



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y
FARMACÉUTICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO



CENTRO DE ESTUDIOS FOTOSINTÉTICOS Y
BIOQUÍMICOS

TESIS DE DOCTORADO

**“MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN
RETRÓGRADA MITOCONDRIAL (RRM)
EN PLANTAS”**

presentada por

Licenciado Diego Alberto Peralta

Directora: Dra. María Victoria Busi
Director: Dr. Diego Fabián Gómez Casati
Rosario, Argentina

2015

MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN RETRÓGRADA MITOCONDRIAL (RRM) EN PLANTAS

Diego Alberto Peralta

Licenciado en Biología Molecular, de la Universidad Nacional
de San Luis

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la cátedra de Química Biológica, laboratorio 3 del Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 23 de septiembre de 2010 y el 11 de febrero de 2016, bajo la dirección de la Dra. María Victoria Busi y la codirección del Dr. Diego Fabián Gomez Casati.

Dra. María Victoria Busi. Director.....
Dr. Diego Fabián Gomez Casati. Co-Director.....
Dra. María Rosa Marano. Miembro del Jurado.....
Dr. Santiago Mora García. Miembro del Jurado.....
Dr. Gustavo Adolfo Martinez. Miembro del Jurado.....
Defendida.....

AGRADECIMIENTOS

Al CONICET por financiar mis recursos personales durante los últimos años de este trabajo de Tesis e incluir a los profesionales de la ciencia en el país.

A la AGENCIA por financiar mis recursos personales y científicos durante los tres primeros años de este trabajo de Tesis.

A la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario por brindarme un espacio de formación y desarrollo durante este trabajo de Tesis Doctoral.

Al CEFOSI por proporcionarme un espacio de trabajo y desarrollo durante el trabajo de Tesis Doctoral. A los directivos del instituto por llevar adelante este lugar de trabajo.

A mis directores María Victoria Busi y Diego Gomez-Casati por la dirección de este trabajo de Tesis, hacerme disponibles los recursos para la realización de la misma y los buenos momentos compartidos desde que llegué al laboratorio.

Al doctor Alejandro Araya por su invaluable aporte en material de trabajo y discusión en los trabajos publicados durante el trabajo de Tesis.

A la doctora Paula Casati por su incondicional aporte de material de trabajo que permitió llevar adelante experimentos durante el trabajo de Tesis.

A todos mis compañeros en el CEFOSI, por permitir la integración humana y científica dentro del instituto.

A mis compañeros de laboratorio, los que ya no están, los que siguen y los nuevos trabajando en el mismo, por su contribución a esta tesis desde lo científico o lo humano, y los incontables buenos momentos compartidos día a día.

A mis padres y hermanos por los valores enseñados, el amor y el cariño brindado de una familia ejemplar y que desde hace 15 años han sabido apoyarme en todo lo emprendido aunque fuese lejos de casa.

A Carlos, Carmen y Julián por permitirme compartir una linda familia junto a Celi y Catalina.

A Celina por su amor y ser la piedra angular de la familia que construimos juntos, por darme lo más hermoso que llena mi corazón día a día, a nuestra hija Catalina. Las amo.

Parte de los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis doctoral llevado a cabo en el Centro de estudios fotosintéticos y bioquímicos han sido publicados en las siguientes revistas científicas y congresos.

- Publicaciones en revistas científicas

· Peralta DA, Araya A, Nardi CF, Busi MV, Gomez-Casati DF. (2013) Characterization of the *Arabidopsis thaliana* E3 Ubiquitin-Ligase AtSINAL7 and Identification of the Ubiquitination Sites. ***PLoS ONE***. 8(8):e73104.

· Turowski VR, Akinin C, Maliandi MV, Buchensky C, Leaden L, Peralta DA, Busi MV, Araya A, Gomez-Casati DF. (2015) Frataxin is localized to both the chloroplast and mitochondrion and is involved in chloroplast Fe-S protein function in *Arabidopsis*. ***PLoS ONE***. 10(10): e0141443.

· Peralta DA, Araya A, Busi MV, Gomez-Casati DF. (2016) The E3 ubiquitin-ligase SEVEN IN ABSENTIA like 7 mono-ubiquitinates in vitro the glyceraldehyde-3-P dehydrogenase 1 isoform and is required for its nuclear localization in *Arabidopsis thaliana*. ***The international Journal of Biochemistry and Cell Biology***. 70, 48-56.

- Publicaciones en Congresos

Congresos Nacionales

· XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular SAIB 2011. Congreso. Potrero de los Funes, Argentina. Characterization of the interaction of GAPC and SINAL7 in plants.

· XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular SAIB 2012. Congreso. Mendoza, Argentina. Characterization of *Arabidopsis thaliana* E3-ubiquitin-ligase SINAL7.

. XLX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular SAIB 2014. Congreso. Rosario, Argentina. Characterization of Arabidopsis SINL7, a potential mediator of a RRM and its interaction with GAPC.

Congresos Internacionales

. 8th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (ICPMB). Congreso. Rosario, Argentina 2013. Characterization of Arabidopsis thaliana E3-ubiquitin-ligase SINL7, a potential mediator of a RRM and its interaction with GAPC.

. EMBO – Ubiquitin and UBLs – At the crossroads from chromatin to protein. Congreso. Buenos Aires, Argentina. 2014. Characterization of Arabidopsis E3-ubiquitin-ligase SINL7, a potential mediator of a RRM and its interaction with GAPC.

INDICE

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	11
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	13
RESUMEN	17
INTRODUCCIÓN	21
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	36
MATERIALES Y MÉTODOS	38
Material biológico	39
Cultivares de <i>A. thaliana</i>	39
Cepas de bacterianas y condiciones de cultivo	40
Medios de cultivo	40
Soluciones Buffer	41
Antibióticos y otros compuestos relacionados	41
Oligonucleótidos, vectores y enzimas de restricción utilizadas	41
Detalle de técnicas	46
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	46
Electroforesis de ADN en geles de agarosa	46
Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	46
Obtención de células competentes	47
Transformación de células competentes	48
Análisis de transformantes	48
Obtención de ADN plasmídico a mini escala	49
Reacciones de digestión empleando enzimas	49
Reacción de ligación	49
Extracción de ARN total	50
Cuantificación de ARN total	50
Obtención de ADN copia	50
Extracción y cuantificación de ADN genómico	51
Clonados	51
Clonados dependientes de ligasa	52
Expresión y purificación de proteínas recombinantes	52
Extracción de proteínas de material vegetal	53
Cuantificación de proteínas	53
Electroforesis y detección inmunológica	53
Obtención de anticuerpos policlonales	54
Ensayo de <i>Far western blot</i>	54

Ensayo de <i>pull-down</i>	55
Ensayo de actividad ubiquitin ligasa E3	55
Mutaciones sitio-dirigidas (Lys-a-Ala)	56
Dicroísmo circular (CD)	57
Determinación de la actividad enzimática de GAPC y mutantes de GAPC	57
Aislamiento de proteínas Nucleares	57
Análisis de espectrometría de masa	58
Análisis estadístico	58
Transformación de plantas de <i>A. thaliana</i> por " <i>Floral Dip</i> "	59
Análisis por <i>real time</i> qPCR	60
Tratamiento con UV-B en plantas de <i>Arabidopsis</i>	60
Identificación y selección de mutantes de homocigotas de SINAL7	61
Construcción y selección de plantas transgénicas sobreexpresantes de SINAL7	61
Longitud de raíz y diámetro del tallo principal	63
Análisis del área de la roseta.	63
Número de hojas de roseta y caulinares	64
Determinación de peso seco	64
Cuantificación de clorofilas	64
Alineamiento de secuencias y análisis filogenético	64
Tiempo de floración	65
Análisis de ERO	65
Actividad catalasa total	66
Medidas de consumo de oxígeno	66
Determinación del número de piezas florales	66
Determinación del número de silicuas y semillas	67
Germinación de los granos de polen	67
Programas bioinformáticos utilizados	68
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
CAPÍTULO I - Caracterización bioquímica de SINAL7	70
Caracterización de la ubiquitina ligasa E3 de <i>A. thaliana</i>	
SINAL7 – Identificación de los residuos involucrados en la actividad	71
Clonado, expresión y purificación de SINAL7 recombinante	71
Análisis por <i>Western blot</i> de SINAL7 recombinante	76
SINAL7 presenta actividad ubiquitina ligasa E3 y se autoubiquitina	77
Evaluación de los posibles residuos involucrados en la actividad ubiquitina ligasa E3	81
Expresión y purificación de las proteínas modificadas SL7K23A, SL7K124A y SL7K23AK124A	83
Evaluación de la estructura secundaria de las proteínas SINAL7, SL7K23A, SL7K124A y SL7K23AK124A	85
CAPÍTULO II - Efecto de SINAL7 sobre GAPC1	89
SINAL7 ubiquitina a GAPC1 <i>in vitro</i> y es necesaria para su localización nuclear en <i>Arabidopsis thaliana</i>	90

SINAL7 interactúa físicamente con GAPC1	91
El residuo K231 en GAPC1 está involucrado en la interacción con SINAL7	95
Efecto de SINAL7 sobre los parámetros cinéticos de GAPC1	97
GAPC1 es mono-ubiquitinada por SINAL7	99
El residuo K76 de GAPC1 está involucrado en la ubiquitinación	99
La ubiquitinación de GAPC1 disminuye su actividad catalítica	102
Las modificaciones K76A y K231A en GAPC1 no afectan el plegamiento proteico	103
GAPC está ausente en el núcleo de plantas mutantes <i>signal7</i>	104
CAPÍTULO III - Estudio funcional <i>in vivo</i> de SINAL7	110
Caracterización fenotípica de plantas deficientes y sobreexpresantes de SINAL7	111
Niveles de transcritos de <i>SINAL7</i> en diferentes órganos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	111
<i>SINAL7</i> muestra un comportamiento dependiente de luz en flores	113
Los niveles de <i>SINAL7</i> aumentan por exposición a UV-B	114
Caracterización funcional de SINAL7	115
Identificación de mutantes homocigotas de <i>A. thaliana</i> del gen SINAL7	115
Construcción de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> sobreexpresantes de SINAL7	118
Caracterización fenotípica de las plantas sobreexpresantes y deficientes de SINAL7	121
Determinación de los niveles de transcritos de <i>SINAL7</i>	121
Determinación de los niveles de proteína SINAL7 en plantas	122
La sobreexpresión de SINAL7 no afecta la longitud de la raíz	125
La sobreexpresión de SINAL7 afecta el desarrollo del tallo principal	126
Las plantas <i>SINAL7.1</i> y <i>SINAL7.2</i> presentan mayor área foliar, peso seco de roseta, número de hojas de roseta y caulinares	127
La influencia de SINAL7 en la senescencia	132
Caracterización de los genes de la familia <i>SINA</i> en <i>Arabidopsis</i> . Alineamiento de secuencias y análisis filogenético	138
Análisis de los niveles de transcritos de homólogos de SINAL7	142
Estudio de la participación de SINAL7 en el tiempo de floración y la formación y desarrollo de los órganos reproductivos de <i>Arabidopsis</i> . Análisis del número de piezas florales, de silicuas y de la viabilidad del polen.	143
Análisis molecular de genes que afectan el desarrollo de silicuas y semillas	152
Determinación de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO) en las líneas de plantas mutantes y sobreexpresantes de SINAL7	156
Determinación de los niveles de ARNm de catalasas y de la actividad catalasa total	158

Determinación de los niveles de ARNm de proteínas componentes de complejos mitocondriales	161
La sobreexpresión de SINAL7 aumenta el consumo de oxígeno	163
CONCLUSIONES	168
BIBLIOGRAFÍA	171

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mitocondria.

Figura 2. Esquema de la coordinación entre el genoma nuclear y las organelas intracelulares.

Figura 3. Esquema de la organización intrón-exón del gen *SINAL7* de *A. thaliana*.

Figura 4. Degradación de proteínas vía ubiquitina-proteosoma 26S.

Figura 5. Localización de las principales fuentes de NO y ERO en plantas.

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 0.8 % (P/V) de los productos de la restricción del vector pGEMT-SINAL7.

Figura 7. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8 % (P/V) de productos de amplificación por PCR de *SINAL7*.

Figura 8. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 % (P/V) del análisis de expresión de la proteína recombinante *SINAL7*.

Figura 9. Análisis mediante geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 % (P/V) de la purificación de la proteína recombinante *SINAL7*.

Figura 10. Identificación de *SINAL7* por *Western blot*.

Figura 11. Actividad ubiquitina ligasa E3 de *SINAL7*.

Figura 12. Identificación de *SINAL7* auto-ubiquitinada.

Figura 13. Controles del ensayo de actividad ubiquitina ligasa E3.

Figura 14. Predicción de sitios de ubiquitinación mediante *UbPred*.

Figura 15. A- Secuencia proteica de *SINAL7* señalando los residuos de lisina.

Figura 16. Actividad E3 ligasa de proteínas modificadas de *SINAL7*.

Figura 17. Espectro de dicroísmo circular de *SINAL7* y mutantes de *SINAL7*.

Figura 18. Gel de poliacrilamida al 12 % (P/V) del análisis de expresión de la proteína recombinante GAPC1.

Figura 19. Identificación de SINAL7 y GAPC1 recombinante por *Western blot*.

Figura 20. Análisis de la purificación de GAPC1.

Figura 21. Interacción entre SINAL7 y GAPC1 por *far Western blot*.

Figura 22. Análisis de la interacción de SINAL7 con GAPC1 o GAPC1K231A por *Pull down*.

Figura 23. Caracterización de los parámetros cinéticos de GAPC1 recombinante.

Figura 24. Actividad ubiquitina ligasa E3 SINAL7 en presencia de GAPC1 y mutantes de GAPC1. Ensayo de actividad ubiquitina ligasa E3 SINAL7 en presencia de GAPC1 y GAPC1K231A. Ensayo de actividad ubiquitina ligasa E3 SINAL7 en presencia de GAPC1 y GAPC1K76A.

Figura 25. Determinación de la actividad específica de GAPC1.

Figura 26. Espectro de dicroísmo circular de GAPC1 recombinante y GAPC1 modificadas.

Figura 27. Detección de GAPC1 en extractos nucleares de flores de *Arabidopsis thaliana*.

Figura 28. Niveles de transcritos de *SINAL7* en diferentes órganos de plantas de *Arabidopsis thaliana* Col0.

Figura 29. Niveles de transcritos de *SINAL7* a lo largo del día en plantas de *A. thaliana* Col0.

Figura 30. Efecto del UV-B en los niveles de transcritos de *SINAL7* en flores de plantas de *A. thaliana* Col0.

Figura 31. Esquema de la estructura del ADN de las plantas mutantes de *SINAL7* (*signal7.1* and *signal7.2*) y los cebadores utilizados para la selección de líneas homocigotas.

Figura 32. Identificación de plantas de *Arabidopsis* mutantes homocigotas en el gen *SINAL7* en las líneas SALK_096989 (*signal7.1*) y CS833574 (*signal7.2*). A- Identificación de la presencia del ADN-T en las líneas mutantes de *Arabidopsis*.

Figura 33. Análisis de niveles de transcripto del gen *SINAL7*.

Figura 34. Selección de plantas transgénicas 35SCaMV:*SINAL7* resistentes a kanamicina.

Figura 35. Análisis de la amplificación del gen *ACTINA2*.

Figura 36. Análisis de la presencia del transgen.

Figura 37. Niveles de transcripto de *SINAL7* determinados por *real time* qPCR.

Figura 38. Niveles relativos de proteína *SINAL7* en plantas.

Figura 39. Imagen comparativa de líneas de plantas de *A. thaliana* Col0, deficientes de *SINAL7* y sobreexpresantes de *SINAL7*.

Figura 40. Longitud de la raíz principal.

Figura 41. Diámetro del tallo principal.

Figura 42. Análisis del área y peso seco de la roseta.

Figura 43. Análisis número de hojas de la roseta.

Figura 44. Análisis número de hojas caulinares.

Figura 45. Hojas *A. thaliana* en proceso de senescencia.

Figura 46. Niveles de transcripto de *CAB1* determinados por *real time* qPCR.

Figura 47. Niveles de clorofila a y b en plantas.

Figura 48. Niveles de transcripto determinados por *real time* qPCR de genes relacionados con la senescencia en *Arabidopsis*.

Figura 49. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de proteínas de la familia SINA en *A. thaliana*.

Figura 50. Árbol filogenético de la familia *seven in absentia* de *A. thaliana*.

Figura 51. Niveles de transcritos de homólogos de *SINAL7* determinados por *real time* qPCR.

Figura 52. Análisis del número de piezas florales.

Figura 53. Análisis de las silicuas.

Figura 54. Estudio de las semillas en *A. thaliana*.

Figura 55. Análisis de las semillas de las diferentes líneas.

Figura 56. Foto representativa de las silicuas y semillas encontradas en las diferentes líneas de plantas.

Figura 57. Germinación del grano de polen.

Figura 58. Niveles de transcritos de genes involucrados en floración determinados por *real time* qPCR.

Figura 59. Análisis de especies reactivas del oxígeno (ERO) en flores de *A. thaliana*.

Figura 60. Análisis de especies reactivas del oxígeno (ERO) en hojas de roseta de *A. thaliana*.

Figura 61. Niveles de transcripto de catalasas determinados por *real time* qPCR.

Figura 62. Niveles de actividad catalasa total.

Figura 63. Niveles de transcritos de genes que codifican proteínas de complejos mitocondriales en plantas.

Figura 64. Niveles de captación de oxígeno en las plantas.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Familia de genes *SINA* de *A. thaliana*.

Tabla 2. ERO y ERN principales.

Tabla 3. Antibióticos y otros compuestos utilizados.

Tabla 4. Cebadores usados en este trabajo.

Tabla 5. Vectores usados en este trabajo.

Tabla 6. Enzimas de restricción usadas en este trabajo.

Tabla 7. Porcentajes de estructura secundaria calculados mediante el algoritmo K2D2.

Tabla 8. Predicción de sitios de ubiquitinación en la secuencia proteica de GAPC1 mediante UbPred (<http://www.ubpred.org/>).

Tabla 9. Secuencias analizadas en el alineamiento de las proteínas de la familia *SINA* en *A. thaliana*.

Tabla 10. Análisis del tiempo de floración en plantas de *A. thaliana*.

Tabla 11. Análisis de las silicuas en plantas de *A. thaliana*.

Tabla 12. Análisis de las semillas en plantas de *A. thaliana*.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	alanina
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ADNg	ácido desoxirribonucleico genómico
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
C	hace referencia a los complejos mitocondriales
CaMV	virus del mosaico del coliflor
CAT	catalasa
Col0	ecotipo Columbia 0 de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>
Da	daltons
dATP	desoxiadenosina fosfato
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
E1	enzima activadora de ubiquitina
E2	enzima conjugadora de ubiquitina
E3	enzima ligasa de ubiquitina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
ERO	especies reactivas del oxígeno

h	hora
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
K	lisina
kDa	kilodaltons
LB	Luria-Bertani
M	molar
Min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
mmol	milimolar
MS	medio Murashige-Skoog
MS – kan	medio Murashige-Skoog con kanamicina
NAD ⁺	dinucleótido de nicotinamida-adenina
NBT	nitroblutetrazolium
P/V	peso en volumen
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
qPCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo

SDS	dodecil sulfato de sodio
SINAL7	seven in absentia like 7
Tris	ácido tricarbóxico
U	unidad enzimática
Ub	ubiquitina
UPS	Sistema de proteosoma dependiente de ubiquitina
UV	ultravioleta

- Nomenclatura para genes y proteínas

<i>GAPC1</i>	gen <i>gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>gapc1</i>	gen mutante en <i>gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>
GAPC1/2	proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 1 o 2 citosólica de <i>A. thaliana</i>
<i>SINAL7</i>	gen <i>seven in absentia like 7</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>sin7.1</i> y <i>7.2</i>	gen mutante en <i>seven in absentia like 7</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>SINAL7.1</i> y <i>7.2</i>	gen <i>seven in absentia like 7</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>
SINAL7	proteína <i>seven in absentia like 7</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>

RESUMEN

- Resumen - Mecanismos de señalización retrógrada mitocondrial (RRM) en plantas.

La mitocondria tiene una función crítica en diferentes procesos celulares tales como el metabolismo energético, metabolismo del carbono y nitrógeno, termorregulación, homeostasis del calcio y hierro, regulación de la apoptosis y en la síntesis de grupos Fe-S y hemo. A pesar de que la mitocondria tiene su propio material genético, más del 98% de las proteínas que se localizan en ella están codificadas en el genoma nuclear. De esta manera, el proceso de biogénesis mitocondrial es complicado debido a que requiere una fina coordinación de la expresión de ambos genomas, nuclear y mitocondrial. Por esto, la comunicación entre la mitocondria y el núcleo es una parte esencial en la biogénesis de esta organela. Existen dos mecanismos generales de comunicación entre los genomas, nuclear y mitocondrial. Uno de ellos involucra la regulación retrógrada mitocondrial (RRM) que es un mecanismo de respuesta crucial que tienen diferentes organismos entre los cuales se encuentran las plantas, animales y hongos. Con el objeto de ampliar los conocimientos sobre los mecanismos de señalización núcleo-mitocondria, en el laboratorio se desarrollaron tres modelos de estudio que presentan una disfunción mitocondrial en plantas de *Arabidopsis*. En los tres modelos, la expresión de los transcritos del gen *seven in absentia like 7 (SINAL7)* se mostró alterada, convirtiéndolo en un potencial candidato a participar de RRM en plantas. SINA (predicha como enzima ubiquitina ligasa E3) ha sido asociada a diversos procesos en plantas, donde el rol como ligasa E3 en la misma, resultaría de gran importancia sabiendo que la ubiquitinación es una modificación post-traducciona que tanto para degradación proteica, como señalización cumplen roles claves en importantes procesos celulares. Además uno de los modelos de plantas con disfunción mitocondrial donde *SINAL7* se observó alterado, es una línea deficiente en *GAPC1* de *Arabidopsis*, una enzima citosólica de la vía glucolítica que cumple otros roles además de su actividad catalítica. Sumado a esto, *GAPDH* el homólogo murino de *GAPC1* interactúa con *Siah1*, homólogo murino de *SINAL7* de *Arabidopsis*, activando una cascada de señalizaciones que desencadenan apoptosis. Con estos antecedentes, durante este trabajo de tesis, se abordó la caracterización *in*

vitro e *in vivo* de SINAL7. Para esto, se clonó, expresó (en *E. coli*) y purificó mediante cromatografía de afinidad en columna, la proteína recombinante SINAL7. Posteriormente, se demostró que SINAL7 recombinante presenta actividad ubiquitina ligasa E3, siendo capaz de auto-ubiquitinarse. Además se demostró la interacción de SINAL7 con la proteína GAPC1 mediante las técnicas de *far western blot* y *pull down*, donde el residuo K213 en GAPC1 está involucrado en dicha interacción. Se demostró que la interacción de SINAL7 con la proteína de la glicólisis GAPC1, modifica los parámetros cinéticos de la misma. Además se demostró que GAPC1 es blanco de ubiquitinación de SINAL7, siendo mono-ubiquitinada en el residuo K76 de la enzima glucolítica, por la E3 ligasa. Además, la ubiquitinación de GAPC1 abole completamente su actividad catalítica. Posteriormente, con el fin de estudiar el rol de SINAL7 *in vivo*, se aislaron plantas de *A. thaliana* mutantes homocigota en el gen *SINAL7*, donde se demostró que la presencia de GAPC1 en el núcleo celular de plantas de *Arabidopsis* es dependiente de la presencia de SINAL7 en las plantas. Además se obtuvieron plantas transgénicas sobreexpresantes de SINAL7, que junto a las plantas mutantes, fueron utilizadas en los ensayos de caracterización fenotípica donde se estudió la influencia de SINAL7 en las plantas. De los ensayos realizados en las plantas, se observó que las plantas sobreexpresantes presentan un mayor vigor que las plantas tipo salvaje y las mutantes, siendo además plantas híbridas que presentan afectada la floración y fructificación. Además se propone mediante experimentos de *real time* qPCR que algunos genes, parálogos de SINAL7, podrían estar complementando su función en las líneas mutantes que no presentan un fenotipo marcado comparado con las sobreexpresantes. Además se observó un aumento en los niveles de especies reactivas del oxígeno en las plantas sobreexpresantes y un interesante retardo en la senescencia de las plantas determinado por los niveles clorofilas, ausencia de amarilleo característico de la senescencia y por los niveles de transcritos de genes involucrados en este proceso. Por último, SINAL7 estaría involucrado en los procesos de floración y fructificación, donde la sobreexpresión de SINAL7 acelera la floración e influencia de negativamente la fructificación, según los parámetros fenotípicos analizados en las plantas y los niveles de

transcriptos de factores de transcripción involucrados en estos procesos. De esta manera, durante este trabajo de tesis se llevó adelante la caracterización de SINAL7 que mostró gran influencia en parámetros vegetativos y reproductivos del desarrollo en *Arabidopsis*.

INTRODUCCIÓN

En las células de diversos organismos pertenecientes a los reinos vegetal, animal, protista y fungi, las mitocondrias son organelas semiautónomas que presentan doble membrana, genoma propio, maquinaria replicativa y de traducción propia. Mientras que la mitocondria tiene su propio material genético, más del 98% de las proteínas que se localizan en esta organela están codificadas en el genoma nuclear [1, 2]. Es importante destacar que diversas proteínas que participan en la replicación, la transcripción, la maduración y la edición de los ARNs deben ser importadas a la mitocondria para asegurar la expresión de los genes codificados por esta organela. Muchas de estas proteínas no han sido aún identificadas [1, 3].

En la mitocondria, procesos celulares importantes como el desarrollo y crecimiento celular dependen de la integridad de la función de esta organela. La misma, cumple funciones críticas en diferentes procesos celulares tales como el metabolismo energético (generación de energía disponible en forma de ATP, adenosina trifosfato) (Figura 1 A), metabolismo del carbono y nitrógeno (oxidación de ácidos orgánicos a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, TCA o ciclo de Krebs), termorregulación, homeostasis del calcio y hierro, regulación de la apoptosis y en la síntesis de grupos Fe-S y hemo [4-6]. Los procesos que permiten generar ATP se encuentran compartamentalizados dentro de las mitocondrias a causa de la presencia de las membranas interna (MI) y externa (ME) de esta organela. Entre las membranas interna y externa, se delimita un espacio intermembrana (EIM), mientras que la MI delimita la matriz mitocondrial (MM) (Figura 1 B y C). La ME está formada principalmente por poros proteicos que permiten el ingreso de iones y moléculas de bajo tamaño molecular, mientras que la MI es mucho más selectiva, similar a la membrana plasmática de eucariotas. En la MI se encuentran integrados cinco complejos multiproteicos encargados de la fosforilación oxidativa (Figura 1 A).

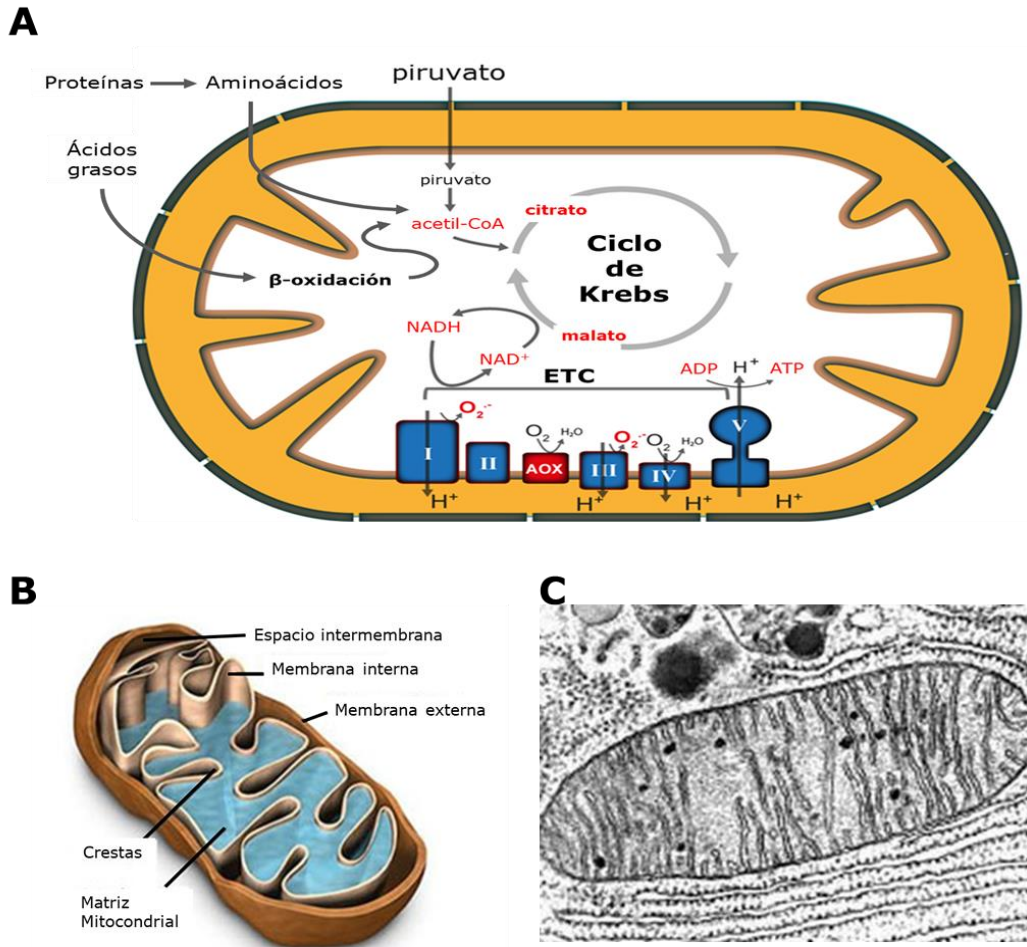


Figura 1. Mitocondria. **A** - Esquema de las reacciones y la localización de las mismas del metabolismo mitocondrial. ETC: cadena de transporte de electrones. **B** - Esquema tridimensional de los espacios delimitados por las membranas mitocondriales en la mitocondria. **C** - Fotografía de mitocondria tomada en microscopio electrónico de barrido (Adaptado de <http://emp.byui.edu/wellerg/The%20Cell%20Lab/Eukaryotic%20Cells/The%20Eukaryotic%20Cell%2003%20Cell.html>).

El proceso de biogénesis mitocondrial es complejo debido a que requiere una fina coordinación de la expresión de ambos genomas, nuclear y mitocondrial. Por esto, la comunicación entre la mitocondria y el núcleo es una parte esencial en la biogénesis de esta organela [1]. Además, la organela debe responder a cambios metabólicos y del ambiente celular y controlar los daños causados por mutaciones en el DNA mitocondrial que pueden afectar la estructura y la función de los complejos respiratorios mitocondriales, llevando a una alteración de la fosforilación oxidativa [4].

En los organismos vegetales, existe una fina coordinación de la expresión de genes debido principalmente a la existencia de tres genomas (nuclear,

cloroplástico y mitocondrial) en respuesta a programas de desarrollo, señales del ambiente, el funcionamiento de las organelas, en particular, los cloroplastos y las mitocondrias y la comunicación cruzada (*cross-talk*) entre las mismas. De esta manera, se dan diversos tipos de señalización dentro de las células como se muestra en la Figura 2 (adaptado de Woodson y Chory, 2008) [7].

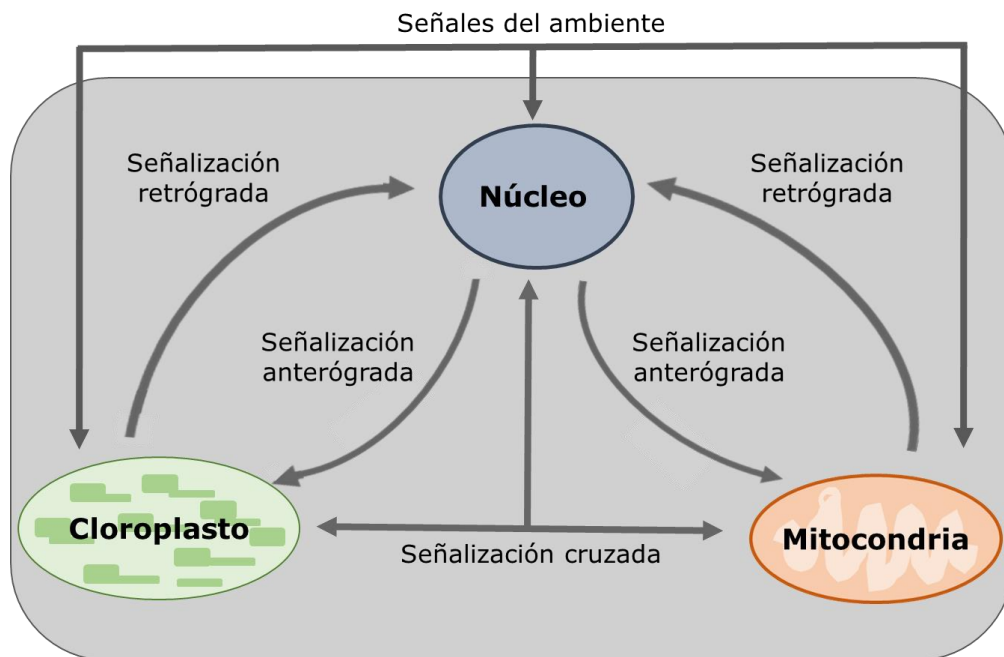


Figura 2. Esquema de la coordinación entre el genoma nuclear y las organelas intrcelulares. El diagrama muestra la comunicación entre el núcleo, los cloroplastos y las mitocondrias. Los tipos de señalización se muestran con flechas (Adaptado de Woodson y Chory, 2008).

En términos de señalización, en organismos vegetales, se ha descrito con gran detalle la regulación retrógrada de plástidos en *Arabidopsis*, utilizando como modelo mutantes *GUN* (*genomes uncoupled*) [8]. Entre otros ejemplos, se describió que el factor GUN4 participa en la señalización núcleo-cloroplasto regulando el tráfico celular de la Mg-protoporfirina IX, intermediario de la síntesis de clorofila, que fue postulado como una señal plastídica que reprime la transcripción nuclear de genes relacionados con la fotosíntesis [8].

Focalizándonos particularmente en la mitocondria, existen dos mecanismos generales de comunicación entre su propio genoma y el genoma nuclear: Uno que involucra un conjunto de factores de transcripción y/o activadores que regulan la transcripción génica en ambos genomas y que responden a estímulos externos y el segundo, involucra respuestas celulares al estado funcional de la mitocondria. La alteración de la expresión génica a nivel nuclear dirigida por cambios metabólicos o señales originadas en esta organela es un proceso que se denomina "regulación o señalización retrógrada" [4, 9]. En el caso de la señalización de la mitocondria hacia el núcleo se hace referencia como señalización retrógrada mitocondrial [10]. La regulación retrógrada mitocondrial (RRM) es un mecanismo de respuesta crucial que tienen diferentes organismos entre los cuales están las plantas, animales y hongos [9].

La pérdida de las funciones mitocondriales, y en algunos casos, la pérdida de la RRM, está asociada a diversas enfermedades en humanos como enfermedad Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, diabetes tipo 2 y cáncer [10, 11]. Existen numerosos estudios sobre los mecanismos de RRM en levaduras. *Saccharomyces cerevisiae* responde a una disfunción mitocondrial alterando el metabolismo del carbono y el nitrógeno [10]. Las células deficientes en la respiración cambian su metabolismo con el fin de mantener los niveles de los intermediarios del ciclo del TCA y su función. Por ejemplo, en células de levaduras que carecen de genoma mitocondrial (*rho0*), se observó una alteración en la expresión de genes nucleares como *MRP13* (proteína ribosomal de mitocondrias), *DLD3* (lactato dehidrogenasa) y *CIT2* (citrato sintasa, asociada con el ciclo del TCA) [5, 10, 12]. En particular, la información más detallada del mecanismo de RRM viene de estudios sobre la regulación del gen *CIT2* [12]. La expresión de *CIT2* puede ser inducida más de 50 veces en células con disfunción mitocondrial. Se ha descrito la existencia de 3 reguladores positivos Rtg1p, Rtg2p y Rtg3p, que son factores de transcripción de la familia bHLH-Zip (*helix-loop-helix-leucine zipper*) [12] y 4 reguladores negativos (Mks1, Lst8p, Bmh1p y Bmh2p) que controlan la expresión del gen *CIT2* [10].

La naturaleza sésil de las plantas les ha permitido desarrollar diversos mecanismos para completar los distintos estadios de desarrollo aún bajo situaciones adversas [13-15]. De esta manera, las plantas integran diversas vías de señalización, detectando información específica que les permita modular la actividad energética dentro de la célula, cubriendo las demandas del crecimiento y desarrollo. En general, las plantas integran señales que provienen del medio ambiente (nutricionales, de temperatura y calidad de luz) y de su interacción con el entorno (interacción con patógenos) [16-18]. Las señales detectadas en el exterior se transmiten al interior mediante vías que involucran hormonas, sistemas redox (glutación y ascorbato) y especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN), entre otras [19-21]. Este sistema de detección está sujeto al reloj circadiano y es específico de cada tejido, órgano y especie [22].

La mitocondria cumple un rol fundamental en la integración de las señales mencionadas [23-26]. Estas organelas regulan su organización proteica, composición, forma y número permitiendo un fino ajuste de las actividades metabólicas asociadas con la síntesis de moléculas energéticas, moléculas que intervienen en el metabolismo redox y segundos mensajeros [25].

Se conoce que diversos factores, como estrés biótico, abiótico, mutaciones y la acción de inhibidores de los complejos respiratorios pueden causar una disfunción mitocondrial y esto podría influenciar la expresión de algunos genes nucleares [9, 10, 27-32]. Los cambios a nivel de la transcripción nuclear llevan a la reconfiguración del metabolismo a fin de que las células se adapten a la nueva situación. Si bien existen algunos ejemplos de RRM en plantas, es escasa la información sobre los mecanismos moleculares que inician la señalización mitocondrial. Se desconoce además, cómo estas señales modifican la expresión de genes nucleares como así también los factores involucrados en las vías de señalización responsables del control de la expresión génica de proteínas mitocondriales codificadas en núcleo.

Con el objeto de ampliar los conocimientos sobre los mecanismos de señalización núcleo-mitocondria, en el laboratorio se desarrollaron 3 modelos de estudio en plantas de *Arabidopsis thaliana* que presentan una disfunción mitocondrial:

(i) - Plantas con disfunción mitocondrial inducida por en la expresión de un gen "no-editado" de la subunidad 9 de la ATP sintasa mitocondrial (*u-ATP9*) [27, 28]. En este sistema, la deficiencia mitocondrial activa un conjunto de genes nucleares, en particular tres genes que codifican para subunidades del complejo I (CI) y otros factores asociados a este complejo, como por ejemplo *ARR2* (*Arabidopsis Response regulador 2*), activador transcripcional expresado predominantemente en polen cuya acción es ejercida sobre algunos genes del CI [33].

(ii) - Plantas que presentan deficiencia en el ensamblaje de proteínas Fe-S. Recientemente se describió la participación de *AtFH*, homólogo de frataxina de *Arabidopsis*, en la biogénesis de proteínas Fe-S mitocondriales [34]. Debido a que la depleción completa de *AtFH* es letal, se aisló una mutante insercional por ADN-T deficiente en *AtFH* (*knock down, atfh-1*) y se construyó además una línea antisentido (*as-AtFH*). En este sistema, la disfunción mitocondrial activa algunos genes relacionados con el ciclo del TCA (aconitasa y *SDH-1*, una de las subunidades de la succinato deshidrogenasa), además de otros genes relacionados con respuesta a estrés [34].

(ii) - Plantas de *Arabidopsis* con deficiencia en una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa citosólica (*GAPC1*). *GAPC1* es una de las dos *GAPC* citosólicas presentes en *Arabidopsis*. Si bien es una proteína localizada en el citoplasma, se encontró asociada a mitocondrias junto con otras enzimas glucolíticas [35, 36]. Recientemente se llevó a cabo la caracterización de dos líneas deficientes en *GAPC1*, una mutante insercional de ADN-T (*gapc1*) y una línea antisentido (*as-GAPC1*). En ambas líneas, la deficiencia de *GAPC1* provoca una disfunción mitocondrial con incremento en la expresión de genes nucleares relacionados con el metabolismo del carbono, fotosíntesis y estrés [37].

Trabajo previo del laboratorio estuvo enfocado en el análisis del transcriptoma de las plantas con disfunción mitocondrial *gapc1* [37] y las líneas *u-ATP9* [38] y además, se llevaron a cabo experimentos de *real time* qPCR en ambas líneas deficientes en *AtFH* [39]. En todas las líneas mencionadas se observó la alteración en la expresión de diferentes grupos

de genes relacionados con biogénesis mitocondrial, síntesis y degradación de proteínas, estrés, metabolismo del carbono y señalización, incluidos numerosos genes que codifican factores de transcripción, proteínas de unión al ADN y proteínas asociadas a respuesta hormonal. Es importante aclarar que existen muchas similitudes pero también numerosas divergencias entre los genes que tienen alterada su expresión, lo que sugiere la ocurrencia de diferentes vías de RRM en los tres modelos de disfunción mitocondrial mencionados.

Entre los genes relacionados con mecanismos de señalización y que presentan alterada su expresión en todos los modelos se encuentran:

- (i) genes que codifican algunos factores de transcripción del tipo MYB (*MYB3*, *MYB30*, *MYB58* y *MYB103*), que presentan en su estructura un dominio MYB de unión al ADN, y están asociados a diversas funciones de defensa, desarrollo vegetal y particularmente *MYB103*, involucrado con el desarrollo del polen y células del tapetum lo que lleva a un fenotipo de macho-esterilidad [40-43];
- (ii) *ARR2* (*Arabidopsis Response Regulator 2*), involucrado en la activación transcripcional de algunas subunidades del CI mitocondrial [33] y además asociado a un sistema de dos componentes que regula diferentes vías de transducción de señales iniciadas por hormonas vegetales como ABA, auxinas y etileno [44];
- (iii) genes relacionados con señalización de auxinas como *AREB3*, un factor de transcripción bZIP involucrado en metabolismo del ABA [45];
- (iv) genes relacionados con la familia SINA (*seven in absentia*) como *SINAL7* (At5g37890, *seven in absentia like 7*) una familia de proteínas que presentarían actividad ubiquitina ligasa E3. Estos genes que se expresaron diferencialmente en los tres modelos con disfunción mitocondrial, son potenciales candidatos a participar en vías de señalización retrógrada mitocondrial.

En el presente trabajo de tesis doctoral nos centramos en el estudio de SINAL7 como potencial mediador de vías de RRM, llevando a cabo su caracterización bioquímica *in vitro* y caracterización funcional en plantas de *Arabidopsis thaliana* (mutantes deficientes y plantas sobreexpresantes del gen *SINAL7*), mediante el análisis del fenotipo de las mismas. A continuación se introducen los escasos conocimientos relacionados a este gen y además, algunos procesos celulares donde podría estar implicado con el fin de facilitar la comprensión del trabajo realizado y presentado en los diferentes capítulos de la tesis.

El gen *seven in absentia-like 7* (At5g37890, *SINAL7*) de *Arabidopsis thaliana*, codifica para una proteína RING *finger* [46, 47] con las características de las ubiquitina ligasas E3 del tipo C3HC4. *SINAL7* se encuentra ubicado en el cromosoma 5 de *A. thaliana*, contiene un intrón y el análisis de su secuencia de nucleótidos (www.arabidopsis.org) muestra la presencia de dos marcos abiertos de lectura, uno de ellos de 191 nucleótidos (pseudogen que no codifica producto proteico) y el otro de 861 nucleótidos (Figura 3), que codifica para una proteína de 287 aminoácidos con una masa aproximada de 34 kDa.

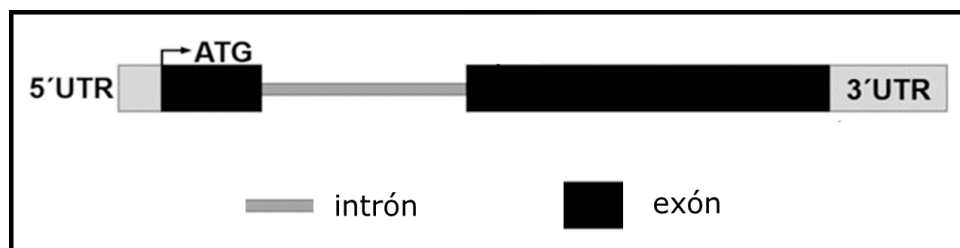


Figura 3. Esquema de la organización intrón-exón del gen *SINAL7* de *A. thaliana*. El gen contiene dos exones y un intrón.

El primer homólogo de SINA fue descrito en *Drosophila* y luego en humanos y ratones, asociado al desarrollo de un foto-receptor [48-50]. La superfamilia SINA posee importantes funciones en el control del desarrollo y la degradación de proteínas mediada por el proteosoma. Estas proteínas son parte esencial de la maquinaria de modificación de proteínas encontradas en todos los organismos eucariotas [46, 51]. El genoma de *A. thaliana*

contiene más de mil genes que codifican enzimas E3 ligasas, además existen 18 genes de la familia SINA (www.ncbi.nlm.nih.gov) (tabla 1). Si bien SINA se relaciona con la actividad ubiquitina E3 ligasa, también se lo ha asociado a procesos como respuesta hormonal, resistencia a patógenos y crecimiento en las plantas [48, 52].

Nombre	Locus	Nombre	Locus
<i>SINA</i>	At3g13672	<i>SINAL4</i>	At1g66650
<i>SINAT1</i>	At2g41980	<i>SINAL5</i>	At1g66660
<i>SINAT2</i>	At3g58040	<i>SINAL6</i>	At5g37870
<i>SINAT3</i>	At3g61790	<i>SINAL7</i>	At5g37890
<i>SINAT4</i>	At4g27880	<i>SINAL8</i>	At5g37900
<i>SINAT5</i>	At5g53360	<i>SINAL9</i>	At5g37910
<i>SINAL1</i>	At1g66610	<i>SINAL10</i>	At5g37930
<i>SINAL2</i>	At1g66620	<i>SINAL11</i>	At5g62800
<i>SINAL3</i>	At1g66630	<i>PEX14</i>	At5g62810

Tabla 1. Familia de genes *SINA* de *A. thaliana*. Existen dieciocho genes *SINA* en el genoma de *A. thaliana*. En la tabla se detalla el nombre y número de acceso para cada uno de ellos.

La ubiquitinación de proteínas es un mecanismo importante que las dirige a degradación por el proteosoma y se constituye en un proceso relevante en la regulación de funciones celulares claves [53-55]. La ubiquitinación es llevada a cabo por un proceso de tres pasos que involucra la activación de ubiquitina (Ub) por una enzima E1, la transferencia de Ub a una proteína E2 y finalmente una ubiquitina ligasa E3 cataliza la transferencia del péptido Ub a una proteína aceptora o blanco, en el caso de las E3 ligasas de tipo RING como sería el caso de *SINAL7* (Figura 4). Las enzimas E3 de este tipo, son responsables del reconocimiento específico de la proteína blanco, convirtiendo al estudio de las proteínas E3 esencial para comprender los

mecanismos regulatorios de procesos celulares fundamentales en la vía de degradación de proteínas.

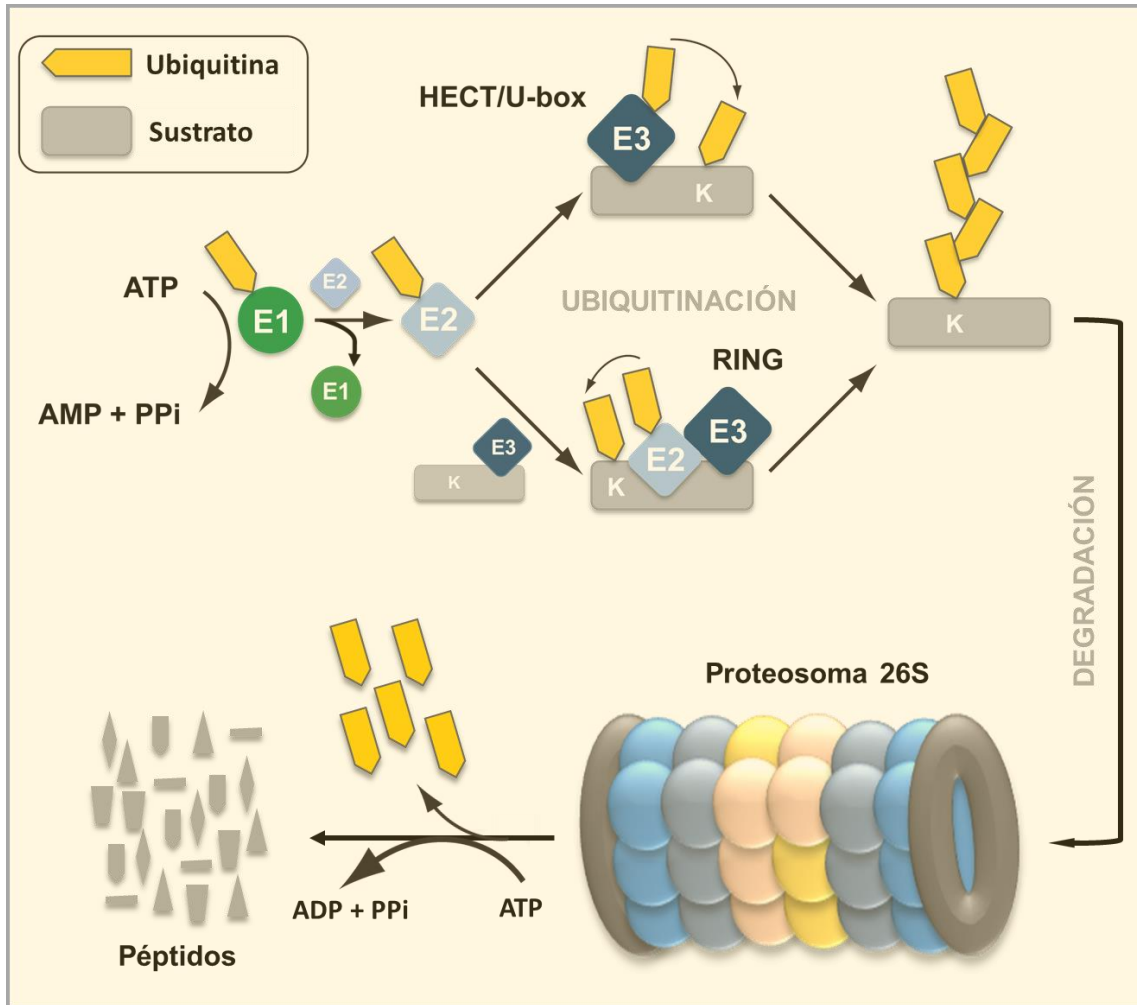


Figura 4. Degradación de proteínas vía ubiquitina-proteosoma 26S. Una molécula de ubiquitina se une a la enzima activadora E1 (círculo verde) en una reacción dependiente de ATP. La enzima conjugadora de ubiquitina E2 (rombo celeste) une ubiquitina. Luego según el tipo de E3 ligasa (rombo azul) existen dos posibilidades, la enzima E3 une ubiquitina, liberando a E2 y ubiquitinando la proteína sustrato en un residuo de lisina (K) en el caso de las E3 ligasas tipo HECT/U-box, o bien, la enzima E3 (que previamente se unió al sustrato mediante un dominio específico de unión en el extremo C-terminal de la E3) se une a la enzima E2 (en el extremo N-terminal de la E3) que transfiere la molécula de ubiquitina al sustrato en un residuo de lisina, en el caso de las E3 ligasas de tipo RING (como SINAL7). Luego de sucesivas reacciones de ubiquitinación sobre la proteína sustrato, el proteosoma reconoce la cadena de ubiquitina y degrada la proteína sustrato, liberando aminoácidos, péptidos y moléculas de ubiquitina para ser utilizadas en un nuevo ciclo de ubiquitinación (Adaptado de Nagy y Dikic, 2010 [56]).

Considerando la importancia del rol del sistema ubiquitina-proteosoma en la regulación de la fisiología vegetal [57-59], el conocimiento de los blancos

específicos de las proteínas ubiquitina ligasas es crucial para comprender los mecanismos de señalización y expresión génica en plantas. La necesidad de reconocer específicamente un amplio repertorio de sustratos, da cuenta de la gran diversidad (alrededor de más de mil) entre las potenciales E3 ligasas [59]. La ubiquitinación de proteínas puede tener diversas consecuencias dependiendo en el tipo y forma de la modificación. La ubiquitinación puede enviar proteínas sustrato a proteólisis por el proteosoma 26S o alterar sus propiedades bioquímicas y la localización subcelular.

Diversos blancos de poli-ubiquitinación de SIAH, el homólogo de SINA, han sido descritos en el contexto de la degradación proteica mediada por el proteosoma. Teniendo en cuenta que se han postulado sustratos específicos de compartimento para SIAH-1, diferentes efectos pueden ser inducidos dependiendo de la localización subcelular del blanco de ubiquitinación [60]. La interacción entre SIAH-1 y GAPDH S-nitrosilada, es una vía de translocación nuclear bien conocida que participa de una cascada de señalización de muerte celular programada [61]. En plantas, SINAT5 (parálogo de SINAL7) promueve la degradación mediada por ubiquitinación de NAC1 (factor de transcripción involucrado en la formación del meristema apical y raíces secundarias mediado por auxinas) para regular negativamente las señales de auxinas [62].

Como fue descrito anteriormente, en uno de los modelos de plantas de *A. thaliana* con disfunción mitocondrial generados en el laboratorio (plantas mutantes *gapc1*), los niveles de *SINAL7* se vieron alterados comparado con plantas Col0 [37]. Se ha reportado que la interacción de la ubiquitina ligasa E3 Siah-1 (homóloga de SINAL7) con la forma S-nitrosilada de GAPDH (homólogo murino de GAPC1 en *Arabidopsis*) permite su translocación nuclear iniciando una cascada de señalización de muerte celular por apoptosis [61].

Las enzimas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas (GAPDH) están altamente conservadas en todos los organismos vivos, donde cumplen un papel esencial en el metabolismo del carbono en la célula. *Arabidopsis thaliana* posee cuatro isoformas diferentes de GAPDH (www.arabidopsis.org): una isoforma citosólica, fosforilante y NAD⁺

dependiente, GAPC1 (At3g04120) que cataliza la conversión de gliceraldehído-3-fosfato (Ga3P) en 1,3-bifosfoglicerato; la isoforma GAPC2 (At1g13440) involucrada en unión a ion cobre; y las isoformas plastídicas GAPCP1 (At1g79530) y GAPCP2 (At1g16300). En particular, GAPC1, cuyo rol en la glicólisis es bien conocido [63], sufre diversas modificaciones post-traduccionales por efecto de especies reactivas de oxígeno (ERO) o especies reactivas del nitrógeno (ERN) [64] que le confieren diversas actividades no metabólicas [35, 65] llamadas también propiedades multifuncionales (*moonlighting*) [66]. GAPC puede ser translocada del citoplasma al interior del núcleo celular [65, 66], y la nitrosilación de GAPC ha sido propuesta como responsable de este evento [64]. En las células vegetales, las ERO y ERN se producen como consecuencia de ciertos procesos metabólicos en diversos compartimentos como en cloroplastos, peroxisomas, citoplasma, apoplasto y mitocondrias. En la Figura 5 se detallan los procesos y compartimentos donde se producen las principales ERO y NO (óxido nítrico, una de las ERN). La producción de ERO y ERN es la inevitable consecuencia de la vida aeróbica [67]. ERO y ERN son términos generales que comprenden a una variada colección de formas del radical oxígeno y nitrógeno [67]; los principales se detallan en la tabla 2 [68].

ERO	ERN
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Oxido nítrico, NO^{\cdot}
Hidroperóxilo, HO_2^{\cdot}	Dióxido nítrico, NO_2^{\cdot}
Hidroxilo, $\cdot OH$	Radical nitrato, NO_3^{\cdot}
Peroxilo, ROO^{\cdot}	
Alcoxilo, RO^{\cdot}	

Tabla 2. ERO y ERN principales.



Figura 5. Localización de las principales fuentes de NO y ERO en plantas. Las fuentes de NO que están en debate todavía se encuentran en *itálicas*.

En plantas, H_2O_2 es producido por diferentes enzimas como producto de sus reacciones catalíticas. Importantes generadores de H_2O_2 son las enzimas de los peroxisomas, glicolato oxidasa y acil-CoA oxidasa, las cuales están involucradas en la fotorespiración y la vía de β -oxidación de ácidos grasos, respectivamente. Actualmente, está bien establecido que la mayor fuente de O_2^- es la NADPH oxidasa (NOX) localizada en la membrana plasmática [69-71], pero otras fuentes productoras de superóxido y peróxido de hidrógeno son los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas como resultado de diferentes reacciones de oxidación y transporte de electrones [68, 72-74]. Otra importante fuente de ERO son las peroxidasas unidas a la pared celular, las cuales pueden generar H_2O_2 [75, 76].

La evolución de sistemas antioxidantes eficientes ha permitido a las plantas sobrellevar la toxicidad de las ERO y poder usar estas moléculas como transductores de señales [71, 77-79].

En este contexto, debido a que *SINAL7* presentó niveles de transcritos alterados en plantas con disfunción mitocondrial con niveles aumentado de ERO [34, 37, 38], atribuidos probablemente al funcionamiento incorrecto de

la mitocondria, postulamos que SINAL7 podría actuar como mediador de alguna vía de señalización retrógrada en respuesta a lo observado en las plantas con disfunción mitocondrial.

Además, teniendo en cuenta que se ha asociado a la familia SINA en el desarrollo de *Arabidopsis* (www.arabidopsis.org) y que, según datos de experimentos de transcriptómica a gran escala, SINAL7 se expresa en la mayoría de los tejidos de la plantas, pero mayormente en tejidos florales como el replum (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>), proponemos que podría tener alguna influencia en los complejos procesos de floración o fructificación en *Arabidopsis* que se encuentran altamente regulados.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- Hipótesis de trabajo

SINAL7 podría ser un mediador o participar en vías de señalización retrógrada mitocondrial (RRM) en plantas superiores.

- Objetivo general

Identificar la/las funciones de SINAL7 y su papel en vías de señalización retrógrada mitocondrial, a través de su caracterización bioquímica y estudios funcionales *in vivo* en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

- Objetivos específicos

- Caracterizar bioquímicamente SINAL7, estudiar la actividad de la proteína recombinante *in vitro* y su relevancia.

- Estudiar la influencia de SINAL7 sobre GAPC1, analizar bioquímicamente las enzimas recombinantes *in vitro* y el efecto de SINAL7 en la modificación y localización de GAPC1.

- Estudiar la función de SINAL7 *in vivo*, caracterizar plantas con ausencia y sobreexpresión del gen *SINAL7* y analizar su influencia en parámetros del desarrollo vegetativo y reproductivo en plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

- Cultivares de *A. thaliana*

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* variedad Columbia (Col0) de tipo salvaje, plantas de *A. thaliana* mutantes insercionales deficientes de SINAL7 (At5g37890) obtenidas del "Arabidopsis Resource Center" (ABRC) (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress?gene=AT5G37890>). Las líneas seleccionadas, *signal7.1* y *signal7.2*, (SALK_096989 y CS833574) presentan inserción de ADN-T en el segundo o el primer exón respectivamente. Además, plantas transgénicas de *A. thaliana* sobreexpresantes de SINAL7 (*SINAL7.1* y *SINAL7.2*) con resistencia al antibiótico kanamicina como marcador de selección. Además se utilizaron plantas de *A. thaliana* deficientes en GAPC1 (At3g04120 llamadas *gapc1*), mutantes por inserción de ADN-T en el noveno exón del gen (descriptas previamente por Rius y col. 2008). Las semillas se esterilizaron con una solución de lavandina comercial al 5 % (V/V) y Tween 20 al 0,05 % (V/V) durante 15 min. Luego se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y se sembraron en tierra o en medio MS [80] suplementado con el antibiótico adecuado. Finalmente se mantuvieron en oscuridad a 4°C por 48 h y se transfirieron a invernadero a 23°C con humedad variable (40 - 70 %). Las condiciones de iluminación se lograron mediante la combinación de lámparas fluorescentes blancas frías (*Cool White, Philips*) y de tipo GroLux (Sylvania, Vinhedo, SP, Brasil) con una intensidad de $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ utilizando un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad (denominado fotoperiodo de día largo).

Las plantas transgénicas se seleccionaron durante al menos 10 días en placas de Petri con medio MS [80] agar utilizando el antibiótico adecuado. Luego de este período las plantas resistentes al antibiótico se trasplantaron a macetas con tierra y perlita en proporción 3:1.

- Cepas de bacterianas y condiciones de cultivo

1) ***E. coli* XL1-Blue:** *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIZ M15 Tn10* (Tetr)].

2) ***E. coli* BL21 (DE3):** F', *ompT, hsdSB (rB-, m B-), dmc, gal, (DE3)*.

3) ***E. coli* BL21 (DE3) pLysS:** F', *ompT, gal, dcm, lon, hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻)*, λ (DE3), pLysS(cm^R).

4) ***A. tumefaciens*:** cepa GV3101, plásmido Ti: pTiC58, chromo C58, kanR, opinas: Nopalina (Holters et al., 1980).

Los cultivos de *E. coli* se incubaron a 30 ó 37°C (según se indique) mientras que los de *A. tumefaciens* se crecieron a 28°C. Los cultivos en medios líquidos se mantuvieron con agitación continua (150 rpm) y los medios sólidos se obtuvieron por adición de agar 1,5 % (P/V). Todas las cepas bacterianas fueron crecidas en medio Luria Bertani (LB) conteniendo los antibióticos requeridos. El crecimiento celular se determinó por medición de la densidad óptica a 600 nm (DO600).

- Medios de cultivo

Medio Luria Bertani (LB): triptéina 10 g; extracto de levadura 5 g; NaCl 10 g; agua destilada c.s.p. 1 litro. pH 7.0.

Medio Terrific Broth (TB): triptéina 24 g, extracto de levadura 12 g, glicerol 4 mL, KH₂PO₄ 0.17 M y K₂HPO₄ 0.72 M, agua destilada c.s.p. 1 litro.

Medio LB agar: medio LB con el agregado de 15 g/l de agar.

Murashige and Skoog (MS) basal medium with Gamborg's vitamina (MS, Sigma M 0404)

Medio de selección para semillas de *Arabidopsis* transformadas: Se prepararon cajas de Petri de forma estéril con medio MS [80], 0.8 % P/V de agar, 1 % (P/V) sacarosa y el antibiótico Kanamicina a una concentración de 50 µg/ml.

- Soluciones Buffer

10 X TBE Buffer: Tris-base 108 g; ácido bórico 55 g; 0.5 M EDTA; agua c.s.p. 1 litro. pH 8.0.

TE Buffer: Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; agua csp 800 ml; ajustar pH 8 con HCl; agua c.s.p. 1 litro.

10 X PBS: NaCl 80 g; KCl 2 g; Na₂HPO₄·7H₂O 26.8 g; KH₂PO₄ 2.4 g; agua c.s.p. 800 ml; HCl hasta pH 7.4; agua c.s.p. 1 litro.

Buffer de Infiltración (transformación de *A. thaliana*): Sacarosa 5 % (P/V), detergente Silwet L-77R (*Helena Chemical Company*) 0,03 % (V/V).

- Antibióticos y otros compuestos relacionados

Compuesto	Concentración (Stock)	Concentración final (Bacterias)	Concentración final (Plantas)
Ampicilina	100 mg / ml	100 µg / ml	
Cloranfenicol	30 mg / ml	30 µg / ml	
Kanamicina	50 mg / ml	50 µg / ml	30 µg / ml
Gentamicina	50 mg / ml	25 µg / ml	50 µg / ml
Rifampicina	20 mg / ml	100 µg / ml	
Espectinomicina	50 mg / ml	100 µg / ml	
Isopropil β-D-tiogalactopiranosido (IPTG)	1 M	0.5 mM	

Tabla 3. Antibióticos y otros compuestos utilizados. Tabla con los antibióticos y otros compuestos utilizados y las concentraciones de uso de los mismos.

- Oligonucleótidos, vectores y enzimas de restricción utilizadas

Nombre	Gen	Observaciones	Secuencia
SINAL7up	At5g37890	Clonado	AAAGGATCCAATGGGTGCCGCGATTTTG
SINAL7down	At5g37890	Clonado	CTCGAGATTCTCTTTGTTCAACTTCTTGAC
SL7K23Aup		Mutagénesis	GATCTAACAGCATTCTCTCGCAAGCGAGACAACCTTCTCTAGTGAT
SL7K23Adown		Mutagénesis	CTAGATTGTCGTAAGAGAGCGTTCGCTCTGTTGAAAGAAGATCACTA

Mecanismos de señalización retrógrada mitocondrial (RRM) en plantas

SL7K124Aup		Mutagénesis	TTGCAAAAAGAATGTATCTTATGGGGCAGAGTTAACTCATGAAAAGGAATGC
SL7K124Adown		Mutagénesis	AACGTTTTTCTTACATAGAATACCCCGTCTCAATTGAGACTTTTCCTTACG
GAPC1up	At3g04120	Clonado	TCTCATATGGCTGACAAGAAGAT
GAPC1down	At3g04120	Clonado	ACCGAATTCGGCCTTTGACATGTGGAC
GAPC1NcoIup	At3g04120	Clonado	CCATGGATGGCTGACAAGAAGAT
GAPC1XhoIdown	At3g04120	Clonado	CTCGAGAATTCGGCCTTTGACATGTGGAC
RTSL7up	At5g37890	PCR en tiempo real	GCTACGAAGCTTTCACAATTCC
RTSL7Down	At5g37890	PCR en tiempo real	GTACAGATCCTTGTATGAGCTA
RTSL6 up	At5g37870	PCR en tiempo real	GATAAGACCCGCTCAGCGATGC
RTSL6 down	At5g37870	PCR en tiempo real	AACAGGCAAAGCACATGCAGGA
RTSL8 up	At5g37900	PCR en tiempo real	CAACGCTCGGCGACATTGCTA
RTSL8 down	At5g37900	PCR en tiempo real	AGAACTCTCGGTGCAACCAACA
RTSL9 up	At5g37910	PCR en tiempo real	CAACGCTCGGCGATAGTACTGC
RTSL9 down	At5g37910	PCR en tiempo real	AGGCAAAGTACATGCAGGGCAC
RTSL11 up	At5g62800	PCR en tiempo real	GCTTCGAGCCGCTCACTATTCC
RTSL11 down	At5g62800	PCR en tiempo real	AGGCTGATTCGAGAACCCTCTCC
Act2 Fw	At3g18780	PCR en tiempo real	AATCTCCGGCGACTTGACAG
Act2 Rv	At3g18780	PCR en tiempo real	AAACCCTCGTAGATTGGCACAG
LBb1		Chequeo mutante	CGCTGGACCGCTTGCTGCAACT
GAPC1K231Aup		Mutagénesis	GCTTCCAGCTCTTAACGGAGCGTTGACTGGAATGTCTTTC
GAPC1K231Adown		Mutagénesis	GAAAGACATTCAGTCAACGCTCCGTTAAGAGCTGGAAGC
GAPC1K76Aup		Mutagénesis	CCCTTCTCTCGGTGAGGCGCCAGTCACTGTTTTCG
GAPC1K76Adown		Mutagénesis	CGAAAACAGTGACTGGCGCCTCACCGAAGAGAAGGG
CBPFw	At5g44200	PCR en tiempo real	CCGGCCTATTCGTGTGGATTTTGA
CBPRv	At5g44200	PCR en tiempo real	CATAATTCGTTGGCGCAGCTTGAG
CPK3Fw	At4g23650	PCR en tiempo real	AATCCACGGATGATTTAGCA
CPK3Rv	At4g23650	PCR en tiempo real	ATCTGGAGTGCTGGTGTGAT
CAB1 up	At1g29930	PCR en tiempo real	GTAAGGCCGTCAAGCTTTCCCC
CAB1 down	At1g29930	PCR en tiempo real	TCGCCAGAGAATGGACCCAAGT
SAG12 up	At5g45890	PCR en tiempo real	CGGTTAGCGTTGGAATTGAAGGAG
SAG12 down	At5g45890	PCR en tiempo real	TCCGTTAGTAGATTCGCCGTATCC
MIT1 up	At1g07600	PCR en tiempo real	CGATTGAGGAACTGGGACGAAAC
MIT1 down	At1g07600	PCR en tiempo real	TCTTGAGGGACACGGGTAATAGC
SAG101 up	At5g14930	PCR en tiempo real	GTGGGGATGAGAGACGATGTGAG
SAG101 down	At5g14930	PCR en tiempo real	CGGGTGTCATAAACTAGGTCAAG
WRKY6 up	At1g62300	PCR en tiempo real	GCAGTTCTCTGGTGGCTCTCC
WRKY6 down	At1g62300	PCR en tiempo real	GTTGTTTCTTCGCGTCGTG

Mecanismos de señalización retrógrada mitocondrial (RRM) en plantas

PPH up	At5g13800 PCR en tiempo real AATCCCAACGCTCCATACTACG
PPH down	At5g13800 PCR en tiempo real CCAGACTCCAGGTGCTTGATCC
BFN1 up	At1g11190 PCR en tiempo real CCAATGGATTATGGCACGACGATC
BFN1 down	At1g11190 PCR en tiempo real CACCAGACTTGACGCCTTTGTATC
RTCAT1 up	At1g20630 PCR en tiempo real GATAAGCTACTCCAGACCCGGA
RTCAT1 down	At1g20630 PCR en tiempo real CTGAGACCAGTAAGAGATCCA
RTCAT2 up	At4g35090 PCR en tiempo real GATAAGCTGCTCAAACCCGTG
RTCAT2 down	At4g35090 PCR en tiempo real CTGAGACCAGTAAGAGATCCA
RTCAT3 up	At1g20620 PCR en tiempo real ACGACAAGCTGCTCCAGTGA
RTCAT3 down	At1g20620 PCR en tiempo real CTGAGACCAGTAAGAGATCCA
RTNAD9 up	AtMg00070 PCR en tiempo real CCCAAGAAATGGGTCAAAA
RTNAD9 down	AtMg00070 PCR en tiempo real CCCAAGGACTAGCAAAATCG
RTPSST up	At5g11770 PCR en tiempo real GCCTAGTCCTGCCAGTCTG
RTPSST down	At5g11770 PCR en tiempo real GCTGGAGTAGCCATAGAGC
RTCOX19 up	At3g06310 PCR en tiempo real AATCTTGAGCTATGGAGGCGAATGC
RTCOX 19 down	At3g06310 PCR en tiempo real TCGAGGCATTCTCTGGGTTAGGA
RTAOX1 up	At3g22370 PCR en tiempo real ATTTTTTCAGAGACGATA
RTAOX1 down	At3g22370 PCR en tiempo real GCGATGACAGAAGCAAA
RTLEAFYFw	At5g61850 PCR en tiempo real CCCACCAAGGTGACGAACCAAG
RTLEAFYRv	At5g61850 PCR en tiempo real CCAACGTTCTCACCGGTTCT T
RTAP1Fw	At1g69120 PCR en tiempo real CCTTTTCTCAACATGGGTGGTCTGT
RTAP1Rv	At1g69120 PCR en tiempo real ATGGAAATGCTTCATGCGGCGA
RTSOC1Fw	At2g45660 PCR en tiempo real GCAGCTCAAGCAAAGGAGAAAGC
RTSOC1Rv	At2g45660 PCR en tiempo real GCGTCTCTACTTCAGAACTGGGC
RTFULFw	At5g60910 PCR en tiempo real GCGCTCCAGAAGAAGGATAAAGCC
RTFULRv	At5g60910 PCR en tiempo real CCATCTCTGGAGGAGTTACGCA
RTCONSTANSFw	At5g15840 PCR en tiempo real GGCTCCTCAGGGACTCACTACAA
RTCONSTANSRv	At5g15840 PCR en tiempo real CTGACAGGTCAGGTTGTTGCT
RTGA1Fw	At4g02780 PCR en tiempo real ATACCGGGCATCACAATTGGCG
RTGA1Rv	At4g02780 PCR en tiempo real GCAAACCAATCTCGCCAGGTAA
RTGA20OX5Fw	AT1g44090 PCR en tiempo real GTGTTGGCCCCATAATGACCC
RTGA20OX5Rv	AT1g44090 PCR en tiempo real ACAATGCCATGAAGGTGTCTCCAAC
RTSHP2Fw	At2g42830 PCR en tiempo real AACTCCGAGACAGATTCCGGAC
RTSHP2Rv	At2g42830 PCR en tiempo real AACATCTCGTCTTCTTGGATCGG
RTSEP3Fw	At1g24260 PCR en tiempo real TGCCAATCCAGCTGAACCTAA
RTSEP3Rv	At1g24260 PCR en tiempo real ACTTGGTCTGCTCCATTCCA
RTREPLUMLESSFw	At5g02030 PCR en tiempo real TCGACGACGATGATTCTTCTGCT

RTREPLUMLESSRv At5g02030 PCR en tiempo real CTTGTAAACCTCGTCGAGCATGGAG

RTMYB33Fw At5g06100 PCR en tiempo real GCAGATGAAACTCCACCAAGGCA

RTMYB33Rv At5g06100 PCR en tiempo real AGTGCGTCGCTCATGCTACCT

Tabla 4. Cebadores usados en este trabajo.

Vector	Especificaciones	Fuente
pGEM-T EASY	bla+, 3015 pb, ori f1, lacZ (SMC), derivado de pGEM-5Zf(+), vector linealizado por corte con EcoRV y con timidinas agregadas en los extremos 3'.	Promega
pGEM-T-SINAL7	bla+, pGEM-T Easy::ADNc SINAL7 de Arabidopsis thaliana, clonada con los sitios BamHI y XhoI.	Esta tesis
pRSETb	ampicilinaR, derivdo de de pUC, 2897 pb, prom T7, vector de alto rendimiento de expresión de proteínas fusionadas a un tag de 6xHistidinas con posibilidad de ser removida en bacterias, inducción de proteínas con IPTG.	Invitrogen
pHis-parallel	ampicilinaR, derivdo de de pET28b, prom T7, vector de alto rendimiento de expresión de proteínas fusionadas a un tag de 6xHistidinas con posibilidad de ser removida por la proteasa TEV, en bacterias, inducción de proteínas con IPTG.	Sheffield P. y colaboradores, 1999. [81]
SINAL7-pRSETb	pRSETb::ADNc SINAL7 de Arabidopsis thaliana, clonada con los sitios BamHI y XhoI.	Esta tesis
SINAL7-pHis-parallel	pHis-parallel::ADNc SINAL7 de Arabidopsis thaliana, clonada con los sitios BamHI y XhoI.	Esta tesis
pRSETb-SL7K23A	pRSETb::ADNc SINAL7 Arabidopsis thaliana. (secuencia de SINAL7 en el vector mutada para expresión con cambio de aminoácido K23 por alanina)	Esta tesis
pRSETb-SL7K124A	pRSETb::ADNc SINAL7 Arabidopsis thaliana (secuencia de SINAL7 en el vector mutada para expresión con cambio de aminoácido K124 por alanina).	Esta tesis

pRSETb-SL7K23AK124A	pRSETb::ADNc SINAL7 Arabidopsis thaliana (secuencia de SINAL7 en el vector mutada para expresión con cambio de aminoácido K23 por alanina y K124 por alanina)	Esta tesis
pETGB1a	kanamicinaR, 6245 pb, promotor T7/LacO, vector de expresión en bacterias de proteínas con tag de 6xhistidinas removible con proteasa TEV.	G. Stier, EMBL, Heidelberg, Germany
pETGB1a-GAPC1	pETGB1a::ADNc GAPC1 de Arabidopsis thaliana, clonada con los sitios NcoI y XhoI.	Esta tesis
pETGB1a-GAPC1K231A	pETGB1a::ADNc GAPC1 de Arabidopsis thaliana, clonada con los sitios NcoI y XhoI. (secuencia de GAPC1 en el vector mutada para expresión con cambio de aminoácido K231 por alanina).	Esta tesis
pETGB1a-GAPC1K76A	pETGB1a::ADNc GAPC1 de Arabidopsis thaliana, clonada con los sitios NcoI y XhoI. (secuencia de GAPC1 en el vector mutada para expresión con cambio de aminoácido K76 por alanina).	Esta tesis
pPZP212-SINAL7	pPZP212::ADNc SINAL7 de Arabidopsis thaliana clonado con los sitios XbaI y SacI (expresión de SINAL7 en plantas bajo el promotor CaMV35S) Bacterias: espectinomomicinaR. Plantas: kanamicinaR.	Esta tesis

Tabla 5. Vectores usados en este trabajo.

Enzima	Sitio de Corte	Proveedor	Catálogo	Buffer
XhoI	C/TCGAG	New England Biolabs	R0146S	2
BamHI	G/GATCC	New England Biolabs	R0136S	2
XbaI	T/CTAGA	New England Biolabs	R0145S	2
SacI	GAGCT/C	New England Biolabs	R0156S	1
NcoI	C/CATGG	New England Biolabs	R0193S	1

Tabla 6. Enzimas de restricción usadas en este trabajo.

Detalle de técnicas

- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El protocolo general de amplificación constó en un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 minutos, un número determinado de ciclos: fase de desnaturalización 30 s. a 94°C; fase de hibridación a la temperatura óptima para cada juego de cebadores determinado por gradiente de temperatura; fase de elongación 1 minuto por cada 1000 pb a amplificar, a 72°C, más una extensión final de 7 minutos. De esta forma el número de ciclos se estableció en función del objetivo buscado en cada experimento.

- Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las moléculas de ADN con un tamaño comprendido entre 0,2 y 10 Kb se separaron en geles de agarosa 0,8 % (P/V) con SYBR® Safe 0,05 µl/ml (Invitrogen). Los geles fueron sometidos a electroforesis horizontal en un campo eléctrico de dirección constante, utilizando el buffer TBE 1 X. Los fragmentos fueron visualizados en un transiluminador de luz azul y sus tamaños fueron determinados por comparación con marcadores comerciales (400 bp, 100 bp, Productos bio-Lógicos, UNQ).

- Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Para esta técnica se utilizó el kit GFX (*GFX PCR and Gel Band Purification Kit, Amersham*). Luego de la electroforesis en gel de agarosa, se cortaron las bandas conteniendo los fragmentos de ADN a purificar y se transfirieron a un microtubo. Se agregaron 500 µl de solución de captura y se incubó a 50°C por 10 minutos hasta la completa disolución de la agarosa. Luego, se transfirió la solución con el ADN a la columna de purificación y se mezcló por pipeteo (de cuatro a seis veces). La columna fue centrifugada en una microcentrifuga a 12000 x g por 30 s., y luego de descartar el fluido que traspasó al tubo colector fue reubicada en otro tubo. Se agregaron 500 µl

de solución de lavado y se repitió el paso de centrifugación a máxima velocidad por 30 s. El tubo colector fue descartado y la columna fue ubicada en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Se agregaron 50 μ l de buffer de elución directamente sobre la matriz de fibra de vidrio en la columna GFX. Se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifugó a 12000 $\times g$ por 1 minuto para recuperar en el eluido el ADN purificado.

- Obtención de células competentes

Células de *E. coli* de la cepa de interés se obtuvieron a partir de una colonia aislada en medio LB agar suplementado con el antibiótico adecuado y se inocularon en 3 ml de medio LB líquido. Se crecieron a 37°C con agitación durante 16 h y 1 ml de este cultivo saturado se utilizó para inocular 100 ml de medio LB fresco que se creció a 37°C con agitación hasta llegar a la densidad óptica de 600 nm (OD600). Posteriormente el cultivo se centrifugó a 4°C y 3000 $\times g$ durante 10 min y el precipitado resultante se resuspendió en 50 ml de la solución TfbI [AcOK 30 mM; KCl 100 mM; CaCl₂ 10 mM; MnCl₂ 50 mM; Glicerol 15 % (V/V); pH 5,8 ajustado con HAc 0,2 M; filtrado) durante 20 min en hielo. Luego de este periodo se volvió a centrifugar a 4°C y 2100 $\times g$ durante 10 min. Finalmente el precipitado se resuspendió en 1 ml de solución TfbII [MOPS 10 mM; CaCl₂ 75 mM; KCl 10 mM; Glicerol 15 % (V/V); pH 6,5 ajustado con AcONa filtrado] y se recogieron alícuotas de 110 μ l que fueron guardadas a -80°C hasta su uso.

Células de *A. tumefaciens* GV3101 aisladas a partir de una colonia se inocularon en 5 ml de medio LB con los antibióticos adecuados (rifampicina 100 μ g/ml, gentamicina 25 μ g/ml) y se crecieron a 28°C con agitación durante 24 h. Posteriormente se utilizó 2 ml de este cultivo líquido saturado para inocular 200 ml de medio LB, suplementado con los antibióticos antes indicados, y se creció durante 6 h a 28°C con agitación. Las células se centrifugaron a 4200 rpm durante 20 min a 4°C y el precipitado (pellet de células) se resuspendió en buffer TE frío. Finalmente, las células se

centrifugaron, se resuspendieron en LB, se alicuotaron de a 500 μ l y se guardaron a -80°C hasta su uso.

- Transformación de células competentes

Las células de *E. coli* competentes (110 μ l), se transformaron por choque térmico con los plásmidos correspondientes utilizando protocolos de rutina [82]. Brevemente, las células competentes fueron incubadas en presencia del plásmido correspondiente durante 30 min. en hielo, posteriormente se colocaron a 45°C durante 45 s y se llevaron nuevamente al hielo durante 15 min. Luego de este período se agregó 1ml de LB líquido y se incubaron a 37°C con agitación durante 45 min. Finalmente, las bacterias se centrifugaron (5 min a 7000 r.p.m), se resuspendieron en 100 μ l de LB y se sembraron en placas de medio LB agar conteniendo los antibióticos adecuados para la selección de las colonias transformadas. Las placas se incubaron 16 h a 37°C .

La transformación de *A. tumefaciens* se realizó con una alícuota de 500 μ l células competentes que se incubaron con 1 μ g de ADN plasmídico de modo sucesivo: 5 min. en hielo, 5 min. en N_2 (líquido) y 5 min. a 37°C . La suspensión se diluyó a 1 ml con medio LB y se incubó con agitación a 28°C durante 2 h. Posteriormente las células se centrifugaron a $2000 \times g$ y se resuspendieron en un volumen de 200 μ l que se sembraron en medio LB agar suplementados con los antibióticos adecuados. Las bacterias se incubaron a 28°C durante 48 h.

- Análisis de transformantes

El análisis de las colonias crecidas luego de la transformación se realizó mediante PCR de colonias. En este caso, se colocó directamente una colonia dentro de cada tubo de reacción junto al resto de los componentes del medio; el programa de temperaturas utilizado y el análisis de los productos fueron similares a los ya descritos.

Aquellas colonias en las que se pudo observar un producto de PCR del tamaño esperado, se utilizaron para inocular entre 3 y 10 ml de medio LB conteniendo el antibiótico adecuado. Luego de la incubación a 37°C durante 16 h, se extrajo el ADN plasmídico. Posteriormente, se analizó este ADN digiriéndolo con endonucleasas de restricción que produjeran un patrón distintivo de fragmentos de ADN al correr el producto del corte en un gel de agarosa 0,8 % (P/V).

- Obtención de ADN plasmídico a mini escala

Para la obtención de ADN plasmídico se utilizó el *kit* comercial *Illustra plasmid Prep Mini Spin* (GE Healthcare Bio-Sciences) según las instrucciones del fabricante, obteniéndose ADN libre de ARN. Este método se utilizó para obtener ADN plasmídico con el que se llevaron a cabo procesos de secuenciación, clonado o digestión con enzimas de restricción.

- Reacciones de digestión empleando enzimas

Las digestiones de ADN se llevaron a cabo a 37 °C durante 1 a 3 h, utilizando enzimas comerciales (*Promega*) y siguiendo las indicaciones recomendadas por los proveedores de las enzimas de restricción. El resultado de las digestiones se verificó mediante electroforesis de los productos en geles de agarosa 0,8 % (P/V).

- Reacción de ligación

Las reacciones de unión de los fragmentos aislados de ADN a los vectores plasmídicos, se llevó a cabo utilizando una relación molar inserto:vector igual a 3:1. Se utilizó 1 U de T4 ADN ligasa (*Promega*), el buffer de reacción provisto por el fabricante de la enzima y agua destilada c.s.p. 10 µl. La reacción se incubó a 16°C durante 18 h.

- Extracción de ARN total

El ARN total de diferentes tejidos fue extraído usando el reactivo Trizol (Invitrogen), compuesto por una mezcla de fenol y tiocianato de guanidina. Cada muestra se homogeneizó con nitrógeno líquido, según la relación 50-100 mg de tejido: 1 ml de Trizol. Se agregó 200 μ l de cloroformo y se agitó vigorosamente de forma manual durante 15 s. La mezcla se dejó reposar durante 3 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó 15 min a $12000 \times g$ a 4°C . Luego de esta etapa se observa una separación en la mezcla de dos fases, una inferior orgánica de color rojo y otra superior, acuosa e incolora, que contiene al ARN. Se transfirió la fase superior a otro tubo y se agregó 200 μ l de alcohol isopropílico. Luego de agitar, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se centrifugó a $12000 \times g$ durante 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante (el ARN precipita en el fondo del tubo). Se lavó exhaustivamente el precipitado con etanol 70 % (V/V) y se agitó durante 2 min. Finalmente se centrifugó a $7000 \times g$ durante 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El ARN se resuspendió en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato, para la inactivación de ARNasas).

- Cuantificación de ARN total

La cantidad de ARN total se determinó espectrofotométricamente a 260 nm (1 unidad de absorbancia equivale a 40 μ g de ARN). La pureza de las muestras obtenidas se determinó mediante la relación de absorbancia 260 nm/280 nm.

- Obtención de ADN copia

El ADNc se obtuvo por transcripción reversa a partir de 5 μ g de ARN. La mezcla de reacción estaba compuesta por: 200 U de la enzima transcriptasa reversa M-MLV RT (Promega); 15 μ g de hexámeros *Random* pd(N) (Amersham Biosciences); 500 μ M de dNTPs; 1X buffer 5X M-MLV

(Promega); 25 U Inhibidor de ARNasas (Promega); H₂O DEPC c.s.p. 50 µl. La reacción se incubó a 42°C durante 1 h.

- Extracción y cuantificación de ADN genómico

El ADN genómico (ADNg) se extrajo a partir de 100 mg de hojas de *A. thaliana* que se trituraron en presencia de N₂ en microtubos. Posteriormente se agregó 300 µl de buffer bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB), se trituró hasta lograr la completa homogeneización del tejido y se incubó a 60°C durante 30 min. Posteriormente se centrifugó a 13400 rpm durante 5 min, se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo y se agregó 300 µl de cloroformo. Después de agitar, se centrifugó nuevamente a 13400 rpm por 5 min. La fase acuosa (superior) fue transferida a otro tubo al que se le agregó un volumen igual de isopropanol y se precipitó el ADN por 20 min a temperatura ambiente. El precipitado obtenido luego de centrifugar a 7000 × g por 10 min. se lavó en etanol 70 % (V/V) y se secó a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 20 µl de agua destilada y se conservó a -20°C. La cantidad de ADN total se determinó espectrofotométricamente a 260 nm (1 unidad de absorbancia equivale a 50 µg/µl de ADN). La pureza de las muestras obtenidas se determinó mediante la relación de absorbancia 260 nm/280 nm.

- Clonados

Las secuencias de ADN de interés se amplificaron a partir de ADNc de *A. thaliana* mediante ensayos de PCR con oligonucleóticos específicos (tabla 4) diseñados a partir de las secuencias disponibles en las base de datos TAIR (www.arabidopsis.org). El fragmento amplificado fue aislado y purificado según se describió en los puntos anteriores.

- Clonados dependientes de ligasa

Para los clonados tradicionales, los fragmentos amplificados y los vectores de interés, fueron digeridos con las enzimas de restricción adecuadas, purificados y ligados como se indica en puntos anteriores. Posteriormente, con las ligaciones obtenidas se transformaron bacterias de *E. coli* competentes XL1Blue y se seleccionaron en medio de LB agar con los antibióticos adecuados. Las colonias resistentes se analizaron por medio de PCR utilizando como molde 1 μ l de una colonia resuspendida en 10 μ l de agua destilada estéril. Aquellos clones que resultaron positivos, se inocularon en medio LB líquido suplementado con los antibióticos adecuados para obtener ADN plasmídico. Los plásmidos se analizaron por ensayos de PCR y restricción con las enzimas correspondientes. Las construcciones obtenidas se secuenciaron para analizar la fidelidad de las secuencias (www.macrogenusa.com).

- Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes fueron expresadas en células de *E. coli* BL21 (DE3) RIL o BL21 (DE3) pLysS. Luego de ser crecidas las células por 4 h a 37°C, se agregó IPTG a concentración final 0,5 mM en el medio de cultivo y este fue incubado por 4 h a 28°C. Las células fueron precipitadas por centrifugación 10 minutos a 4000 x *g* a 4°C. El precipitado fue lavado y resuspendido en buffer conteniendo 20 mM Tris-HCl, pH8 (1 ml/g de célula). Las células se rompieron utilizando un ultrasonificador (VCX130, Sonics and Materials Inc., Connecticut, USA), posteriormente se centrifugó a 1200 x *g* durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue filtrado a través de filtro de membrana de acetato de celulosa y cargado a una columna de cromatografía de afinidad *HiTrap™ Chelating HP* (Amersham Biosciences) equilibrada con buffer de unión (20 mM Tris-HCl pH8, 0.3 M NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol; 20 mM imidazol). Este paso fue llevado a cabo a 25°C. La columna fue lavada con 10 a 15 volúmenes de buffer de unión y cada proteína fue eluída usando un gradiente lineal de buffer de elución (20 mM Tris-HCl pH8, 0.3 M NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol; 0 a 500 mM imidazol).

Todas las proteínas eluyeron en la fracción 200 y 300 mM de imidazol. Las fracciones conteniendo la proteína fueron unidas y concentradas a >1mg/ml usando concentradores Centriplus-10 y Centriprep-10 (Millipore Corp., Massachusetts, USA). Las proteínas concentradas fueron utilizadas en el momento en los diferentes ensayos o guardada a -20°C con glicerol hasta su uso.

- Extracción de proteínas de material vegetal

Los diferentes tejidos de *A. thaliana* se cortaron en pequeños trozos, se congelaron en nitrógeno líquido y se trituraron con un émbolo hasta lograr un fino polvo. Luego se agregó un buffer de extracción (Tris-HCl 20 mM pH6.8; EDTA 1 mM; PMSF 1 mM) y se homogeneizó con ayuda del émbolo. Finalmente las muestras se centrifugaron a 10000 x *g* durante 10 min. a 4°C y se conservó la fracción soluble.

- Cuantificación de proteínas

La totalidad de las proteínas fue determinada por el método de Bradford [83] en el cual se tomaron concentraciones crecientes conocidas de la proteína albumina de suero bovino (BSA) con las cuales se realizó una curva de calibración para luego mediante la medida de absorbancia a 590 nm determinar por interpolación la concentración de las proteínas totales.

- Electroforesis y detección inmunológica

El análisis de electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) fue llevado a cabo con un equipo *Mini Protean* (Bio-Rad) usando geles de poliacrilamida/bisacrilamida al 12 % o 15 % (P/V) (según el tamaño de la proteína a separar) como ha sido previamente descrito por Laemmli, 1970 [84]. Los geles fueron resueltos por tinción con *Coomassie Brilliant Blue* (R250, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) o mediante la transferencia a membrana de nitro celulosa (Trans-Blot Transfer Medium, Nitrocellulose

Membrane, Bio-Rad, California, USA), y posterior revelado con anticuerpo penta-His (Anti-His antibody selector kit, Qiagen, California, USA), con anticuerpo anti-cMyc (anti-cMycUbiquitin, Boston Biochem), o anticuerpos policlonales obtenidos en conejo dirigidos contra ADP-Glucosa Pirofosforilasa (anti-ADP-Glc PPasa), SINAL7 (anti-SINAL7) (realizado en esta tesis), GAPC (anti-GAPC) y contra la forma acetilada de la histona H3 (anti-Ach3) (Millipore) de *Arabidopsis thaliana*. El complejo antígeno - anticuerpo fue visualizado por la reacción de la fosfatasa alcalina unida a anticuerpo anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo con los sustratos BCIP y NBT (Promega, Madison WI, USA) [85].

- Obtención de anticuerpos policlonales.

Los anticuerpos policlonales contra SINAL7 recombinante de *A. thaliana* fueron obtenidos mediante inmunización de conejo luego de la inyección de cuatro dosis de 100 µg de la proteína recombinante purificada [86].

- Ensayo de *Far western blot*

El ensayo de *far western blot* se realizó como se describió previamente por Wu y colaboradores en 2007 [87], con modificaciones menores. En primer lugar, SINAL7His recombinante fue sometida a electroforesis en gel de poliacilamida (SDS-PAGE) y el gel se transfirió a una membrana de PVDF (polivinil difluoruro) (GE Healthcare Bio-Sciences). A continuación, la membrana se bloqueó en 10 mM de fosfato de sodio pH7.2, 0,9 % (P/V) de NaCl, conteniendo 3 % (P/V) de BSA y 0,1 % (V/V) de Tween-20, y se incubó durante 12 h a 4°C con 2 µg/mL de la proteína cebo (GAPC1). Después de esto, la membrana se lavó tres veces durante 10 min. con buffer de fosfato de sodio 10 mM pH7.2, 0,9 % (P/V) de NaCl y 0,1 % (V/V) de Tween-20. GAPC1 unida a SINAL7His se detectó por incubación con anticuerpo generado contra GAPC (anti-GAPC). Los controles se incubaron con anticuerpo anti-His y anti-GAPC. Los complejos antígeno-anticuerpo se visualizaron como se describe en la sección de detección inmunológica.

- Ensayo de *pull-down*.

Los ensayos de *pull-down* se llevaron a cabo como se ha descrito previamente por Wayllace y colaboradores, 2010 [88]. GAPC o GAPCK231A recombinantes unidas al *tag* de histidinas purificadas fueron unidas a una resina de sepharosa de alto rendimiento con Ni²⁺ (GE Healthcare Bio-Sciences) previamente equilibrada con buffer de unión (20 mM NaH₂PO₄ pH7.4, 20 mM de imidazol, NaCl 50 mM y 1 mM β-mercaptoetanol). La proteína recombinante SINAL7 (usado como "presa") que carece del *tag* de histidinas (removido con la proteasa TEV), se añadió a la proteína cebo inmovilizado. En experimentos de control, BSA se utilizó como la proteína "presa". Las proteínas no unidas se eliminaron con tres lavados de 5 ml de buffer de unión. La resina lavada se centrifugó a 500 g durante 3 min a 4 ° C y se descartó el sobrenadante. Las proteínas unidas se eluyeron con un buffer que contiene 20 mM NaH₂PO₄ pH7.4, imidazol 500 mM, NaCl 50 mM y 1 mM β-mercaptoetanol). Las proteínas recuperadas se sometieron a SDS-PAGE y se analizaron adicionalmente por tinción con azul de Coomassie e inmunotransferencia.

- Ensayo de actividad ubiquitin ligasa E3

El ensayo *in vitro* de ubiquitinación fue adaptado del protocolo descrito por Wertz y colaboradores en 2004 [89]. Cada reacción (volumen final 25 μl) contenía buffer de ubiquitinación (20 mM HEPES pH7.5, NaCl 100 mM, 5 mM MgCl₂, 5 mM ATP, DTT 10 mM), 5 μg cMyc-ubiquitina (Boston Biochem), 150 nM de enzima activadora de ubiquitina E1 de levadura (Boston Biochem), 200 nM de enzima conjugadora E2 Ubch2 recombinante humana (Boston Biochem), 5 μg SINAL7 recombinante purificada (como enzima E3 ligasa de ubiquitina) y GAPC1 recombinante purificada, GAPCK231A y GAPCK76A (como blancos de ubiquitinación). Las mezclas de reacción se incubaron a 30°C durante 2 h. La reacción se detuvo mediante la adición de 5 μl de 5X *Sample* buffer de SDS-PAGE (125 mM Tris-HCl pH6.8, 20 % (V/V) glicerol, 4 % (P/V) SDS y 10 % (V/V) β-mercaptoetanol)

a las muestras que luego se hirvieron a 100°C durante 5 min. y se analizaron por electroforesis SDS-PAGE. Los geles de proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se analizaron usando un anticuerpo contra cMyc (anti-cMycUbiquitin, Boston Biochem), seguido de anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma).

- Mutaciones sitio-dirigidas (Lys-a-Ala)

Los codones codificantes para los residuos de lisina 23 y 124 en SINAL7 y 76 y 231 en GAPC1 se cambiaron a tripletes que codifican para alanina utilizando el kit QuickChange II XL mutagénesis dirigida (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.). Para el cambio de aminoácido en SINAL7, el vector SINAL7-pRSETb se utilizó como molde para la amplificación por PCR. Los cebadores utilizados fueron: SL7K23A, GATCTAACAGCATTCTCTCGCAAgcGAGACAACCTTTCTTCTAGTGAT; SL7K124A, TTGCAAAAAGAATGTATCTTATGGGgcAGAGTTAACTCATGAAAAGGAATGC, y sus respectivos oligonucleótidos complementarios (tabla 4). Las sustituciones de bases se indican con letras minúsculas. Para el cambio de aminoácido en GAPC, el vector pETGB1aGAPC1 se utilizó como molde para la amplificación por PCR. Los cebadores utilizados fueron: GAPCK76Aup, CCCTTCTCTTCGGTGAGgcGCCAGTCACTGTTTTTCG; GAPCK231Afw, GCTTCCAGCTCTTAACGGAgcGTTGACTGGAATGTCTTTC, y sus respectivos oligonucleótidos complementarios (tabla 4). Las sustituciones de bases se indican con letras minúsculas. Los vectores resultantes, pRSETbSL7K23A, pRSETbSL7K124A, pRSETbSL7K23AK124A, pETGB1aGAPC1K76A y pETGB1aGAPC1K231A se verificaron mediante secuenciación de ADN (www.macrogenusa.com) y se utilizaron para transformar la cepa *E. coli* BL21 (DE3) RiL o BL21 (DE3) pLysS para luego realizar la expresión y purificación de las proteínas recombinantes (como se describe anteriormente) con cambio de aminoácido.

- Dicroísmo circular (CD)

Espectros de UV-lejano de dicroísmo circular se obtuvieron utilizando un espectro-polarímetro Jasco J-810 (Jasco International Co.) en un intervalo de longitud de onda 200-250 nm, a 25°C. Las mediciones se realizaron en una cubeta de cuarzo de 0,2 cm a una velocidad de 100 nm.min⁻¹, el ancho de banda de 1 nm, tiempo de respuesta de 2 s, el tono de datos de 1 nm, y la acumulación de datos de CD 10. Los datos de los espectros se muestran como valores de elipticidad residual media (deg.cm².dmol⁻¹) obtenido luego de restar la línea de base, suavizado y normalización de los datos. Los espectros de dicroísmo para SINAL7, SINAL7K23A, SINAL7K124A, SINAL7K23AK124A, GAPC1, GAPC1K76A, GAPC1K231A (0,1-1 mg.ml⁻¹) se registraron en buffer fosfato de sodio 20 mM, pH7.4. Se realizó análisis de la estructura secundaria de los datos de los espectros de dicroísmo, utilizando el algoritmo K2D [90].

- Determinación de la actividad enzimática de GAPC y mutantes de GAPC

La actividad GAPC se midió siguiendo la reducción de NAD⁺ como se describió por Rius y colaboradores en 2008 [37] usando proteínas recombinantes. El buffer contenía 50 mM de trietanolamina-HCl pH8.5, 10 mM Na₃AsO₄, 4 mM NAD⁺, 1,2 mol de Ga3P y ditiotreitól 3 mM. La reacción fue iniciada por la adición de Ga3P, fue lineal durante al menos 3 min, proporcionalmente a la concentración de la enzima. Una unidad de enzima (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol.min⁻¹ de NADH en condiciones de ensayo especificado.

- Aislamiento de proteínas Nucleares

Los extractos de proteínas nucleares se obtuvieron de flores de 40 días de plantas de *A. thaliana* y plantas *signal7* (deficientes de SINAL7) como se ha descrito previamente por Calikowski y colaboradores en 2006 [91], con modificaciones menores. Las proteínas de los compartimientos nucleares y otras fracciones subcelulares se analizaron por electroforesis en SDS-PAGE

(descrito previamente) y fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Como control positivo de proteínas nucleares (N) se utilizó un anticuerpo contra la forma acetilada de la histona H3 (anti-AcH3); y anti-ADPGlc PPasa se utilizó como un control para proteínas de otras fracciones subcelulares o citosólicas (C) en los extractos. Los complejos antígeno-anticuerpo se resolvieron como se indicó anteriormente.

- Análisis de espectrometría de masa

El análisis de espectrometría de masas se llevó a cabo en el CEQUIBIEM (instalación proteómica), en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. El equipo utilizado fue un MALDI-TOF-TOF, Ultraflex II de Bruker. El enfoque ascendente utilizado se basó en MS huella digital y MSMS de péptidos representativos para cada proteína; la búsqueda se realizó contra la base de datos NCBI de *Arabidopsis thaliana* (para las proteínas GAPC) y el *Homo sapiens* (por ubiquitina); se permitió dos cortes indeseados para tripsina; una modificación constante de carbamidometilación se utilizó para cisteína, y una modificación variable de GlyGly para detectar ubiquitinaciones no escindidas de Lys; tolerancia péptido: 0,1 Da; tolerancia fragmento: 0,5 Da.

- Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron al menos tres veces (muestras biológicas) de los triplicados técnicas. La importancia de las diferencias se determinó mediante la prueba "t" de Student o prueba de ANOVA. Además en algunos casos se realizó la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Los valores estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) del control se muestran con un asterisco o letras minúsculas en gráficos.

- Transformación de plantas de *A. thaliana* por "Floral Dip"

Se crecieron plantas de *A. thaliana* variedad Columbia (Col0) hasta floración (aproximadamente 5 a 6 semanas). El momento adecuado para la transformación de las plantas por inmersión de los botones florales [92] es cuando las yemas están emergiendo (aprox. 2 cm. - 8 cm. de la roseta) y todavía no se encuentran flores abiertas. Las plantas se regaron abundantemente los dos últimos días. Previamente a la transformación de las plantas, se inoculó 30 ml de medio LB conteniendo, rifampicina (100 µg/ml), gentamicina (25 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml) con *Agrobacterium tumefaciens* portadores de la construcción de interés: *pPZP212-SINAL7*, donde la secuencia de SINAL7 se encuentra a continuación del promotor constitutivo 35S CaMV. Estos inóculos fueron crecidos con agitación a 28°C por 24 h, los cuales fueron utilizados como pre-inóculo en 600ml de medio LB suplementado con antibióticos, que fueron crecidos con agitación a 28°C por 24 h. Los cultivos saturados se centrifugaron a 4200 rpm por 15 minutos. El precipitado bacteriano fue resuspendido en un litro de medio de infiltración, el cual contiene 50 g sacarosa, 0.5 g de buffer MES y 300 µl de Silwet L-77R (Helena Chemical Company). Se llenaron vasos de precipitado con la solución de *Agrobacterium* resuspendidos en medio de infiltración. Las plantas fueron invertidas sobre la solución de infiltración bacteriana de modo que los botones florales quedaran sumergidas totalmente en el líquido. El tiempo de inmersión fue de 20 a 30 segundos y posteriormente al retirarlas, fueron puestas de costado en una bandeja, para que el exceso de líquido no penetre en la tierra. Luego se cubrió la bandeja que contenía las macetas con papel film y siguieron su crecimiento en el cuarto de plantas por 1-2 días. Cuando las flores se abrieron y las yemas comenzaron a crecer, las macetas se colocaron en posición vertical. Se dejaron crecer las plantas hasta la apertura de las silicuas con una irrigación decreciente. De esta manera se obtuvieron las semillas de la generación parental de plantas transformadas (SINAL7) que se recolectaron en un papel, se tamizaron los restos de los frutos y se guardaron las semillas en tubos de microcentrifuga destapados hasta que se encontraron libres de humedad para evitar la contaminación de las semillas. Posteriormente los tubos conteniendo solo

semillas secas fueron tapados y mantenidos en heladera a 4°C hasta su utilización.

- Análisis por *real time* qPCR

La PCR en tiempo real se realizó utilizando como templado ADNc obtenido de plantas de *A. thaliana* Col0, *signal7.1*, *signal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. Las reacciones de amplificación se realizaron en placas de 96 pocillos cada una de las cuales contenía 20 µl de medio de reacción [10 ng de ADNc; 500 nM de oligonucleótidos; 1X buffer Go Taq incoloro (Promega); 1,5 mM de MgCl₂; 200 µM dNTPs; 1X de Syber Green; 0,8 U de ADN polimerasa Go Taq (Promega); agua destilada c.s.p 20 µl]. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mx3000P (QPCR Systems, Stratagene) utilizando como controles interno el gen *ACTINA2* (At3g18780), *CBP* (At5g44200), *CPK3* (At4g23650). Para la cuantificación relativa se empleó el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [93].

- Tratamiento con UV-B en plantas de *Arabidopsis*

La irradiación de plantas con UV-B se realizó como fue descrita previamente por Lario y colaboradores [94]. Plantas de *A. thaliana* fueron expuestas a radiación UV-B por 4 h en una cámara de crecimiento usando lámparas de UV (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las lámparas de UV-B fueron cubiertas con filtros de acetate de celulosa (Tap Plastics, Mountain View, CA, USA) para excluir las longitudes de onda por debajo de 280 nm y ubicadas 30 cm por encima de las plantas. La radiación UV medida con un radiómetro de UV-B/UV-A (UV203 AB radiometer, Macam Photometrics, Scotland, UK) fue de 2 W.m⁻² para UV-B y 0.65 W.m⁻² para UV-A. Las plantas control fueron expuestas el mismo periodo de tiempo a las fuentes de luz descritas más arriba, pero cubiertas con un filtro de poliéster (Tap Plastics) para absorber tanto UV-B (0.04 W.m⁻²) como las longitudes de onda menores a 280 nm (la intensidad de radiación UV-A fue de 0.4 W.m⁻²). Inmediatamente después de la irradiación, las muestras de al menos tres

experimentos independientes fueron colectadas y congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta su utilización (extracción de ARN).

- Identificación y selección de mutantes de homocigotas de SINAL7

Se solicitaron semillas mutantes en el gen *SINAL7* por inserción de ADN-T de *A. tumefaciens* al "*Arabidopsis Biological Resource Centre*" (ABRC) (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress?gene=AT5G37890>). Se crecieron semillas de las plantas obtenidas de ABRC y se realizaron extracciones de ADNg de las hojas de las mismas como se describe más arriba. Las plantas homocigotas para la inserción de ADN-T en el gen *SINAL7* de las líneas SALK_096989 (denominada, *sin17.1*) y CS833574 (denominada, *sin17.2*) fueron identificadas mediante la técnica de PCR sobre el ADNg obtenido como molde, utilizando un par de oligonucleótidos que amplifican el gen *SINAL7* (*SINAL7up* y *SINAL7down*) y un oligonucleótido diseñado a partir del extremo izquierdo del ADN-T (LBb1, 5' - GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT - 3'; <http://signal.salk.edu>) (tabla 4).

- Construcción y selección de plantas transgénicas sobreexpresantes de SINAL7

Se construyeron plantas transgénicas sobreexpresantes de SINAL7 a partir de la transformación de plantas de *A. thaliana* Col0 por la técnica de *floral dip* (como se describe previamente) con *A. tumefaciens* conteniendo el vector pPZP212-SINAL7. La construcción pPZP212-SINAL7 se logró a partir del clonado clásico de la secuencia de ADNc que codifica para la proteína SINAL7 amplificada por PCR con los sitios flanqueantes del par de enzimas de restricción Xba I / SacI en un plásmido derivado del vector binario de expresión en plantas pPZP212 (cedido gentilmente por el doctor Alejandro Araya) [95]. El plásmido denominado mMat1, contiene un inserto (flanqueado por los sitios XbaI y BamHI) ubicado corriente arriba a un promotor constitutivo CaMV 35S agregado al plásmido previo al gen resistencia *NPTII* (que confiere resistencia al antibiótico kanamicina), fue

sometido a reacción de digestión con el par de enzimas de restricción XbaI y SacI, logrando la liberación del inserto y la linealización del plásmido. Luego de la obtención de la secuencia de ADNc que codifica para SINAL7 conteniendo los sitios de las enzimas XbaI y SacI amplificado por PCR, y sometido a reacción de digestión con las enzimas correspondientes, se realizó la ligación en el plásmido linealizado obtenido, obteniendo de esa manera el vector pPZP212-SINAL7. La construcción en el vector pPZP212-SINAL7 fue verificada por secuenciación (www.macrogenusa.com) y a continuación la misma se utilizó en la transformación de bacterias de *A. tumefaciens* como se describe previamente. Las bacterias transformantes positivas a su vez se emplearon para transformar plantas de *A. thaliana* Col0 mediante la técnica de *floral dip*. La sobreexpresión de SINAL7 en las plantas está controlada bajo el promotor constitutivo 35S CaMV (del virus del mosaico del coliflor). Además las plantas transgénicas resultan ser resistentes al antibiótico kanamicina (utilizado como marcador de selección), característica otorgada por el vector pPZP212. Luego de la transformación, la selección de las líneas sobreexpresantes de SINAL7 se llevó a cabo mediante la germinación de las semillas de plantas transformadas en placas de Petri en medio MS suplementadas con el antibiótico kanamicina (MS-kana). Las plantas resistentes, fueron luego rusticadas en maceta con tierra y su crecimiento se llevó a cabo como se describe previamente. A los 28 días post-geminación, se tomó una muestra de ADNg de una hoja de roseta de cada planta resistente (12 plantas, denominadas 35SCaMV:SINAL7#1 a 35SCaMV:SINAL7#12) y se realizó la confirmación de la inserción de la construcción por la técnica de PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 4). Las plantas conteniendo el transgén fueron sometidas a análisis por segregación para la selección de plantas transgénicas homocigotas sobreexpresantes de SINAL7. De esta manera se seleccionó dos líneas de plantas transgénicas homocigotas sobreexpesantes de SINAL7 (*SINAL7.1* y *SINAL7.2*) que expresan aproximadamente diez veces más SINAL7 (determinado por *real time* qPCR), las cuales fueron utilizadas en los experimentos de caracterización fenotípicos posteriores.

- Longitud de raíz y diámetro del tallo principal

La longitud de la raíz principal fue determinada como fue descrito previamente por Corrales y colaboradores [96] mediante el análisis de las imágenes de las raíces con el programa *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) [97]. En este experimento, se determinó en plantas de *A. thaliana* Col0, *sin17.1*, *sin17.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*, la distancia entre la zona que limita con el hipocotilo y la punta de la raíz en las imágenes fotográficas tomadas en lupa (NIKON SMZ-2T, Japan) con aumento 1x. Previo a esto, se realizó una calibración de la medición con una regla estándar NIKON. Se analizó al menos doce raíces de cada línea de plantas y los valores fueron analizados mediante una prueba de ANOVA como se describe en la sección de análisis estadístico.

La determinación del diámetro del tallo principal de las plantas se realizó mediante el análisis de la distancia de los mismos (5 mm por debajo de la primera ramificación) en imágenes mediante el programa *ImageJ*, habiendo realizado una calibración de la medición (con una regla estándar NIKON) previa a las determinaciones. Se analizaron a menos diez tallos de plantas de *A. thaliana* Col0, *sin17.1*, *sin17.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2* y los valores fueron analizados mediante una prueba de ANOVA como se describe en la sección de análisis estadístico.

- Análisis del área de la roseta.

Utilizamos el método de determinación de la expansión de la roseta descrita por Rymen y colaboradores [98] con modificaciones menores. Las plantas fueron crecidas en tierra como se indica previamente y se tomaron imágenes digitales a través del tiempo. Estas imágenes fueron procesadas con el programa *ImageJ* [97], y el área total de la roseta fue determinada en cada punto. Se analizaron al menos 10 plantas de cada línea. Finalmente, este parámetro fue graficado en función del tiempo y una prueba de ANOVA de dos vías fue realizada, definiendo dos factores con diferentes niveles: Tipo de planta (Col0, *sin17.1*, *sin17.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*) y tiempo (cada día como nivel).

- Número de hojas de roseta y caulinares

Se determinó el número total de hojas de roseta y caulinares de plantas de *A. thaliana* Col0, *sin17.1*, *sin17.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*, desde la germinación a lo largo del desarrollo de las plantas hasta el día 27 post-germinación. Se analizó al menos 10 plantas de cada línea y los valores obtenidos se analizaron mediante una prueba de ANOVA como se describe en la sección de análisis estadístico.

- Determinación de peso seco

El peso seco de rosetas completas fue determinado en plantas de 28 días de *A. thaliana* Col0, *sin17.1*, *sin17.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*, pesadas después de ser secadas en estufa a 60 °C por 48 h.

- Cuantificación de clorofilas

Los valores de concentración de clorofila se obtuvieron según la técnica descrita por Porra en 2002 [99]. Hojas de roseta de plantas de *A. thaliana* se congelaron en nitrógeno líquido y se procesaron en mortero. El polvo obtenido se extrajo durante 12 h a 4 °C con solución de acetona amortiguada a pH 7.8. Se centrifugó, y el sobrenadante se leyó a 663 nm, 647 nm y 537 nm (este último es una corrección por lectura proveniente de antocianinas en las muestras). Los cálculos se realizaron según la ecuación reportada por Sims y Gamon en 2002 [100].

Fórmulas para el cálculo de clorofilas:

$$\text{Clorofila } a = 0.01373 A_{663} - 0.000897 A_{537} - 0.003046 A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = 0.02450 A_{647} - 0.004305 A_{537} - 0.005507 A_{663}$$

- Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

Las similitudes de secuencia de SINAL7 (At5g37890, residuos aminoacídicos de 1 a 286) fueron analizadas mediante el programa *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y el alineamiento de secuencias fue visualizado mediante el programa *Bio Edit* [101]. Se utilizó un corte de 35 % de identidad como el máximo mínimo permitido en el alineamiento. En porcentajes menores al 35 % de identidad a SINAL7 de las secuencias analizadas, las posibilidades de complementación en la función de SINAL7 se limitan sólo al dominio RING *finger* (dominio E3 ligasa) y no a la identidad del C-terminal que provee especificidad unión al sustrato en las E3 ligasas de tipo RING. A partir del alineamiento se realizó un análisis filogenético que fue plasmado en un árbol filogenético realizado en programa MEGA 6.06 [102]. El análisis filogenético fue inferido por el método de máxima verosimilitud basada en el modelo JTT [103]. Se realizaron 500 repeticiones de las réplicas de los árboles filogenéticos y se determinó el porcentaje en el que los taxones asociados fueron agrupados [104].

- Tiempo de floración

El tiempo de floración fue determinado como fue descrito previamente por Koornef y colaboradores [105]. Se analizó el tiempo de floración en al menos 10 plantas de *A. thaliana* Col0, *sin17.1*, *sin17.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2* crecidas en condiciones de día largo (como se describe previamente). Los valores de tiempo de floración fueron sometidos a una prueba de ANOVA como se describe en la sección de análisis estadístico.

- Análisis de ERO

El análisis de ERO se realizó como fue descrito previamente por Leshem y colaboradores en 2006 [106]. Se incubaron flores (al menos 6 de cada línea) y la hoja 5 (al menos 4 de cada línea) de plantas de *A. thaliana* Col0, *sin17.1*, *sin17.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2* con el buffer fosfato conteniendo

con H₂DCFDA 10 μM (Sigma-Aldrich) por 30 minutos, luego se realizaron tres lavados con el mismo buffer sin el reactivo H₂DCFDA. La fluorescencia de ERO fue visualizada en microscopio de fluorescencia (Olympus) con el filtro correspondiente para evitar la superposición de la emisión de la autofluorescencia de la clorofila.

- Actividad catalasa total

La actividad catalasa total fue determinada a 25°C en extracto de hojas de plantas de *A. thaliana* Col0, *signal7.1*, *signal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*, como fue descrito previamente por Aebi [107], con modificaciones menores [108] siguiendo el descenso en la absorbancia a 240 nm a 25°C. El medio del ensayo contenía 470 μL de 50 mM KH₂PO₄ pH7.0 y 10 mM H₂O₂ como sustrato.

- Medidas de consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno fue medido a 25°C usando una cámara de aire cerrada unida a un electrodo tipo Clark (Hansatech Leaf Disc Electrode Unit, Hansatech, UK). Se cortaron hojas de plantas de aproximadamente 6 semanas de *A. thaliana* (entre 200 a 300 mg) y éstas fueron colocadas en la cámara en presencia del electrodo de oxígeno. La calibración se realizó mediante 2 puntos: para el límite superior se utilizó el pasaje de aire ambiental (21 % O₂) y el límite inferior se logró con el pasaje de N₂ (g) (0 % O₂) a través de la cámara. El consumo de oxígeno fue monitoreado durante 15 min.

- Determinación del número de piezas florales

El número de piezas florales del ramillete del ápice en el tallo principal fue determinado en plantas de 30 días de *A. thaliana* Col0, *signal7.1*, *signal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. En esta determinación, se contó el número de piezas florales en al menos 10 ramilletes de plantas (10 plantas) de cada línea. Los

valores fueron analizados mediante una prueba de ANOVA como se describe en la sección de análisis estadístico.

- Determinación del número de silicuas y semillas

Se contó el número de silicuas por planta en al menos 12 plantas en estadio 6.9 [109] de *A. thaliana* Col0, *sin17.1*, *sin17.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. Se determinó el número de silicuas totales por planta y además se clasificó en silicuas normales y silicuas aberrantes a las silicuas que presentaban características normales o anormales en su desarrollo. Los valores obtenidos del número de silicuas para cada línea de plantas fue sometido a una prueba de ANOVA como se describe en la sección de análisis estadístico. En el análisis del número de semillas, se determinó el número de semillas totales por planta en todas las líneas de plantas. Se clasificaron en viables o no viables a las semillas que presentaban una morfología normal o anormal en su desarrollo. En este análisis, se dividió imaginariamente a los tallos de 4 plantas (de cada línea) en tres porciones y en cada una de ellas se contó el número de semillas de todas las silicuas de cada porción. Las plantas utilizadas en este estudio fueron las mismas que las usadas en el análisis de las silicuas. Los valores correspondientes al número de semillas en cada planta de cada línea fueron sometidos a una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

- Germinación de los granos de polen

La determinación de la germinación del grano de polen se evaluó analizando la elongación del tubo polínico en los mismos como fue descrito por Hicks y colaboradores [110], con modificaciones menores. Se analizó la elongación del tubo polínico del polen obtenido de flores de plantas de *A. thaliana* Col0, *sin17.1*, *sin17.2*, *SINAL7.1*, y *SINAL7.2*, que fue incubado en porta-objetos con el medio de germinación (10 % (P/V) sacarosa, 0.01 % (P/V) ácido bórico, 1 mM CaCl₂, 1 mM Ca(NO₃)₂, y 1 mM MgSO₄, pH 6.5)

al 100% de humedad por 12 h. Luego se cuantificó el número de granos de polen germinados en microscopio óptico (NIKON Labophot-2) y se analizó el porcentaje de los mismos para cada línea.

- Programas bioinformáticos utilizados

Las secuencias nucleotídicas fueron obtenidas de las páginas *web* de *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR) (www.arabidopsis.org) y de la página del *National Centre for Bio-technology Institute* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Los oligonucleótidos se diseñaron y analizaron utilizando el algoritmo Primer-BLAST disponible en la página *web* del del National Center for Bio-technology Institute (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/).

El análisis de las secuencias de ADN y aminoácidos se realizó utilizando los diferentes módulos del programa *Lasergene* 5.0 (DNASTAR, Inc. Madison).

Los análisis de densitometría se llevaron a cabo utilizando el programa *Gel Pro Analyzer* (Media Cybernetics).

El análisis de la estructura secundaria a partir de los datos de DC se realizó utilizando el algoritmo K2d, (<http://kal-el.ugr.es/k2d/spectra.html>), [90].

Los gráficos y cálculos de los parámetros cinéticos se realizaron utilizando el programa *SigmaPlot 12*, *Systat Software, Inc.*, San Jose California USA, (www.sigmaplot.com).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

Caracterización bioquímica de SINAL7

Caracterización de la ubiquitina ligasa E3 de *A. thaliana* SINAL7 – Identificación de los residuos involucrados en la actividad.

La ubiquitinación de las proteínas es uno de los procesos que las induce o dirige hacia su degradación por el proteosoma y, por lo tanto, es un importante mecanismo de la regulación de funciones celulares claves [53-55]. La ubiquitinación es llevada a cabo por un proceso de tres pasos que involucra la activación de la ubiquitina (Ub) por una enzima E1, la transferencia de la Ub a una proteína E2 y finalmente una ubiquitina ligasa E3 cataliza la transferencia del péptido Ub a una proteína aceptora o blanco. En este proceso, las enzimas E3 son responsables del reconocimiento específico de la proteína blanco. Así, el estudio de estas proteínas es esencial para comprender los mecanismos regulatorios de procesos celulares fundamentales a través de la vía de degradación de proteínas.

El gen *seven in absentia-like 7* (At5g37890, *SINAL7*) de *Arabidopsis thaliana*, codifica para una proteína con las características de las ubiquitina ligasas E3 del tipo C3HC4. Como se mencionó en la introducción, el genoma de *A. thaliana* contiene más de mil genes que codifican enzimas E3 ligasas y existen 18 homólogos posibles de la familia *SINA* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Además, el interés por el estudio de esta familia de genes radica en que han sido asociados varios de sus miembros a diferentes procesos fisiológicos como la resistencia a patógenos y el crecimiento vegetal [48, 52]. De esta forma, con el fin de determinar la función de *SINAL7*, nos propusimos realizar la caracterización bioquímica de la misma.

- Clonado, expresión y purificación de *SINAL7* recombinante

Con el objeto de generar una construcción que contenga la secuencia nucleotídica de *SINAL7* de *A. thaliana*, que luego nos permita expresar la proteína recombinante en un sistema heterólogo bacteriano y caracterizarla, se llevó a cabo el sub-clonado de dicho gen previamente clonado en el vector pGEM-T (disponible en el laboratorio). El fragmento de ADNc conteniendo la secuencia codificante de 861 pares de bases fue liberado mediante digestión enzimática usando las enzimas BamHI y XhoI (como se

describe en Materiales y métodos) a fin de clonarlo en los vectores de expresión pRSETb y pHISparallel (Figura 6).

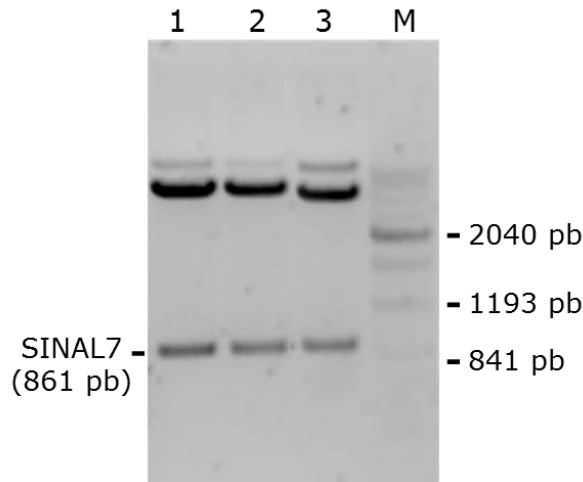


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 0.8 % (P/V) de los productos de la restricción del vector pGEMT-SINAL7, utilizando las enzimas BamHI y XhoI (Calles 1-3); (M) marcador 400 bp (Productos Biológicos).

Como se observa en la Figura 6, la reacción de restricción liberó un fragmento de alrededor de 850 pb, similar al tamaño esperado para el gen *AtSINAL7* con sus sitios específicos de corte BamHI y XhoI (861 pb). Además, se observa un remanente de plásmido en cada calle sin ser digerido.

Una vez verificada la correcta liberación del inserto, se llevó a cabo una reacción de ligación en los vectores pRSETB y pHISparallel digeridos con las mismas enzimas. Posteriormente, se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 pLys con los vectores de expresión SINAL7-pRSETB y SINAL7-pHIS-parallel (nombre que se le dio a los vectores que contienen la secuencia codificante de la proteína recombinante SINAL7, de *A. thaliana*). En ambos plásmidos, la proteína se expresa fusionada a un "Tag" de hexahistidinas en el extremo N-terminal, que permite su purificación mediante columnas de afinidad a Ni⁺⁺. Para verificar la correcta transformación de las células, se llevó a cabo una PCR de colonias para amplificar el fragmento correspondiente a *SINAL7* (Figura 7) de dos colonias (en cada caso) obtenidas de medio selectivo conteniendo el antibiótico

ampicilina, característica de resistencia que es otorgada por los vectores de expresión pRSETb y pHIS-parallel.

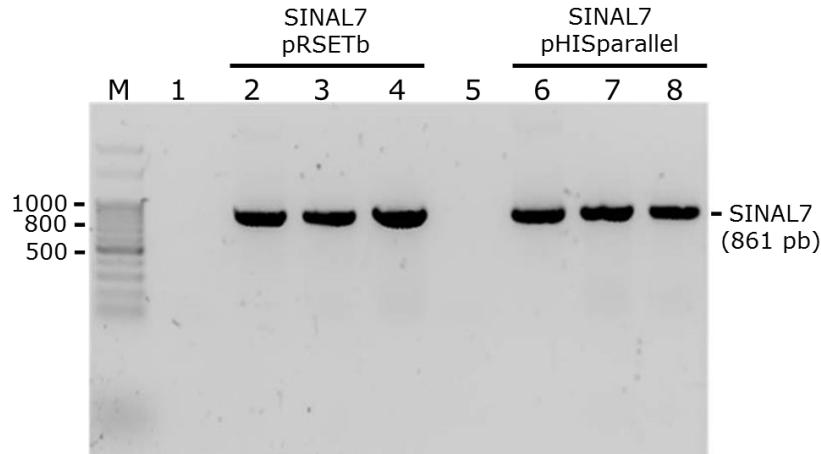


Figura 7. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8 % (P/V) de productos de amplificación por PCR de *SINAL7*. Calles: M- marcador de peso molecular 100 pb (pares de bases); 1- Blanco PCR (sin molde); 2- control positivo (vector *SINAL7*-pRSETb); 3- Colonia A de *E. coli BL21 pLys* (transformada con *SINAL7*-pRSETB); Colonia B de *E. coli BL21 pLys* (transformada con *SINAL7*-pRSETB); 5- Blanco PCR (sin molde); 6- control positivo (*SINAL7*-pHISparallel); 7- Colonia C de *E. coli BL21 pLys* (transformada con *SINAL7*-pHISparallel); 8- colonia D de *E. coli BL21 pLys* (transformada con *SINAL7*-pHIS-parallel).

La Figura 7 muestra la presencia de bandas de tamaño molecular correspondiente a los fragmentos de *SINAL7* amplificados. Así podemos decir que la transformación de las células competentes de *E. coli BL21 pLys* fue exitosa para ambos vectores utilizados, obteniéndose dos cepas de *E. coli* transformadas con las construcciones *SINAL7*-pRSETb y *SINAL7*-pHISparallel.

Posteriormente, ambas cepas de *E. coli* (clones A y C), fueron crecidas a 37°C y 160 rpm en medio TB suplementado con ampicilina (50 µg/ml), hasta una DO_{600} de 0.4 - 0.6. La expresión de la proteína recombinante fue inducida con IPTG 1mM por 12 h. El tiempo de expresión óptimo fue seleccionado mediante el análisis de muestras recolectadas a diferentes tiempos luego de la inducción. Los cultivos de células fueron colectados por centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos, y las células fueron lavadas dos veces con Tris-HCl 20mM pH 7.4. Posteriormente las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida en

condiciones desnaturalizantes para verificar la expresión de la proteína recombinante (Figura 8).

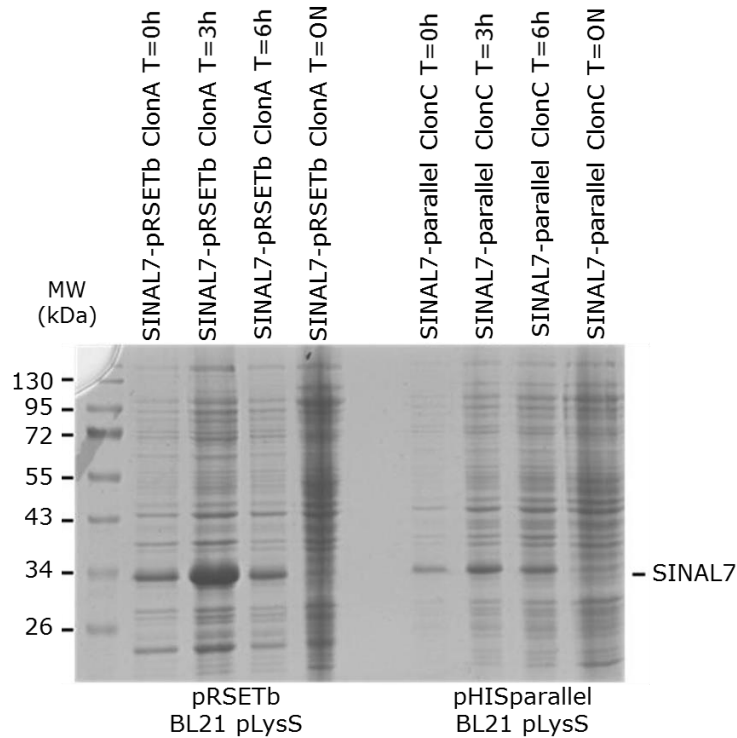


Figura 8. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 % (P/V) del análisis de expresión de la proteína recombinante SINAL7 a diferentes tiempos de inducción en células de *E. coli* BL21 pLys transformadas con los vectores SINAL7-pRSETb y SINAL7-pHIS-parallel.

Como muestra la Figura 8, luego de la inducción se obtuvo una banda proteica de la masa molecular esperada para SINAL7 (aproximadamente, 34 kDa), en ambas cepas transformadas con las construcciones SINAL7-pRSETb y SINAL7-pHIS-parallel. La banda proteica de mayor intensidad se obtuvo a las 3 horas después de la inducción. La presencia de la proteína SINAL7 se reveló mediante análisis de *Western blot* (detallado más abajo).

Si bien la expresión de SINAL7 en el sistema pHISparallel fue menor que en el sistema pRSETb, la obtención de la proteína recombinante en el primer sistema de expresión es relevante, ya que el vector pHISparallel posee un sitio de clivaje de la proteasa TEV (disponible en el laboratorio), que permite la liberación de la proteína del *Tag* de hexahistidinas. Esto es de suma importancia para la obtención de SINAL7 sin modificaciones en su

secuencia aminoacídica que pudiesen interferir en posteriores ensayos bioquímicos.

Posteriormente, se realizó la purificación de la proteína recombinante como se describe en Materiales y métodos mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni⁺⁺. Luego de los sucesivos lavados de la columna con la proteína unida, fue eluida en un gradiente de imidazol de 20 mM a 500 mM y las fracciones fueron colectadas. Una alícuota de cada fracción fue sembrada en geles de poliacrilamida al 12 % (P/V) y sometida a electroforesis, seguida de tinción con azul de Coomassie para revelar la presencia de las proteínas (Figura 9). Además se sembraron las muestras correspondientes al tiempo cero y 12 horas de inducción (ON), el pellet celular y el sobrenadante obtenidos luego del paso de sonicación y centrifugación (ver Materiales y métodos) y el lavado de la columna previo a la elusión de la proteína con el gradiente de imidazol.

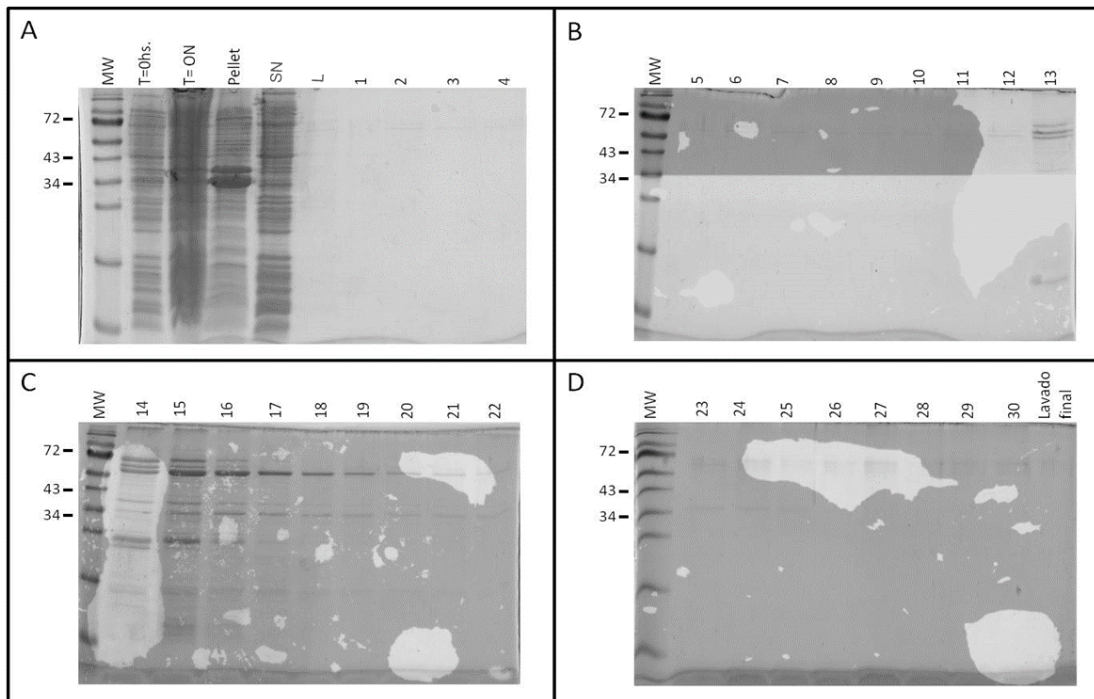


Figura 9. Análisis mediante geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 % (P/V) de la purificación de la proteína recombinante SINAL7. A- MW, marcador de masa molecular (Fermentas *Protein Ladder*). T=0h: muestra a 0h de inducción; T ON: muestra a 12h de inducción. Pellet: precipitado obtenido luego del sonicated. SN: Fracción sobrenadante obtenida luego del sonicated. L: lavado de la columna Calles 1 a 4: Fracciones obtenidas luego de la elusión. Panel B, MW y fracciones de elusión 5 a 13. Panel C: MW y fracciones de elusión 14 a 22. Panel D: MW y fracciones de elusión 23 a 30 y el lavado final de la columna.

De la purificación de SINAL7 (Figura 9), si bien puede observarse que un 75 % de proteína queda en el precipitado después del proceso de sonicado, se obtuvo cantidad suficiente de proteína soluble de aproximadamente 35 kDa. en las diversas fracciones. Luego de la purificación, se llevó a cabo la concentración de las fracciones que contienen la proteína SINAL7 como se describe en Materiales y métodos. La proteína purificada fue mantenida a 4 °C hasta su posterior uso.

- Análisis por *Western blot* de SINAL7 recombinante

Una vez realizada la expresión de la proteína recombinante SINAL7 y la purificación de la misma (Figura 9), se llevó a cabo una electroforesis (por duplicado) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de las muestras a 0h (Figura 10 calle 1) y 3 h (Figura 10 calle 2) post-inducción con IPTG, sumado a una muestra de la proteína purificada (Figura 10 calle 3). Uno de los geles fue sometido a tinción con *Coomassie Brilliant Blue* (R250, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y el otro a transferencia (*Western blot*) a membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot Transfer Medium, *Nitrocellulose Membrane*, Bio-Rad, California, USA). Esta membrana fue incubada con un anticuerpo de reconocimiento específico (His-probe (H-15): sc-803, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) dirigido contra el *Tag* de hexa-histidinas. El complejo antígeno - anticuerpo fue visualizado por la reacción de la fosfatasa alcalina unida a anticuerpo anti IgG de conejo con los sustratos BCIP y NBT (Promega, Madison WI, USA, Figura 10).

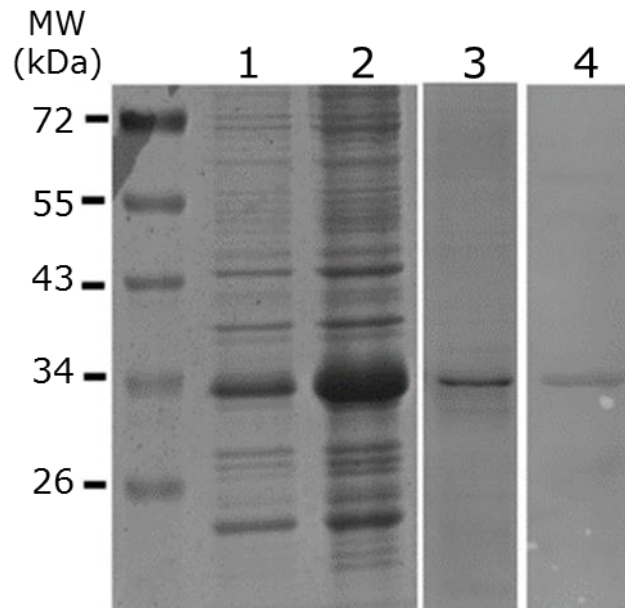


Figura 10. Identificación de SINAL7 por Western blot. Gel de electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie de extractos de *E. coli* inducidos a 0h (calle 1), 3h (calle 2) y muestra del concentrado de fracciones de la purificación de SINAL7 recombinante (calle 3). Calle 4, membrana de Western blot con SINAL7 pura revelada con el anticuerpo α -His. MW (kDa), representa las masas moleculares del marcador (Fermentas, *Protein Ladder*).

En la Figura 10 se observa la aparición de una banda proteica de aproximadamente 35 kDa, que corresponde a la identificación de la proteína recombinante SINAL7 por el anticuerpo dirigido contra el *Tag* de hexahistidinas luego del análisis por *western blot*.

- SINAL7 presenta actividad ubiquitina ligasa E3 y se autoubiquitina

La proteína SINAL7 contiene un dominio de 45 aminoácidos en el extremo N-terminal que presenta 42 % de identidad con el dominio *RING finger* de Siah de *D. melanogaster*. Estos dominios son una clase especializada dentro del dominio *zinc finger* y se encuentran formados por 40-60 aminoácidos que coordinan 2 átomos de zinc [46, 47]. Son módulos específicos para la interacción entre proteínas y se encuentran implicados en distintos procesos biológicos. Habiendo obtenido SINAL7 recombinante purificada y sabiendo que la actividad de E3 ubiquitina ligasa es intrínseca de los dominios *RING finger* y que la misma sería una función general de este dominio

(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/IPR013010>), se evaluó la actividad de ubiquitina ligasa E3 de SINAL7.

El ensayo *in vitro* de ubiquitinación se llevó a cabo como fue descrito por Wertz y colaboradores [89], usando componentes heterólogos: una enzima activadora de ubiquitina E1 de levadura y la enzima conjugadora de ubiquitina E2 (UbcH2) humana recombinante, en presencia de ubiquitina comercial fusionada a un *Tag* c-Myc (cMyc-ubiquitina), como se describe en Materiales y métodos. La proteína purificada recombinante SINAL7 se usó como enzima ligasa de ubiquitina E3.

Como era de esperarse, no se obtuvo señal de ubiquitinación en las calles que carecían de la proteína cMyc-ubiquitina (Figura 11, calles 1, 2, 3, 5 y 6), indicando que el anticuerpo anti-cMyc no muestra reacción cruzada con otras proteínas presentes en la mezcla de reacción. Las calles 4 y 7 de la Figura 11, conteniendo solamente ubiquitina marcada o la mezcla de reacción careciendo solo del componente E3 (SINAL7) respectivamente, muestra cuatro bandas características del monómero (9,3 kDa) y los oligómeros que forma cMyc-ubiquitina. De manera interesante, la mezcla completa de reacción mostró una banda proteica que correspondería a SINAL7 ubiquitinada que migró como una proteína de aproximadamente 72 kDa (Figura 11, calle 8).

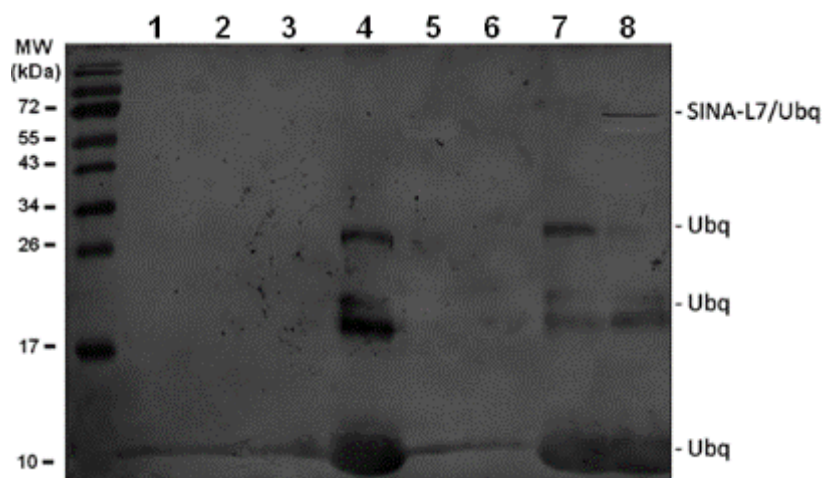


Figura 11. Actividad ubiquitina ligasa E3 de SINAL7. Las reacciones de ubiquitinación fueron realizadas usando cMyc-ubiquitina como sustrato como se describe en Materiales y métodos. Calle 1, buffer de ubiquitinación. Calle 2, buffer de ubiquitinación + E1. Calle 3,

buffer de ubiquitinación + E2. Calle 4, buffer de ubiquitinación + cMyc-ubiquitina. Calle 5, buffer de ubiquitinación + SINAL7. Calle 6, buffer de ubiquitinación + E1 + E2. Calle 7, buffer de ubiquitinación + E1 + E2 + cMyc-ubiquitina. Calle 8, buffer de ubiquitinación + E1 + E2 + cMyc-ubiquitina + SINAL7. Los conjugados SINAL7/cMyc-ubiquitina se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % (P/V) t detectados por *Western blot* usando el anticuerpo anti-cMyc.

Con el fin de conocer si efectivamente SINAL7 se había auto-ubiquitinado, las muestras 5 y 8 conteniendo solamente al E3 (SINAL7) y la mezcla de reacción completa del ensayo respectivamente, fueron analizadas por *Western blot* (figura 12) usando un anticuerpo dirigido contra el *Tag* de hexahistidinas que posee SINAL7 (Santa Cruz Biotechnology) y un anticuerpo específico dirigido contra SINAL7 recombinante (producido en conejo como se describe en Materiales y métodos, parte de este trabajo de tesis).

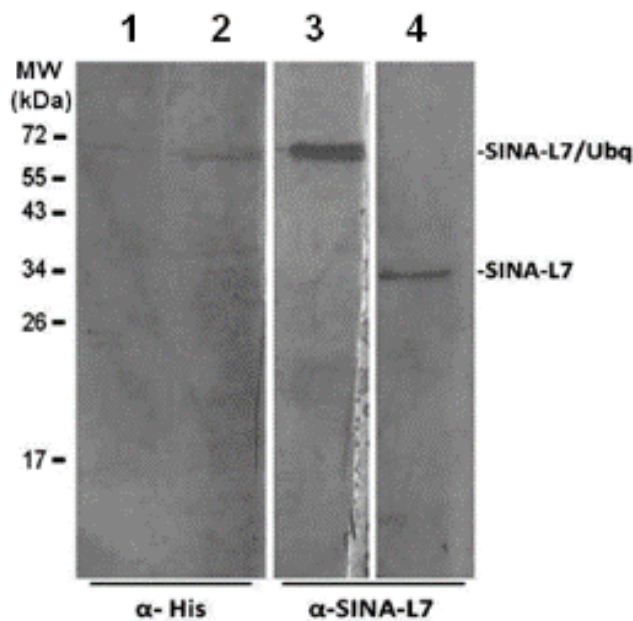


Figura 12. Identificación de SINAL7 auto-ubiquitinada. Los conjugados de SINAL7/cMyc-ubiquitina sometidos electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % (P/V) y detectados por inmuno-transferencia usando anti-His (Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpo policlonal anti-SINAL7. Calle 1, control negativo conteniendo solamente buffer de ubiquitinación. Calle 2 y 3, SINAL7 recombinante purificada incubada en el medio completo de reacción de ubiquitinación conteniendo el sustrato, cMyc-ubiquitina y los componentes E1 y E2. Calle 4, SINAL7 recombinante purificada. MW: marcadores de masa molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, Fermentas).

Como muestra la Figura 12, se obtuvo una banda proteica correspondiente a SINAL7 revelada tanto con anti-His, como con anti-SINAL7 (Figura 12,

calles 2 y 3). Es interesante notar que SINAL7 identificada con el anticuerpo anti-SINAL7 (calle 3 y 4), migra a 34 kDa (calle 4), mientras que la forma auto-ubiquitinada muestra un cambio en la movilidad, migrando a 70 kDa, sugiriendo que más de una molécula de ubiquitina ha sido incorporada por SINAL7.

Posteriormente, con el objetivo de verificar la técnica utilizada y la especificidad de la misma, se llevó a cabo el ensayo con albúmina de suero bovino, una proteína que no posee actividad ubiquitina ligasa E3. Como se observa en la calle 2 de la Figura 13, no hay banda correspondiente a la proteína albúmina ubiquitinada, dando negativa su actividad ligasa E3 o reacción cruzada con el anticuerpo anti-cMyc. Sí se observa banda de ubiquitinación cuando SINAL7 se encuentra presente en la mezcla de reacción. De esta manera concluimos que no obtenemos falsos positivos en el ensayo de actividad ubiquitina ligasa E3.

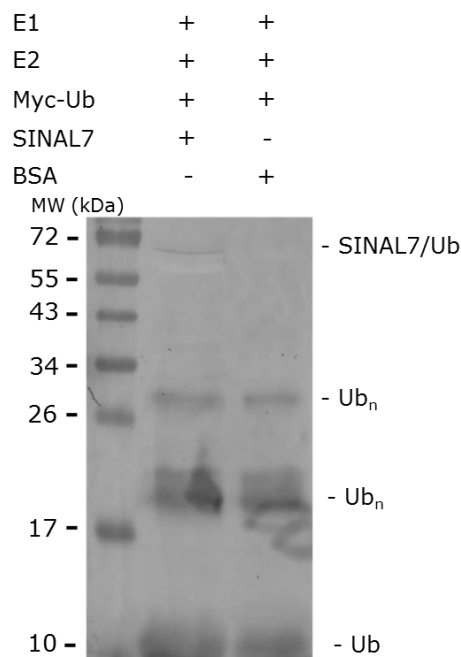


Figura 13. Controles del ensayo de actividad ubiquitina ligasa E3. Las reacciones de auto-ubiquitinación *in vitro* fueron llevadas a cabo incubando SINAL7 recombinante o la proteína comercial albúmina de suero bovino (BSA) en presencia de buffer de ubiquitinación, cMyc-Ubiquitina, E1 de levadura, UbcH2 E2. Los conjugados de SINAL7/ubiquitina fueron resueltos por SDS-PAGE al 15 % (P/V) y detectados por análisis de *Western blot* usando anticuerpo anti-cMyc. Los números de la izquierda indican la masa molecular de los estándares (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, Fermentas).

- Evaluación de los posibles residuos involucrados en la actividad ubiquitina ligasa E3.

Con el objetivo de averiguar cuáles son los residuos involucrados en la actividad ligasa E3 de SINAL7, se llevó a cabo un análisis *in silico* para predecir los aminoácidos directamente involucrados. La secuencia proteica de SINAL7 posee 19 residuos de lisina. El aminoácido lisina está involucrado en la unión de ubiquitina en ligasas de tipo *RING finger*. El análisis bioinformático se llevó a cabo con el programa *UbPred: Predictor of protein ubiquitination sites* [111] (<http://www.ubpred.org/>), obteniendo dos sitios posibles.

En la figura 14 se observa el resultado del análisis de la secuencia proteica de SINAL7, mostrando dos sitios posibles, una lisina en la posición 23 (K23) con mediano valor confianza y una lisina en la posición 124 (K124) con bajo valor de confianza. Los valores de confianza para los demás residuos de lisina de la proteína no son representativos de sitios de unión a ubiquitina.

UbPred: predictor de sitios de ubiquitinación en proteínas

MVGAAILESPGEGIGSNSILSQ**K**RQLSSSDAA**K**RDAA**K**KRSTMLMDLEILDPCICYEAFTIPIF
 QCDNGHLACSSCCPKLNN**K**CPACTSPVGHNRCRAMESVLESILIPCPNA**K**LG**C****K**KNVSY**G****K**
 ELTHE**K**ECMFSHCACPALDCNYTSSY**K**DLYTHYRITHMEINQINTFICDIPLSVRMNIS**K**KILIR
 TEHLTNHLFAVQCFREPYGVYVTVSCIAPSSPELSQYSYALSQSYVTDGHTVIYQSP**E**V**K**RVL**K**LS
 FQTPQENFMLIPNSLLRGDVLEM**R**ISV**K**KL**N**KE.

UbPred - Predicción de sitios de ubiquitinación en SINAL7			
Residuo	Score	Ubiquitinación	
23	0.69	Si	
33	0.28	No	
37	0.59	No	
38	0.57	No	
78	0.42	No	
82	0.46	No	
113	0.42	No	
117	0.21	No	
118	0.22	No	
124	0.66	Si	
130	0.54	No	
151	0.45	No	
184	0.35	No	
185	0.31	No	
247	0.43	No	
251	0.49	No	
281	0.26	No	
282	0.33	No	
285	0.22	No	
Marca	Rango de Score	Sensibilidad	Especificidad
Baja confianza	$0.62 \leq \leq 0.69$	0.464	0.903
Mediana confianza	$0.69 \leq \leq 0.84$	0.346	0.950
Alta confianza	$0.84 \leq \leq 1.00$	0.197	0.989

Figura 14. Predicción de sitios de ubiquitinación mediante UbPred. Secuencia proteica de SINAL7 señalando los residuos de lisina que no estarían involucrados en actividad ligasa E3 (negrita) y dos residuos que estarían involucrados en actividad ligasa E3 de media y baja confianza (gris).

Para corroborar estas predicciones, se construyeron proteínas mutadas por cambio de un aminoácido puntual mediante mutagénesis sitio dirigida de los residuos K23 y K124 individualmente y una tercera proteína modificada en ambos sitios simultáneamente, cambiándolos por el aminoácido alanina (ver Materiales y métodos). Para ello, se diseñaron cebadores específicos sobre el vector de expresión SINAL7-pRSETb (Figura 15).

A

SINAL7

MVGAAILSPGEGIGSNSILSQ**K**RQLSSSDAAKRDAKKRSTMLMDLEILDPCICYEAFTIPIFQ
 CDNGHLACSSCCPKLNKCPACTSPVGHNRCRAMESVLESILIPCPNAKLGCKKNVSYG**K**EL
 THEKECMFSHCACPALDCNYTSSYKDLYTHYRITHMEINQINTFICDIPLSVRMNISKILIRTE
 HLTNHLFAVQCFREPYGVYVTVSCIAPSSPELSQYSYALSQYTVVDGHTVIYQSPVEVKRVLKLSFQ
 TPQENFMLIPNSLLRGDVLLEMRIKLVKLNKE.

B

Cebadores mutagenesis SINAL7

Nombre	Secuencia	Longitud Tm (°C)	
SL7K23Aup	GATCTAACAGCATTCTCTCGCAAGCGAGACAACCTTTCTTCTAGTGAT	47	78.5
SL7K23Adown	CTAGATTGTCGTAAGAGAGCGTTCGCTCTGTTGAAAGAAGATCACTA	47	78.5
SL7K124Aup	TTGCAAAAAGAATGTATCTTATGGGGCAGAGTTAACTCATGAAAAGGAATG	52	78.1
SL7K124Adown	AACGTTTTTCTTACATAGAATACCCCGTCTCAATTGAGTACTTTTCCTTACG	52	78.1

Figura 15. A- Secuencia proteica de SINAL7 señalando los residuos de lisina 23 y 124 que son cambiados mediante mutagenesis sitio dirigida por el aminoácido alanina. **B-** Secuencia de los cebadores utilizados en la mutagénesis sitio dirigida de los residuos de lisina K23 y K124.

Las proteínas mutadas, denominadas SL7K23A, SL7K124A y SL7K23AK124A fueron obtenidas utilizando el kit comercial “*QuickChange II XL site-directed mutagenesis kit*” (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Luego se realizó la transformación de células ultracompetentes XL10 GOLD (que son provistas en el mismo kit). De las colonias positivas obtenidas se realizó una PCR de colonia, para la evaluación de su transformación y posteriormente, se obtuvo el ADN plasmídico de las colonias positivas. Las secuencias de ADN mutadas fueron verificadas mediante secuenciación (Macrogen, USA).

- Expresión y purificación de las proteínas modificadas SL7K23A, SL7K124A y SL7K23AK124A.

A fin de obtener las proteínas recombinantes de SINAL7 modificadas K23A, K124A y la doble mutante K23AK124A, se llevó a cabo la transformación de células competentes BL21 *pLys* de *E. coli* con los vectores pRSETb-SL7K23A, pRSETb-SL7K124A y pRSETb-SL7K23AK124A.

Se obtuvieron colonias positivas de todas las transformaciones y posteriormente se llevó a cabo la expresión de las mismas. Se inocularon

cultivos de 500 ml con las cepas de expresión, se realizó la inducción por el agregado de IPTG y luego de 5h de inducción se colectó las células por centrifugación. Posteriormente se prosiguió con el sonicado de las mismas para obtener luego el sobrenadante de donde se procedió a la purificación de las proteínas recombinantes modificadas y a la identificación de las mismas por inmuno-detección con el anticuerpo dirigido contra el *Tag* de hexa-histidinas como se describe en Materiales y métodos (el procedimiento de expresión y purificación fue el mismo que la SINAL7 recombinante).

Con las proteínas recombinantes SINAL7, SL7K23A, SL7K124A y SL7K23AK124A purificadas, se realizaron los ensayos de actividad ubiquitina ligasa E3 posteriores.

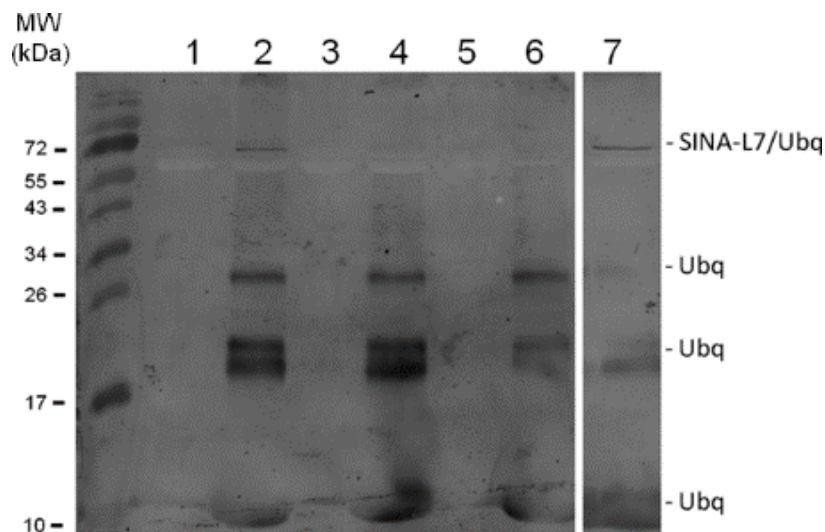


Figura 16. Actividad E3 ligasa de proteínas modificadas de SINAL7. Las reacciones de auto-ubiquitinación *in vitro* fueron llevadas a cabo incubando las proteínas recombinantes SL7K23A (calle 2), SL7K124A (calle 4), SL7K23AK124A (calle 6) y SINAL7 (calle 7) en presencia de buffer de ubiquitinación, cMyc-Ubiquitina, E1 de levadura, Ubch2 E2 (como se describe en Materiales y métodos). Los conjugados de SINAL7/ubiquitina y mutantes de SINAL7/ubiquitina fueron resueltos por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % (P/V) y detectados mediante análisis por *western blot* usando anticuerpo anti-cMyc. Los números de la izquierda indican la masa molecular de los estándares (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas).

En la Figura 16, se observa la pérdida total de la actividad de la proteína SL7K124A (calle 4), al igual que en la proteína doblemente mutada (calle 6). No se observa pérdida de actividad ubiquitina ligasa E3 en la proteína SL7K23A (calle 2). Como control positivo, en la calle 7 se muestra la

proteína SINAL7 recombinante que posee actividad ubiquitina ligasa E3 demostrada previamente. No se observan bandas correspondientes a las proteínas ensayadas en las calles 1, 3 y 5 como control negativo de reacción cruzada con el anticuerpo anti-cMyc de las mismas.

- Evaluación de la estructura secundaria de las proteínas SINAL7, SL7K23A, SL7K124A y SL7K23AK124A

Con el propósito de evaluar si la pérdida de la capacidad de auto-ubiquitinación de las mutantes SL7K124A y SL7K23AK124A es debida a un nuevo arreglo conformacional de la proteína por el cambio del aminoácido con respecto a SINAL7, se determinaron sus estructuras secundarias mediante el estudio de los espectros de dicroísmo circular (Figura 17).

Observando la superposición de las curvas correspondiente a las distintas proteínas y analizando el porcentaje de estructura secundaria (tabla 7) para cada una de ellas calculado mediante el algoritmo K2D2 (<http://www.ogic.ca/projects/k2d2/>), podemos decir que no hay modificación en la estructura de las mutantes en comparación con la proteína SINAL7. Por otro lado, la mutante SL7K23A presenta una leve modificación en los porcentajes de estructura alfa y beta que no conllevan pérdida de la capacidad de auto-ubiquitinarse *in vitro* como la proteína SINAL7, tal como se presenta en la tabla 7.

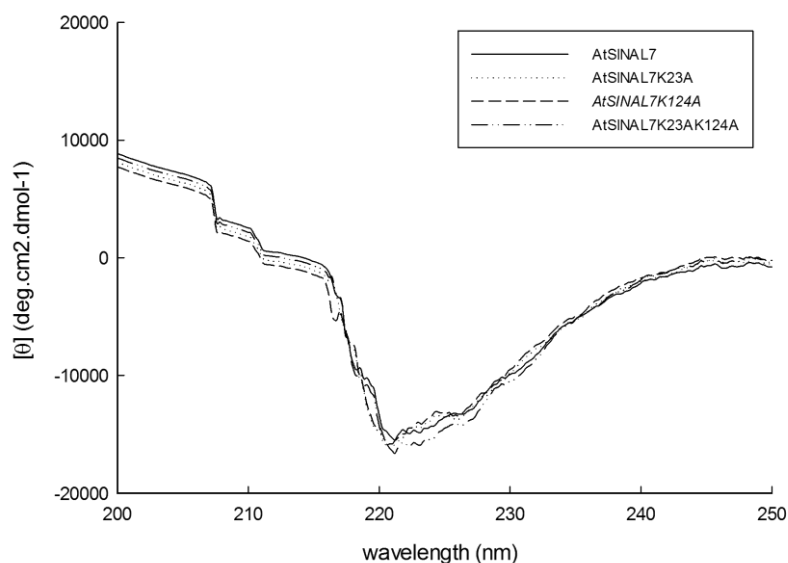


Figura 17. Espectro de dicroísmo circular de SINAL7 y mutantes de SINAL7. Los espectros fueron obtenidos usando un espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco International Co.) sobre el rango de longitud de onda de 190 a 250 nm, a 25 °C. Las medidas fueron realizadas en una cubeta de cuarzo de 0.2 cm a una tasa de 100 nm.min⁻¹, ancho de banda de 1 nm, tiempo de respuesta de 2 s, toma de datos cada 1 nm y acumulación de 10. Los datos de Dicroísmo circular son mostrados como el valor de elipticidad de residuo (deg.cm².dmol⁻¹) obtenido después de sustraer la línea de base, suavizar y normalización de los datos. Los espectros para SINAL7 (línea sólida), SINAL7K23A (línea punteada), SINAL7K124A (línea de rayas) y SINAL7K23AK124A (línea de puntos y rayas) fueron realizados en un buffer 20 mM de Fosfato de Sodio a pH 7.4.

Proteína	Hélice alfa (%)	Lámina β (%)	Al azar
AtSINAL7	26.76	30.03	43.21
AtSINAL7K23A	34.24	13.18	52.58
AtSINAL7K124A	26.76	30.03	43.21
AtSINAL7K23AK124A	26.76	30.03	43.21

Tabla 7. Porcentajes de estructura secundaria calculados mediante el algoritmo K2D2.

Teniendo en cuenta el análisis de la estructura secundaria en las proteínas modificadas, podemos decir que el residuo K124 de SINAL7 resulta ser indispensable para la actividad ubiquitina ligasa E3 y que dicha proteína pierde totalmente su actividad cuando este residuo aminoacídico es reemplazado. El residuo K23 parecería no estar involucrado en tal actividad.

En el presente capítulo se llevó a cabo la caracterización bioquímica de SINAL7, una proteína del tipo *RING-finger* homóloga a *seven in absentia* (*sina*) de *Drosophila*. La superfamilia de *sina* posee importantes funciones en el control del desarrollo y la degradación de proteínas mediada por el proteosoma. Estas proteínas son parte esencial de la maquinaria de modificación de proteínas y están presentes en todos los organismos eucariotas [46, 51]. Esta particular modificación de proteínas participa en muchos procesos celulares distintos, afectando la expresión génica a través de vías de degradación de proteínas o modificación de la función de las mismas [54]. La importancia del papel que cumplen resulta tanto de la actividad ubiquitina ligasa E3, como de su capacidad de reconocer específicamente la proteína blanco. Es por esto que el conocimiento de las ubiquitina ligasas E3 de tipo RING es crucial para entender los mecanismos fisiológicos involucrados en el desarrollo y la adaptación de las plantas.

En este contexto, durante la caracterización bioquímica de SINAL7, se demostró que la proteína recombinante es capaz de participar como enzima ubiquitina ligasa E3 en un ensayo de ubiquitinación (Figura 11). Además, se demostró que el residuo de lisina en la posición 124, localizado en el dominio *sina*, es requerido para la función de ubiquitina ligasa E3. Sin embargo, esta función fue analizada en un ensayo de auto-modificación y resta dilucidar si el mismo actúa como aceptor de ubiquitina y si juega un rol en la catálisis.

La auto-ubiquitinación de las ubiquitina ligasas E3 ha sido asociada con la regulación de la actividad de las mismas, el reclutamiento de sustratos y con la participación en funciones no catalíticas [53, 112]. Considerando también que SINAL7 contiene un dominio de tipo TRAF (factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), la auto-ubiquitinación podría ser un mecanismo para reclutar sustratos con propiedades ubiquitina-ubiquitina, como se ha demostrado para TRAF6, una ligasa E3 de tipo RING que posee un rol crucial en la activación inicial de cascadas de señalización [113-115]. Entonces es posible postular que SINAL7 sufre auto-ubiquitinación como blanco de degradación por el proteosoma, pero también cumple diferentes funciones en las células vegetales. Estudios *in*

vivo son necesarios para validar estas hipótesis y son abordados en los capítulos II y III.

CAPÍTULO II

Efecto de SINAL7 sobre GAPC1

SINAL7 ubiquitina a GAPC1 *in vitro* y es necesaria para su localización nuclear en *Arabidopsis thaliana*

Las enzimas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas (GAPDH) están altamente conservadas en todos los organismos vivos, donde cumplen un papel esencial en el metabolismo del carbono en la célula. *Arabidopsis thaliana* posee cuatro isoformas diferentes de GAPDH (www.arabidopsis.org): una isoforma citosólica, fosforilante y NAD⁺ dependiente, GAPC1 (At3g04120) que cataliza la conversión de gliceraldehído-3-fosfato (Ga3P) en 1,3-bifosfoglicerato; la isoforma GAPC2 (At1g13440) involucrada en unión a ion cobre; y las isoformas plastídicas GAPCP1 (At1g79530) y GAPCP2 (At1g16300). En particular, GAPC1, cuyo rol en la glicólisis es bien conocido [63], sufre diversas modificaciones post-traduccionales como por ejemplo nitrosilación y glutationización reversibles entre otras [64], confiriéndole propiedades multifuncionales (*moonlight*) a la misma [66] que la acondiciona y/o prepara para ser translocada al núcleo y acumularse en el mismo para cumplir funciones de activación de factores de transcripción en vías de señalización como la mencionada previamente [116, 117]. Además, las mismas participan en otros procesos importantes de la célula, como su asociación con el citoesqueleto y la mitocondria, y en este último caso, involucrando a GAPC1 en la regulación de las funciones mitocondriales [35]. De acuerdo con esta hipótesis, las plantas mutantes *gapc1*, que carecen de la isoforma GAPC1, presentan una disfunción mitocondrial y fenotipo de macho-esterilidad [37].

En análisis llevados a cabo en el laboratorio, se detectó que los niveles de ARNm de *seven in absentia like 7* (SINAL7) estaban regulados negativamente (disminuídos) en plantas que presentaban disfunción mitocondrial [38]. Además, se ha reportado que la interacción de la ubiquitina ligasa E3 Siah-1 con la forma S-nitrosilada de GAPDH permite su translocación nuclear iniciando una cascada de señalización de muerte celular por apoptosis [61]. Basados en estas observaciones, proponemos la hipótesis de que la ubiquitina ligasa E3 SINAL7, caracterizada bioquímicamente en el capítulo I [118], podría cumplir algún rol en alguna

vía de señalización involucrando a GAPC1 y en particular en vías de señalización retrógrada mitocondrial en *Arabidopsis*.

Con el fin de investigar sobre esta vía de señalización en plantas, decidimos verificar si SINAL7 interactúa con la enzima glucolítica GAPC1 y estudiar las consecuencias bioquímicas de este evento.

- SINAL7 interactúa físicamente con GAPC1

Se ha reportado que Siah1 (homólogo murino de SINAL7) se une específicamente a GAPDH (homólogo de GAPC) y se desencadena una vía de señalización de muerte celular programada [61]. Con el fin de investigar una posible interacción entre SINAL7 y GAPC1, y disponiendo de SINAL7 expresada y purificada, se procedió a la obtención de GAPC1 a través de su clonado, expresión y purificación.

Para la expresión de la proteína GAPC1, se realizó el clonado de la secuencia de ADNc codificante de la proteína en pGEM-T, se realizó el subclonado clásico en el vector de expresión pETGB1a (ver Materiales y métodos) y se transformaron células competentes de *E. coli* BL21-RIL con la construcción pETGB1a-GAPC1. Se seleccionaron dos colonias positivas (pETGB1a-GAPC1 #1 y pETGB1a-GAPC1 #2) con resistencia al antibiótico kanamicina, conferida por el vector. Las células transformadas fueron crecidas a 37 °C y 160 rpm en medio LB suplementado con kanamicina (30 ug/ml), hasta una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0.4 – 0.6. La expresión de GAPC1 recombinante fue inducida con IPTG como se describe en Materiales y métodos.

En la Figura 18, se observa un gel de poliacrilamida con muestras de la inducción de GAPC1 recombinante, tomadas a distintos tiempos de ambos clones pETGB1a-GAPC1 #1 y pETGB1a-GAPC1 #2. En dicho gel se detectó la expresión de una banda del tamaño esperado para GAPC1 junto a un *tag* de hexa-histidinas (con la posibilidad de ser removida con la proteasa TEV) que permite su purificación mediante cromatografía de afinidad.

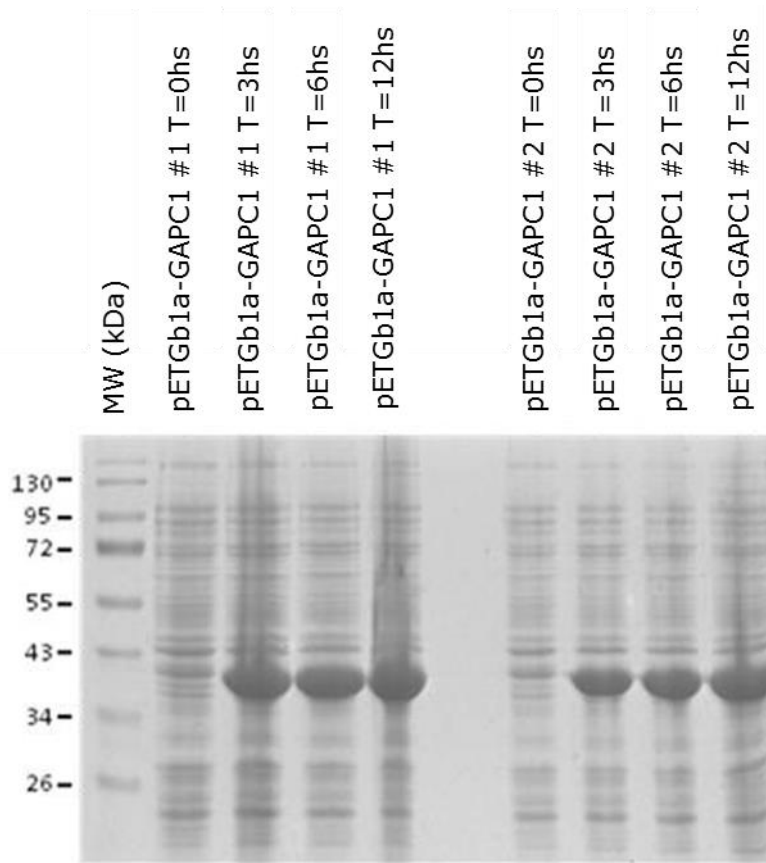


Figura 18. Gel de poliacrilamida al 12 % (P/V) del análisis de expresión de la proteína recombinante GAPC1 a diferentes tiempos de inducción en células de *E. coli* BL21RIL transformadas con el vector pETGB1a-GAPC1.

Se seleccionó el clon 1 que expresa la proteína con el tamaño esperado para GAPC1 (más el *tag* de histidinas) recombinante para seguir trabajando. Posteriormente se realizó la identificación de dicha proteína mediante inmunodetección por *Western blot*, enfrentando la membrana al anticuerpo policlonal obtenido en conejo, dirigido contra la proteína GAPC de trigo (disponible en el laboratorio).

Se sembraron por duplicado muestras de la inducción de SINAL7 y GAPC1 en los geles de poliacrilamida al 12 % (P/V), los cuales fueron resueltos por electroforesis. Uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie (Figura 19 A) y el otro fue sometido a electro-transferencia sobre una membrana de nitrocelulosa (Figura 19 B) y luego resuelto con anticuerpo dirigido contra el *tag* de hexa-histidinas (Santa Cruz *Biotechnology*) en ambas proteínas recombinantes. Luego, el complejo antígeno - anticuerpo fue visualizado

por la reacción de la fosfatasa alcalina unida a anticuerpo anti-IgG de conejo con los sustratos BCIP y NBT (Promega).

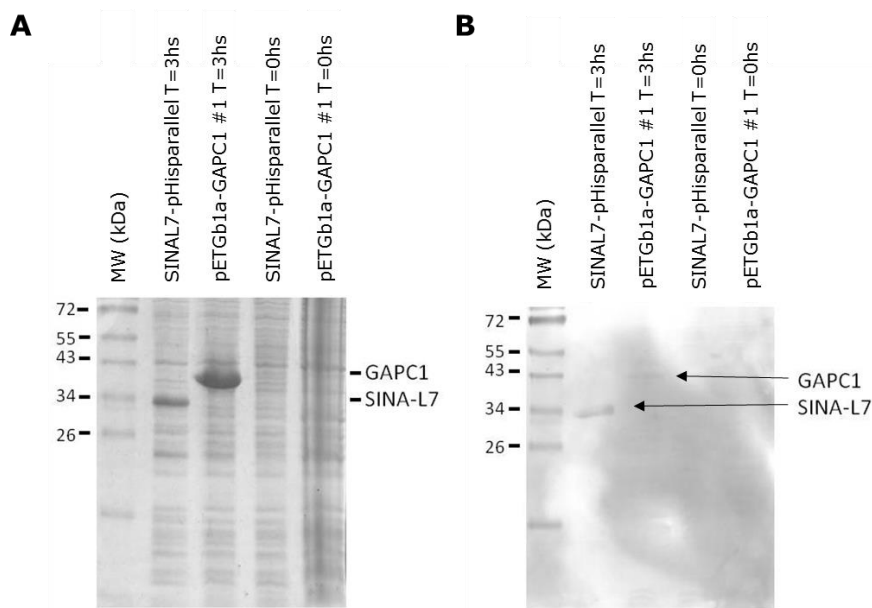


Figura 19. Identificación de SINAL7 y GAPC1 recombinante por Western blot. **A** - Gel de poliacrilamida al 12 % (P/V) teñido con azul de Coomassie correspondiente a la expresión de las proteínas recombinantes SINAL7 y GAPC1 a cero y tres horas post-inducción en células de *E. coli BL21pLys* y *E. coli BL21RL*, respectivamente. **B** - Membrana de nitrocelulosa de *Western blot* de un gel similar al de la Figura A incubado con anticuerpo específico del *tag* de hexa-histidinas.

En la Figura 19 B se muestra la presencia de GAPC1 recombinante (de manera tenue, ver calle inducción a 3 h) revelada, utilizando el anticuerpo dirigido contra el *tag* de hexa-histidinas. No se observa ninguna banda correspondiente a GAPC1 en la calle de tiempo 0 h de inducción. Además se identificó con el mismo anticuerpo a SINAL7 sirviendo como control positivo de la técnica.

Posteriormente, habiendo identificado que la banda proteica inducida de alrededor de 37 a 40 kDa correspondía a GAPC1, se realizó la purificación de la misma de forma similar a lo descrito para la proteína SINAL7 (ver capítulo I), utilizando columnas de afinidad a Ni⁺⁺ (ver Materiales y métodos).

En la Figura 20, se muestra un análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones obtenidas luego de la purificación de esta

proteína. Las fracciones 16 a 19 son las que presentan la mayor cantidad de proteína purificada. Estas fracciones fueron recolectadas y concentradas.

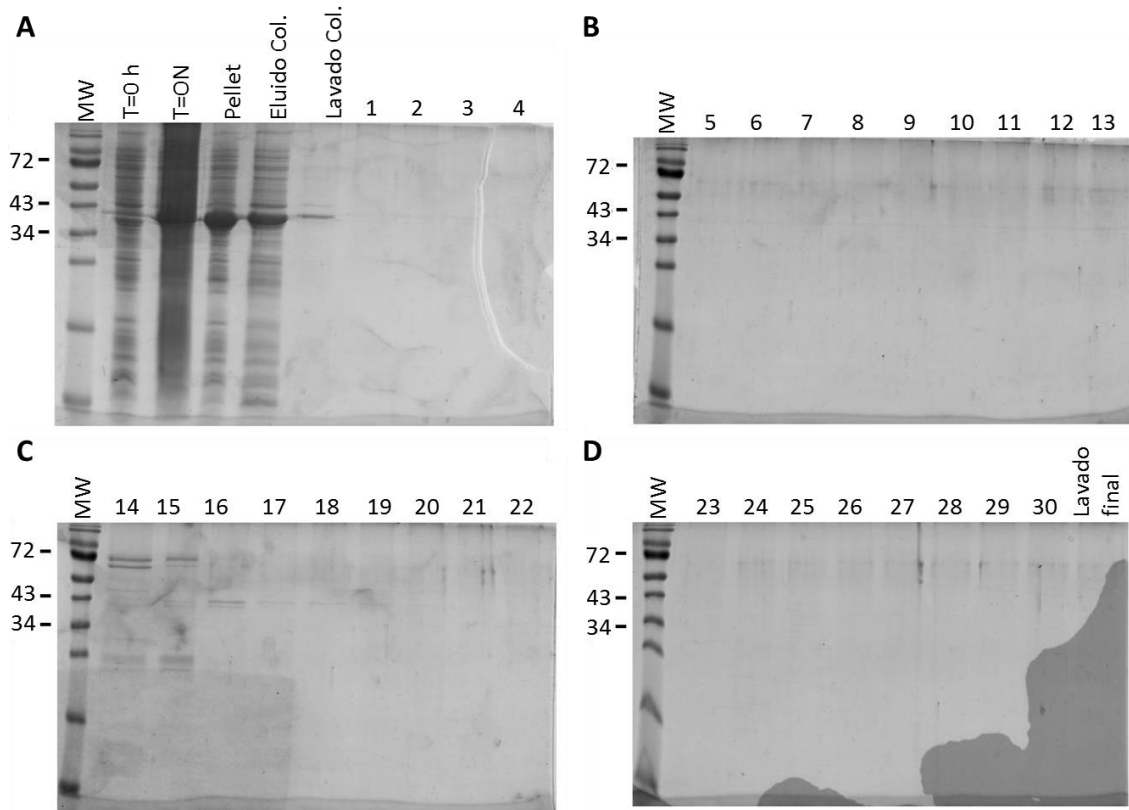


Figura 20. Análisis de la purificación de GAPC1 mediante geles de poliacrilamida al 12 % (P/V) teñido con azul de Coomassie. A- MW, bandas correspondientes a los estándares del marcador de masa molecular Fermentas *Protein Ladder*, T=0 h y T=ON: muestras a 0 y 3 h de inducción de GAPC1. Pellet: precipitado obtenido luego de la sonicación. Eluido col: sobrenadante obtenido luego del sonificado y de pasar por la columna de afinidad. Lavado col: lavado de la columna con buffer de baja astringencia. Los paneles B, C y D muestran las diferentes fracciones colectadas.

Con ambas proteínas (SINAL7 y GAPC1) expresadas y purificadas se procedió a investigar una posible interacción entre las mismas mediante la técnica de *Far western blot* (Figura 21).

Para llevar a cabo este ensayo SINAL7 fue sembrada en gel de poliacrilamida al 12 % (P/V), sometida a electroforesis en condiciones desnaturalizantes y transferida a una membrana de PVDF como se describe en Materiales y métodos. Luego se incubó la membrana con GAPC1 recombinante y se lavó al menos 3 veces. Posteriormente, las membranas conteniendo SINAL7 fueron incubadas con anticuerpo dirigido contra GAPC.

Como se observa en la calle 1 de la Figura 21, se observó una banda positiva de alrededor de 35 kDa, que es el tamaño esperado para SINAL7 recombinante (ver calle 2). No se observó señal correspondiente a GAPC1 en la membrana donde se transfirió SINAL7 pero que no fue incubada con GAPC1 (Figura 21 calle 3), confirmando que no hay reacción cruzada entre el anticuerpo que revela GAPC1 con SINAL7.

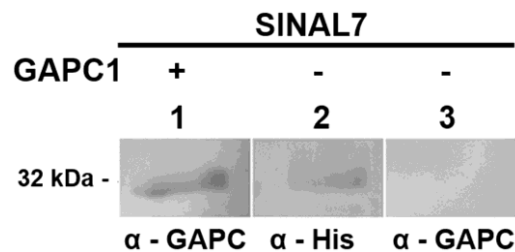


Figura 21. Interacción entre SINAL7 y GAPC1 por far western blot. SINAL7 recombinante fue sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida, transferida a membrana de *Western blot* (PVDF) e incubada con GAPC1 y revelada con anticuerpo anti-GAPC (calle 1). En paralelo, dos membranas conteniendo SINAL7 (en ausencia de incubación con GAPC1) fueron usadas como control y resueltas con los anticuerpos anti-His (calle 2) y anti-GAPC (calle 3), respectivamente.

En resumen, utilizando la técnica de *Far western blot* se detectó una banda proteica de alrededor de 35 kDa que indica la presencia de GAPC1 en la calle 1 de la Figura 21. Así, podemos sugerir que SINAL7 interactúa físicamente con GAPC1.

- El residuo K231 en GAPC1 está involucrado en la interacción con SINAL7

Habiendo demostrado mediante la técnica de *Far western blot* la interacción *in vitro* entre SINAL7 y GAPC1, nos propusimos estudiar cuáles residuos son los responsables de dicha interacción, considerando que el residuo de lisina 225 de la GAPC de *Rattus norvegicus* que está involucrada en la unión a Siah1 (homólogo murino a SINAL7 de *A. thaliana*) [61], se encuentra conservado en la GAPC1 de *A. thaliana* en la posición 231.

Con el fin de investigar si dicho residuo (K231) de GAPC1 está involucrado en la interacción con SINAL7, se realizó un ensayo de *Pull down* de SINAL7

con GAPC1 y GAPC1K231A (Figura 22). La proteína recombinante GAPC1K231A es una proteína modificada mediante el cambio del aminoácido lisina en la posición 231 por el aminoácido alanina utilizando la técnica de mutagénesis sitio dirigida (ver Materiales y métodos). La proteína GAPC1K231A fue expresada y purificada de la misma forma que GAPC1.

El ensayo consistió en la incubación de SINAL7 (carente del *tag* de hexa-histidinas, por proteólisis con la proteasa TEV) con GAPC1 o GAPC1K231A. Luego de los lavados correspondientes, se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) de los productos (ver Materiales y métodos y Figura 22)

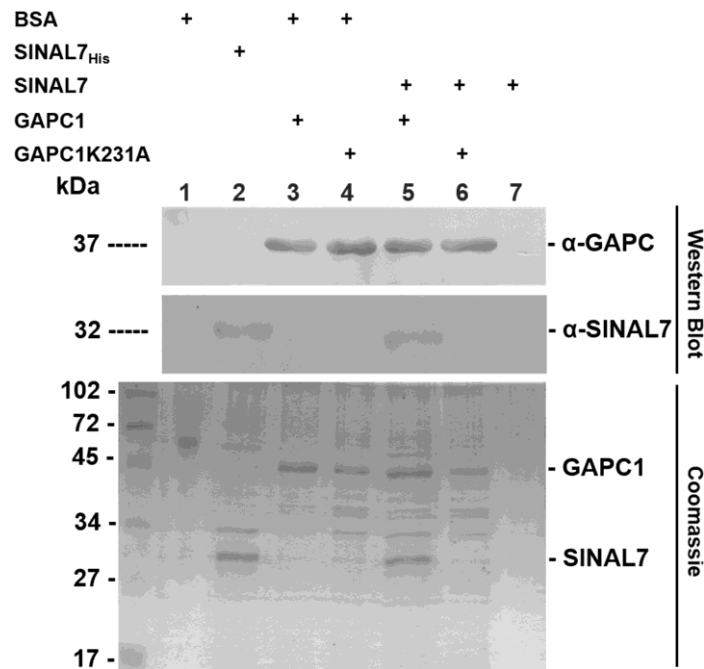


Figura 22. Análisis de la interacción de SINAL7 con GAPC1 o GAPC1K231A por Pull down. La interacción física entre las proteínas SINAL7 (sin *tag* de hexa-histidinas), GAPC1 y GAPC1K231A fue determinada mediante análisis de *pull down*, por electroforesis en gel de poliacrilamida seguido de *Western blot*. La inmunodetección de las proteínas fue realizada usando anticuerpos, anti-GAPC y anti-SINAL7. Las proteínas eluidas de la resina en el análisis de *pull down* fueron analizadas por tinción con azul de Coomassie (panel inferior). Calle 1, albúmina de suero bovino (BSA) (control negativo de interacción); calle 2, SINAL7 con *tag* de hexa-histidinas (como control positivo de la identificación de SINAL7); calle3, BSA y GAPC1 (unida a la resina); calle 4, BSA y GAPC1K231A (unida a la resina); calle 5, SINAL7 (sin *tag* de hexa-histidinas) y GAPC1 (unida a la resina); calle 6, SINAL7 (sin *tag* de hexa-histidinas) y GAPC1K231A (unida a la resina); calle 7, muestra la falta de interacción de SINAL7 (sin *tag* de hexa-histidinas) con la resina como control negativo.

Como se muestra en la calle 5 de la Figura 22, SINAL7 fue recuperada en el complejo eluido con el buffer de alta astringencia (imidazol 500 mM). Sin embargo, la proteína modificada GAPC1K231A no fue capaz de retener a SINAL7 (calle 6), indicando que el residuo K231 estaría involucrado en la interacción entre GAPC1 y SINAL7. Este resultado además refuerza el obtenido por *Far western blot* de la interacción entre SINAL7 y GAPC1.

- Efecto de SINAL7 sobre los parámetros cinéticos de GAPC1

Con el fin de estudiar el efecto de la unión entre SINAL7 y GAPC1, se determinaron los parámetros cinéticos, K_m y V_{max} de GAPC1. La actividad enzimática fue medida siguiendo la reducción de NAD^+ a 340 nm como fue descrita por Rius y colaboradores [37] (ver Materiales y métodos). La actividad de GAPC1 fue determinada usando diferentes concentraciones de Ga3P (Figura 23 A) y NAD^+ (Figura 23 B) en ausencia o presencia de SINAL7 recombinante en una relación molar de 1:3 (GAPC1:SINAL7). Los parámetros cinéticos de GAPC1 sufrieron modificaciones por el agregado de concentraciones crecientes de SINAL7 recombinante (Figura 23).

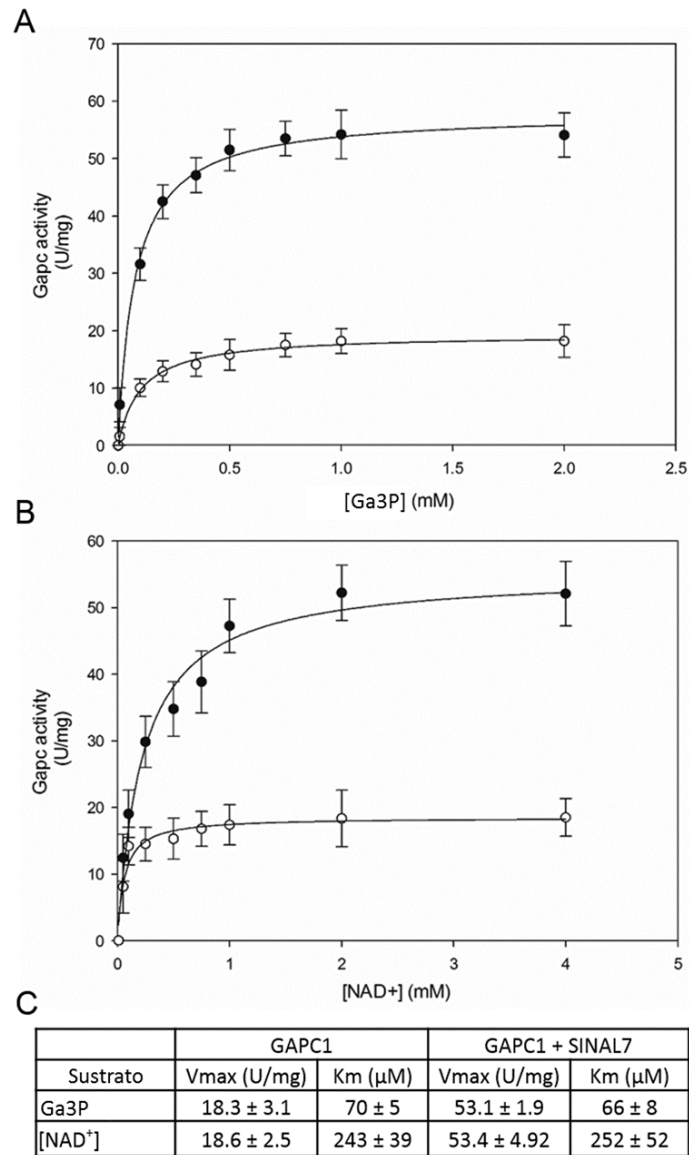


Figura 23. Caracterización de los parámetros cinéticos de GAPC1 recombinante. K_m y V_{max} fueron determinados para GAPC1 recombinante en ausencia o presencia de SINAL7 recombinante usando diferentes concentraciones de Ga3P (A) y NAD^+ (B) como se describe en Materiales y métodos. Los puntos blancos representan GAPC1 y los puntos negros representan GAPC1 y SINAL7 en una proporción molar de 1:3, respectivamente en los gráficos de actividad A y B. La función de ajuste fue realizada en el programa *SigmaPlot*, ajustando a una hipérbola simple rectangular, de dos parámetros ($f = a*x/(b+x)$) para las curvas de concentraciones variables de Ga3P and NAD^+ . Los valores de los parámetros cinéticos determinados (K_m y V_{max}) se muestran en la tabla (C). Cada valor representa el promedio de tres experimentos separados y cada experimento consiste en tres réplicas técnicas. Los datos de este experimento fueron analizados estadísticamente como se describe en Materiales y métodos.

Mientras que no se observó efecto alguno en los valores de K_m para ambos sustratos, Ga3P y NAD^+ , se detectó un incremento de alrededor de 3 veces en la V_{max} para Ga3P (Figura 23 A) y más de dos veces la V_{max} de NAD^+

(Figura 23 B). Los datos de un promedio de tres experimentos independientes se muestran en el panel C de la Figura 23.

- GAPC1 es mono-ubiquitinada por SINAL7

En el capítulo anterior de esta tesis, se demostró que SINAL7 posee actividad ubiquitina ligasa E3 [118]. Por otra parte, GAPC1 interactúa con SINAL7 (Figuras 21 y 22), mediante el residuo K231 de GAPC1. Por esto, se decidió investigar si GAPC es un blanco aceptor de ubiquitina por parte de SINAL7.

Con este propósito, se realizó el ensayo de ubiquitinación de GAPC1 y GAPC1K231A usando SINAL7 como E3 ligasa. Como se muestra en la Figura 24 A y B, se observaron nuevas bandas de alta masa molecular (marcadas con asterisco). Estas bandas proteicas corresponden a productos de la reacción de ubiquitinación de GAPC1 (calle 6) y GAPC1K231A (calle 8) en presencia de SINAL7 como E3 ligasa. Estas bandas no fueron observadas en la mezclas de reacciones donde SINAL7 estaba ausente. Se detectaron además bandas correspondientes a posibles productos de autoubiquitinación de SINAL7 (calle 4). Las bandas de alta masa molecular, específicas de GAPC1 y GAPC1K231A, resultantes de las reacciones de ubiquitinación, fueron sometidas a análisis e identificación por espectrometría de masas. Los resultados indicaron que dichas bandas correspondían a GAPC1 y GAPC1K231A mono-ubiquitinadas (calles 6 y 8 respectivamente).

- El residuo K76 de GAPC1 está involucrado en la ubiquitinación

Como se describió más arriba, GAPC1 es ubiquitinada *in vitro* por SINAL7. Con el fin de conocer los potenciales residuos involucrados en la ubiquitinación de GAPC1, se realizó un análisis *in silico* de los potenciales sitios aceptores de ubiquitina mediante el programa UbPred "*Predictor of ubiquitination sites*" [111]. Cinco de 31 residuos de lisina, K76, K109, K111, K145 y K302 fueron encontrados como potenciales aceptores de ubiquitina en el análisis bio-informático (<http://www.ubpred.org/>) (tabla 8). Esta

predicción fue comprobada por el análisis de espectrometría de masas que mostró que el péptido de ubiquitina se encontraba unido al residuo K76, tanto en GAPC1, como en GAPC1K231A (ver Materiales y métodos).

UbPred - Predicción de sitios de ubiquitinación en GAPC1				
Residuo	Score	Ubiquitinación		
4	0.09	No		
5	0.11	No		
50	0.51	No		
59	0.51	No		
64	0.4	No		
66	0.46	No		
69	0.42	No		
76	0.62	Yes		
109	0.69	Yes		
111	0.69	Yes		
117	0.19	No		
121	0.17	No		
122	0.21	No		
130	0.54	No		
145	0.65	Yes		
166	0.43	No		
190	0.47	No		
198	0.48	No		
219	0.51	No		
223	0.33	No		
231	0.32	No		
255	0.43	No		
263	0.39	No		
264	0.36	No		
267	0.43	No		
273	0.59	No		
275	0.58	No		
302	0.67	Yes		
310	0.44	No		
313	0.3	No		
337	0.47	No		
Marca	Rango de Score	Sensibilidad		Especificidad
Baja confianza	$0.62 \leq \leq 0.69$		0.464	0.903
Mediana confianza	$0.69 \leq \leq 0.84$		0.346	0.950
Alta confianza	$0.84 \leq \leq 1.00$		0.197	0.989

Tabla 8. Predicción de sitios de ubiquitinación en la secuencia proteica de GAPC1 mediante UbPred (<http://www.ubpred.org/>).

Para confirmar experimentalmente el resultado de la predicción y estudiar si algún otro residuo de lisina diferente del K76 era capaz de ser ubiquitinado por SIN7, se realizó la mutante GAPC1K76A, (donde el residuo de lisina en la posición 76 de GAPC1 fue reemplazado por alanina mediante mutagénesis sitio dirigida como se describe en Materiales y métodos), y se

realizó el ensayo de ubiquitinación usando SINAL7 como ubiquitina ligasa E3.

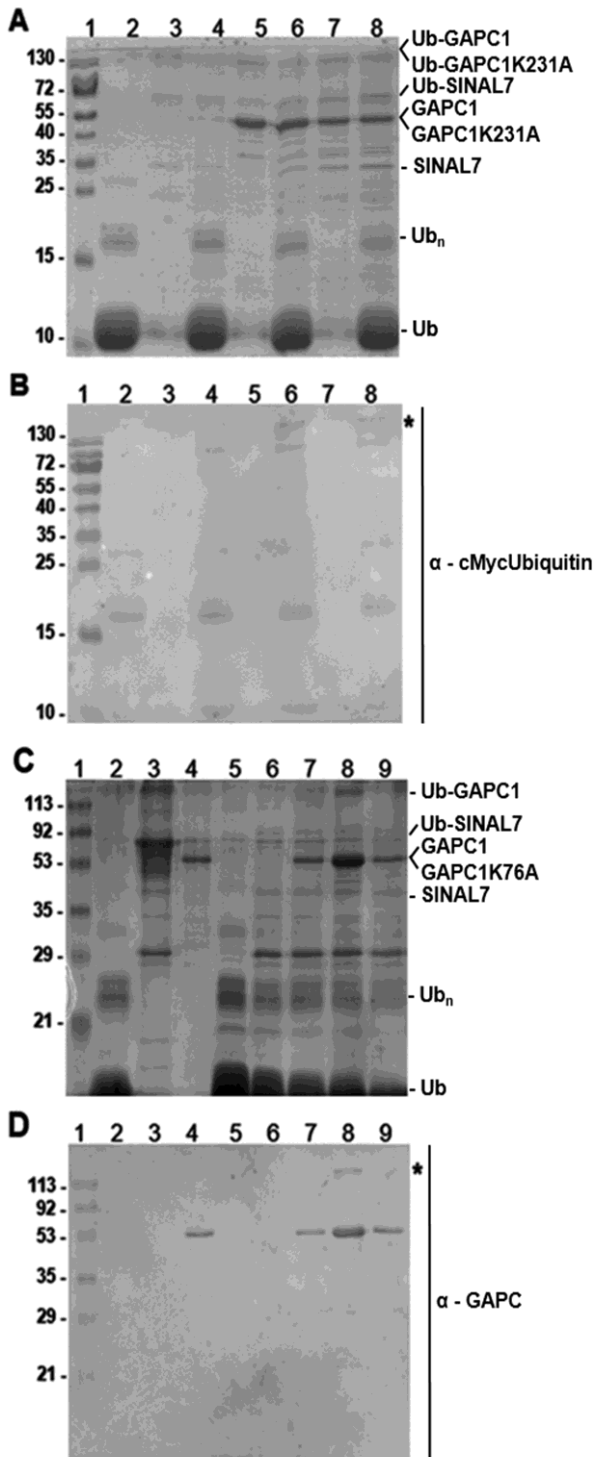


Figura 24. Actividad ubiquitina ligasa E3 SINAL7 en presencia de GACP1 y mutantes de GACP1. Ensayo de actividad ubiquitina ligasa E3 SINAL7 en presencia de GACP1 y GACP1K231A. A - Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. B - Inmunodetección de proteínas ubiquitinadas por *Western blot*. Las reacciones de ubiquitinación in vitro fueron realizadas incubando SINAL7 (como E3 ligasa) en presencia de GACP1 (calle 6), GACP1K231A (calle 8) como se describe en Materiales y métodos. El control de auto-ubiquitinación de SINAL7 se encuentra en la calle 4. Los conjugados de ubiquitina con la proteína blanco (señalados con un asterisco, *) fueron resueltos en geles de poliacrilamida al 12 % (P/V) e inmunodetectados usando el anticuerpo anti-cMyc. Calle 2, buffer + ubiquitina; calle 3, buffer + SINAL7 como control de reacción cruzada del anticuerpo; calle 5 buffer + GACP1; calle 7 buffer + GACP1K231A. Los números y las bandas en la izquierda corresponden a las masas moleculares de los estándares en kDa (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas) en la calle 1. **Ensayo de actividad ubiquitina ligasa E3 SINAL7 en presencia de GACP1 y GACP1K76A.** A - Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. B - Inmunodetección de proteínas ubiquitinadas por *Western blot*. Las reacciones de ubiquitinación in vitro fueron realizadas incubando SINAL7 (como E3 ligasa) en presencia de GACP1 (calle 8), GACP1K231A (calle 9) como se describe en Materiales y métodos. Los conjugados de GACP/ubiquitina (señalados con un asterisco, *) fueron resueltos en geles de poliacrilamida al 12 % (P/V) e inmunodetectados usando el anticuerpo anti-GACP. Calle 2, buffer + ubiquitina. Calle 3, buffer + SINAL7 como control de reacción cruzada del anticuerpo. Calle 4, buffer + GACP1K76A. Calle 5 buffer + cMyc-ubiquitina + E1 + E2. Calle 6, SINAL7 + buffer, cMyc-ubiquitina, E1 + E2. Calle 7, GACP1K76A + buffer + E1 + E2. Los números y las bandas en la izquierda corresponden a las masas moleculares de los estándares en kDa (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas) en la calle 1.

El ensayo realizado sobre las proteínas GACP1 y GACP1K76A mostró la ausencia de productos modificados (Figura 24 C y D, calle 9) cuando

GAPC1K76A fue usado como sustrato de ubiquitinación *in vitro*, en contraste a lo que ocurrió con GAPC1 (Figura 24 C y D, calle 8), donde sí se observó la banda proteica correspondiente al producto ubiquitinado. Este resultado, claramente concluyente demuestra que el residuo K76 en GAPC1 está involucrado en la ubiquitinación por parte de SINAL7 y sugiere la ausencia de otro sitio de ubiquitinación de la proteína.

- La ubiquitinación de GAPC1 disminuye su actividad catalítica

Con el fin de investigar si la modificación por ubiquitinación de GAPC1 afecta su actividad catalítica, se realizó el ensayo *in vitro* de ubiquitinación usando a SINAL7 como E3 ligasa, en presencia de GAPC1, GAPC1K231A o GAPCK76A, seguido del análisis de la actividad enzimática de GAPC1 (Figura 25).

Luego de 2 h de incubación de la mezcla completa de reacción de ubiquitinación, GAPC1 no presentó actividad detectable (calle 4), comparado con la muestra donde SINAL7 estaba ausente (calle 3). Un resultado similar se observó para la mutante GAPC1K231A (calle 8 comparada con calle 7). Cabe destacar que la mutante GAPC1K76A, que no se ubiquitina, no presenta inhibición de la actividad catalítica (calle 12). Este resultado indica que la pérdida de la actividad catalítica de GAPC1 fue debida a la ubiquitinación de la enzima. Por otra parte, no se observaron diferencias en la actividad enzimática en cualquiera de las mutantes usadas sin ubiquitinar (líneas 1, 5 y 9). Debemos mencionar que GAPC1 y las proteínas modificadas, retienen aproximadamente un 40% de la actividad luego de la incubación de 2 h a 30°C (Figura 25, calles 1, 5 y 9 vs. 2, 6 y 10, respectivamente).

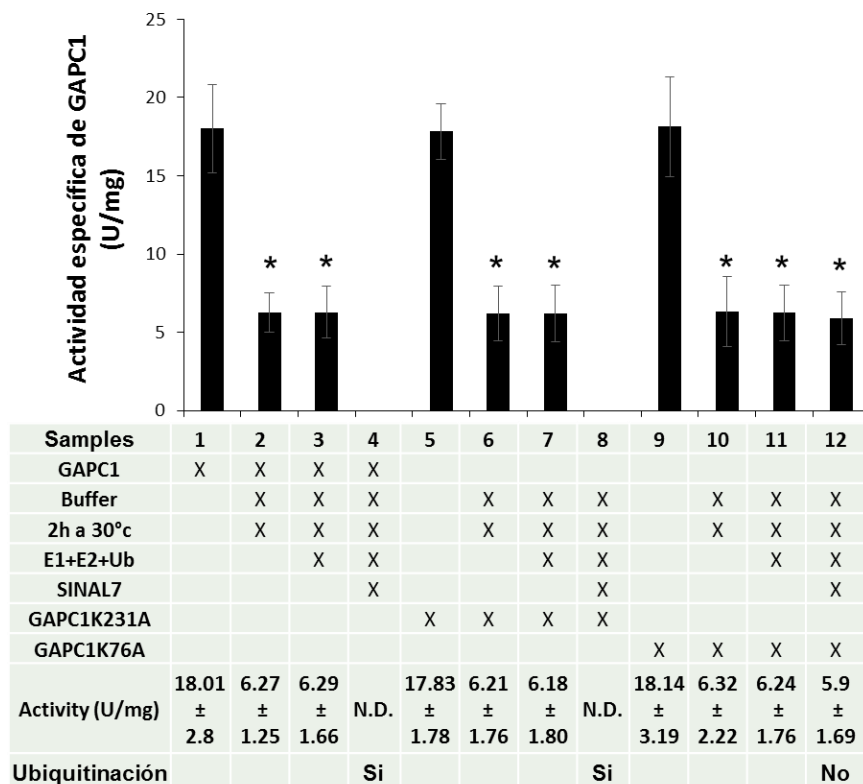


Figura 25. Determinación de la actividad específica de GAPC1. La actividad específica GAPC1 fue determinada en diferentes muestras conteniendo GAPC1 y GAPC1K231A ubiquitinadas por SINAL7 y GAPC1K76A no ubiquitinada como se indica en Materiales y métodos. En la tabla, N.D. indica "no detectado". Cada valor representa tres experimentos independientes, cada uno de ellos fueron realizados por triplicado (réplicas técnicas). Los asteriscos en el gráfico, representan valores diferentes estadísticamente significativos ($p < 0.05$). El análisis estadístico de los datos fue realizado como se describe en Materiales y métodos.

- Las modificaciones K76A y K231A en GAPC1 no afectan el plegamiento proteico

Considerando que el cambio de los residuos de lisina en GAPC1K231A y GAPC1K76A podría resultar en cambios estructurales en la proteína, decidimos estudiar la estructura secundaria de GAPC1 y las respectivas proteínas mutadas, GAPC1K231A y GAPC1K76A, mediante dicroísmo circular (DC) (Figura 26). Los porcentajes de estructura secundaria fueron determinados del espectro de DC usando el algoritmo K2D [90].

Ambas proteínas modificadas GAPC1K76A y GAPC1K231A presentaron espectros de DC idénticos al de la proteína GAPC1 sin modificaciones, demostrando que no se produjeron cambios en la estructura secundaria. Considerando que el error promedio observado en el espectro de dicroísmo

fue más bajo que el de los valores obtenidos en la predicción de la estructura secundaria usando el algoritmo K2D (0.08; 0.09), concluimos que la falta de ubiquitinación en GAPC1K76A y la falta de interacción con SINAL7 en GAPC1K231A, no fue resultado de la pérdida de estructura secundaria.

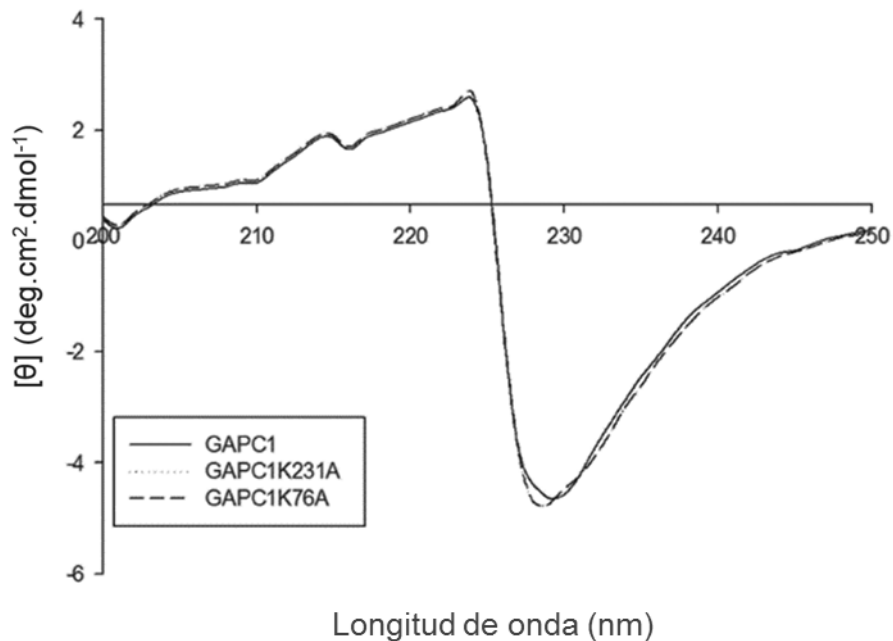


Figura 26. Espectro de dicroísmo circular de GAPC1 recombinante y GAPC1 modificadas. Los espectros para GAPC1 (línea continua), GAPC1K231A (línea de puntos) y GAPC1K76A (línea de rayas) fueron obtenidos usando un espectro-polarímetro Jasco J-810 (Jasco International Co.) en un buffer de fosfato de sodio 20 mM, pH 7.4.

- GAPC está ausente en el núcleo de plantas mutantes *signal7*

Considerando los resultados de interacción previamente descritos y que homólogos de la familia SINA están involucrados en la translocación de GAPDH al núcleo en otros organismos para activar distintas cascadas de señalización [61], decidimos estudiar la localización celular de GAPC1 en plantas de *A. thaliana* Col 0 y mutantes deficientes en SINAL7.

Con el fin de evaluar la posible función del gen *SINAL7*, se llevó a cabo la selección de plantas de *A. thaliana* deficientes en SINAL7 (*signal7*) por inserción de ADN-T (ver Materiales y métodos). El proceso de selección y la obtención de dos líneas mutantes de SINAL7 homocigotas (*signal7.1* y

sin17.2) de *A. thaliana* se detalla en el siguiente capítulo de la presente tesis y los esquemas de la ubicación de los ADN-T en ambas líneas se muestran en la Figura 31.

Nuestra hipótesis de trabajo fue que la interacción de SIN17 con GAPC1 estaría involucrada en la translocación o estabilización de la misma en el compartimiento nuclear. Para verificar esta posibilidad, los núcleos provenientes de células de tejidos florales de plantas Col 0 (WT) y mutantes *sin17* de *Arabidopsis* fueron aislados y las proteínas nucleares fueron analizadas por *Western blot* para intentar identificar GAPC1 en el extracto nuclear (ver Materiales y métodos). La forma acetilada de la histona H3 se usó como marcador de la fracción de proteínas nucleares y ADPGlc PPasa fue usada para identificar contaminación citosólica en los extractos nucleares.

Como se muestra en la Figura 27, no se detectó contaminación cruzada en las fracciones de los extractos nucleares (N) o citosólicos (C). Se identificó a GAPC1 tanto en compartimento nuclear como citoplasmático en los extractos de plantas tipo salvaje (WT) (Figura 27, WT, calles N y C). No se observó la presencia de GAPC1 en el núcleo de plantas *sin17* (Figura 27, *sin17*, calle N), sugiriendo que SIN17 es requerida para la localización nuclear de GAPC1. Se obtuvieron resultados similares con ambas líneas mutantes *sin17*.

Por otra parte, el análisis de western blot realizado con las plantas mutantes de GAPC1 (*gapc1*) [37], reveló la presencia de una banda proteica de menor intensidad que en las plantas wt en el extracto nuclear usando el anticuerpo anti-GAPC (Figura 27, *gapc1*, calle N). Estos resultados sugieren que la isoforma GAPC2, que comparte el 98% de identidad con GAPC1, también es translocada al núcleo en plantas de *A. thaliana*.

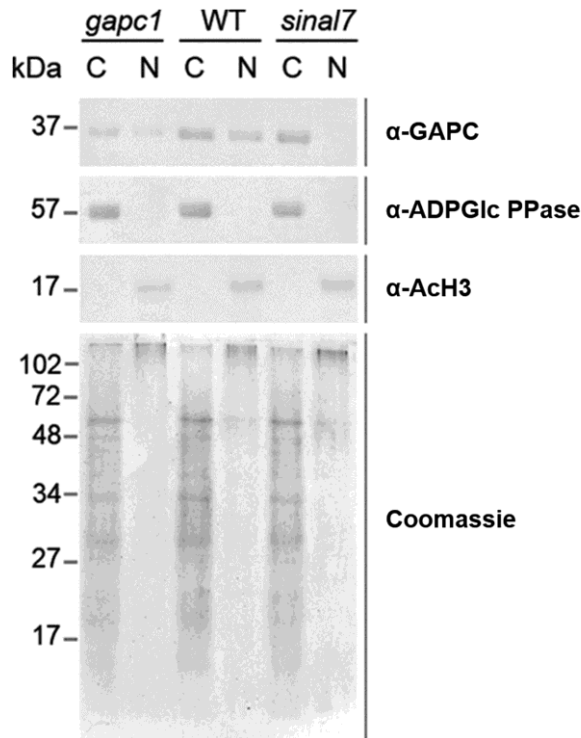


Figura 27. Detección de GAPC1 en extractos nucleares de flores de *Arabidopsis thaliana*. GAPC1 fue detectada por *Western blot* usando anticuerpo anti-GAPC en extractos de proteínas nucleares de flores de *A. thaliana* Col 0 y mutantes *gapc1*, y *sinal7.1*. (C) Fracción de extracto de proteínas citosólicas, mitocondriales y plastídicas de las flores. (N) Fracción de proteínas nucleares. El anticuerpo anti-ADPGlc PPasa se usó para identificar contaminación de la fracción citosólica y anti-Ach3 (anticuerpo dirigido contra la forma acetilada de la Histona H3) fue usado para identificar proteínas nucleares en los extractos. El panel de abajo es el gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. Los números en la izquierda indican las masas moleculares de las proteínas identificadas y las masas moleculares de los estándares correspondientes al marcador *Bio Rad Low Range Prestained SDS-PAGE Standards*.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que SINAL7 de *A. thaliana* posee actividad ubiquitina ligasa E3 (capítulo I) e interactúa *in vitro* con GAPC1 (Figuras 21 y 22). Además, GAPC1 fue monoubiquitinada en presencia de SINAL7 como E3 ligasa y los últimos resultados sugieren que SINAL7 es requerida para la traslocación de GAPC1 al núcleo en plantas de *Arabidopsis*. Estudios previos realizados en el laboratorio informaron que en plantas de *A. thaliana* con disfunción mitocondrial, los niveles de SINAL7 estaban regulados negativamente [34, 37, 38]. Sumado a esto, además de la disfunción mitocondrial, plantas carentes de GAPC1 citosólica, *gapc1*, también presentan fenotipo de macho-esterilidad [37], sugiriendo que SINAL7 podría cumplir algún rol en alguna vía de señalización retrógrada mitocondrial y en la reproducción de las plantas.

La mayoría de las enzimas glucolíticas están funcionalmente asociadas a la mitocondria en *Arabidopsis* [35]. A pesar del conocido papel en la glicólisis de GAPC1 [63], diversos reportes atribuyen roles no metabólicos para GAPC1 [35, 65]. Consistente con esta hipótesis es la observación de que GAPC1 sufre modificaciones post-traduccionales por efecto de especies reactivas de oxígeno (ERO) o especies reactivas del nitrógeno (ERN) [64]. De hecho, las modificaciones post-traduccionales redox, afectan la actividad catalítica de GAPDH induciendo cambios en la localización sub-celular, confiriendo propiedades multifuncionales (*moonlight*) a las isoformas de GAPDH [64, 66, 116].

Por otro lado, diversos blancos de poli-ubiquitinación de SIAH, el homólogo de SINA, han sido descritos en el contexto de la degradación proteica mediada por el proteosoma. Teniendo en cuenta que se han postulado sustratos específicos de compartimiento para SIAH-1, diferentes efectos pueden ser inducidos dependiendo de la localización sub-celular del blanco de ubiquitinación [60]. La interacción entre SIAH-1 y GAPDH S-nitrosilada, vía translocación nuclear es bien conocida, en la participación de una cascada de señalización de muerte celular programada [61]. En plantas, SINAT5, parólogo de SINAL7, promueve la degradación mediada por ubiquitinación de NAC1 para regular negativamente las señales de auxinas [62].

Considerando la importancia del rol del sistema ubiquitina-proteosoma en la regulación de la fisiología vegetal [57-59], el conocimiento de los blancos específicos de las proteínas ubiquitina ligasas es crucial para comprender los mecanismos de señalización y expresión génica en plantas. La necesidad de reconocer específicamente un amplio repertorio de sustratos, da cuenta de la gran diversidad (alrededor de más de mil) entre las potenciales E3 ligasas [59]. La ubiquitinación de proteínas puede tener diversas consecuencias dependiendo en el tipo y forma de la modificación. La ubiquitinación puede enviar proteínas sustrato a proteólisis por el proteosoma 26S o alterar sus propiedades bioquímicas y la localización sub-celular.

En el presente capítulo de este trabajo de tesis mostramos que SINAL7 es capaz de interactuar con GAPC1 mediante *Far western blot* (Figura 21) y

pull down (Figura 22). Además, la interacción física entre ellas se vió afectada cuando el residuo K231 fue reemplazado por alanina en GAPC1, sugiriendo que este residuo está involucrado en la formación del complejo o se encuentra en la interfaz proteína-proteína. Debe destacarse que la ausencia de interacción no se debió a una pérdida en la estructura secundaria por el cambio del aminoácido (lisina por alanina) en la posición 231 sino a un efecto específico de la mutación puntual. Esto quedó demostrado por la conservación de las constantes catalíticas para la mutante de GAPC1 y la confirmación por análisis de dicroísmo circular (Figura 26).

Con el fin de conocer si el complejo GAPC1-SINAL7 observado, tiene un rol funcional, ambas proteínas fueron incubadas en presencia de todos los elementos necesarios de un ensayo de ubiquitinación y luego de un análisis por electroforesis, se detectó un producto de alta masa molecular. Este producto fue identificado por análisis de espectrometría de masas como GAPC1 mono-ubiquitinada (determinado como se describe en Materiales y métodos). Concluimos que de cinco residuos de lisina (probables receptores de ubiquitina) en GAPC1, que contiene 31, sólo el residuo K76 fue modificado. De hecho, cuando K76 fue reemplazado por alanina, la ubiquitinación de GAPC1 fue abolida (Figura 24). Debe mencionarse que la mutante GAPC1K231A (que no interacciona con SINAL7 por ensayo de *pull down*) también fue ubiquitinada por SINAL7, indicando probablemente la existencia de una interacción más débil comparada a la que ocurre con GAPC1 sin modificaciones y que no puede ser detectada por el ensayo de *pull down*.

Un punto importante del estudio realizado en este capítulo, es el incremento de la V_{\max} de GAPC1 cuando interactúa *in vitro* con SINAL7, convirtiéndola en una enzima más efectiva, probablemente afectando la vía glucolítica. En contraste, el reclutamiento de GAPC1 por SINAL7 como enzima E3 ligasa en un medio completo de ubiquitinación, permitió su mono-ubiquitinación, con la pérdida de la actividad específica GAPC1, impidiéndole catalizar la conversión de Ga3P en 1,3-bis-fosfoglicerato. La observación de que la mutante GAPC1K76A, incapaz de ser ubiquitinada por SINAL7, conserva la

actividad GAPC, es una muestra importante de que la pérdida de la actividad enzimática es debida a la ubiquitinación en el residuo K76.

En *Arabidopsis*, GAPC puede ser translocada del citoplasma hacia el núcleo [65, 66], y la nitrosilación de GAPC ha sido propuesta como responsable de este evento [64]. Específicamente, dicha relocalización se debería a la S-nitrosilación de la cisterna 156 del sitio catalítico que le conferiría la habilidad de unirse a Saih1. En contraste, se ha reportado en *Arabidopsis* que la relocalización nuclear de GAPC1 puede ser estimulada por la sustitución de la cisteína catalítica por una serina [117], sugiriendo que una modificación redox de la cisteína no sería requerida para la translocación nuclear de GAPC1 en *Arabidopsis*. Por ésto, la posibilidad de que el estrés oxidativo u otro estímulo pueda modificar los eventos de translocación no puede ser descartada.

En este capítulo presentamos evidencia de que GAPC1 puede ser mono-ubiquitinada por SINAL7 y postulamos que esta modificación podría ser requerida para la translocación nuclear. Cualquiera sea la modificación post-traducciona que ocurra, es claro que la presencia de SINAL7 es requerida para la relocalización de GAPC1 en el núcleo celular en plantas, considerando que los extractos de proteínas nucleares de plantas *signal7*, no muestran rastros de GAPC1. De manera interesante, en extractos proteicos nucleares de plantas mutantes carentes de GAPC1 (*gapc1*), detectamos la presencia de GAPC2, confirmando lo descrito por Holygreffe y colaboradores [116]. Este resultado no es sorprendente, considerando que GAPC1 y GAPC2 conservan un 98% de identidad y de esta manera, probablemente compartan propiedades bioquímicas en común. Nuestros resultados son consistentes con el hecho de que se conoce que la mono-ubiquitinación causa la translocación de las proteínas afectadas por esta modificación en las células [119, 120], mientras que la poli-ubiquitinación está mayormente asociada con la degradación proteolítica de los sustratos por el proteosoma 26S [121].

CAPÍTULO III

Estudio funcional *in vivo* de SINAL7

Caracterización fenotípica de plantas deficientes y sobreexpresantes de SINAL7

En los capítulos previos de esta tesis, se analizó la actividad de SINAL7 como ubiquitina ligasa E3 *in vitro*, su interacción con GAPC1 y su capacidad de ubiquitinar a esta proteína. Además se demostró que SINAL7 es indispensable para la localización nuclear de GAPC1 en plantas de *Arabidopsis*. Para una caracterización completa de SINAL7 decidimos estudiar su función en plantas.

Se ha reportado que SINAT5 (homólogo de SINAL7 en *Arabidopsis*) estaría involucrado en la regulación de la floración [122] y que promueve la degradación mediada por ubiquitina de NAC1 (factor de transcripción involucrado en la formación del meristema apical y raíces secundarias mediado por auxinas) en la atenuación de las señales de auxinas [62]. Además, se ha asociado a otro homólogo de SINAL7 (SINAT2), en la estabilización de elementos en la carotenogénesis de las hojas de *Arabidopsis* [123]. Si bien se ha asociado a proteínas *seven in absentia* en la participación de procesos involucrados en crecimiento [52] y resistencia a patógenos en plantas [48], poco se conoce sobre la función *in vivo* de estas proteínas en *Arabidopsis*. Teniendo en cuenta estos antecedentes, podemos notar que el papel de los homólogos de SINAL7 tiene influencia en un abanico de procesos en plantas.

Con el fin de ampliar el conocimiento sobre la caracterización y las posibles funciones *in vivo* de SINAL7, inicialmente se llevó a cabo el estudio de sus niveles de transcriptos en diversas condiciones y tejidos en plantas de *Arabidopsis thaliana* Col0.

- Niveles de transcriptos de *SINAL7* en diferentes órganos de *Arabidopsis thaliana*

Se determinó la expresión de *SINAL7* en diversos tejidos de plantas de *A. thaliana* Col0 mediante *real time* qPCR (Figura 28). Se extrajo ARN total de raíz, hojas de roseta, inflorescencia en estadio 6 y 12 y silicuas de plantas de *A. thaliana* Col0 crecidas 28 días bajo condiciones de día largo en

invernadero (ver Materiales y métodos). El ADNc fue sintetizado a partir del ARN total obtenido de los distintos órganos de la planta (ver Materiales y métodos) y a continuación cuantificado espectrofotométricamente. Se usaron cantidades idénticas de las diferentes muestras de ADNc para la amplificación por qPCR usando cebadores específicos de *SINAL7* en la reacción (ver tabla 4 en Materiales y métodos). Los datos presentados responden a los valores obtenidos del promedio de al menos tres réplicas biológicas y técnicas usando el gen *CBP* (*cap binding protein*, At5g44200) como control interno de normalización [124] (Figura 28).

Se observaron niveles elevados del transcrito de *SINAL7* en silicuas (2.377) e inflorescencia en estadio 12 (0.705) y menores niveles en raíz (0.152), inflorescencia en estadio 6 (0.080) y hojas de roseta (0.060) en relación a la expresión del gen control. Con estos resultados podemos concluir que *SINAL7* se expresaría de manera tejido-específica, destacándose una mayor expresión en flores en estadio avanzado de desarrollo (12) y silicuas, alcanzando aproximadamente niveles doce y cuarenta veces mayores respectivamente, a lo observado en hojas de roseta.

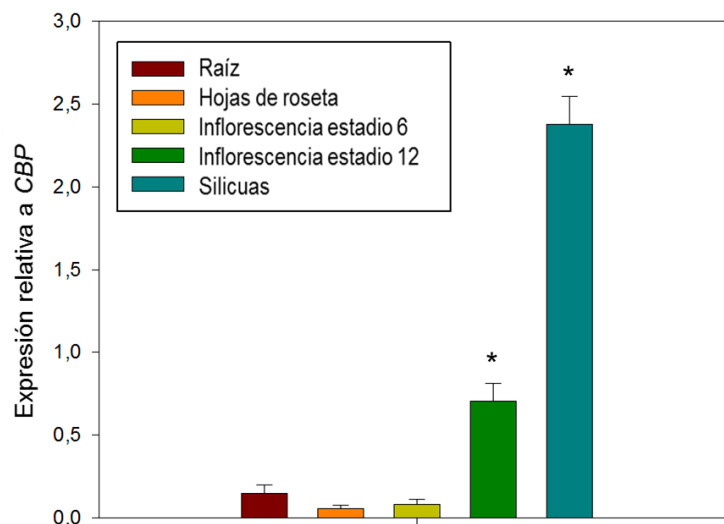


Figura 28. Niveles de transcritos de *SINAL7* en diferentes órganos de plantas de *Arabidopsis thaliana* Col0. Determinación de los niveles de transcritos de *SINAL7* relativos a la expresión del gen control *CBP* (At5g44200) en distintos órganos de *A. thaliana* mediante *real time* qPCR (como se describe en materiales y métodos). Los datos mostrados representan al menos tres experimentos independientes, cada uno con triplicado técnico. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas mediante test de t de Student ($P < 0.05$).

- *SINAL7* muestra un comportamiento dependiente de luz en flores

La floración es marcadamente dependiente de las diferentes señales del medio ambiente, en particular de la luz. Un gran regulador de la floración es la longitud del día, que permite que proceda en el momento apropiado [125]. Como se observó en el apartado anterior (figura 28), la mayor expresión de *SINAL7* se observó en órganos florales y por lo tanto, decidimos realizar el análisis de la expresión del transcripto a lo largo del día, en flores en estadio 12 crecidas bajo condiciones de día largo (ver Materiales y métodos). Los niveles de expresión de *SINAL7* fueron relativizados a la expresión del gen control *CBP* (At5g44200) [124].

Como se observa en la Figura 29, los niveles de ARNm de *SINAL7* disminuyen luego de cuatro horas de oscuridad a su mínimo valor (0.0365). Al comienzo del día, los mensajeros de *SINAL7* comienzan a aumentar hasta alcanzar su máximo valor (0.705) a las 20 h del periodo experimental (12 h luego de exposición a la luz). De esta manera, podemos concluir que hay una variación de dos veces en los niveles de transcripto de *SINAL7* en un período de 24 h.

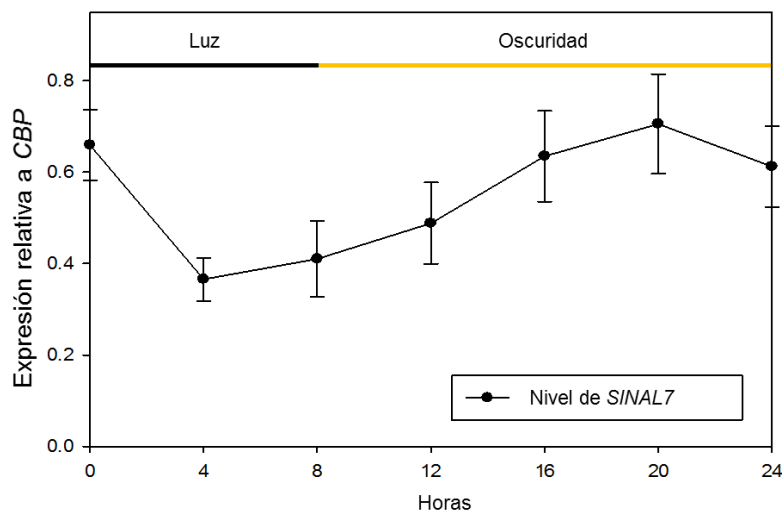


Figura 29. Niveles de transcritos de *SINAL7* a lo largo del día en plantas de *A. thaliana* Col0. Determinación de los niveles de transcritos de *SINAL7* a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h a lo largo del día en régimen de día largo mediante *real time* qPCR (como se describe en materiales y métodos). Los valores fueron estimados y graficados en relación a la expresión del gen control *CBP* (At5g44200). Los datos mostrados representan al menos tres experimentos independientes, cada uno con triplicado técnico. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas mediante test de t de Student ($P < 0.05$).

- Los niveles de *SINAL7* aumentan por exposición a UV-B

Como fue mencionado anteriormente, la ubiquitinación cumple un rol crucial en la amplificación de la señal de daño al ADN. Diversas proteínas marcadas con ubiquitina son degradadas mediante el proteosoma luego del daño inducido por UV-B [126]. Debido a que *SINAL7* es una ubiquitina ligasa decidimos investigar el comportamiento del gen que la codifica en respuesta a UV-B.

Se determinaron los niveles de transcripto de *SINAL7* mediante qPCR en flores en estadio 12 de plantas expuestas a la radiación UV-B. Se crecieron plantas de *A. thaliana* Col0 en invernadero en condiciones de día largo durante cuatro semanas y luego las mismas fueron expuestas a UV-B (ver Materiales y métodos) a partir del punto de las 16 h (8 h de oscuridad y 8 h de luz). Las plantas control, presentes en el mismo ambiente, fueron protegidas con una membrana plástica capaz de excluir la luz UV-B. Los ADNc obtenidos de plantas control y tratadas fueron utilizados en la reacción de *real time* qPCR (Figura 30) usando *CPK3* (proteína kinasa dependiente de calcio 3, At4g23650) como gen control normalizador, ya que su expresión no varía con el tratamiento de UV-B [127].

Los resultados del triplicado técnico de al menos tres réplicas biológicas nos permiten concluir que la expresión de *SINAL7* aumenta al menos 2 veces en las flores de plantas tratadas con UV-B. Similares resultados fueron obtenidos para las hojas de roseta, demostrando de esta manera que la exposición a UV-B gatilla la expresión del transcripto del gen *SINAL7* (datos no mostrados)

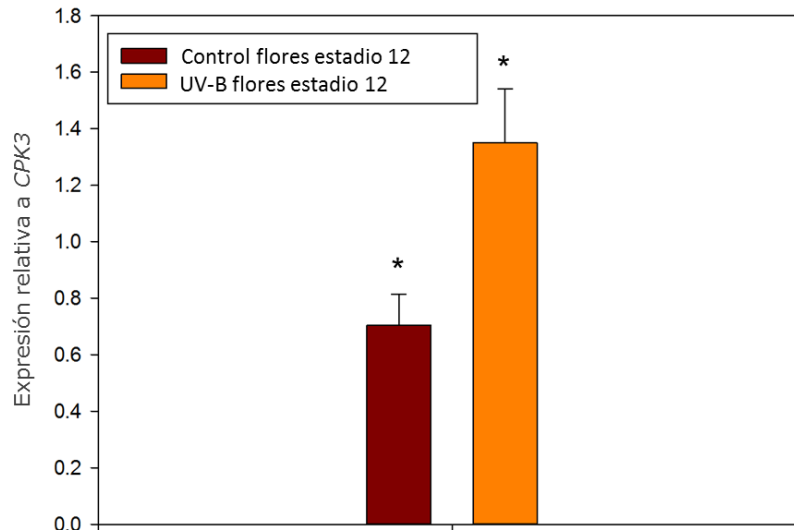


Figura 30. Efecto del UV-B en los niveles de transcritos de *SINAL7* en flores de plantas de *A. thaliana* Col0. Los niveles del transcrito de *SINAL7* en flores en estadio 12 de *A. thaliana* relativos al gen control *CPK3* (proteína kinasa dependiente de calcio 3, At4g23650) fueron determinados luego de cuatro horas de exposición a UV-B mediante *real time* qPCR (como se describe en Materiales y métodos). Las plantas control fueron protegidas de la radiación UV-B usando filtros de poliéster (ver Materiales y métodos). Los datos mostrados representan al menos tres experimentos independientes, cada uno con triplicado técnico. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas mediante test de t de Student ($P < 0.05$).

De la caracterización transcriptómica existente en diferentes bases de datos de *SINAL7* se puede concluir que la expresión de esta ubiquitina ligasa es mayor en tejidos con activa división celular y alta demanda energética. Los resultados de obtenidos en este sentido corroboran lo observado computacionalmente en *e-FPBrowser* [128] (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi? PrimaryGene = AT5G37890&modeInput=Absolute>). Además, los niveles de transcritos estarían respondiendo a distintos estímulos de luz.

- Caracterización funcional de *SINAL7*
- Identificación de mutantes homocigotas de *A. thaliana* del gen *SINAL7*

Para estudiar el rol *in vivo* de *SINAL7* en plantas de *A. thaliana* con pérdida de función, se solicitaron semillas mutantes en este gen por inserción de ADN-T al "*Arabidopsis Biological Resource Centre*" (ABRC) (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress? gene= AT5G37890>).

Se adquirieron semillas de dos líneas mutantes nulas del gen en estudio, de eventos independientes. A continuación, se procedió a la obtención de las líneas de plantas homocigotas. Para esto, se sembraron 20 semillas de cada línea, se extrajo ADN genómico y se procedió a la identificación de las mutantes homocigotas mediante la técnica de PCR utilizando un par de oligonucleótidos que amplifican el gen *SINAL7* (*SINAL7up* y *SINAL7down*) y un oligonucleótido diseñado a partir del extremo izquierdo del ADN-T (*Lb1*, 5' - GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT - 3' ; <http://signal.salk.edu>).

Como muestra la figura 31 A y B, la línea *SALK_096989* (denominada, *signal7.1*) y la *CS833574* (denominada, *signal7.2*) presentan el ADN-T en el segundo y el primer exón del gen *SINAL7*, respectivamente.

Las plantas que presentan la inserción del ADN-T, producen una reacción de PCR positiva utilizando la combinación de oligonucleótidos *SINAL7up/Lb1*, ya que el ADN-T se encuentra insertado en esa dirección (Figura 32 A). Contrariamente, una reacción de PCR positiva con los oligonucleótidos *SINAL7up/SINAL7down*, indica que el ADN-T no se encuentra insertado en esa región, y la planta tiene genotipo salvaje (Figura 32 B). Una reacción de PCR negativa con los oligonucleótidos *SINAL7up/SINAL7down*, indica que la falta de amplificación del gen completo *SINAL7* es debida a la presencia del ADN-T en plantas mutantes homocigotas (Figura 32 B).

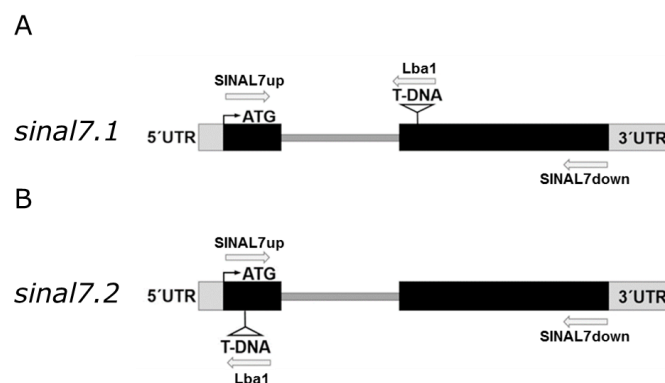


Figura 31. Esquema de la estructura del ADN de las plantas mutantes de *SINAL7* (*signal7.1* and *signal7.2*) y los cebadores utilizados para la selección de líneas homocigotas. (A and B) Organización intrón-exón del gen *SINAL7* en las líneas mutantes por inserción del ADN-T (*signal7.1*, *SALK_096989* and *signal7.2*, *CS833574*) utilizadas en este trabajo. Las flechas muestran la localización y dirección de los cebadores usados para seleccionar las líneas *signal7* mutantes (*SINAL7up*, *SINAL7down* y *Lba1*). La estructura del ADN-T no está graficada a escala. El gen *SINAL7* contiene dos exones y un intrón. El triángulo blanco muestra la posición de T-DNA en el segundo exón (A) o primer exón (B) en la región del gen *SINAL7*.

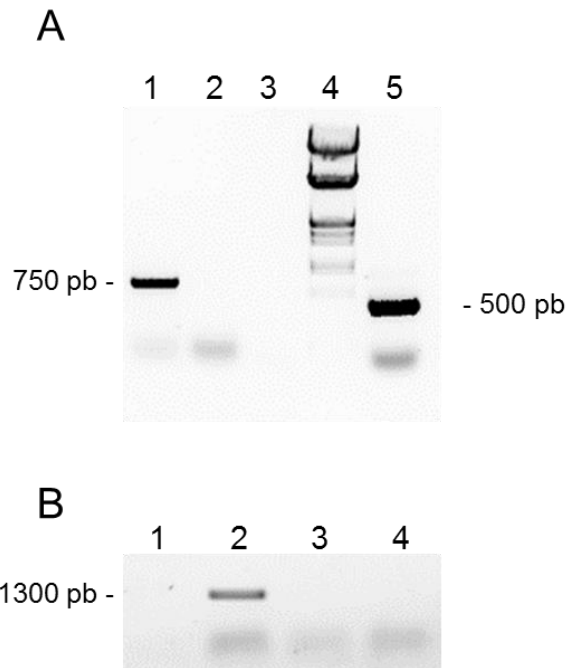


Figura 32. Identificación de plantas de *Arabidopsis* mutantes homocigotas en el gen *SINAL7* en las líneas SALK_096989 (*sin17.1*) y CS833574 (*sin17.2*). A- Identificación de la presencia del ADN-T en las líneas mutantes de *Arabidopsis*. Análisis de los productos de PCR separados en gel de agarosa al 1% (P/V). Las reacciones de PCR (40 ciclos) se llevaron a cabo en presencia de los cebadores *SINAL7* 5' y LBb1, utilizando ADN genómico de plantas de la línea SALK_096989 (calle 1), Col0 (calle 2) y CS833574 (calle 5). En la calle 3 se encuentra un control negativo de la reacción de PCR con agua como molde. En la calle 4 se encuentra el marcador Lambda EcoRI + HindIII Ready-to-use (PB-L). **B- Identificación de mutantes homocigotas.** Análisis de los productos de PCR separados en gel de agarosa al 1% (P/V). Las reacciones de PCR (40 ciclos) se llevaron a cabo en presencia de los cebadores *SINAL7* 5' y *SINAL7* 3' utilizando ADN genómico de las líneas de plantas Col0 (calle 2), SALK_096989 (calle 3) y CS833574 (calle 4). En la calle 1 se encuentra un control negativo de reacción con agua como molde.

A continuación, se analizó por RT-PCR la presencia del transcripto del gen *SINAL7* en ADNc de las líneas *sin17.1* y *sin17.2* y plantas salvajes de la línea Col0 (Figura 33). Mediante este estudio se logró determinar que la inserción del ADN-T produce una disminución de la expresión del transcripto del gen *SINAL7* a niveles indetectables en las líneas de plantas mutantes homocigotas *sin17.1* y *sin17.2*.

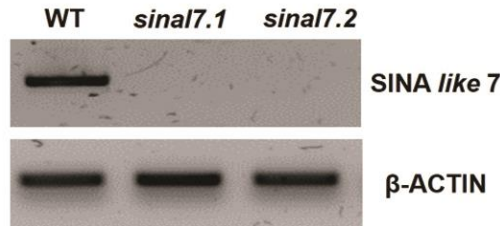


Figura 33. Análisis de niveles de transcritpo del gen *SINAL7*. Análisis de los productos de PCR con muestras de ADNc de plantas de *Arabidopsis* Col0, *sinal7.1* (SALK_096989) y *sinal7.2* (CS833574). El ARN total fue extraído de las hojas de plantas de 42 días de edad y luego se realizó la transcripción reversa usando hexámeros aleatorios y luego amplificadas con cebadores específicos para *SINAL7*. La amplificación del gen *ACTINA2* (At3g18780) se utilizó como control interno.

- Construcción de plantas transgénicas de *A. thaliana* sobreexpresantes de *SINAL7*.

Las plantas de *Arabidopsis* sobreexpresantes constitutivas de *SINAL7* fueron generadas a partir del clonado clásico de la secuencia de ADNc que codifica para la proteína *SINAL7* amplificada por PCR con los sitios flanqueantes del par de enzimas de restricción Xba I / Bam HI (ver Materiales y métodos) en un plásmido derivado del vector binario de expresión en plantas pPZP212 [95]. Una vez obtenida la construcción en el vector pPZP212:*SINAL7*, se verificó la secuencia de ADN (www.macrogenusa.com) y a continuación se transformó en *A. tumefaciens* (ver Materiales y métodos). Las bacterias transformantes positivas se emplearon para transformar plantas de *A. thaliana* Col0 mediante la técnica de *floral dip* (ver Materiales y métodos). La sobreexpresión de *SINAL7* en las plantas está controlada bajo el promotor constitutivo 35S CaMV (del virus del mosaico del coliflor). Además las plantas transgénicas resultan ser resistentes al antibiótico kanamicina (utilizado como marcador de selección), característica otorgada por el vector pPZP212. Luego de la transformación, la selección de las líneas sobreexpresantes de *SINAL7* se llevó a cabo mediante la germinación de las semillas de plantas transformadas en placas de Petri en medio MS suplementadas con el antibiótico kanamicina (MS - kan). Como se muestra en la Figura 34, luego de la transformación, se obtuvieron plantas resistentes a kanamicina.

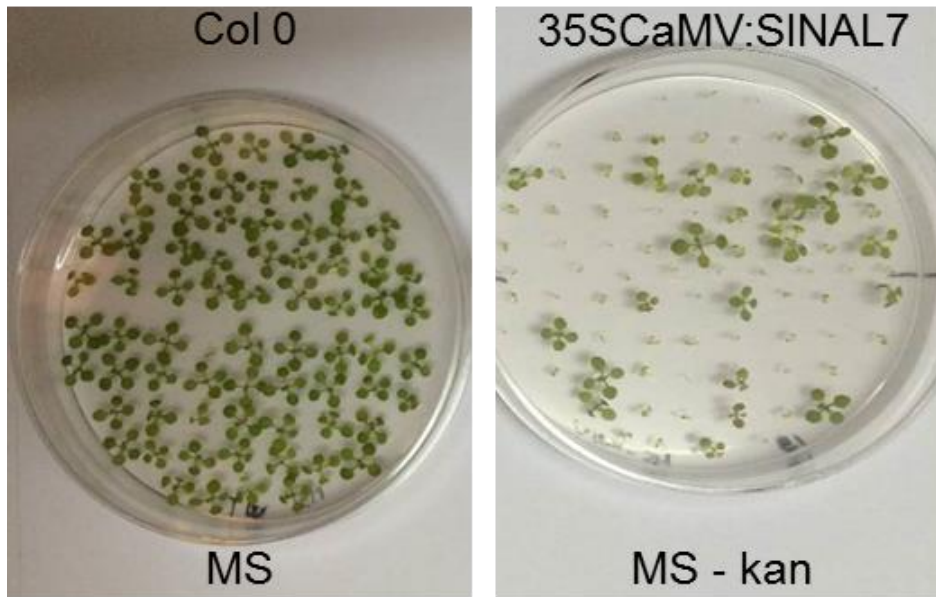


Figura 34. Selección de plantas transgénicas 35SCaMV:SINAL7 resistentes a kanamicina. Imágenes fotográficas de plantas en placas de Petri conteniendo medio MS (control positivo de germinación de plantas Col0 en medio no suplementado con el antibiótico) y MS-kan donde se llevó a cabo la selección de las plantas transgénicas (35SCaMV:SINAL7). Las plantas que germinan y crecen en medio MS-kan son plantas transgénicas de *A. thaliana* transformantes positivas para la construcción pPZP212:SINAL7.

Las plantas resistentes, fueron luego rusticadas en macetas con tierra y su crecimiento se llevó a cabo como se describe en Materiales y métodos. A los 28 días post-germinación, se tomó una muestra de ADN_g de una hoja de roseta de cada planta resistente (12 plantas, denominadas 35SCaMV:SINAL7#1 a 35SCaMV:SINAL7#12) y las mismas se utilizaron como moldes de reacciones de PCR donde se analizó la amplificación del gen *ACTINA2* (At3g18780) (cebadores: Act2up/Act2down) como gen normalizador y como paso de análisis de la integridad del ADN_g extraído (Figura 35).

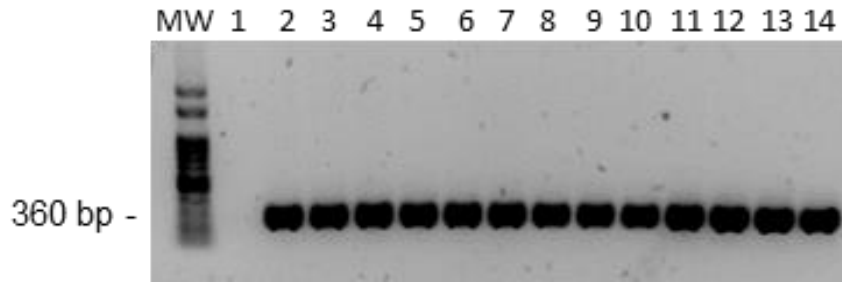


Figura 35. Análisis de la amplificación del gen *ACTINA2*. Análisis de los productos de PCR de amplificación del gen *ACTINA2* (At3g18780) con cebadores Act2up y Act2down, en muestras de ADNg de plantas de *Arabidopsis* Col0 (calle 2) y plantas transgénicas 35SCaMV:SINAL7#1 a 35SCaMV:SINAL7#12 resistentes a kanamicina (calles 3 a 14 respectivamente). En la calle 1 se encuentra un control negativo de PCR usando agua como molde. Las bandas en la calle MW corresponden al marcador 100 pb de PB-L (Productos Bio-Lógicos).

Posteriormente, se analizó la presencia del transgen mediante la amplificación del mismo por PCR a 40 ciclos con cebadores que amplifican una parte de la región 5' del gen *SINAL7* (sinal7up) y parte del gen *NPTII* (gen correspondiente a la resistencia al antibiótico kanamicina, NPTII down), utilizando como molde el ADNg obtenido de las plantas resistentes (Figura 36).

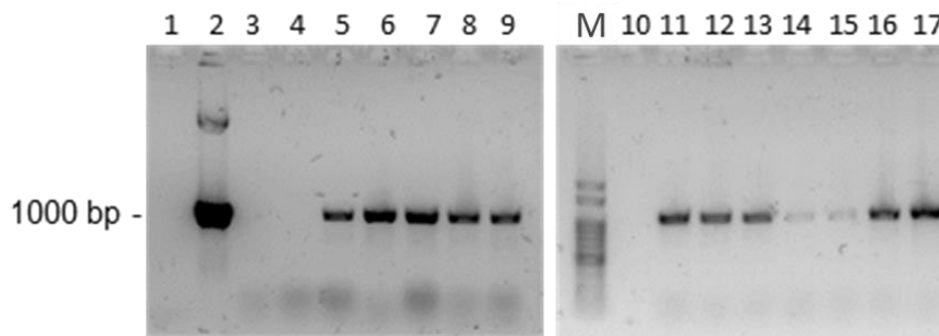


Figura 36. Análisis de la presencia del transgen. Análisis de los productos de PCR de amplificación del gen *SINAL7* (At5g37890) y parte del gen *NPTII* con cebadores sinal7up/NPTII down, en muestras de ADNg de plantas de *Arabidopsis* Col0 (calle 4) y plantas transgénicas resistentes a kanamicina (plantas 35SCaMV:SINAL7#1 a 35SCaMV:SINAL7#5 en calles 5 a 9 respectivamente y plantas 35SCaMV:SINAL7#6 a 35SCaMV:SINAL7#12 en calles 11 a 17 respectivamente). En la calle 3 se encuentra un control negativo de PCR usando agua como molde. Como control positivo de señal de amplificación de *SINAL7* se utilizó como molde el plásmido pPZP212:SINAL7 con los cebadores sinal7up y sinal7down (calle 2). Calle 1, control negativo de amplificación de *SINAL7* de PCR con agua como molde con los cebadores sinal7up y sinal7down. Las bandas en la calle M corresponden al marcador 100 pb de PB-L (Productos Bio-Lógicos). Calle 10, vacía (sin siembra).

Como muestra la figura 36, en las calles 5 a 9 y 11 a 17 se observa una banda de aproximadamente 1000 pares de bases que correspondería al producto de amplificación por PCR del transgén con los cebadores *sinal7up* y *NPTIIDwon*, en las plantas 35SCaMV:*SINAL7*. En la calle 4, no se observa amplificación alguna correspondiente a la muestra de *A. thaliana* Col0, lo cual indica que no existe amplificación inespecífica del transgen en plantas tipo salvaje. Además, en la calle 2, se observa una banda (como control de la señal de *SINAL7*) correspondiente a la amplificación de *SINAL7* por PCR usando el plásmido pPZP212:*SINAL7* como molde con los cebadores *sinal7up* y *sinal7down*.

De las doce líneas de plantas sobreexpresantes de *SINAL7* obtenidas, se seleccionaron las líneas 35SCaMV:*SINAL7*#2 y 35SCaMV:*SINAL7*#3, que fueron denominadas *SINAL7.1* y *SINAL7.2* respectivamente. Empleando estas dos líneas sobreexpresantes, sumadas a las líneas deficientes (*sinal7.1* y *sinal7.2*) y empleando como control a la línea Col0, se llevaron a cabo los experimentos de caracterización fenotípica, a fin de comprender el rol *in vivo* de *SINAL7*.

- Caracterización fenotípica de las plantas sobreexpresantes y deficientes de *SINAL7*

- Determinación de los niveles de transcritos de *SINAL7*

A fin de conocer los niveles de transcritos de *SINAL7* en las distintas líneas de plantas donde se llevarán a cabo los ensayos fenotípicos y la posibilidad de asignar significancia a estos resultados en este contexto, se cuantificó el transcritos del gen *SINAL7* mediante la técnica de *real time* qPCR. En la reacción (llevada a cabo con cebadores específicos para el transcritos del gen *SINAL7*, ver Materiales y métodos), se utilizó el ADNc resultante de la reacción de retrotranscripción a partir de muestras de ARN total obtenido de hojas de plantas en estadio 5 [109]. Dichas muestras fueron analizadas en relación a la expresión del gen *ACTINA2* (At3g18780) como control interno.

Como ilustra la Figura 37, los niveles de transcritos del gen *SINAL7* son indetectables en las muestras provenientes de plantas deficientes (*signal7.1* y *signal7.2*) como se determinó previamente mediante RT-PCR (Figura 33). Además, se observa un incremento de aproximadamente diez veces en los niveles de transcritos de *SINAL7* en las líneas sobreexpresantes (*SINAL7.1* y *SINAL7.2*), comparado con los niveles detectados en Col0.

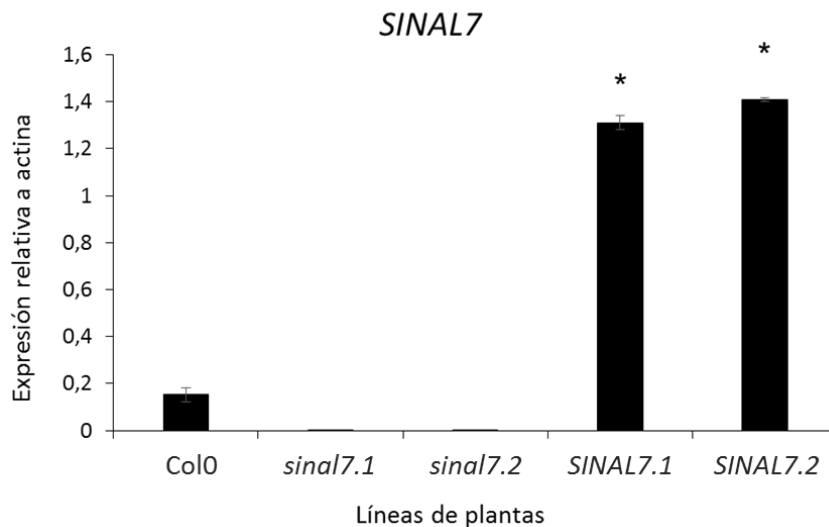


Figura 37. Niveles de transcritos de *SINAL7* determinados por *real time* qPCR. Determinación de los niveles de transcritos del gen *SINAL7* relativos al gen control *ACTINA* (At3g18780) en hojas de plantas de *A. thaliana* Col0, *signal7.1*, *signal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2* mediante *real time* qPCR (como se describe en Materiales y métodos). Los datos representan al menos tres experimentos independientes (diferencias estadísticamente significativas determinadas usando un test de t, $p < 0.05$).

De esta manera, podemos concluir que existe un incremento a nivel transcripcional de los mensajeros correspondientes al gen *SINAL7* en las plantas sobreexpresantes (líneas *SINAL7.1* y *SINAL7.2*), que podría estar influyendo en el desarrollo de las plantas.

- Determinación de los niveles de proteína *SINAL7* en plantas

Para conocer si la diferencia de expresión de los transcritos se correlaciona con los niveles de la proteína *SINAL7* en las distintas líneas seleccionadas, se determinó su cantidad mediante la técnica de inmuno-detección o

Western blot con extractos proteicos de hojas. Luego de la extracción de proteínas totales, se cuantificó la cantidad de proteína obtenida de cada línea y se sembraron idénticas alícuotas para el ensayo de inmunodetección (Figura 38 A). Como control de carga de los distintos extractos proteicos, se observa la idéntica cantidad de proteína correspondiente a la subunidad mayor de Rubisco en un duplicado del gel de poliacrilamida del ensayo teñido con azul de Coomassie.

En la Figura 38 A, se observan bandas de proteína en la membrana de nitrocelulosa identificadas por el anticuerpo policlonal contra SINAL7 (anti-SINAL7) en las calles correspondientes a los extractos proteicos de las líneas Col0, *SINAL7.1* y *SINAL7.2* y no se observan bandas en las calles de los extractos de proteína de las plantas mutantes. Tampoco se observan bandas en la calle donde se sembró la proteína albúmina de suero bovino comercial (BSA, de sus siglas en inglés) como control negativo de reacción cruzada del anticuerpo anti-SINAL7. Además, a fin de cuantificar la proteína SINAL7 en el extracto de las distintas líneas de plantas, se realizó un análisis de las bandas por densitometría, mediante el programa informático *Gel Pro Analyzer* (Media Cybernetics) de la foto de la membrana de nitrocelulosa revelada con el anticuerpo. Como puede observarse en el gráfico de la Figura 38 B, hay un incremento de la cantidad de proteína SINAL7 de alrededor de 2 veces en ambas líneas sobreexpresantes (*SINAL7.1* y *SINAL7.2*) respecto a la wt.

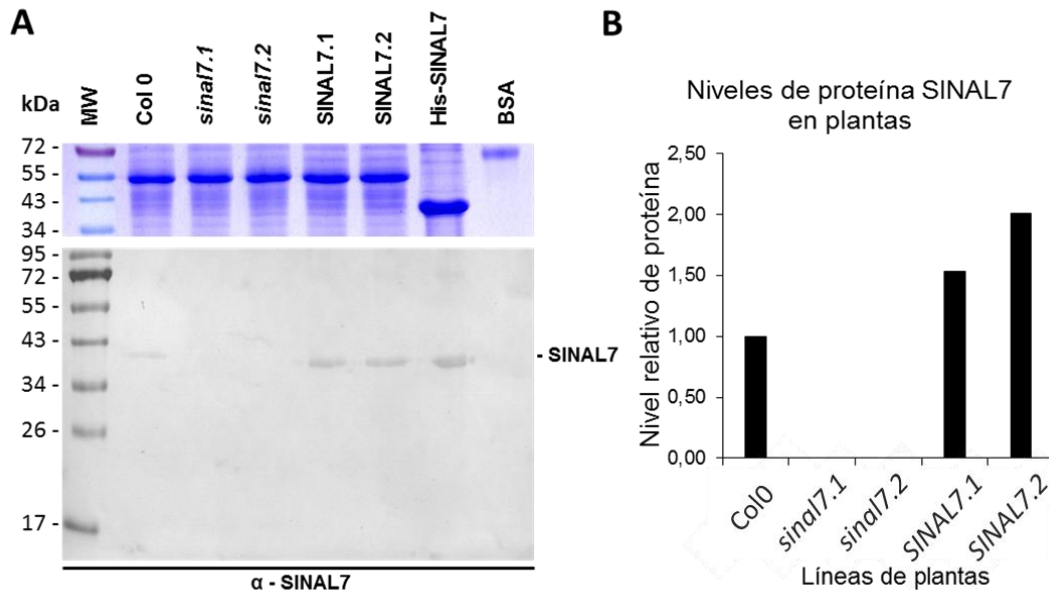


Figura 38. Niveles relativos de proteína SINAL7 en plantas. **A** - Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (arriba) y membrana de *Western blot* (abajo) analizada con anticuerpo anti - SINAL7 (α - SINAL7) de extracto de hojas de plantas de *A. thaliana* Col0, *sin17.1*, *sin17.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. Los números a la izquierda son los valores (expresados en kDa) de la masa molecular de las bandas del marcador THERMO Scientific. **B** - Gráfico de los niveles relativos de proteína SINAL7 determinados por densitometría de las bandas correspondientes a la proteína SINAL7 en la membrana de *Western blot* analizadas con el anticuerpo anti - SINAL7 mediante el programa *Gel-Pro Analyzer*. Se asignó el valor 1 a la intensidad de la banda de SINAL7 en Col0, el resto de las bandas fueron relativizadas a este valor arbitrario. Los datos son una representación de los valores obtenidos según el análisis de la membrana en A.

De esta manera, podemos afirmar que se obtuvieron dos líneas de plantas deficientes y dos líneas sobreexpresantes de SINAL7, independientes, que nos permitirán estudiar *in vivo* las posibles funciones de SINAL7 a partir de su análisis fenotípico y molecular.

A partir de este punto, se analizaron diversos parámetros en la generación F2 de las líneas de plantas *sin17.1*, *sin17.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2* (Figura 39) comparando los valores determinados con los de plantas de *A. thaliana* Col0, como se detalla a continuación.



Col0 *sinal7.1* *sinal7.2* SINAL7.1 SINAL7.2

Figura 39. Imagen comparativa de líneas de plantas de *A. thaliana* Col0, deficientes en SINAL7 y sobreexpresantes de SINAL7. Plantas de *A. thaliana* Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, SINAL7.1 y SINAL7.2 de 32 días.

- La sobreexpresión de SINAL7 no afecta la longitud de la raíz

Con el fin de conocer si la función de SINAL7 tiene influencia en el crecimiento de la raíz de las plantas, se analizó el crecimiento de este órgano en las distintas líneas de plantas de *A. thaliana* Col0, deficientes y sobreexpresantes de SINAL7. Se determinó la longitud de la raíz principal como fue descrito previamente por Corrales y colaboradores. [96] mediante el análisis de las imágenes de las raíces con el programa *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) [97] (ver Materiales y métodos). No se encontraron diferencias significativas entre las distintas líneas en la longitud de la raíz principal y raíces laterales. En la Figura 40 se observa un gráfico y las imágenes utilizadas en el análisis de la longitud de raíces laterales de plantas de 10 días post-germinación.

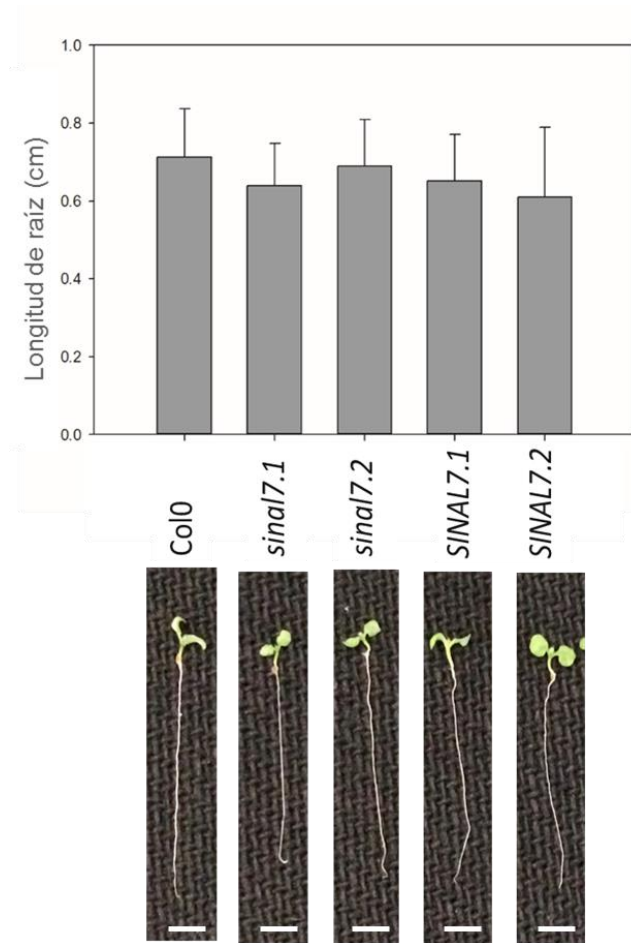


Figura 40. Longitud de la raíz principal. Se determinó la longitud de la raíz principal mediante el análisis de la distancia entre la zona que limita con el hipocotilo y punta de la raíz de imágenes fotográficas tomadas en lupa con aumento 1 x en el programa ImageJ (Abajo). Previo al análisis se una calibración con una regla estándar de medida de NIKON. La línea blanca corresponde a 0.15 cm de longitud en las imágenes. Gráfico de barras de los valores de longitud de la raíz principal de las distintas líneas de plantas. (Arriba) Se analizaron al menos 12 raíces de cada una de las líneas de plantas y los valores determinados se analizaron mediante un test estadístico de ANOVA.

A partir de estos resultados se concluye que ni la deficiencia ni la sobreexpresión de SINAL7 influirían en el crecimiento o desarrollo de la raíz principal de la planta.

- La sobreexpresión de SINAL7 afecta el desarrollo del tallo principal

A diferencia de la raíz, el tallo de plantas *SINAL7* mostró un marcado incremento del diámetro (Figura 41 A). Como muestra la Figura 41 B, las líneas deficientes en SINAL7 no presentan diferencias significativas respecto a las líneas Col0. Sin embargo, el diámetro del tallo principal de las plantas

sobreexpresantes *SINAL7.1* y *SINAL7.2*, muestra un aumento significativo de aproximadamente el 40% comparado con Col0 (Figura 41 B).

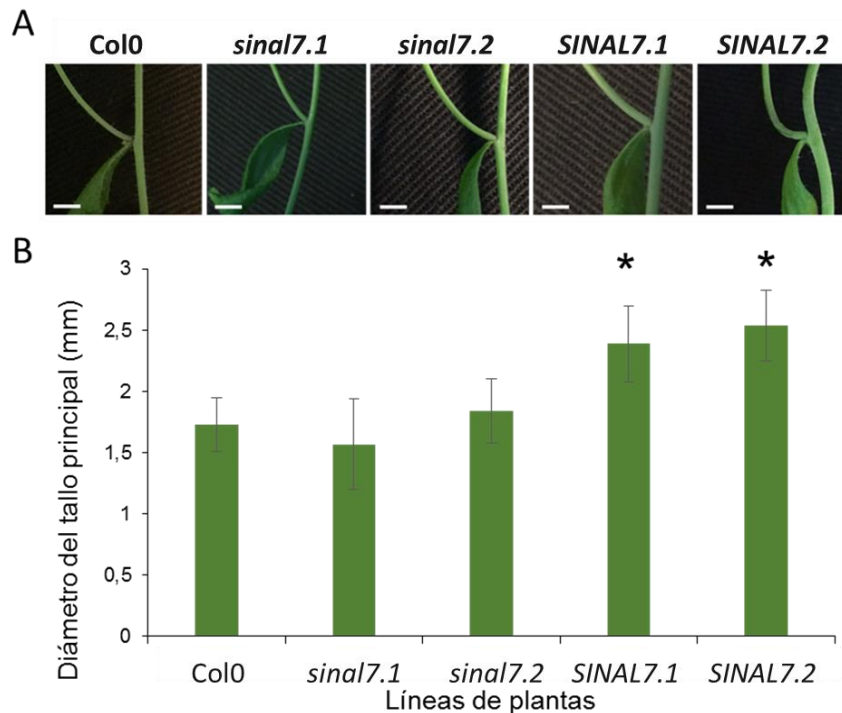


Figura 41. Diámetro del tallo principal. Se determinó el diámetro del tallo principal mediante el análisis de las distancias de los tallos (5 mm por debajo de la primera ramificación) en el programa *ImageJ* de imágenes fotográficas (A) tomadas en lupa con aumento 1 x. Previo al análisis se realizó una calibración con una regla estándar de medida de NIKON. (B) Gráfico de barras de los valores de diámetro del tallo de las distintas líneas. Se analizaron al menos 10 tallos de cada una de las líneas de plantas y se analizaron mediante un test estadístico de ANOVA donde las diferencias significativas estadísticamente ($p < 0.5$) están representadas con un asterisco (*).

El aumento del diámetro del tallo en las plantas *SINAL7*, implica que la sobreexpresión de este gen estaría influyendo positivamente en el desarrollo del tallo.

- Las plantas *SINAL7.1* y *SINAL7.2* presentan mayor área foliar, peso seco de roseta, número de hojas de roseta y caulinares

Con el fin de continuar caracterizando del desarrollo vegetativo en las plantas, se analizó el área de la roseta a lo largo de su desarrollo hasta el

día 30 post-germinación, como fue descrito previamente por Rymen y colaboradores [98] (ver Materiales y métodos) en plantas crecidas en condiciones de día largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad).

Los resultados mostraron que el área de la roseta de plantas sobreexpresantes de SINAL7 es marcadamente mayor al del resto de las líneas (Figura 42 A).

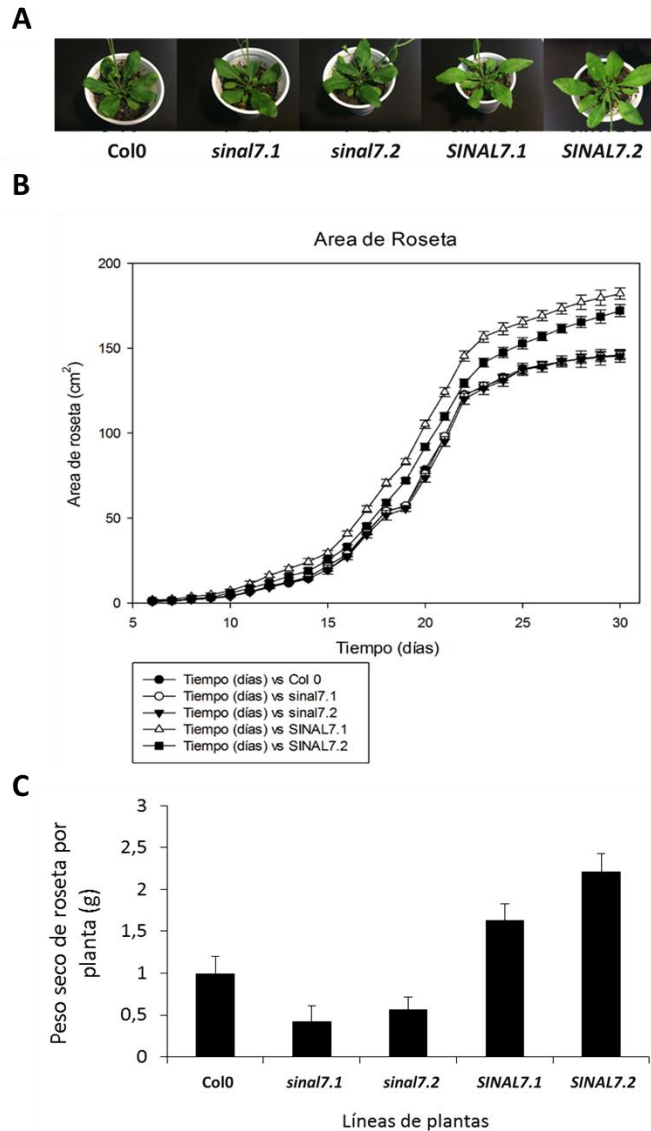


Figura 42. Análisis del área y peso seco de la roseta. Se determinó el área y el peso seco de la roseta de plantas Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, SINAL7.1 y SINAL7.2 mediante el análisis de las imágenes fotográficas tomadas de la roseta (A) en el programa *ImageJ*. (B) Gráfico de los valores de área de la roseta de las distintas líneas. (C) Gráfico de peso seco de roseta completa por planta de *A. thaliana*. Se evaluó el área y el peso seco de al menos 10 rosetas completas de plantas de cada una de las líneas y se analizaron mediante un test estadístico de ANOVA donde las diferencias significativas estadísticamente ($p < 0.5$) ocurren a partir del día 11 en el caso del área de la roseta y en todos los casos para peso seco de roseta.

Luego de graficar los valores obtenidos del análisis del área de las rosetas de las distintas líneas de plantas mediante el programa *ImageJ* [97], se observa que la misma es significativamente mayor (20 a 25%) en las plantas sobreexpresantes en comparación con las plantas Col0 y ambas líneas mutantes homocigotas *signal7* (figura 42 B). El área de la roseta de las líneas mutantes y tipo salvaje no muestran diferencias significativas entre sí. Para el análisis del peso seco de la roseta de las distintas líneas, se secaron por 48 h a 60 °C al menos 10 rosetas completas de cada línea de plantas, se pesaron después del secado y se obtuvo el parámetro de peso seco. Se observó un incremento de aproximadamente el doble en el peso seco de la roseta de plantas sobreexpresantes *SINAL7*, en plantas de 28 días en comparación con Col0 (Figura 42 C).

Posteriormente, se analizó si el aumento del área de la roseta de las plantas *SINAL7* era debido a un aumento en el número de hojas, cuantificando las mismas. En este experimento, se usaron las mismas plantas del experimento previo (determinación del área de la roseta) y, para esto, se contó el número de hojas de la roseta desde la germinación y a lo largo del desarrollo de la misma hasta el día 27 post-germinación.

Como muestra la Figura 43, no hay diferencias significativas en el número de hojas de roseta de las plantas mutantes *signal7* comparado con las plantas Col0 a lo largo del experimento. Por el contrario, sí se observa un aumento estadísticamente significativo del número de hojas de roseta en las plantas sobreexpresantes comparado con plantas Col0 o deficientes *signal7* a partir del día 15. En las plantas *SINAL7*, el aumento del número de hojas de roseta es de aproximadamente del 14% (día 15 post-germinación) y este parámetro se va incrementando paulatinamente a lo largo del experimento hasta llegar a un valor del 30% (día 27 post-germinación).

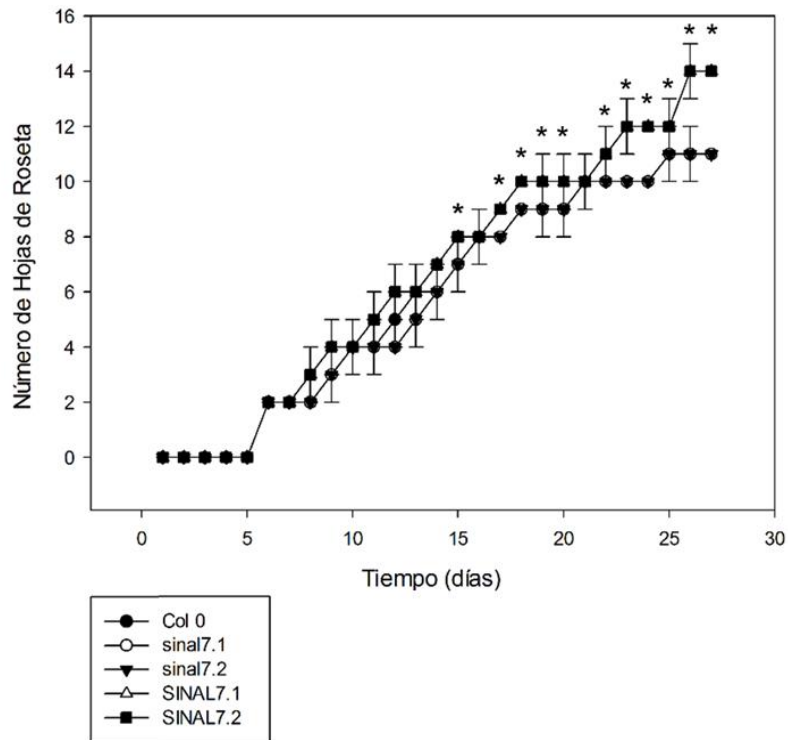


Figura 43. Análisis número de hojas de la roseta. Gráfico de los valores del número de hojas de la roseta de las distintas líneas. Se determinó el número de hojas de la roseta de plantas Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. Se contó el número de hojas de roseta de al menos 10 rosetas completas de cada una de las líneas y los valores obtenidos se analizaron mediante un test estadístico de ANOVA donde las diferencias significativas estadísticamente ($p < 0.5$) se señalan con un asterisco (*).

Posteriormente evaluamos el número de hojas caulinares en todas las líneas descritas previamente. Los resultados indicaron un incremento en el número total de las mismas por planta a lo largo del experimento (0 a 27 días post-germinación) en las plantas sobreexpresantes de *SINAL7* comparados con las líneas Col0 y *sinal7* (Figura 44). Además, las hojas caulinares en plantas sobreexpresantes emergen dos días antes (día 18) comparado con las plantas Col0 y *sinal7* (día 20). A partir de la aparición de las hojas caulinares, el incremento observado en las plantas *SINAL7* va en ascenso a lo largo del experimento. No se observaron diferencias significativas entre las plantas Col0 y *sinal7* en relación al número de hojas caulinares.

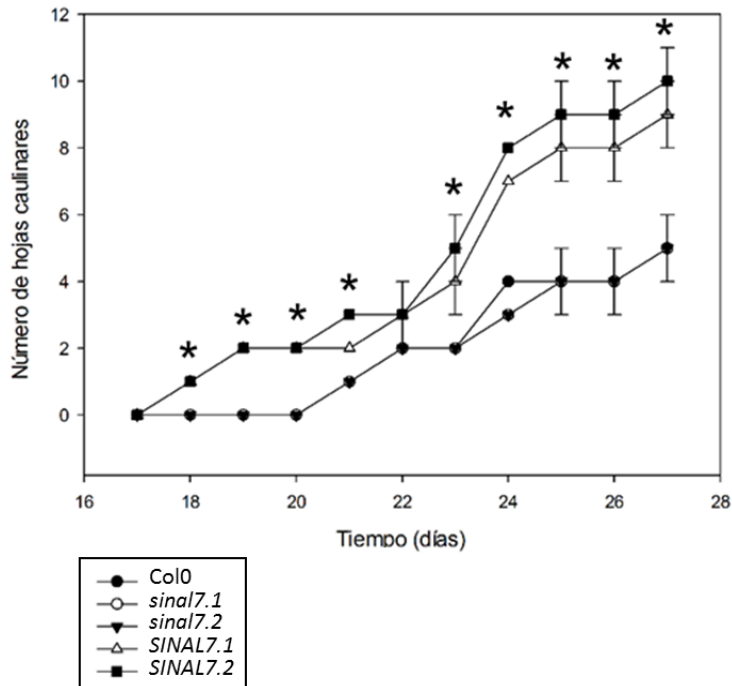


Figura 44. Análisis número de hojas caulinares. Gráfico de los valores del número de hojas caulinares de las distintas líneas. Se determinó el número de hojas caulinares de plantas Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, SINAL7.1 y SINAL7.2. Se contó el número de hojas caulinares de al menos 10 plantas de cada una de las líneas y los datos obtenidos se analizaron mediante un test estadístico de ANOVA donde las diferencias significativas estadísticamente ($p < 0.5$) se señalan con un asterisco (*).

En resumen, se observó un incremento del área de la roseta de las plantas sobreexpresantes a partir del día 11 post-germinación que continúa progresivamente a lo largo del desarrollo (al menos hasta el día 27), comparado con las plantas tipo salvaje (Figura 42). El incremento en el área de la roseta, podría deberse a hojas más grandes y/o un mayor número de hojas de la misma. Del análisis del número de hojas de roseta (Figura 43), se observa que existe un incremento de las mismas a partir del día 15 post-germinación. Teniendo en cuenta que el aumento del área en la roseta es a partir del día 11 post-germinación, podemos concluir que se estarían dando ambas situaciones en simultáneo, mayor tamaño y mayor número de hojas que influyen en el aumento del área de la roseta en las plantas SINAL7. Además en el análisis del peso seco de la roseta por planta en las distintas líneas se observó un incremento en el peso seco de la roseta de las plantas sobreexpresantes comparado con Col0. Además, las plantas SINAL7 muestran un mayor número de hojas caulinares (Figura 44), a lo largo de

su desarrollo comparado con plantas del tipo salvaje y un mayor diámetro del tallo.

- La influencia de SINAL7 en la senescencia

No se detectó la aparición del amarilleo característico del comienzo de la senescencia en las plantas *SINAL7* en el estadio 6.9 [109] comparado con plantas Col0 y mutantes *signal7*. Se realizó el análisis mediante la observación macroscópica de la hoja 5 de la roseta de las distintas líneas. Los resultados mostraron que las hojas de plantas *SINAL7* se mantuvieron completamente de color verde en comparación con las otras líneas (Figura 45).

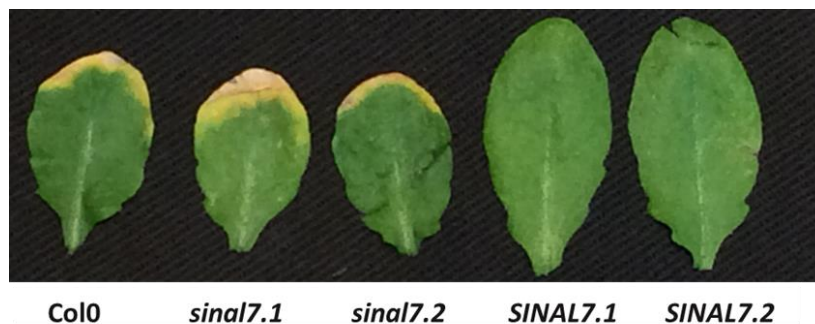


Figura 45. Hojas *A. thaliana* en proceso de senescencia. Imagen fotográfica de la hoja 5 de plantas 42 días de *A. thaliana* Col0, *signal7.1*, *signal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*.

El proceso de senescencia de las hojas es una secuencia de sucesos degradativos que conllevan la re-movilización de nutrientes y la eventual muerte de las hojas. Este proceso está altamente regulado e involucra declinación fotosintética, degradación de proteínas, peroxidación lipídica y degradación de clorofila [129]. Los niveles de ARN total caen durante senescencia por el incremento en la actividad ARNasa [130]. Los cloroplastos son unos de los primeros sitios de catabolismo, mientras que la mitocondria se mantiene intacta hasta el final en el proceso de senescencia para que la respiración continúe [129]. Las hormonas están involucradas en la regulación del proceso de senescencia, con las citoquininas demorando la

senescencia, el etileno modulando el tiempo de la senescencia y otras hormonas cumpliendo roles menos prominentes [129].

La senescencia de las hojas, como otros procesos de desarrollo, está activamente regulada por expresión génica diferencial. Los niveles de transcritos de genes fotosintéticos como *rbcS* (*small subunit of Rubisco*, de sus siglas en inglés) y *cab1* (At1g29930, *chlorophyll ab binding protein 1*, de sus siglas en inglés) disminuyen [131], mientras que otros como los genes asociados a senescencia (SAGs) se activan [132, 133].

Se propuso estudiar entonces los niveles de transcritos del gen *CAB1* por *real time* qPCR. *CAB1* es uno de los genes más caracterizados en la senescencia de *Arabidopsis thaliana*, siendo reportado como un “marcador del progreso”. Se informó que los niveles del transcritos *CAB1* se encuentran elevados durante el desarrollo de las plantas y hasta el comienzo del proceso de senescencia, donde decaen progresivamente [134]. Estos niveles fueron determinados mediante *real time* qPCR sobre ADNc sintetizado a partir de ARN total de hojas de roseta de plantas de 42 días de *A. thaliana* Col0, *sin17.1*, *sin17.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2* usando cebadores específicos (ver Materiales y métodos). Las determinaciones de los niveles de transcritos fueron relativizados a la expresión del gen *ACTINA2* (control interno normalizador).

Como muestra la Figura 46, se observó una disminución de los niveles del ARNm *CAB1* en las hojas de las plantas mutantes *sin17* comparado con Col0, indicando un mayor progreso en la senescencia. En concordancia con la falta de amarilleo en plantas *SINAL7*, los niveles de *CAB1* en estas líneas se encuentran aumentados alrededor de 2 veces respecto a los niveles en las plantas Col0, indicando un retraso de la senescencia en estas plantas.

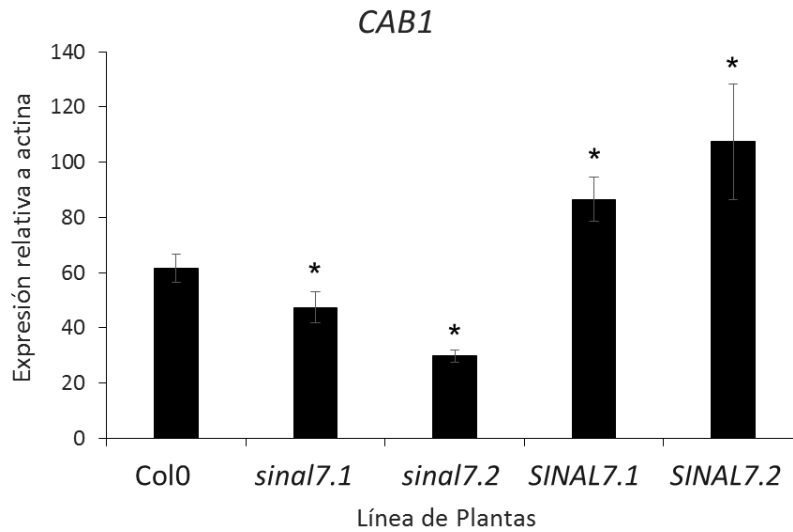


Figura 46. Niveles de transcripto de *CAB1* determinados por *real time qPCR*. Determinación de los niveles de transcritos del gen *CAB1* (At1g29930) relativos al gen control *ACTINA2* (At3g18780) en hojas de plantas de *A. thaliana* Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. Los datos representan al menos tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas determinadas usando un test de t, $p < 0.05$, se representan con un asterisco (*).

Teniendo en cuenta la ausencia de amarilleo en las hojas y los elevados niveles de *CAB1* nos preguntamos cómo se encontrarían los niveles de clorofilas en las distintas líneas de plantas. Se cuantificaron entonces los niveles de clorofila a y b en las hojas de roseta de plantas de las tres líneas, como se describe en Materiales y métodos. Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas en los niveles de clorofilas a y b en las plantas mutantes *sinal7* comparados con Col0; en contraste, se observó un incremento de aproximadamente 2 veces en los valores de ambas clorofilas en las plantas *SINAL7* respecto a las líneas tipo salvaje (Figura 47).

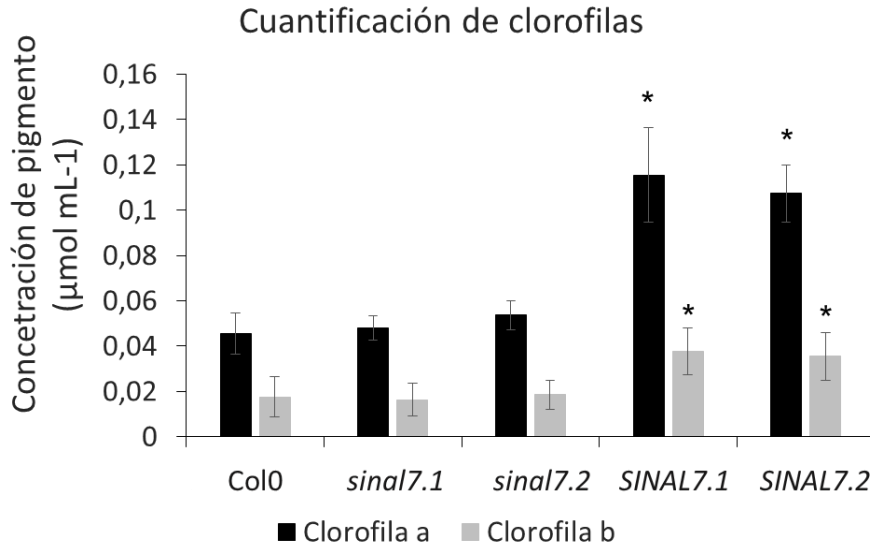


Figura 47. Niveles de clorofila a y b en plantas. Cuantificación de los niveles de clorofilas a y b en hojas de roseta de plantas de 42 días de *A. thaliana* Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. Los datos representan al menos tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas usando un test de t, $p < 0.05$, se representan con un asterisco (*).

De esta manera, se obtuvo evidencia que apoya los resultados observados de los niveles de transcritos de *CAB1*, indicando que, de acuerdo con los parámetros determinados, el progreso de la senescencia en las plantas sobreexpresantes *SINAL7.1* y *7.2* se encuentra retrasado.

Con el objetivo de ampliar los estudios sobre el proceso de senescencia, se analizaron los niveles de transcritos de diversos genes asociados al proceso de senescencia (*SAGs*, *senescence associated genes*) como *SAG12*, *SAG17* y *SAG101* (Figura 48).

SAG12 (At5g45890) codifica para una cisteína proteasa que ha sido propuesta como marcador molecular de senescencia ya que no responde a estímulos de estrés, sino solo al envejecimiento de las plantas. Los niveles de transcritos de *SAG12* aumentan notablemente y de manera repentina en senescencia [134].

SAG17 (MIT1, At1g07600) codifica para una proteína de unión a metales que aumenta los niveles de su ARNm progresivamente hacia la senescencia y responde a diferentes condiciones de estrés [134].

SAG101 (At5g14930) codifica para una acil-hidrolasa. Mientras que aquellas plantas silenciadas en este gen demoran la senescencia 4 días, se ha determinado que la sobreexpresión de *SAG101* provoca senescencia precoz [135].

Por otra parte, se estudiaron también los niveles ARNm de otros genes que participan en la senescencia como *WRKY6*, *BFN1* y *PPH*.

WRKY6 (At1g62300) es un factor de transcripción cuyos niveles de transcriptos aumentan notablemente en senescencia. Está asociado al envejecimiento y también a la respuesta al ataque por patógenos [136].

BFN1 (At1g11190, *bifunctional nuclease 1*) es una nucleasa que incrementa sus niveles de transcripción durante la senescencia. No se detecta su inducción en raíces y hojas no senescentes [137].

PPH (At5g13800, *pheophytinase*), codifica para una hidrolasa inducida en senescencia, que cataliza la defitilización de clorofila libre de magnesio (feofitina) dando como producto feoforbido [138].

Mecanismos de señalización retrógrada mitocondrial (RRM) en plantas

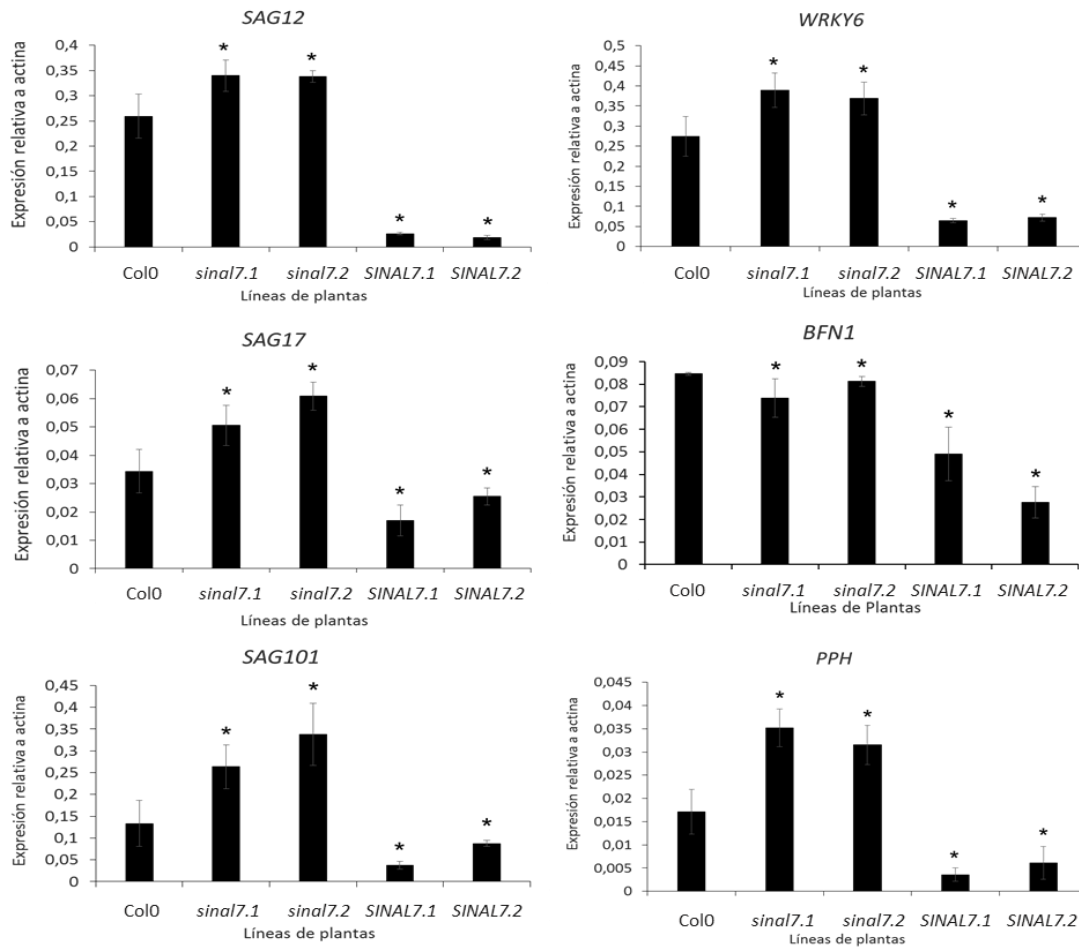


Figura 48. Niveles de transcritpo determinados por *real time* qPCR de genes relacionados con la senescencia en *Arabidopsis*. Determinación de los niveles de transcritpos de los genes *SAG12* (At5g45890), *SAG17* (At1g07600), *SAG101* (At5g14930), *WRKY6* (At1g62300), *BFN1* (At1g11190) y *PPH* (At5g13800) relativos al gen control *ACTINA2* (At3g18780) en hojas de plantas de *A. thaliana* Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. Los datos representan al menos tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas determinadas usando un test de t, $p < 0.05$, se representan con un asterisco (*).

En el análisis de genes asociados a senescencia (Figura 48) se observó que los tres genes estudiados (*SAG12*, *SAG17* y *SAG101*) presentan valores incrementados de los transcritpos en las plantas mutantes *sinal7* comparado con Col0, señalando un progreso más avanzado de la senescencia. En contraposición, los niveles de transcritpos para estos genes se encuentran disminuidos (aproximadamente un 90% en el caso de *SAG12* y un 50% en el caso de *SAG17* y *SAG101*) en las plantas sobrepresantes de *SINAL7*, indicando que el proceso de senescencia se encuentra retrasado comparado con plantas Col0. Además, en concordancia con los resultados obtenidos para los genes asociados a senescencia, se observó que los

niveles de los ARNm de *WRKY6*, *BFN1* y *PPH* se encuentran disminuidos en las plantas sobreexpresantes, señalando un menor progreso de la senescencia comparado con plantas Col0. En las plantas *sin17* además, se observó un aumento en los niveles de transcritos de *WRKY6* y *PPH* comparado con las plantas Col0. Se observaron diferencias leves en los niveles de transcritos de *BFN1* en plantas *sin17* respecto a las líneas tipo salvaje.

Resumiendo, estos resultados y la caracterización fenotípica de las plantas sobreexpresantes *SINAL7* sugieren que esta proteína participa en el desarrollo vegetativo de la plantas y en el proceso de senescencia, disminuyendo su progreso en plantas sobreexpresantes y favoreciéndolo cuando *SINAL7* se encuentra ausente. Es interesante remarcar que la deficiencia de *SINAL7* no tendría efecto sobre algunos parámetros del desarrollo vegetativo determinados en las plantas, como el diámetro del tallo, el área de la roseta, el número de hojas de roseta y caulinares. Esta ausencia de cambios en determinados parámetros en las plantas *sin17* podría deberse a que alguno de los homólogos de *SINAL7* podrían estar cumpliendo un efecto compensatorio de su función. Esta conclusión estaría apoyada por los perfiles de expresión de los ARNm de *SINAL7* en los distintos órganos en *Arabidopsis* (Figura 28), donde los niveles de *SINAL7* son mayores en flores y silicuas, no observándose niveles elevados de transcritos en tejidos vegetativos.

- Caracterización de los genes de la familia *SINA* en *Arabidopsis*.
Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

Con el fin de evaluar si la carencia de fenotipo en las plantas *sin17* es debida a algún efecto compensatorio llevado a cabo por alguno de los homólogos de *SINAL7*, se realizó un alineamiento de secuencias utilizando *SINAL7* como molde (Figura 49), seguido de un análisis filogenético (Figura 50) por similitud de secuencia de la familia *SINA* en *A. thaliana*. Posteriormente se analizaron también los niveles de ARNm de estos genes

mediante *real time* qPCR en las distintas líneas de plantas y se compararon sus niveles en las plantas tipo salvaje.

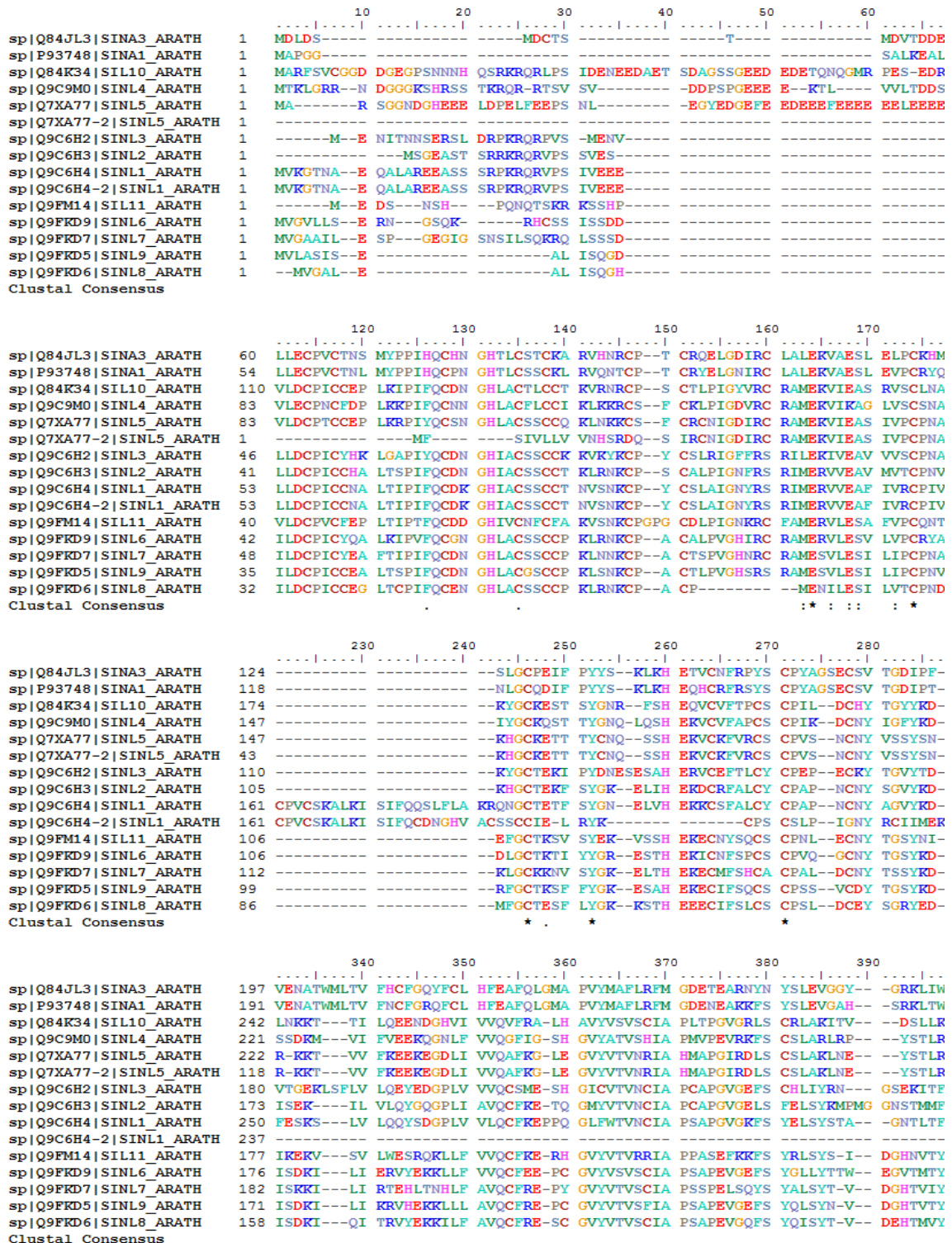


Figura 49. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de proteínas de la familia SINA en *A. thaliana*. El alineamiento de las secuencias de los integrantes de la familia seven in absentia de *A. thaliana* (tabla 9) obtenidos por *PSI-Blast*. El alineamiento se realizó en *Clustal OMEGA* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

En la Figura 49, se muestra el alineamiento (visualizado con el programa *Bio Edit*) [101] de las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por los genes homólogos de SINAL7 en *A. thaliana* que presentan identidad de secuencia mayor al 35 %. En porcentajes menores al 35 % de identidad a SINAL7 de las secuencias analizadas, las posibilidades de complementación en la función de SINAL7 se limitan sólo al dominio RING *finger* (dominio E3 ligasa) y no a la identidad del C-terminal que provee especificidad unión al sustrato en las E3 ligasas de tipo RING. Para esto, se utilizó el programa *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) usando como molde la secuencia de aminoácidos de SINAL7 (ver Materiales y métodos). Las proteínas estudiadas son las codificadas por los genes que se detallan en la tabla 9, donde se muestran los parámetros de longitud e identidad de secuencia, *Score*, y *E-Value* de las secuencias aminoácídicas de las proteínas de la familia SINA encontradas en *A. thaliana*.

Secuencias analizadas en alineamiento con Clustal Omega					
ID	Nombre	Longitud (aa)	Score	Identidad (%)	E-value
At5g37890	SINA-like 7	286	1522	100	1,00E-167
At5g37910	SINA-like 9	276	890	64	3,00E-94
At5g37870	SINA-like 6	281	820	56	4,00E-86
At5g37900	SINA-like 8	263	784	55	6,00E-82
At1g66620	SINA-like 2	313	668	47	2,00E-68
At5g62800	SINA-like 11	314	655	45	5,00E-67
At5g37930	SINA-like 10	349	588	44	3,00E-59
At1g66650	SINA-like 4	329	535	42	4,00E-53
At1g66610.1	SINA-like 1	366	484	32	3,00E-47
At1g66630	SINA-like 3	303	480	35	1,00E-46
At1g66660.1	SINA-like 5	328	461	37	2,00E-44
At1g66660.2	SINA-like 5.2	224	299	36	1,00E-25
At3g61790	SINAT3	326	256	39	1,00E-20
At1g66610.2	SINA-like 1.2	237	253	43	2,00E-20
At2g41980	SINAT1	305	252	39	3,00E-20

Tabla 9. Secuencias analizadas en el alineamiento de las proteínas de la familia SINA en *A. thaliana*. Integrantes de la familia seven in absentia de *A. thaliana* con identidad de secuencia mayor a 35% que fueron usados en el alineamiento de las secuencias

mediante *PSI-Blast*. Como molde se utilizó la secuencia de *SINAL7*. En la tabla se muestran los parámetros de longitud e identidad de secuencia, *Score* y *E-Value* (valor de confianza del alineamiento) del alineamiento realizado en *Clustal OMEGA* con los parámetros por defecto (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Posteriormente, se realizó un análisis filogenético a partir del alineamiento mostrado en la Figura 49 y las secuencias de aminoácidos de los integrantes de la familia *seven in absentia* de la tabla 9, usando el programa MEGA 6.06 [102] (ver Materiales y métodos), con el fin de estudiar además la proximidad de *SINAL7* a todos los integrantes de la familia con identidad mayor al 35%. En la Figura 50, se muestra que *SINAL7* de *A. thaliana* se encuentra compartiendo un clado junto con *SINAL8* (At5g37900), *SINAL9* (At5g37910); y éstos además comparten un clado con *SINAL11* (At5g62800) y *SINAL6* (At5g37870). Además, éstos integrantes de la familia *SINA* son los que mostraron un mayor porcentaje de identidad y *Score* en el alineamiento realizado (Figura 49 y tabla 9). Por otro lado, se observa un solapamiento en la expresión de estos genes durante el desarrollo en los distintos órganos de *Arabidopsis*, teniendo en cuenta los datos de microarreglos de ADNc de dichos genes comparados a *SINAL7* según un análisis bio-informático utilizando la herramienta *Arabidopsis eFP-Viewer* de la universidad de Toronto [128] (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

Teniendo en cuenta que los homólogos a *SINAL7* en *A. thaliana* de mayor identidad y proximidad en el análisis filogenético realizado (Figura 50) se expresan en los mismos tejidos de la planta (aunque a distintos niveles), nos propusimos evaluar la expresión del ARNm de *SINAL6*, *SINAL8*, *SINAL9* y *SINAL11* e investigar si alguno de ellos podría estar contrarrestando la deficiencia de *SINAL7* en las plantas mutantes *signal7*.

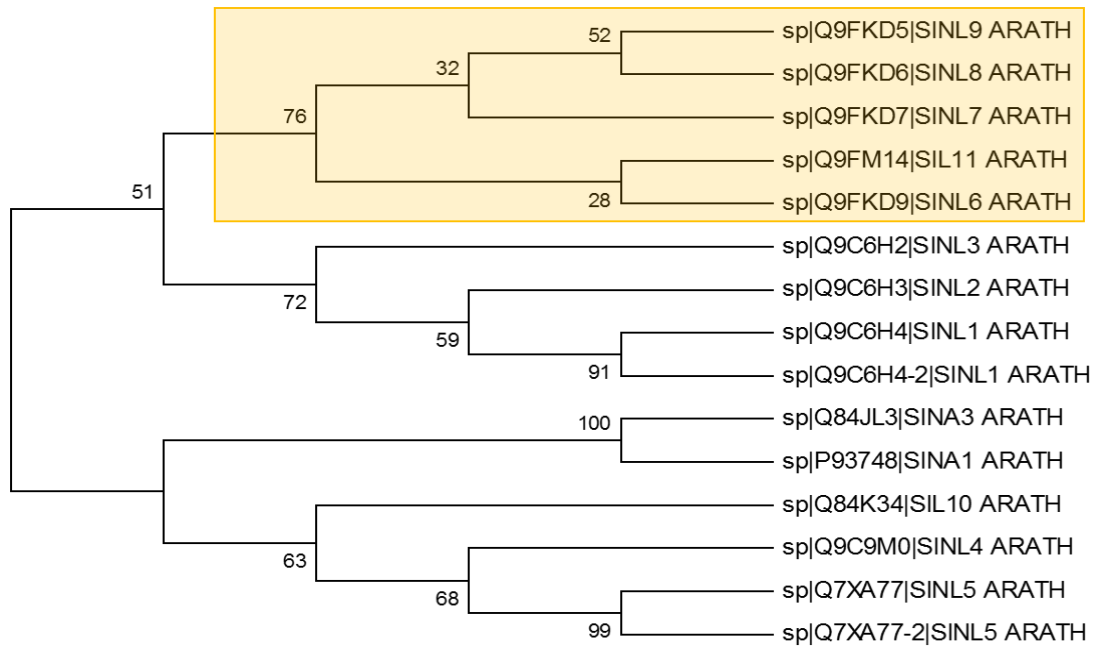


Figura 50. Árbol filogenético de la familia *seven in absentia* de *A. thaliana*. El árbol se basó en el alineamiento de las secuencias de los integrantes de la familia *seven in absentia* de *A. thaliana* (tabla 9) obtenidos por *PSI-Blast*. Se construyó una filogenia inferida por el método de máxima verosimilitud basada en el modelo JTT [103] en el programa MEGA 6.06 [102]. El porcentaje de árboles replicados (500 repeticiones) en el que los taxones asociados fueron agrupados, se muestran junto a las ramas [104].

- Análisis de los niveles de transcritos de homólogos de *SINAL7*

Para este estudio, se extrajo ARN total de hojas de roseta de plantas de 28 días de *A. thaliana* Col0, *signal7.1*, *signal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*, se obtuvo el ADNc y éste fue usado como molde en las reacciones de *real time* qPCR con cebadores específicos para cada gen (Materiales y métodos). Los niveles de transcritos fueron relacionados a la expresión del gen *ACTINA2* (At3g18780) usado como control interno normalizador (ver Materiales y métodos). No se observaron variaciones significativas en los niveles de transcritos de los genes *SINAL8* y *SINAL11* en las líneas de plantas mutantes y sobreexpresantes de *SINAL7* comparando con Col0 (Figura 51). Curiosamente, se observaron incrementos significativos de los niveles de transcritos de *SINAL9* y *SINAL6* en ambas líneas mutantes (*signal7.1* y *signal7.2*) comparando con Col0 (Figura 51).

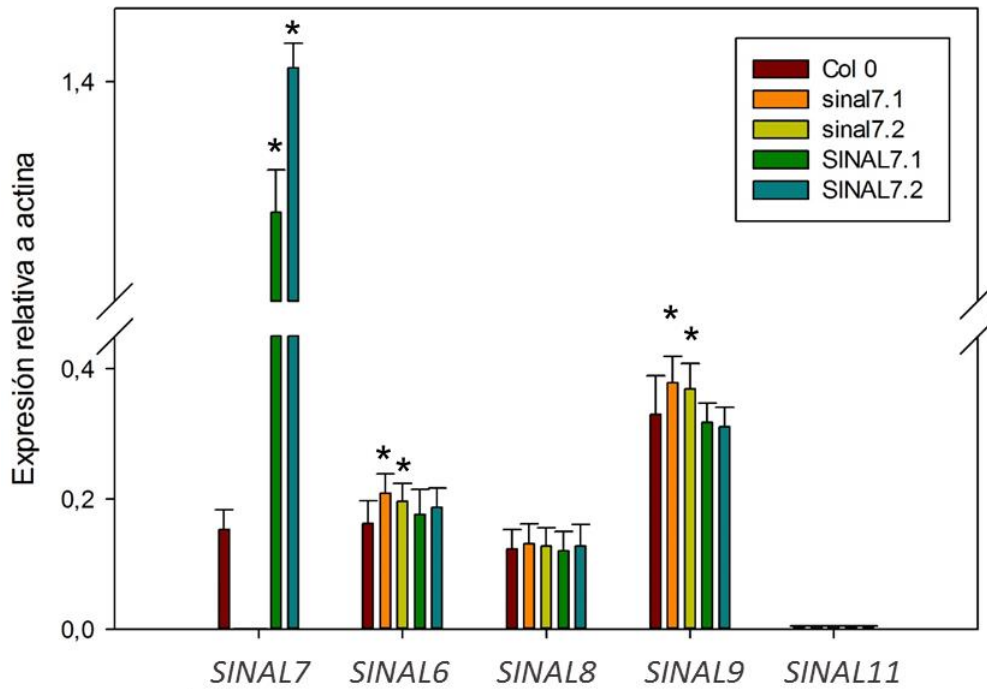


Figura 51. Niveles de transcritos de homólogos de *SINAL7* determinados por *real time qPCR*. Determinación de los niveles de transcritos de los genes de *SINAL7*, *SINAL6*, *SINAL8*, *SINAL9* y *SINAL11* relativos al gen control *ACTINA2* (*At3g18780*) en hojas de roseta de plantas de *A. thaliana* Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. Los datos representan al menos tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas determinadas usando un test de ANOVA ($p < 0.05$) y una prueba de Tukey para múltiples comparaciones, se señalan con un asterisco (*).

De estos resultados concluimos que la ausencia de *SINAL7* altera los niveles de transcritos de *SINAL9* y *SINAL6*, al menos en hojas de plantas de *A. thaliana* sugiriendo la existencia de un efecto compensatorio por parte de alguno o los dos genes (Figura 51). En este sentido, el análisis del ARNm de *SINAL7* en plantas mutantes en los genes mencionados y en plantas dobles o triples mutantes en estos genes (*SINAL7*, *SINAL9* y *SINAL6*) sería de utilidad para comprobar esta hipótesis.

- Estudio de la participación de *SINAL7* en el tiempo de floración y la formación y desarrollo de los órganos reproductivos de *Arabidopsis*. Análisis del número de piezas florales, de silicuas y de la viabilidad del polen.

El paso de la fase vegetativa a la fase reproductiva es un evento importante en la vida de las plantas, donde la floración está modulada por el medio

ambiente, factores endógenos y su propio programa de desarrollo. Este parámetro (floración) puede ser un buen indicador del estado de estrés de la planta. En condiciones normales de crecimiento y de día largo, plantas de *A. thaliana* del ecotipo Columbia florecen dentro de las 3 a 4 semanas [105, 109]. Con estos antecedentes y habiendo observado preliminarmente cambios en las líneas de plantas estudiadas, nos propusimos realizar una caracterización de parámetros reproductivos que nos permitan entender el rol de SINAL7 en este contexto.

Trabajamos con grupos de 10 plantas de cada línea crecidas bajo condiciones de día largo (ver Materiales y métodos). El tiempo de floración fue determinado como fue descrito previamente por Koornneef y colaboradores [105] (ver Materiales y métodos). La tabla 10 muestra el número de días, hojas de roseta y caulinares en el momento de la floración para cada línea de plantas estudiada.

Tiempo de Floración	Col 0	<i>signal7.1</i>	<i>signal7.2</i>	<i>SINAL7.1</i>	<i>SINAL7.2</i>
Días	22 ± 1	21 ± 1	21 ± 1	18 ± 1*	18 ± 1*
N° de Hojas de roseta	10	10	10	10	10
N° de Hojas caulinares	1	1	1	1	1

Tabla 10. Análisis del tiempo de floración en plantas de *A. thaliana*. Tabla que presenta los valores de días, número de hojas de roseta y caulinares en el análisis del tiempo de floración en plantas de *A. thaliana* Col0, *signal7.1*, *signal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. Se analizaron al menos 10 plantas y los datos se analizaron con un test estadístico de ANOVA donde las diferencias significativas con Col0 ($p < 0.05$) se señalan con una asterisco (*).

Del análisis del tiempo de floración se observa que las plantas sobreexpresantes florecen cuatro días antes comparado con plantas *mutantes* sugiriendo que podría estar produciéndose una entrada temprana en la etapa reproductiva de las plantas SINAL7 (tabla 10). Por el contrario, el número absoluto de hojas de roseta y caulinares en las plantas no varía hasta el comienzo de la floración. Este dato resulta interesante, ya que en las plantas sobreexpresantes de SINAL7 no se estaría cumpliendo el hecho de que una floración temprana ocurra en detrimento de la etapa vegetativa, como ocurre generalmente [109], que como se observa en la Figura 43, las

plantas sobreexpresantes presentan mayor número de hojas a medida que avanza su desarrollo.

Se determinó el número de piezas florales del ramillete de flores del ápice en el tallo principal de plantas de 30 días de *A. thaliana* Col0, *signal7.1*, *signal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2* (ver Materiales y métodos). Se analizaron los ramilletes de al menos 10 plantas para cada una de las líneas. Se contó el número de piezas florales y se realizó una representación gráfica de los valores obtenidos (Figura 52). La Figura 52 A muestra las diferencias morfológicas en los ramilletes de flores de las líneas sobreexpresantes (Figura 52 A). Luego del análisis cuantitativo (Figura 52 B), determinamos que las plantas *SINAL7* presentan aproximadamente 3 veces más botones florales por ramillete que las plantas Col0 y las mutantes *signal7*. No se observaron diferencias significativas en el número de piezas florales de los ramilletes de las plantas mutantes *signal7* comparando con Col0.

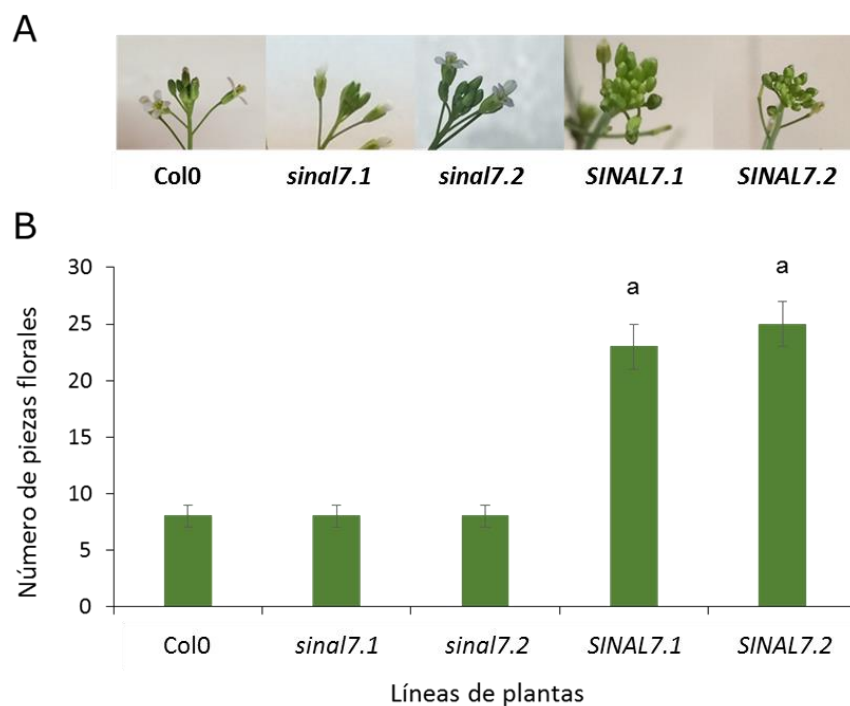


Figura 52. Análisis del número de piezas florales. Se determinó el número de piezas florales del ramillete principal de plantas Col0, *signal7.1*, *signal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. (A) Imágenes fotográficas representativas de los ramilletes de cada línea. (B) Gráfico de los valores de piezas florales en las distintas líneas. Se evaluó el área de al menos 10 ramilletes de flores de cada una de las líneas y se analizaron mediante un test estadístico de ANOVA donde las diferencias significativas estadísticamente ($p < 0.5$) se representan con una letra minúscula por encima de la barra en cada caso.

Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de *SINAL7* afecta el número de piezas florales en las plantas, se analizó el número de silicuas totales por planta en las distintas líneas (ver Materiales y métodos). En este análisis, se determinó el número de silicuas totales por planta en 12 plantas en estadio 6.9 (estadio donde la florescencia termina y maduran las silicuas) [109] de *Arabidopsis Col0*, *signal7.1*, *signal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. Los datos de todas las líneas fueron sometidos a un test estadístico de ANOVA como se detalla en Materiales y métodos. En la tabla 11, se muestran los valores finales de silicuas totales, silicuas normales y silicuas aberrantes para cada línea. La clasificación de silicuas normales y silicuas aberrantes fue realizada en base a la una notoria diferencia de estos órganos en las poblaciones analizadas (Figura 53 A).

	Silicuas totales	Silicuas normales	Silicuas aberrantes
Col 0	153 ± 24	149 ± 22	5 ± 2
signal7.1	123 ± 20	109 ± 16	14 ± 4
signal7.2	130 ± 15	115 ± 12	16 ± 3
SINAL7.1	293 ± 52	51 ± 8	242 ± 44
SINAL7.2	321 ± 69	5 ± 2	316 ± 68

Tabla 11. Análisis de las silicuas en plantas de *A. thaliana*. Tabla que presenta los valores de número de silicuas totales, silicuas normales y silicuas aberrantes en plantas en estadio 6.9 de *A. thaliana* Col0, *signal7.1*, *signal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. Se analizaron al menos 12 plantas de cada línea.

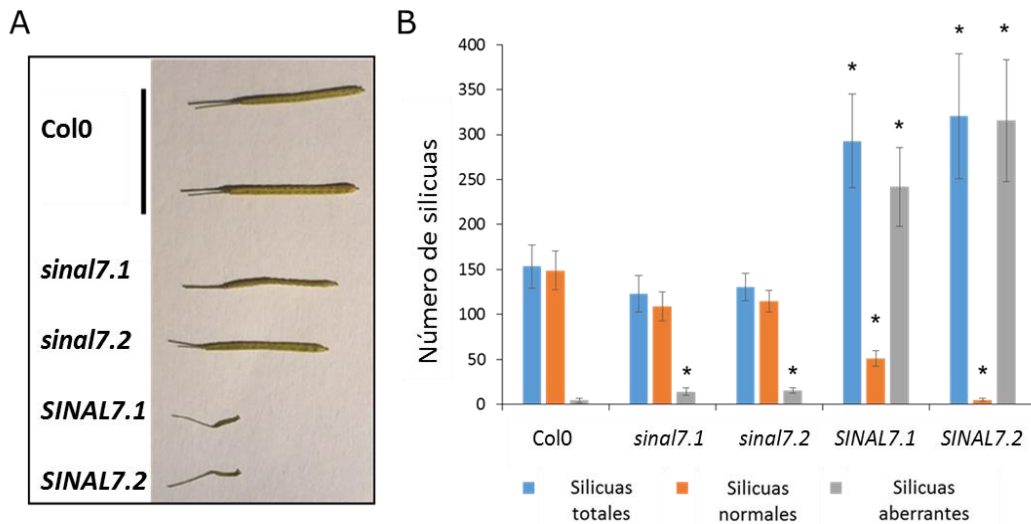


Figura 53. Análisis de las silicuas. Se determinó el número de silicuas totales, silicuas normales y silicuas aberrantes en plantas en estadio 6.9 de *A. thaliana* Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. (A) Imagen fotográfica representativa de las silicuas de cada línea. (B) Gráfico del número de silicuas totales, normales y aberrantes en las distintas líneas. Se analizó el número de silicuas de al menos 12 plantas de cada una de las líneas y se analizaron mediante un test estadístico de ANOVA donde las diferencias significativas estadísticamente ($p < 0.5$) se representan con un asterisco (*).

En el análisis de las silicuas se observó que las plantas sobreexpresantes *SINAL7* presentan un aumento de aproximadamente 3 veces del número total de silicuas comparado con plantas Col0 y *sinal7*. Este resultado no es raro, teniendo en cuenta que las plantas *SINAL7* también mostraron un incremento comparable en el número de piezas florales del ramillete principal, sugiriendo que las plantas *SINAL7* estarían reproductivamente más beneficiadas respecto a las líneas Col0 y *sinal7*. Sin embargo, el análisis de las silicuas mostró un incremento en el número de silicuas aberrantes (83% a 98%) y una caída obligada del número de silicuas normales que varió entre sólo el 2 al 17% del total de las silicuas en las líneas sobreexpresantes. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de silicuas totales entre las líneas Col0 y mutantes *sinal7*, pero estas últimas presentan aproximadamente un 10% más de silicuas aberrantes respecto a la tipo salvaje. Estos resultados sugieren que los niveles de *SINAL7* tendrían una fuerte influencia en el correcto desarrollo de las silicuas.

Considerando que la variación de los niveles de SINAL7 en las plantas produce cambios en la floración y el desarrollo de las silicuas, nos propusimos investigar el desarrollo de las semillas. Para ello, se analizó el número de semillas totales por planta en las distintas líneas bajo estudio y su capacidad de germinación (ensayada en placa). Además se clasificaron como normales o aberrantes según su morfología, como se muestra en la Figura 54 A. Los valores de semillas totales, normales, aberrantes y viables (con capacidad de germinar) en las distintas líneas se muestran en la tabla 12. En este análisis, se contó el número de semillas de todas las silicuas en 4 de las 12 plantas (de cada línea) usadas en el análisis de las silicuas.

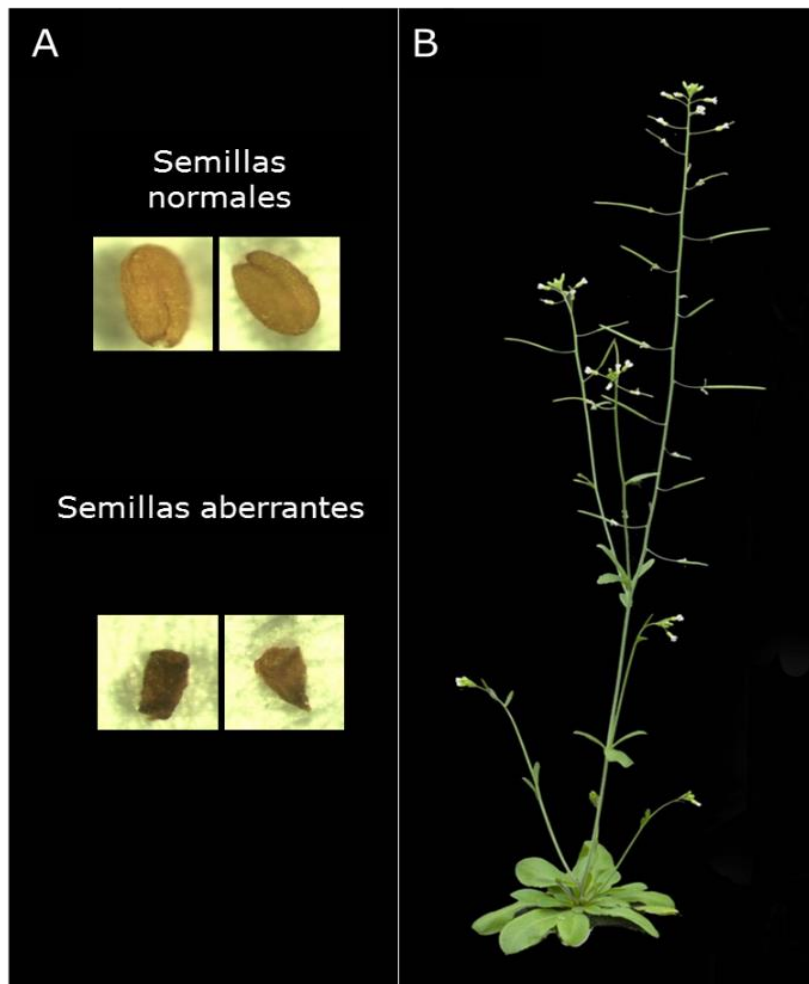


Figura 54. Estudio de las semillas en *A. thaliana*. A - Imágenes de la clasificación de semillas viables o no viables. B - Imagen de planta de *A. thaliana* en el estudio de las semillas. Se estudió del número de semillas en cada línea de plantas de *A. thaliana* Col0, sinal7.1, sinal7.2, SINAL7.1 y SINAL7.2.

La cantidad de semillas por planta (de cada línea, analizada en el estudio de las silicuas) se analizó estadísticamente mediante un test de ANOVA y una prueba de Tukey para comparaciones múltiples. De esta manera, se analizó la población de semillas de las plantas de *Arabidopsis* Col0, *signal7.1*, *signal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*, representados en la tabla 12 y la figura 55.

	Semillas totales	Semillas normales	Semillas aberrantes	% de germinación (semillas viables)
Col 0	8409 ± 154	8166 ± 139	243 ± 15	97,1 ± 1,6
<i>signal7.1</i>	4003 ± 117	3547 ± 94	456 ± 23	88,6 ± 2,3
<i>signal7.2</i>	5033 ± 94	4431 ± 75	602 ± 18	88,0 ± 1,5
<i>SINAL7.1</i>	6915 ± 276	1208 ± 44	5706 ± 232	17,5 ± 0,6
<i>SINAL7.2</i>	5849 ± 243	91 ± 6	5758 ± 237	1,6 ± 0,1

Tabla 12. Análisis de las semillas en plantas de *A. thaliana*. Tabla que presenta los valores de número de semillas totales, semillas normales, semillas aberrantes y % de germinación (semillas viables) en plantas en estadio 6.9 de *A. thaliana* Col0, *signal7.1*, *signal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. Se analizaron al menos 4 plantas de cada línea.

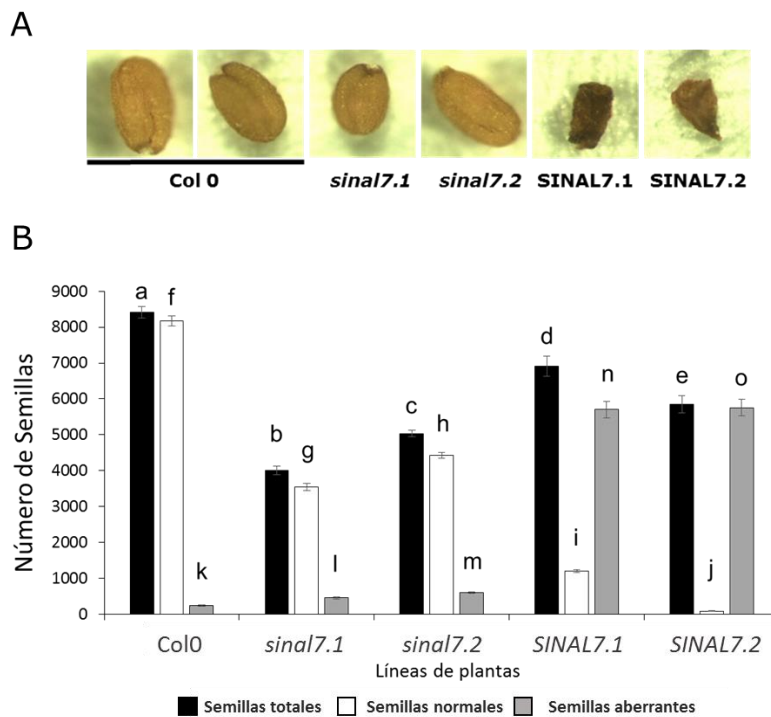


Figura 55. Análisis de las semillas de las diferentes líneas. Se determinó el número de semillas totales, semillas viables y semillas no viables en plantas de *A. thaliana* Col0, *signal7.1*, *signal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2* como se describe en Materiales y métodos. (A) Imagen fotográfica representativa de las semillas de cada línea. (B) Gráfico del número de semillas totales, viables y no viables en las distintas líneas. Los datos del análisis de los número de semillas para cada una de las líneas se analizaron mediante un test estadístico de ANOVA seguido de una test de Tukey donde las diferencias significativas estadísticamente ($p < 0.05$) se representan con una letra minúscula por encima de la barra en cada caso.

En el estudio de las semillas se observó una disminución en la producción de semillas totales en las plantas mutantes *sin17* y sobreexpresantes *SINAL7* de aproximadamente 45% y 30% respectivamente, comparando con Col0 (figura 55). Existe una disminución de aproximadamente el 10% en el porcentaje del número de semillas viables morfológicamente normales en las líneas *sin17* comparando con Col0, que incrementa el porcentaje del número de semillas aberrantes en estas líneas a 10% comparado con Col0 (3%, aproximadamente). Este efecto se ve marcadamente aumentado en las plantas que sobreexpresan *SINAL7*, en donde sólo el 17% de las semillas totales son capaces de germinar comparado con el 97% de Col0. De esta manera, alrededor del 80% de las semillas son aberrantes en plantas *SINAL7*.

En la Figura 56 se muestra una foto representativa del tipo de semillas y silicuas que predominan en las distintas líneas de plantas. Podemos concluir con estos resultados que *SINAL7* influye notoriamente en el desarrollo de las silicuas y las semillas en las plantas, generando plantas que producen semillas aberrantes cuando *SINAL7* se sobreexpresa.

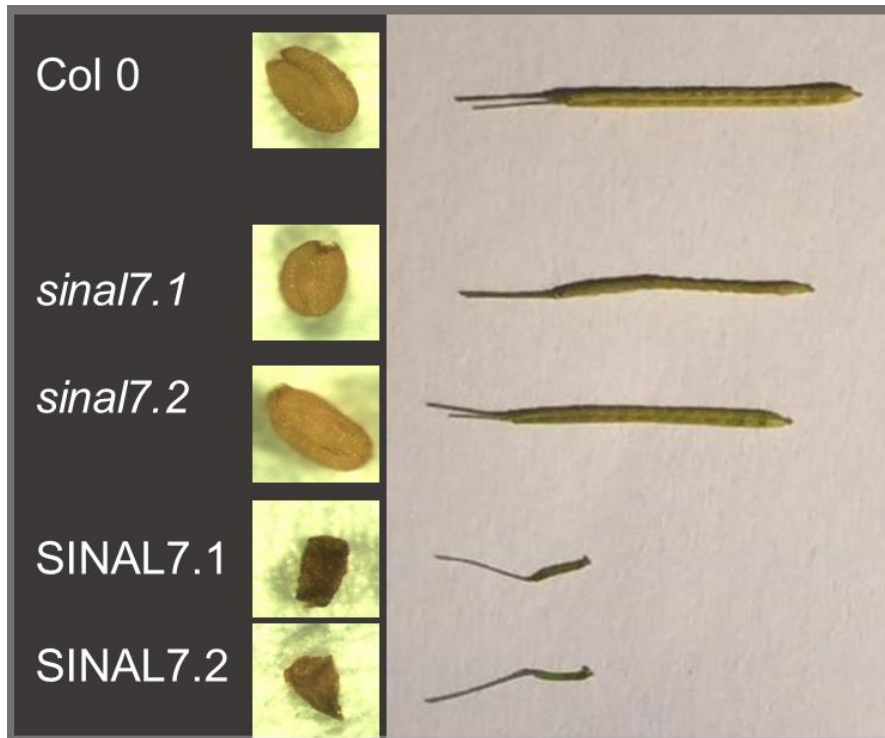


Figura 56. Foto representativa de las silicuas y semillas encontradas en las diferentes líneas de plantas. Figura que incluye imágenes de semillas y silicuas representativas de plantas de *A. thaliana* Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*.

Por último, y teniendo en cuenta que las plantas sobreexpresantes presentan silicuas y semillas aberrantes, indicativo de un desarrollo anormal de los frutos, nos propusimos investigar si la viabilidad del polen y/o la elongación del tubo polínico se encontraba afectada, según fue descrito previamente por Hicks y colaboradores en 2004) [110] Mediante el análisis de imágenes tomadas en microscopio óptico de granos de polen luego de su incubación con la solución de elongación (Figura 57 A), se determinó el número de tubos polínicos emergidos en cada caso y se estimó el porcentaje de germinación (granos de polen que logran elongar el tubo polínico), como se muestra en la Figura 57 B.

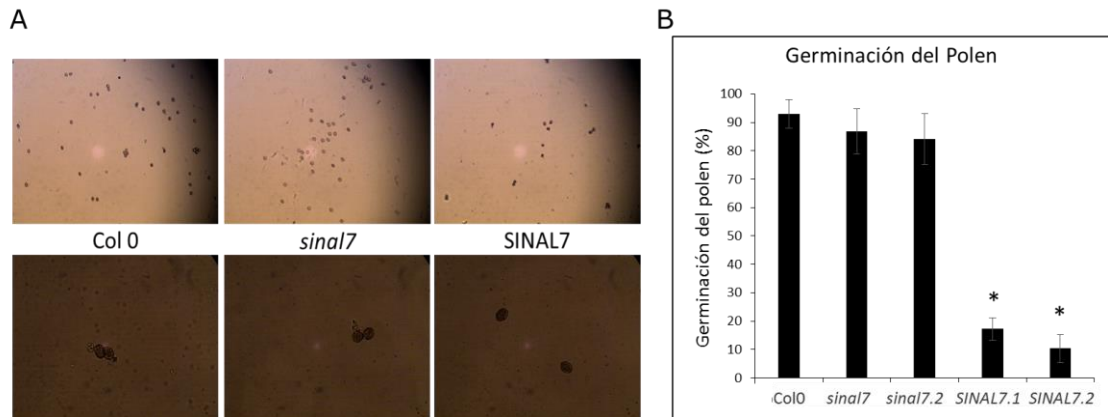


Figura 57. Germinación del grano de polen. **A** – Imágenes representativas de las tomadas en microscopio óptico (objetivos 10X, arriba y 40X, abajo) que muestran los tubos polínicos analizados de plantas de *A. thaliana* Col0, *sinal7* y *SINAL7*. Los experimentos se realizaron por triplicado, los datos fueron analizados mediante un test de t de Student y los porcentajes estimados de germinación del polen (elongación del tubo polínico) se muestran en el gráfico (**B**). Las diferencias estadísticamente significativas con Col0 se representan con un asterisco (*) por encima de la barra en cada caso.

Como muestra la Figura 57, el porcentaje de germinación de los granos de polen de plantas *SINAL7* disminuye aproximadamente un 90% respecto a las plantas tipo salvaje. No hay diferencias significativas en el porcentaje de germinación de los granos de polen de las plantas mutantes *sinal7*. Podemos decir entonces que las plantas *SINAL7* presentarían un fenotipo de macho-esterilidad influenciado por la sobreexpresión de *SINAL7* que impide la germinación del grano de polen, en concordancia con la producción de silicuas anormales y semillas no viables.

- Análisis molecular de genes que afectan el desarrollo de silicuas y semillas

El fruto es un órgano especializado, que proporciona un entorno adecuado para la maduración de la semilla y, a menudo, los mecanismos de dispersión. Los frutos secos o cápsulas, sufren dehiscencia que es un proceso complejo y altamente organizado. El desarrollo progresivo de los frutos debe coordinarse con el de semillas contenidas y culmina con la apertura o rompimiento de las cápsulas (dehiscencia) que permite la dispersión de las mismas [139]. Las cápsulas de las crucíferas (*Arabidopsis*) constan de 2 carpelos unidos, divididos por un tabique falso y se denominan silicuas. Los carpelos unidos se convierten en las valvas que están unidas

con dos replum que bordean el tabique; las semillas están unidas al tabique por funículos [139].

Por otro lado, la germinación de las semillas representa un rasgo ecológico y agronómico clave y, como tal, está muy regulado por estímulos, tanto internos (programas de desarrollo y fitohormonas) como externos (luz, temperatura, sequía), que determinan el estado de latencia y el potencial de germinación (definido como el porcentaje final de germinación) [140-142]. El desarrollo de las semillas de plantas superiores se divide en dos fases principales: el desarrollo del embrión y del endosperma (o morfogénesis); y la maduración de la semilla [143, 144]. La embriogénesis comienza con la formación de un cigoto de una sola célula y termina en la etapa de corazón, cuando todas las estructuras del embrión han sido formadas. Posteriormente, cursa una fase de crecimiento en la cual el embrión llena el saco embrionario. En el final de la fase de crecimiento del embrión, la división celular en el embrión se detiene [145] y este es el momento en que la semilla entra en la fase de maduración. La maduración se inicia con una fase de transición durante el cual ocurre el cambio de control maternal al filial [146]. La semilla comienza un período de crecimiento del embrión y de llenado. La latencia se inicia temprano durante la maduración de la semilla y aumenta hasta que la semilla está plenamente desarrollada [145]. La maduración de la semilla ha concluido cuando los compuestos de almacenamiento se han acumulado, el contenido de agua ha disminuido, los niveles de ABA están aumentados, y la tolerancia a la desecación y la latencia primaria se establecen [140].

Debido al origen ontogenético de los tejidos del fruto diferenciado, se pensó que ciertos genes MADS box podrían desempeñar un papel importante en el establecimiento de su identidad [147]. En uno de los primeros trabajos publicados en la temática [148], se aisló una mutación que bloquea la elongación de la silicua en *Arabidopsis* después de la fertilización (FUL). Tanto la expansión celular y la diferenciación de las valvas del carpelo se ven afectadas. La caracterización molecular de los mutantes reveló que la mutación de pérdida de función era en el gen AGL8, desde ese momento llamado FUL [149, 150].

Debido al fenotipo obtenido de silicuas aberrantes, decidimos analizar los niveles de transcritos de genes involucrados en el proceso de floración, dehiscencia y desarrollo del fruto y a que los mecanismos que regulan el desarrollo de la silicua y la dehiscencia de la misma han sido identificados en *Arabidopsis*.

En la silicua bicarpelada, la elongación de la valva y la diferenciación son controladas por *FRUITFULL* (*FUL*, previamente analizado en este trabajo) que antagoniza a *SHATTERPROOF* (*SHP1* y *SHP2*) e *INDEHISCENCE* (*IND*) en la zona de dehiscencia donde controlan la normal lignificación. *SHP1* y *SHP2* son también regulados por *REPLUMLESS* (*RPL*), responsable de la formación del replum [151]. Es importante recordar en este punto que los niveles máximos de expresión de *SINAL7* se dan en el replum. En este contexto, se analizó la expresión de *FUL* (At5g609010), *SHP2* (At2g42830, *SHATTERPROOF2*), *REPLUMLESS* (At5g02030, *RPL*) y *MYB33* (At5g06100) en flores de *Arabidopsis*, con el fin de analizar la influencia de *SINAL7*.

Se analizó también la expresión de *MYB33*, que junto con *MYB65* controlan el correcto desarrollo de anteras. En anteras de doble mutantes *myb33/myb65*, el tapetum sufre hipertrofia en el estadio del polen de célula madre, resultando en aborto pre-meiótico del desarrollo del polen. Sin embargo la esterilidad en estas mutantes es condicional, donde la fertilidad aumenta tanto en alta luz como en baja temperatura [152].

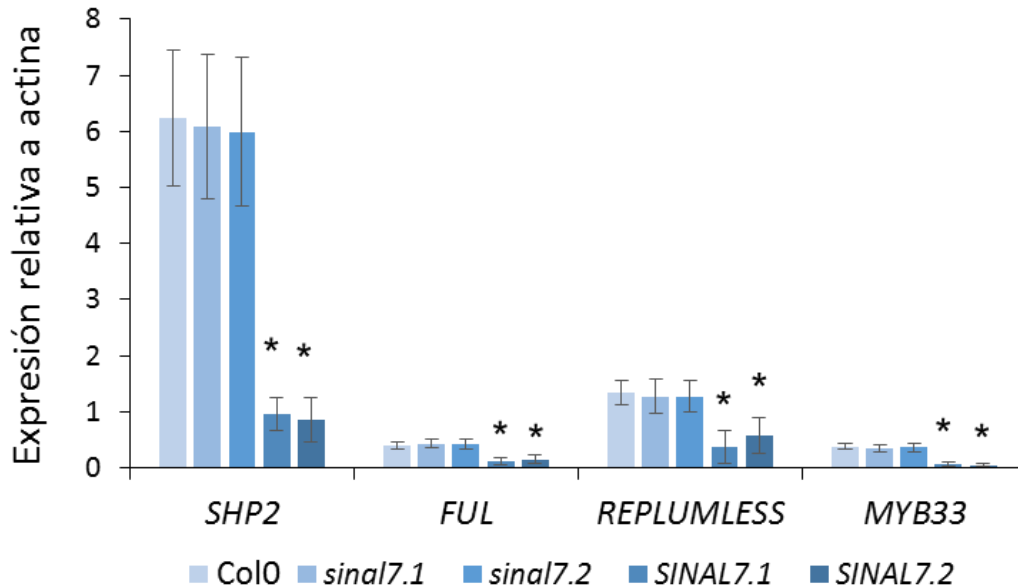


Figura 58. Niveles de transcritos de genes involucrados en floración determinados por *real time* qPCR. Determinación de los niveles de transcritos de los genes de *SHP2*, *FUL*, *REPLUMLESS* y *MYB33* relativos al gen control *ACTINA2* (At3g18780) en flores en estadio 6 de roseta de plantas de *A. thaliana* Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. Los datos representan al menos tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas determinadas usando un test de ANOVA ($p < 0.05$) y una prueba de Tukey para múltiples comparaciones, se señalan con un asterisco (*).

En la Figura 58, se observa una disminución en los niveles de transcritos para todos los genes analizados en las plantas sobreexpresantes *SINAL7* comparado con Col0 y *sinal7*. Los niveles de expresión de *FUL*, *SHP2*, *REPLUMLESS* y *MYB33* disminuyen 2, 5, 2 y 5 veces respectivamente en las plantas *SINAL7*, mostrando una variación a nivel transcripcional en comparación con Col0. No se observan diferencias significativas en las plantas mutantes *sinal7*, probablemente por la influencia de homólogos de *SINAL7* que complementen alguna función de *SINAL7*.

Por lo tanto, la presente caracterización molecular demostraría la participación de *SINAL7* en las cascadas de señalización del desarrollo de frutos y semillas. Existen reportes anteriores de la participación de enzimas ubiquitina ligasas en el desarrollo de las semillas. Bueso y colaboradores 2014 [153], informaron que RSL1, una ubiquitina ligasa putativa del tipo RING-FINGER y dedos de zinc codificada por el gen At2g26130, está relacionada con la longevidad de las semillas de *Arabidopsis*, característica crucial para preservar los cultivos y plantas silvestres. La longevidad es

afectada por los daños progresivos del envejecimiento (*aging*), en su mayoría oxidativos, y los factores ambientales y genéticos. La ganancia y pérdida de función de RSL1 se correlaciona con el aumento o disminución, respectivamente, de la longevidad de la semilla, sugiriendo que su participación es un factor limitante para la supervivencia de las semillas durante el envejecimiento. La proteína recombinante RSL1 tiene actividad de ubiquitina ligasa y varias de las alteraciones morfológicas de las plantas sobreexpresantes permitiría postular un mecanismo basado en el aumento de los niveles de las hormonas promotoras del crecimiento.

- Determinación de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO) en las líneas de plantas mutantes y sobreexpresantes de SINAL7

Se ha reportado que el tiempo de floración es afectado por diversos factores y que el mismo puede ser acelerado por estrés oxidativo [154]. De esta manera, un aumento en las especies reactivas del oxígeno (ERO) adelantaría la floración en *Arabidopsis*. Las ERO son subproductos de muchos procesos metabólicos celulares como fotosíntesis y respiración. Estudios recientes sugieren además que no son sólo subproductos, sino también moléculas señal en varios procesos biológicos [155].

Diversas líneas de evidencia revelan que el correcto desarrollo floral requiere una función mitocondrial adecuada [156-158]. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente sobre la función mitocondrial en las plantas con niveles variables de SINAL7 y que la expresión de *SINAL7* es máxima en estos tejidos (Figura 28) [118], decidimos analizar diversos parámetros fenotípicos del desarrollo reproductivo en las distintas líneas de plantas

Debido a los antecedentes detallados arriba, nos propusimos investigar cualitativamente el nivel de ERO intracelular total en las flores de las distintas líneas de plantas, tal como se describe en Materiales y métodos [106]. Se trataron al menos 6 flores de cada línea de plantas con H₂DCFDA (sonda fluorescente que es utilizada para la detección de ERO totales, incluidos radicales hidroxilo (.OH), aniones superóxido (O₂⁻), y peróxido de

hidrógeno (H_2O_2)) y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Como muestra la Figura 59, hay una mayor acumulación de ERO en las flores de plantas SINAL7, principalmente en las anteras, comparado con las flores de plantas Col0 y *sinal7*.

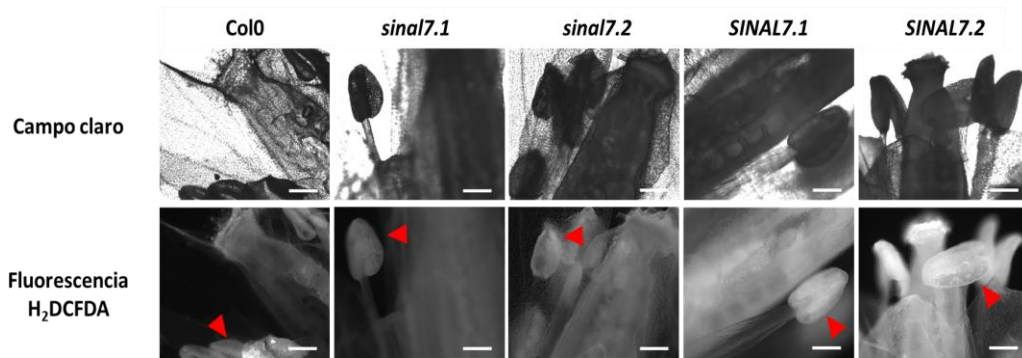


Figura 59. Análisis de especies reactivas del oxígeno (ERO) en flores de *A. thaliana*. Se analizó cualitativamente las ERO en imágenes fotográficas tomadas en microscopio de fluorescencia en flores de *A. thaliana*, tratadas con H_2DCFDA , de las líneas Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, SINAL7.1 y SINAL7.2. Se analizaron al menos 6 flores de plantas distintas de cada línea. La ilustración presentada es representativa de las muestras analizadas. Los triángulos rojos señalan una antera de la flor en cada caso. La línea blanca representa 0.25 mm de longitud.

Además se analizó el nivel de ERO en hojas de roseta de las distintas líneas de plantas de la misma manera que se determinó en flores [106] (ver Materiales y métodos). Se analizaron 4 hojas de roseta (hoja número 5) de cada línea de plantas de *A. thaliana* Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, SINAL7.1 y SINAL7.2. Como se muestra en la Figura 60, existe una mayor acumulación de ERO en los tricomas de las plantas SINAL7, comparado con los niveles de ERO en plantas *sinal7* y Col0.

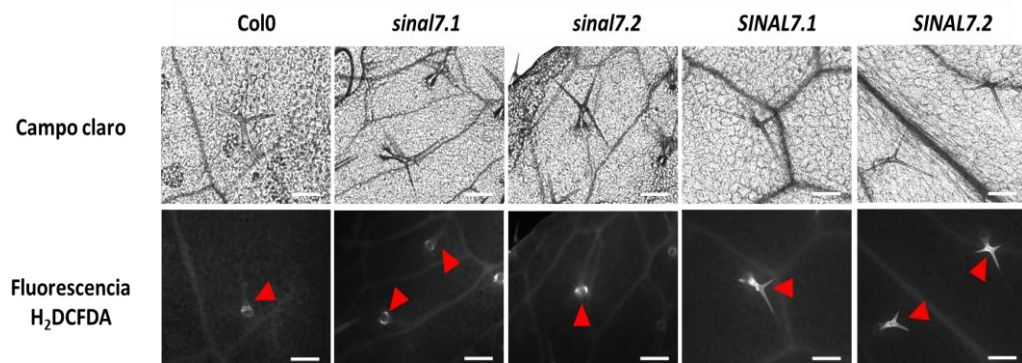


Figura 60. Análisis de especies reactivas del oxígeno (ERO) en hojas de roseta de *A. thaliana*. Se analizó cualitativamente las ERO en imágenes fotográficas tomadas en microscopio de fluorescencia de hojas de roseta de plantas de *A. thaliana*, tratadas con H_2DCFDA , de las líneas Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, SINAL7.1 y SINAL7.2. Se analizaron al

menos 4 hojas (hoja número 5) de plantas distintas de cada línea. La ilustración presentada es representativa de las muestras analizadas. Los triángulos rojos señalan los tricomas de las hojas en cada caso. La línea blanca representa 0.25 mm de longitud.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en flores y hojas en la determinación de ERO, podemos sugerir que la sobreexpresión de *SINAL7* estaría provocando un estado de mayor estrés oxidativo que podría influir en la anticipación de la floración en las plantas *SINAL7*. Este fenotipo probablemente no sólo esté afectado por los altos niveles de ERO sino también por anomalías de las funciones mitocondriales en tejidos de alta demanda energética y división celular activa, como es el caso de los tejidos reproductivos.

- Determinación de los niveles de ARNm de catalasas y de la actividad catalasa total

Debido al hallazgo de mayores niveles de ERO existentes en las plantas *SINAL7*, se investigó si alguna de las enzimas con actividad antioxidante se encontraba afectada en estas plantas. Uno de los agentes oxidantes más importantes es el peróxido de hidrógeno que es generado en los peroxisomas mediante reacciones enzimáticas catalizadas por la glicolato oxidasa y/o la superóxido dismutasa. La catalasa fue la primera enzima antioxidante caracterizada, capaz de detoxificar el peróxido de hidrógeno celular [159]. Existen tres genes de catalasa (*CAT1*, At1g20630; *CAT2*, At4g35090 y *CAT3*, At1g20620) descritos en *Arabidopsis* [160]. La isoforma mayoritaria de las catalasas es *CAT2*, localizada en los peroxisomas/glioxisomas y el citosol, mientras que *CAT1* (localizada principalmente en citosol y peroxisomas) y *CAT3* (localizada en mitocondria) son menos abundantes. Se analizaron los niveles de transcritos de los genes de las tres catalasas (Figura 61) y se determinó la actividad catalasa total en hojas de las distintas líneas de plantas (Figura 62).

Con este fin, se extrajo ARNtotal de hojas de roseta de las líneas de plantas estudiadas, se obtuvo el ADN copia, y éste fue usado como molde para la amplificación por *real time* qPCR (ver Materiales y métodos) de los

transcritos de los genes *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* mediante la utilización de cebadores específicos para la amplificación de los tres genes (ver Materiales y métodos). Los niveles de transcritos determinados fueron normalizados en relación a la expresión del gen *ACTINA2* (At3g18780), que se usó como control estándar interno.

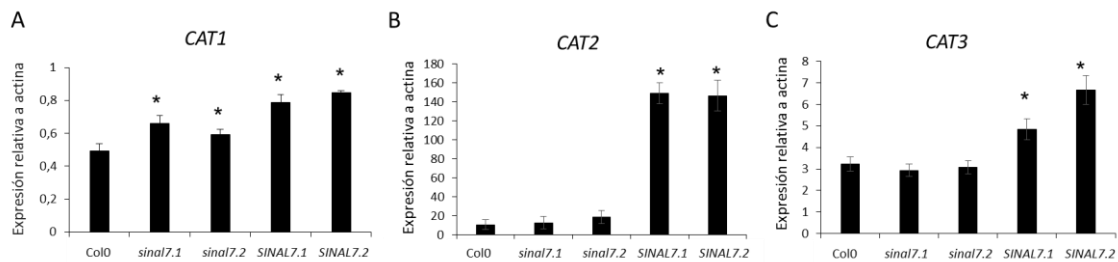


Figura 61. Niveles de transcritos de catalasas determinados por *real time* qPCR. Determinación de los niveles de transcritos de los genes de *CATALASA* (*CAT1*, *CAT2* y *CAT3*) relativos al gen control *ACTINA2* (At3g18780) en hojas de plantas de *A. thaliana* Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. Los datos representan al menos tres experimentos independientes (diferencias estadísticamente significativas señaladas con asterisco (*) determinadas usando un test de t, $p < 0.05$).

Como se muestra en la Figura 61, los niveles de transcritos de *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* se encuentran aumentados entre 2 (*CAT1* y *CAT3*) y 10 veces (*CAT2*) en las plantas sobreexpresantes *SINAL7*.

Por otro lado, la expresión de *CAT2* y *CAT3* no varía significativamente en las plantas *sinal7* observándose sólo un leve incremento del ARNm de *CAT1* comparándolas con Col0.

Con el fin de evaluar si el aumento en los niveles de transcritos de los genes de *CAT1*, *CAT2* y *CAT3*, se traduce en un aumento de la actividad detoxificante de las catalasas, se determinó la actividad enzimática catalasa total en extractos de hojas de las distintas líneas de plantas de *Arabidopsis* como fue descrito previamente por Maliandi y colaboradores [39] (ver Materiales y métodos). Se analizaron al menos cuatro extractos proteicos de hoja de cada una de las líneas de interés.

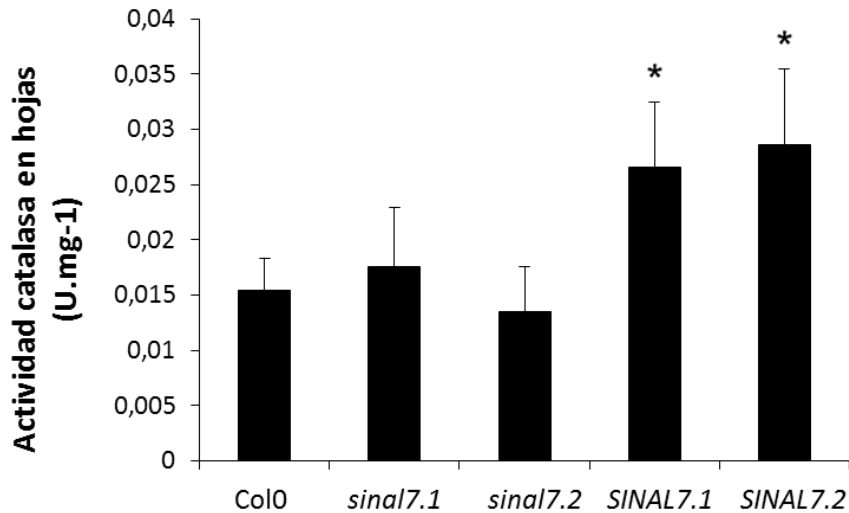


Figura 62. Niveles de actividad catalasa total. Representación gráfica de los valores de actividad enzimática CATALASA total determinados en extractos proteicos de hojas de plantas de *A. thaliana* Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. Se analizaron al menos 4 extractos de hoja de cada línea de planta en cada experimento independiente. Los datos representan al menos tres experimentos independientes (diferencias estadísticamente significativas señaladas con asterisco (*) determinadas usando un test de t, $p < 0.05$).

La Figura 62, muestra que se detectó un aumento de aproximadamente 2 veces en la actividad catalasa total en hojas de plantas SINAL7 comparando con las plantas Col0. Este aumento resulta ineficiente en la reducción del estrés oxidativo general de las plantas, ya que pueden estar influyendo otras especies reactivas del oxígeno que no son metabolizadas por las catalasas, como por ejemplo los radicales hidroxilo y los aniones superóxido.

Podemos decir entonces que los niveles de transcritos de los genes que codifican para las enzimas detoxificantes *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* se encuentran elevados en las plantas *SINAL7*, que presentan un mayor contenido de especies reactivas del oxígeno general comparado con plantas *sinal7* y Col0. Este aumento en los niveles de transcritos de los genes *CAT*, se ve reflejado además en un aumento en la actividad catalasa total en las plantas *SINAL7*, mientras que no hubo diferencias en la actividad catalasa en las plantas *sinal7.1* y *7.2* respecto a las plantas tipo salvaje.

- Determinación de los niveles de ARNm de proteínas componentes de complejos mitocondriales

En las mitocondrias se llevan a cabo procesos fundamentales para la vida celular, como es la respiración a través de la cadena de transporte de electrones de la membrana interna, que genera el gradiente electroquímico necesario para la producción de ATP (fosforilación oxidativa) y la oxidación de ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs. Los complejos respiratorios mitocondriales, CI, CIII y CIV, están formados por proteínas codificadas en el genoma nuclear y mitocondrial. El CII que es el único que posee todas sus subunidades codificadas en el núcleo [161-164]. Para el correcto ensamblado de estos complejos multiproteicos, la expresión de los respectivos genes nucleares y mitocondriales debe estar finamente regulada [165]. Parte de esta regulación y la respuesta ante demandas energéticas específicas son llevadas a cabo a nivel transcripcional. El complejo I de la cadena respiratoria (CI, NADH:ubiquinona oxidoreductasa) tiene como función transferir electrones desde el NADH, generado en la matriz hacia la ubiquinona a través de los centros redox (FMN y centros Fe-S). En este proceso, los protones son translocados a través de la membrana interna para generar la fuerza protón-motriz necesaria para la síntesis de ATP. Esta es una función importante dentro de la mitocondria, ya que sirve para mantener los niveles normales de tasa respiratoria y para una producción de ATP eficiente durante el desarrollo de la planta [166].

De las 30 subunidades que componen el CI en *Arabidopsis*, 17 se encuentran codificadas en el genoma nuclear, y luego son traducidas en el citoplasma e importadas hacia la mitocondria, y otras 4 subunidades están codificadas a nivel del genoma mitocondrial [163].

Como dijimos en el apartado anterior, se observó un aumento en el estrés oxidativo general de las plantas SINAL7. Además, determinamos que los niveles de los transcritos y actividad catalasa total estaban elevados en estas líneas de plantas. Teniendo en cuenta que los niveles de ARNm de *CAT3* (isoforma mitocondrial de las catalasas), se encontraban aumentados alrededor de 2 veces, nos propusimos analizar por *real time* qPCR los niveles de ARNm de genes que codifican proteínas del CI mitocondrial en

hojas de *Arabidopsis* de las distintas líneas, para evaluar posibles alteraciones en sus niveles (ver Materiales y métodos). Así, se analizaron por *real time* qPCR los niveles de *NAD9* (NADH deshidrogenasa subunidad 9, AtMg00070; subunidad central del CI de la cadena respiratoria mitocondrial), *PSST* (At5g11770, codifica una proteína mitocondrial que posee centros Fe-S del CI), *COX19* (At3g06310, perteneciente a la familia de proteínas CHCH con actividad NADH deshidrogenasa) y *AOX1* (At3g22370, isoforma 1 de la oxidasa alternativa (*AOX1*), involucrada en la modulación de la producción de ERO en condiciones normales).

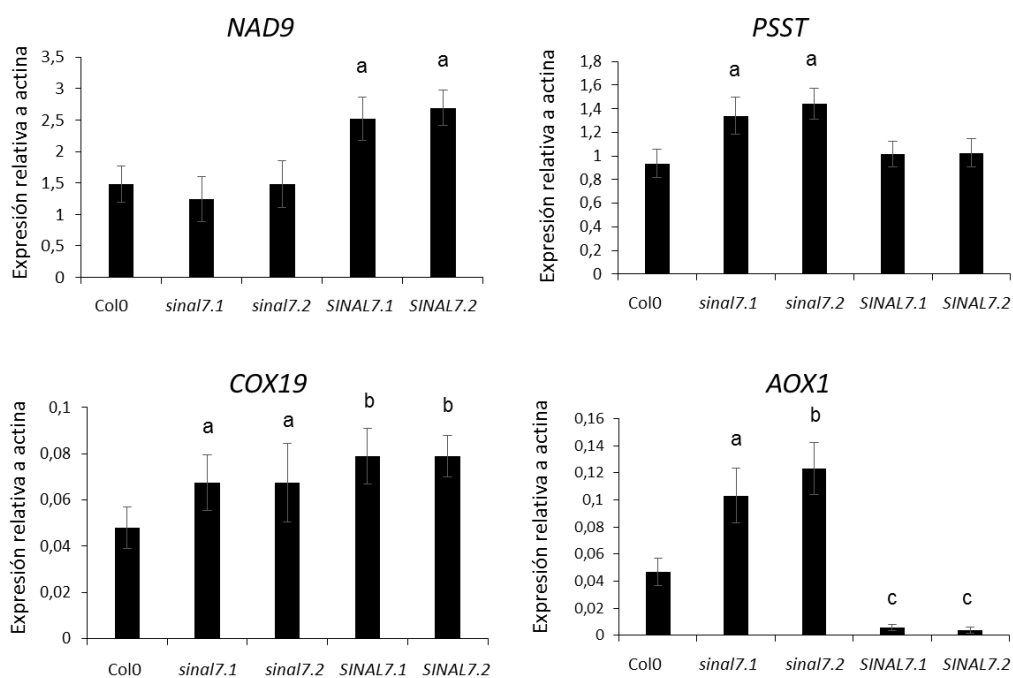


Figura 63. Niveles de transcritos de genes que codifican proteínas de complejos mitocondriales en plantas. Se determinaron los niveles de ARNm de los genes que codifican para *NAD9*, *PSST*, *COX19*, y *AOX1* de complejos mitocondriales mediante *real time* qPCR en hojas de plantas Col0, *sinal7.1*, *sinal7.2*, SINAL7.1 y SINAL7.2. Los datos representan al menos tres experimentos independientes que se analizaron mediante un test estadístico de ANOVA donde las diferencias significativas ($p < 0.05$) se representan con una letra minúscula encima de la barra en cada caso.

Como se muestra en la Figura 63, los niveles de transcritos de *NAD9* están aumentados alrededor de 2 veces en las plantas SINAL7 comparando con Col0 y las mutantes *sinal7*. Los niveles de transcritos de *PSST* se encuentran elevados un 30% en las plantas *sinal7* comparando con las plantas Col0 y SINAL7. Por otra parte, los niveles de *COX19* se encuentran elevados en las líneas mutantes (*sinal7*) y sobreexpresantes (SINAL7) un

30% y 70%, respectivamente comparado con plantas Col0. Este análisis indica que tanto transcriptos del genoma nuclear (*PSST* y *COX19*) como mitocondrial (*NAD9*) del CI se encuentran alterados por la sobreexpresión o deficiencia de *SINAL7*. Este dato resulta de interés ya que el estudio de *SINAL7* en nuestro laboratorio comenzó a raíz de encontrar sus niveles de ARNm alterados en plantas que presentan alteraciones en la función mitocondrial [37, 38].

En el análisis de los niveles de transcriptos de *AOX1* de la Figura 63, se observó un aumento de aproximadamente el doble en las líneas mutantes *sin17* comparando con Col0. De manera interesante además, los niveles de *AOX1* en las plantas sobreexpresantes *SINAL7* se encontraron disminuidos aproximadamente 10 veces comparando con Col0. Los niveles variables de *AOX* en las líneas mutantes (donde no varían los niveles de ERO comparado con plantas Col0) o sobreexpresantes (que presentan niveles mayores de ERO comparado con plantas Col0) no se corresponden con la hipótesis universal donde *AOX* modula los niveles de especies reactivas del oxígeno [167]. Esto ya se ha visto previamente en plantas [167], a pesar de lo reportado por Cvetkovska y Vanlerberghe, donde la ausencia de *AOX* incrementa los niveles de superóxido (O_2^-) [168]. Existen reportes donde hay inconsistencias que muestran disminuido los niveles de ERO en hojas de plantas de tabaco que carecen de *AOX* comparados con los niveles de ERO en plantas tipo salvaje [169].

- La sobreexpresión de *SINAL7* aumenta el consumo de oxígeno

A partir de los resultados obtenidos de la variación de los niveles de algunos transcriptos que codifican para proteínas mitocondriales del metabolismo energético como *NAD9*, *PSST*, *COX19* y *AOX1*, decidimos analizar la función mitocondrial a partir del estudio del consumo de oxígeno en las plantas de *A. thaliana* Col0, *sin17.1*, *sin17.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*, como se describe en Materiales y métodos.

En la Figura 64, se muestra una tabla con los valores de consumo de oxígeno determinados para las distintas líneas de plantas (A) y la

representación gráfica de los mismos (B). Puede apreciarse un aumento de alrededor de 2 veces en el consumo de oxígeno en las líneas sobreexpresantes *SINAL7*. Sin embargo, no se detectaron cambios en las líneas de plantas *sin17* en comparación con las Col0.

A

	Col 0	<i>sin17.1</i>	<i>sin17.2</i>	<i>SINAL7.1</i>	<i>SINAL7.2</i>
Captación de Oxígeno ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,057 ± 0,006	0,067 ± 0,005	0,062 ± 0,006	0,142 ± 0,006	0,160 ± 0,004

B

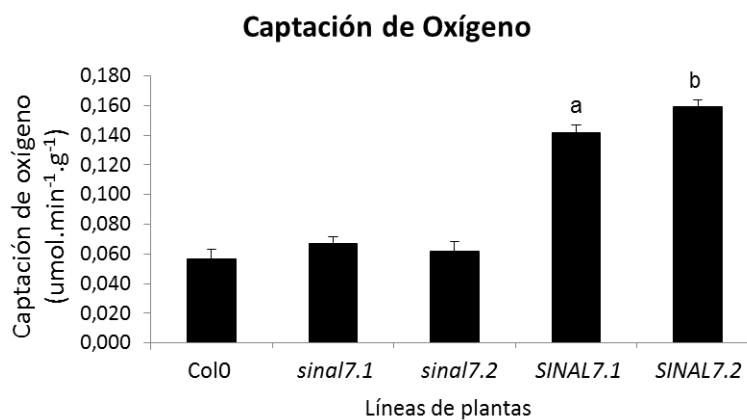


Figura 64. Niveles de captación de oxígeno en las plantas. Se determinó el consumo de oxígeno usando una cámara de aire cerrada unida a un electrodo tipo Clark (Hansatech Leaf Disc Electrode Unit, Hansatech, UK) en hojas de plantas de *A. thaliana* Col0, *sin17.1*, *sin17.2*, *SINAL7.1* y *SINAL7.2*. (A) Tabla con los valores de consumo de Oxígeno y (B) Gráfico de los valores de consumo de Oxígeno en las distintas líneas. Se evaluaron al menos 4 muestras de plantas de cada una de las líneas y se analizaron mediante un test estadístico de ANOVA donde las diferencias significativas estadísticamente ($p < 0.5$) se señalan con una letra minúscula por encima de la barra en cada caso.

Los resultados obtenidos del aumento en la captación de oxígeno por las plantas sobreexpresantes *SINAL7* podrían ser el efecto de la respuesta transcripcional observada en la Figura 63 a una disfunción mitocondrial. De todas formas, tanto la determinación de los niveles proteicos de las subunidades que componen los complejos mitocondriales como la cuantificación de ATP serían adecuados para dar soporte a los resultados observados.

En conjunto, podemos decir que la sobreexpresión de *SINAL7* altera a nivel génico la expresión de genes de proteínas mitocondriales de codificación

nuclear y mitocondrial. Además se observó una alteración de la captación de O₂, lo que indicaría una alteración en las funciones mitocondriales.

Tiwari y colaboradores (2002), analizaron el papel de las mitocondrias en la generación de estallido oxidativo provocado por un estrés oxidativo temporal o continuo teniendo como modelo mitocondrias aisladas de *Arabidopsis* [170].

Los resultados mostraron que la exposición de células de *Arabidopsis* a un estrés oxidativo leve y constante aumenta el transporte electrones de la cadena respiratoria y la captación de oxígeno en las mitocondrias aisladas, lo que lleva a una mayor producción de ERO, amplificando eficazmente el estrés oxidativo inicial. El peróxido de hidrógeno generado provoca permeabilidad mitocondrial y la consiguiente translocación o liberación de citocromo c de la membrana mitocondrial interna, lo que resulta en el agotamiento del ATP y la muerte celular. También informan que la utilización de inhibidores de proteasas bloquea la liberación del citocromo c y se evita parcialmente la progresión de la permeabilidad y el agotamiento de ATP.

En humanos, se ha demostrado que el exceso de ERO producido por mitocondrias defectuosas podría aumentar la acetilación de las proteínas de los microtúbulos a través de la supresión de SIRT2 (una tubulina deacetilasa), lo que resulta en la distribución perinuclear de las mitocondrias en fibroblastos de la piel de los pacientes con síndrome de CPEO [171]. Este síndrome es una de las encefalomiopatías mitocondriales que se caracteriza por miopatía mitocondrial, oftalmoplejía externa y ptosis. La mayoría de estos pacientes tienen en común una supresión de 4.977 pb del ADNmt y se ha establecido que fisiológica y bioquímicamente los defectos más pronunciados se dan en el músculo y sistema nervioso. Datos importantes para el diagnóstico son la tinción negativa para la citocromo c oxidasa (COX) y el patrón de succinato deshidrogenasa (SDH) hiperreactivo en músculo esquelético [171]. La función respiratoria de los fibroblastos de la piel de pacientes establecidos CPEO se redujo significativamente en comparación con la de los sujetos normales y la disfunción respiratoria mitocondrial en los tejidos afectados

no sólo perjudica la producción de energía, sino que también aumenta la acumulación de ERO, tanto de peróxido como de superóxido, debido al desequilibrio en la expresión de enzimas antioxidantes. Recientemente, un estudio de microarreglos de ADN demostró que varios genes implicados en el sistema de proteosoma dependiente de ubiquitina (UPS) fueron marcadamente regulados de manera negativa en las células de varios pacientes con síndrome de CPEO [172].

Como se explicó en la introducción, la ubiquitinación es una conjugación covalente de ubiquitina a residuos de lisina en proteínas diana, que está estrechamente regulada por ubiquitina ligasas E3 (ligasa) y enzimas deubiquitinadas. El papel más importante de la ubiquitinación de proteínas es ejecutar el control intracelular de la calidad de las proteínas para degradar las proteínas mal plegadas, ya que proteínas anormales se eliminan a través de poliubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma. Se han demostrado que defectos en la ubiquitinación pueden asociarse con diversas enfermedades humanas, especialmente las neurodegenerativas, y que el exceso de estrés oxidativo puede poner en peligro el UPS [173].

Además, se ha informado de que la disfunción mitocondrial inducida por rotenona puede inactivar el proteosoma y dar lugar a la agregación de proteínas oxidadas [174]. Estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo generado por una disfunción mitocondrial puede estar implicado en la inactivación del sistema ubiquitina-proteosoma a través de la alteración de la expresión de genes codificantes de ubiquitina ligasas y las proteínas del proteosoma entre otros.

En resumen, para contrarrestar los efectos adversos del daño mitocondrial, las células cuentan con evolucionadas vías de control de calidad para el correcto ensamblaje y funcionamiento de proteínas y orgánulos. El control de calidad de las proteínas en la membrana mitocondrial externa es supervisado por el sistema ubiquitina-proteosoma, mientras que las chaperonas y proteasas actúan en los distintos compartimentos de la mitocondria. Cuando el daño es excesivo y la maquinaria de degradación está superada, la mitocondria es eliminada por autofagosoma. En conjunto,

estas vías mantienen una red funcional en la mitocondria que proporciona el ATP necesario para la supervivencia de la célula y el cumplimiento de su función [175].

Desafortunadamente, el estrés crónico y el envejecimiento pueden afectar negativamente a proteínas que están implicadas en las vías mitocondriales de control de calidad que conduce a la acumulación de mitocondrias disfuncionales y la muerte celular. Los tejidos reproductivos exigen una gran cantidad de energía en forma de ATP que es proporcionada por la mitocondria a través de la fosforilación oxidativa, donde las especies reactivas de oxígeno (ERO) son subproductos de este proceso.

Lo expuesto en los párrafos anteriores podría explicar por qué las plantas *SINAL7*, a pesar de cursar un estado de estrés oxidativo, no ingresan en una muerte celular programada, están más saludables, no senescentes, con mayor biomasa y sin disfunción mitocondrial. La sobreexpresión de la ubiquitina E3 ligasa *SINAL7* funcional en plantas de *Arabidopsis* compensaría el daño provocado al sistema de proteosoma dependiente de ubiquitina por las ERO, aportando enzima activa capaz de depletar las proteínas mitocondriales afectadas y optimizando los sistemas de control de calidad.

CONCLUSIONES

Conclusiones

- Mediante ensayos de ubiquitinación se demostró que la proteína recombinante SINAL7 tiene actividad ubiquitina ligasa E3 y es capaz de auto-ubiquitinarse. Cuando el residuo K214 en SINAL7 fue modificado, la enzima no presentó actividad E3 ligasa, sugiriendo que el residuo K124 de SINAL7 estaría involucrado en la actividad ubiquitina ligasa E3.
- GAPC1 recombinante de *A. thaliana* es capaz de interactuar con SINAL7 *in vitro* mediante ensayos de *far western blot* y *pull down*. Tal interacción es dependiente de la presencia del residuo K231 en GAPC1 y la misma induce un aumento en la eficiencia catalítica de GAPC1 que podría tener implicancias en la vía glucolítica dentro de la células.
- Se demostró *in vitro* que GAPC1 es blanco de ubiquitinación de SINAL7 cuando la misma actúa como E3 ligasa y que la modificación ocurre en el residuo K76 en GAPC1, que además pierde completamente su actividad catalítica. De esta manera concluimos que la ubiquitinación de GAPC1 tendría un rol regulatorio esencial en la actividad de la enzima.
- La presencia de GAPC1 en el núcleo celular de plantas de *A. thaliana* es dependiente de la presencia de SINAL7. En este sentido, los resultados obtenidos sugieren que SINAL7 modula la actividad de GAPC1 y que participa en su translocación desde el citoplasma hacia el núcleo.
- Los niveles de transcritos de *SINAL7* están elevados en tejidos con alta demanda energética y con activa división celular, como por ejemplo en las flores de plantas de *A. thaliana*, sugiriendo que cumple algún papel en el desarrollo de este órgano. Además se demostró que el ARNm de *SINAL7* presenta un patrón de expresión tipo circadiano y que es inducida por la exposición a radiación de tipo UV-B, sugiriendo su participación en un amplio rango de procesos celulares en plantas.
- Las plantas sobreexpresantes *SINAL7* mostraron cambios en los parámetros vegetativos analizados, siendo éstas plantas más vigorosas y alcanzando mayor biomasa comparadas con plantas Col 0, sugiriendo que *SINAL7* estaría cumpliendo importantes funciones en el desarrollo

vegetativo en *Arabidopsis*. Además, los niveles de ARNm de parálogos de SINAL7 se mostraron alterados, sugiriendo que podrían estar cumpliendo algún rol compensatorio de la función de SINAL7 en las plantas.

- Las plantas sobreexpresantes SINAL7 mostraron un retardo en la senescencia y alteración en los niveles de ARNm involucrados en este proceso. Estos datos sugieren que SINAL7 cumpliría un rol regulatorio en senescencia.

- La floración y fructificación son afectadas por la expresión diferencial de SINAL7, donde a mayor expresión se acelera el tiempo de floración y las plantas presentan un fenotipo de esterilidad con silicuas y semillas anormales. Además, se demostró que los niveles de ARNm de factores de transcripción relacionados con los procesos de floración y fructificación son influenciados por la expresión diferencial de SINAL7 en las plantas, postulándolo como un factor regulatorio de influencia general en estos procesos.

- Las plantas sobreexpresantes SINAL7 presentan mayor tasa de respiración y captación de oxígeno. Dicha activación de la fosforilación oxidativa genera un estado en estrés oxidativo. A pesar de ello, estas plantas no ingresan en una muerte celular programada, están más saludables, no senescentes, con mayor biomasa y sin disfunción mitocondrial. La sobreexpresión de la ubiquitina E3 ligasa SINA funcional en plantas de *Arabidopsis* compensaría el daño provocado al sistema de proteosoma dependiente de ubiquitina por las ERO, aportando enzima activa capaz de depletar las proteínas mitocondriales afectadas y optimizando los sistemas de control de calidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gray, M.W., G. Burger, and B.F. Lang, *The origin and early evolution of mitochondria*. *Genome Biology*, 2001. **2**(6): p. reviews1018.1-reviews1018.5.
2. Poyton, R.O. and J.E. McEwen, *Crosstalk Between Nuclear and Mitochondrial Genomes*. *Annual Review of Biochemistry*, 1996. **65**(1): p. 563-607.
3. Gray, M.W., G. Burger, and B.F. Lang, *Mitochondrial evolution*. *Science*, 1999. **283**(5407): p. 1476-81.
4. Ryan, M.T. and N.J. Hoogenraad, *Mitochondrial-Nuclear Communications*. *Annual Review of Biochemistry*, 2007. **76**(1): p. 701-722.
5. Traven, A., et al., *Interorganellar Communication: ALTERED NUCLEAR GENE EXPRESSION PROFILES IN A YEAST MITOCHONDRIAL DNA MUTANT*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(6): p. 4020-4027.
6. Orrenius, S., B. Zhivotovsky, and P. Nicotera, *Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(7): p. 552-565.
7. JD, W. and C. J., *Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes*. *Nature Reviews*, 2008. **9**: p. 383 - 395.
8. Larkin, R.M., et al., *GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling*. *Science*, 2003. **299**(5608): p. 902-6.
9. Rhoads, D.M. and C.C. Subbaiah, *Mitochondrial retrograde regulation in plants*. *Mitochondrion*, 2007. **7**(3): p. 177-94.
10. Butow, R.A. and N.G. Avadhani, *Mitochondrial signaling: the retrograde response*. *Mol Cell*, 2004. **14**(1): p. 1-15.
11. Weissig, V., S.M. Cheng, and G.G. D'Souza, *Mitochondrial pharmaceuticals*. *Mitochondrion*, 2004. **3**(4): p. 229-44.
12. Liao, X.S., et al., *Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (CIT2) expression in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1991. **11**(1): p. 38-46.
13. Dangl, J.L. and J.D.G. Jones, *Plant pathogens and integrated defence responses to infection*. *Nature*, 2001. **411**(6839): p. 826-833.
14. Esmon, C.A., U.V. Pedmale, and E. Liscum, *Plant tropisms: providing the power of movement to a sessile organism*. *Int J Dev Biol*, 2005. **49**(5-6): p. 665-74.
15. Vickers, C.E., et al., *A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress*. *Nat Chem Biol*, 2009. **5**(5): p. 283-291.
16. Catala, R., J. Medina, and J. Salinas, *Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(39): p. 16475-80.
17. Depuydt, S. and C.S. Hardtke, *Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation*. *Curr Biol*, 2011. **21**(9): p. R365-73.
18. Ostaszewska, M., et al., *Long-term sulphur starvation of Arabidopsis thaliana modifies mitochondrial ultrastructure and activity and changes tissue energy and redox status*. *J Plant Physiol*, 2014. **171**(7): p. 549-58.
19. Baudouin, E. and J.T. Hancock, *Nitric oxide signaling in plants*. *Frontiers in Plant Science*, 2013. **4**: p. 553.
20. Considine, M.J. and C.H. Foyer, *Redox regulation of plant development*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **21**(9): p. 1305-26.

21. Sierla, M., et al., *Apoplasmic and chloroplastic redox signaling networks in plant stress responses*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **18**(16): p. 2220-39.
22. De Vleeschauwer, D., G. Gheysen, and M. Hofte, *Hormone defense networking in rice: tales from a different world*. *Trends Plant Sci*, 2013. **18**(10): p. 555-65.
23. Colombatti, F., D.H. Gonzalez, and E. Welchen, *Plant mitochondria under pathogen attack: a sigh of relief or a last breath?* *Mitochondrion*, 2014. **19 Pt B**: p. 238-44.
24. Jacoby, R.P., et al., *Mitochondrial composition, function and stress response in plants*. *J Integr Plant Biol*, 2012. **54**(11): p. 887-906.
25. Schwarzlander, M. and I. Finkemeier, *Mitochondrial energy and redox signaling in plants*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **18**(16): p. 2122-44.
26. Welchen, E., et al., *Coordination of plant mitochondrial biogenesis: keeping pace with cellular requirements*. *Frontiers in Plant Science*, 2013. **4**: p. 551.
27. Busi, M.V., et al., *Nuclear-encoded mitochondrial complex I gene expression is restored to normal levels by inhibition of unedited ATP9 transgene expression in Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem*, 2006. **44**(1): p. 1-6.
28. Gomez-Casati, D.F., et al., *A mitochondrial dysfunction induces the expression of nuclear-encoded complex I genes in engineered male sterile Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 2002. **532**(1-2): p. 70-4.
29. Lister, R., et al., *A transcriptomic and proteomic characterization of the Arabidopsis mitochondrial protein import apparatus and its response to mitochondrial dysfunction*. *Plant Physiol*, 2004. **134**(2): p. 777-89.
30. Garmier, M., et al., *Complex I dysfunction redirects cellular and mitochondrial metabolism in Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2008. **148**(3): p. 1324-41.
31. Kushnir, S., et al., *A Mutation of the Mitochondrial ABC Transporter Sta1 Leads to Dwarfism and Chlorosis in the Arabidopsis Mutant starik*. *The Plant Cell*, 2001. **13**(1): p. 89-100.
32. Rhoads, D.M., et al., *Altered gene expression in plants with constitutive expression of a mitochondrial small heat shock protein suggests the involvement of retrograde regulation in the heat stress response*. *Physiologia Plantarum*, 2005. **123**(4): p. 435-444.
33. Lohrmann, J., et al., *The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in Arabidopsis*. *Mol Genet Genomics*, 2001. **265**(1): p. 2-13.
34. Busi, M.V., et al., *Deficiency of Arabidopsis thaliana frataxin alters activity of mitochondrial Fe-S proteins and induces oxidative stress*. *The Plant Journal*, 2006. **48**(6): p. 873-882.
35. Giegé, P., et al., *Enzymes of Glycolysis Are Functionally Associated with the Mitochondrion in Arabidopsis Cells*. *The Plant Cell Online*, 2003. **15**(9): p. 2140-2151.
36. Graham, J.W., et al., *Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling*. *Plant Cell*, 2007. **19**(11): p. 3723-38.

37. Rius, S.P., et al., *Characterization of Arabidopsis Lines Deficient in GAPC-1, a Cytosolic NAD-Dependent Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*. *Plant Physiology*, 2008. **148**(3): p. 1655-1667.
38. Busi, M.V., et al., *Effect of Mitochondrial Dysfunction on Carbon Metabolism and Gene Expression in Flower Tissues of Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 2011. **4**(1): p. 127-143.
39. Maliandi, M.V., et al., *The mitochondrial protein frataxin is essential for heme biosynthesis in plants*. *FEBS Journal*, 2011. **278**(3): p. 470-481.
40. Preston, J., et al., *AtMYB32 is required for normal pollen development in Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2004. **40**(6): p. 979-95.
41. Higginson, T., S.F. Li, and R.W. Parish, *AtMYB103 regulates tapetum and trichome development in Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2003. **35**(2): p. 177-92.
42. Yanhui, C., et al., *The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family*. *Plant Mol Biol*, 2006. **60**(1): p. 107-24.
43. Li, S.F., S. Iacuone, and R.W. Parish, *Suppression and restoration of male fertility using a transcription factor*. *Plant Biotechnol J*, 2007. **5**(2): p. 297-312.
44. Hass, C., et al., *The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in Arabidopsis*. *Embo j*, 2004. **23**(16): p. 3290-302.
45. Bensmihen, S., J. Giraudat, and F. Parcy, *Characterization of three homologous basic leucine zipper transcription factors (bZIP) of the ABI5 family during Arabidopsis thaliana embryo maturation*. *J Exp Bot*, 2005. **56**(412): p. 597-603.
46. Deshaies, R.J. and C.A.P. Joazeiro, *RING Domain E3 Ubiquitin Ligases*. *Annual Review of Biochemistry*, 2009. **78**(1): p. 399-434.
47. Lorick, K.L., et al., *RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. **96**(20): p. 11364-11369.
48. Kim, Y.S., et al., *An Arabidopsis homologue of human seven-in-absentia-interacting protein is involved in pathogen resistance*. *Molecules and cells*, 2006. **21**(3): p. 389-394.
49. Hu, G., et al., *Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway*. *Genes & Development*, 1997. **11**(20): p. 2701-2714.
50. Hu, G., et al., *Characterization of human homologs of the Drosophila seven in absentia (sina) gene*. *Genomics*, 1997. **46**(1): p. 103-11.
51. Callis, J. and R.D. Vierstra, *Protein degradation in signaling*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000. **3**(5): p. 381-386.
52. Den Herder, G., et al., *Seven in Absentia Proteins Affect Plant Growth and Nodulation in Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 2008. **148**(1): p. 369-382.
53. de Bie, P. and A. Ciechanover, *Ubiquitination of E3 ligases: self-regulation of the ubiquitin system via proteolytic and non-proteolytic mechanisms*. *Cell Death Differ*, 2011. **18**(9): p. 1393-402.
54. Komander, D. and M. Rape, *The Ubiquitin Code*. *Annual Review of Biochemistry*, 2012. **81**(1): p. 203-229.

55. Teixeira, L.K. and S.I. Reed, *Ubiquitin Ligases and Cell Cycle Control*. Annual Review of Biochemistry, 2013. **82**(1): p. 387-414.
56. Nagy, V. and I. Dikic, *Ubiquitin ligase complexes: from substrate selectivity to conjugational specificity*. Biol Chem, 2010. **391**(2-3): p. 163-9.
57. Ling, Q. and P. Jarvis, *Dynamic regulation of endosymbiotic organelles by ubiquitination*. Trends in Cell Biology, 2013. **23**(8): p. 399-408.
58. Shabek, N. and N. Zheng, *Plant ubiquitin ligases as signaling hubs*. Nat Struct Mol Biol, 2014. **21**(4): p. 293-296.
59. Vierstra, R.D., *The Expanding Universe of Ubiquitin and Ubiquitin-Like Modifiers*. Plant Physiology, 2012. **160**(1): p. 2-14.
60. Brauckhoff, A., et al., *Nuclear expression of the ubiquitin ligase seven in absentia homolog (SIAH)-1 induces proliferation and migration of liver cancer cells*. Journal of Hepatology, 2011. **55**(5): p. 1049-1057.
61. Hara, M.R., et al., *S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): p. 665-674.
62. Xie, Q., et al., *SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals*. Nature, 2002. **419**(6903): p. 167-170.
63. Anderson, L.E., M.R. Ringenber, and A.A. Carol, *Cytosolic glyceraldehyde-3-P dehydrogenase and the B subunit of the chloroplast enzyme are present in the pea leaf nucleus*. Protoplasma, 2004. **223**(1): p. 33-43.
64. Zaffagnini, M., et al., *Mechanisms of nitrosylation and denitrosylation of cytoplasmic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Arabidopsis thaliana*. Journal of Biological Chemistry, 2013.
65. Sirover, M.A., *Subcellular Dynamics of Multifunctional Protein Regulation: Mechanisms of GAPDH Intracellular Translocation*. Journal of cellular biochemistry, 2012. **113**(7): p. 2193-2200.
66. Zaffagnini, M., et al., *Plant cytoplasmic GAPDH: redox post-translational modifications and moonlighting properties*. Frontiers in Plant Science, 2013. **4**.
67. Del Rio, L.A., *ROS and RNS in plant physiology: an overview*. J Exp Bot, 2015. **66**(10): p. 2827-37.
68. Halliwell B and G. JMC, *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, 2007.
69. Suzuki, N., et al., *Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling*. Curr Opin Plant Biol, 2011. **14**(6): p. 691-9.
70. Marino, D., et al., *A burst of plant NADPH oxidases*. Trends Plant Sci, 2012. **17**(1): p. 9-15.
71. Baxter, A., R. Mittler, and N. Suzuki, *ROS as key players in plant stress signalling*. Journal of Experimental Botany, 2013.
72. Asada, K., *Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions*. Plant Physiology, 2006. **141**(2): p. 391-396.
73. del Río, L.A., et al., *Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling*. Plant Physiology, 2006. **141**(2): p. 330-335.

74. Rhoads, D.M., et al., *Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling*. Plant Physiology, 2006. **141**(2): p. 357-366.
75. Bolwell, G.P. and A. Daudi, *Reactive Oxygen Species in Plant-Pathogen Interactions*, in *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling*, A.L. Rio and A. Puppo, Editors. 2009, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 113-133.
76. O'Brien, J.A., et al., *Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism*. Planta, 2012. **236**(3): p. 765-79.
77. Mittler, R., et al., *ROS signaling: the new wave?* Trends Plant Sci, 2011. **16**(6): p. 300-9.
78. Inze, A., et al., *A subcellular localization compendium of hydrogen peroxide-induced proteins*. Plant Cell Environ, 2012. **35**(2): p. 308-20.
79. Sandalio, L.M., et al., *Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Plants Under Cadmium Stress: From Toxicity to Signaling*, in *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*, P. Ahmad and M.N.V. Prasad, Editors. 2012, Springer New York: New York, NY. p. 199-215.
80. Murashige, T. and F. Skoog, *A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures*. Physiologia Plantarum, 1962. **15**(3): p. 473-497.
81. Sheffield, P., S. Garrard, and Z. Derewenda, *Overcoming Expression and Purification Problems of RhoGDI Using a Family of "Parallel" Expression Vectors*. Protein Expression and Purification, 1999. **15**(1): p. 34-39.
82. Sambrook, J., T. Maniatis, and E.F. Fritsch, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2nd edition)*. 1989, Cold Spring Harbour, NY.
83. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
84. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
85. Bollag, D.M., D.M. Rozycki, and S.J. Edelman, eds. *Protein Methods*. 1996, New York: Wiley-Liss.
86. HM, P., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000. **45**(3): p. 413.
87. Wu, Y., Q. Li, and X.Z. Chen, *Detecting protein-protein interactions by Far western blotting*. Nat Protoc, 2007. **2**(12): p. 3278-84.
88. Wayllace, N.Z., et al., *The starch-binding capacity of the noncatalytic SBD2 region and the interaction between the N- and C-terminal domains are involved in the modulation of the activity of starch synthase III from Arabidopsis thaliana*. FEBS Journal, 2010. **277**(2): p. 428-440.
89. Wertz, I.E., et al., *De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling*. Nature, 2004. **430**(7000): p. 694-9.
90. Andrade, M.A., et al., *Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network*. Protein Engineering, 1993. **6**(4): p. 383-390.
91. Calikowski, T. and I. Meier, *Isolation of Nuclear Proteins*, in *Arabidopsis Protocols*, J. Salinas and J. Sanchez-Serrano, Editors. 2006, Humana Press. p. 393-402.

92. Clough, S.J. and A.F. Bent, *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 1998. **16**(6): p. 735-743.
93. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Research, 2001. **29**(9): p. e45.
94. Lario, L.D., et al., *Regulation of plant MSH2 and MSH6 genes in the UV-B-induced DNA damage response*. J Exp Bot, 2011. **62**(8): p. 2925-37.
95. Hajdukiewicz, P., Z. Svab, and P. Maliga, *The small, versatile PZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation*. Plant Molecular Biology, 1994. **25**(6): p. 989-994.
96. Corrales, A.R., et al., *Salinity Assay in Arabidopsis*. Bio-protocol, 2014. **4**(16): e1216.
97. Abràmoff, M.D., P.J. Magalhães, and S.J. Ram, *Image processing with ImageJ*. Biophotonics Inter, 2004. **11**(7): p. 36-43.
98. Rymen, B., et al., *Kinematic analysis of cell division and expansion*. Methods in molecular biology., 2010. **655**.
99. Porra, R.J., *The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b*. Photosynthesis Research. **73**(1): p. 149-156.
100. Sims, D.A. and J.A. Gamon, *Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages*. Remote Sensing of Environment, 2002. **81**(2-3): p. 337-354.
101. Hall, T.A., *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucleic Acids Symposium Series, 1999. **41**: p. 95-98.
102. Tamura, K., et al., *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods*. Molecular Biology and Evolution, 2011. **28**(10): p. 2731-2739.
103. Jones, D.T., W.R. Taylor, and J.M. Thornton, *The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences*. Computer applications in the biosciences : CABIOS, 1992. **8**(3): p. 275-282.
104. Felsenstein, J., *Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap*. Evolution, 1985. **39**(4): p. 783-791.
105. Koornneef, M., C.J. Hanhart, and J.H. van der Veen, *A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in Arabidopsis thaliana*. Molecular and General Genetics MGG, 1991. **229**(1): p. 57-66.
106. Leshem, Y., et al., *Suppression of Arabidopsis vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H₂O₂-containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(47): p. 18008-18013.
107. Aebi, H., *Catalase in vitro*. Methods Enzymol, 1984. **105**: p. 121-6.
108. Saleh, L. and C. Plieth, *Fingerprinting antioxidative activities in plants*. Plant Methods, 2009. **5**(1): p. 1-18.
109. Boyes, D.C., et al., *Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants*. The Plant Cell, 2001. **13**(7): p. 1499-1510.

110. Hicks, G.R., et al., *Geminating Pollen Has Tubular Vacuoles, Displays Highly Dynamic Vacuole Biogenesis, and Requires VACUOLESS1 for Proper Function*. *Plant Physiology*, 2004. **134**(3): p. 1227-1239.
111. Radivojac, P., et al., *Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2010. **78**(2): p. 365-380.
112. Ben-Saadon, R., et al., *The polycomb protein Ring1B generates self atypical mixed ubiquitin chains required for its in vitro histone H2A ligase activity*. *Mol Cell*, 2006. **24**(5): p. 701-11.
113. Wang, C., et al., *TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK*. *Nature*, 2001. **412**(6844): p. 346-51.
114. Yin, Q., et al., *E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6*. *Nat Struct Mol Biol*, 2009. **16**(6): p. 658-66.
115. Baud, V., et al., *Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain*. *Genes Dev*, 1999. **13**(10): p. 1297-308.
116. Holtgreffe, S., et al., *Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications*. *Physiologia Plantarum*, 2008. **133**(2): p. 211-228.
117. Vescovi, M., et al., *Nuclear Accumulation of Cytosolic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in Cadmium-Stressed Arabidopsis Roots*. *Plant Physiology*, 2013. **162**(1): p. 333-346.
118. Peralta, D.A., et al., *Characterization of the Arabidopsis thaliana E3 Ubiquitin-Ligase AtSINAL7 and Identification of the Ubiquitination Sites*. *PLoS ONE*, 2013. **8**(8): p. e73104.
119. Cai, Y., et al., *Vacuolar Degradation of Two Integral Plasma Membrane Proteins, AtLRR84A and OsSCAMP1, Is Cargo Ubiquitination-Independent and Prevacuolar Compartment-Mediated in Plant Cells*. *Traffic*, 2012. **13**(7): p. 1023-1040.
120. Tanaka, Y., et al., *c-Cbl-Dependent Monoubiquitination and Lysosomal Degradation of gp130*. *Molecular and Cellular Biology*, 2008. **28**(15): p. 4805-4818.
121. Hellmann, H. and M. Estelle, *Plant Development: Regulation by Protein Degradation*. *Science*, 2002. **297**(5582): p. 793-797.
122. Park, B.S., et al., *Ubiquitination of LHY by SINAT5 regulates flowering time and is inhibited by DET1*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010. **398**(2): p. 242-246.
123. Welsch, R., et al., *Transcription Factor RAP2.2 and Its Interacting Partner SINAT2: Stable Elements in the Carotenogenesis of Arabidopsis Leaves*. *Plant Physiology*, 2007. **145**(3): p. 1073-1085.
124. Czechowski, T., et al., *Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2005. **139**(1): p. 5-17.
125. Thomas, B., *Light signals and flowering*. *Journal of Experimental Botany*, 2006. **57**(13): p. 3387-3393.
126. Bergink, S., N.G.J. Jaspers, and W. Vermeulen, *Regulation of UV-induced DNA damage response by ubiquitylation*. *DNA Repair*, 2007. **6**(9): p. 1231-1242.

127. Ulm, R., et al., *Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(5): p. 1397-402.
128. Winter, D., et al., *An "Electronic Fluorescent Pictograph"• Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets*. PLoS ONE, 2007. **2**(8): p. e718.
129. Smart, C.M., *Tansley Review No. 64. Gene Expression During Leaf Senescence*. The New Phytologist, 1994. **126**(3): p. 419-448.
130. Blank, A. and T.A. McKeon, *Expression of Three RNase Activities during Natural and Dark-Induced Senescence of Wheat Leaves*. Plant Physiology, 1991. **97**(4): p. 1409-1413.
131. Bate, N.J., N.A. Straus, and J.E. Thompson, *Expression of chloroplast photosynthesis genes during leaf senescence*. Physiologia Plantarum, 1990. **80**(2): p. 217-225.
132. Buchanan-Wollaston, V., *The molecular biology of leaf senescence*. Journal of Experimental Botany, 1997. **48**(2): p. 181-199.
133. Weaver, L., E. Himelblau, and R. Amasino, *Leaf Senescence: Gene Expression and Regulation*, in *Genetic Engineering*, J. Setlow, Editor. 1997, Springer US. p. 215-234.
134. Weaver, L.M., et al., *A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment*. Plant Molecular Biology, 1998. **37**(3): p. 455-469.
135. He, Y. and S. Gan, *A Gene Encoding an Acyl Hydrolase Is Involved in Leaf Senescence in Arabidopsis*. The Plant Cell, 2002. **14**(4): p. 805-815.
136. Robatzek, S. and I.E. Somssich, *Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense*. Genes & Development, 2002. **16**(9): p. 1139-1149.
137. Pérez-Amador, M.A., et al., *Identification of BFN1, a Bifunctional Nuclease Induced during Leaf and Stem Senescence in Arabidopsis*. Plant Physiology, 2000. **122**(1): p. 169-180.
138. Schelbert, S., et al., *Pheophytin Pheophorbide Hydrolase (Pheophytinase) Is Involved in Chlorophyll Breakdown during Leaf Senescence in Arabidopsis*. The Plant Cell, 2009. **21**(3): p. 767-785.
139. Jaradat, M.R., et al., *A comprehensive transcriptome analysis of silique development and dehiscence in Arabidopsis and Brassica integrating genotypic, interspecies and developmental comparisons*. GM Crops Food, 2014. **5**(4): p. 302-20.
140. Holdsworth, M.J., L. Bentsink, and W.J. Soppe, *Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination*. New Phytol, 2008. **179**(1): p. 33-54.
141. JD, B., et al., *Physiology of Development, Germination and Dormancy*. Seeds, 2013.
142. Wilkinson, M.D., et al., *Use of comparative molecular genetics to study pre harvest sprouting in wheat*. Euphytica. **126**(1): p. 27-33.
143. West, M. and J.J. Harada, *Embryogenesis in Higher Plants: An Overview*. The Plant Cell, 1993. **5**(10): p. 1361-1369.
144. Gutierrez, L., et al., *Combined networks regulating seed maturation*. Trends Plant Sci, 2007. **12**(7): p. 294-300.

145. Raz, V., J.H. Bergervoet, and M. Koornneef, *Sequential steps for developmental arrest in Arabidopsis seeds*. *Development*, 2001. **128**(2): p. 243-52.
146. Weber, H., L. Borisjuk, and U. Wobus, *Molecular physiology of legume seed development*. *Annu Rev Plant Biol*, 2005. **56**: p. 253-79.
147. Busi, M.V., et al., *MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development*. *Plant Mol Biol*, 2003. **52**(4): p. 801-15.
148. Gu, Q., et al., *The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development*. *Development*, 1998. **125**(8): p. 1509-1517.
149. Ferrandiz, C., S.J. Liljegren, and M.F. Yanofsky, *Negative regulation of the SHATTERPROOF genes by FRUITFULL during Arabidopsis fruit development*. *Science*, 2000. **289**(5478): p. 436-8.
150. Liljegren, S.J., et al., *SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis*. *Nature*, 2000. **404**(6779): p. 766-70.
151. Pabón-Mora, N., G.K.-S. Wong, and B.A. Ambrose, *Evolution of fruit development genes in flowering plants*. *Frontiers in Plant Science*, 2014. **5**.
152. Millar, A.A. and F. Gubler, *The Arabidopsis GAMYB-Like Genes, MYB33 and MYB65, Are MicroRNA-Regulated Genes That Redundantly Facilitate Anther Development*. *The Plant Cell*, 2005. **17**(3): p. 705-721.
153. Bueso, E., et al., *A forward genetic approach in Arabidopsis thaliana identifies a RING-type ubiquitin ligase as a novel determinant of seed longevity*. *Plant Sci*, 2014. **215-216**: p. 110-6.
154. Kotchoni, S.O., et al., *Alterations in the Endogenous Ascorbic Acid Content Affect Flowering Time in Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2009. **149**(2): p. 803-815.
155. Shim, J.S. and T. Imaizumi, *Circadian Clock and Photoperiodic Response in Arabidopsis: From Seasonal Flowering to Redox Homeostasis*. *Biochemistry*, 2015. **54**(2): p. 157-170.
156. Linke, B., T. Nothnagel, and T. Börner, *Flower development in carrot CMS plants: mitochondria affect the expression of MADS box genes homologous to GLOBOSA and DEFICIENS*. *The Plant Journal*, 2003. **34**(1): p. 27-37.
157. Landschütze, V., L. Willmitzer, and B. Müller-Röber, *Inhibition of flower formation by antisense repression of mitochondrial citrate synthase in transgenic potato plants leads to a specific disintegration of the ovary tissues of flowers*. *The EMBO Journal*, 1995. **14**(4): p. 660-666.
158. Geisler, D.A., et al., *Downregulation of the δ -Subunit Reduces Mitochondrial ATP Synthase Levels, Alters Respiration, and Restricts Growth and Gametophyte Development in Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2012. **24**(7): p. 2792-2811.
159. Mhamdi, A., et al., *Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models*. *Journal of Experimental Botany*, 2010. **61**(15): p. 4197-4220.
160. Frugoli, J.A., et al., *Catalase Is Encoded by a Multigene Family in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh*. *Plant Physiology*, 1996. **112**(1): p. 327-336.

161. Scheffler, I.E., *Molecular Genetics of Succinate:Quinone Oxidoreductase in Eukaryotes*, in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, M. Kivie, Editor. 1998, Academic Press. p. 267-315.
162. Figueroa, P., et al., *Three different genes encode the iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase in Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. **46**(2): p. 241-250.
163. Heazlewood, J.L., K.A. Howell, and A.H. Millar, *Mitochondrial complex I from Arabidopsis and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2003. **1604**(3): p. 159-169.
164. Millar, A.H., et al., *Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits*. *Plant Molecular Biology*. **56**(1): p. 77-90.
165. Brennicke, A., et al., *Transcription signals of mitochondrial and nuclear genes for mitochondrial proteins in dicot plants*. *Journal of Heredity*, 1999. **90**(3): p. 345-350.
166. Rasmusson, A.G., et al., *Physiological, biochemical and molecular aspects of mitochondrial complex I in plants*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1998. **1364**(2): p. 101-111.
167. Vanlerberghe, G.C., M. Cvetkovska, and J. Wang, *Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase?* *Physiologia Plantarum*, 2009. **137**(4): p. 392-406.
168. Cvetkovska, M. and G.C. Vanlerberghe, *Alternative oxidase modulates leaf mitochondrial concentrations of superoxide and nitric oxide*. *New Phytologist*, 2012. **195**(1): p. 32-39.
169. Amirsadeghi, S., et al., *Changes in Plant Mitochondrial Electron Transport Alter Cellular Levels of Reactive Oxygen Species and Susceptibility to Cell Death Signaling Molecules*. *Plant and Cell Physiology*, 2006. **47**(11): p. 1509-1519.
170. Tiwari, B.S., B. Belenghi, and A. Levine, *Oxidative Stress Increased Respiration and Generation of Reactive Oxygen Species, Resulting in ATP Depletion, Opening of Mitochondrial Permeability Transition, and Programmed Cell Death*. *Plant Physiology*, 2002. **128**(4): p. 1271-1281.
171. Wu, Y.T., et al., *Mitochondrial respiratory dysfunction-elicited oxidative stress and posttranslational protein modification in mitochondrial diseases*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1201**: p. 147-56.
172. Alemi, M., et al., *Mitochondrial DNA deletions inhibit proteasomal activity and stimulate an autophagic transcript*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007. **42**(1): p. 32-43.
173. Grune, T., et al., *Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36**(12): p. 2519-30.
174. Shamoto-Nagai, M., et al., *An inhibitor of mitochondrial complex I, rotenone, inactivates proteasome by oxidative modification and induces aggregation of oxidized proteins in SH-SY5Y cells*. *J Neurosci Res*, 2003. **74**(4): p. 589-97.
175. Hammerling, B.C. and A.B. Gustafsson, *Mitochondrial quality control in the myocardium: cooperation between protein degradation and mitophagy*. *J Mol Cell Cardiol*, 2014. **75**: p. 122-30.

