



Facultad de Ciencia y Tecnología  
Universidad Nacional de San Martín

# **PROTEÍNA HETEROTRIMÉRICA G EN PLANTAS: ESTUDIO DE PERFILES PROTEÓMICOS.**

Tesis presentada para optar al título de Licenciado en Biotecnología de la  
Universidad Nacional de San Martín

Autor: Christian Lisi

Director de tesis: Agustina Mazzella

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular.

INGEBI-CONICET



Buenos Aires, 2010

## **Agradecimientos**

*A continuación quiero agradecer a todas las personas que siempre me han apoyado tanto en mi vida como en mi carrera, sin su ayuda no hubiera podido lograr el objetivo que me propuse hace ya varios años atrás, este título se lo dedico a todos uds.*

A la Dra. Agustina Mazzella, directora de esta tesis, por la confianza depositada en mi al aceptarme como tesinista, por sus apreciados aportes, críticas, comentarios, sugerencias y por el esfuerzo volcado a ayudarme en todo lo que necesité durante el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Jorge Muschietti por abrirme las puertas de su laboratorio y aceptarme en su grupo trabajo. Por la calidez y la confianza en el trato diario, haciéndome sentir como uno más del grupo en todo momento.

A la Dra. Mirtha Flawiá, directora del INGEBI, por haberme facilitado el ámbito para el desarrollo de mi investigación.

A los compañeros de laboratorio que tuve mientras se desarrolló mi tesina, primero y principal a Romi y a Gaby que me ayudaron a adaptarme al manejo diario en el laboratorio siendo las principales víctimas de las preguntas que me surgían a diario. A Joaquín, mi vecino de mesada, y aunque sea de Racing, la única persona con la que podía hablar de fútbol en el laboratorio. A los chicos del laboratorio "221", Tami por sus locuras y su simpatía, Diego por la dedicación que demostraba todo los días en el laboratorio, Leandro por su maestría en la confección de fotos graciosas de gente del laboratorio con el Photoshop, Lauri por su bondad y María Laura por su buena predisposición siempre. Por último no me quiero olvidar de Elva y el Dr. Erijman por su aporte al grupo en el día a día.

A mis compañeros de facultad: Pablito, Nacho y Jere con los que pase noches sin dormir antes de los exámenes, Sole que fue mi inyección de pilas para todos los exámenes, Vera, Gi, Vir, Clau, Rover, Maxi y Marcos que me ayudaron durante la carrera no sólo en

el aspecto académico sino también compartiendo los buenos y malos momentos de la vida. Roni y Lara que fueron los primeros amigos que tuve durante la carrera.

A los docentes de la UNSAM que me formaron académicamente inculcándome los conocimientos necesarios para desenvolverme como un buen profesional y a la comisión de tesinas, en especial a Susana Giambiagi, que siempre me ayudó durante la duración de la misma.

A mis amigos de la vida: Fer, Paton, el Negro, Rocker, Tibu, Tonga, Gabo, Cundo, Alan, Chispa, Gamu, Tincho y Taits, y a las chicas: Lula y las “Hobbits”: Nole, Jime y Juli. Gracias a todos, ustedes fueron mi cable a tierra cuando las cosas no salían como quería.

A mis actuales compañeros de laboratorio: Cris, Caro, Romi, Nico, Andy, Elvis, Ara, Grachu, Carmen, Luciano, Victor, Julian, Chechu, Marce y Magu, con uds compartí muy buenos momentos desde el primer día.

A mis padres Carlos y Susana que se preocuparon siempre de que reciba la mejor educación posible, por incentivar me a superarme día a día y por ser mis modelos a seguir en la vida.

A mis hermanas Cynthia, Verónica y Vanina por ser participes de mi formación como persona aconsejándome y apoyándome desde que era muy pequeño.

A mis cuñados Marcelo y Nico, gracias por darme los sobrinos que siempre quise tener.

A mis sobrinos Juan Cruz, Valentina y Mía que los amo con el alma y que son la razón por la cual deseo para el futuro un mundo mejor en donde puedan cumplir los objetivos que se propongan.

*Gracias a Todos.*

## ÍNDICE

Página

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1    Transducción de Señales en Plantas.....	4
2    Proteínas G heterotriméricas.....	5
2.1  Proteínas G heterotriméricas en plantas vs mamíferos.....	6
2.2  Componentes involucrados en el sistema de señalización de la Proteína G heterotrimérica en Arabidopsis.....	7
2.2.1  Subunidad $\alpha$ de la proteína G heterotrimérica en Arabidopsis.....	7
2.2.2  Subunidad $\beta$ de la proteína G heterotrimérica en Arabidopsis.....	8
2.2.3  Subunidad $\gamma$ de la proteína G heterotrimérica en Arabidopsis.....	9
2.2.4  Receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GCRP).....	9
2.2.5  Proteínas reguladoras de la actividad de subunidad alpha de las Proteínas G heterotriméricas.....	10
2.2.6  Velocidad de intercambio de nucleótidos guanina en la subunidad $\alpha$ de Arabidopsis.....	11
2.2.7  Efectores de la subunidad $\alpha$ de la proteína G heterotrimérica.....	11
2.3  Funciones de la subunidad $\alpha$ de la proteína G heterotrimérica.....	13
2.3.1  Funciones de GPA1 durante el desarrollo de Arabidopsis.....	13
2.3.1.1  Señalización de GPA1 en la semilla.....	13
2.3.1.2  Señalización de GPA1 en plántulas.....	14

2.3.1.3	Señalización de GPA1 en plantas adultas.....	15
2.3.2	Señalización de GPA1 en respuesta a diferentes estímulos ambientales....	17
2.3.2.1	Señalización de GPA1 en respuesta a defensa contra patógenos.....	17
2.3.2.2	Ozono (O <sub>3</sub> ).....	17
2.3.2.3	Luz.....	18
2.4	Asociación de las proteínas G heterotriméricas con la fosforilación de proteína.....	18
3	Planta modelo de estudio: Arabidopsis thaliana.....	19
4	Estudios de perfiles proteicos.....	20
4.1	Preparación de las muestras proteicas a partir de tejido vegetal.....	21
4.2	La técnica de geles bidimensionales.....	21
<b>OBJETIVOS E HIPOTESIS.....</b>		<b>24</b>
1	Objetivo General.....	25
2	Objetivos Particulares.....	26
3	Hipótesis de Trabajo.....	26
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>		<b>27</b>
1	Material vegetal. Tratamientos.....	28
2	Identificación del mutante <i>gal</i> .....	29
2.1	Extracción de ADN de plántulas y hojas de Arabidopsis.....	29
2.2	Reacciones de PCR para la identificación de mutantes <i>gal</i> .....	30

3	Análisis proteómico.....	31
3.1	Extracción de proteínas.....	31
3.1.1	Método de TCA/Acetona.....	32
3.1.2	Método de fenol.....	32
3.2	Solubilización de proteínas.....	33
3.3	Cuantificación de proteínas.....	33
4	Geles Bidimensionales 2D.....	34
4.1	Hidratación de las tiras comerciales.....	34
4.2	Isoelectroenfoque (Primera dimensión).....	35
4.3	Equilibrado de las muestras.....	36
4.4	Geles SDS-PAGE estándar (Segunda dimensión).....	36
4.5	Tinción de geles con solución de <i>Coomassie Blue</i> .....	37
5	Análisis de los geles bidimensionales.....	38
<b>RESULTADOS.....</b>		<b>40</b>
1	Identificación de mutantes homocigotas <i>gpa1</i> para la inserción de T-ADN..	41
2	Valoración del método de extracción de proteínas.....	42
3	Análisis de los perfiles proteicos de los genotipos salvaje y <i>gpa1</i> .....	44
3.1	Análisis proteómico de los genotipos salvaje y mutante <i>gpa1</i> en un rango de pH 3-10.....	44
3.2	Análisis proteómico de los genotipos salvaje y mutante <i>gpa1</i> en un rango de pH de 4-7.....	51

<b>DISCUSIÓN</b> .....	55
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	61

## Resumen

La transducción de señales es uno de los procesos más importantes desarrollados en los seres vivos. Gracias a esto, la planta como organismo sésil, es capaz de sentir y responder de manera adecuada a los diversos estímulos que se le presentan en el ambiente en el cual se desarrollan. La proteína G heterotrimérica es una molécula esencial en este mecanismo y se ha demostrado que está implicada en la señalización de numerosos estímulos en plantas como son la luz, hormonas, azúcares, y oxígeno, entre otros. *Arabidopsis thaliana* posee un único gen que codifica para la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica (*GPA1*). Las plantas mutantes *gpa1* muestran diferencias fenotípicas con respecto a las plantas salvajes. Cuando son crecidos en oscuridad y en un medio suplementado con sacarosa, los mutantes *gpa1* presentan un hipocotilo más corto que los del genotipo salvaje y el gancho apical abierto. En plantas adultas las mutantes *gpa1* presentan las hojas de las rosetas más redondeadas y más grandes que las del genotipo salvaje.

El objetivo general de este trabajo es estudiar las proteínas involucradas en la transducción de las señales mediadas por GPA1. Para esto proponemos la obtención, comparación y estudio de los perfiles proteicos de la planta salvaje y mutante *gpa1* para los tejidos de hoja y plántula utilizando la técnica de geles bidimensionales (geles 2D). El estudio de estos perfiles implica la búsqueda de diferencias significativas en la expresión de proteínas entre ambos genotipos.

Para cumplir con este objetivo primero identificamos aquellas semillas homocigotas mutantes *gpa1*, mediante reacciones de PCR sobre el ADN de plántulas provenientes de un *pool* de semillas comerciales.

Una vez obtenida la planta mutante homocigota realizamos la puesta a punto de la extracción de proteínas para ambos genotipos en los tejidos de hoja y plántula. Utilizamos un método de extracción de proteínas totales, que se basa principalmente en la utilización de fenol para el tejido de hoja. Para el tejido de plántula no hemos aún encontrado un método que combine rendimiento con buenas corridas electroforéticas.

Con las muestras provenientes de la extracción de proteínas del tejido de hoja realizamos geles 2D en un rango de pH 3-10 con el objetivo de analizar de forma completa el

perfil de proteínas totales de las muestras. Luego utilizamos un rango de pH 4-7 para observar en detalle la zona donde se encontraban la mayor cantidad de proteínas expresadas.

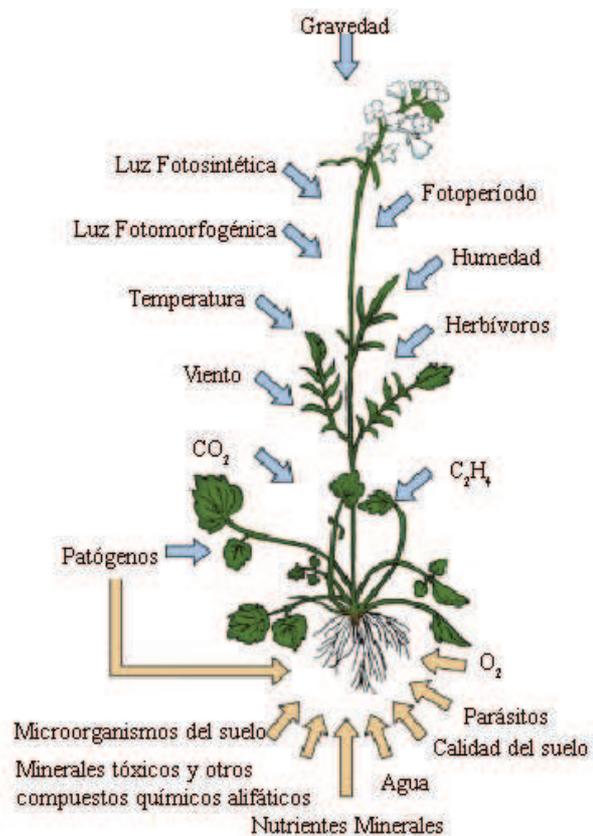
Los geles fueron analizados con un software específico *Image Master Platinum* versión 7. Los datos de correlación y coeficiente de variación entre geles de la misma muestra mostraron que en nuestras condiciones experimentales logramos alta reproducibilidad en diferentes réplicas independientes, es decir alta confiabilidad para el análisis de los resultados. El análisis estadístico entre los dos genotipos permitió detectar once proteínas diferencialmente expresadas. El hallazgo de estas proteínas candidatas es el primer paso para poder identificar nuevos componentes involucrados en la señalización por GPA1.

## **INTRODUCCIÓN**

## 1 – Transducción de Señales en Plantas

El desarrollo de las plantas es un fenómeno dinámico que comprende un conjunto de varios procesos complejos. La supervivencia de las mismas dependerá de la coordinación de sus procesos de crecimiento y desarrollo con los cambios externos que las rodean. Una serie de eventos que involucran el reconocimiento molecular de un estímulo particular definen las respuestas adecuadas, generando una cascada de señales, y el fenómeno en su conjunto se define como transducción de señales. En las plantas, el mecanismo de transducción de señales es de gran importancia, ya que como organismos sésiles es fundamental la capacidad de sentir y responder de manera adecuada a las variaciones en los factores ambientales. La planta percibe el estímulo primario a través de receptores específicos. Este estímulo, o primer mensajero, desencadena el resto de las señales y la activación de elementos transductores intermediarios hasta obtener una respuesta final para ese estímulo en particular.

Los factores ambientales a los cuales se deben adaptar las plantas pueden ser bióticos o abióticos (Fig. 1). Entre los factores abióticos se encuentran: los nutrientes, la luz, el oxígeno, el agua, la temperatura, la gravedad, el viento y los compuestos químicos presentes en el ambiente. Entre los factores bióticos se encuentran los organismos que realizan interacciones simbióticas, de herbivoría y patógenos con las plantas. La percepción y



**Figura 1.** Señales ambientales percibidas por las plantas.

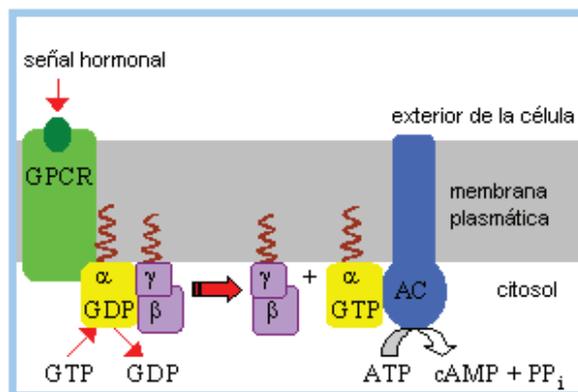
la generación de la respuesta apropiada para cada uno de estos estímulos están a cargo de los elementos que pertenecen a la cadena de transducción de señales. Varios de estos elementos y su rol en la transmisión de la señal se encuentran conservados entre plantas, animales y eucariotas inferiores.

La acción coordinada de receptores, proteínas G, canales iónicos,  $\text{Ca}^{2+}$ , inositol fosfato, quinasas, fosfatasas, hormonas, péptidos y factores de transcripción resultan en una alteración del patrón de expresión génico generando la respuesta específica.

## 2 - Proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas forman parte del mecanismo más utilizado por las células eucariotas en la transducción de señales, y su función es la de mediar la transmisión de una señal externa desde las moléculas receptoras a las moléculas efectoras.

El sistema está formado por un heterotrímero compuesto por una subunidad llamada  $\alpha$ , una  $\beta$  y una  $\gamma$ . Cuando el ligando estimula a un receptor GPCR (receptores acoplados a proteínas G), éste favorece el intercambio de GDP (guanosina difosfato) por GTP (guanosina trifosfato) de la subunidad  $\alpha$  cambiando su conformación y liberando la subunidad  $\alpha$  por un lado y el dímero  $\beta\gamma$  por otro. Ambos interactúan con diferentes componentes citoplasmáticos que desencadenan diferentes caminos de señalización. Luego el GTP es hidrolizado a GDP por la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad  $\alpha$  reasociándose el heterotrímero y volviendo a su estado basal para ser activado nuevamente (Fig. 2).



**Figura 2.** Esquema de la activación de la proteína G Heterotrimérica.

Además, como se menciona más adelante existen otras proteínas capaces de regular la actividad de  $G\alpha$  que pueden acelerar la actividad GTPasa intrínseca de esta subunidad o bloquear la interacción con sus efectores.

## 2.1 – Proteínas G heterotriméricas: plantas *versus* mamíferos

En animales existen aproximadamente diecisiete genes que codifican para subunidades  $G\alpha$ , cinco para subunidades  $G\beta$ , 12 para  $G\gamma$  (Tabla 1.), aproximadamente 950 GPCRs y docenas de efectores. Esta diversidad genera que la señalización por medio de la proteína G alcance un amplio repertorio de combinaciones de los componentes que intervienen en la señalización y entre los efectores con los cuales interaccionarán.

Los genes que codifican para las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas en plantas han sido aislados sobre la base de la homología de secuencia de las subunidades de mamíferos. Así, contrariamente a lo que sucede en animales, que presentan varios genes que codifican para las distintas subunidades, en *Arabidopsis* existe solo un único gen que codifica para la subunidad  $\alpha$  (*GPA1*) (Ma y col., 1991), uno para la  $\beta$  (*AGBI*) (Weiss y col., 1994) y dos para la  $\gamma$  (*AGG1* y *AGG2*) (Mason y Botella, 2000 y 2001) (Tabla 1).

En arroz la subunidad  $\alpha$  está codificada por un único gen (*RGAI*) (Ishikawa y col., 1995, Ashikari y col., 1999) al igual que en tomate (*TGAI*) (Ma y col., 1991), y arveja (Marsh y Kaufman, 1999), pero en otras especies es codificada por dos genes, como sucede en tabaco (*NtGPA1* y *NtGA2*) (Saalbach y col., 1999) y soja (*SGAI* y *SGA2*) (Kim y col., 1995; Gotor y col., 1996).

La subunidad  $\beta$  está codificada por un único gen en arroz (*RGBI*) (Kato y col., 2004) al igual que en tabaco (*TGBI*) (Peskan y Oelmuller, 2000) y maíz (*ZGBI*) (Weiss y col., 1994).

Es decir que, el sistema de señalización por proteínas G heterotriméricas en plantas es mucho más simple que en animales, intervendrían menor cantidad de receptores, proteínas reguladoras y componentes intermediarios constituyendo un excelente modelo para estudiar el funcionamiento de estos componentes.

<b>Comparación de la proteína G heterotrimérica entre Arabidopsis y Humanos</b>		
<b>Subunidad</b>	<b>N° de genes en el genoma</b>	
	<b>Arabidopsis</b>	<b>Humanos</b>
<b><math>\alpha</math></b>	1	17-20
<b><math>\beta</math></b>	1	5
<b><math>\gamma</math></b>	2	12

**Tabla 1.** Composición de las subunidades de la proteína G heterotrimérica en Arabidopsis y Humanos

## **2.2 – Componentes involucrados en el sistema de señalización de la Proteína G heterotrimérica en Arabidopsis**

### **2.2.1 – Subunidad $\alpha$ de la proteína G heterotrimérica de Arabidopsis**

La subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica está formada por una estructura helicoidal en la región N-terminal, un dominio GTPasa del tipo Ras y un dominio  $\alpha$  hélice (Fig. 3).

La subunidad  $\alpha$  posee tres regiones llamadas *switchs* (I, II y III) que intervienen directamente en la unión con los nucleótidos de guanina (GDP/GTP), estas regiones cambian su conformación cuando un ligando se une al receptor (GPCR). La región N-terminal helicoidal de  $G\alpha$ , y partes de las regiones I, II intervienen en la unión de  $G\alpha$  con el dímero  $\beta\gamma$  (Temple y Jones, 2007).

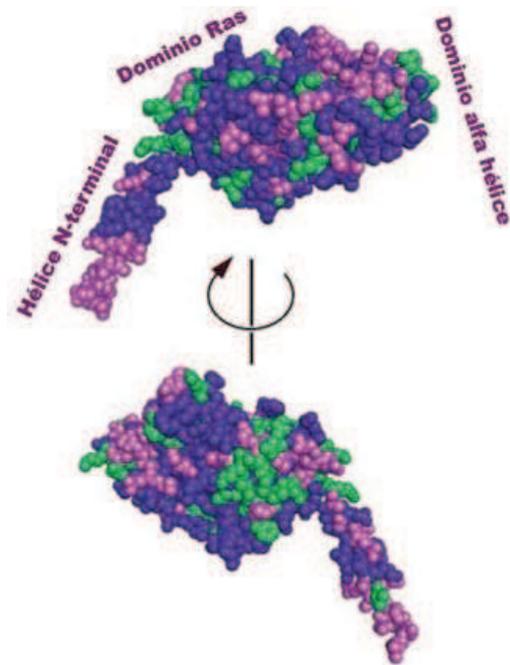
La subunidad  $\alpha$  también posee sitios de miristoilación, S-acetilación y sitios en el extremo amino y carboxilo terminal de unión al receptor (GPCR).

Mutaciones en estos sitios potenciales de miristoilación y acetilación hacen que  $G\alpha$  se localice en el citosol y no en membrana (Adjobo-Hermans y col., 2006).

- Regiones invariantes y clase específicas de las subunidades  $G\alpha$  entre plantas y animales.

- Regiones no conservadas entre animales y plantas.

- Regiones únicas de plantas.



**Figura 3.** Estructura molecular de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica de Arabidopsis. La flecha indica que se muestran las dos vistas de la proteína. (Temple y Jones, 2007)

### 2.2.2 – Subunidad $\beta$ de la proteína G heterotrimérica en Arabidopsis

La principal función de la subunidad  $G\beta$  es actuar como una proteína de interacción con otras proteínas de la cadena de transducción de señales. Esta subunidad posee en el extremo N-terminal una estructura helicoidal que forma interacciones hidrofóbicas con la subunidad  $G\gamma$  las cuales son prácticamente irreversibles en condiciones no desnaturalizantes. El resto de los residuos forman una estructura “seven-bladed propeller” de unidades repetidas llamadas “WD40 repeat motifs” (Temple y Jones, 2007).

La hélice del extremo N terminal de la subunidad  $G\alpha$  se une a una región en forma de ranura que está situada al lado de la hélice  $\beta$  mientras que los dominios Ras y helicoidal de la subunidad  $\alpha$  se unen a la superficie de la hélice de  $G\beta$  (Temple y Jones, 2007).

### 2.2.3 – Subunidad $\gamma$ de la proteína G heterotrimérica en Arabidopsis

En Arabidopsis se han identificado dos genes que codifican para  $G\gamma$ ,  $G\gamma 1$  (AGG1) y  $G\gamma 2$  (AGG2), estos dos genes fueron hallados utilizando la técnica de doble híbrido en levaduras y utilizando como cebo la subunidad  $\beta$  de la proteína G heterotrimérica de tabaco (TGB1) (Mason y Botella, 2000). Las masas moleculares de las  $\gamma$  subunidades es de aproximadamente 10.8 kDa y ambas poseen una secuencia CAAX-box en el extremo C terminal para agregados de isoprenilos. En el extremo N-terminal presentan un dominio  $\alpha$ -hélice enrollado a través del cual interaccionan con la subunidad  $G\beta$ .  $G\gamma$  además posee un motivo DPLL que sirve como un contacto hidrofóbico con  $G\beta$ . Ensayos *in vitro* comprobaron la interacción de AGG2 con AGB1 (Mason y Botella, 2000 y 2001).

### 2.2.4 – Receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCR)

Los GPCRs (receptores acoplados a proteínas G) poseen siete dominios transmembrana con un extremo N- terminal extracelular y dominios citosólicos que se unen a la subunidad  $\alpha$  de la proteína G. En mamíferos la regulación está dada porque los GPCRs son capaces de intercambiar nucleótidos de guanina funcionando entonces como proteínas (GEFs) (*guanosine exchange factor*) promoviendo el intercambio de GDP a GTP de la subunidad  $\alpha$ .

Hasta la fecha, el conocimiento de los GPCR en plantas es escaso. Se han postulado varios genes por homología de secuencia que podrían funcionar como posibles GPCR en plantas (Assmann, 2002). El receptor llamado GCR1 (Pandey y Assmann, 2004), interactúa con la subunidad  $\alpha$  y modificaría la unión a GTP de esta proteína (Colucci y col., 2002), sin embargo no se ha podido encontrar el ligando y por esto no ha sido considerado un verdadero GPCR.

GCR2 también fue postulado como un GPCR en plantas (Liu y col., 2007) sin embargo, varios trabajos no parecerían apoyar esta propuesta y hoy en día no es considerado como un verdadero GPCR. Por el momento los llamados GTG1 y GTG2 serían los únicos GPCRs que cumplirían con los requerimientos de un verdadero receptor asociado a proteína

G heterotrimérica: presentan homología con un GPCR de mamíferos, poseen actividad GTPasa, interactúan con GPA1 y se conoce su ligando, en este caso el ácido abscísico (ABA) (Pandey y col., 2009).

### **2.2.5 – Proteínas reguladoras de la actividad de la subunidad $G\alpha$**

En general, existen dos tipos de proteínas capaces de regular la actividad de la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas: aquellas que favorecen el intercambio de GDP por GTP, activando el sistema; y aquellas que favorecen la hidrólisis del GTP a GDP, volviendo el sistema a su estado inactivo original. Los receptores GPCRs convencionales funcionarían como proteínas GEF controlando el paso limitante en el ciclo de intercambio de guanosina: la liberación de GDP de la subunidad  $\alpha$  y la concomitante unión a GTP. Aquellas proteínas reguladoras de las proteínas G que favorecen la hidrólisis de GTP se conocen como proteínas GAP (por *GTPase activating protein*). Particularmente en mamíferos existen más de 30 genes que codifican para proteínas llamadas RGS (por *Regulator of G signaling*). Las proteínas RGS actúan como proteínas del tipo GAP, acelerando la actividad GTPasa intrínseca de  $G\alpha$  y la concomitante hidrólisis del GTP (Koelle, 1997).

Se realizó una búsqueda por homología de las secuencias de los genes RGS de mamíferos sobre la base de datos del genoma de Arabidopsis (Chen y col., 2003). Nuevamente, en contraste a lo que sucede en células de mamíferos que poseen varios tipos de proteínas reguladoras del tipo RGS con funciones caracterizadas, en plantas solo se ha identificado una única proteína RGS1 (Chen y col., 2003). Se halló un único marco de lectura abierto que contenía una secuencia RGS *Box* en el extremo C-terminal de la proteína y un extremo N-terminal que por su secuencia aminoacídica tendría 7 pasos transmembrana (Chen y col., 2003). Realizando otra búsqueda en la base de datos de Arabidopsis utilizando los extremos N y C terminal de RGS no se encontró otro marco de lectura abierto, con lo cual RGS1 en Arabidopsis parecería ser el único miembro de esa familia (Chen y col., 2003). En Arabidopsis RGS1 actúa como una proteína del tipo GAP, durante la señalización principalmente inducida por azúcares (Chen y col., 2003).

### 2.2.6 – Velocidad de intercambio de nucleótidos guanina en la subunidad $G\alpha$ de *Arabidopsis*

Un estudio reciente realizado con la proteína *AtGPA1* recombinante mostró que la unión de GTP radiactivo sucedía con una  $K_{obs}$  veintidós veces más alta que la de mamíferos, y también demostró que la proteína recombinante *AtGPA1* tiene una de las actividades GTPasa más lentas descritas (Johnston y col., 2007). Además, ensayos realizados con una proteína recombinante *AtRGS1* que llevaba una mutación puntual demostraron que *AtRGS1* acelera la actividad GTPasa de *AtGPA1*. Todos estos datos sugieren que, la hidrólisis de GTP más que la liberación de GDP sería el paso limitante en el ciclo de intercambio de nucleótidos de guanina de *AtGPA1*, en contraste con lo que sucede en animales donde el intercambio de nucleótidos es el paso limitante en el ciclo de proteínas G heterotriméricas (Johnston y col., 2007).

### 2.2.7 – Efectores de la subunidad $G\alpha$

Una técnica muy utilizada para conocer más detalladamente qué proteínas se encuentran río abajo de las proteínas G heterotriméricas ha sido el empleo de la técnica de dos híbridos permitiendo encontrar algunas proteínas que interactúan físicamente con *AtGPA1*:

**Fosfolipasa D (PLD1):** Mediante técnicas de inmunoprecipitación y por medio de mutaciones en dominios específicos se demostró que  $PLD\alpha 1$  interactúa con *AtGPA1*, y que el motivo DRY de  $PLD\alpha 1$  es esencial para que ocurra esta interacción (Zhao y Wang, 2004).  $PLD\alpha 1$  se une preferentemente a  $G\alpha$  cuando la subunidad está unida a GDP pero esta unión se inhibe cuando se une a GTP.

Cuando las plantas se encuentran bajo estrés hídrico se produce la acumulación de la hormona ABA (ácido abscísico), que controla la pérdida de agua regulando el cierre de los estomas. Se observó que tanto *AtGPA1* como *AtPLD $\alpha$ 1* son reguladores positivos de la inhibición de la apertura de los estomas mediada por ABA (Mishra y col., 2006).

**AtPirin1** (*Prn1 pirin domain protein*) es un cofactor transcripcional miembro de la familia de proteínas que poseen un dominio *Cupin*. Esta proteína interactúa físicamente con *AtGPA1* y los mutantes *pirin1* presentan un fenotipo similar a los mutantes *gpa1* (Lapik y Kaufman, 2003). La evidencia genética y bioquímica sugiere que *AtPirin1* funcionaría inmediatamente río abajo de *AtGPA1* en la regulación de la germinación y desarrollo de plántulas de *Arabidopsis*. En otro trabajo se demostró además, que GCR1, GPA1, Pirin1, la señal de transcripción NF-Y, y la secuencia CCAAT regulan la expresión del gen *LHCB* (*Light harvesting complex*) en la vía de señalización de la luz azul (Warpeha y col., 2007).

**Preferato deshidratasa** (*AtPD1*) es la enzima citosólica responsable de convertir el preferato en fenilpiruvato, el cual es un precursor en la vía de generación de la fenilalanina. Se vio que *AtPD1* interactúa con la forma activada de *AtGPA1* (*GPA1-GTP*) *in vitro* (Warpeha y col., 2006).

**THF1** (*thylakoid formation*) Esta proteína plastídica también interacciona con *AtGPA1* y funcionaría río abajo del camino de transducción de *AtGPA1* que conduce al desarrollo de las raíces en la señalización por azúcares (Huang y col., 2006).

Además de los efectores ya mencionados que interactúan físicamente con *AtGPA1* existen otros componentes:

**Canales de  $K^+$** : La actividad de estos canales son regulados por la subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica en células de la guarda (Wang y col., 2001). Durante la apertura de los estomas el  $K^+$  entra en estas células por medio de los canales transportadores de  $K^+$ .

La apertura estomática se basa en el incremento de  $K^+$ ,  $Cl^-$ , malato<sup>2-</sup> y sacarosa en el espacio simplástico de las células de la guarda. La presencia de estas moléculas en el simplasto produce la entrada de agua y las células de la guarda se hinchan, esta hinchazón de las células estomáticas hace que el estoma se encuentre abierto.

Durante la inhibición de la apertura de los estomas por ABA, la apertura de estos canales son inhibidos, por lo tanto no hay influjo de iones  $K^+$ .

En plantas de *Arabidopsis* mutantes *gpa1* el influjo de los iones  $K^+$  es insensible a la inhibición por ABA. Es decir que es necesaria la presencia de *AtGPA1* para que se produzca la inhibición de los canales de  $K^+$  por medio de ABA (Wang y col., 2001).

**Canales de  $Ca^{2+}$ :** La subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica incrementaría la apertura de los canales de calcio en la membrana plasmática de células de tomate (Aharon y col., 1998), y sería un modulador de la concentración de calcio citosólico durante la germinación del polen de *Arabidopsis* (Wu y col., 2007).

**Fosfolipasa C (PI-PLC):** La fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol es una proteína que está implicada en varios procesos celulares y del desarrollo, como por ejemplo, cierre de los estomas (Staxén y col., 1999), organización del citoesqueleto (Kovar y col., 2000) y en el crecimiento del tubo polínico (Kost y col., 1999). *AtGPA1* activaría a PI-PLC durante el ciclo de división celular mas específicamente promoviendo la síntesis de ADN (Apone y col., 2003).

### **2.3 - Funciones de la subunidad $\alpha$ de la proteína G heterotrimérica**

El primer mutante *gpa1* en *Arabidopsis* fue obtenido hace nueve años atrás (Ullah y col., 2001), y si bien se realizaron muchos avances en cuanto al conocimiento de sus funciones, la mayoría de los componentes que intervienen en la cadena de transducción del sistema de proteínas G heterotriméricas en plantas no son completamente conocidos.

Ensayos genéticos y bioquímicos realizados con el mutante *gpa1* junto con la evidencia que GPA1 se encuentra expresada en casi todos los tejidos de *Arabidopsis* (Weiss y col., 1993) sugieren que esta proteína está involucrada en un gran número de procesos del desarrollo de las plantas.

#### **2.3.1 – Funciones de GPA1 durante el desarrollo de Arabidopsis**

##### **2.3.1.1 – Señalización de GPA1 en la semilla**

La germinación es un fenómeno que es regulado por varias señales, entre ellas se encuentran las hormonas, la luz y los azúcares.

Los mutantes *gpa1* muestran un retraso en la germinación con respecto al de las semillas salvajes (Lapik y Kaufman, 2003), sugiriendo que se encuentran en mayor estado de dormición. Consistente con este fenómeno las mutantes *gpa1* presentan una mayor sensibilidad a la inhibición de la germinación mediada por ABA y azúcares (Ullah y col., 2002).

Por otro lado, *AtGPA1* también está involucrada en la germinación mediada por giberelinas y brasinoesteroides. Semillas mutantes de *gpa1* resultaron cien veces mas insensibles a la inducción de la germinación por giberelinas (Ullah y col., 2002), y la germinación fue reducida cuando se aplicaba brasinoesteroides exógenamente (Chen y col., 2004). También recientemente, se demostró que *AtGPA1* modularía la inducción de la germinación mediada por luz a través de los sistemas de fotorreceptores resultando indispensables para el control de la germinación (Botto y col., 2009).

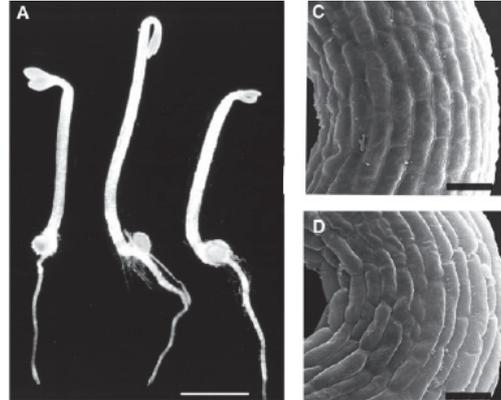
El mecanismo por el cual todas estas señales son integradas por las plantas para controlar la germinación no es del todo conocido, pero un posible mecanismo involucraría el acoplado y *cross talk* entre estas señales mediada por la proteína G heterotrimérica (Assmann, 2002).

### **2.3.1.2 – Señalización de GPA1 en plántulas**

Cuando una semilla germina en completa oscuridad, es decir por debajo de la superficie del suelo, la plántula se desarrolla con un patrón de crecimiento etiolado caracterizado por hipocotilos largos, cotiledones cerrados y una estructura en forma de gancho en la porción apical del hipocotilo, llamado gancho apical o plumular (Fig. 4A, central). De esta manera se optimiza la llegada de los cotiledones por sobre la superficie del suelo minimizando el daño de los mismos. En contraste, cuando las plántulas son expuestas a la luz se produce el fenómeno conocido como desetiolación, caracterizado por la inhibición del alargamiento del hipocotilo, la apertura del gancho apical, la apertura y expansión de los cotiledones y la activación de los genes de la maquinaria fotosintética entre las respuestas más importantes.

El mutante *gpa1* presenta un hipocotilo más corto que el genotipo salvaje y el gancho apical abierto cuando las plantas crecen en oscuridad y sacarosa (Fig. 4) (Ullah y col., 2001).

**Figura 4.** (A) Diferencias morfológicas entre una plántula salvaje (centro) y dos alelos mutantes *gpa1* (extremos). (C y D) Microscopía electrónica de la región del gancho plumular en plántulas mutante *gpa1* (C) y salvajes (D)



En la región del gancho apical, los mutantes *gpa1* (Fig. 4C) presentan un menor número de células que en el genotipo salvaje (Fig. 4D). Mediante el estudio de la expresión de un gen mitótico fusionado a un gen reportero (GUS) en mutantes *gpa1* se observó una disminución de la división celular en tejidos aéreos de plántulas de *Arabidopsis* sugiriendo que *AtGPA1* sería un regulador positivo de la proliferación celular (Ullah y col., 2001).

Contrariamente a lo observado en el mutante *gpa1*, las plántulas mutantes *rgs1* presentan un hipocotilo alargado como resultado de un aumento en la división celular (Chen y col., 2003), lo cual es consistente con la hipótesis de que las proteínas RGS se oponen a la activación de  $G\alpha$ .

### 2.3.1.3 – Señalización de GPA1 en plantas adultas

Cuando son crecidos en luz las plantas mutantes *gpa1* presentan las hojas de las rosetas redondeadas y más grandes debido a que las células son de mayor tamaño que las de genotipo salvaje (Fig.5) lo que compensaría la disminución en la tasa de división celular (Ullah y col., 2001).

En la fase reproductiva del desarrollo de la planta se observó que el mutante *gpa1* presenta silicuas más largas y finas que el genotipo salvaje (Ullah y col., 2003).

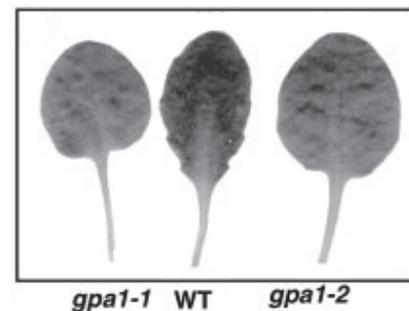
Los estomas son los encargados de controlar el intercambio de gases a través de la superficie de las hojas, permitiendo que ingrese el dióxido de carbono necesario para la fotosíntesis y al mismo tiempo disminuyendo la pérdida de agua en forma de vapor.

Una serie de experimentos se realizaron con el propósito de caracterizar la función de GPA1 en la señalización que controla a los estomas (Wang y col., 2001). Estos estudios revelaron que la apertura de los estomas en los mutantes *gpa1* es insensible a la inhibición por ABA provocando que la tasa de pérdida de agua sea mayor en estos mutantes que en el genotipo salvaje (Wang y col., 2001). De la misma manera que para la apertura de los estomas, el influjo de iones  $K^+$  fue insensible a ABA en las plantas mutantes (Wang y col., 2001). Estos resultados sugieren que GPA1 sería necesaria en la respuesta de la inhibición de la apertura estomática y del influjo de iones  $K^+$  mediada por ABA.

También se observó que GPA1 estaría involucrada en la vía de señalización de ABA mediada por la fosfolipasa  $D\alpha 1$  ( $PLD\alpha 1$ ) en estomas. Se vio que *AtGPA1* interacciona con *AtPLD $\alpha 1$*  y que esta interacción modularía la función de GPA1 en la apertura y cierre de los estomas (Mishra y col., 2006).

El crecimiento y desarrollo de las raíces es otro aspecto regulado por GPA1. El desarrollo de la raíz involucra un balance entre la división celular en los meristemas laterales y del ápice de la raíz, y la posterior elongación de estas células. Los meristemas laterales se originan de células que difieren de las células que originan el meristema primario. Estudios realizados con el mutante *rgs1* muestran que poseen raíces primarias más largas debido a que tienen aumentada la producción de esas células en un medio suplementado con glucosa (Chen y col., 2003). Consistente con estos resultados, el mutante *gpa1* presenta raíces más cortas que el genotipo salvaje (Huang y col., 2006) sugiriendo que  $G\alpha$  estaría implicado en modular la división celular en el meristema de las raíces primarias.

Además mediante la expresión de un transgén que codifica para una proteína *AtGPA1* mutante que carece de su actividad GTPasa se observó una aceleración en la división celular



**Figura 5.** Fenotipo de hojas de plantas salvajes y *gpa1* mutantes.

en el meristema de la raíz primaria, por lo tanto se postuló que el efecto de *AtGPA1* sería el de modular un incremento del estado basal de la división (Pandey y Assmann, 2004).

### **2.3.2 – Señalización de GPA1 en respuesta a diferentes estímulos ambientales**

Las proteínas G están implicadas en varias vías de señalización que transmiten estímulos producidos por estrés, tanto producidas por factores bióticos como abióticos.

Entre los factores bióticos se encuentran las señales producidas por moléculas propias de patógenos y que son reconocidas por la planta, y entre los factores abióticos los producidos por la deficiencia de agua, el tratamiento con ozono (O<sub>3</sub>) o luz.

#### **2.3.2.1 - Señalización de GPA1 en respuesta a defensa contra patógenos**

La mayoría de los patógenos llegan al interior de la planta por medio de los orificios naturales de la superficie de la misma, y particularmente los estomas ofrecen una puerta de entrada para que ocurra la infección. Se realizó un estudio en *Arabidopsis* con el objetivo de investigar si GPA1 estaría implicada en la inhibición de la apertura de los estomas mediada por un péptido derivado de la flagelina (Flg22) que es producido por especies de eubacterias flageladas. Se observó que la inhibición de la apertura de los estomas por el péptido Flg22 no se producía cuando se infectaban plantas mutantes *gpa1* (Zhang y col., 2008).

#### **2.3.2.2 - Ozono (O<sub>3</sub>)**

La exposición a altos niveles de ozono (O<sub>3</sub>) produce lesiones foliares. Luego del tratamiento con O<sub>3</sub> hojas de plantas de genotipo salvaje resultaron extensivamente dañadas, mientras que las mutantes *gpa1* resultaron muy poco dañadas y claramente menos sensibles al daño tisular por O<sub>3</sub> (Joo y col., 2005). Este trabajo muestra que el proceso oxidativo que genera especies reactivas de oxígeno requiere de la proteína G<sub>α</sub>.

### 2.3.2.3 – Luz

La transducción de las señales iniciadas por luz fue de las primeras vías de señalización en las que se observó la participación de las proteínas G heterotriméricas. Los primeros experimentos realizados utilizando aproximaciones farmacológicas sugerían que la subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica en tomate estaría involucrada en el camino de señalización por luz (Neuhaus y col., 1993; Bowler y col., 1994). Recientemente, dos trabajos publicados muestran que GPA1 estaría involucrada en dos respuestas mediadas por fotorreceptores: la sensibilidad a la germinación de semillas (Botto y col., 2009) y la muerte celular programada en hipocotilos de plántulas (Wei y col., 2008). Por otro lado, experimentos genéticos y moleculares muestran que existen al menos dos caminos de señalización iniciados por la luz azul en los que está involucrado GPA1. Un camino involucra a GCR1, GPA1 y la pteridina deshidratasa PD1 (Warpeha y col., 2006) y el segundo camino involucra a Pirin1, la señal de transcripción NF-Y, y la secuencia CCAAT que regulan la expresión del gen *LHCB* (Warpeha y col., 2007).

El estudio de los mutantes *gpa1* mostró que cuando estos mutantes eran crecidos bajo luz roja o roja lejana mostraban el mismo fenotipo que la planta salvaje (Jones y col., 2003). Estos resultados sugirieron que GPA1 no estaría directamente implicada en la respuesta a las señales de luz roja y roja lejana en la regulación del alargamiento del hipocotilo (Jones y col., 2003).

### 2.4 – Asociación de las proteínas G heterotriméricas con la fosforilación de proteínas

Cuando la proteína heterotrimérica G es activada, luego de la disociación de sus subunidades, una de sus funciones es la de regular proteínas que se encuentran río abajo. Esta regulación es ejercida indirectamente mediante la regulación de quinasas y fosfatasas que fosforilan y desfosforilan respectivamente proteínas que se encuentran en esta cascada de señalización. Esto sugiere que en mutantes para alguna de las subunidades de la proteína G heterotrimérica el patrón de proteínas fosforiladas presente una variación con respecto a una planta salvaje. A favor de esta hipótesis se observó que la actividad quinasa medida en extractos de células BY2 fue mayor en los extractos provenientes de plantas sobreexpresantes de GCR1 que del genotipo salvaje (Apone y col., 2003).

### 3 – Planta modelo de estudio: *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* posee características únicas que ofrecen una serie de ventajas a la hora de considerarla como modelo de investigación. En primer lugar, es diploide con un ciclo de vida muy corto (6-8 semanas), de fecundación autógena, y produce numerosas semillas que permanecen viables durante muchos años.

En segundo lugar, posee el genoma más pequeño del reino vegetal con un tamaño de 125 Mb, cinco cromosomas, y relativamente escasas secuencias repetidas. Además un gran porcentaje de sus genes guardan alta homología con otras especies, lo que hace de esta especie, un sistema ideal para estudios genéticos y moleculares.

Que la subunidad  $\alpha$  (GPA1) esté codificada por un único gen confiere una ventaja a la hora de querer trabajar con mutantes nulas para esta subunidad.

Como expusieramos más arriba GPA1 está implicada en vías de señalización mediadas por muy diversos estímulos como hormonas, luz, ozono, patógenos, azúcares y su acción se ha visto implicada en muchos procesos vitales para las plantas como la germinación, desetiación, la respuesta al estrés, la división celular y aspectos morfológicos. Si bien se ha avanzado considerablemente en entender la función y en que procesos está involucrada esta proteína, se conoce poco hasta la fecha de cómo se establece la cadena de traducción río abajo de las mismas y de cuales son las proteínas que regula directa o indirectamente.

Con el objetivo de profundizar con más detalle cuales proteínas podrían estar involucradas en el camino de señalización de GPA1 decidimos estudiar los cambios en la expresión de proteínas entre la planta salvaje y el mutante *gpa1* utilizando como herramienta el estudio de geles bidimensionales. Esta técnica permite no solo la comparación en el perfil de proteínas de diferentes genotipos o tratamientos sino que además permitiría observar cambios en los patrones postraduccionales.

#### 4 – Estudios de perfiles proteicos

Los avances logrados en la secuenciación del genoma han generado gran información para muchos organismos modelo incluyendo *Arabidopsis thaliana*. Al mismo tiempo, solo el conocimiento de las secuencias no es suficiente para responder a preguntas biológicas concernientes a la función de un gen, a la biología del desarrollo o a algún proceso bioquímico. Hoy en día al 40% de las proteínas codificadas por el genoma de *Arabidopsis* no se les ha asignado ninguna función.

Para comprender mas precisamente cómo funcionan y se integran en una célula los procesos de transducción de señales se ha comenzado a utilizar nuevas técnicas que permiten estudiar los cambios globales de la expresión de genes (transcriptoma), de los productos proteicos (proteoma) y de los metabolitos (metaboloma). Las técnicas para analizar cambios en el transcriptoma, los llamados microarreglos de ADN, han permitido la identificación global de genes regulados por GPA1, revelando la participación de esta proteína en la señalización del ácido jasmónico (Okamoto y col., 2009). Por otro lado, el estudio del transcriptoma de los mutantes en la subunidad  $\beta$  de la proteína G heterotrimérica mostró que esta subunidad regularía un buen número de genes inducibles por auxinas (Ullah y col., 2003).

Queda claro que el análisis del transcriptoma utilizando la técnica de microarreglos es una herramienta sumamente útil y poderosa, sin embargo, la abundancia de un mensajero podría representar solo una función especulativa ya que la relación entre los niveles de los mensajeros y las proteínas no siempre se correlaciona (Tian y col., 2004; Gygi y col., 1999). Queda claro que un único gen puede generar varias proteínas con diferentes funciones y localizaciones. El *splicing* alternativo de los mensajeros puede producir combinaciones únicas en lo exones. Más aún, hoy sabemos que la regulación funcional y estructural de las proteínas está dada por mecanismos postraduccionales específicos como fosforilación, acetilación, glicosilación y ubiquitinación.

La investigación proteómica actual está dirigida a identificar nuevas proteínas relacionadas con su función y en última instancia develar como está controlada su expresión dentro de redes de regulación. Además, los trabajos de construcción de proteomas complejos como por ejemplo el proteoma del tallo de arroz (1999) (Komatsu y col, 1999) han ido

derivando hacia proteomas ligados a la función, analizando subproteomas de orgánulos propios de plantas, como el cloroplasto (Kleffmann y col., 2004).

#### **4.1 – Preparación de las muestras proteicas a partir de tejido vegetal**

Encontrar un método de extracción apropiados es crucial, ya que la cantidad y número de proteínas solubles depende fuertemente de los tejidos de partida (Stasyk y col., 2001). En la bibliografía se pueden encontrar numerosos trabajos dedicados a la obtención, preparación y solubilización de proteínas de tejidos vegetales, y la optimización para diferentes tejidos, incluyendo centrifugaciones diferenciales, fraccionamiento subcelular, etc. Los tejidos verdes a menudo representan un material de partida complicado para la extracción de proteínas y su posterior estudio mediante electroforesis bidimensional (Rose y col, 2004). En general los contenidos de proteínas son bajos comparados con cultivos de microorganismos y otros tejidos animales. Además los tejidos vegetales son ricos en compuestos que producen interferencias y pérdida de reproducibilidad (contenido en sales, ácidos orgánicos, fenoles, proteasas endógenas, ligninas, pigmentos terpenos, ceras etc.). Además los tejidos vegetales suelen presentar grandes cantidades de sales e iones en disolución que pueden provocar efectos negativos tanto en la solubilización como en la migración de las proteínas.

#### **4.2 – La técnica de geles bidimensionales**

El método clásico para el estudio de la expresión de genes en términos de proteómica es el de geles en dos dimensiones (2D).

La técnica de geles 2D tiene la capacidad de resolver una mezcla compleja de proteínas permitiendo el análisis simultáneo de cientos o miles de productos génicos. Particularmente en los últimos años los geles 2D han tomado un impulso muy grande ya que se han visto facilitados por los avances en la espectrometría de masa, la secuenciación y la anotación del genoma.

La técnica de geles 2D permite separar una mezcla de proteínas primero según su punto isoeléctrico mientras que en la segunda dimensión las separa por su peso molecular. La

combinación de ambas técnicas de separación resuelve las proteínas en *spots* que se distribuyen en un mapa de dos dimensiones, donde cada *spot* es fijado en una coordenada determinada por su punto isoelectrico y peso molecular. Estos mapas pueden ser considerados la huella dactilar de una muestra de proteínas, y pueden compararse mapas provenientes de diferentes tratamientos o genotipos para analizar los cambios o aparición/desaparición de una proteína. Muy brevemente, luego que los geles son corridos en la primera y segunda dimensión, son teñidos con solución de *Coomassie Blue* o con el método de nitrato de plata y luego los geles son *scaneados* para localizar y cuantificar los *spots* de ambos geles. Finalmente se aíslan los *spots* que aparezcan diferencialmente expresados. Las proteínas en dichas porciones de geles son luego digeridas en péptidos que son finalmente extraídos para su posterior inyección en el espectrómetro de masa. De allí se obtendrán las secuencias de dichos péptidos que luego serán utilizados para identificar la proteína original.

Las mejoras técnicas en el uso de los geles 2D han permitido la reproducibilidad de los geles y la facilidad de su uso. Hoy en día se utilizan geles comerciales en forma de tiras de poliacrilamida con inmobilinas, esto es con un gradiente de pH inmovilizado. Esta propiedad lo hace altamente reproducible.

Estas tiras pueden adquirirse con varios rangos de pH. Los gradientes amplios (8 unidades de pH) permiten dar una primera idea de la distribución de las proteínas de la muestra, y los gradientes más acotados (1 o 3 unidades de pH) permiten aumentar la resolución. Los rangos de pH se combinan con diferentes longitudes (de 7, 13, 18 y 24 cm.). La segunda dimensión se realiza como una corrida electroforética SDS-PAGE estándar.

Otra técnica recientemente muy utilizada es la de *Differential in gel electrophoresis* (DIGE) la cual permite la comparación de dos muestras diferentes en un mismo gel. La técnica de DIGE se basa en utilizar diferentes fluoróforos para marcar las proteínas que provengan de muestras diferentes. Para poder visualizar los resultados se escanea el gel con filtros específicos para los fluoróforos y se realiza la comparación. La gran ventaja de esta técnica es que como las muestras están juntas se elimina la variación de gel a gel. Sin embargo, el alto costo de los reactivos y el requerimiento de un scanner con filtros especiales para obtener las imágenes de los geles fluorescentes constituyen una desventaja.

Otra ventaja es que los geles 2D permiten en algunos casos discriminar cambios en los patrones de migración de proteínas debido a cambios postraduccionales como fosforilación, glicosilación, etc. La adquisición de grupos fosfatos cargados negativamente produce un corrimiento horizontal de la proteína hacia pHs más ácidos. Las diferentes isoformas de una proteína fosforilada pueden ser así visualizadas en un gel ya que presentan un patrón como “collar de perlas” (Bykova y col., 2003). Cada *spot* que forma parte del collar representa una isoforma de la proteína fosforilada. La fosforilación de un residuo de serina o treonina produce un incremento en la masa del residuo aminoacídico receptor del fosfato de 80 Daltons (Da), aumentando la masa molecular normal de estos de 87 Da a 167 Da. (Mann y Jensen, 2003).

La obtención de los mapas proteómicos del mutante *gpa1*, que aquí proponemos nos dará información acerca de proteínas novedosas involucradas en la transducción de señales mediadas por las proteínas G heterotriméricas en plantas durante el desarrollo de *Arabidopsis*. Además podría proveer de información no anotada en bases de datos como cambios postraduccionales. Al mismo tiempo, en un futuro la identificación y el estudio de la función biológica de dichas proteínas proveerá de un mejor entendimiento de los caminos de señalización mediados por proteínas G heterotriméricas.

## **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

## 1 - Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es estudiar los mecanismos moleculares y las proteínas involucradas en la transducción de señales mediadas por la proteína heterotrimérica G durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. En esta tesis utilizaremos la técnica de geles bidimensionales para el análisis global de cambios en la expresión de proteínas y así identificar y caracterizar nuevas proteínas involucradas en la transducción de señales mediadas por la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica en Arabidopsis.

Los caminos de transducción en los que participan las proteínas G heterotriméricas es un área de gran importancia en la biología vegetal, ya que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas. Entender como es este patrón de crecimiento y como puede alterarse tiene gran importancia económica para el crecimiento de las plantas en cultivos. Si bien Arabidopsis no es una planta de interés agronómico sí es un excelente modelo para el estudio de los caminos de transducción dada su versatilidad y fácil manipulación genética. Además, la mayoría de sus genes se encuentran en casi todas las especies de interés agronómico.

Adicionalmente, muchos descubrimientos relevantes para la salud humana o tratamiento de enfermedades han sido elaborados utilizando a Arabidopsis como modelo, y muchos procesos importantes en la biología humana han sido mejor estudiados en este organismo tan versátil. El caso de las proteínas G heterotriméricas es uno de estos casos (Jones y col., 2008).

Si bien el genoma de Arabidopsis está totalmente secuenciado, el esfuerzo y desafío hoy en día es conocer y estudiar la función de muchos de estos genes. La obtención de los mapas proteómicos que aquí proponemos dará nueva información acerca de proteínas involucradas en la biología de plantas. Las proteínas diferencialmente expresadas obtenidas a partir de este trabajo y su caracterización posterior proveerán de un mejor entendimiento de los caminos de señalización mediados por GPA1. Además proveerá de información no anotada en las bases de datos tales como cambios postraduccionales de proteínas, o proteínas modificadas diferencialmente por el mecanismo de *splicing* alternativo.

## **2 - Objetivos Particulares**

En esta tesis plantearemos tres objetivos particulares

1- Obtener el mutante homocigota *gpa1* a partir de una población de semillas de *Arabidopsis thaliana* con inserción de ADN-T.

2- Obtener y comparar, en plántulas crecidas durante tres días en sacarosa y oscuridad y en hojas de plantas adultas, los proteomas específicos entre el genotipo salvaje y mutante *gpa1* utilizando la técnica de geles bidimensionales.

3- Analizar estadísticamente las proteínas diferencialmente expresadas y las posibles modificaciones postraduccionales.

## **3 - Hipótesis de Trabajo**

Los mecanismos moleculares que dan cuenta del fenotipo distintivo entre el genotipo salvaje y el mutante *gpa1* se desconocen en su mayor parte. Nuestra hipótesis de trabajo es que la subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica modula la expresión y/o modifica la conformación de otras proteínas regulatorias que se encontrarían río abajo en la señalización.

Para detectar los cambios ocurridos en las proteínas utilizamos el análisis proteómico mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. Si la hipótesis fuese cierta se deberían observar cambios en la expresión de algunas proteínas cuando se compara los perfiles proteicos entre una planta salvaje y una mutante que carece de GPA1.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1 - Material vegetal. Tratamientos

Los experimentos se realizaron utilizando plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Columbia*. Para todos los experimentos se utilizaron plantas de genotipo salvaje y mutante por inserción (ver resultados punto 1) en el gen *AtGPA1*.

Se sembraron semillas del genotipo salvaje y mutante en cajas de plástico transparente en un medio MS (medio mínimo) (Tabla 1) suplementado con 1% de sacarosa y se mantuvieron en completa oscuridad a 4°C. Luego de 3 días se expusieron las semillas durante 4 horas a la luz blanca y a 23°C con el propósito de sincronizar la germinación de ambos genotipos. Luego se mantuvieron en completa oscuridad a 23°C y se cosecharon las plántulas 3 días mas tarde.

Algunas de las plántulas fueron transplantadas a macetas conteniendo una mezcla de vermiculita, perlita, turba (1:1:1) y regadas una vez por semana con solución nutritiva (nombre comercial *Hakaphos*) (Tabla 1). Las macetas se mantuvieron en fotoperiodos continuos de luz (50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) a 23°C. Se cosecharon las hojas de rosetas de plantas adultas.

Medio Murashige-Skoog (MS)		Hakafos: Composición		%
MnO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	22,3 mg.L <sup>-1</sup>	Nitrógeno Total (N)		7
ZnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	8,6 mg.L <sup>-1</sup>	Nítrico (NO <sub>3</sub> )		7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg.L <sup>-1</sup>	Amoniacal (NH <sub>4</sub> )		0
KI	0,83 mg.L <sup>-1</sup>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Soluble en agua y citrato		12
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25 mg.L <sup>-1</sup>	K <sub>2</sub> O Soluble en agua		40
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025 mg.L <sup>-1</sup>	Magnesio (MgO)		2
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,025 mg.L <sup>-1</sup>	Azufre (S)		4,4
EDTA Na <sub>2</sub>	37,3 mg.L <sup>-1</sup>	Boro (B)		0,02
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27,85 mg.L <sup>-1</sup>	Cobre (Cu-EDTA)		0,019
		Hierro (Fe-EDTA)		0,05
		Manganeso (Mn-EDTA)		0,05
		Molibdeno (Mo-EDTA)		0,001
		Zinc (Zn-EDTA)		0,019

**Tabla 1.** Composición de los medios utilizados para el crecimiento de las plantas MS y solución nutritiva *Hakaphos*.

Para definir la etapa del desarrollo en que se encontraron las plantas nos guiamos según las definiciones descritas por Boyes (Boyes y col., 2001). Se cosecharon las hojas de rosetas cuando éstas presentaban entre 10 y 11 hojas (estadio 1.10 y 1.11).

## **2 - Identificación del mutante *gal***

Las semillas de las cual partimos provinieron de una generación F3 recibidas de *SIGNAL T-DNA Expression Center*, San Diego (<http://signal.salk.edu>). En la población de semillas recibidas, se pueden encontrar semillas salvajes (sin inserción), heterocigotas u homocigotas mutantes para la inserción. Para discriminar entre los tres genotipos posibles, y encontrar así el homocigota mutante, realizamos reacciones de PCR con dos pares de oligonuclótidos diferentes, uno que permite identificar el alelo salvaje y otro par que identifique el alelo mutante como se detalla a continuación (Fig. 1). Las reacciones de PCR se realizaron a partir de ADN extraído de las hojas de cada plántula individualmente.

### **2.1- Extracción de ADN de plántulas y hojas de *Arabidopsis***

Se tomó la décima y undécima hoja de plántulas crecidas en cámaras de cultivo y se procedió a extraer el ADN con el siguiente protocolo.

- 1- Se colocaron entre 100-120 mg de tejido en un tubo.
- 2- El tejido se homogeneizó con un émbolo.
- 3- Se agregaron 350  $\mu$ l de *buffer* EB (ver abajo) y se incubó por 10 min a 65°C.
- 4- Luego se agregaron 100  $\mu$ l de SNIII (Acetato de potasio 3M, Ácido acético glacial 11% v/v), se mezcló por inversión y se lo dejó incubando en hielo durante 20 min.
- 5- Se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min a 4°C y se trasvasó el sobrenadante a un tubo nuevo.
- 6- El sobrenadante se lo trató con 1  $\mu$ l de RNAsa durante 30 min a 37°C.
- 7- Luego se precipitó el sobrenadante con 1 volumen de isopropanol.
- 8- Después de la precipitación se centrifugó el tubo a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C.
- 9- El sobrenadante de la centrifugación se descartó, el *pellet* se lavó con etanol 80% y se volvió a centrifugar a 10.000 rpm durante 5 min a 4°C.

- 10- Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se dejó secar a temperatura ambiente.  
 11- Por último se resuspendió en 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y se guardaron a -20°C las muestras.

Buffer EB:

- 50 mM Tris-HCl (pH8)
- 10 mM EDTA (pH8)
- 100 mM NaCl
- 1% SDS
- 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol

**2.2- Reacciones de PCR para la identificación de mutantes *gpa1***

El par de oligonucleótidos utilizados para identificar el alelo salvaje fueron GPA3-GPA4 y para identificar el alelo mutante se usó el par GPA3-Lba1.

**GPA3:** 5' – TACCAAGGACATCGCTGAGG – 3'.

**GPA4:** 5' – TGTCCACTCTATCCGGCGC – 3'.

**Lba1:** 5' – TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG – 3'.



**Figura 1.** Esquema de los sitios de unión de los oligonucleótidos para la caracterización de los mutantes.

**Ciclo de PCR**

- 1) 94°C --- 5'
- 2) 94°C --- 30''
- 3) 55°C --- 30''
- 4) 72°C --- 2'

- 5) Repetir 34 veces los ciclos 2-4
- 6) 72°C --- 10'
- 7) Final de ciclos

PCR	µl p/ tubo
H <sub>2</sub> O	17
<i>Buffer</i> TAE 10X	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1
dNTPs (10 mM)	0,5
Primer I (10 mM)	1
Primer II (10 mM)	1
Taq polimerasa	1
ADN	1
Volumen final	25

Los productos de la reacción de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio a 80V. Para la adquisición de la imagen de las bandas pertenecientes a los productos de la PCR se utilizó un transiluminador *Syngene (GeneGenius)*.

### 3. Análisis proteómico

#### 3.1 – Extracción de proteínas

Dependiendo del tejido del cual se extrajeron las proteínas se utilizaron diferentes protocolos de extracción.

Para la extracción de proteínas de plántula se utilizó el método del ácido tricloroacético (TCA) acetona (Santoni y col., 1994) el cual se basa en que el bajo pH del TCA inactiva las proteasas presentes en la muestra y la acetona permite la solubilización de las proteínas en la muestra.

Para la extracción del tejido de hoja se probó con el método de fenol (Isaacson y col., 2006) en el cual la presencia de fenol minimiza la proteólisis durante la extracción y separa las proteínas de compuestos que interfieren con la electroforesis.

### 3.1.1 Método de TCA/Acetona

Este protocolo se puso a punto para la extracción de proteínas de plántulas etioladas crecidas en oscuridad por 3 días.

Una vez crecidas las plántulas se las cosechó en cuarto oscuro equipado con una lámpara de luz verde. Al instante de cosechar las plántulas fueron congeladas en nitrógeno líquido para preservar el estado de las proteínas.

Se partió de 300 mg de tejido para cada genotipo (salvaje y *gpa1*).

- 1 – Se pulverizó el tejido en mortero con nitrógeno líquido.
- 2 – Se agregó 1 ml de *buffer* TCA/Acetona (90% acetona, 10% TCA) + 2% de  $\beta$  – mercaptoetanol cada 100 mg de homogenato.
- 3 – Se homogeneizó el tejido en homogenizador de vidrio. Luego se dejaron precipitando las proteínas una noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- 4 – Se centrifugaron las muestras a 5.000g a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 min.
- 5 – Se descartó el sobrenadante y se agregó 5 ml de Acetona fría al 80 %.
- 6 – Se centrifugaron las muestras a 5.000g a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Estos lavados se repitieron 3 veces.
- 7 – Se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente para terminar de eliminar la acetona presente.

### 3.1.2 Método de fenol

Las hojas, al igual que las plántulas, a medida que iban siendo cosechadas se colocaban en nitrógeno líquido.

- 1 – Se pulverizó el tejido en mortero con nitrógeno líquido.
- 2 – Se agregó 1 ml de *buffer* fenol (0,7 M sacarosa, 0,1 M KCl, 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM EDTA) + 2 % final de  $\beta$ -mercaptoetanol cada 100 mg de homogenato.

- 3 – Se homogenizó el tejido utilizando un homogenizador de vidrio. Se agregó el mismo volumen de fenol saturado con Tris-HCl, pH 8.
- 4 – Se agitó el tejido a 4°C durante 15 min.
- 5 – Se centrifugó a 5.000g a 4°C durante 30 min.
- 6 – Se conservó el sobrenadante (parte fenólica), se anotó el volumen obtenido, y se agregó el mismo volumen de *buffer* fenol. Este paso se repitió 3 veces.
- 7 – Se agregaron 5 volúmenes de 0,1 M de acetato de amonio en metanol frío y se guardó una noche a -20°C.
- 8 – Se centrifugó a 5.000g a 4°C durante 30 min.
- 9 – Se agregó al sobrenadante 2 volúmenes de metanol frío.
- 10 – Se centrifugó a 5.000g a 4°C durante 10 min. Estos lavados se repitieron 3 veces.
- 11 – Se descartó el sobrenadante y se agregó 2 volúmenes de acetona fría. Los lavados con acetona se repitieron 2 veces.
- 12 – Se centrifugó a 5.000g a 4°C durante 10 min.
- 13 – Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente para terminar de eliminar la acetona presente.

### **3.2 - Solubilización de proteínas**

Siguiendo con el protocolo, una vez evaporada la acetona se prosiguió con la solubilización de las proteínas.

Los *pellets* de ambos métodos fueron resuspendidos en 200 ul de *buffer* de isoelectroenfoco (7 M de urea, 2 M tiourea, CHAPS 4% (p/v)). La urea y tiourea son agentes caotrópicos que se utilizan para desnaturalizar las proteínas. El CHAPS es un detergente *zwitterionico* (el cual no posee carga) necesario para la solubilización de las proteínas cuando éstas están en presencia de agentes caotrópicos.

### **3.3 - Cuantificación de proteínas**

Una vez resuspendidas las proteínas se cuantificó la concentración de las mismas utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976).

Para que el detergente presente en el *buffer* de isoelectroenfoque no interfiera con la cuantificación, tanto la muestra como el *buffer* utilizado en la curva de calibración fueron diluidos a 1/5.

## 4 – Geles Bidimensionales 2D

El proceso para lograr un gel 2D consta de varias etapas:

- Hidratación de las tiras comerciales (*Immobiline DryStrip GE Healthcare*) con la muestra
- Primera dimensión (Isoelectroenfoque)
- Equilibrado de las tiras comerciales
- Segunda dimensión (Geles SDS-PAGE)
- Tinción de los geles (nitrato de plata o *Coomassie Blue*)

### 4.1 – Hidratación de las tiras comerciales

Una vez extraídas las proteínas, las mismas fueron cargadas en las tiras comerciales para ser corridas en su primera dimensión. Las tiras comerciales son geles que poseen un gradiente de pH inmovilizado a través del cual migrarán las proteínas y se situaran en su punto isoeléctrico correspondiente.

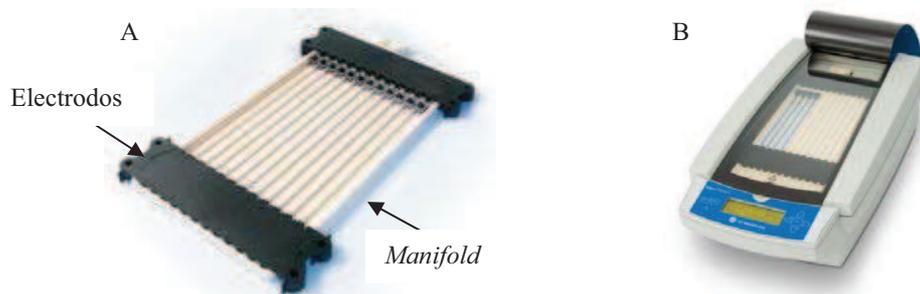
Se utilizaron tiras comerciales de 7 cm con rangos de pH de 3-10 o 4-7.

Se sembraron en todos los geles 200 ug de proteínas totales. Antes de sembrar se le agregó ditiotreitól (DTT) 50 mM, Anfolitos *Immobiline* (IGP *Buffer* Adecuado) 0.8%, azul de bromofenol 0.01% y se llevó a 125 ul de volumen final con *buffer* IEF. Luego se dejó la muestra en estufa a 30°C durante 1 hora y se la centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Este paso elimina cualquier partícula insoluble que podría dificultar la entrada de la muestra a la matriz de acrilamida de las tiras de isoelectroenfoque. El sobrenadante de cada muestra fue colocado por separado en cada una de las calles del *Immobilin DryStrip Reswelling Trays, GE Healthcare*, el cual se utiliza como reservorio para realizar la hidratación de las tiras. Luego se colocaron las tiras comerciales con la parte del gel hacia abajo en las calles que contenían las muestras. Se cubre cada una de las calles con 3 ml de aceite mineral (*Drystrip cover fluid, Amersham*) para prevenir la evaporación de la

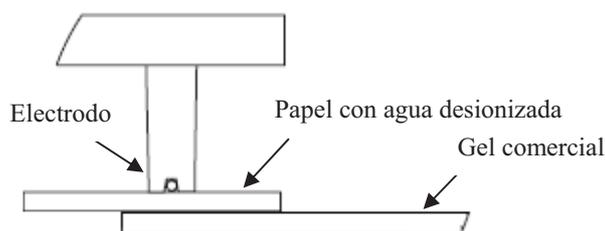
muestra y la cristalización de la urea. Por último se deja el reservorio con las muestras en una estufa a 30°C, por 16 horas.

#### 4.2 – Isoelectroenfoque (Primera dimensión)

Una vez completado el proceso de hidratación se colocaron las tiras comerciales con el gel hacia arriba en las calles del *manifold* (*Ettan IPGphor Manifold, GE Healthcare*) (Fig. 2A). Se colocaron dos papeles (*Paper electrode, GE Healthcare*) hidratados con 200 µl de agua deionizada cuya función es actuar como conectores de contacto entre la tira comercial y el electrodo (Fig. 3). Rápidamente se aseguraron los electrodos en el *manifold* y se colocó el conjunto electrodos-*manifold* en el aparato de IEF (*Ettan IPGphor 3 IEF System, GE Healthcare*) (Fig. 2B). Se completó la calle del *manifold* donde está colocada la tira comercial, con 4 ml de aceite mineral hasta cubrir totalmente la calle (el aceite se utiliza para evitar que la tira con la muestra aumente su temperatura y dañe la muestra).



**Figura 2.** A) Foto del conjunto *manifold*-electrodos. B) Foto de la unidad de Isoelectroenfoque (*Ettan IPGphor 3 IEF System*) con el conjunto *manifold*-electrodos ya en posición.



**Figura 3.** Esquema del armado del contacto entre el electrodo y el gel.

El protocolo de la corrida fue el siguiente:

- Temperatura de corrida: 20°C.
- Paso 1: 500 Volts/h por 30 min.
- Paso 2: 1000 Volts/h por 30 min.
- Paso 3: 5000 Volts/h por 1:40 horas, hasta un total de 9.000 V.

Finalizada la corrida, se escurrió la tira comercial y se guardó a -80°C hasta nuevo uso.

### **4.3 – Equilibrado de las muestras**

Antes de realizar la corrida electroforética SDS PAGE estándar, las tiras deben ser incubadas en *buffer* de equilibrio (*buffer* EI) (50 mM Tris-Hcl pH 8.8, 6 M urea, 30% glicerol, 2% SDS, 0,01% de azul de bromofenol (BPB)). Este paso es fundamental ya que asegurará que las proteínas estén cargadas negativamente para la corrida en la segunda dimensión (SDS-PAGE) y mantendrá el estado desnaturalizado de las mismas.

Se colocó la tira comercial en un tubo de 15 ml, con 4 ml de *buffer* de equilibrio, 40 mg de DTT sólido y se dejó incubando a temperatura ambiente con agitación durante una hora. Luego se traspasó la tira a otro tubo de 15 ml, con 4 ml de *buffer* de equilibrio y 180 mg de iodoacetamida sólida y se lo agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante una hora. La iodoacetamida permite alquilar los grupos tioles libres y evitar la reoxidación de las proteínas.

### **4.4 – Geles SDS-PAGE estándar (Segunda dimensión)**

Para la segunda dimensión se utilizaron geles 10% de acrilamida-bisacrilamida.

La tira comercial se sumergió 3 veces en *buffer* de corrida Tris Glicina 1X (ver abajo), SDS 0,15%.

En la calle del gel, se colocó la tira y sobre ésta, una solución que contenía 1 ml de agarosa 0,5% fundida en *buffer* de corrida y 30 ul BPB. Una vez solidificada la agarosa, se armó el dispositivo de geles, y se comenzó la corrida. Los geles se corrieron a 10 mA, hasta

llegar las muestras al final del gel concentrador (*stacking*), y luego a 25 mA en el gel separador (*running*). Como *buffer* de electroforesis, se utilizó Tris Glicina 1X, SDS 0,15%.

Tris Glicina 10X:

Tris	30,25 g
Glicina	144 g
Agua	1 litro

Buffer de craqueo 5X (CB 5X) (10 ml): Se utiliza únicamente cuando se corre la muestra en un gel de una sola dimensión.

SDS	10%
Glicerol	50%
$\beta$ -mercaptoetanol	25%
BPB	0,4 mg
Tris 1 M pH 7,4	1,25 ml
AGua	1,25 ml

#### **4.5 - Tinción de geles con solución de *Coomassie Blue***

Una vez finalizada la segunda dimensión, los geles fueron teñidos en una solución de *Coomasie* (*Coomasie* G-250 0,5 gr, sulfato de amonio 0.5 gr, 5.8 ml de ácido fosfórico 85% y llevar a 400 ml con agua). Este método utiliza una tinción progresiva, es decir las proteínas son teñidas progresivamente mientras el fondo permanece limpio. En este método, también conocido como *Coomasie* coloidal, el *Brillant Blue G* forma microprecipitados, que son excluidos del gel de acrilamida en medio ácido que contiene sulfato de amonio. Los microprecipitados actúan como un reservorio de moléculas de colorante así hay suficiente colorante para ocupar todos los sitios de unión en todas las proteínas. Así, no solo se obtiene mejor reproducibilidad sino también mayor sensibilidad.

Se mezclaron 4 partes de la solución de *Coomasie* con 1 parte de Metanol. Se dejó el gel teñiendo toda la noche. Se destiñeron con distintos lavados de agua, hasta obtener la claridad deseada de los geles.

Esta tinción con *Coomassie* es capaz de detectar desde 10 ng de proteínas (Kang y col., 2002).

## 5 – Análisis de los geles bidimensionales

Los geles una vez teñidos fueron escaneados utilizando el *Image Scanner III (GE Healthcare)* con una resolución de 200 dpi en escala de grises.

El análisis de los geles se realizó utilizando el *Image Master 2D Platinum software version 7.0 (GE Healthcare)*, el cual hizo posible la detección y cuantificación de los *spots*, y el *matching* de los *spots* entre los diferentes geles. El *matching* de *spots* que realiza el programa automáticamente permite identificar los *spots* que se encuentran representados en todos los geles (si el *spot* está presente sólo en un gel de tres, no forma *match* y ese *spot* no es tomado en consideración por el *software*).

Se analizó cada rango de pH (tanto el de 4-7 como el de 3-10) con 3 réplicas biológicas para cada genotipo.

Para compensar las posibles variaciones experimentales (cantidad de proteína que se cargó en cada gel, la tinción de los geles o su destinción) se utilizó como parámetro de comparación al volumen normalizado (volumen relativo) de cada *spot*. El volumen normalizado es la división del volumen de cada *spot* analizado por la suma de todos los volúmenes presentes en el gel.

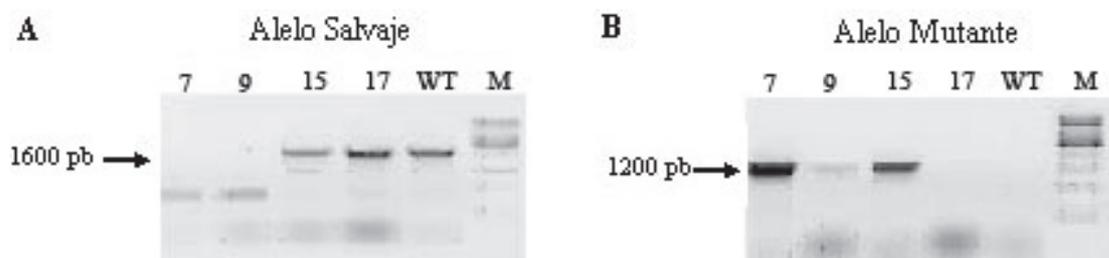
Para analizar la reproducibilidad de los genes dentro de las muestras independientes utilizamos dos aproximaciones. Primero, obtuvimos los datos de correlación entre las diferentes comparaciones de los tres geles o replicas (Por ejemplo si el gel WT1 fue elegido como gel de referencia, se obtuvieron los datos de correlación entre los *spots* que formaron un *match* entre WT1 y WT2 y entre WT1 y WT3 para cada rango de pH). Un dato de correlación alto entre los geles implica una alta reproducibilidad. Segundo, calculamos el coeficiente de variación a partir de los datos de volumen normalizado de todos los *spots* presentes en cada *match* y construimos gráficos con la distribución de frecuencias de los coeficientes de variación para pH 3-10 y 4-7. El coeficiente de variación para cada *match* se obtuvo del cociente derivado del desvío estándar de los *spots* presentes en un *match* y el promedio de los valores de estos.

Las diferencias de expresión entre los *spots* de diferentes genotipos fue calculada por el *software* que utiliza el método estadístico de ANOVA. Se eligieron los *spots* que presentaban un valor de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

## 1 - Identificación de mutantes homocigotas *gpa1* para la inserción de T-ADN

Como mencionamos anteriormente recibimos una población de semillas F3 proveniente del Instituto *SIGNAL T-DNA Expression Center* y primeramente realizamos la búsqueda de aquellos genotipos que fueran homocigotas mutantes para la inserción de ADN-T. Para esto, cultivamos plantas en cámaras de cultivo y extrajimos el ADN a partir de hojas. La confirmación del alelo salvaje o mutante lo realizamos utilizando la técnica de PCR (ver materiales y métodos punto 2.2). La estrategia que seguimos para conocer el genotipo de aquellas plantas homocigotas mutantes esta basada en el diseño de los oligonucleótidos (ver Materiales y Métodos Fig. 1). La presencia del gen *GPA1* salvaje (sin inserción) se identifica por amplificación de un fragmento cuyos oligos se aparean a los costados del sitio posible de inserción. Si no hay inserción, se amplificará una banda de 1.600 pb según el diseño de nuestros oligonucleotidos (GPA3 –GPA4). En el caso en el que se haya insertado un ADN-T (aproximadamente 5.000 pb) no se producirá la amplificación del alelo salvaje. Por otro lado, utilizando los oligonucleótidos Lba1-GPA3 sólo se producirá amplificación cuando exista una inserción de ADN-T, ya que Lba1 fue diseñado para aparearse únicamente a un borde del ADN-T. Como puede observarse en la Fig. 1, las plantas 7 y 9 no mostraron amplificación de la banda del alelo salvaje de 1600pb, mientras que las plantas 15 y 17 sí mostraron amplificación de dicha banda, es decir que estos últimos resultaron al menos heterocigotas para la inserción.



**Figura 1.** Búsqueda del genotipo *gpa1* mutante para la inserción de ADN-T a partir de una población F3. A) Reacción de PCR para la identificación del alelo salvaje con los oligonucleótidos GPA3-GPA4. B) Reacción de PCR para la identificación del alelo mutante con los oligonucleótidos GPA3-Lba1. 7, 9, 15 y 17 son líneas de inserción de *Arabidopsis*. WT es el genotipo salvaje. M: Marcador de peso molecular de 400pb (PB-L).

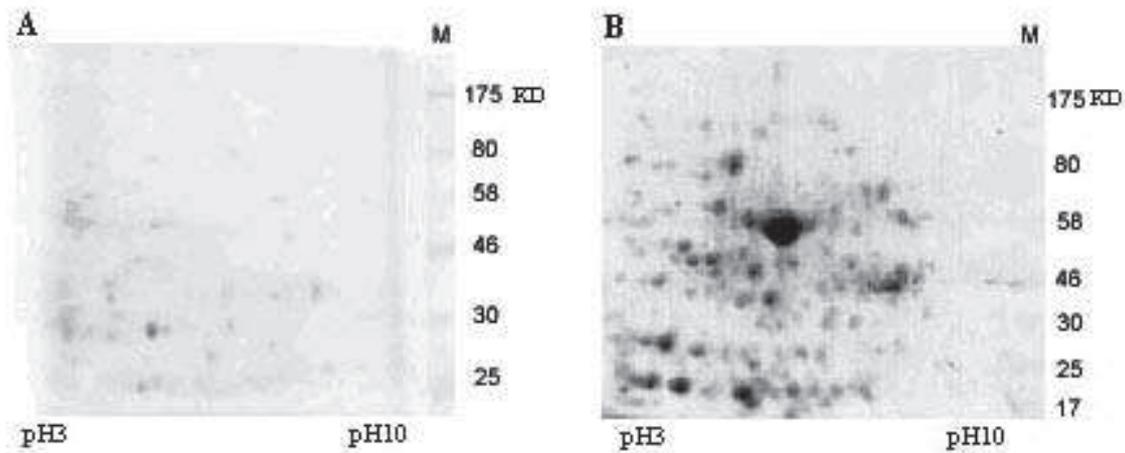
La presencia de la banda correspondiente al alelo ADN-T de aproximadamente entre 1100 y 1300 pb fue observada en las plantas 7, 9 y 15. Estos resultados muestran que las plantas 7 y 9 resultaron mutantes homocigotas para la inserción en el gen *GPA1*, la planta 15 resultó heterocigota mutante y la planta 17 homocigota salvaje. Esta tesis se continuó con las semillas provenientes de la planta 7 ahora renombrada mutante *gpa1*.

## **2 – Valoración del método de extracción de proteínas**

Como parte de los objetivos específicos nos propusimos obtener los perfiles proteicos del genotipo salvaje y mutantes *gpa1* en plántulas crecidas durante 3 días en oscuridad y sacarosa, y en hojas de plantas adultas.

El primer paso de esta tesis fue entonces encontrar el método de extracción de proteínas más eficiente para cada tejido. Con excepción de las semillas y el polen, los demás tipos celulares de las plantas contienen relativamente bajo contenido en proteínas, y son ricos en proteasas y enzimas oxidativas. Además, las células vegetales producen una gran cantidad de metabolitos como pigmentos, polisacáridos, compuestos fenólicos y lípidos que contaminan las extracciones proteicas y contribuyen a las dificultades en el fraccionamiento y posterior análisis de las proteínas. Las extracciones basadas en la precipitación directa de las proteínas con TCA/Acetona o el método de extracción utilizando fenol han sido los más usados en tejidos vegetales ya que se han obtenido los mayores rendimientos y buena calidad de geles 2D (Carpentier y col., 2005; Rose y col., 2004; Song y col., 2006).

El método de TCA/Acetona se basa en la precipitación de proteínas en un único paso; se decidió la utilización de este método para el tejido de plántulas crecidas en oscuridad por tres días partiendo de la premisa que este no es un tejido recalcitrante. Las extracciones realizadas en tejido de plántulas con el método TCA/Acetona no resultaron eficientes (Fig. 2A). La mayoría de las veces no logramos obtener una concentración de proteínas que nos permitiera obtener geles con alta definición y reproducibilidad. Probamos aumentar la cantidad de tejido inicial para alcanzar mayores niveles de proteínas pero finalmente dificultaba aun más la extracción.

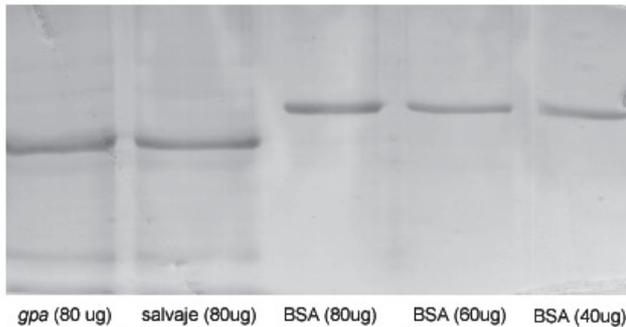


**Figura 2.** Puesta a punto de los protocolos de extracción de proteínas. Perfiles de los geles 2D en diferentes tejidos de *Arabidopsis* de genotipo salvaje. A) Plántulas crecidas durante 3d en oscuridad. La extracción se realizó con el método de TCA/Acetona. B) Hoja de plantas adultas. La extracción se realizó con el método de fenol. En ambos casos se utilizó una tira comercial de pH 3-10 de 7cm. Parámetros de corrida de isoelectroenfoque: 30'a 500V, 30'a 1000V y 1h 40'a 5000V. La segunda dimensión se corrió en un gel de poliacrilamida de 10%. M: Maracador de peso molecular NEB (7-175kDa).

Para la extracción de proteínas del tejido de hoja utilizamos un protocolo que incluye varios pasos de tratamiento con fenol. La presencia de fenol minimiza la proteólisis durante la extracción y separa las proteínas de compuestos que interferirían con la corrida de la primera dimensión (Isaacson y col., 2006). Esta extracción mostró que la mezcla de proteínas pudo resolverse y enfocarse satisfactoriamente, por lo tanto fue el método elegido para realizar los experimentos a partir de tejido de hoja (Fig. 2B).

Uno de los pasos fundamentales para la comparación de dos geles de genotipos o tratamientos diferentes es que la masa de proteínas que se carga para cada condición sea la misma, de manera de reducir al mínimo las diferencias por error de carga. En este trabajo utilizamos dos métodos de estimación de la cantidad de proteínas obtenidas luego de cada extracción. Por un lado, cuantificamos las proteínas utilizando el método de Bradford y luego corroboramos dicha estimación en un gel de acrilamida. Cabe destacar que algunos de los compuestos que posee el *buffer* de IEF interfieren con el método de Bradford a esas concentraciones, razón por la cual siempre se diluyeron las muestras a 1/5.

Primeramente antes de efectuar cualquier corrida en isoelectroenfoque sembramos una alícuota proveniente de la extracción de proteínas del genotipo salvaje y mutante *gpa1* junto con cantidades conocidas de la proteína seroalbúmina bovina (BSA) con el propósito de evaluar que la cantidad de proteína fuera pareja entre los genotipos y, por otro lado confirmar la cantidad de proteína extraída como se muestra en un ejemplo en la figura 3.

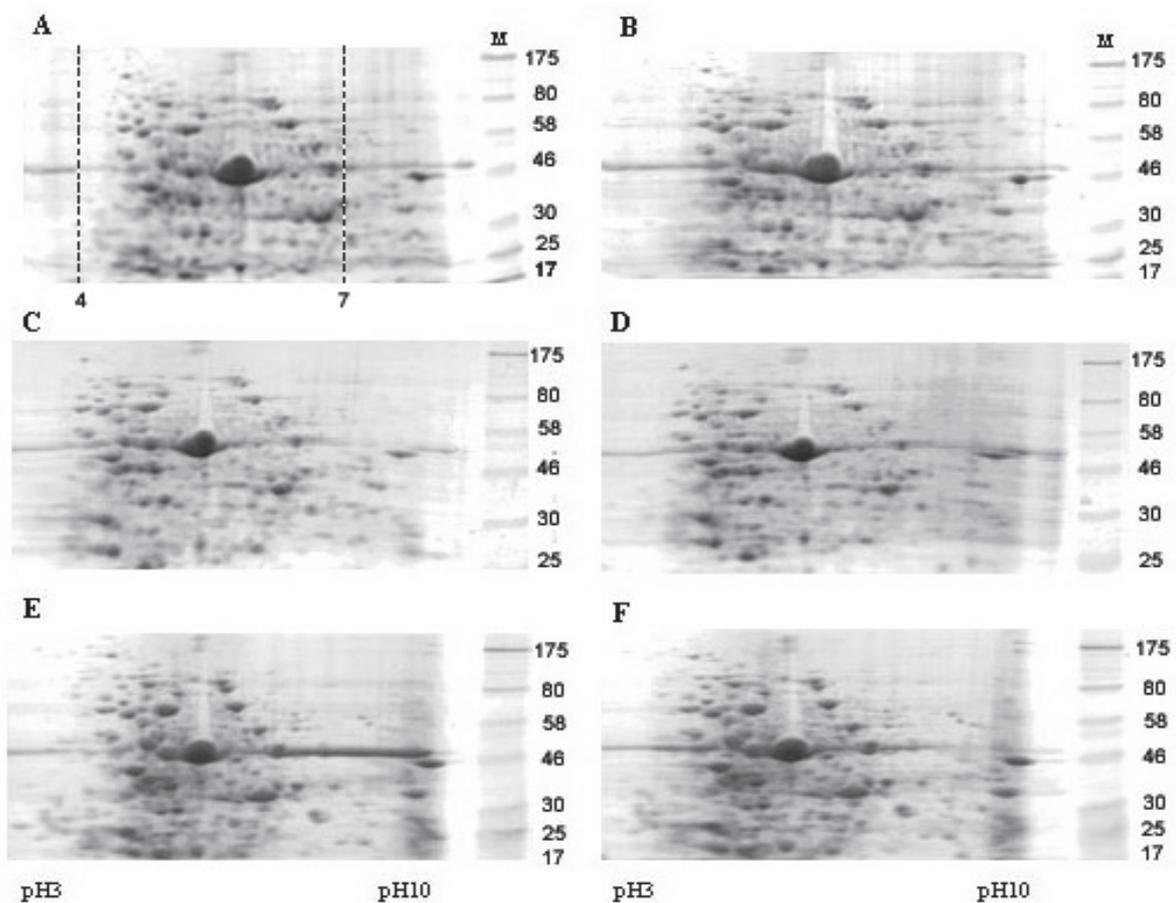


**Figura 3.** Cuantificación por gel de la concentración de proteínas presentes en muestras de hoja salvaje y *gpa1* comparándolas con cantidades conocidas de la proteína BSA.

### 3. - Análisis de los perfiles proteicos de los genotipos salvaje y *gpa1*

#### 3.1 – Análisis proteómico de los genotipos salvaje y *gpa1* en un rango de pH 3-10

Con el propósito de analizar la distribución general de las proteínas en las muestras decidimos comenzar las corridas electroforéticas utilizando tiras comerciales con un rango amplio de pH 3-10 de manera tal que incluyan la mayor cantidad de proteínas. Esta elección permite barrer un amplio rango de puntos isoeléctricos para luego focalizar en aquellas porciones del gel donde se encontrarán acumuladas la mayor cantidad de proteínas. Se extrajeron las proteínas totales de la décima y undécima hoja del genotipo salvaje y mutante *gpa1* con el método de fenol y se sometieron a electroforesis bidimensional (Fig. 4). Realizamos tres repeticiones independientes que incluyeron al genotipo salvaje (Fig. 4. A, C, E) y al genotipo mutante *gpa1* (Fig. 4. B, D, F).



**Figura 4.** Geles 2D para tres muestras independientes de los genotipos salvaje (A, C, E) y mutante *gal* (B, D, F) realizados a partir de extracciones proteicas obtenidas con el método de fenol de la décima y undécima hoja. En todos los casos se sembraron 200  $\mu$ g de proteínas. Se utilizó una tira comercial de pH 3-10 de 7cm. Parámetros de corrida de isoelectroenfoque: 30'a 500V, 30'a 1000V y 1h 40' a 5000V. La segunda dimensión se corrió en un gel de poliacrilamida de 10%. Los geles fueron teñidos con la tinción Coomassie Blue. M: Marcador de peso molecular.

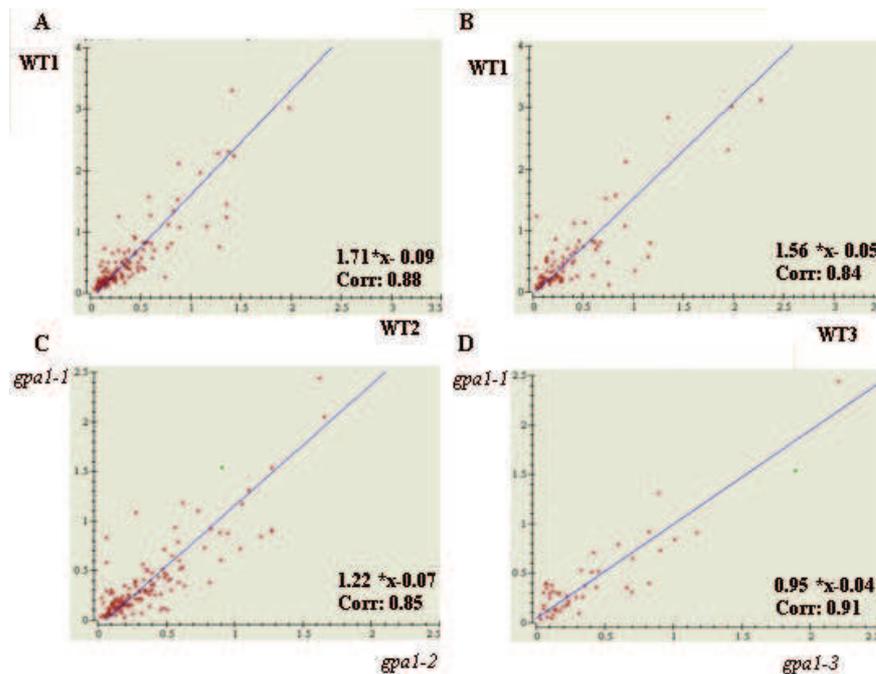
Para analizar los geles bidimensionales utilizamos el *software* llamado *Image Master 2D Platinum* versión 7.0. El primer paso en el análisis para la comparación de geles consiste en realizar lo que se llama *matching*. El *matching* es realizado automáticamente por el *software* tomando uno de los geles como referencia y buscando las proteínas detectadas en ese gel en el resto de las replicas experimentales. Cuando una proteína del gel de referencia es detectada en al menos uno de los otros geles eso forma un *match*. De la misma forma si esa proteína en el gel de referencia no se encuentra en ninguno de los otros geles no se

produce el *match* (no será considerado como un *spot* en el posterior análisis). Con este análisis detectamos un promedio de 184 *spots* para el genotipo salvaje y 165 *spots* para el mutante *gpa1*.

Con el objetivo de analizar la variabilidad experimental entre los geles (como diferencias en la intensidad de tinción o la masa cargada) y verificar así el grado de reproducibilidad de los mismos entre las réplicas de cada genotipo, obtuvimos los datos de correlación a través del análisis de los *scatter plots*  $v/v$  para el *pool* de *spots* que formaron un *match* (Fig. 5). Este parámetro da idea de la relación entre el valor de los *spots* de dos geles ya que busca la dependencia lineal entre los valores de los *spots* de un gel (variable x) y los valores correspondientes a esos mismos *spots* en el gel de referencia (variable y). Esta dependencia lineal es definida con la mejor recta que ajusta los datos descripta por la pendiente y la intersección al eje y. La bondad de ajuste para esta aproximación está dada por el coeficiente de correlación cuyos valores varían entre 1 y -1, donde un valor absoluto cercano a 1 indica el mejor ajuste. Cuando realizamos los *scatter plot* utilizando todos los *spots* entre dos geles observamos la presencia de algunos valores extremos. Por definición se llama valores extremos a las observaciones atípicas, infrecuentes, que no parecen seguir la distribución característica del resto de los datos. En general un dato que se encuentra tan alejado no es representativo y podría sesgar los resultados. En todos los casos este valor que se comportó como valor extremo correspondió a la proteína más expresada en el gel (por peso molecular y punto isoelectrico la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa o Rubisco), y por este motivo decidimos no incluirla en este análisis. Otros trabajos también han identificado a la Rubisco como valores extremos en geles bidimensionales (Patterson y col, 2007)

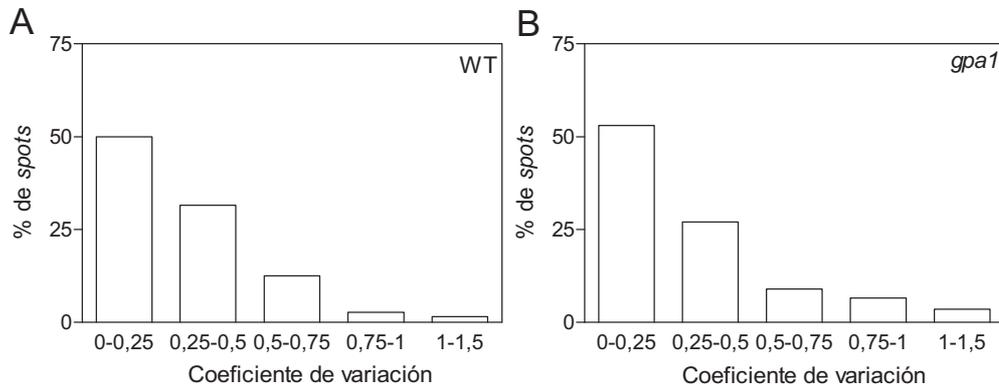
La ecuación de la recta descripta en el análisis de *scatter plots* nos da una idea de cuan parecidos son los *spots* en las diferentes corridas. Por ejemplo, una pendiente de 1.71 indica que en el WT1 los *spots* están un 70 % mas intensos que en el WT2 y la intersección en el eje y indica que la migración de los *spots* estaría corrida por 0.09 (Fig. 5A). Los datos de correlación entre geles para el genotipo salvaje por un lado, y *gpa1* mutante por el otro, fueron muy altos (entre 0.91 y 0.84 Fig. 5). Es decir que los geles provenientes de muestras completamente independientes resultaron reproducibles y confiables para el análisis. Para el

caso del genotipo salvaje, el gel 1 (representado por WT1) resultó en general con una mayor intensidad de tinción que las otras dos réplicas. Para que esto no interfiera en el análisis estadístico posterior, la abundancia de las proteínas fue medida calculando el volumen de tinción de cada *spot* en relación al volumen total de todos los *spots* en el gel.



**Figura 5.** *Scatter Plot* intra genotipo para tres repeticiones independientes. Se comparó un gel de referencia (WT1 y *gpa1-1*) con las otras dos réplicas experimentales utilizadas para el estudio. A y B genotipo salvaje WT. C y D mutante *gpa1*.

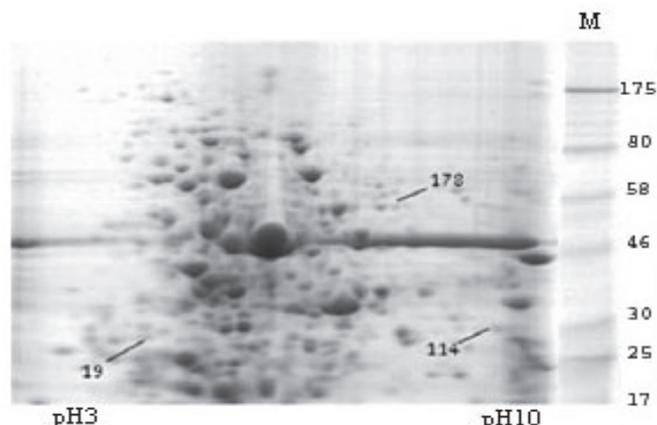
Con el objetivo de analizar más profundamente y corroborar la reproducibilidad de los geles antes de comenzar con el análisis estadístico, realizamos un análisis de coeficiente de variación. Para cada genotipo calculamos el coeficiente de variación para cada uno de los *spots* que formaron un *match*. Como muestra la Fig. 6 el 83% y el 82% de los *spots* para el genotipo salvaje y mutante respectivamente presentaron coeficientes de variación menores que 0.5. Esto sugiere nuevamente que la reproducibilidad de las muestras fue alta.



**Figura 6.** Coeficiente de variación de los *spots* que formaron un *match* de las tres replicas para el genotipo salvaje (A) y *gpa1* mutante (B) para geles de pH 3-10 7cm. El coeficiente de variación se calculó sobre la base de los datos de intensidad v/v.

Una vez que obtuvimos tres réplicas independientes y reproducibles comenzamos el análisis entre los genotipos para hallar aquellas proteínas expresadas diferencialmente. El *matching* entre genotipos se basa en realizar el *matching* explicado previamente pero utilizando los 6 geles (3 por genotipo) en lugar de solo 3 geles de un mismo genotipo. Este análisis nos dió como resultado que había presentes 232 *matches*, es decir, 232 *spots* detectados en ambos genotipos.

El análisis estadístico de las diferencias en la expresión de dichos *spots* entre el genotipo salvaje y el genotipo mutante *gpa1* mostró que 3 proteínas presentaban una diferencia estadística significativa entre ambos ( $p < 0.05$ ) (Fig. 7 y Tabla 1).



**Figura 7.** Gel representativo que indica las proteínas expresadas diferencialmente entre los genotipos salvaje y *gpa1* mutante. Los números representan los *spots* significativamente diferentes. M: Marcador de peso Molecular.

La tabla 1 muestra las características de las proteínas diferencialmente expresadas, el ratio, dispersión, punto isoelectrico y masa molecular con sus respectivos valores de significancia según el test de ANOVA.

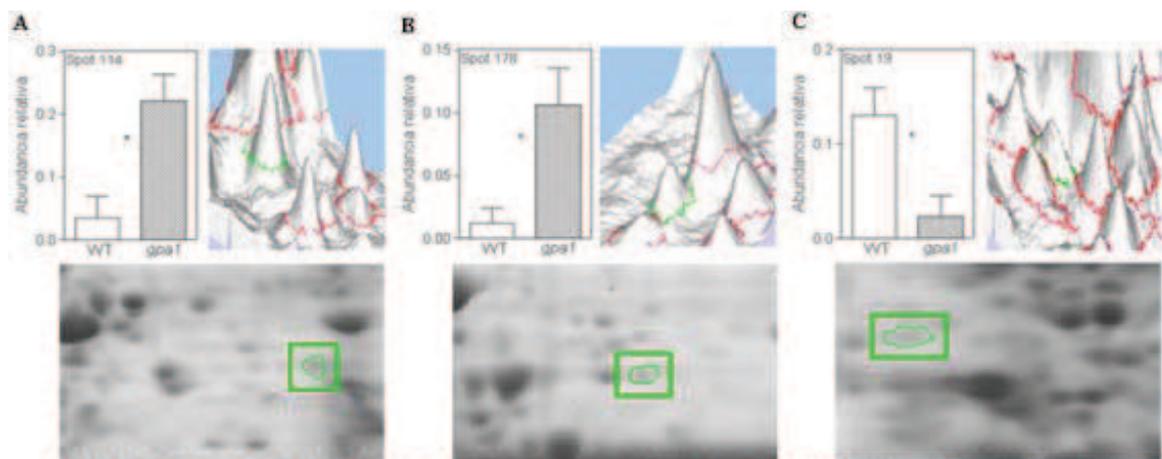
SpotID	Ratio	Dispersión	pI	MW	Valor de P
114	1,96 ( <i>gpa1</i> )	0,108142	8,98	32	0,025683
178	2,22 ( <i>gpa1</i> )	0,056696	7,92	59,5	0,041925
19	1,61 (WT)	0,065409	4,66	31,75	0,044805

**Tabla 1.** Características de las proteínas que presentan una diferencia estadística entre el genotipo salvaje y *gpa1* mutante detectadas en un gel de rango de pH 3-10 y 7cm. pI: punto isoelectrico. PM: peso molecular de la proteína.

El *ratio* indica la proporción entre los valores de volumen normalizado de los *spots* que forman el *match* en cuestión e indica en qué genotipo se encuentra más expresado y en qué magnitud, por ejemplo en el *spot* 114 el genotipo mutante *gpa1* se encuentra un 96% más expresado con respecto al genotipo salvaje. De las tres proteínas, dos se encontraron significativamente más expresadas y una menos expresada en el mutante *gpa1* con respecto

al salvaje respectivamente. La dispersión indica la variabilidad de la muestra con respecto al valor promedio.

La figura 8 muestra una foto representativa de cada uno de los *spots* detectados como diferencialmente expresados por el software (Fig. 8), el gráfico de barras correspondiente, así como la vista en 3D de la región en el gel que comprende el *spot* (Fig. 8). En los gráficos en 3D los ejes X e Y representan los valores de pI y peso molecular mientras que la intensidad de la señal es representada a lo largo del eje Z. Este tipo de gráficos nos permite además confirmar que cada *spot* contenga una única proteína, fundamental para el análisis estadístico. Claramente la vista en 3D de las tres proteínas diferencialmente expresadas entre el genotipo salvaje y el mutante *gpa1* muestra que se trató en cada caso de una única proteína (Fig. 8C).



**Figura 8.** Visualización de cada *spot* diferencialmente expresado A) 114, B) 178 y C) 19 .Se muestra el gráfico de abundancia relativa (%v/v) correspondiente, su vista en 3D y la ampliación de cada uno de ellos en la porción de gel. En verde está marcado el *spot* correspondiente al gráfico de abundancia relativa y en rojo se muestran los *spots* cercanos en el mapa proteómico.

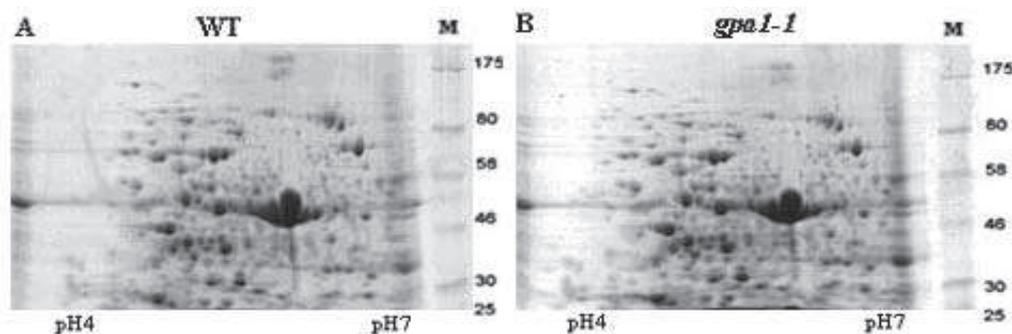
Cuando analizamos la distribución de los *spots* totales a lo largo del rango de pH observamos que un alto número de proteínas presentes en el gel de pH 3-10 se encontraron dentro del rango de pH de 4-7 (Fig. 4A). Para obtener una mejor resolución en este rango de

pH decidimos realizar el análisis de las proteínas expresadas diferencialmente entre los genotipos acotando el rango de pH a tiras comerciales de pH de 4-7 unidades.

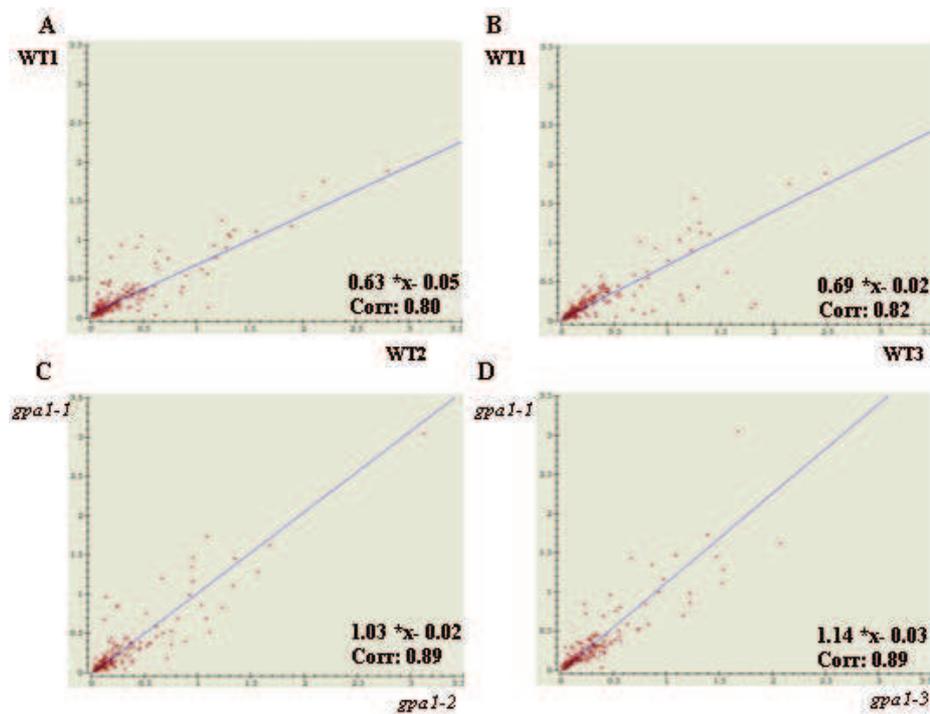
### 3. 2 Análisis proteómico de los genotipos salvaje y mutante *gpa1* en un rango de pH de 4-7

Con el propósito de obtener un mayor detalle del rango de pH donde se encuentran la mayoría de las proteínas totales del tejido, decidimos utilizar tiras comerciales que incluyan únicamente las proteínas con un punto isoeléctrico entre 4 y 7.

Con la misma metodología utilizada para la extracción de proteínas totales para los geles de pH 3-10, realizamos tres repeticiones independientes (se muestra solo una repetición representativa por genotipo) que incluyeron al genotipo salvaje (Fig. 9 A) y al genotipo mutante *gpa1* (Fig. 9B). Del análisis de estos geles detectamos 298 *spots* para el genotipo salvaje y 240 *spots* para el genotipo *gpa1* mutante. Al igual que en los geles de pH 3-10, los datos de correlación entre las réplicas mostraron alta reproducibilidad en el rango de pH de 4-7 (Fig. 10). Además, el 85 y 87 % de los *spots* del genotipo salvaje y *gpa1* mutante respectivamente mostraron coeficientes de variación por debajo de 0.5 (Fig. 11). Con estos resultados continuamos hacia un análisis confiable de los cambios de expresión entre los genotipos salvaje y mutante *gpa1*.

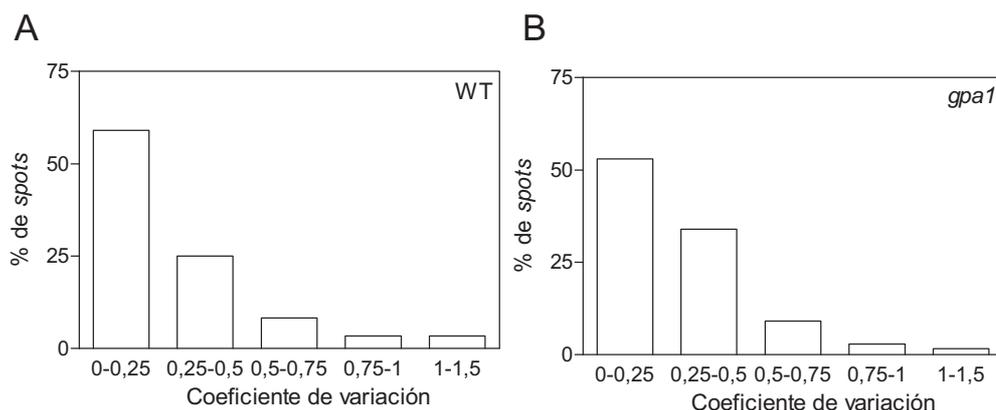


**Figura 9.** Geles bidimensionales representativos en el rango de pH 4-7 y 7 cm a partir de tejido de hoja de los genotipos A) salvaje y B) *gpa1* mutante. Los parámetros de corrida fueron los mismos que los descritos anteriormente.



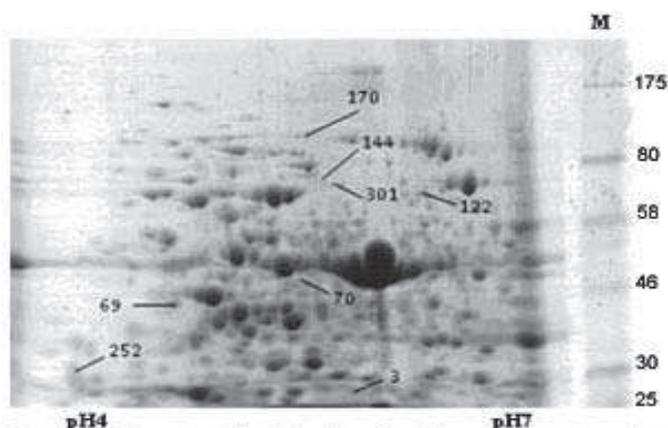
**Figura 10.** *Scatter Plot* intra genotipo de tres repeticiones independientes para geles de pH 4-7 y 7 cm. Se comparó un gel de referencia (WT1 y *gpa1-1*) con las otras dos replicas experimentales utilizadas para el estudio. A y B genotipo salvaje. C y D mutante *gpa1*.

Luego realizamos el *matching* entre ambos genotipos utilizando 6 de estos geles (3 por genotipo) a partir del cual obtuvimos un total de 303 *matches* .



**Figura 11.** Coeficiente de variación de los *spots* que formaron un *match* de las tres replicas para el genotipo salvaje (A) y *gpa1* mutante (B) para geles de pH 4-7 7cm. El coeficiente de variación se calculó sobre la base de los datos de intensidad v/v.

El análisis estadístico de las diferencias en la expresión de dichos *spots* mostró que 8 proteínas presentaban una diferencia estadística significativa entre el genotipo salvaje y el mutante *gpa1* ( $p < 0.05$ ) (Fig.12).



**Figura 12.** Gel representativo de la detección de las proteínas expresadas diferencialmente entre los genotipos salvaje y *gpa1* utilizando tiras comerciales con un rango de pH de 4-7. Los números representan los *spots* significativamente diferentes. M: Marcador de peso molecular

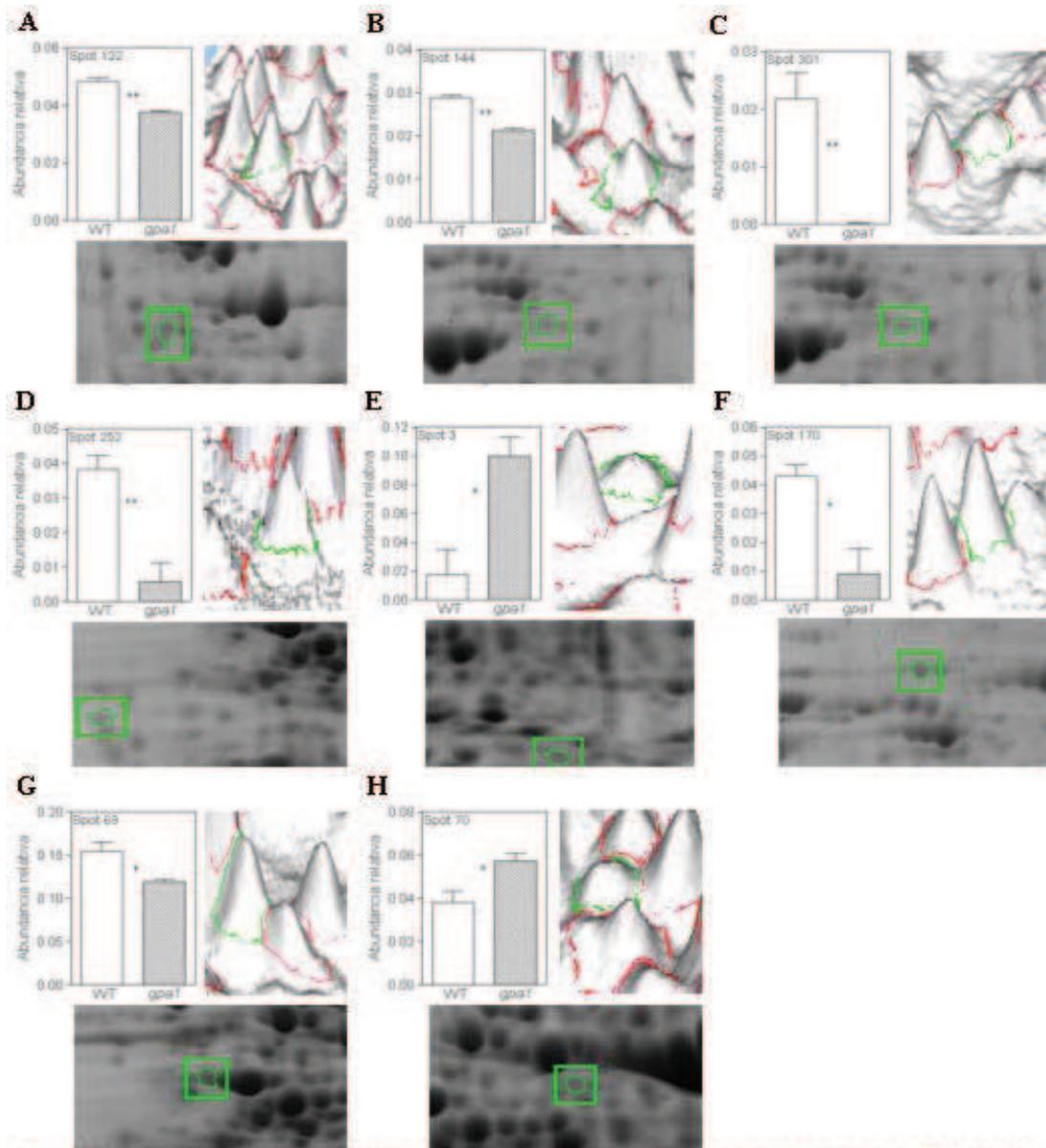
La tabla 2 muestra las características de las proteínas encontradas con sus respectivos valores de significancia según el test de ANOVA.

Spot ID	Ratio	Dispersión	pI	MW	Valor de P
122	1,20984 (WT)	0,00553058	6,307625	69,8	0,0023
144	1,23654 (WT)	0,00417098	5,788366	75	0,0042
301	0 (WT)	0,0118086	5,784257	74,6	0,0083
252	2,39502 (WT)	0,0177725	4,470187	33,7	0,009
3	1,93825 ( <i>gpa1</i> )	0,0465708	5,99164	27	0,0193
170	1,75319 (WT)	0,0196697	5,63979	108	0,0243
69	1,12786 (WT)	0,0207448	5,070006	46,3	0,0332
70	1,1358 ( <i>gpa1</i> )	0,0115159	5,64545	48,1	0,042612

**Tabla 2.** Características de las proteínas que presentan una diferencia estadística entre el genotipo salvaje y *gpa1* mutante utilizando tiras comerciales con un rango de pH de 4 a 7. PM: peso molecular de la proteína. pI: punto isoeléctrico.

El valor 0 para el ratio del *spot* 301 es debido a que esa proteína solo se encontró en uno de los dos genotipos (en este caso solo se encontró en el salvaje) y por ende no se puede establecer cuantas veces más está expresado en el genotipo salvaje que en el mutante *gpa1*.

De las ocho proteínas encontradas seis se encontraban significativamente más expresadas y dos menos expresadas en el genotipo salvaje comparado con mutante *gpa1*. La figura 13 muestra la forma de las proteínas en el gel, los gráficos de abundancia relativa y sus vistas en 3D para poder analizar la naturaleza de cada *spot*.



**Figura 13.** Visualización de cada *spot* diferencialmente expresado. Se muestra el gráfico de abundancia relativa (%v/v) correspondiente, su vista en 3D y la ampliación de cada uno de ellos en la porción de gel. En verde está marcado el *spot* correspondiente al gráfico de abundancia relativa y en rojo se muestran los *spots* cercanos en el mapa proteómico.

## **DISCUSIÓN**

Con el objetivo de investigar los cambios que se producen a nivel del proteoma en los mutantes que carecen de la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica, *gpa1*, durante el desarrollo de Arabidopsis, realizamos geles bidimensionales a partir de proteínas extraídas del genotipo salvaje y mutante *gpa1* cosechados en la misma etapa del desarrollo.

Para comenzar a realizar los perfiles proteómicos de los estadios de plántula y hoja, obtuvimos primeramente semillas homocigotas mutantes para la inserción de ADN-T. Para lograr este objetivo utilizamos la reacción de PCR para identificar de las plantas provenientes de un *pool* de semillas (que contenía las tres combinaciones de genotipos posibles), cuáles eran las homocigotas mutantes. Los resultados de las reacciones de PCR realizadas mostraron que de las plantas analizadas había dos en las que no se observó banda específica que identificara al alelo salvaje y que además presentaban una banda aproximada de entre 1100 y 1300 pb que evidenciaba la presencia del alelo mutante (Fig. 1). Este resultado sugería que en ambos casos las plantas eran homocigotas mutantes. La inserción del ADN-T de esta línea está localizada en el noveno exón del gen *GPA1* (At2g26300), sin embargo aún podría contener proteína funcional. En otra línea de trabajo del laboratorio se han realizado *Western blots* revelados con anticuerpos específicos contra *AtGPA1* en estos mutantes, y hemos comprobado que no poseen proteína GPA1 ni en plántulas ni en hojas de plantas adultas (resultados no mostrados). A partir de aquí consideramos nuestro material de trabajo apto para llevar a cabo los objetivos propuestos.

Una vez que obtuvimos semillas homocigotas mutantes comenzamos la puesta a punto de la extracción de proteínas para el estadio de plántula. A las plántulas crecidas por tres días en oscuridad se les realizó una extracción de proteínas con un protocolo basado en la precipitación de proteínas utilizando una solución de TCA y acetona (Santoni y col., 1994; Méchin y col., 2007; Carpentier y col., 2005). Utilizamos este método de extracción basándonos en la premisa de que el tejido de plántula no es un tejido recalcitrante el cual sí necesita de protocolos de extracción más complejos ya que poseen mayor cantidad de compuestos fenólicos que interfieren con la corrida electroforética. Los resultados

obtenidos para este tejido no fueron satisfactorios porque en la mayoría de las extracciones realizadas no hemos podido lograr la concentración mínima de proteínas requerida, es decir que el rendimiento fue muy pobre. En dos casos que se logró obtener la mínima concentración de proteínas dichos geles no presentaron *spots* definidos (Fig. 2A). Utilizamos entonces el método de fenol descripto para hojas ya que genera muestras más limpias, sin embargo el rendimiento en este protocolo de tantos pasos fue aun menor (datos no mostrados). Para tratar de resolver este problema intentamos obtener mayor masa de proteínas. Probamos aumentando la cantidad de tejido inicial de plántula, pero eso solo dificultaba aún más la extracción ya que al ser una extracción de un único paso cuando se precipitaban las proteínas también precipitaban grandes cantidades de restos celulares generando que la resuspensión de las proteínas del precipitado sea prácticamente imposible. Se sabe que el contenido proteico en plántulas etioladas es muy bajo en relación al tejido verde. El crecimiento postembrionario del hipocotilo de *Arabidopsis* es mayoritariamente el resultado de la elongación celular más que de la división celular. Este crecimiento es muy rápido hasta que la plántula atraviesa la superficie del suelo y es expuesta finalmente a la luz. El proceso biofísico del crecimiento en plántulas etioladas se produce por la entrada de agua al interior celular seguido de la relajación de la pared (extensibilidad de la pared) (Cosgrove y col. 1997, 1993). La entrada masiva de agua durante la elongación celular resulta en la dilución de los solutos (Schopfer, 2006). Es decir que los tejidos etiolados contendrían una mayor proporción de agua en relación a la concentración de solutos, entre los que se encuentran las proteínas. Uno de los objetivos a futuro en el laboratorio es desarrollar un protocolo de extracción que permita obtener mayor concentración de proteínas a partir de este tejido. Para poder eliminar la alta presencia de restos tisulares se podría probar a futuro la utilización de filtros haciendo pasar el extracto crudo de los hipocotilos por éstos (Chaki y col., 2009).

Para la extracción de proteínas del tejido de hoja utilizamos el protocolo de extracción que incluye varios pasos de tratamiento con fenol (Isaacson y col., 2006). Se eligió este protocolo porque los tejidos verdes generalmente presentan alto contenido de proteasas y compuestos secundarios que requieren numerosos pasos de purificación para eliminarlos y evitar así que interfieran durante la corrida electroforética. Los resultados

mostraron que se obtuvo una buena concentración de proteínas con esta extracción en concordancia con trabajos previos (Wang y col., 2003; Saravanan y Rose, 2004).

Antes de proceder a realizar un gel 2D las muestras fueron cuantificadas por el método de Bradford y también por cuantificación en gel de SDS PAGE. Otra opción para cerciorarnos de que la concentración de proteínas es correcta hubiera sido realizar una doble medición utilizando el kit comercial *2-D Quant Kit (GE, Uppsala)*, aunque esta opción no se llevó a cabo por el alto costo del *kit* comercial.

Una consideración importante en la proteómica de plantas es la presencia de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco) ya que al ser la proteína más abundante en plantas ocupa un gran porcentaje de la concentración de proteínas totales de la extracción (aproximadamente el 40%); por otro lado también dificulta el análisis de las proteínas que migran cerca (notar que en los geles aquí presentados la subunidad mayor de la Rubisco aparece un *spot* de gran tamaño y muy fuertemente teñido en un peso molecular de aproximadamente 55 kD). La mayoría de los trabajos realizados a partir de hoja se realizan teniendo en cuenta esta observación. Sin embargo muy recientemente se publicaron algunos métodos de extracción fáciles y de bajo costo para separar la enzima Rubisco del resto de las proteínas (Widjaja y col., 2009, Kim y col., 2001). Estos métodos combinan principalmente fracciones microsomales y separaciones diferenciales utilizando polietilenglicol. (PEG). Estos ensayos mostraron un mayor número de proteínas visualizadas cuando la Rubisco fue depletada (Kim y col., 2001). Es decir que la presencia de esta enzima podría estar enmascarando proteínas de baja expresión.

La reproducibilidad de las réplicas biológicas es esencial para la confianza de los resultados estadísticos. Para analizar este punto utilizamos dos aproximaciones diferentes, por un lado los datos de correlación entre los geles pertenecientes a replicas biológicas (Fig. 5 y 10); y por otro lado el coeficiente de variación para cada uno de los *spots* que formaron un *match* entre las réplicas (Fig. 6 y 11). A lo largo de este análisis obtuvimos valores de correlación dentro de un rango de 0.9 – 0.85 y tres replicas cayeron entre 0.85-0.8 (Fig. 5 y 10). Adicionalmente, entre el 82 y 87% de los *spots* de una misma replica mostraron coeficientes de variación por debajo de 0.5 (Fig. 6 y 11). Si comparamos estos valores con los encontrados en otros trabajos podemos decir que los geles obtenidos presentan alta reproducibilidad (Lundgren y col., 2006, Greenbaum y col., 2003).

Las correlaciones realizadas entre ambos genotipos también fueron altas (0.98 x-0.02 Correlación: 0.85), esto sugiere que en estos extractos proteicos no habría una expresión diferencial global entre los proteomas. El análisis estadístico dió como resultado que once proteínas presentaban diferencias significativas entre ambos genotipos, tres fueron observadas en el análisis comparativo de las tiras comerciales de pH 3-10 y ocho en las de pH 4-7. Estos *spots* los analizamos mediante su vista en 3D para corroborar que realmente se tratasen de proteínas únicas. Esta información es fundamental tanto para el análisis estadístico como para la extracción del *spot* del gel para su secuenciación. Es difícil determinar a partir del análisis de los geles si alguna de las tres proteínas encontradas como significativamente diferentes cuando se utilizaron las tiras comerciales de pH 3-10, es la misma proteína que luego se observó con la tiras de pH 4-7. En principio, especulativamente, de las ocho proteínas encontradas en la corrida de pH 4-7, la identificada con el número 252 podría ser el *spot* 19 en la corrida de pH 3-10 ya que ambas poseen tamaño molecular y punto isoeléctricos muy similares (Tabla 1 y 2). La identificación por medio de espectrometría de masa de ambos *spots* nos dará la información necesaria para avalar esta hipótesis.

En casi todos los estudios de geles bidimensionales, los datos interesantes provienen de los *spots* cuyas intensidades han sido calculadas por el *software* como significativamente diferentes entre las condiciones analizadas. Sin embargo, una inspección visual de dichos datos, muestra que algunos de estos resultados son producto de errores en el análisis de las imágenes como *spots* que han sido detectado incorrectamente constituyendo falsos positivos. En esta tesis nosotros hemos descartados aquellos *spots* que a simple vista no se encontraban bien seleccionados por el programa. Por otro lado, algunos de los *spots* que dieron significativamente diferentes podrían no presentar una diferencia real de expresión entre los genotipos. Esto se debe a la baja variabilidad entre los *spots* que disminuye la dispersión. Por ejemplo, en los geles corridos de pH 4-7 los *spots* 122, 144, 69, y 70 se encontraron solamente 1.21, 1.24, 1.12, y 1.13 veces diferencialmente expresados respectivamente. Es probable que esta no sea una diferencia biológica relevante a pesar que la fuerza estadística de esta prueba los considere diferentes. Este tipo de análisis nos servirá para generar una tabla de prioridades a la hora de mandar los *spots* a secuenciar.

Es importante destacar que la extracción de proteínas utilizada en este trabajo permite visualizar aquellas proteínas mayoritariamente expresadas en la célula. Para un análisis más detallado se podrían utilizar métodos de fraccionamiento subcelular que permitan obtener proteínas enriquecidas, por ejemplo en núcleos (Folta y Kaufman, 2000; Calikowski y col., 2003), mitocondrias (Giege y col., 2003; Heazlewood y col., 2004), cloroplastos (Kleffmann y col., 2004, Phee y col., 2004), proteínas de membrana etc. En este caso en particular el próximo paso a seguir serán la corrida de geles más largos de 13 cm que permitirá una mejor resolución de las proteínas para seleccionar las que serán secuenciadas.

La identificación de proteínas modificadas postraduccionalmente suele ser muchas veces difícil ya que representan una pequeña fracción del total de proteínas presentes en una muestra. En estos ensayos no hemos podido detectar a simple vista patrones típicos que pudieran sugerir fosforilación. El análisis de los fosfoproteomas o el enriquecimiento de proteínas fosforiladas utilizando columnas de afinidad podría en un futuro revelar la existencia de dichas modificaciones (Patterson y col., 2007).

Resumiendo, en este trabajo logramos seleccionar una planta homocigota mutante para la inserción de ADN-T en el gen *AtGPA1*, poner a punto la extracción de proteínas totales para el tejido de hoja, realizar los geles 2D a partir de este tejido y encontrar proteínas que presentaron una diferencia significativa de expresión entre ambos genotipos. Los próximos pasos a seguir en este trabajo serán la secuenciación e identificación de estas proteínas y el estudio funcional de las mismas. La identificación de estas proteínas nos permitirá conocer nuevas proteínas involucradas en el camino de señalización iniciados por la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica y el estudio bioinformático de las mismas nos permitirá conocer la regulación de estas proteínas (a nivel transcripcional o traduccional).

Un análisis en combinación con las técnicas de proteómica, transcriptoma y genoma será necesario para identificar el mecanismo molecular, los genes y proteínas involucrados en la señalización mediada por proteínas G. Este trabajo es el primero en el que se aborda este estudio desde el punto de vista proteómico y aportará un conocimiento más detallado sobre la complejidad de la red de señalización iniciada por Proteínas G en plantas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Adjobo-Hermans MJW, Goedhart J, Gadella TWJ, Jr.** (2006). *J. Cell Sci.* 119: 5087–5097.
- Aharon GS, Gelli A, Snedden WA, Blumwald E.** (1998). *FEBS Letters*, 424: 17–21.
- Apone F, Alyeshmerni N, Wiens K, Chalmers D, Chrispeels MJ, Colucci G** (2003). *Plant Physiol.* 133: 571–579.
- Ashikari M, Wu J, Yano M, Sasaki T, Yoshimura A.** (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 10284–10289.
- Assmann SM.** (2002). *Plant Cell*, 14: 355–373.
- Botto JF, Ibarra S, Jones AM.** (2009). *Photochem Photobiol.* 85(4): 949–54.
- Bowler C, Yamagata H, Neuhaus G, Chua N-H.** (1994). *Genes Dev* 8: 2188–2202.
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J.** (2001). *Plant Cell*, 13: 1499–1510.
- Bradford MM.** (1976). *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Bykova NV, Stensballe A, Egsgaard H, Jensen ON, Moller IM.** (2003). *J. Biol. Chem.* 278, 26021–26030.
- Calikowski TT, Meulia T, Meier I.** (2003). *J. Cell Biochem.* 90(2): 361–78.
- Carpentier SC, Witters E, Laukens K, Deckers P, Swennen R, Panis B.** (2005). *Proteomics*, 5: 2497–2507.
- Chaki M, Fernández-Ocaña A M, Valderrama R, Carreras A, Esteban FJ, Luque F, Gómez-Rodríguez MV, Begara-Morales J, Corpas FJ, Barroso JB.** (2009) *Plant Cell Physiol.* 50: 665–679.
- Chen JG, Willard FS, Huang J, Liang J, Chasse S.** (2003). *Science*, 301: 1728–31.
- Chen JG, Pandey S, Huang J, Alonso JM, Ecker JR, Assmann SM, Jones AM.** (2004). *Plant Physiol.* 135: 907–15.
- Colucci G, Apone F, Alyeshmerni N, Chalmers D, Chrispeels MJ** (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 4736–4741.

- Cosgrove DJ** (1993). *New Phytologist*, 124: 1-23.
- Cosgrove DJ** (1997). *Annu. Rev. Plant Biol.* 13: 171-201.
- Folta KM, Kaufman LS.** (2000). *Plant Cell Rep.* 19: 504-510.
- Giege P, Sweetlove LJ, Leaver CJ.** (2003). *Plant Mol. Biol. Rep.* 21: 133–144.
- Gotor C, Lam E, Cejudo FJ, Romero L.** (1996). *Plant Mol. Biol.* 32: 1227–1234.
- Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M.** (2003). *Genome Biol.*, 4(9): 117.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R.** (1999). *Mol. Cell. Biol.* 19(3): 1720-1730.
- Heazlewood JL, Tonti-Filippini JS, Gout AM, Day DA, Whelan J, Millar AH.** (2004). *Plant Cell*, 16: 241–256.
- Huang J, Taylor JP, Chen JG, Uhrig JF, Schnell DJ, Nakagawa T, Korth KL, Jones AM.** (2006). *Plant Cell*, 18: 1226–38.
- Ishikawa A, Tsubouchi H, Iwasaki Y, Asahi T.** (1995). *Plant Cell Physiol*, 36(2): 353-359.
- Isaacson T, Damasceno CMB, Saravanan RS, He Y, Catalá C, Saladié M, Rose J KC.** (2006). *Nat. Protoc.* 1: 769–774.
- Johnston CA, Taylor JP, Gao Y, Kimple AJ, Grigston JC, Chen JG, Siderovski DP, Jones AM, Willard FS.** (2007). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 17317–17322.
- Jones AM, Ecker JR, Chen, JG.** (2003). *Plant Physiol.* 131: 1623–1627.
- Jones AM, Assmann SM.** (2004). *EMBO Reports* 5: 572–78.
- Jones AM, Chory J, Dangl JL, Estelle M, Jacobsen SE, Meyerowitz EM, Nordborg M, Weigel D.** (2008). *Cell*, 133: 939–943.
- Joo JH, Wang S, Chen JG, Jones AM, Fedoroff NV.** (2005). *Plant Cell*, 17: 957–970.
- Kang D, Gho YS, Suh M, Kang C.** (2002). *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23: 1511-1512.
- Kato C, Mizutani T, Tamaki H, Kumagai H, Kamiya T, Hirobe A, Fujisawa Y, Kato H, Iwasaki Y.** (2004). *Plant J.* 38: 320-331.
- Kim WY, Cheong NE, Lee DC, Je DY, Bahk JD, Cho MJ, Lee SY** (1995). *Plant Physiol.* 108: 1315–1316.

- Kim ST, Cho KS, Jang YS, Kang KY.** (2001). *Electrophoresis*, 22: 2103–2109.
- Kleffmann T, Russenberger D, von Zychlinski A, Christopher W, Sjölander K, Gruissem W, Baginsky S.** (2004). *Curr. Biol.*, 14: 354–362.
- Koelle, MR.** (1997). *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9: 143-147.
- Komatsu S, Muhammad A, Rakwal R.** (1999). *Electrophoresis*, 20: 630-636.
- Kovar DR, Drøbak BK, Staiger CJ.** (2000). *Plant Cell*, 12: 583–598.
- Kost B, Lemichez E, Spielhofer P, Hong Y, Tolias K, Carpenter C, Chua NH** (1999). *J. Cell Bio.*, 145: 317–330.
- Lapik VR, Kaufman LS.** (2003). *Plant Cell*, 15: 1578–1590.
- Liu X, Yue Y, Li B, Nie Y, Li W, Wu W H, Ma L.** (2007). *Science*, 315: 712–716.
- Lundgren C, Lahmann J, Becker S, Roblick U, Schedvins K, Boman K, Frankendal B, Nordström B, Auer G** (2006). *Acta Oncologica*, 45: 685-694.
- Ma H., Yanofsky M F., Huang H.** (1991). *Gene*, 107(2): 189-95.
- Mann M., Jensen O N.** (2003). *Nat. Biotechnol.* 21(3): 255-61.
- Marsh J F, Kaufman L S.** (1999). *Plant J.* 19: 237–247.
- Mason M G, Botella J R.** (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 14784–14788.
- Mason M G, Botella J R.** (2001). *Biochim. Biophys. Acta*, 1520: 147–153.
- Mechin V, Damerval C, Zivy M.** (2007). *Methods Mol. Biol.* 355: 1– 8.
- Mishra G, Zhang W, Deng F, Zhao J, Wang X** (2006). *Science*, 312: 264–266.
- Neuhaus G, Bowler C, Kern R, Chua N H** (1993). *Cell*, 73: 937–952.
- Okamoto H, Göbel C, Capper RG, Saunders N, Feussner I, Knight MR.,** (2009). *J. Exp. Bot.*, 60: 1991-2003.
- Okamoto H, Matsui M, Deng XW.** (2001). *Plant Cell*, 13: 1639–1651.
- Pandey S, Assmann SM.** (2004). *Plant Cell*, 16: 1616–1632.
- Pandey S, Nelson D C, Assmann SM.** (2009). *Cell*, 136 (1):136-48.
- Peskan T, Oelmuller R.** (2000). *Plant Mol. Biol.* 42: 915–922.
- Patterson J, Ford K, Cassin A, Natera S, Bacic A.** (2007). *Plant Physiol.* 144: 1612-1631.
- Phee BK, Cho JH, Park S, Jung JH, Lee YH** (2004). *Proteomics*, 4: 3560–3568.
- Rose J K, Bashir S, Giovannoni JJ, Jahn M M, Saravanan RS.** (2004). *Plant J.*

39(5): 715–733.

**Saalbach G, Natura G, Lein W, Bushmann P, Dashe I, Rohrbeck M, Nagy F.** (1999). *J. Exp. Bot.* 50: 53–61.

**Santoni V, Bellini C, Caboche M.** (1994). *Planta*, 192:557–566.

**Saravanan RS, Rose JK.** (2004). *Proteomics*, 4: 2522-2532.

**Schopfer P.** (2006). *Am. J. Bot.* 93(10): 1415–1425.

**Siderovski DP, Jones AM, Willard FS.** (2007). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 17317–17322.

**Song J, Braun G, Bevis E, Doncaster K.** (2006). *Electrophoresis*, 27(15): 3144-51.

**Stasyk T, Hellman U, Souchelnytskyi S.** (2001). *Life Science News*, 9: 1-4.

**Staxén I, Pical C, Montgomery LT, Gray JE, Hetherington AM, McAinsh MR.** (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 1779–1784.

**Temple BRS, Jones AM.,** (2007). *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58:249–66.

**Tian Q, Stepaniants S, Mao M, Weng L, Feetham M, Doyle M, Yi E, Dai H, Thorsson V, Eng J, Goodlett D, Berger JP, Gunter B, Linseley PS, Stoughton RB, Aebersold R, Collins SJ, Hanlon WA, Hood.** (2004). *Mol. Cell Proteomics*, 3(10): 960-966.

**Ullah H, Chen JG, Young JC, Im K, Sussman MR, Jones AM.** (2001). *Science*, 292: 2066.

**Ullah H, Chen JG, Wang S, Jones AM.** (2002). *Plant Physiol.* 129: 897–907.

**Ullah H, Chen JG, Temple B, Boyes DC, Alonso JM, Davis KR, Ecker JR, Jones AM.** (2003). *Plant Cell*, 15: 393–409.

**Wang X-Q, Ullah H, Jones AM, Assmann SM.** (2001). *Science*, 292: 2070–2072.

**Wang W, Scali M, Vignani R, Spadafora A, Sensi E, Mazzuca S, Cresti M.** (2003). *Electrophoresis*, 24: 2369-2375.

**Warpeha KM, Lateef SS, Lapik Y, Anderson M, Lee BS, Kaufman LS** (2006). *Plant Physiol* 140(3): 844–855.

**Warpeha KM, Upadhyay S, Yeh J, Adamiak J, Hawkins SI, Lapik Y, Anderson MB, Kaufman LS.** (2007). *Plant Physiol.* 143(4): 1590–1600.

**Wei Q, Zhou W, Hu G, Wei J, Yang H, Huang J.** (2008). *Cell Res.* 18: 949-960.

**Weiss CA, Garnaat CW, Mukai K, Hu Y, Ma H (1994).** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 9554-9558.

**Weiss CA, Huang H, Ma H (1993).** *Plant Cell*, 5: 1513-1528.

**Widjaja I, Naumann K, Roth U, Wolf N, Mackey D, Dangl JL, Scheel D, Lee J. (2009).** *Proteomics*, 9: 138-147.

**Wu Y, Xu X, Li S, Liu T, Ma L, Shang Z. (2007).** *New Phytologist*, 176: 550–559.

**Zhao J, Wang X. (2004).** *J. Biol. Chem.*, 279: 1794–1800.

**Zhang L, Hu G, Cheng Y, Huang J. (2008).** *Dev. Biol.* 324: 68–75.