

# ***Desarrollo de un sistema molecular para medir cambios en el estado redox celular en plantas bajo condiciones de estrés.***

***Lucía Blixen Bidegaray***

**Orientadora:** *Sabina Vidal*

**Co-orientadora:** *Cecilia Ruibal*

**Laboratorio de Biología Molecular Vegetal  
Facultad de Ciencias – UdelAR**

**2012**

*Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas,  
de pronto, cambiaron todas las preguntas.*

Mario Benedetti

## Agradecimientos

En primer lugar agradecer a Sabina por darme un lugar en su laboratorio, hacerme sentir parte del mismo, y por el cariño. A los compañeros del laboratorio, Marcel y Juan Pablo, por la ayuda; y en especial a Ceci y Alex, no sólo por enseñarme cada una de las cosas que aprendí en estos años, sino también, por escucharme y ayudarme siempre en muchos otros aspectos que hacen el día a día en el laboratorio... y ¡por soportarme!

A los amigos... ¡TODOS! A los que fueron parte de todos estos años en facultad, que fueron muchos y fueron compartiendo distintos momentos siendo importantes en cada etapa... sobretodo a esos que hoy siguen estando ahí y que forman parte de algo más que esto: Lauli, Maia, Flo, Josepe, Rulito, Cabe, y a mi Papein del alma, por todo. También a esos que están siempre, que son parte de mi fuera de esto, y que van a estar siempre, y que adoro con el alma: Dani, Ire, Gabita, Kari, Tiki, que les debo más que mucho. Y hay otros, que aparecieron después, y que son muy importantes: mi esposa, Toto, Vicky, Mano, Pablo, siempre dando para adelante y Emi, ayudando en los momentos complicados de esto y confiando en mí siempre. Sin los amigos las cosas buenas no tienen sentido.

Un gracias sin palabras para mi FAMILIA, que me enseñó y me hizo lo que soy, que me apoyó de manera incondicional. A mamá y papá, que me dieron oportunidades en todos los aspectos de mi vida para que sea feliz y me acompañan en cada una de mis decisiones. A todos: mis abuelos, hermanos, tíos, primos, y sobrinos, ¡gracias por compartir!

Y el más especial, a quién le dedico cada uno de mis logros y sueños, al que lo disfrutaría como nadie, al que le prometí que iba a llegar, y me demoré más de lo planeado; al que me dio lo mejor de él para que yo sea lo mejor de mí, para el que no tengo más que palabras de amor, gracias abuelito, al IRMO,

siMpleMenTe\* ... GRACIAS TOTALES.

# Índice

<b>ABREVIACIONES</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN.</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1. Transducción de señales en plantas al estrés</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2. Estrés oxidativo en plantas.</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3. Proteínas verde fluorescentes (GFPs).</b> .....	<b>11</b>
1.3.1. <i>Proteínas verde fluorescentes sensibles al estado redox (roGFPs).</i> .....	16
1.3.2. <i>Usos de las proteínas verde fluorescentes.</i> .....	19
<b>1.4. <i>Physcomitrella patens</i> como modelo vegetal.</b> .....	<b>22</b>
1.4.1. <i>Mutantes knock-out en genes de respuesta al estrés.</i> .....	25
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1. Objetivos generales.</b> .....	<b>27</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.</b> .....	<b>27</b>
2.2.1. <i>Generación de una construcción génica para la expresión constitutiva de una proteína GFP modificada (roGFP) en <i>Physcomitrella patens</i>.</i> .....	27
2.2.2. <i>Generación de líneas de <i>Physcomitrella patens</i> que expresen constitutivamente roGFP.</i> .....	27
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1. Obtención del gen roGFP a partir del vector pRSETb.</b> .....	<b>28</b>
3.1.1. <i>Transformación de células <i>E.coli</i> electrocompetentes.</i> .....	28
3.1.2. <i>Purificación de los plásmidos.</i> .....	28
3.1.3. <i>Cuantificación de ADN plasmídico.</i> .....	29
3.1.4. <i>Análisis de plásmidos por ensayo de restricción.</i> .....	29
3.1.5. <i>Análisis por PCR.</i> .....	29
3.1.6. <i>Electroforesis.</i> .....	30
<b>3.2. Clonado en vector de entrada pENTR2B.</b> .....	<b>31</b>
3.2.1. <i>Aislamiento de roGFP a partir de pRSETb-roGFP por digestión.</i> .....	31
3.2.2. <i>Purificación de fragmentos a partir de gel.</i> .....	31
3.2.3. <i>Ligación.</i> .....	32
3.2.4. <i>Transformación de células <i>E.coli</i> quimiocompetentes.</i> .....	32
3.2.5. <i>Análisis de colonias por restricción.</i> .....	32



3.2.6. Secuenciación de la construcción pENTR2B-roGFP. ....	33
<b>3.3. Clonado en vector destino pTHUbi-Gate. ....</b>	<b>34</b>
3.3.1. Recombinación pENTR2B-roGFP con pTHUbi-Gate. ....	34
3.3.2. Análisis por restricción de posibles colonias conteniendo la construcción pUroGFP. ....	35
3.3.3. Secuenciación de la construcción pUroGFP. ....	35
<b>3.4. Transformación de <i>Physcomitrella patens</i>. ....</b>	<b>35</b>
3.4.1. Preparación de material vegetal. ....	35
3.4.2. Transformación y selección de transformantes. ....	36
<b>3.5. Visualización de roGFP. ....</b>	<b>36</b>
<b>3.6. Caracterización molecular de líneas de <i>P. patens</i> que expresan roGFP. ....</b>	<b>37</b>
3.6.1. Extracción de proteínas de <i>Physcomitrella patens</i> . ....	37
3.6.2. Cuantificación de proteínas. ....	37
3.6.3. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE). ....	38
3.6.4. Western blot. ....	39
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. Generación de una construcción génica para la transformación de <i>P. patens</i>. ....</b>	<b>40</b>
4.1.1. Clonado y secuenciado de roGFP en vector de entrada pENTR2B con sistema GATEWAY. ....	44
4.1.2. Generación de una construcción en vector de integración para la sobreexpresión de roGFP en <i>Physcomitrella patens</i> . ....	52
<b>4.2. Generación de líneas de <i>Physcomitrella patens</i> que expresen constitutivamente roGFP. ....</b>	<b>58</b>
4.2.1. Transformación de protoplastos de <i>Physcomitrella patens</i> WT y los mutantes knockout <i>Ppnpr1</i> y <i>Pphsp26</i> . ....	58
4.2.2. Visualización de los transformantes en microscopio de epifluorescencia. ....	60
4.2.3. Caracterización molecular de transformantes. ....	62
<b>5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS. ....</b>	<b>67</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....</b>	<b>69</b>

## Abreviaciones

AA	aminoácidos
ABA	ácido abscísico
ADN	ácido desoxirribonucleico
Amp	ampicilina
APS	persulfato de amonio
APX	ascorbato peroxidasa
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BrEt	bromuro de etidio
BSA	Bovine serum albumine
CaCl <sub>2</sub>	cloruro de calcio
CAT	catalasa
c.s.p	cantidad suficiente para
DHA	dehidroascorbato
DHAR	dehidroascorbato reductasa
DTT	ditiotreitól
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EST	Expressed sequence tag
FeSO <sub>4</sub>	sulfato de hierro (II)
GFP	Green fluorescent protein
Gln	glutamina
Gly	glicina
GR	glutación reductasa
GPX	glutación peroxidasa
GSH	glutación
GSSG	glutación oxidado
HCl	ácido clorhídrico
HS	heat shock
HSP	heat shock proteins
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno
HR	hypersensitive response
IQB	Instituto de Química Biológica
Kan	kanamicina
kb	kilobases
kDa	kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato monopotásico
KNO <sub>3</sub>	nitrate de potasio
KO	knockout
LB	medio Luria-Bertani
LEA	<i>Late embryogenesis abundant</i>
MDA	monodehidroascorbato
MDAR	monodehidroascorbato reductasa
mg	miligramo
MgCl <sub>2</sub>	cloruro de magnesio
MgSO <sub>4</sub>	sulfato de magnesio
min	minutos
ml	mililitro

<b>mM</b>	milimolar
<b>Mpb</b>	mega pares de bases
<b>ms</b>	milisegundos
<b>mV</b>	milivolt
<b>NaCl</b>	cloruro de sodio
<b>NADPH</b>	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NaOH</b>	hidróxido de sodio
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>ng</b>	nanogramo
<b>npr1</b>	<i>nonexpresser of pathogenesis-related genes</i>
<b>nt</b>	nucleótidos
<b>O<sub>2</sub></b>	oxígeno molecular
<b>·O<sub>2</sub>·</b>	radical superóxido
<b>·OH</b>	radical hidroxilo
<b>ON</b>	over-night
<b>p35S</b>	promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PBS</b>	buffer fosfato salino
<b>PBS-T</b>	buffer fosfato salino Tween
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>Phe</b>	fenilalanina
<b>PMSF</b>	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>RH</b>	recombinación homóloga
<b>RNasa</b>	ribonucleasa
<b>roGFP</b>	<i>reduction-oxidation sensitive Green Fluorescent Protein</i>
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i>
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SA</b>	ácido salicílico
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sodio
<b>Ser</b>	serina
<b>seg</b>	segundos
<b>sHSP</b>	<i>small heat shock proteins</i>
<b>SOD</b>	superóxido dismutasa
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
<b>Tyr</b>	tirosina
<b>UV</b>	ultra violeta
<b>Val</b>	valina
<b>wt</b>	wild-type
<b>YFP</b>	<i>yellow fluorescent protein</i>
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	zinc
<b>μF</b>	microFaradio
<b>μL</b>	microlitro
<b>μm</b>	micras
<b>μM</b>	micromolar
<b>ε</b>	absortividad
<b>λ</b>	longitud de onda
<b>Ω</b>	ohmio

## Resumen

Las plantas se encuentran frecuentemente sometidas a diversos tipos de estrés a lo largo de su ciclo de vida, los factores de estrés, tanto bióticos como abióticos, generan condiciones de estrés oxidativo, dando lugar a la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Estos compuestos desempeñan distintas funciones en las células vegetales, ya sea en condiciones normales como en condiciones de estrés, y su acumulación puede producir efectos tóxicos. Las plantas, al igual que otros organismos han desarrollado diferentes mecanismos enzimáticos y no enzimáticos de detoxificación que tienden a promover un equilibrio en los niveles intracelulares de ROS.

Una herramienta novedosa, recientemente desarrollada en el 2004 para poder llevar a cabo el monitoreo del estado redox celular, fue la generación de proteínas verde fluorescentes modificadas sensibles al cambio en el estado redox (roGFPs). La incorporación de pares de cisteínas en sitios estratégicos de la cadena de aminoácidos de GFP dió lugar a cambios en las propiedades de fluorescencia. La presencia de dos picos de excitación, a 405nm y a 488nm, se ve afectado en las distintas variantes de estas proteínas (roGFP1 a 6), favoreciendo la formación de uno u otro pico en función del estado redox.

Para evaluar el estado redox frente a distintas condiciones de estrés se utilizó el musgo *Physcomitrella patens*, ya que posee varias ventajas que lo definen como un buen modelo de estudio: incorpora ADN exógeno a su genoma fundamentalmente mediante el proceso de recombinación homóloga, posee su genoma completamente secuenciado, ciclo de vida predominantemente haploide, y posee un alto grado de genes similares al de otras plantas terrestres. Todas estas características permiten que *P. patens* sea utilizado para producir mutantes knockout en genes de respuesta al estrés.

En este trabajo se generó una construcción génica para la sobreexpresión de roGFP1-R12 en *Physcomitrella patens*. Se llevó a cabo la transformación de las líneas salvaje, y de dos líneas mutantes knockout, *Pphsp16.4* y *Ppnpr1*, afectados en genes de respuesta a condiciones de estrés abiótico y biótico, respectivamente. Por último se realizó la caracterización molecular de los clones obtenidos tras la transformación mediante ensayos de Western blot.

## 1. Introducción

Las plantas en la naturaleza se enfrentan a distintas condiciones ambientales que pueden alterar su metabolismo celular. Los distintos tipos de estrés físicos impuestos sobre un organismo que no sean causados por otros organismos vivos, como la luz, las temperaturas extremas, el agua, las altas concentraciones de iones o los contaminantes atmosféricos, se denominan factores de estrés abiótico. La sequía, la salinidad, y las bajas temperaturas son ejemplos de estrés abiótico que afectan principalmente a las plantas (Vinocur and Altman 2005). En el mundo los cultivos se ven sometidos frecuentemente a condiciones de estrés abiótico o biótico, por lo que los mecanismos de adaptación de las plantas a dichas condiciones son considerados de gran interés para la agricultura (Xiong and Zhu 2001), siendo la deshidratación uno de los principales factores limitantes de la productividad de los cultivos (Bartels y Nelson 1994). Debido a su naturaleza sésil las plantas exhiben diversos mecanismos que les permiten adaptarse en las distintas etapas de su desarrollo a distintas condiciones ambientales. Estos mecanismos se pueden basar tanto en la prevención de la exposición al estrés, así como en la tolerancia al estrés. Por lo tanto, comprender los procesos por los cuales las plantas se han adaptado a estas adversidades, y la caracterización de las vías involucradas en las respuestas a diferentes condiciones de estrés, pueden ayudar al desarrollo de plantas tolerantes al estrés biótico y abiótico para la agricultura (Cullis 2004).

### 1.1. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN LAS PLANTAS AL ESTRÉS.

En primer lugar las plantas deben percibir las señales del ambiente, lo que desencadena la activación de cascadas de señalización intracelular que dan lugar a la activación génica y a cambios metabólicos que buscan reestablecer la homeostasis (Vinocur and Altman 2005), lo que confiere un mecanismo de aclimatación de la planta al medio. Estas respuestas involucran la expresión génica y cambios en procesos moleculares y celulares (Knight and Knight 2001). La duración y severidad de un estrés indicarán la magnitud y el tiempo de duración de dicha respuesta.

Las plantas generalmente se van a ver sometidas a distintos tipos de estrés de manera simultánea, por lo que los sensores que perciben el estrés, así como las vías de transducción de señales que informan a la planta ante qué se encuentra expuesta, son sistemas complejos que involucran diversos tipos de proteínas y enzimas. A su vez, estímulos diferentes pueden dar lugar a una misma respuesta en la planta por lo que, en algunos casos, las vías de señalización desencadenadas por distintos estímulos convergen para dar lugar a una respuesta integrada, lo que se denomina entrecruzamiento de las vías o “cross-talk”. A pesar de la superposición de las vías, en algunos casos, parece ser beneficioso producir respuestas específicas, inducibles y apropiadas que resulten en cambios específicos adecuados a las condiciones de estrés particulares a las que se expone la planta (Knight and Knight 2001).

Se han propuesto dos tipos de sistemas de reconocimiento del estrés que dependen de la membrana de la célula vegetal. Estos son sistemas dependientes del estado redox de la célula y los que son dependientes de las perturbaciones de las interacciones en la pared y en la membrana celular (Kacperska 2004). Aunque no se identificaron receptores específicos para el frío, la sequía o la salinidad, los receptores de tipo protein quinasa, así como receptores asociados a proteína-G son sensores potenciales de estas señales. Muchos factores de estrés abiótico dan lugar a la acumulación de ácido abscísico (ABA). Esta hormona activa la expresión génica y desencadena una de las vías de transducción principales en respuesta al estrés (Xiong and Zhu 2001).

Actualmente se sabe que la variación genética de las plantas contribuye a la tolerancia fisiológica al estrés, mediante la regulación de cuatro procesos fisiológicos principales, que incluyen el control de la homeostasis, el ajuste metabólico y la regulación hormonal, el control del crecimiento, y el control del daño celular (Zhu 2002). Los productos de los genes inducidos por estrés pueden actuar protegiendo del daño celular como intermediarios para la percepción y transducción de la señal (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2005). Los genes y proteínas asociadas al estrés pueden clasificarse en dos grupos diferentes: proteínas funcionales, proteínas que actúan en la tolerancia al estrés, y proteínas reguladoras, factores involucrados en la regulación de transducción de señales y en la expresión de genes responsables de la respuesta al estrés.

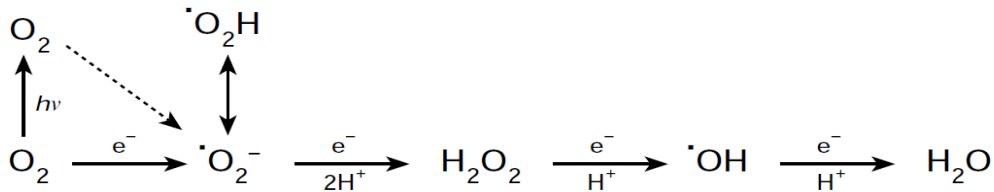
Por lo tanto, aquellos genes que son inducibles por estrés, se cree que cumplen una función en la vías de señalización o juegan roles en la tolerancia al estrés, lo que los convierte en blancos de estudio. La identificación de estos genes puede abordarse de distintas maneras: ensayos de expresión por detección diferencial; aproximación al gen candidato, donde se selecciona un gen de una vía particular de un módulo conocido y se examina la expresión del gen y la actividad de sus productos bajo condiciones de estrés, por complementación funcional en sistemas heterólogos; el uso de agentes farmacológicos que son antagonistas o agonistas para modular las vías de señalización; y, genética directa y reversa, que involucran el aislamiento de las señales en los mutantes, o mutaciones en genes regulatorios, que permitan obtener evidencia para la función de un producto génico en un proceso de señalización particular (Xiong and Zhu 2001).

## 1.2. ESTRÉS OXIDATIVO EN PLANTAS.

La evolución de los procesos de metabolismo aerobio como la respiración y la fotosíntesis dan lugar, inevitablemente, a la producción de ROS en la mitocondria, los cloroplastos y los peroxisomas. Los distintos ROS se caracterizan por su capacidad para causar daño a las proteínas, el ADN y los lípidos; lo que explica que se hayan desarrollado numerosos mecanismos de detoxificación, enzimáticos y no enzimáticos, en las plantas (Apel 2004). Cuando las plantas están expuestas a condiciones de estrés biótico o abiótico se genera un estrés oxidativo en el cual se acumulan grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno (ROS) modificando el estado redox celular (Vinocur and Altman 2005).

En condiciones normales los ROS aparecen en la célula como subproductos inevitables, como resultado de sucesivas reducciones de un electrón del oxígeno molecular ( $O_2$ ). Este oxígeno puede convertirse en formas ROS mucho más reactivas, tanto por reacciones de transferencia de energía o por transferencia de electrones, dando lugar a la formación de superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) (*figura 1*). La mayoría de las células adquirieron mecanismos de protección, que mantienen los niveles de ROS lo más bajo posibles dentro de las células. Bajo condiciones fisiológicas normales los ROS son eliminados por distintos mecanismos

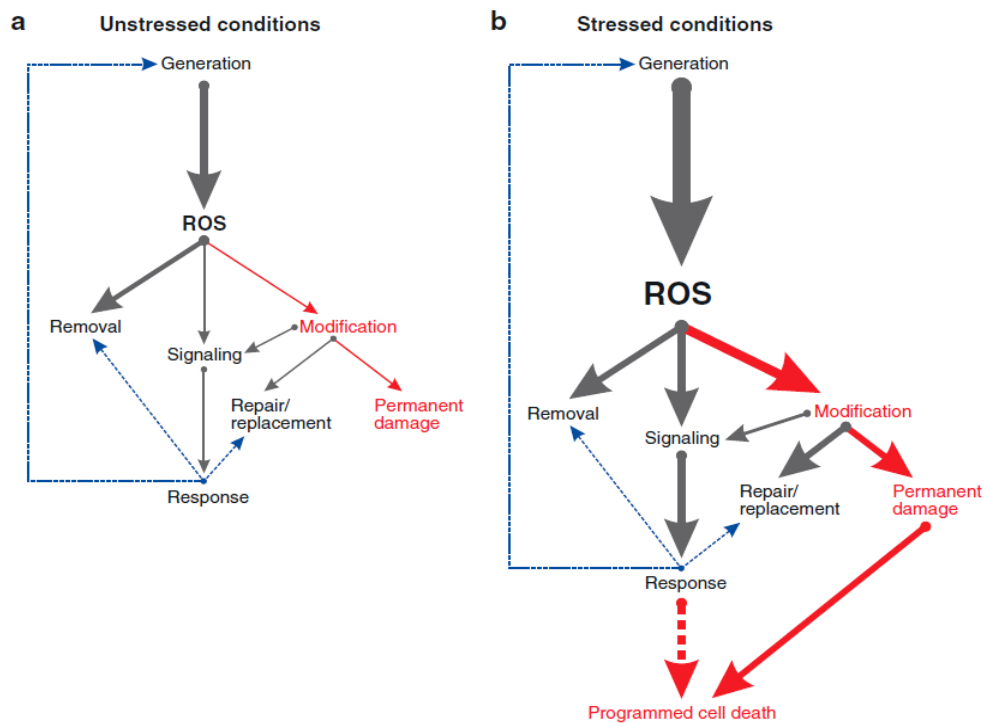
de detoxificación, enzimáticos y no enzimáticos, localizados en determinados compartimentos celulares. El equilibrio entre los mecanismos de generación y detoxificación están bajo un estricto control, ya que estos ROS cumplen distintas funciones en las células, tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés.



**Figura 1.** Esquema de la producción de ROS a partir de la reducción del oxígeno.  $\text{}^{\cdot}\text{O}_2^-$ : radical superóxido.  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrógeno.  $\text{}^{\cdot}\text{OH}$ : radical hidroxilo. [Tomada de Wojtasze 1997].

En condiciones de estrés biótico, como resultado de la infección con patógenos, hay un aumento en las concentraciones de ROS y se produce lo que se denomina *estallido oxidativo* en la planta (Doke 1983). El estallido oxidativo es la producción rápida y transitoria de grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno (ROS), que se produce por activación de varias oxidasas y peroxidasas en respuesta a ciertos tipos de estímulos (*figura 2*), siendo uno de los primeros aspectos observables en las estrategias de defensa de las plantas (Wojtaszek 1997).





**Figura 2.** Representación de la generación en condiciones normales de las células vegetales (a), y bajo condiciones de estrés (b). [Tomada de Møller 2007].

Cuando la planta se enfrenta a la entrada de un patógeno, la producción de ROS va a servir no sólo como protección, sino también va a activar señales que desencadenan las reacciones de defensa, incluyendo la respuesta de hipersensibilidad (HR) de las células infectadas (Tenhaken, Levine et al. 1995). Una de las respuestas de defensa más rápidamente detectadas en las interacciones huésped-patógeno en las plantas es la generación superóxido y peróxido, en el sitio del ataque por parte del patógeno (Apel 2004). La generación de estas especies ocurre por acción de la NADPH oxidasa, que cataliza la producción de superóxido por la reducción de un electrón del oxígeno utilizando al NADPH como donador de electrones. Cuando ocurre el ataque por patógenos, no sólo hay un aumento en los niveles de los ROS, sino que también se produce una desregulación de los mecanismos de detoxificación, ya que el programa de muerte celular requiere altos niveles de peróxido de hidrógeno para ser inducido. Esto es posible gracias a la difusión del peróxido de hidrógeno en la célula desde su lugar de generación hasta el sitio dónde se produjo el ataque por el patógeno. El peróxido va a acumularse rápidamente frente a la llegada

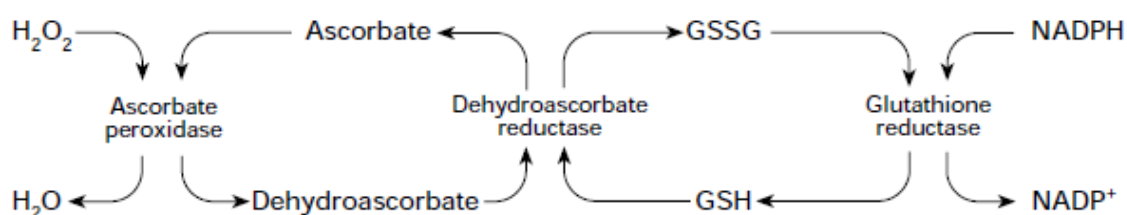
del patógeno, seguido por un segundo estallido más prolongado; su generación ocurre tanto localmente como sistemáticamente (Aple 2004).

Asimismo los ROS están involucrados en la respuesta de la planta frente al estrés abiótico, causado por la luz, la sequía, las altas y bajas temperaturas, el estrés mecánico, entre otros factores. En presencia de luz, los cloroplastos y los peroxisomas son la fuente principal de ROS en las células vegetales, mientras que en oscuridad, la mitocondria es el mayor productor (Moller 2007). En los cloroplastos, por ejemplo, la producción de grandes cantidades de ROS es una consecuencia inevitable de la reducción fotosintética del oxígeno, por lo que la célula debe controlar los niveles de especies generadas, para evitar los efectos tóxicos de los mismos (Apel 2004).

La acumulación de ROS está determinada por el sistema antioxidante, que juega un rol importante en remover esos ROS y en determinar el umbral para las respuestas de defensa contra el estrés biótico y abiótico (Foyer and Noctor 2005). El estrés oxidativo es inducido por muchos agentes ambientales, y muchas veces involucra la inhibición de los mecanismos de defensa antioxidantes de las células, o la desregulación de los procesos metabólicos oxidativos en la célula (Cheng, Tong et al. 2010). El daño producido por la oxidación de células vegetales puede ser irreversible, el cuál ocurre a nivel de lípidos de membrana, ADN, carbohidratos y proteínas (Moller 2007). Sin embargo cambios transitorios en los ROS como peróxido de hidrógeno, anión superóxido y oxígeno singulete son los que se presume que inician la señalización para la defensa contra patógenos, la aclimatación a diversos tipos de estrés abiótico y procesos de diferenciación, como los pelos radiculares y la diferenciación del xilema (Mullineaux and Lawson 2008).

Los ROS que se generan en los compartimentos celulares como la mitocondria y los cloroplastos, resultan en cambios en el transcriptoma nuclear, indicando que la información debe ser transmitida desde estos organelos al núcleo. Los sensores de ROS pueden ser activados para inducir cascadas de señalización que por último afectan la expresión génica. Alternativamente, los componentes de la vías de señalización pueden ser directamente oxidados por los ROS. Finalmente, los ROS pueden cambiar la expresión de los genes por direccionamiento y modificación de la actividad de los factores de transcripción (Apel 2004).

El equilibrio que existe entre las especies generadas y la remoción de las misma es mantenido por varios mecanismos, enzimáticos y no enzimáticos, en la célula vegetal. Dentro de los mecanismos enzimáticos se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX), la glutatión peroxidasa (GPX) y la catalasa (CAT). La SOD actúa como la primer línea de defensa contra ROS, dismuta el superóxido a peróxido de hidrógeno, mientras que APX, GPX y CAT se encargan de remover el  $H_2O_2$  generado. Dentro de los mecanismos no enzimáticos, los principales antioxidantes que actúan como buffer redox celulares son el ascorbato y el glutatión (GSH), así como el tocoferol, los flavonoides, los alcanoides y los carotenoides. Mientras que el GSH es oxidado por ROS formando glutatión oxidado (GSSG), el ascorbato es oxidado a monodehidroascorbato (MDA) y a dehidroascorbato (DHA) (Apel 2004). Para lograr detoxificar los ROS, los niveles de GSH y ascorbato reducido deben ser altos; los mismos son mantenidos en el ciclo glutatión-ascorbato, gracias a la acción de la glutatión reductasa (GR), la MDA reductasa (MDAR) y la DHA reductasa (DHAR), utilizando NADPH como poder reductor (*figura 3*).



**Figura 3.** Representación del ciclo del ascorbato-glutatión. [Tomada de Wojtaszek 1997].

Uno de los metabolitos encargados de mantener el estado redox intracelular reducido es el glutatión, el cual puede pasar de su forma oxidada (GSSG) a reducida (GSH) de manera reversible. La homeostasis del glutatión ha sido considerada un elemento clave en las cascadas de señalización de respuesta al estrés abiótico, donde sus dianas son factores de transcripción que alteran la expresión de genes, o enzimas metabólicas, que modifican los flujos metabólicos (Meyer 2008). Por lo tanto, el glutatión está involucrado en la detoxificación de ROS así como en la transmisión de señales redox; y la relación entre su forma reducida y oxidada es un indicador de estrés oxidativo en células vivas (Jones 2002).

Cuantificar la relación entre las especies reducidas y oxidadas puede dar información acerca de los daños que ocasiona el estrés oxidativo en distintas condiciones de crecimiento así como en diferentes genotipos vegetales. Entre los distintos sistemas moleculares que permiten monitorear estos cambios se encuentra la proteína verde fluorescente sensible al estado redox, roGFP (Redox-sensitive Green Fluorescent Protein) (Hanson, Aggeler et al. 2004), la cual permite llevar a cabo la cuantificación del estado redox en los distintos compartimentos celulares, como aquellos involucrados en ciertas vías de transducción de señal de respuesta al estrés abiótico.

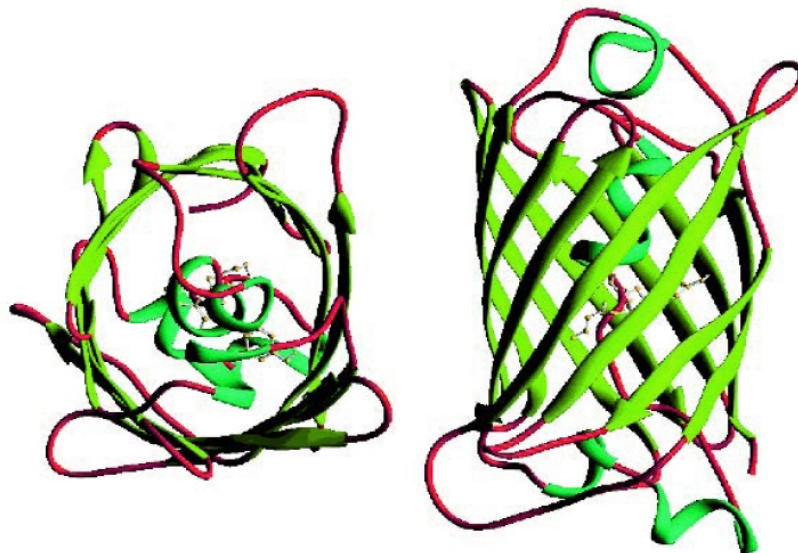
### 1.3. PROTEÍNAS VERDE FLUORESCENTES (GFPs).

Las proteínas verdes fluorescentes se encuentran en un gran número de celenterados bioluminiscentes, dentro de las clases Hidrozoa y Antozoa. En 1962 el grupo de Osamu Shimomura (Shimomura, Johnson et al. 1962) purificó y caracterizó la aequorina de *Aequorea victoria* junto con una proteína que emitía luz verde. En 1966 el grupo de Shimomura denomina a dicha proteína como “fotoproteína”, una proteína bioluminiscente que es capaz de emitir luz en proporción a su cantidad; y luego, en 1969, pasa a denominarse proteína verde fluorescente (GFP) por Hastings and Morin.

Las GFPs tienen como función la emisión de luz en la bioluminiscencia *in vivo*. En *Aequorea* las proteínas aequorina y la GFP están asociadas, de forma tal que la luz liberada por la aequorina (emisión  $\lambda_{\max}$  460 nm) es absorbida por GFP ( $\lambda_{\max}$  400 y 480 nm, 30000 y 7000  $M^{-1}cm^{-1}$  respectivamente), seguido de la reemisión de la energía absorbida por GFP como fluorescencia (emisión  $\lambda_{\max}$  509 nm). En este mecanismo de radiatividad, la energía transferida y la forma del espectro dependen de la concentración de GFP presente (Shimomura 2006).

La proteína wt GFP de *Aequorea victoria* es una proteína pequeña globular, compacta, y soluble, con un largo de 238 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 27 kDa. Sólo esta GFP y las formas recombinantes se encuentran como monómeros, ya que el resto de las GFPs conocidas se encuentran formando dímeros estables. Posee una estructura en forma de barril constituido por 11 hojas  $\beta$ , y  $\alpha$ -hélices en los extremos, en cuyo interior se encuentra el

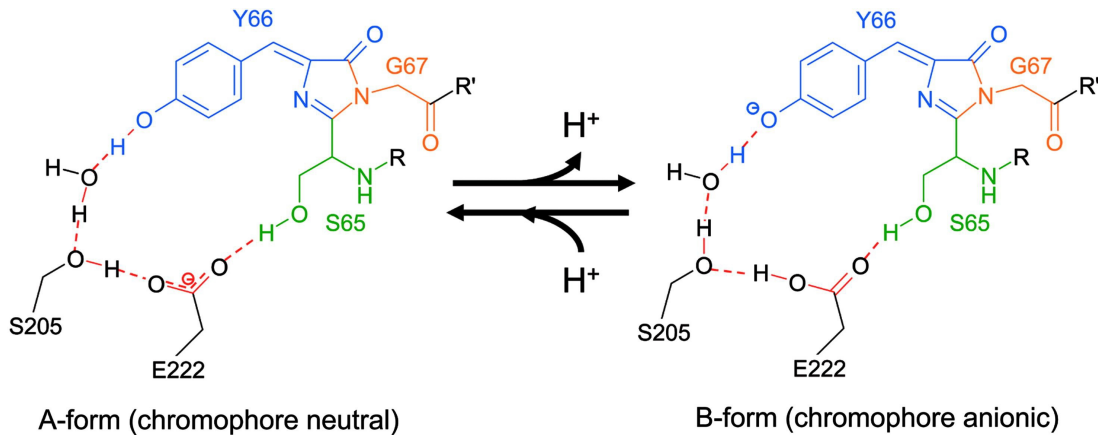
cromóforo (*figura 4*). Estas  $\alpha$ -hélices actúan como tapas, limitando el acceso del solvente al interior de la proteína, por lo que el cromóforo se encuentra muy protegido de la acción de proteasas. La protección es tan completa que los agentes quenchers clásicos de fluorescencia como la acrilamida no tiene efecto sobre la fluorescencia de GFP (Rao et al., 1980). Por otra parte, el espacio físico interior es pequeño, encontrándose moléculas de agua inmobilizadas, pero no moléculas de mayor tamaño. Otra de las ventajas que presenta sobre las otras proteínas fluorescentes es que la formación del cromóforo sólo requiere la presencia de oxígeno, no siendo necesarios cofactores o activadores enzimáticos. Esto permite su empleo en distintos organismos vivos, tejidos y células.



**Figura 4. Estructura de la proteína GFP de *Aequorea victoria*.** Vistas superior (izquierda) y de lado (derecha) de la estructura cilíndrica de GFP. Las 11 hojas- $\beta$  antiparalelas forman una estructura de barril con hélices cortas que forman las tapas en cada extremo. El cromóforo se encuentra dentro, como parte de una  $\alpha$ -hélice corta y distorsionada que se encuentra alineada en el eje del cilindro. (Protein Data Bank entry 1GFL).[Adaptada de Yang, 1996].

El cromóforo de la GFP de *Aequorea* está constituido por los aminoácidos Ser65-Tyr66-Gly67. La forma neutral (protonada) del cromóforo presenta un pico de absorción a 395 nm y la aniónica (desprotonada) a 475 nm (*figura 5*). Estos máximos reflejan dos estados de protonación diferentes del grupo fenol de la Tyr66 en el cromóforo. El mecanismo por el cual se logra la emisión de luz verde a dos longitudes de onda similares se denomina ESPT (transferencia de protón en estado

excitado), en la que interviene un enlace de hidrógeno, entre una molécula de agua y el grupo hidroxilo de la Ser205.



**Figura 5. Estructura del cromóforo.** La desprotonación reversible del cromóforo de GFP da lugar a dos máximos de excitación distintos; interconversión entre las formas A-neutral y B-aniónica del cromóforo. El cromóforo se encuentra formado por Ser65 (verde), Tyr66 (azul) y Gly67 (rojo). La desprotonación del grupo hidroxilo fenólico está acoplado a la protonación de Glu222 a través de una red de enlaces de hidrógeno, que involucra a Ser65, Ser205 y una molécula de agua estructural. [Adaptado de Meyer 2010].

En general, el grado de protonación del cromóforo es determinado por las interacciones con los residuos circundantes, los cuales pueden ser afectados por cambios en la composición y la estructura proteica. Los AA más relevantes son aquellos involucrados en el enlace de hidrógeno del EPST (Ser205, Glu222, Ser65), y los más próximos a Tyr66 (Asn146, His148, Thr203). Cuando se sustituye la glicina 67 por otro aminoácido se obtiene una GFP no funcional, lo que indica que dicho aa cumple un rol importante en la formación del cromóforo.

Sin embargo, la desprotonación se ve muy favorecida cuando se sustituye la Ser65 por una treonina (S65T) (Ormo et al., 1996), donde se incrementa la amplitud (entre 5 y 6 veces) y se obtiene un corrimiento hacia el rojo del pico aniónico, de 475 nm a un máximo de excitación a 488 nm. Esta sustitución no altera la estructura de la proteína, pero sí sus propiedades de absorción debido a que se ve afectada la interacción entre el hidroxilo de la Ser65 y el carboxilo del Glu222, con una desaparición del pico de absorción a 395 nm (Delagrave et al., 1995; Heim et al., 1995;

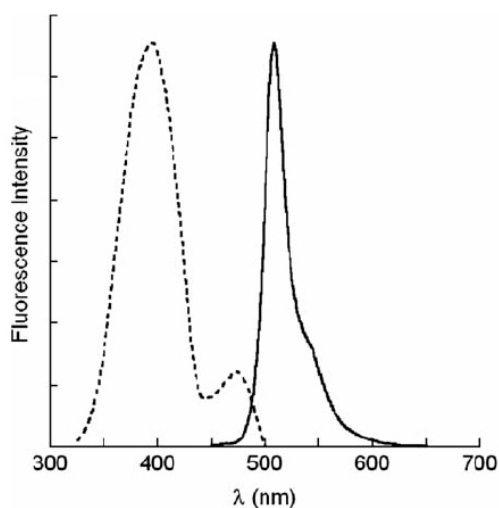
Cheng et al., 1996). La formación del cromóforo maduro en el mutante S65T ocurre 4 veces más rápido que en la GFP wt, y el plegamiento es mucho más eficiente a temperaturas menores a 37°C respecto a GFP wt.

El mecanismo de activación del cromóforo consiste en una ciclación no enzimática, como la desaminación de Asn-Gly (Wright, 1991), seguido por la oxidación de la tirosina a dehidrotirosina. La ciclación de la triada Ser-Gly-Tyr constituye un paso crítico en la formación del fluoróforo, lo que requiere dos factores: (a) la proximidad de los átomos de los aminoácidos 65 y 67, y (b) una reacción ácido-base que catalice la ciclación. La proximidad se consigue por la remoción del impedimento estérico, por la cadena lateral de la glicina en la posición 67. La arginina de la posición 96 se encuentra cercana para actuar como base, sustrayendo los electrones mediante enlaces de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo de la Ser65, favoreciendo así el ataque nucleofílico por el nitrógeno de la amida de la Gly67.

Se ha observado que el reemplazo de ciertos residuos en la superficie del barril de las variantes de GFP produce rearrreglos estructurales pequeños que perturban a los aminoácidos cercanos al cromóforo. Esto ha permitido la generación de variantes de GFP con mejores propiedades fluorescentes (Cannon and Remington 2006). Dichos cambios van a favorecer la presencia de la forma neutral o aniónica del cromóforo, produciendo un corrimiento los máximos de excitación de las distintas GFPs; permitiendo así que las GFPs funcionen como sensores ratiométricos, para realizar medidas cuantitativas.

Las distintas GFPs difieren en las propiedades de su espectro, todas las GFPs conocidas, y la mayoría de los mutantes de *Aequorea* GFP emiten luz con una longitud de onda máxima en un rango entre 490 y 520 nm, donde la mayoría se encuentran entre 508-509 nm. Dentro de todas las proteínas tipo-GFP de la clase Hidrozoa, sólo la GFP de *Aequorea* posee un espectro de absorción con un máximo en la región UV (Morise, Shimomura et al. 1974). La GFP-wt de *Aequorea* posee el espectro más complejo de todas, con un máximo de excitación alrededor de los 395 nm con una amplitud tres veces mayor a la de un pico menor a 475 nm. La excitación de cualquiera de los dos picos da lugar a una emisión verde a 508 nm (*figura 6*). Luego de la excitación a longitudes de onda

próximas a 395nm se produce una disminución en la capacidad de absorción a esta longitud de onda, con un aumento en el pico de excitación a 475 nm; este efecto de interconversión es especialmente evidente cuando se irradia GFP con luz UV.



**Figura 6. Espectro de fluorescencia de GFP wt.** Espectro de excitación (línea punteada), y espectro de emisión (línea sólida) para una excitación a 400 nm, para la proteína GFP wt. La excitación para dos picos, a aproximadamente 400 y 480 nm, da lugar a la emisión verde característica a 510 nm. Las intensidades fueron llevadas a escala para alinear los picos de excitación y emisión. [Adaptado de Cannon and Remington, 2008].

La GFP y sus variantes son resistentes a las proteasas comunes y son estables en condiciones de pH fisiológico, lo que constituye una base óptima para el desarrollo de biosensores para monitorear parámetros fisiológicos importantes. De manera independiente, los grupos de Winther y Remington desarrollaron sondas de GFP sensibles al estado redox, colocando enlaces disulfuro artificiales sobre el esqueleto de las proteínas fluorescentes, que permitieron obtener imágenes cuantitativas, no invasivas, asociadas al equilibrio del ditiol-disulfuro (Meyer, 2010).



### 1.3.1. Proteínas verdes fluorescentes sensibles al estado redox (roGFPs).

Entre las diversas GFPs modificadas, Hanson et al. (2004) obtuvieron mediante mutagénesis, una variante de GFP sensible al estado redox (roGFP, *redox-sensitive green fluorescent protein*). Estas proteínas se crearon mediante inserción de pares de cisteínas en la superficie del barril- $\beta$  (hojas 7 y 10), en posiciones favorables para la formación de puentes disulfuro: posiciones 147/204 y 149/202. Las cisteínas de las proteínas juegan roles importantes en la actividad enzimática, las cuales son necesarias, por ejemplo, para reducir el efecto de las especies reactivas del oxígeno, ROS (Cannon and Remington 2008). Los grupos tioles de las cisteínas son muy sensibles a la oxidación, y sus propiedades redox permiten la formación de puentes disulfuro que permiten que la proteína se pliegue correctamente o forme complejos multiproteicos; sin embargo, también van a ser muy vulnerables al daño oxidativo (Meyer 2008).

Hanson junto con su grupo desarrollaron seis versiones de roGFP: roGFP1 y 2, roGFP3 y 4, y roGFP5 y 6, correspondiendo a la adición de cisteínas en la primer posición (147/204), en la segunda (149/202), o en ambas posiciones, respectivamente (*tabla 1*). Dentro de estas, se dividen además dependiendo sobre que proteína base fueron generadas las variantes, siendo la 1, 3 y 5 construidas sobre GFP wt, y las 2, 4 y 6 sobre la GFP que contiene la sustitución S65T (Hanson, Aggeler et al. 2004), denominada enhanced GFP.

**Tabla 1. Variantes de roGFP.** A la izquierda (variant) se muestran las mutaciones que contienen las distintas variantes, su constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ), su potencial redox ( $E_0$ ), y su rango dinámico ( $\delta$ ) de excitación. [Adaptado de Hanson, 2004].

<i>Spectroscopic excitation ratios and redox equilibrium properties of roGFPs</i>				
Variant <sup>a</sup>	ID	$K_{eq}$ <sup>b</sup>	$E_0$ <sup>c</sup>	$\delta$ <sup>d</sup>
			V	
S147C/Q204C	roGFP1	0.070	-0.288	6.1 <sup>e</sup>
S147C/Q204C <sup>f</sup>	roGFP1	0.83 <sup>f</sup>	-0.287	4.5 <sup>e</sup>
S147C/Q204C/S65T	roGFP2	0.021	-0.272	5.8 <sup>e</sup>
N149C/S202C	roGFP3	0.151	-0.299	4.3 <sup>e</sup>
N149C/S202C/S65T	roGFP4	0.056	-0.286	2.6 <sup>e</sup>
S147C/Q204C/N149C/S202C	roGFP5	0.134	-0.296	7.8 <sup>e</sup>
S147C/Q204C/N149C/S202C/S65T	roGFP6	0.039	-0.280	5.4 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Variants in this column also contain the two phenotypically neutral substitutions C48S and Q80R.

<sup>b</sup> Equilibrium constant ( $K_{eq}$ ) values are given for the reaction  $roGFP_{red} + DTT_{ox} \rightleftharpoons roGFP_{ox} + DTT_{red}$  (see exception below for lipoic acid in Footnote f).

<sup>c</sup>  $E_0$  values are for pH 7 and 30 °C.

<sup>d</sup> The dynamic range value ( $\delta$ ) is the maximum observed  $\delta$ -fold change in excitation peak ratio.

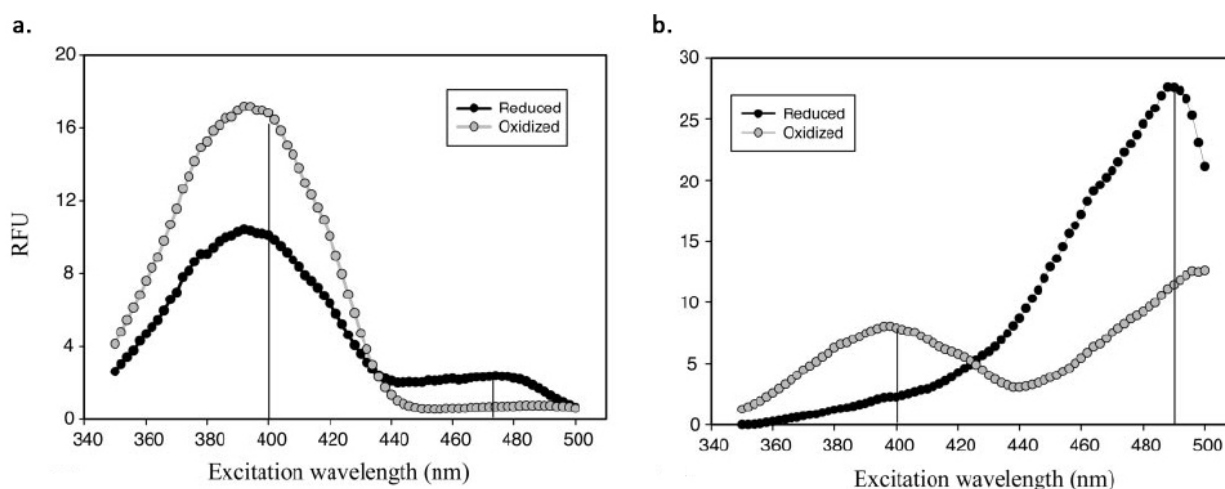
<sup>e</sup> Measured at 475 and 400 nm.

<sup>f</sup> Values estimated by titration against lipoic acid (assumed midpoint potential, -290 mV), average of two experiments.

<sup>g</sup> Measured at 490 and 400 nm.

Las variantes S65T poseen una mayor absorción a 480 nm, una oxidación más rápida y una mayor fluorescencia, con una emisión de fluorescencia que depende no solo del potencial redox, sino también del pH (Hanson, Aggeler et al. 2004). Además, roGFP2 tiene una fluorescencia más brillante, y posee una cinética mayor que roGFP1 para las longitudes de onda 405 nm y 488 nm (utilizadas para microscopios confocales). Las variantes roGFP3 y 4 presentan rangos dinámicos menores que los de roGFP1 y 2, pero poseen potenciales un poco más negativos que éstas. En particular roGFP3, posee el potencial más negativo de todas las roGFPs, -299 mV; por lo que, en compartimentos muy reductores, puede proporcionar mejores medidas en relación a las otras roGFPs (Hanson, 2004; Meyer, 2010).

Los máximos de excitación característicos de GFP se mantienen en estas variantes, predominando la banda A (aprox. 400 nm) para roGFP1 y la banda B (aprox. 475-490 nm) para roGFP2. La oxidación da lugar a un aumento en la banda A, y una disminución en la banda B, y un comportamiento inverso en condiciones reductoras. Ambas versiones presentan un punto isobéptico a aprox. 425 nm (*figura 7*). El potencial redox para las roGFPs fue determinado por el grupo de Hanson mediante titulación con DTT, estableciendo como potenciales normales consenso -291mV para roGFP1 y -280 mV para roGFP2 (Hanson, 2004; Dooley 2004).



**Figura 7. Espectro de excitación de roGFP.** Espectro de excitación para las formas completamente oxidadas y reducidas de roGFP1 (a) y roGFP2 (b). La emisión fue monitoreada a 515 nm. [Adaptado de Dooley, 2004].

Las cisteínas se encuentran en una protuberancia sobre las láminas  $\beta$  próximas a la His148, cuya cadena lateral está orientada hacia dentro del barril localizándose muy cerca del extremo fenólico del cromóforo. El cambio entre la forma neutral y la aniónica del cromóforo ocurre por la protonación/desprotonación de éste grupo fenólico, por lo que la formación del puente disulfuro en estos sitios afecta la orientación del cromóforo y por lo tanto las relaciones de excitación de fluorescencia (Cannon and Remington 2008 ).

La formación del puente disulfuro requiere la desprotonación del tiol de la cisteína a la forma tiolato, siendo este el paso limitante de la reacción. El valor de pKa de las cisteínas en roGFP se encuentra entre 8,9 y 9,5, lo que resulta en la mayoría de los tioles protonados, con una baja reactividad. La forma tiolato de la cisteína se estabiliza en presencia de cargas positivas, aumentando las tasas de formación del puente disulfuro. Como estrategia para generar distintas variantes de roGFP con diferentes aplicaciones se diseñaron distintas variantes de roGFP1, denominadas roGFP1-R (de R1 hasta R14) (*tabla 2*), que poseen hasta tres sustituciones con cargas positivas (lisina o arginina) en sitios cercanos a las cisteínas reactivas, posiciones 149, 202 y 223, para las cuales se observaron tasas de reacción más elevadas. En el caso de roGFP-R12, la inserción de dos lisinas cercanas a las dos cisteínas, más una arginina en la posición 223 da lugar a una constante mayor para las reacciones de oxidación y reducción, además de poseer un mayor punto isoeléctrico estimado (pI 6,2), por lo que se la recomienda para el uso *in vivo* (Cannon and Remington 2006).

**Tabla 2. Propiedades espectroscópicas de los mutantes roGFP1-R.** A la izquierda (variant) se muestran las mutaciones que contienen las distintas variantes de roGFP1-R, y sus propiedades espectroscópicas (rango dinámico, rendimiento cuántico y coeficiente de extinción). [Adaptado de Cannon and Remington, 2006].

Variant <sup>a</sup>	ID	$\delta^b$	$\Phi^c$	$\epsilon^d$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
S147C/Q204C	roGFP1	6.5	0.64	20,200
S147C/Q204C/F223R	R1	5.6	0.60	24,100
S147C/Q204C/N149K	R3	7.0	0.58	20,100
S147C/Q204C/F223R/S202K	R7	6.2	0.64	25,700
S147C/Q204C/F223R/K41D	R8	7.5	0.42	12,600
S147C/Q204C/N149K/Y151D	R9	7.2	0.64	15,200
S147C/Q204C/F223R/S202K/K41D	R10	6.2	0.65	22,500
S147C/Q204C/N149K/F223R	R11	5.4	0.60	18,700
S147C/Q204C/N149K/F223R/S202K	R12	5.6	0.62	23,100
S147C/Q204C/N149K/F223R/S202K/Y151D	R14	5.6	0.60	20,700

<sup>a</sup> Variants also contain the two phenotypically neutral substitutions, C48S and Q80R.

<sup>b</sup> The dynamic range value ( $\delta$ ) is the maximum observed  $\delta$ -fold change in excitation peak ratio.

<sup>c</sup> The fluorescence quantum yield for emission with excitation at 400 nm.

<sup>d</sup> Extinction coefficients for absorbance at 400 nm.

Las variantes de roGFP pierden la capacidad de formar dímeros, característica de la GFP wt. Las cadenas laterales de los aminoácidos Ala206, Leu221 y Phe223, de cada uno de los monómeros, junto con los contactos hidrofóbicos, que involucran a Tyr39, Glu142, Asn149, Tyr151, Arg168, Asn170, Glu172, Tyr200, Ser202, Gln204, y Ser208, forman un gran núcleo hidrofóbico. La sola presencia de éstos alcanza para formar una estructura dimérica en bajas concentraciones en solución y en células vivas (Yang et al., 1996). Cuando se modifican cualquiera de estos tres residuos, siendo uno o en combinación, por residuos cargados positivamente, como A206K, L221K, y F223R, se elimina eficazmente la interacción entre los monómeros (Zacharias et al., 2001). La variante roGFP1-R12 es una de las variantes que posee la mutación F223R, por lo que no va a poder formar dímeros.

### **1.3.2. Usos de las proteínas verdes fluorescentes.**

Entre los genes reporteros más ampliamente utilizados para monitorear la expresión génica en sistemas vegetales se encuentra el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa. El producto de este gen, comúnmente denominado GUS, puede ser localizado y cuantificado mediante el uso de técnicas histoquímicas. Sin embargo estas técnicas son invasivas, y no son adecuadas para el análisis de los transformantes primarios o para seguir en el tiempo la expresión génica en plantas (Jefferson et al., 1987). Por el contrario, la GFP puede ser directamente observada en tejidos vivos, siendo una herramienta muy utilizada para los experimentos de transformación en plantas *in vivo*.

Otra de las ventajas que ofrece la GFP es que se trata de una proteína que no perturba los sistemas biológicos, que puede ser expresada en tejidos específicos y ser dirigida a compartimentos subcelulares específicos. La GFP se puede encontrar aplicada en tres grandes áreas: (1) para la visualización dinámica de las proteínas marcadas en las células, y a gran escala, (2) para el marcaje selectivo y el monitoreo de las células dentro de tejidos en crecimiento en plantas, y (3) para la identificación de plantas transgénicas individuales que expresan GFP (Haseloff and Siemering 2006). El uso de promotores tejido específicos para dirigir la expresión de GFP permite el marcaje selectivo de un tipo particular de células en plantas transformadas.

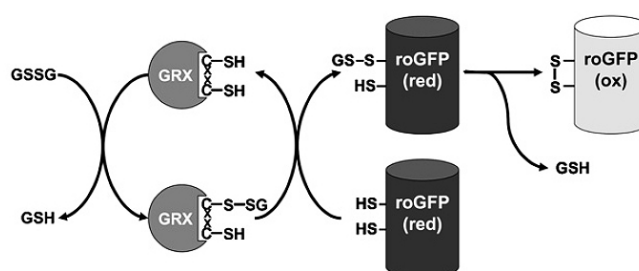
Utilizando una fuente UV se obtiene el espectro de excitación de fluorescencia de GFP, exhibiendo dos picos a las longitudes de onda de 395nm y 475nm. La iluminación con luz ultravioleta puede ser utilizada para excitar GFP, permitiendo la observación de material vegetal transformado sin ocultar la emisión verde (Haseloff and Siemering 2006). Se ha demostrado que las amplitudes relativas para los picos de excitación de GFP pueden ser alterados por medio de mutagénesis (Heim et al., 1994), afectando así el ambiente circundante al cromóforo. Una de estas mutaciones, I167T, ha mostrado un incremento en la amplitud del pico de excitación a 475nm respecto al de 400nm. Es posible manipular los espectros de fluorescencia de GFP mediante la introducción de sustituciones adicionales en la proteína sin afectar perjudicialmente a sus características mejoradas de plegado; como la sustitución Y66H, que da lugar a un corrimiento hacia el azul importante en el espectro de emisión de GFP, obteniendo así una “proteína fluorescente azul” (Heim et al., 1994).

La existencia de los dos picos de excitación permite obtener una respuesta frente a los cambios transitorios en los estados redox asociados con la producción de estallidos de ROS cortos, siendo los cambios en las relaciones de potencial redox del orden de los 10 minutos. En las variantes, roGFP1 y roGFP2, esta excitación dual permite monitorear los cambios en el estado redox celular, modificándose la intensidad de fluorescencia de uno u otro pico dependiendo de cuán oxidado o reducido se encuentre el ambiente celular. De este modo se pueden realizar medidas ratiométricas midiendo las fluorescencias a estas longitudes de onda y expresándolas como una relación 400/480. Este tipo de medidas permite eliminar o reducir las influencias causadas por fotoblanqueamiento, la concentración de la proteína o el grosor del tejido.

Utilizando las distintas variantes se han reportado diversos trabajos en los cuales se monitorea el potencial redox celular de manera reversible. Un ejemplo es el estudio de los eventos de señalización celulares, en los cuales participa el  $H_2O_2$  como segundo mensajero en respuesta a varios estímulos extracelulares. Como la respuesta de roGFP frente a los cambios en la producción intracelular de  $H_2O_2$  es lenta, en el entorno de los 10 minutos, se generaron variantes que contienen cambios en los residuos cercanos a las cisteínas reactivas (149, 202 y 223), sustituyéndolos por residuos cargados positivamente que aumentan el ritmo de formación de puentes disulfuro. Estas variantes son más sensibles a la oxidación por  $H_2O_2$ , dado que se facilita la

desprotonación de las cisteínas redox activas (Hanson et al.,2004; Dooley et.al., 2004). La variante roGFP1-R12 es la que posee la respuesta más rápida en tiempo y un potencial redox mayor (Cannon and Remington 2006).

El grupo de Meyer (Meyer et al., 2007) comprobó que la oxidación completa de roGFP1 y roGFP2 por  $H_2O_2$  y la subsecuente reducción por DTT tiene una cinética más rápida cuando ocurre *in vivo* que cuando se desarrolla *in vitro* con la proteína purificada (*figura 8*); esto sugiere entonces que en las células las roGFPs están interactuando con enzimas redox activas que catalizan la transferencia de electrones (Meyer, Brach et al. 2007). Estos estudios permitieron identificar a las glutarredoxinas como responsables de catalizar de manera reversible la transferencia del estado redox intracelular a la roGFP2.



**Figura 8. Interacción glutarredoxinas-roGFP.** Posible mecanismo catalítico de la oxidación de roGFP mediada por glutarredoxinas (GRX). La catálisis ocurre sin involucrar a la segunda cisteína en el sitio activo de GRX. [Adaptado de Meyer 2008].

Por otro lado, Dooley et al. (2004) realizaron estudios en células HeLa, considerando que la producción de  $H_2O_2$  endógeno está relacionada con la respuesta a factores de crecimiento, y suponiendo que los niveles son mayores en la cercanía de los receptores de membrana para dichos factores de crecimiento, transfectaron células HeLa con roGFP2 dirigida a la membrana plasmática. Para ello utilizaron el extremo N-terminal de la proteína tirosin-quinasa Lyn, como péptido señal. Los resultados evidenciaron la presencia de roGFP2 en la membrana, sin embargo, no fue reactiva a la estimulación por los factores de crecimiento.

Otro ejemplo es el trabajo realizado por Cheng et al. (2010) en el cual se utilizó como herramienta la variante MTroGFP1, que tiene como diana la mitocondria, para visualizar el estrés oxidativo inducido por  $Zn^{2+}$ . El  $Zn^{2+}$  genera toxicidad aumentando el nivel de ROS en la mitocondria, lo que lleva a un cambio en el estado redox y con ello cambios en la intensidad de fluorescencia a 510 nm al excitar a 404 y 488 nm. Se observó un aumento en la fluorescencia 404/488, lo que indicó una disminución en el estado reducido de la mitocondria. Otro grupo monitoreó el estado redox *in vivo* de mitocondria de plantas, utilizando una construcción mt-roGFP2 (Schwarzlander, Fricker et al. 2009). Los resultados mostraron la sensibilidad de la mitocondria frente a las perturbaciones del estado redox y sugieren un rol principal en sensor y señalizar los cambios redox celulares.

Tanto roGFP1 como roGFP2 han sido introducidas y expresadas en *Arabidopsis*. Las muestras fueron completamente reducidas en tejidos en condiciones normales (sin estrés) y respondieron a la oxidación y reducción reversible tras el tratamiento con DTT (ditiotreitól) y  $H_2O_2$  (Jiang, Schwarzer et al. 2006; Meyer, Brach et al. 2007; Meyer and Branch 2009). Con ambas muestras, en el citosol el potencial redox determinado fue de -320 mV (Jiang et al., 2006), y mostraron que la zona de elongación de las raíces de *Arabidopsis* tienen un potencial redox más oxidado que el meristemo o el cap. Estas diferencias en el equilibrio redox se relacionan con observaciones anteriores que indican que el desarrollo de los pelos de las raíces dependen del equilibrio redox y las células de elongación involucran ROS (Sanchez-Fernandez, Fricker et al. 1997).

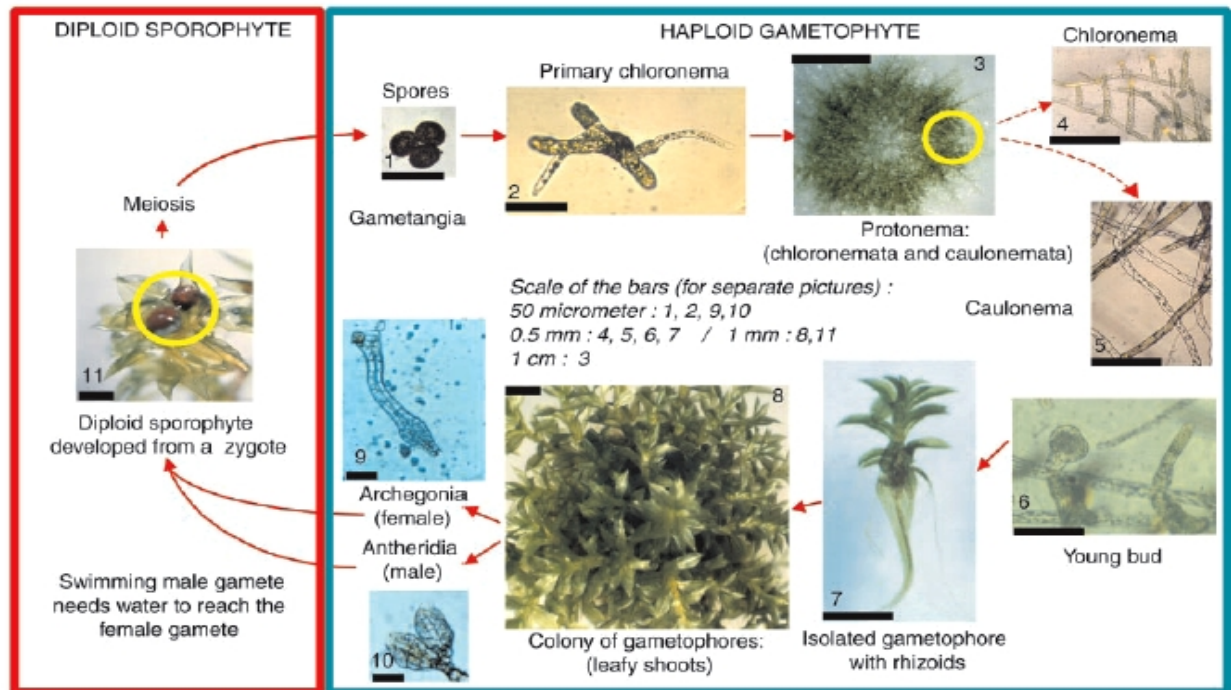
#### **1.4. PHYSCOMITRELLA PATENS COMO MODELO VEGETAL.**

Las briofitas dominaron regiones terrestres hace 400 millones de años, y se encuentran hoy en día ampliamente distribuídas en el planeta, desde los trópicos hasta la Antártida (Proctor and Tuba 2002; Robinson et al., 2003). Su exitosa adaptación a la vida terrestre es un hecho que se atribuye a su gran capacidad de resistir a deshidratación (Oliver et al., 2000). La posición filogenética basal de las Briofitas entre las plantas terrestres las ubica en una situación ideal para contestar preguntas fundamentales sobre la evolución de las plantas (Schaefer 2002).

En los años 30' se reconocieron a las briofitas como un potencial modelo genético para el estudio del desarrollo de las plantas (von Wettstein 1932). Las características que las convierten en un buen modelo son, la facilidades para realizar los análisis genéticos, por la predominancia de la fase haploide en su ciclo de vida; las respuestas similares con las plantas superiores frente al ambiente y a los factores de crecimiento; y la morfología simple de la planta, lo que permite seguir los procesos celulares y de desarrollo a nivel de células individuales (Cove et al., 1997 ). Desde que se obtuvieron aislados los primeros mutantes en el musgo *Physcomitrella patens* (Engel, 1968), esta planta pasó a ser utilizada como sistema de modelo genético para los estudios fisiológicos y de desarrollo (Cove, 1992).

*Physcomitrella patens* es una planta con una arquitectura relativamente simple. El ciclo de vida está dominado por un gametofito haploide, el cuál proviene de esporas haploides, y presenta dos fases de desarrollo distintas: el *protonema*, que posee un crecimiento filamentosos en dos dimensiones; y el *gametóforo*, que se desarrolla por un crecimiento en tres dimensiones del caulonema para convertirse en una planta pequeña típica (*figura 9*). Puede ser crecido en un medio simple, conteniendo únicamente sales inorgánicas, y en 3 meses va a completar su ciclo. Al poseer la fase haploide dominante y presentar menor redundancia génica que las plantas superiores, los fenotipos mutantes puedan ser observados directamente en la progenie, facilitando así su caracterización (Mishler y Oliver 2009).





**Figura 9. Ciclo de vida de *Physcomitrella patens*:** (1) esporas, (2) germinación de las esporas dependiente de la luz, generando el cloronema primario, (3) protonema de 15 días de crecimiento, (4) ramificación del cloronema, (5) células del caulolema caracterizadas por una pared oblicua y un pequeño número de cloroplastos, (6) cambios en la estructura bidimensional de los filamentos, a tridimensional, con apariencia de brotes jóvenes, (7) formación del gametofito, (8) gametofito completamente desarrollado (4 semanas), (9) estructura femenina del gametofito, (10) estructura masculina del gametofito, (11) esporofito diploide. [Adaptado de Schaefer 2001]

En los eucariotas en general, la transformación génica ocurre mayoritariamente por integración de secuencias de ADN por recombinación ilegítima al azar en distintas posiciones del genoma. Sin embargo, la presencia de secuencias isogénicas en el ADN que va a ser introducido, permite dirigir el mismo a loci cromosomales específicos y facilitar su integración por *recombinación homóloga* (RH). A diferencia de las plantas vasculares, *Physcomitrella patens* incorpora ADN exógeno a su genoma fundamentalmente mediante RH, siendo el primer eucariota multicelular en el cuál ocurre la integración de ADN en el genoma mediante RH con una eficiencia similar a la observada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Schaefer y Zryd 1997; Schaefer 2001).

El genoma de *Physcomitrella* fue completamente secuenciado en el año 2007 (cepa Gransden 2004, Schaefer et al., 1991), determinando un tamaño del genoma de 480 megabases distribuidas en 27 cromosomas pequeños (Rensing, Lang et al. 2008). Este tamaño se asemeja al del genoma

del arroz (Reski, 1999). El programa de EST de *Physcomitrella* proporcionó aproximadamente 16.000 ESTs en la base de datos, obteniendo más de 20.000 genes; donde los análisis preliminares de los genes y las ESTs indican que estas secuencias tienen una alta similitud con sus correspondientes secuencias en los genes de plantas superiores. Estas similitudes se extienden desde el uso de codones, estructura intrón-exón, hasta la complejidad de familias multigénicas.

Su capacidad para introducir el ADN exógeno por RH conjuntamente con que su genoma haya sido secuenciado, permite diseñar construcciones para la disrupción y/o reemplazo de genes específicos, generando así mutaciones knockout en loci de interés, y permitiendo realizar estudios por genética reversa (Cho et al. 2007). Este progreso metodológico ubica a *P. patens* en una posición única entre los sistemas modelo en eucariotas multicelulares.

#### **1.4.1. Mutantes knock-out en genes de respuesta al estrés.**

El Laboratorio de Biología Molecular Vegetal tiene como eje central de investigación el estudio de las maquinarias moleculares de respuesta al estrés abiótico y biótico en la planta *P. patens*, para obtener conocimientos que permitan aumentar la tolerancia a estos factores en plantas superiores, con potencial uso para el mejoramiento molecular de especies vegetales de interés agronómico. Estudios de nuestro grupo y otros han demostrado que *Physcomitrella* exhibe una alta tolerancia al estrés osmótico y salino (Frank, Ratnadewi et al. 2005; Saavedra, Svensson et al. 2006) y a las bajas temperaturas (Oldenhof, Wolkers et al. 2006). Explotando el uso de *Physcomitrella* como modelo para el estudio de los genes involucrados en la respuesta al estrés, se han generado una serie de mutantes KO con expresión nula en esta planta. Se destacan dos genes cuyos productos proteicos podrían estar regulados por el estado redox celular en condiciones de estrés: el gen Pphsp16.4 y el gen Ppnpr1.

Entre los distintos genes que participan directamente en la tolerancia a estrés abiótico, las HSPs (heat-shock proteins) y la familia de proteínas LEA (Late Embryogenesis abundant) son por lejos las más abundantes y estudiadas en plantas en el contexto de estas respuestas (Wang et al., 2003; 2004). El estrés por alta temperatura, salinidad y sequía causan la desnaturalización y la pérdida de

función de muchas proteínas; y se cree que las proteínas HSP y LEA ayudan a proteger a la planta del estrés controlando el correcto plegamiento y conformación de las proteínas estructurales y funcionales (Vinocur and Altman 2005).

Las HSPs fueron descubiertas por primera vez en *Drosophila* en el año 1962, y han sido reportadas posteriormente en un amplio rango de organismos incluyendo las plantas (Vierling 1991). Se dividen en cinco grupos de acuerdo a su peso molecular (Trent, 1996). Dentro de las HSPs, las small HSPs (sHSPs) Varios de los miembros de esta familia de sHSPs son esenciales para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Nakamoto y Vigh 2007; Larkindale et al., 2005).

Las HSPs participan en el mantenimiento de la homeostasis del plegamiento de las proteínas suprimiendo la agregación de éstas, en la adquisición de la termotolerancia (Vierling 1991) y protegiendo a la célula del estrés osmótico y oxidativo. Resultados no publicados de nuestro grupo muestran que Pphsp16.4 se induce por estrés osmótico y oxidativo en general, localizándose en agregados citoplasmáticos en la vecindad de los cloroplastos.

Por otro lado, el gen Ppnpr1 codifica una proteína similar a NPR1 (nonexpresser of pathogenesis-related genes) de *Arabidopsis thaliana* (Mou, Fan et al. 2003), la cuál regula la respuesta de defensa frente a patógenos vegetales. En plantas superiores se sabe que NPR1 es un regulador esencial en la resistencia adquirida en plantas frente al ataque de patógenos. NPR1 debe estar reducido para inducir los genes de defensa contra patógenos, por lo que requiere de un aumento en las concentraciones de GSH que permitan mantener un ambiente reductor, no solo para ingresar al núcleo, sino también para interactuar con los factores de transcripción (Meyer 2008). NPR1 está presente en todas las plantas, incluyendo *Physcomitrella patens*, sin embargo no existen datos de su función en plantas inferiores.

Las proteínas HSPs y las tipo NPR1 podrían estar reguladas por el estado redox celular en condiciones de estrés, por lo que el monitoreo del estado redox con técnicas que impliquen la utilización de roGFP, tanto en plantas wt como en mutantes KO de estos genes, puede ser de gran utilidad para entender el mecanismo de acción de las proteínas sHSPs y NPR1 de *Physcomitrella patens*.

## 2. Objetivos

### 2.1. OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de este trabajo es el desarrollo de una herramienta molecular que permita evaluar el estado redox en *Physcomitrella patens* en diferentes condiciones de crecimiento. De este modo, y a largo plazo, se pretende utilizar dicha herramienta para el estudio de distintos mutantes afectados en genes involucrados en las respuestas de defensa al estrés, cuyos productos podrían cumplir funciones dependientes del estado redox celular. En particular, y en primera instancia, se estudiarán los mutantes KO en Pphsp26 y Ppnpr1 generados en nuestro laboratorio.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

#### **2.2.1. Generación de una construcción génica para la expresión constitutiva de una proteína GFP modificada (roGFP) en *Physcomitrella patens*.**

- i. Clonado y secuenciado de roGFP en vector de entrada pENTR2B.
- ii. Generación de una construcción en vector de integración para la sobreexpresión de roGFP en *Physcomitrella patens*.

#### **2.2.2. Generación de líneas de *Physcomitrella patens* que expresen constitutivamente roGFP.**

- i. Transformación de protoplastos de *Physcomitrella patens* WT y los mutantes knockout (KO) Ppnpr1 y Pphsp26 con la construcción.
- ii. Caracterización molecular de transformantes. Estudios por Western Blot con anticuerpo anti-GFP.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Obtención del gen roGFP a partir del vector pRSETb.

#### 3.1.1. Transformación de células *E. coli* electrocompetentes.

El gen roGFP1-R12 se obtuvo a partir del plásmido pRSETb (pRSETb-roGFP) proporcionado por James Remington (Institute of Molecular Biology, University of Oregon). Para multiplicar el plásmido, se transformaron bacterias de *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  electrocompetentes generadas en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal de acuerdo al método descrito por Inoue et al. (1990). 10 ng de plásmido pRSETb fueron electroporados en 50  $\mu$ l de células utilizando un electroporador *Gene Pulser Xcell<sup>TM</sup>* (Bio-Rad) y las siguientes condiciones: voltaje: 2500 V, capacitancia: 25  $\mu$ F, resistencia: 200 $\Omega$ , y un pulso de 4.5-4.8ms. Se agregaron 200  $\mu$ l de medio Luria-Bertani (LB) [10 g/l Bacto triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl, pH 7.0] líquido y se incubó a 37 $^{\circ}$ C durante 1 hora con agitación.

Las células transformadas se plaquearon en medio LB agar [LB con 10 g/l agar] suplementado con el antibiótico de selección ampicilina 100  $\mu$ g/ $\mu$ l (LB/Amp), y se crecieron en estufa a 37  $^{\circ}$ C toda la noche. Se aislaron colonias individuales a partir de las cuales se extrajo ADN plasmídico que fue analizado mediante ensayos de restricción.

#### 3.1.2. Purificación de los plásmidos.

Las colonias de *E. coli* aisladas se crecieron en 5 ml de medio LB/Amp, durante toda la noche a 37 $^{\circ}$ C con agitación. Para posteriores estudios, se almacenó un stock de la muestra en 30% glicerol, a -80 $^{\circ}$ C.

El ADN plasmídico fue aislado a partir de 5ml de medio LB/Amp, utilizando mini preparaciones de plásmidos mediante el método de lisis alcalina (Sambrook et al., 1989). En primer lugar, se centrifugó el cultivo un minuto a 13 000 rpm. Se resuspendió el pellet en 300 $\mu$ l de *buffer 1* [50 mM tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 mg/ml RNAsa] y se vortexeó. Luego se agregaron 300  $\mu$ l de *buffer 2* [200 mM NaOH; 1% SDS], se invirtió el tubo varias veces, y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, se agregaron 300  $\mu$ l de *buffer 3* [3 M acetato de potasio pH 5.5; 11% ácido acético glacial], se invirtió el tubo e inmediatamente se incubó en hielo

durante 10 minutos. Se centrifugó durante 10 minutos a 13 000 rpm, se recuperó el sobrenadante, y se repitió éste paso. Para precipitar el ADN de la muestra, se agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol y se centrifugó a velocidad máxima durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 µl de etanol 70%, centrifugando durante 5 minutos a máxima velocidad. El pellet se secó a 42°C en bloque térmico durante 1 minuto. El ADN se resuspendió en 40 µl de agua miliQ, y se almacenó a -20 °C para su análisis.

### **3.1.3. Cuantificación de ADN plasmídico.**

La cuantificación del ADN plasmídico se realizó en un espectrofotómetro para micro volúmenes, nanodrop, (ACTGene ASP-3700).

### **3.1.4. Análisis de plásmidos por ensayo de restricción.**

Las células transformadas con la construcción *pRSETb-roGFP* se analizaron por ensayo de restricción mediante la digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (Fermentas), y con *NcoI* (Invitrogen). Las digestiones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl y en dos reacciones separadas: una doble digestión con 0.5 µl de las enzimas (*EcoRI* y *HindIII*, buffer R 10X (Fermentas), y otra simple con 0.5 µl de enzima (*NcoI*, buffer 3 10X (Invitrogen), utilizando 0.5 µg de ADN por unidad de enzima en cada reacción. Ambas reacciones se llevaron a cabo a una temperatura de reacción de 37 °C, durante 1 hora. Las dobles digestiones fueron diseñadas en base a las condiciones sugeridas por Fermentas “DoubleDigest™”, que se encuentra disponible en la web (<http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>).

Los productos del ensayo de restricción fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% p/v teñidos con bromuro de etidio (*ver punto 3.1.6*).

### **3.1.5. Análisis por PCR.**

Para corroborar la presencia del gen en las colonias seleccionadas se diseñaron cebadores que permitieron la amplificación de roGFP en el vector pRSETb (*tabla 3*).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl, utilizando: 0.2 mM de cada dNTP's, 0.5 µM de cada cebador específico para roGFP, 1X buffer de PCR, 1 U enzima Taq polimerasa (Fermentas), 10 ng de ADN plasmídico (pRSETb-roGFP), y c.s.p 25 µl de agua para PCR (miliQ filtrada). Se realizaron dos reacciones paralelas y en idénticas condiciones, una con ADN y un

control negativo, sin ADN, para descartar así la presencia de contaminación.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo simultáneamente en un termociclador MultiGene II de la empresa Labnet International Inc. El programa utilizado para la amplificación fue: 94 °C 3 min; 35 ciclos: 94 °C 30 seg, 48 °C 40 seg, 72 °C 1 min 10 seg; 72 °C 10 min.

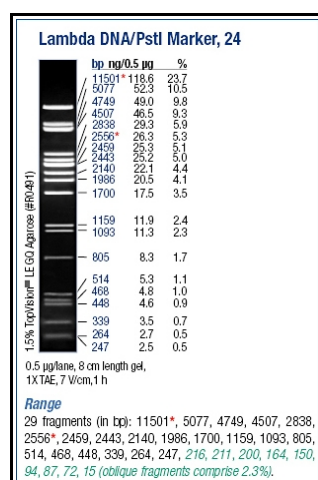
**Tabla 3.** Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de roGFP en el vector pRSETb. En verde aparecen los sitios de corte para las enzimas de restricción.

Cebador	Secuencia	Tm	Sitio de restricción
roGFP-F	5' CGG GAA TTC TAC GAC GAT GAC G 3'	64,2 °C	<i>EcoRI</i>
roGFP-R	5' AGA TCT CGA GCT CGG ATC CT 3'	60,5 °C	<i>XhoI</i>

Los productos de la amplificación fueron analizados en un gel de agarosa al 1% teñidos con BrEt (ver punto 3.1.6).

### 3.1.6. Electroforesis.

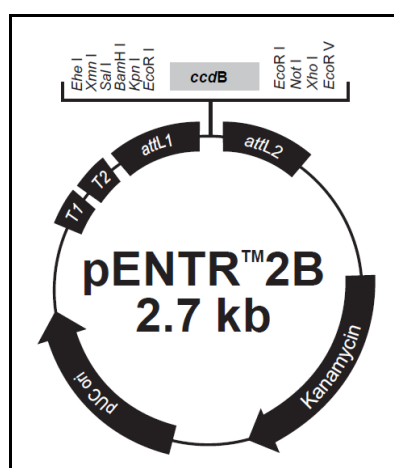
Para la visualización del ADN se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v. Los mismos se tiñeron con 500 ng/mL de BrEt utilizando el buffer 1X TAE [0,04 M Tris base, 1 μM EDTA pH 8.0] (Sambrook et al. 1989). Todas las muestras se cargaron con buffer de carga TD [4 % Ficoll, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.01% bromophenol blue, 0.02 % p/v xylene cyanol blue]. El marcador de peso molecular utilizado para estimar el tamaño y la concentración fue el ADN del fago λ digerido con la enzima *PstI* (Fermentas) (figura 10).



**Figura 10.** Marcador de peso molecular, ADN del fago λ digerido con la enzima Pst1.

### 3.2. Clonado en vector de entrada pENTR2B.

Para generar la construcción pEroGFP se utilizó el vector de entrada pENTR2B del sistema Gateway (Invitrogen, San Diego, CA). El vector confiere resistencia al antibiótico Kanamicina en bacterias. Posee un sitio de clonado múltiple para la inserción del gen de interés, el cuál se encuentra entre los sitios de recombinación attL1 y attL2 (figura 11).



**Figura 11.** Mapa del vector pENTR2B del sistema Gateway (Invitrogen, San Diego, CA).

#### 3.2.1. Aislamiento de roGFP a partir de pRSETb-roGFP por digestión.

La obtención de los extremos cohesivos para la ligación del gen roGFP en el vector de entrada pENTR2B se realizó a través del corte, tanto en el inserto como en el vector, con la enzima *EcoRI* (Fermentas). Se llevaron a cabo dos reacciones independientes en un volumen final de 40  $\mu$ l, conteniendo: 2  $\mu$ l de enzima *EcoRI*, 4  $\mu$ l buffer *EcoRI* 10X, y 25  $\mu$ l de ADN del vector pRSETb-roGFP para una reacción y 23  $\mu$ l de ADN del vector pENTR2B para la otra. La incubación se realizó a una temperatura de 37  $^{\circ}$ C durante 1 hora.

#### 3.2.2. Purificación de fragmentos a partir de gel.

Los fragmentos de ADN generados a partir de los plásmidos pRSETb-roGFP y pENTR2B digeridos con la enzima *EcoRI* fueron purificados a partir de geles de agarosa. Las bandas de interés fueron cortadas del gel y purificadas utilizando el kit GenCatch<sup>TM</sup> Advanced gel extraction



kit de Epoch Biolabs. Las mismas se incubaron con 3 volúmenes de buffer GEX a 55°C durante 10 minutos, y una vez disuelto se transfirió a la columna y se centrifugó durante 30 segundos a 5000 rpm. En cada instancia se descartó el volumen eluido hasta terminar de pasar todo el volumen inicial por la columna. Luego se lavó con buffer WN, y se centrifugó durante 30 segundos a 5000 rpm, descartando el volumen eluido. Posteriormente se utilizó el buffer WS para lavar la columna, centrifugando, en un primer paso, durante 1 min a 5000 rpm, y luego durante 3 min a 1200 rpm para eliminar el etanol. Por último se pasó la columna a un tubo eppendorf para recolectar el ADN, se eluyó con 30 µl agua miliQ y se centrifugó durante 1 min a 12000 rpm.

### **3.2.3. Ligación.**

Para obtener la construcción deseada, pENTR2B-roGFP, se llevó a cabo la ligación de los fragmentos obtenidos tras la digestión del plásmido pRSETb-roGFP y pENTR2B, en una reacción molar vector:inserto de 1:2. Se utilizó la enzima T4-ADN ligasa (Fermentas). La reacción se realizó en un volumen final de 10 µl, utilizando: 0.5 µl de T4-ADN ligasa (Fermentas), 3.0 µl del vector lineal (pENTR2B digerido con *EcoRI*), 5.5 µl del inserto (roGFP, obtenido desde el vector pRSETb), y 1.0 µl de buffer T4-ADN ligasa (Fermentas). Se incubó la mezcla a 16 °C durante la noche.

### **3.2.4. Transformación de células *E. coli* quimiocompetentes.**

La ligación obtenida se utilizó para la transformación de células quimiocompetentes, de la cepa TOPO10 (DH10B) de *E. coli*. Para ello se agregaron 5 µl de la reacción de ligación a las células competentes y se colocaron en hielo durante 30 min. Luego se realizó un shock térmico a 42 °C durante 1 min, y se colocaron inmediatamente en hielo durante 2 min. Se agregaron 200 µl de medio LB líquido, y se incubó durante 1 hora con agitación a 37 °C.

Las células transformadas se plaquearon en medio LB agar suplementado con Kanamicina 50 mg/ml (LB/Kan), y se crecieron en estufa a 37 °C durante toda la noche. Se seleccionaron 4 colonias y se estriaron en una nueva placa de LB/Kan, creciendo en iguales condiciones que las anteriores.

### **3.2.5. Análisis de colonias por restricción.**

Se purificó el ADN de las 4 colonias seleccionadas. El precipitado de cada una de las muestras se resuspendió en un volumen final de 30 µl. Para observar la calidad del ADN se realizó una

corrida electroforética en gel de agarosa al 1% p/v.

Una vez obtenido el ADN se procedió a la digestión del mismo con las enzimas *NcoI* (Invitrogen) y *EcoRV* (Fermentas), con el fin de determinar la orientación del gen roGFP tras la ligación. Se realizaron dos reacciones separadas para cada una de las muestras, utilizando en una 0.5  $\mu$ l enzima *EcoRV* (Fermentas), 2  $\mu$ l buffer R 10X (Fermentas), 10  $\mu$ l de ADN, y c.s.p 20  $\mu$ l de agua miliQ; y otra con 0.5  $\mu$ l enzima *NcoI* (Invitrogen), 2  $\mu$ l buffer 3 10X (Invitrogen), 10  $\mu$ l de ADN y c.s.p 20  $\mu$ l de agua miliQ. Ambas reacciones se llevaron a cabo a una temperatura de reacción de 37 °C durante 1 hora. Los productos de digestión fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% p/v teñidos con BrEt (ver punto 3.1.7).

Para la determinación de la orientación del gen tras su clonado en el vector pENTR2B se realizó una doble digestión con las enzimas *EcoRV* y *NcoI*. Se utilizó para una reacción de 10  $\mu$ l de volumen final: 5  $\mu$ l de ADN, 0.5  $\mu$ l de cada enzima, 1  $\mu$ l buffer Tango 2X (Fermentas) y c.sp. 10  $\mu$ l de agua miliQ (de acuerdo a las recomendaciones del fabricante).

Se seleccionó aquella colonia que resultó positiva para el análisis y se creció en medio LB/Kan líquido, a 37 °C con agitación durante 16 horas. Para posteriores estudios, se almacenó un stock de la muestra (500  $\mu$ l de cultivo líquido) en glicerol 30% a -80 °C. Se purificó el ADN y se cuantificó la muestra.

### **3.2.6. Secuenciación de la construcción pENTR2B-roGFP.**

Para completar el análisis del gen en estudio se secuenció la construcción obtenida (pEroGFP) empleando el servicio de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo.

La secuenciación automática se obtuvo a partir de una concentración entre 100 y 500 ng de plásmido para un volumen total de reacción de 7  $\mu$ l. La concentración de los cebadores empleados (roGFP-F y roGFP-R) fue de 10  $\mu$ M.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information, NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y editadas con los programas BioEdit v7.0.1 (Hall, 1999) y SeqManII v7.0 (DNASTAR Inc, Madison WI).

### 3.3. Clonado en vector destino pTHUbi-Gate.

Con el fin de generar una construcción pUroGFP para la sobreexpresión de roGFP en *P. patens*, se utilizó el vector destino pTHUbi-Gate del sistema Gateway (Pierre François Perroud; Department of Biology, Washington University, St. Louis, MO 63130, USA). El mismo confiere resistencia a ampicilina en bacterias y a higromicina en plantas, y se encuentra bajo la regulación del promotor constitutivo de ubiquitina de maíz (Bezanilla et al., 2005) (figura 12).

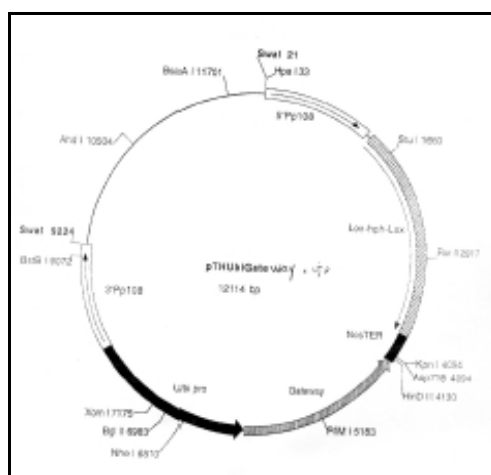


Figura 12. Mapa del vector destino pTHUbi del sistema Gateway.

#### 3.3.1. Recombinación pENTR2B-roGFP con pTHUbi-Gate.

El sistema Gateway (Invitrogen, San Diego, CA) permite realizar la recombinación entre sitios específicos entre los vectores entrada, pEroGFP, y destino, pTHUbi-Gate (Nakagawa et al., 2009). En el vector pENTR2B, el gen roGFP queda flanqueado por los sitios *attL1* y *attL2*, los cuales se recombinan con los sitios *attR1* y *attR2* en el vector destino pTHUbi-Gate. La recombinación se llevó a cabo por la enzima clonasa LR (Gateway LR Clonase enzyme mix); y se utilizó para ello: 1  $\mu$ l enzima clonasa LR, 1  $\mu$ l pEroGFP (300 ng/ $\mu$ l), y 0.5  $\mu$ l pTHUbi-Gate (500 ng/ $\mu$ l), y se incubó a 25°C durante toda la noche. Por último se agregó 1  $\mu$ l de proteinasa K, y se incubó durante 10 minutos a 37 °C, para detener la reacción.

Con la mezcla de recombinación se transformaron células electrocompetentes (ver punto 3.1.1).

### 3.3.2. Análisis por restricción de posibles colonias conteniendo la construcción pUroGFP.

Se analizaron las colonias seleccionadas por ensayo de restricción, para lo que se siguieron los pasos descritos anteriormente en los puntos 3.1.4 y 3.2.5. Se eligió la enzima *Xho*I (Fermentas) para realizar el análisis, utilizando para la reacción: 0,5 µl enzima *Xho*I, 1 µl buffer R 10X, 5 µl de ADN por unidad de enzima, y agua miliQ c.s.p 10 µl; se incubó a 37 °C durante 1 hora.

Se seleccionó la colonia positiva, y se realizó análisis de restricción, seguido de su almacenamiento a -80°C, obteniendo una concentración de ADN plasmídico de 255 ng/µl.

### 3.3.3. Secuenciación de la construcción pUroGFP.

La secuenciación se realizó de igual modo que la anterior (ver punto 1.2.6), utilizando los cebadores pUbi-R y pUbi-prom (tabla 4).

**Tabla 4.** Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de roGFP en la construcción pUroGFP.

Cebador	Secuencia	Tm
pUbi-R	5' TTA CGA GTT TAA GAT GGA TG 3'	51 °C
pUbi-prom	5' GTA ACA CCA AAC AAC AGG GT 3'	53 °C

## 3.4. Transformación de *Physcomitrella patens*.

### 3.4.1. Preparación de material vegetal.

Todas las plantas utilizadas, tanto en estado de protonema como de colonia, fueron mantenidos *in vitro* en medio BCDAT [1,6 g/l Hoagland's, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.5, 10 mM KNO<sub>3</sub>, 45 µM FeSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM tartrato de amonio, 10 g/l agar]. Las plantas se crecieron a 22 °C, con un fotoperíodo de 16 horas y un flujo fotónico de 70 µmol/m<sup>2</sup>.seg. La micropropagación se llevó a cabo cortando las colonias con pinzas estériles y transfiriendo los fragmentos a nuevo medio. El protonema se obtuvo mediante la disrupción de 5 colonias con 2 ml de agua miliQ estéril utilizando un mortero estéril.

Para la transformación se utilizaron placas de protonema luego de 4 pasajes y con 7 días de crecimiento. Cada pasaje fue realizado con cuchillas estériles (Ultraturax) y mantenidos en medio

BCDAT con celofán estéril. Las líneas de *Physcomitrella patens* seleccionadas para la transformación con la construcción pUroGFP fueron: *P. patens* Grandsen tipo salvaje (Schefer et al., 1991), y los mutantes knockout *Pphsp26* y knockout *Ppnpr1*, generados previamente en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal.

### **3.4.2. Transformación y selección de transformantes.**

La transformación se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Schaefer et al. (1991) y adaptado por Saavedra et al. (2006). Los protoplastos se aislaron de cultivos en estado de protonema con 7 días de antigüedad, los cuales se incubaron con 1 ml de driselasa 2 % p/v (Sigma) y 9 ml de manitol 8 % v/v durante toda la noche a 22 °C en oscuridad. Se filtraron con un filtro de 100 µm, se lavaron con manitol 8% v/v, y se siguieron los pasos de acuerdo al protocolo.

Se contaron los protoplastos obtenidos en un microscopio invertido. Se calculó el volumen necesario de solución 3 M [8 % v/v D-Manitol, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% MES pH 5,6] para una concentración final de  $1.6 \times 10^6$  protoplastos, y se utilizó una concentración de ADN de pUroGFP de 30 µg, para cada transformación.

Se incubaron durante 7 días en medio de regeneración [BCDTA, 8% D-manitol] y luego se transfirieron a medio BCDAT con antibiótico higromicina 25 µg/ml (condiciones de selección). Luego de crecer durante 1-2 semanas en selección se pasó a medio fresco sin selección, se crecieron 1-2 semanas y se volvieron a condiciones de selección. Una vez obtenidos los transformantes se realizó la micropropagación de los mismos en medio BCDAT, en iguales condiciones que en el punto 3.4.1.

### **3.5. Visualización de roGFP.**

Se visualizaron las líneas salvajes y *Pphsp16.4* transformadas con la construcción pUroGFP, en el microscopio de epifluorescencia del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Para la observación se montaron hojas de *P. patens* de las distintas líneas en un portaobjetos con agua, y se cubrieron con cubreobjetos. Las imágenes se obtuvieron con un filtro para clorofila, con el fin de evitar interferencia en la señal. Se utilizó como control el genotipo salvaje de *P. patens*.

### 3.6. Caracterización molecular de líneas de *P. patens* que expresan roGFP.

#### 3.6.1. Extracción de proteínas de *Physcomitrella patens*.

Para analizar las líneas de *P. patens* que sobreexpresan la proteína roGFP se realizó una extracción de proteínas de las plantas de acuerdo al siguiente protocolo. Se colocaron entre 100 y 200 mg de material vegetal en estado de colonia (aprox. 5 colonias) en un mortero, y se agregaron 500  $\mu$ l de buffer de extracción [50 mM Tris pH 7.2, 250 mM sacarosa, 5 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 1 mM PMSF]. Se molió el material vegetal, y la muestra se colocó en un tubo eppendorf en hielo. Se centrifugaron a 12000 rpm, durante 10 minutos y a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Se realizó una nueva centrifugación en las mismas condiciones. Las muestras obtenidas se almacenaron a -20 °C.

#### 3.6.2. Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas totales presentes en las distintas muestras se determinó de acuerdo al método descrito por Bradford (Bradford, 1976). Este método se basa en la afinidad de las proteínas al colorante azul de Coomassie, provocando un cambio en el máximo de absorción del mismo de 465 nm a 590 nm, el cuál puede ser monitoreado con espectrofotómetro. Para realizar el ensayo se utilizó el reactivo de Bio-Rad (dye reagent concentrate Coomassie brilliant blue G-250).

Para determinar la concentración proteica de las muestras se realizó una curva de calibración a partir de una solución concentrada de seroalbúmina bovina (BSA), como proteína estándar. Se prepararon varias diluciones con concentraciones finales de 1, 2, 4, 8, 16 y 25  $\mu$ g/ $\mu$ l, y se midieron las absorbancias a una  $\lambda$ = 595 nm, obteniendo así la curva de calibración (absorbancia versus concentración ( $\mu$ g/ml)). Luego se midieron las absorbancias de las muestras de interés a 595 nm, colocando 250  $\mu$ l de Bio-Rad con 5  $\mu$ l de muestra. Utilizando buffer de extracción como blanco. Para todas las medidas se utilizó el espectrofotómetro Varioskan.

A partir de la curva de calibración se obtuvo la ecuación de la recta, la cual se ajusta a la ley de Lambert-Beer:

$$\text{Abs} = \epsilon \cdot l \cdot C$$

Siendo Abs la absorbancia,  $\epsilon$  la absorptividad (Coomassie G-250:  $43000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), 1 mm el paso de la celda, y C (M) la concentración. Extrapolando los datos de Abs obtenidos para las distintas muestras en la recta se determinaron las concentraciones desconocidas.

### 3.6.3. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).

La visualización de las proteínas se realizó mediante electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida, siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizaron geles verticales de 0,75 mm de grosor al 9 % de poliacrilamida. Se mantuvo una relación de acrilamida:bis acrilamida de 29:1. A 5  $\mu\text{g}$  de proteínas totales se les agregó buffer de carga 5X [20 % v/v glicerol, 10% p/v SDS, 0.32 % v/v 2-mercaptoetanol en tris 0,5 M pH 6.8]; las muestras se hirvieron a 100 °C durante 5 min, y se sembraron en los distintos carriles. Las electroforesis se realizaron a voltaje constante en buffer de corrida 1X [200 mM glicina, 25 mM tris, 0.1 % SDS].

#### GEL SEPARADOR: 30 ml

	8%	10%	12%
acrilamida:bis acrilamida 29:1	8,0 ml	10,0 ml	12,0 ml
4X buffer lower gel	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
Agua destilada	14,5 ml	12,5 ml	10,5 ml
10% APS	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
TEMED	28 $\mu\text{l}$	28 $\mu\text{l}$	28 $\mu\text{l}$

#### GEL CONCENTRADOR: 12 ml

	8%	10%	12%
acrilamida:bis acrilamida 29:1	8,0 ml	10,0 ml	12,0 ml
4X buffer u gel	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
Agua destilada	14,5 ml	12,5 ml	10,5 ml
10% APS	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
TEMED	12 $\mu\text{l}$	12 $\mu\text{l}$	12 $\mu\text{l}$

### 3.6.4. Western blot.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, Amersham), en una cuba de transferencia Hoefer TE Series-Tank Transphor unit (GE Healthcare, Amersham) en buffer de transferencia [50 mM Tris, 50 mM ácido bórico, pH 8,3], durante toda la noche a 50 mA. Luego las membranas se bloquearon con leche descremada en polvo al 5 % p/v en buffer PBS-T [PBS 1X [ 0,02 g/l KCl, 0,8 g/l NaCl, 0,02 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,115 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4]/Tween20 0,05 % v/v, pH 7.4] durante 1 hora, con agitación a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron con PBS-T e incubaron con el anticuerpo primario, anti-GFP (1/4000) en PBS-T, durante 1 hora en las mismas condiciones. Se lavaron con PBS-T durante 5 min para eliminar el exceso de anticuerpo primario, y se incubaron con el anticuerpo secundario. En una primera instancia se utilizó como anticuerpo secundario el anti-IgG de conejo IR800 (1/15000) en PBS-T, el cuál reconoce a las cadenas pesadas de la IgG de conejo y a las cadenas livianas de las inmunoglobulinas de conejo (detección del anticuerpo  $\lambda_{\text{exc}}$  778 nm, emisión:  $\lambda_{\text{em}}$  795 nm). En una segunda instancia se utilizó el anticuerpo secundario anti-IgG conejo conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) en PBS-T (1/100000) (Sigma), durante 1 hora con agitación. Se lavaron las membranas con PBS-T, durante 5 min, con un último lavado con PBS 1X .

Las membranas marcadas con anti IgG de conejo IR800 fueron reveladas en el G-Box (Syngene). Las membranas con anti IgG de conejo conjugado con HRP fueron reveladas en películas fotográficas utilizando la mezcla de 5 ml de una solución 1 [25 mM luminol, 4 mM ácido coumárico, 100 mM Tris-HCl pH 8,5] y 5 ml de una solución 2 [5,4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 100 mM Tris-HCl pH 8,5].



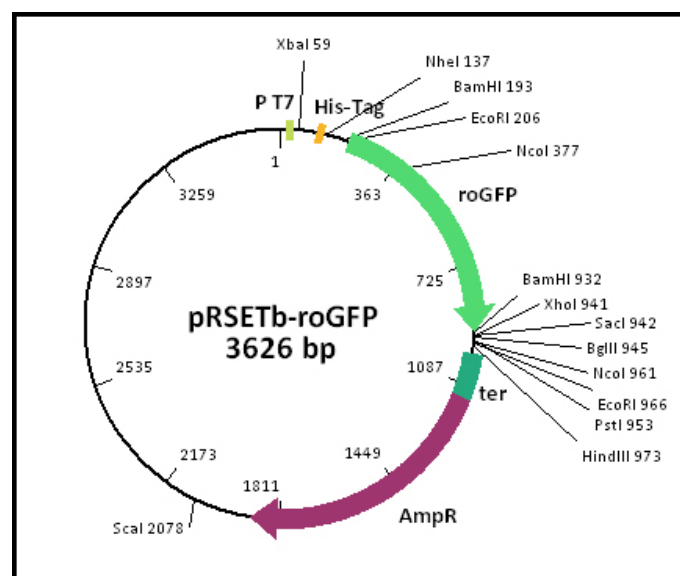
## 4. Resultados y discusión

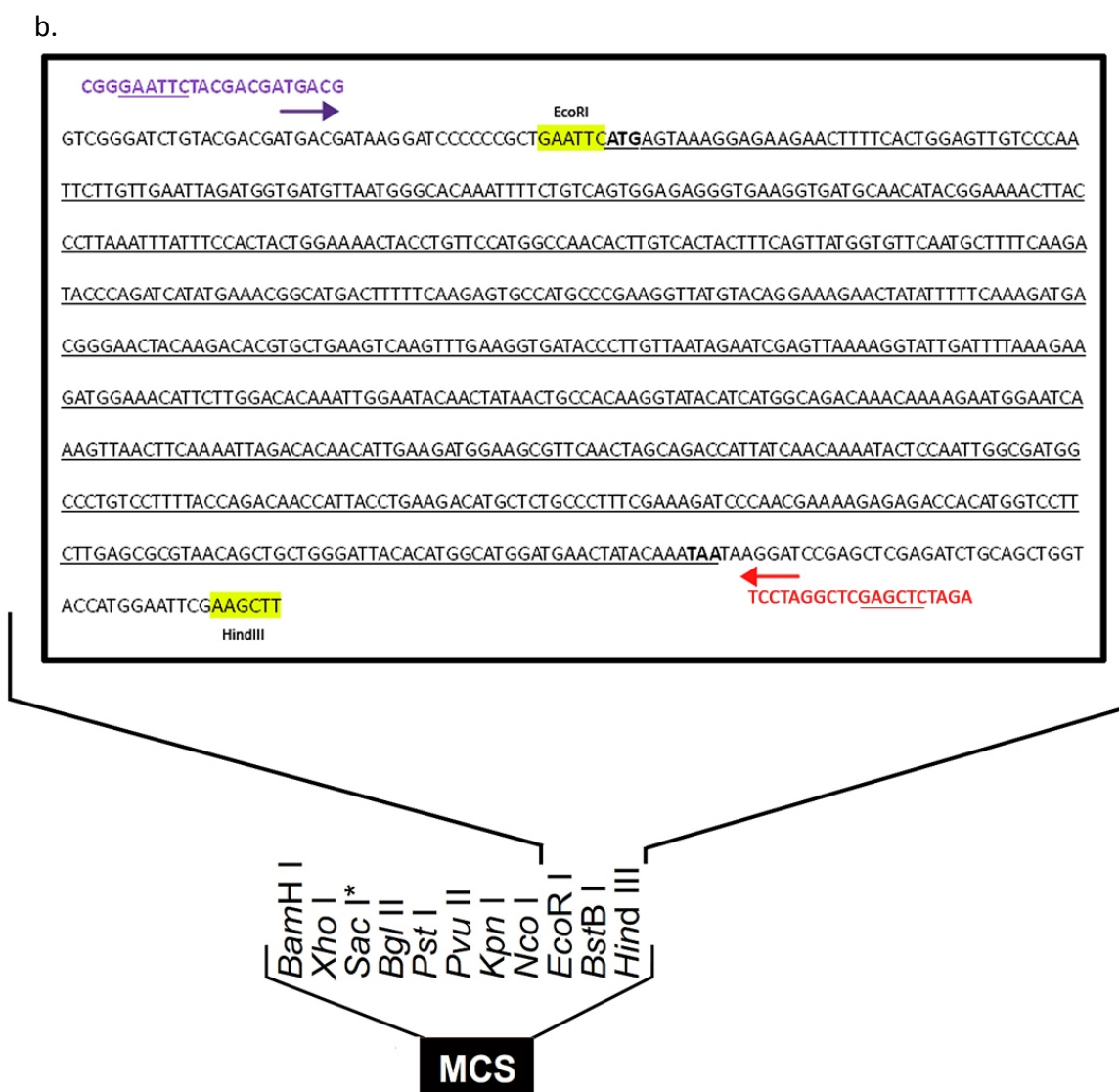
Para cumplir con los objetivos planteados en este trabajo, en primer lugar se procedió a generar una construcción génica que permita la sobreexpresión de la proteína verde fluorescente sensible al estado redox, roGFP, de forma estable en *Physcomitrella patens*. La estrategia que se siguió fue la de clonar la secuencia codificante de roGFP1-R12 (James Remington, Institute of Molecular Biology, University of Oregon), bajo el control del promotor constitutivo de ubiquitina de maiz (Bezanilla et al., 2005), utilizando el vector pTHUbi-Gate (Pierre François Perroud; Department of Biology, Washington University, St. Louis, MO 63130, USA) que dirige la inserción de la construcción por recombinación homóloga en el locus 108 de *Physcomitrella patens* (Schaefer and Zryd, 1997).

### 4.1. Generación de una construcción génica para la transformación de *Physcomitrella Patens*.

La secuencia codificante de roGFP1-R12 se obtuvo a partir del plásmido pRSETb-roGFP (figura 13a), como se describe en la sección *Materiales y métodos*.

a.





**Figura 13. a. Representación de la construcción pRSETb-roGFP.** Plásmido obtenido por James Remington (Institute of Molecular Biology, University of Oregon). **b. Secuencia roGFP1-R12.** Esquema de la ubicación del gen roGFP1-R12 en el vector pRSETb, entre los sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. En violeta se muestra el primer F, en rojo el primer R; en verde, los sitios de corte para las enzimas *EcoRI* y *HindIII*; subrayada se muestra la secuencia del gen.

Conociendo la secuencia del plásmido se diseñaron cebadores específicos de los extremos de la secuencia codificante del gen roGFP, incorporando en sus extremos 5' y 3' sitios de reconocimiento para enzimas de restricción. A su vez, se seleccionaron las enzimas de restricción que permitieron corroborar la presencia del gen de interés en el plásmido (*figura 13b*). En primer lugar se transformaron bacterias *E.coli* electrocompetentes con el plásmido pRSETb-roGFP

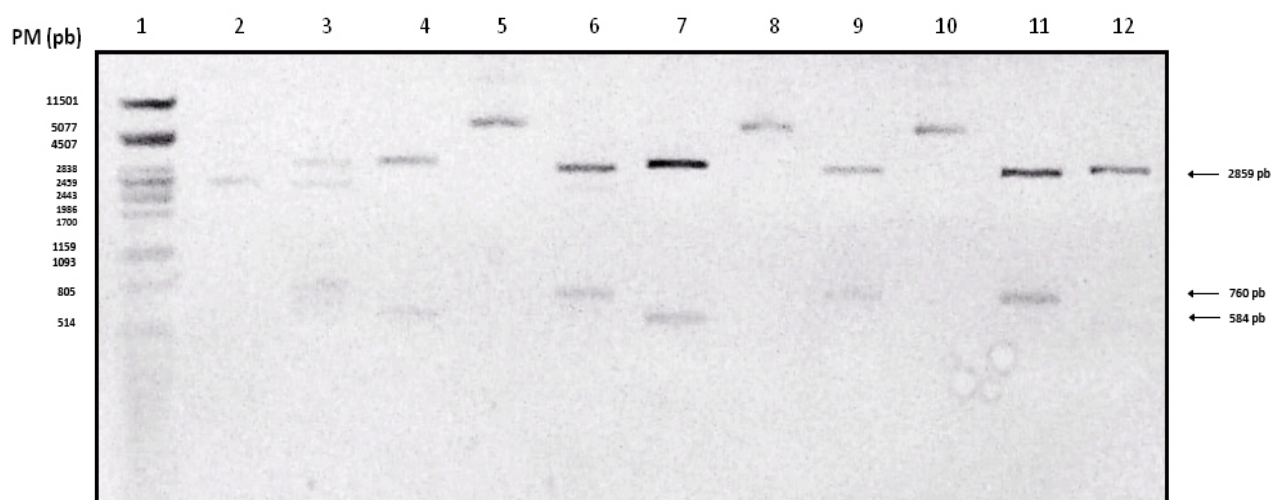
mediante electroporación, y de las 16 colonias obtenidas se seleccionaron 4 que fueron posteriormente analizadas para corroborar la presencia del vector (*ver Materiales y métodos*).

Se extrajo el ADN plasmídico a partir de las colonias seleccionadas y se realizaron ensayos con enzimas de restricción. De acuerdo a la secuencia del plásmido pRSETb, se seleccionaron las enzimas para el ensayo, siendo *EcoRI* y *HindIII* las utilizadas con el fin de liberar el gen de interés; y *NcoI* la utilizada para confirmar la presencia del gen, ya que el gen de interés posee un sitio de corte interno para esta enzima además del que posee el plásmido sólo. Mediante el corte con estas enzimas se logró identificar la presencia del inserto en la construcción pRSETb-roGFP, para lo que se esperaban fragmentos con los siguientes tamaños (*tabla 5*):

**Tabla 5.** Tamaño de los fragmentos esperado para el corte de pRSETb-roGFP, con las enzimas *EcoRI/HindIII* y *NcoI*.

Enzimas	Tamaño de los fragmentos
<i>EcoRI/HindIII</i>	2859 pb + 760 pb + 7 pb
<i>NcoI</i>	3042 pb + 584 pb

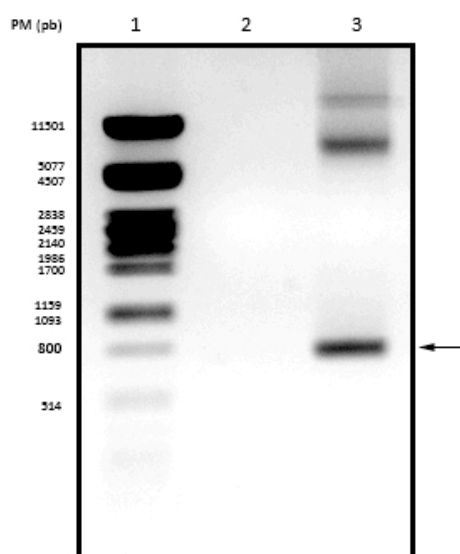
Los productos del ensayo fueron visualizados mediante un gel de agarosa al 1% p/v teñido con BrEt. Como control se utilizó el ADN de las colonias sin digerir (*figura 14*).



**Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa.** Carril 1: marcador de peso molecular  $\lambda$  Pst-1. Carril 2: ADN plasmídico (colonia 1) sin digerir. Carril 3: ADN plasmídico (colonia 1) digerido con las enzimas *EcoRI/HindIII*. Carril 4: ADN plasmídico (colonia 1) digerido con la enzima *NcoI*. Carriles 5, 6 y 7, ídem para ADN plasmídico obtenido de la colonia 2. Carriles 8 y 9: ADN obtenido de la colonia 3 sin digerir y digerido con *EcoRI/HindIII*, respectivamente. Carriles 10, 11 y 12: ídem para ADN obtenido de la colonia 4. Nota: no se realizó la digestión del ADN de la colonia 3 con la enzima *NcoI*.

El ensayo de restricción mostró que los clones analizados corresponderían a la construcción pRSETb-roGFP, ya que las bandas obtenidas se ajustaron al patrón esperado. Para los carriles correspondientes al ADN sin digerir (*carriles 2, 5, 8 y 10*) se observa una banda menor a 11000 pb que corresponde a una isoforma circular del plásmido. En el *carril 2*, se observa también una banda de menor tamaño, aproximadamente 3000 pb, que podría corresponder a la forma superenrollada del plásmido. La digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (*carriles 3, 6, 9 y 11*) dieron lugar a un patrón de bandas que se ajustó al esperado, una de aproximadamente 800 pb, que correspondería al gen de roGFP (717 pb); y una de mayor tamaño, aprox. 2800 pb, conteniendo el resto de plásmido linealizado, liberado tras el corte de las enzimas. Por último, la digestión con *NcoI* (*carriles 4, 7 y 12*), también se observa el patrón esperado. Se observan dos bandas, una de un tamaño de aproximadamente 600 pb, y una de mayor tamaño de aproximadamente 3000pb. Si el vector pRSETb no tuviera el inserto se esperaría una única banda, correspondiente al plásmido linealizado (2887 pb), ya que *NcoI* tiene un único sitio de corte.

Asimismo se realizó un análisis por PCR con el fin de amplificar el gen de interés. Para ello se diseñaron cebadores específicos que se unen a secuencias en el vector pRSETb contiguas a los extremos 3' y 5' de la secuencia codificante del transcripto de roGFP (*ver Materiales y métodos*). El producto de la amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1% p/v (*figura 15*).



**Figura 15. Análisis por PCR.** Carril 1: marcador de peso molecular  $\lambda$  PstI. Carril 2: Control negativo (sin ADN). Carril 3: Producto de amplificación por PCR del ADN plasmídico. La flecha indica la banda esperada que contiene el gen de interés (717 pb).

El tamaño del fragmento obtenido, aprox. 800 pb, se corresponde con el tamaño esperado para el producto de amplificación, 785 pb. Las bandas de mayor tamaño que aparecen en el gel corresponden a ADN del plásmido entero, lo que pudo deberse a que se utilizó demasiado ADN para la reacción de PCR. El control negativo (sin ADN) mostró que la banda obtenida es específica y que no existe contaminación. Este ensayo permitió corroborar que los cebadores diseñados amplifican correctamente el gen de interés en el vector pRSETb-roGFP.

#### 4.1.1. Clonado y secuenciado de roGFP en vector de entrada pENTR2B con sistema GATEWAY.

Con el fin de clonar el gen de interés en el vector pENTR2B del sistema Gateway se utilizó como punto de partida ADN de la construcción pRSETb-roGFP de acuerdo a la metodología descrita (*ver Materiales y métodos*).

La estrategia seleccionada en primera instancia para la generación de la construcción pENTR2B-roGFP fue mediante el clonado del gen a partir del producto de amplificación por PCR, digerido con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*. Tras la ligación del gen de interés en el vector se procedió a realizar los análisis por PCR, por ensayo de restricción, y por secuenciación. Los resultados de los mismos no fueron congruentes con lo que se esperaba, ya que se obtuvieron los patrones esperados para

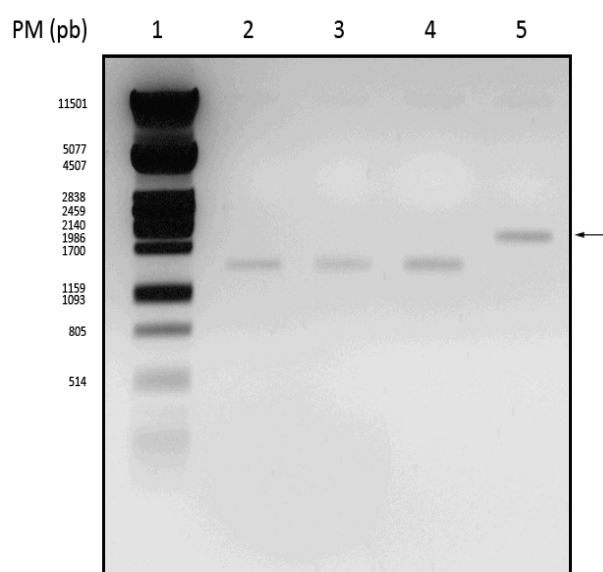
los ensayos de restricción, pero no se obtuvo un producto de PCR esperado, ni se pudo secuenciar la construcción. Estos datos indicaban que el problema podía estar vinculado con los cebadores, ya que los dos análisis involucraban la utilización de estos cebadores.

Debido a estos inconvenientes durante el clonado, se diseñó una nueva estrategia para la generación de la construcción, con el fin de evitar el problema de unión del cebador. La misma consistió en la liberación del gen de interés, roGFP, del plásmido pRSETb por digestión con la enzima *EcoRI*. A partir del ADN de la construcción pRSETb-roGFP y del vector destino pENTR2B se llevó a cabo el ensayo de digestión según se describe en la metodología (*ver Materiales y métodos*). La digestión dió lugar a dos fragmentos de interés, uno de 760 pb, que contiene el gen de interés a ser ligado, y otro de 2295 pb, que corresponde al vector de entrada abierto para la incorporación del gen (*tabla 6*):

**Tabla 6.** Tamaños esperados para la digestión con la enzima *EcoRI* en la construcción pRSETb-roGFP, para liberar el gen de interés, y en el vector de entrada pENTR2B del sistema Gateway.

	<i>EcoRI</i>
Vector	Tamaño de los fragmentos
pRSETb-roGFP	2866 pb + 760 pb
pENTR2B	2295 pb + 423 pb

Una vez aisladas las bandas de interés se procedió a la ligación de los fragmentos, a la transformación de *E.coli* electrocompetentes con la mezcla de ligación, y a su crecimiento en medio LB/Kan agar, con el fin de obtener las colonias a ser analizadas (*ver Materiales y métodos*). De las colonias obtenidas se seleccionaron 4 para chequear la construcción, y se corroboró la integridad del ADN luego de la purificación de los plásmidos (*figura 16*).



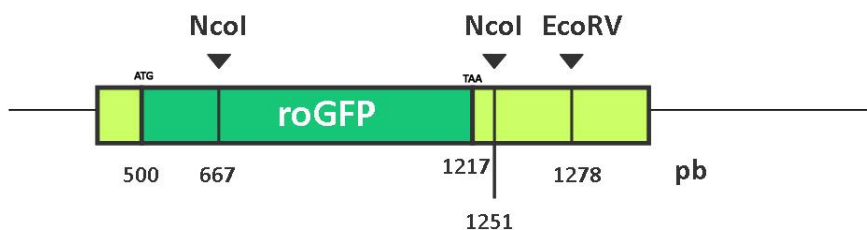
**Figura 16. Visualización de la integridad del ADN plasmídico.** Carril 1: marcador molecular  $\lambda$  PstI. Carriles 2, 3 y 4: ADN plasmídico obtenido a partir de las colonias 1, 2 y 3, respectivamente. Banda de aprox. 1700pb. Carril 5: ADN plasmídico obtenido a partir de la colonia 4. Banda de aprox. 2140pb.

Se observaron diferencias en el tamaño de las bandas correspondientes al ADN plasmídico para las colonias 1, 2, 3 y 4; para las cuáles se esperaba un tamaño de 3055 pb, para la construcción pENTR2B-roGFP, y 2718 pb, para el pENTR2B vacío. Considerando que en los dos casos lo que se visualizaba no era el plásmido lineal, sino otra isoforma del mismo, se procedió al análisis del ADN plasmídico por ensayo de restricción, para identificar cuál patrón correspondía a la construcción y si el gen insertado se encontraba bien orientado.

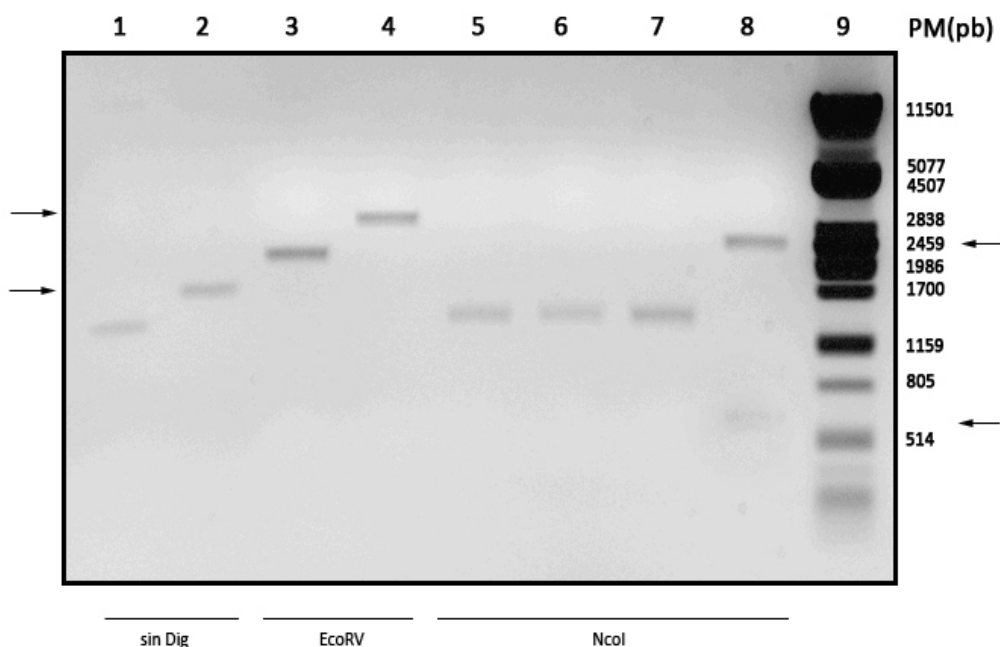
En base a las secuencias del vector pENTR2B y del gen roGFP se diseñó la construcción teórica pENTR2B-roGFP, y se eligieron las enzimas de restricción que daban lugar a diferencias en el patrón de restricción de acuerdo a si estaba presente o no el gen en el vector de entrada. Para ello se seleccionaron las enzimas *NcoI* y *EcoRV*, y se esperaba el siguiente patrón de bandas en caso de ser positivas para la construcción deseada (tabla 7, figura 17). Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 1% p/v (figura 18).

**Tabla 7.** Tamaño esperado de los fragmentos tras el corte con las enzimas *NcoI* y *EcoRV* para los plásmidos positivos para la construcción

Enzimas	Tamaño de los fragmentos
<i>NcoI</i>	2467 pb + 588 pb
<i>EcoRV</i>	3055 pb



**Figura 17.** Esquema de los sitios de corte en la construcción *pENTR2B-roGFP*. Las flechas indican los sitios de corte para las enzimas *NcoI* y *EcoRV*. En verde claro se muestra parte del vector *pENTR2B*, y en verde oscuro se muestra el gen *roGFP*. Los valores corresponden a la ubicación en pares de bases de los distintos sitios; para la orientación 5'-3' del gen en el vector.



**Figura 18.** Análisis por ensayo de restricción construcción *pENTR2B-roGFP*. Carriles 1 y 2: ADN plasmídico de las colonias 1 y 4 sin digerir, respectivamente. Carriles 3 y 4: digestión del ADN plasmídico de las colonias 1 y 4 con la enzima *EcoRV*, respectivamente. Carriles 5, 6, 7 y 8: digestión del ADN plasmídico de las colonias 1, 2, 3 y 4 con la enzima *NcoI*, respectivamente. Carril 9: marcador de peso molecular  $\lambda$  *PstI*.



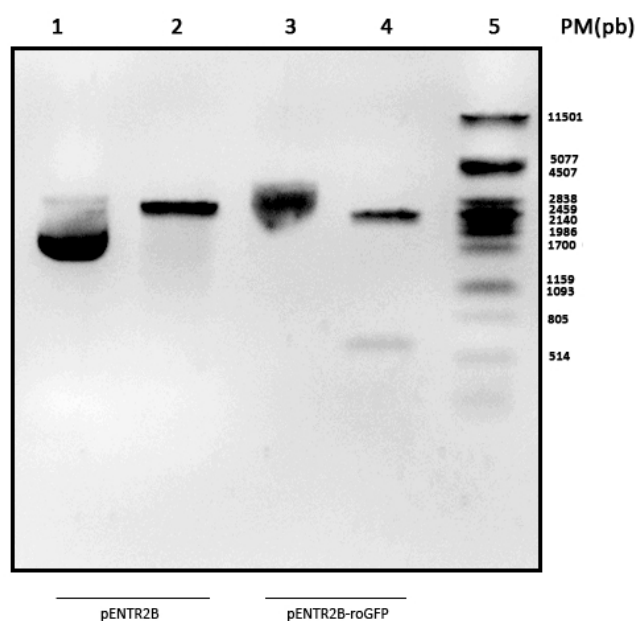
Al igual que en la figura anterior, se observan diferencias en las colonias 1 y 4 sin digerir, por lo que se sospecha existen diferencias entre ambas, las cuales pueden deberse a la presencia o no del inserto (*carriles 1 y 2*). En los *carriles 3 y 4* se observan los productos de digestión para la enzima *EcoRV*, la cuál corta en un único sitio en el plásmido pENTR2B; por lo que el corte con la misma va a linealizar el plásmido. Si no está presente el gen de interés el tamaño esperado es de 2718 pb (pENTR2B vacío), y si posee el inserto es de 3055 pb. En el *carril 3* se observa una única banda de aprox. 2500 pb, lo que podría corresponder al plásmido vacío. En el *carril 4*, sin embargo, se obtiene una banda de mayor tamaño que la anterior para la linealización, de aprox. 3000 pb; el cual se asemeja al esperado para la construcción. Por otra parte, los *carriles 5, 6 y 7* presentan el mismo patrón de bandas para la digestión del ADN plasmídico con la enzima *NcoI* (colonias 1, 2 y 3, respectivamente), con un tamaño de aprox. 1500 pb. Esta banda es similar a la obtenida para el ADN 1 sin digerir del *carril 1*, lo cual sería correcto teniendo en cuenta que el plásmido pENTR2B no posee sitio de corte para esta enzima. Por último, en el *carril 8* se obtuvo un patrón distinto para el corte con *NcoI*; se obtuvieron 2 bandas, una de aprox. 2500 pb, y otra menos intensa, de aprox. 600 pb. Este patrón se corresponde con el esperado en presencia del inserto, ya que se generan los dos sitios de corte para la enzima, dando lugar a dos fragmentos. Estos datos por lo tanto muestran que el ADN plasmídico de las colonias 1, 2 y 3 no contiene el inserto, pero si el de la colonia 4 (se indica con flechas en las *figuras 17 y 18*).

Una vez que se determinó cuál era la colonia positiva para la construcción, se procedió a analizar la orientación del inserto tras la ligación. Teniendo en cuenta las secuencias se diseñaron las construcciones teóricas para la inserción del gen en orientación 3'-5' y 5'-3', y se eligieron 2 enzimas que permitan diferenciar cada situación. Para ello debían cumplir la condición de cortar una de ellas en el inserto y la otra en el vector, siendo las elegidas *NcoI* y *EcoRV* respectivamente, y utilizadas juntas en una misma reacción (*ver Materiales y métodos*). Para dicho ensayo los fragmentos esperados eran los siguientes (*tabla 8*):

**Tabla 8.** Tamaño esperado de los fragmentos tras el corte con las enzimas *NcoI* + *EcoRV* de acuerdo a la orientación de inserción del gen de interés, en el plásmido positivo para la construcción.

		<i>NcoI</i> + <i>EcoRV</i>
Orientación	Tamaño de los fragmentos	
5' - 3'	2444 pb + 584 pb + 27 pb	
3' - 5'	2278 pb + 588 pb + 189 pb	

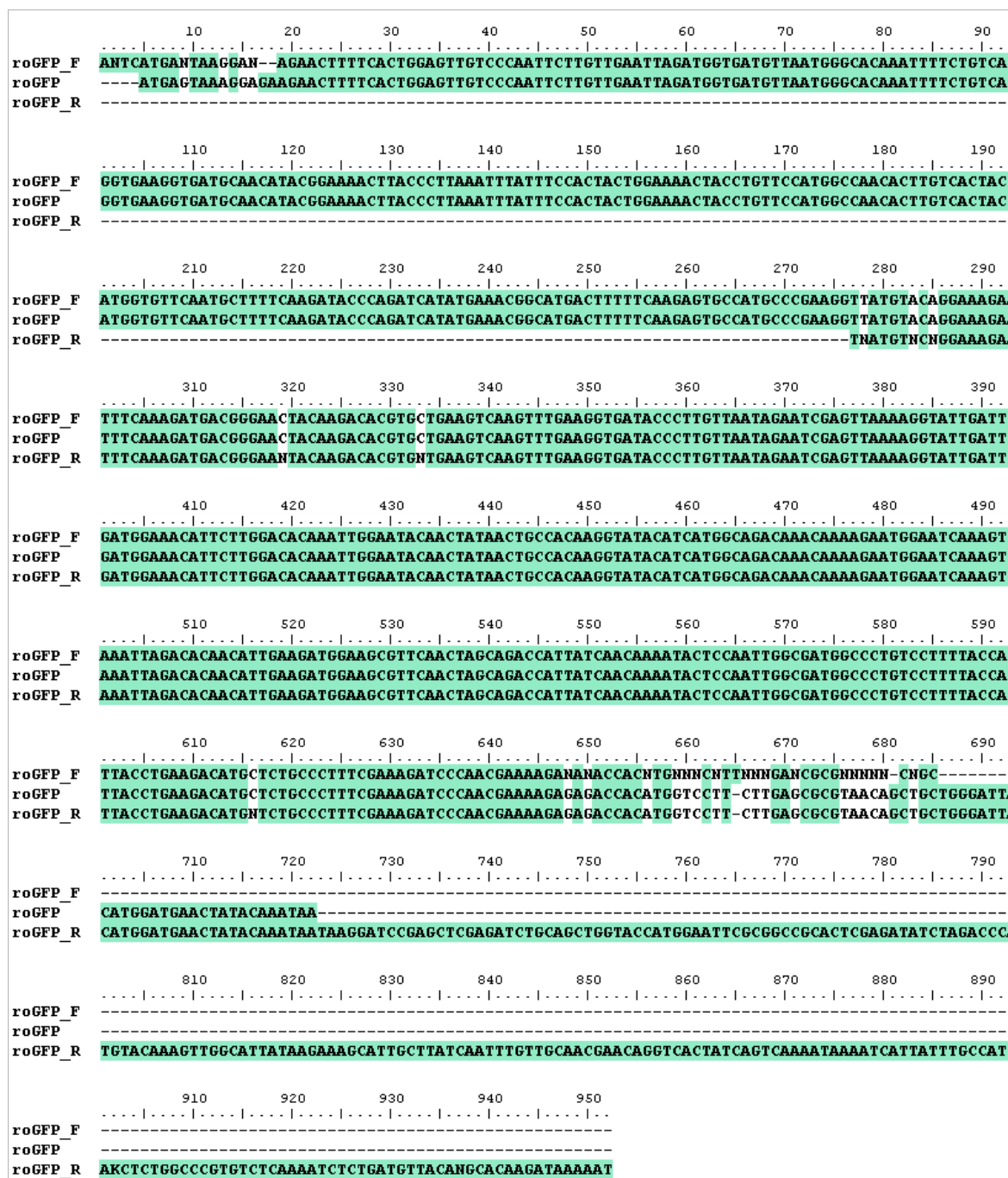
Para la visualización de los productos de digestión se realizó un gel de agarosa al 1% p/v, y se obtuvo el siguiente patrón de bandas:



**Figura 19. Análisis de la orientación de inserción de roGFP.** Carril 1: ADN plasmídico del vector pENTR2B sin digerir. Carril 2: ADN plasmídico del vector pENTR2B digerido con *NcoI* + *EcoRV*. Carril 3: ADN plasmídico obtenido de colonia 4 sin digerir. Carril 4: ADN plasmídico obtenido de colonia 4 digerido con *NcoI* + *EcoRV*. Carril 5: marcador de peso molecular  $\lambda$  *PstI*.

El patrón de bandas obtenido tras realizar la digestión del vector vacío, pENTR2B, y del vector conteniendo el gen de interés, pENTR2B-roGFP, se corresponde con los resultados esperados. Dado que pENTR2B no contiene sitios para la enzima *NcoI*, el corte con *EcoRV* da lugar a la linealización del plásmido, el cual tiene un tamaño de 2718 pb; comparando los *carriles 1* y *2* se observa la diferencia en la migración de la banda, lo que confirma la presencia del sitio de corte. Por otro lado, al comparar el *carril 1* con el *carril 3* (construcción sin digerir) se observa una diferencia en el tamaño, lo que coincide con lo esperado, ya que la construcción pENTR2B-roGFP tiene un tamaño de 3055 pb. Al digerir el vector con el inserto, se obtuvo el siguiente patrón: una banda de mayor tamaño, aprox. 2500 pb, y una menor, de aprox. 600 pb. Se concluyó a partir de estos datos que el gen roGFP se ligó en la orientación correcta, ya que si se encontraba en la orientación contraria la banda de mayor tamaño debería ser de 2278 pb, y se podría haber visualizado la banda de 189 pb.

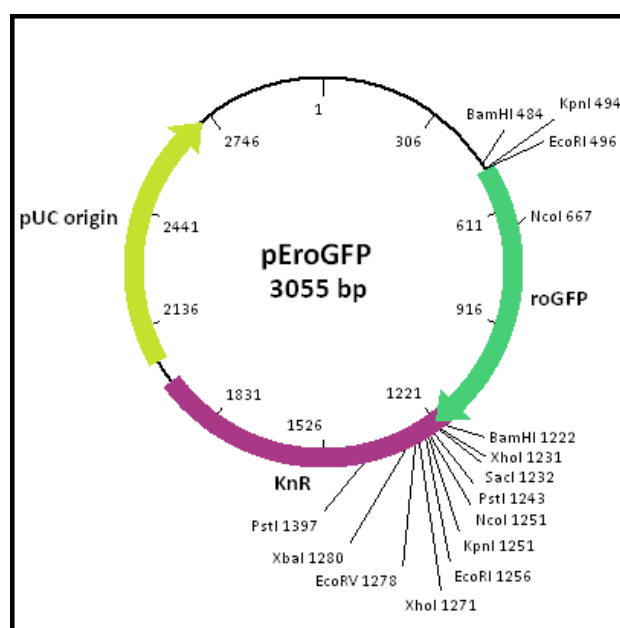
Para finalizar, se confirmó la presencia del gen roGFP en el vector pENTR2B mediante la secuenciación automática del ADN plasmídico, con los cebadores roGFP-F (10  $\mu$ M) y roGFP-R (10  $\mu$ M) (*figura 20*), en el servicio de secuenciación del IP de Montevideo (*ver Materiales y métodos*).



**Figura 20. Secuenciación automática de la construcción pENTR2B-roGFP.** Alineamiento de las secuencias obtenida con los primer pENTR-F (10  $\mu$ M) (superior), y pENTR-R (10  $\mu$ M) (inferior); en el centro aparece la secuencia del gen roGFP. (Alineamiento realizado con el programa Bioedit).

A la construcción obtenida se la denominó: pEroGFP, y se representa en la *figura 21*. Una vez obtenida la construcción deseada, se guardó un stock de las bacterias recombinantes en glicerol a

-80°C (ver Materiales y métodos), para ser utilizado en los ensayos posteriores.



**Figura 21. Representación de la construcción pEroGFP.** Construcción obtenida por inserción del gen roGFP en el vector de entrada pENTR2B del sistema Gateway. **roGFP**: secuencia del clon de roGFP (flecha verde). **KnR**: resistencia al antibiótico Kanamicina (rectángulo violeta). **pUC origin**: replicación y crecimiento en *E.coli*. Las **líneas** indican los sitios de corte para las distintas enzimas de restricción, y los **números** los nucleótidos.

#### 4.1.2. Generación de una construcción en vector de integración para la sobreexpresión de roGFP en *Physcomitrella patens*.

Para cumplir con el objetivo planteado de transformar *Physcomitrella patens* para la expresión de la proteína roGFP de manera constitutiva, se procedió a la generación de una construcción en un vector de transformación de *P. patens*, pTHUbi Gateway.

El sistema Gateway permite realizar la recombinación del gen roGFP entre los vectores entrada y destino utilizando como mecanismo el reconocimiento de sitios específicos por parte de la enzima clonasa (*Materiales y métodos*). En este caso los vectores utilizados fueron el pENTR2B, como vector entrada, y pTHUbi, como vector destino. A partir de la construcción generada, pEroGFP, y a través de la recombinación homóloga entre el vector pTHUbi y el locus 108 de

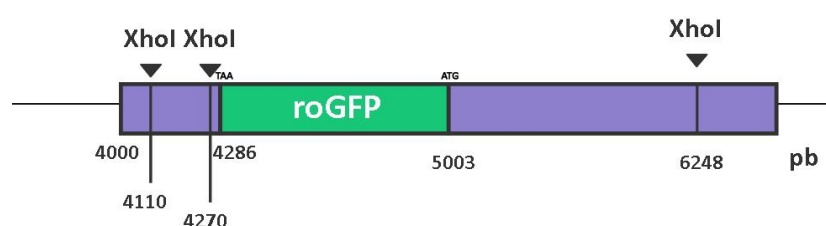
*Physcomitrella patens* wt , se puede introducir el ADN exógeno en el genoma del musgo.

Siguiendo la metodología descrita se llevó a cabo la recombinación, la transformación de células *E. coli* electrocompetentes, y el crecimiento de las mismas en LB/Amp agar (*Materiales y métodos*). Se seleccionaron las 3 colonias para ser analizadas, y se obtuvo su ADN, de concentraciones 191,6 ng/ $\mu$ L, 255,3 ng/ $\mu$ L, y 153,1 ng/ $\mu$ L, para las colonias 1, 2 y 3, respectivamente.

Con el fin de corroborar la construcción tras la recombinación, se realizó un ensayo de digestión con la enzima *Xho*I. Teniendo en cuenta que el gen roGFP se encuentra bajo la acción del promotor de Ubiquitina (*Materiales y métodos*), el patrón de bandas esperado para el ensayo con la enzima *Xho*I se describe en la *tabla 9* (*figura 22*):

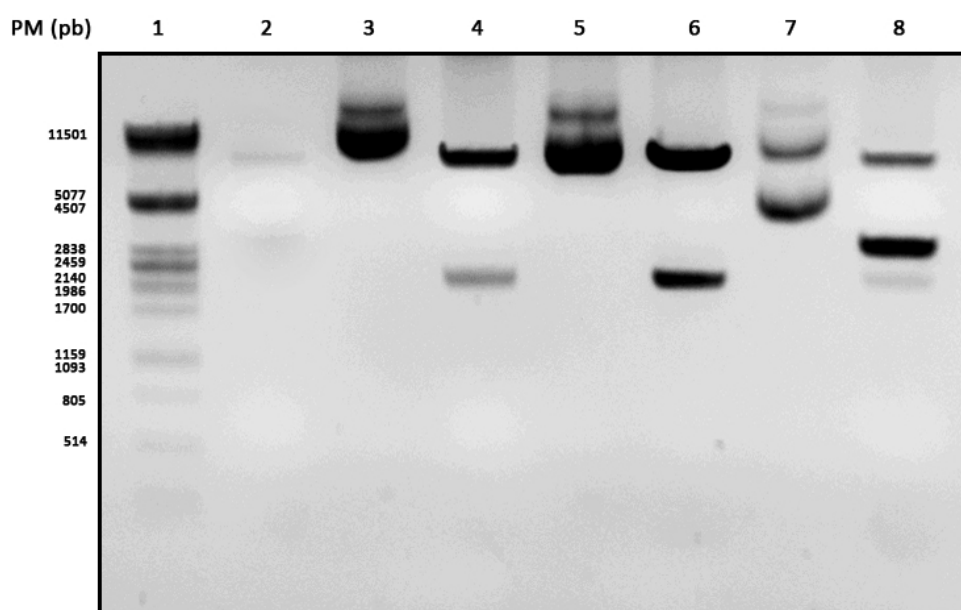
**Tabla 9.** Tamaño esperado de los fragmentos tras el corte con la enzimas *Xho*I en el vector pTHUbi vacío y con el gen de interés tras la recombinación.

	<i>Xho</i> I
Vector	Tamaño de los fragmentos
pTHUbi	8994 pb + 3120 pb
pTHUbi-roGFP	8994 pb + 2278 pb + 160 pb



**Figura 22.** Esquema de los sitios de corte en la construcción *pUbi-roGFP*. Las flechas indican los sitios de corte para la enzima *Xho*I. En violeta claro se muestra parte del vector pUbi, y en verde se muestra el gen roGFP. Los valores corresponden a la ubicación en pares de bases de los distintos sitios.

Los productos de digestión se visualizaron en un gel de agarosa al 1% p/v (figura 23).



**Figura 23. Análisis por restricción con enzima *XhoI*.** Carril 1: marcador molecular  $\lambda$  *PstI*. Carril 2: vector pTHUbi digerido con *XhoI* (control positivo). Carriles 3 y 4: ADN plasmídico obtenido de la colonia 1 sin digerir, y digerido con la enzima *XhoI*, respectivamente. Carriles 5 y 6: ADN plasmídico obtenido de la colonia 2 sin digerir, y digerido con la enzima *XhoI*, respectivamente. Carril 7 y 8: ADN plasmídico obtenido de colonia 3 sin digerir, y digerido con la enzima *XhoI*, respectivamente.

En el carril 2, se observan dos bandas tenues, una de aprox. 10000 pb, y otra de menor tamaño, de aprox. 3000 pb. Este patrón correspondería al esperado para el plásmido pTHUbi vacío. La banda de mayor tamaño puede ser la esperada de 8994 pb, y dado que este marcador molecular no discrimina tamaños entre 5000 pb y 11500 pb, es difícil determinar su tamaño aproximado. Sin embargo, la banda de menor tamaño se aproxima al tamaño esperado.

Los carriles 3 y 4, corresponden a ADN plasmídico extraído de la colonia 1. En el carril 3 se observa el plásmido sin digerir, con un tamaño aproximado de 11000pb; las distintas bandas corresponden a las distintas isoformas del plásmido. Aquí se puede corroborar la integridad del ADN tras la extracción del mismo. En el carril 4 se observa el patrón obtenido tras la digestión del plásmido con la enzima *XhoI*, para el cuál se obtuvieron 2 bandas: una de mayor tamaño, aprox.

10000 pb, y una de menor tamaño, aprox. 2100 pb. Si este patrón se corresponde con el esperado, la banda de 160 pb no se observaría por su pequeño tamaño. De acuerdo con estos resultados, el ADN plasmídico obtenido de la colonia 1 sería un posible candidato para la construcción pUbi-roGFP.

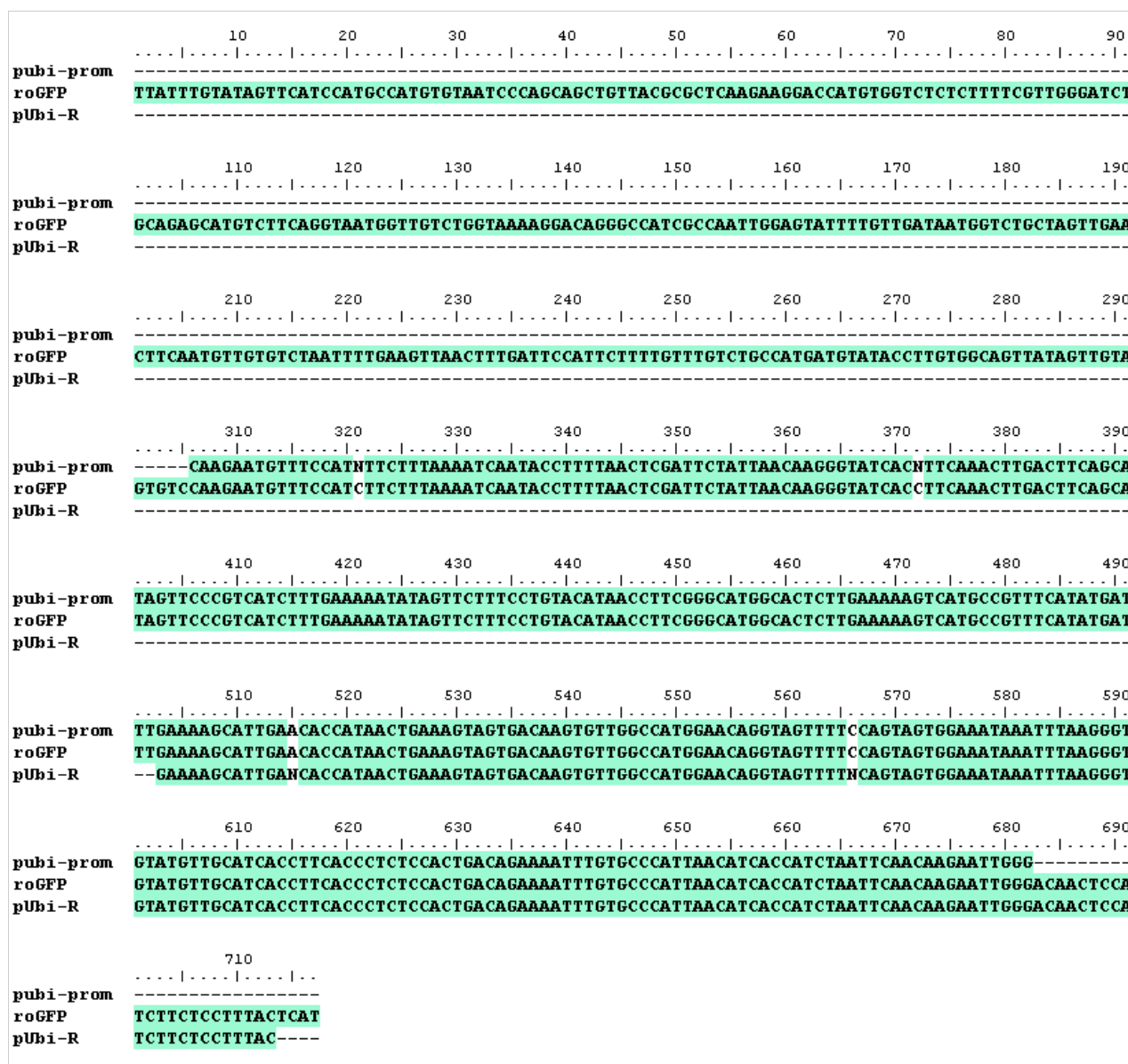
Los *carriles 5 y 6*, corresponden a ADN plasmídico de la colonia 2. Se obtiene el mismo patrón de bandas que el obtenido para los *carriles 3 y 4*; por lo tanto, el ADN plasmídico obtenido la colonia 2 sería otro posible candidato a ser analizado.

Los *carriles 7 y 8* contienen plásmidos de la colonia 3. En el *carril 7* se observan dos bandas, correspondientes a las distintas isoformas del plásmido. Estas bandas poseen distinto tamaño al observado para las colonias 1 y 2 sin digerir. Para la digestión con la enzima *XhoI*, en el *carril 8*, se observa un patrón distinto al observado para las colonias anteriores: una banda de mayor tamaño, aprox. 10000 pb, que se correspondería con la banda de 8994 pb; y otra de aprox. 3000 pb, la cuál se correspondería a la banda de 3120 pb del plásmido pTHUbi-Gate, ya que migra igual que el control positivo (pTHUbi digerido con *XhoI*) del *carril 1*. Además, hay una tercer banda de aprox. 2400 pb la cuál podría ser contaminación o ADN sin digerir migrando de acuerdo a su isoforma, ya que no corresponde a ninguna de las bandas esperadas.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos se seleccionaron los clones 1 y 2 como candidatos positivos para la construcción. Se eligió el clon 2 para su análisis. Para posteriores estudios se guardó un stock de las bacterias recombinantes en glicerol al 30 %, a -80 °C.

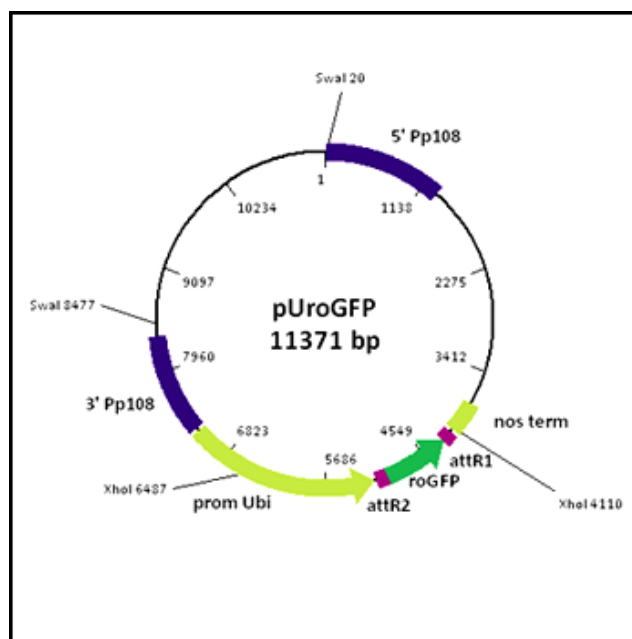
Para el análisis del candidato se realizó la secuenciación automática del ADN, utilizando los cebadores pUbi-R (10  $\mu$ M) y pUbi-prom (10  $\mu$ M) (*ver Materiales y métodos*). Los resultados obtenidos tras la secuenciación del clon 2 se muestran en la *figura 24* (concentración: 2055 ng/ $\mu$ l).





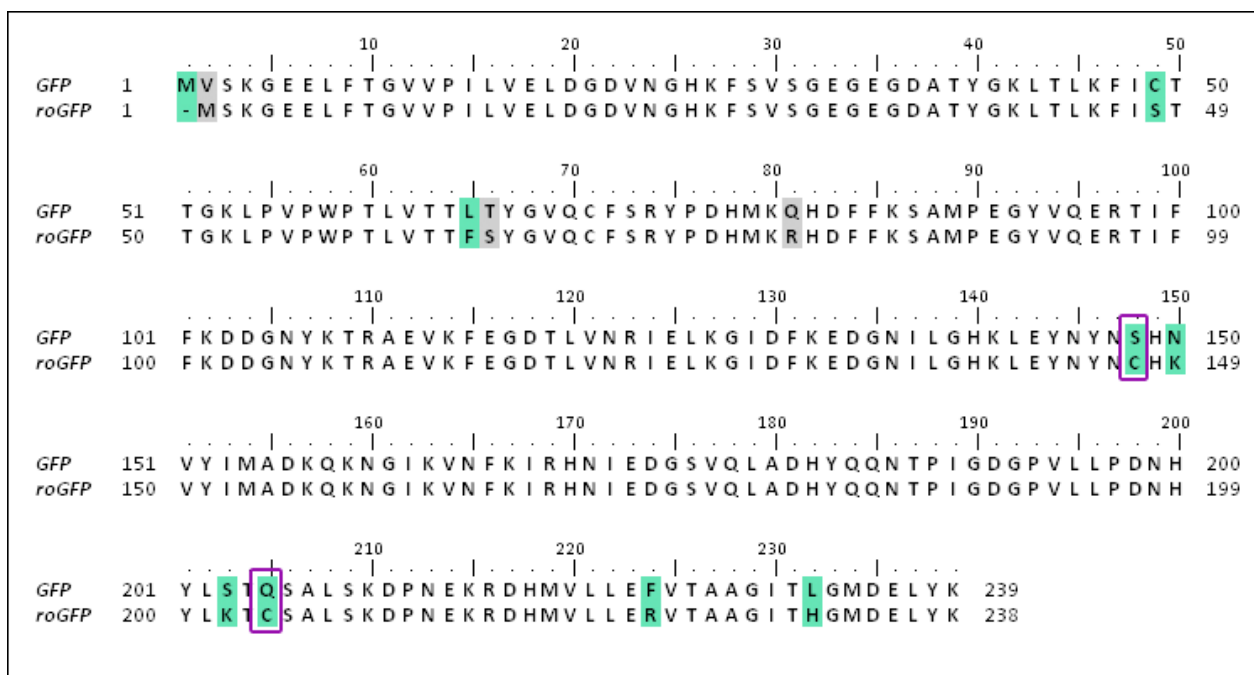
**Figura 24. Secuenciación automática de la construcción pTHUbi-roGFP.** Alineamiento de las secuencias obtenidas con los primers pUbi-prom (10  $\mu$ M) (superior), y pUbi-R (10 $\mu$ M); en el centro se muestra la secuencia del gen roGFP. (Alineamiento realizado con el programa Bioedit).

La construcción obtenida pUbi-roGFP, denominada **pUroGFP**, se muestra esquemáticamente en la *figura 25*:



**Figura 25. Representación de la construcción pUroGFP.** Construcción obtenida por inserción del gen de interés roGFP en el vector destino pTHUbi del sistema Gateway. **roGFP**: gen de la proteína GFP modificada. **Prom Ubi**: promotor de Ubiquitina. **Nos term**: terminador nos. **attR1 y attR2**: sitios específicos de recombinación del sistema Gateway. **5' y 3' Pp108**: sitios específicos del locus 108 de *Physcomitrella patens* wt para la transformación.

Luego de realizar la secuenciación del gen de roGFP1-R12 en ambas construcciones, pEroGFP y pUroGFP, se pudo determinar la secuencia de la proteína con sus respectivas mutaciones características de la variante en cuestión. Sin embargo, se observaron diferencias entre las modificaciones de la roGFP1-R12 obtenida por Remington para cumplir con los objetivos de este trabajo, respecto a la roGFP1-R12 reportada en la bibliografía. Según lo reportado, como se trata de una roGFP de tipo 1, la misma está construida sobre la base de GFP wt, sin embargo, de acuerdo a los datos de secuencia obtenidos a lo largo de este trabajo, se evidencia la presencia de la mutación S65T, por lo que las características de la misma corresponderían a una roGFP de tipo 2. Además de poseer esta mutación posee otras que la hacen una mejor herramienta para estudios *in vivo*. Se muestran las mutaciones presentes en esta variante respecto a la proteína GFP wt obtenida a partir del vector pGW5 (Karimi et al., 2002) utilizada en el laboratorio (*figura 26*).



**Figura 26. Alineamiento GFP vs. roGFP1-R12.** Se muestra la secuencia proteica de las proteínas GFP wt y la variante sensible al estado redox roGFP1-R12. En gris se muestran los aminoácidos de identidad similar, y en verde las mutaciones. Las cisteínas introducidas aparecen recuadradas en violeta en las posiciones 148 y 205 de GFP wt.

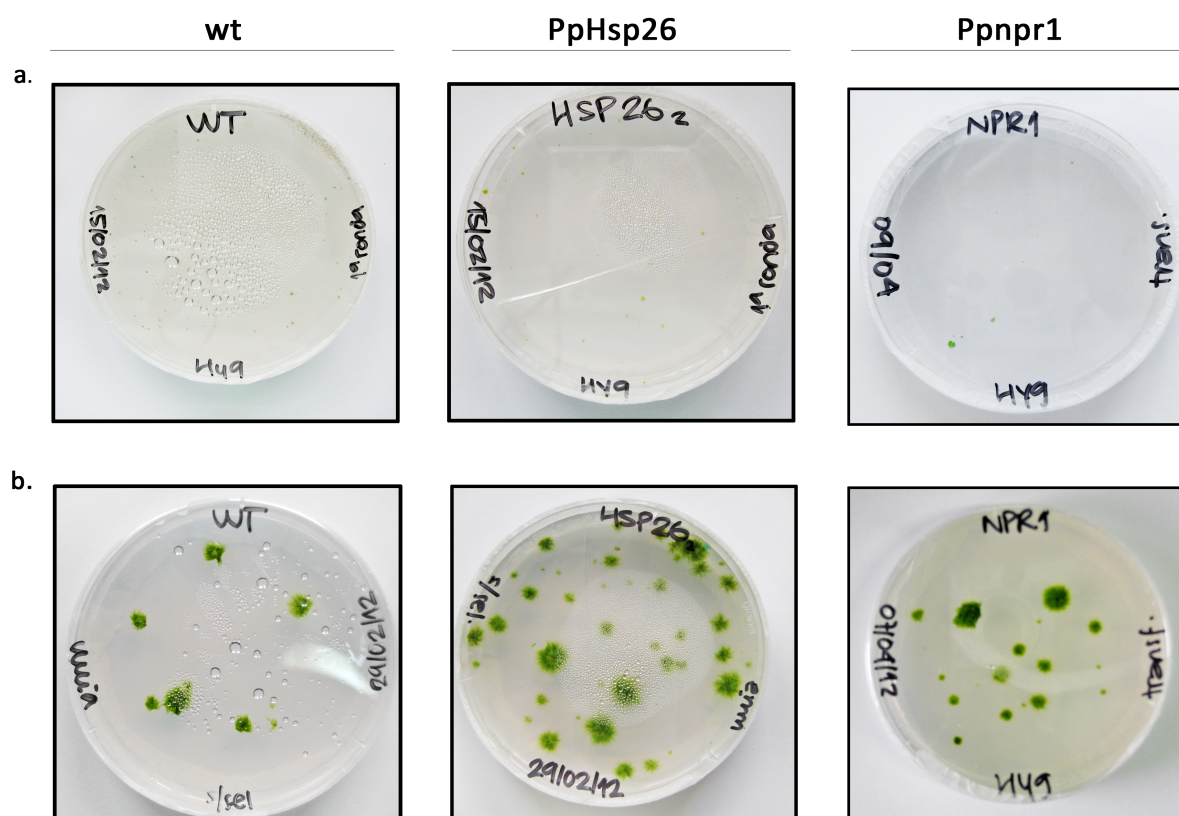
## 4.2. Generación de líneas de *Physcomitrella patens* que expresen constitutivamente roGFP.

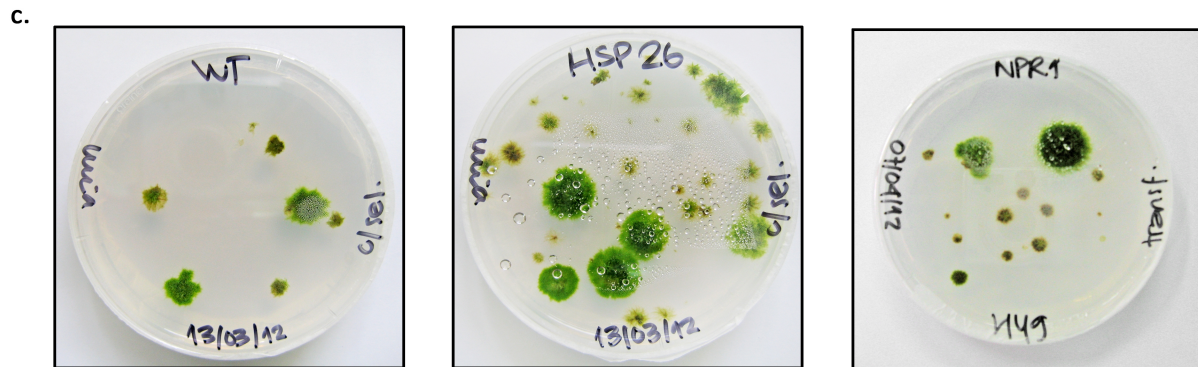
### 4.2.1. Transformación de protoplastos de *Physcomitrella patens* WT y los mutantes knockout *Ppnpr1* y *Pphsp26*.

Una vez obtenida la construcción deseada se procedió a la transformación de protoplastos de *Physcomitrella patens*, de acuerdo al protocolo de Schaefer (ver *Materiales y Métodos*), de las líneas salvaje (wt), y los mutantes KO *Pphsp26* y KO *Ppnpr1*. Para una concentración de protoplastos de  $1,6 \times 10^6$  se utilizaron 30  $\mu\text{g}$  de ADN de la construcción pUroGFP. El vector destino pTHUbi contiene resistencia al antibiótico higromicina, por lo que las rondas de selección fueron realizadas en medio BCDAT con una concentración final de 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de dicho antibiótico.

El seguimiento de los posibles transformantes, en las distintas etapas, se realizó mediante la observación de los mismos en microscopio invertido. En cada etapa se observó si ocurría división celular, y finalizado el tiempo de crecimiento en cada etapa se procedió al pasaje de los mismos de una condición de selección a una sin selección, y luego a una segunda ronda de selección, para eliminar transformantes no estables. Las rondas de selección se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo, con una duración de crecimiento de 2 semanas en cada paso. Tras la primer ronda de selección, donde el tamaño permitió su observación a simple vista, se tomaron fotos con el fin de realizar un seguimiento de los mismos (*figura 27*).

Luego de la última ronda de selección, aquellos transformantes que sobrevivieron fueron propagados en medio BCDAT sin antibiótico, en las mismas condiciones de crecimiento que el resto del material vegetal de partida (*ver Materiales y métodos*). Se mantuvieron las líneas con el fin de realizar la caracterización molecular de las mismas.

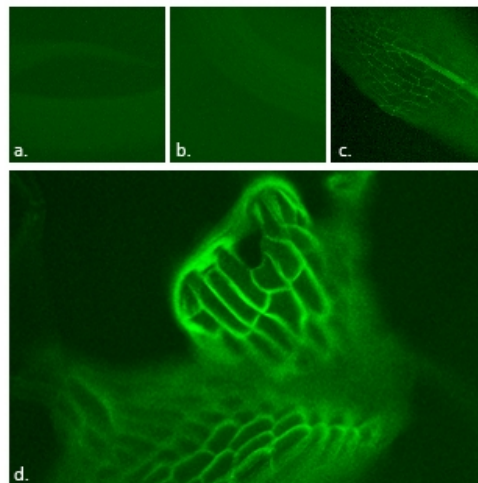




**Figura 27. Visualización de los protoplastos transformados. (a).** Primera ronda de selección. Antibiótico Higromicina. En la izquierda aparece Pp WT, en el centro el mutante KO PpHSP26, y a la derecha el mutante KO Ppnpr1. En verde se visualizan los protoplastos transformados con la construcción pUroGFP. **(b).** Crecimiento en medio *sin selección*. Aquellos candidatos visualizados en (a) continúan creciendo en esta etapa, teniendo en cuenta que los que crecen a mayor velocidad son los nuevos candidatos, mientras que los que crecen lento probablemente mueran en la segunda ronda de selección (integración episomal de la resistencia). **(c).** Segunda ronda de selección. Algunos de los observado en (b) mueren debido a que no permaneció integrado de forma estable el ADN exógeno en el genoma de *Physcomitrella patens*.

#### 4.2.2. Visualización de los transformantes en microscopio de epifluorescencia.

Se observó la fluorescencia emitida por la expresión de la proteína roGFP en uno de los clones correspondiente al genotipo wt de *P. patens* transformado con la construcción pUroGFP (*figura 28*). Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio de epifluorescencia, con filtro para clorofila.



**Figura 28. Visualización de roGFP en líneas de *Physcomitrella patens* transformadas.** Imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia: (a) control de *Physcomitrella patens* wt sin GFP, se observa la autofluorescencia; (b) línea Pphsp26-roGFP; (c) y (d) línea Ppwt-roGFP.

Para el genotipo *Pphsp26* no se pudo visualizar presencia de fluorescencia correspondiente a la acumulación de roGFP. De acuerdo a lo reportado en la literatura por Tsien y su grupo (Tsien, 1998), existen diversos factores que afectan la detección de GFP (*tabla 10*).

**Tabla 10. Factores que afectan la detección de GFP.** [Adaptado de Tsien, 1998].

**Table 2** Factors affecting the detectability of green fluorescent protein (GFP)

Total amount of GFP (picked out by antibodies, or by position on gel if GFP is abundant enough)
Number of copies of gene, duration of expression
Strength of transcriptional promoters and enhancers
Efficiency of translation including Kozak sequence and codon usage
Absence of mRNA splicing, protein degradation and export
Efficiency of posttranslational fluorophore formation
Solubility vs. formation of inclusion bodies
Availability of chaperones
Hindrance to folding because of unfortunate fusions to host proteins
Time, temperature, availability of O <sub>2</sub> , and intrinsic rate of cyclization/oxidation
Molecular properties of mature GFP
Wavelengths of excitation and emission
Extinction coefficient and fluorescence quantum yield
Susceptibility to photoisomerization/bleaching
Dimerization
Competition with noise and background signals
Autofluorescence of cells or culture media at preferred wavelengths
Location of GFP, diffuse vs. confined to small subregions of cells or tissues
Quality of excitation and emission filters and dichroic mirrors
Sensitivity, noise, and dark current of photodetector

El nivel de expresión de la proteína en las líneas transformadas es un factor clave para la detección, ya que un mayor nivel implica mayor cantidad de proteína que puede ser detectada. En estas líneas, la expresión de roGFP está bajo el control de un promotor constitutivo, por lo que los niveles deberían ser tales que permitan su detección. Sin embargo, la detección de GFP en plantas requiere el uso de equipos que permitan disminuir todo tipo de interferencia.



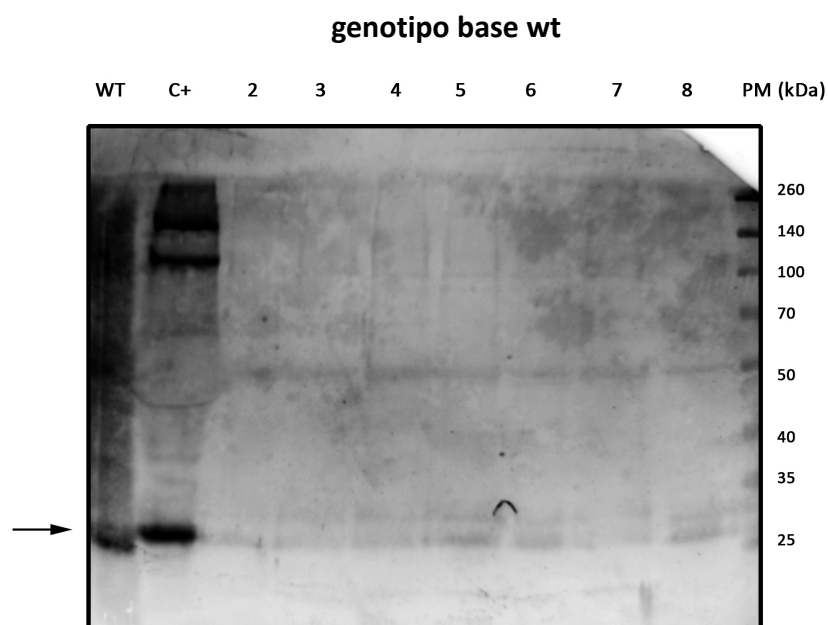
### 4.2.3. Caracterización molecular de transformantes.

Una vez generadas las líneas deseadas se procedió a su caracterización molecular mediante dos ensayos: estudios por Western Blot y análisis por PCR.

#### Acumulación de roGFP en líneas de *P. patens*.

Con el fin de determinar la presencia de la proteína sobreexpresada en las líneas de *P. patens* transformantes, se llevaron a cabo ensayos por Western Blot. Para ello, se realizó la extracción de proteínas de acuerdo al protocolo descrito anteriormente (*ver Materiales y métodos*). Se utilizaron 5  $\mu$ g de extracto de proteínas totales para la corrida electroforética en gel de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes, con el fin de visualizar las proteínas obtenidas. Una vez finalizada la corrida electroforética se procedió a la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa para su detección por Western blot. Se utilizó como anticuerpo primario un anti-GFP, con el fin de detectar la proteína en estudio, y como anticuerpo secundario marcado con el anti conejo IR800 (*ver Materiales y métodos*).

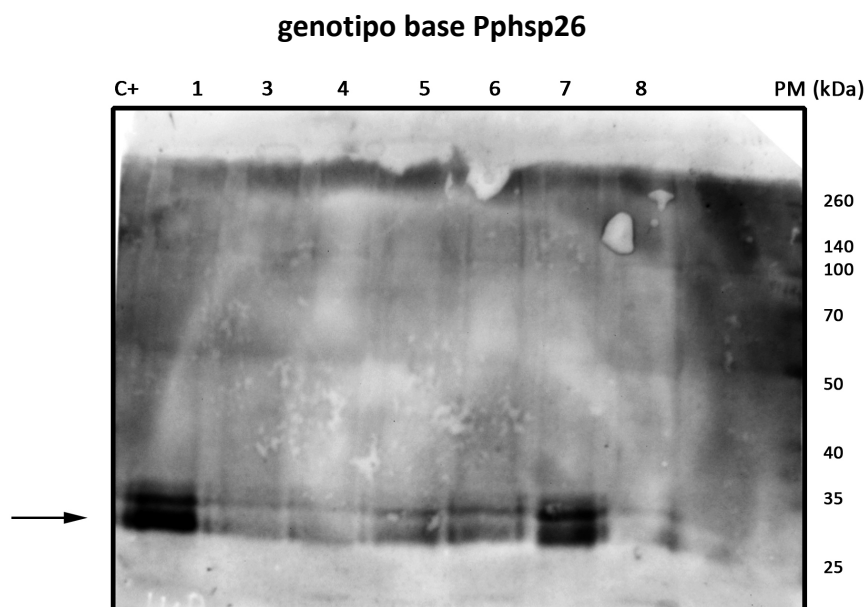
Se realizaron dos ensayos en paralelo, uno con los transformantes del genotipo WT, como genotipo de base (*figura 29*) y otro con los transformantes obtenidos en el genotipo mutante Pphsp26 (*figura 30*).



**Figura 29. Western blot.** En el *primer carril* se encuentra el control negativo, proteína obtenida del genotipo WT. En el *segundo carril*, el control positivo, proteínas totales de *Arabidopsis* sobreexpresando GFP. En los *carriles numerados 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8*, se encuentran las proteínas obtenidas para los transformantes del genotipo WT. El marcador de peso molecular utilizado fue el SM1849 de Fermentas. La flecha indica la posición de la proteína GFP

En el primer carril se encuentra el control negativo (proteínas obtenidas a partir de una línea WT que no contiene GFP), en el cual se observa la presencia de contaminación del pocillo contiguo (control positivo con GFP). En este carril se esperaba que no hubiesen bandas, ya que se utilizó un anticuerpo específico; sin embargo, podían estar presentes aquellas bandas que son inespecíficas y que aparecen en todas las muestras, debido a problemas de reactividad cruzada con el anticuerpo utilizado.

Para los distintos clones del genotipo WT transformados con pUroGFP, los resultados obtenidos muestran la presencia de la proteína GFP, dado que se observa señal tras la incubación con un anticuerpo específico para la misma. Esta proteína migra igual que la que se encuentra en el segundo carril, correspondiente al control positivo que consiste en proteínas extraídas de una línea de *Arabidopsis* que expresa constitutivamente GFP; y además poseen un tamaño un poco mayor a 25 kDa, similar al esperado (26 kDa).

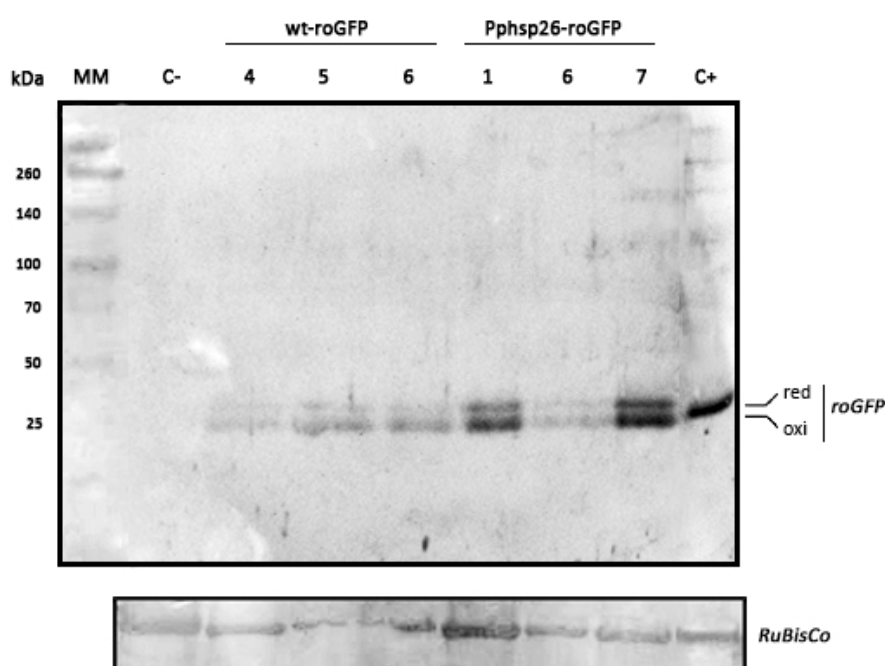




**Figura 30. Western blot.** En el *primer carril* se encuentra el control positivo, proteínas extraídas de una línea de *Arabidopsis* que expresa constitutivamente GFP. En los *carriles* numerados 1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, se encuentran las proteínas obtenidas para los transformantes del genotipo Pphsp26. El marcador de peso molecular utilizado fue el SM1849 de Fermentas. La flecha indica la posición de la proteína GFP.

En el caso de las líneas del mutante *Pphsp26* transformadas con pUroGFP, se obtuvieron varias líneas positivas para la expresión de roGFP. En particular, se obtuvieron dos líneas de alta expresión, la 1 y la 7.

Se repitió el ensayo seleccionando aquellos tres clones que tenían mayor señal para cada genotipo; en el caso de WT se seleccionaron los clones 4, 5 y 6, y los clones 1, 6 y 7 para el caso del Pphsp26. Utilizando como control negativo, un extracto de proteínas totales obtenidas del genotipo wt de *P. patens*, y como positivo, un extracto de proteínas totales de *Arabidopsis* sobreexpresando GFP, los resultados se muestran en la *figura 31*.



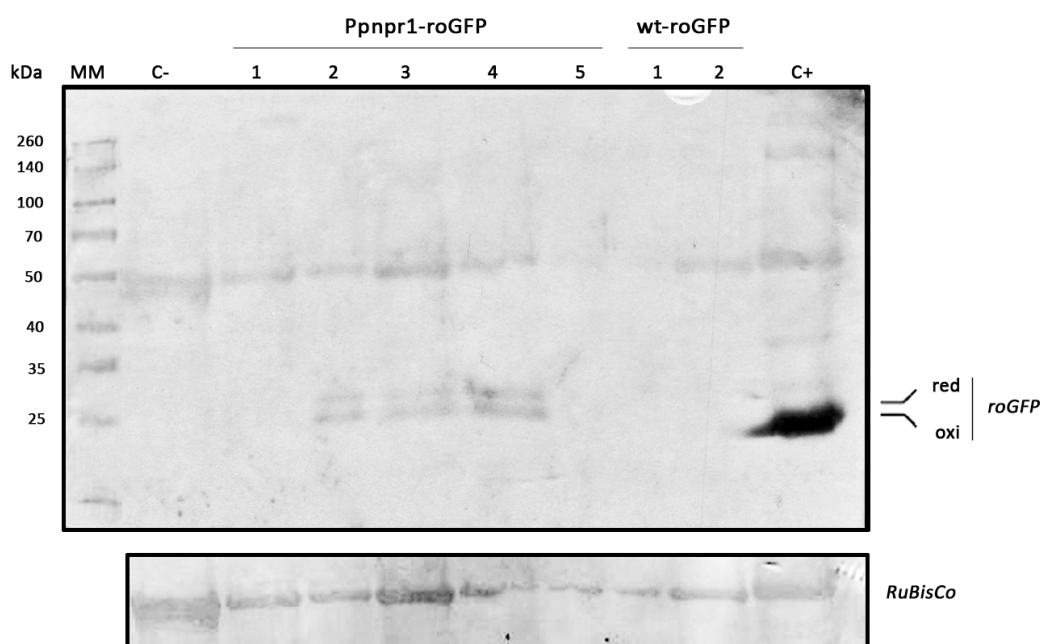
**Figura 31. Western blot.** Detección por Western Blot de la proteína roGFP en líneas sobreexpresantes de *P. patens* con anticuerpo anti-GFP. **MM**: Marcador molecular SM1849. **C-**: control negativo, *P. patens* wt. **wt-roGFP**: líneas WT de Pp sobreexpresando roGFP. **Pphsp26-roGFP**: línea mutante KO *Pphsp26* sobreexpresando roGFP. **C+**: control positivo, GFP expresada en *Arabidopsis*. Como control de carga se visualiza la proteína Rubisco.

A partir del ensayo se puede confirmar la sobreexpresión de la proteína roGFP en las líneas WT y *Pphsp26*, dado que se obtuvo una banda de aprox.25 kDa, siendo el tamaño esperado 26 kDa. En el control negativo no se observan bandas, lo que descarta unión inespecífica del anticuerpo primario y secundario a proteínas de *P. patens*.

La presencia de señal específica con el anticuerpo anti-GFP en los carriles 4,5 y 6 para el genotipo wt, así como los carriles 1, 6 y 7 para el genotipo *Pphsp26* confirma la presencia de la proteínas en los clones seleccionados tras la transformación. Se seleccionaron estos 6 clones para su análisis por PCR.

El control positivo permite corroborar que se trata de roGFP, sin embargo, el patrón de bandas es diferente, obteniéndose dos bandas para las líneas transformadas, y una para el control positivo. Este patrón de bandas en *Physcomitrella* podría deberse a la proteólisis de roGFP. Es interesante recalcar que este fenómeno no ocurre en las muestras extraídas de plantas de *Arabidopsis* que expresan GFP y que fueron tomadas como control positivo. La proteína GFP wt posee residuos que le permiten establecer enlaces para la formación de estructuras diméricas (Canon and Remington 2006), sin embargo, la generación de la proteína roGFP1 implica la sustitución de varios de estos residuos, inhabilitando la formación de dímeros. Por lo tanto una posible explicación sería que la presencia de dos bandas podría deberse a la coexistencia de dos isoformas de roGFP1-R12. Según lo reportado por Lith (van Lith 2011) la proteína roGFP presenta dos formas distintas según se encuentre reducida u oxidada, migrando más en el último caso.

El mismo ensayo se realizó para para los transformantes obtenidos para las líneas KO *Ppnpr1* y wt, en iguales condiciones, y con los mismos controles negativo (extracto de proteínas totales de *Physcomitrella* wt) y positivo (extracto de proteínas totales de *Arabidopsis* expresando GFP) (figura 32).



**Figura 32. Western blot.** Detección por Western Blot de la proteína roGFP en líneas sobreexpresantes de *Physcomitrella patens* con anticuerpo anti-GFP. **MM:** marcador molecular SM1849. **C-:** control negativo, *Physcomitrella patens* wt. **Ppnpr1-roGFP:** líneas Ppnpr1 sobreexpresando roGFP. **wt-roGFP:** línea wt de Pp sobreexpresando roGFP. **C+:** control positivo, GFP expresada en *Arabidopsis*. Como control de carga se visualiza la proteína Rubisco.

A partir del ensayo se puede observar la presencia de roGFP en la línea KO Ppnpr1, ya que se observan dos bandas de aproximadamente 25 kDa, siendo el tamaño esperado 26 kDa. Además, en el control negativo no se observan bandas, lo que descarta unión inespecífica en los extractos proteicos en ausencia de GFP. En los clones seleccionados para el genotipo wt no se observó la presencia de la proteína.

Así como para las líneas wt y Pphsp26, se observa un patrón de bandas dobles en roGFP, correspondiente a las formas reducida y oxidada. Por lo tanto, la presencia de ambas formas en los carriles 2, 3 y 4 para el genotipo KO Ppnpr1 confirma la sobreexpresión de la proteína en los clones seleccionados tras la transformación. Estos tres clones se seleccionaron para su posterior análisis por PCR.

## Conclusiones y perspectivas

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que se cumplió con los objetivos planteados, obteniendo tres líneas de *P. patens* sobreexpresando la proteína roGFP.

En primer lugar se obtuvo la construcción pUroGFP necesaria para la transformación de *P. patens*. Luego se procedió a la transformación de tres genotipos, wt, y los mutantes Pphsp26 y Ppnpr1, obteniendo la expresión de la proteína roGFP de manera estable en la planta. Por último, se realizó la visualización de la proteína y la caracterización molecular de los transformantes obtenidos, con el fin de corroborar la presencia de roGFP.

Dentro de las perspectivas planteadas se tiene como primer objetivo continuar con la caracterización molecular de los transformantes, realizando el análisis por PCR de los tres genotipos transformados, con nuevos cebadores específicos para roGFP. Además, se va a evaluar el nivel de expresión de roGFP en los distintos clones obtenidos para los distintos genotipos mediante Northern blot, para así elegir aquellos con los cuáles se continuarán realizando los futuros estudios. Para cumplir con estos objetivos se está preparando el material vegetal para la extracción de ADN y ARN, respectivamente.

Por otro lado, se continuará con la visualización al microscopio confocal de las líneas transformadas, con el fin de observar la fluorescencia de roGFP en todas las líneas, tanto en hojas como en protoplastos, de aquellos clones que poseen mayores niveles de expresión.

Por último, se pondrá a punto la herramienta generada en esta instancia. Para ello se llevará a cabo el monitoreo del estado redox de las líneas de *P. patens* que sobreexpresan roGFP en distintas condiciones de estrés biótico y abiótico, y normales. En esta instancia se pretende no sólo observar la fluorescencia en dichas condiciones, sino también cuantificar el estado redox mediante el uso de las propiedades de roGFP en relación al espectro de absorción de la proteína. Esperando observar diferencias entre las distintas líneas transformadas en distintas condiciones, que permitan contribuir con el estudio de los genes hsp26 y npr1.

Una vez puesta a punto la herramienta se espera contribuir a los distintos trabajos que se realizan en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal, considerando que podrá ser de gran utilidad para el estudio del estrés en plantas de acuerdo a todas las ventajas que posee.

## Referencias bibliográficas

- Apel, K. and H. Hirt (2004). "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction." Annu Rev Plant Biol **55**: 373-399.
- Bartels D., Nelson D. (1994) "Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics". Plant, Cell and Environment **17**: 659–667.
- Bethesda Research Laboratories. (1986). "BRL pUC host: E. coli DH5α competent cells". Focus **8**(2):9.
- Bezanilla, M., P. F. Perroud, et al. (2005). "An RNAi system in *Physcomitrella patens* with an internal marker for silencing allows for rapid identification of loss of function phenotypes." Plant Biol (Stuttg) **7**(3): 251-257.
- Cannon, M. B. and S. J. Remington (2006). "Re-engineering redox-sensitive green fluorescent protein for improved response rate." Protein Sci **15**(1): 45-57.
- Cannon, M. B. and S. J. Remington (2008). "Redox-sensitive green fluorescent protein: probes for dynamic intracellular redox responses. A review." Methods Mol Biol **476**: 51-65.
- Cheng, W. Y., H. Tong, et al. (2010). "An integrated imaging approach to the study of oxidative stress generation by mitochondrial dysfunction in living cells." Environ Health Perspect **118**(7): 902-908.
- Cho, S.H., R.S. Quatrano, and J.S. Shin (2007). "Transgenesis in *Physcomitrella patens*." Transgenic Plant Journal **1** (1): 99-103.
- Cove, D. J., Knight C. D., Lamparter T (1997). "Mosses as model systems". Trends Plant Sci **2**: 99-105.
- Cove, D. J., (1992). "Regulation of development in the moss *Physcomitrella patens*." In *Development the molecular genetic approach*. Russo, V.E.A., Brody, S., Cove, D., and Ottolenghi, S. (Eds.). Springer-Verlag: 179-193.
- Cullis, C. A., (2004) "Plant Genomics and Proteomics." John Wiley & Sons: 131-145.
- Delagrave, S., Hawtin, R. E., Silva, C. M., Yang, M. M., and Youvan, D. C. (1995). "Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein." Biotechnology **13**: 151–154.
- Doke, N. (1983). "Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components." Physiol Plant Pathol **23**: 345–357.
- Dooley, C. T., T. M. Dore, et al. (2004). "Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators." J Biol Chem **279**(21): 22284-22293.
- Engel, P. P (1968). "The induction of biochemical and morphological mutants in the moss *Physcomitrella patens*." Am. J. Bot. **55**: 438-446.
- Foyer, C. H. and G. Noctor (2005). "Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses." Plant Cell **17**(7): 1866-1875.
- Frank, W., D. Ratnadewi, et al. (2005). "*Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought,

- salt and osmotic stress." *Planta* **220**(3): 384-394.
- Hanson, G. T., R. Aggeler, et al. (2004). "Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators." *J Biol Chem* **279**(13): 13044-13053.
- Hastings, J. W., and Morin, J. G. (1969). "Comparative biochemistry of calcium-activated photoproteins from the ctenophore, Mnemiopsis and the coelenterates. Aequorea, Obelia, Pelagia and Renilla." *Biol. Bull* **137**: 402.
- Haseloff, J. and K. R. Siemering (2006). "The uses of green fluorescent protein in plants." *Methods Biochem Anal* **47**: 259-284.
- Heim, R., D. C. Prasher, et al. (1994). "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26): 12501-12504.
- Inoue H., Nojima H., and Okayama H. (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids". *Gene* **96**: 23-28.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, et al. (1987). "GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants." *EMBO J* **6**(13): 3901-3907.
- Jiang, K., C. Schwarzer, et al. (2006). "Expression and characterization of a redox-sensing green fluorescent protein (reduction-oxidation-sensitive green fluorescent protein) in Arabidopsis." *Plant Physiol* **141**(2): 397-403.
- Jones, D. P. (2002). "Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance." *Methods Enzymol* **348**: 93-112.
- Kacperska, A. (2004). "Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity?" *Physiologia Plantarum* **122**: 159-168.
- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A. (2002). "Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation." *Trends Plant Sci.* **7**(5): 193-195.
- Knight, H. and M. R. Knight (2001). "Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk." *Trends Plant Sci* **6**(6): 262-267.
- Larkindale, J., Hall J. D., Knight M. R., Vierling E (2005). "Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance". *Plant Physiol* **138**: 882-897.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Meyer, A. J. (2008). "The integration of glutathione homeostasis and redox signaling." *J Plant Physiol* **165**(13): 1390-1403.
- Meyer, A. J. and T. Brach (2009). "Dynamic redox measurements with redox-sensitive GFP in plants by confocal laser scanning microscopy." *Methods Mol Biol* **479**: 93-107.
- Meyer, A. J., T. Brach, et al. (2007). "Redox-sensitive GFP in Arabidopsis thaliana is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer." *Plant J* **52**(5): 973-986.
- Meyer, A. J. and T. P. Dick (2010). "Fluorescent protein-based redox probes." *Antioxid Redox Signal* **13**(5): 621-650.

- Mishler, B. D. and Oliver, M. J. (2009). "The moss *Physcomitrella patens*" Annual Plant Reviews **46**: 1-12.
- Moller, I. M., P. E. Jensen, et al. (2007). "Oxidative modifications to cellular components in plants." Annu Rev Plant Biol **58**: 459-481.
- Morise, H., O. Shimomura, et al. (1974). "Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*." Biochemistry **13**(12): 2656-2662.
- Mou, Z., W. Fan, et al. (2003). "Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes." Cell **113**(7): 935-944.
- Mullineaux, P. M. and T. Lawson (2008). "Measuring redox changes in vivo in leaves: prospects and technical challenges." Methods Mol Biol **476**: 67-77.
- Nakagawa, T., et al. (2009). "Gateway vectors for plant transformation." Plant Biotechnology **26**(3): 275-284.
- Nakamoto, H., Vigh L (2007). "The small heat shock proteins and their clients". Cell Mol Life Sci **64**: 294-306
- Oldenhof, H., W. F. Wolkers, et al. (2006). "Freezing and desiccation tolerance in the moss *Physcomitrella patens*: an in situ Fourier transform infrared spectroscopic study." Biochim Biophys Acta **1760**(8): 1226-1234.
- Oliver M.J., Velten J. and Word A.J. "Bryophytes as experimental models for the study of environmental stress tolerance: *Tortula ruralis* and desiccation-tolerance in mosses". Plant Ecol., 2000; 151:73–84.
- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., and Remington, S. J. (1996). "Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein." Science **273**: 1392–1395.
- Rao, B., Kemple, M., and Prendergast, F. (1980). "Proton nuclear magnetic resonance and fluorescence spectroscopic studies of segmental mobility in aequorin and a green fluorescent protein from *Aequorea forskalea*." Biophys. J. **32**: 630–632.
- Rensing, S. A., D. Lang, et al. (2008). "The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants." Science **319**(5859): 64-69.
- Reski, R. (1999). "Molecular genetics of *Physcomitrella*." Planta **208**: 301.
- Robinson SA., Wasley J. and Tobin AK. (2003) "Living on the edge-plants and global change in continental and maritime Antarctica". Global Change Biol. **9**: 1681-1717
- Saavedra, L., J. Svensson, et al. (2006). "A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance." Plant J **45**(2): 237-249.
- Sambrook J.; Fritsch E. F. and Maniatis T. A., (1989). "*Molecular cloning: a laboratory manual*". 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor, NY; Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Fernandez, R., M. Fricker, et al. (1997). "Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(6): 2745-2750.
- Schaefer, D., J. P. Zryd, et al. (1991). "Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*."



Mol Gen Genet **226**(3): 418-424.

- Schaefer, D. G. (2002). "A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*." Annu Rev Plant Biol **53**: 477-501.
- Schaefer, D. G. and J. P. Zryd (1997). "Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*." Plant J **11**(6): 1195-1206.
- Schaefer, D. G. and J. P. Zryd (2001). "The moss *Physcomitrella patens*, now and then." Plant Physiol **127**(4): 1430-1438.
- Schwarzlander, M., M. D. Fricker, et al. (2009). "Monitoring the in vivo redox state of plant mitochondria: effect of respiratory inhibitors, abiotic stress and assessment of recovery from oxidative challenge." Biochim Biophys Acta **1787**(5): 468-475.
- Shimomura, O. (2006). "Discovery of green fluorescent protein." Methods Biochem Anal **47**: 1-13.
- Shimomura, O., F. H. Johnson, et al. (1962). "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*." J Cell Comp Physiol **59**: 223-239.
- Tenhaken, R., A. Levine, et al. (1995). "Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(10): 4158-4163.
- Trent, J. D. (1996). "A review of acquired thermotolerance, heat-shock proteins, and molecular chaperone sinarchaea". FEMS Microbiol Rev **18**: 249-58.
- Tsien, R. Y. (1998). "The green fluorescent protein." Annu Rev Biochem **67**: 509-544.
- van Lith, M., S. Tiwari, et al. (2011). "Real-time monitoring of redox changes in the mammalian endoplasmic reticulum." J Cell Sci **124**(Pt 14): 2349-2356.
- Vierling, E. (1991) "The heat shock response in plants." Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **42**: 579-620.
- Vinocur, B. and A. Altman (2005). "Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations." Curr Opin Biotechnol **16**(2): 123-132.
- von Wettstein, F. (1932). "Genetik". In F. Verdoorn, de., Manual of Bryology. 233-272.
- Wang, D. and D. S. Luthe (2003). "Heat sensitivity in a bentgrass variant. Failure to accumulate a chloroplast heat shock protein isoform implicated in heat tolerance." Plant Physiol **133**(1): 319-327.
- Wojtaszek, P. (1997). "Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection." Biochem J **322 ( Pt 3)**: 681-692.
- Wright, H. T. (1991). "Nonenzymatic deamidation of asparaginylyl and glutaminylyl residues in proteins." Crit Rev Biochem Mol Biol **26**(1): 1-52.
- Xiong, L. and J. K. Zhu (2001). "Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives." Physiol Plant **112**(2): 152-166.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (2005). "Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters". Trends Plant Sci **10**: 88-94
- Yang, F., Moss, L. G., and Phillips Jr., G. N. (1996). "The molecular structure of green fluorescent

protein." Nat. Biotechn **14**: 1246–1251.

Zhu J. K. (2002). "Salt and drought stress signal transduction in plants". Annual Review of Plant Biology **53**: 247–273.

Zacharias, D. A. and R. Y. Tsien (2006). "Molecular biology and mutation of green fluorescent protein." Methods Biochem Anal **47**: 83-120.