

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



**Sobreexpresión de Transportadores de
Nucleótidos Azúcar en dos Modelos Vegetales y
su Rol en Síntesis de Pared Celular**

Seminario de Título
Entregado a la
Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos
Para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

Daniela Gómez Atria

Mayo 2007
Santiago – Chile

Director de Seminario de Título: Dr. Ariel Orellana López

*Con todo mi amor a
mi pequeña Florencia*

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, por haber confiado siempre en mí y por darme su apoyo incondicional para sacar adelante mi carrera y mis sueños.

A Florencia por su alegría y amor que me dan ánimo y hacen cada día más feliz.

A Francisco por su apoyo y amor en todo momento.

A mis hermanas, tíos, primos, abuelos y toda mi gran familia que siempre han creído en mí.

A mis amigos de la U, por los sueños de arreglar el mundo, los buenos negocios y las risas.

A mi tutor Ariel, por apoyarme siempre y guiarme en este y otros trabajos.

A todos los amigos del lab, en especial a Francisca, Susana, Consuelo, Cecilia, Michael, Roberto, Andrés, Carlos, Rafa y Ricardo, por esos almuerzos llenos de risa, la ayuda en el trabajo y el ánimo que nos dábamos mutuamente.

A todos los miembros del Centro de Biotecnología Vegetal de la UNAB (ex GenMolVeg) y en especial al Grupo AO.

BIOGRAFÍA



Soy Daniela Gómez Atria y llegué a este mundo el 13 de Agosto de 1981. La mayor parte de mi etapa escolar la pasé en el colegio Academia de Humanidades de los Padres Dominicanos, ahí cultivé grandes amistades y comenzó mi afición a la biología y la química. Proveniente de una familia de artistas y “huasos” me convertí en la oveja negra a la que le gustaba estudiar, y los caminos de la vida me llevaron a ingresar a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular.

Ya en la Universidad me convertí en una científica más. Las amistades crecieron y junto a ellos llegó el amor y mi hija Florencia.

Hoy termino esta gran etapa de mi vida, comenzando ya otra, la del doctorado, en una nueva ciudad y con nuevos amigos, esperando que las cosas salgan tan bien como hasta ahora.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
Resumen	
Abstract	
1. Introducción	1
2. Hipótesis	7
3. Objetivos	7
4. Materiales y Métodos	8
4.1. Medios de Cultivo	8
4.2. Reactivos	8
4.3. Material Biológico	8
4.4. Clonamiento de los genes AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7	9
4.5. Técnicas generales de Biología Molecular	10
4.6. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	11
4.7. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
4.8. Transformación de hojas de tabaco por infiltración con <i>A. tumefaciens</i>	13
4.9. Transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
4.10. Preparación de fracción microsomal de hojas de tabaco	14
4.11. Fraccionamiento subcelular de plantas de <i>A. thaliana</i>	15
4.12. Medición de Proteínas	15
4.13. Inmunodetección de las proteínas AtUTr _n -Myc.His	16
4.14. Ensayo de incorporación de nucleótidos azúcar	17
4.15. Extracción de ARN de plantas de <i>A. thaliana</i>	17

4.16.	Ensayo de RT-PCR	17
4.17.	Preparación de extracto de pared celular	18
4.18.	Análisis de componentes de pared celular	18
5.	Resultados	21
5.1.	Clonamiento de los genes AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 codificantes para transportadores de nucleótidos azúcar de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
5.2.	Expresión de los transportadores de nucleótidos azúcar AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 de <i>Arabidopsis thaliana</i> en hojas de <i>Nicotiana tabacum</i>	24
5.2.1.	Análisis de acumulación de las proteínas AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 fusionadas a Myc.His en fracción microsomal de plantas de tabaco transformadas	25
5.2.2.	Ensayos de incorporación de UDP-azúcares en fracción microsomal de tabaco expresando AtUTr1-Myc.His, AtUTr2-Myc.His y AtUTr7-Myc.His	26
5.3.	Generación de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que sobreexpresen los transportadores de nucleótidos azúcar AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7	28
5.3.1.	Presencia de los transcritos AtUTr1-Myc.His, AtUTr2-Myc.His y AtUTr7-Myc.His en hojas de roseta de plantas de <i>A. thaliana</i>	30
5.3.2.	Análisis de acumulación de las proteínas AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 fusionadas a Myc.His en fracciones subcelulares de plantas de <i>A. thaliana</i> transformadas	32
5.3.3.	Ensayos de incorporación de UDP-azúcares en fracciones subcelulares de plantas de <i>A. thaliana</i> transgénicas para AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7	33
5.3.4.	Presencia de los transcritos AtUTr1-Myc.His, AtUTr2-Myc.His y AtUTr7-Myc.His en plantas etioladas de <i>A. thaliana</i>	34
5.4.	Análisis fenotípico de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transgénicas para los transportadores de nucleótidos azúcar AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7	36
5.4.1.	Caracterización visual de plantas de <i>A. thaliana</i> transformadas con los transportadores AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7	36

5.4.2.	Análisis de componentes de pared celular de plantas transgénicas para los transportadores AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7	39
6.	Discusión	44
6.1	Expresión de los transportadores de nucleótidos azúcar AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 de <i>A. thaliana</i> en hojas de <i>Nicotiana tabacum</i>	45
6.2	Generación de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> que sobreexpresen los transportadores de nucleótidos azúcar AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7	46
6.3	Análisis fenotípico de plantas de <i>A. thaliana</i> transgénicas para los transportadores de nucleótidos azúcar AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7	49
7.	Conclusiones	55
8.	Bibliografía	56
9.	Financiamiento	60

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Modelo de síntesis de polisacáridos en el aparato de Golgi	5
Figura 2	Plasmidios usados en el clonamiento de los genes AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 etiquetados con el epítotope Myc.His	21
Figura 3	Análisis de restricción de los genes clonados en el vector pGEM-T	22
Figura 4	Secuencias clonadas de los genes AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7	23
Figura 5	Análisis de restricción del plasmidio pBI121-AtUTr _n -Myc.His	24
Figura 6	Acumulación de las proteínas AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 en fracción microsomal de hojas de tabaco	26
Figura 7	Incorporación de UDP-glucosa y UDP-galactosa en hojas de tabaco expresando AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7	27
Figura 8	Expresión de los transgenes en hojas de roseta de plantas transformadas de <i>A. thaliana</i>	31
Figura 9	Acumulación de las proteínas AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 en fracciones de retículo y Golgi de <i>A. thaliana</i>	32
Figura 10	Incorporación de UDP-galactosa en plantas etioladas de <i>A. thaliana</i>	34
Figura 11	Expresión de los transgenes en plantas etioladas de <i>A. thaliana</i>	35
Figura 12	Comparación de plántulas de <i>A. thaliana</i> silvestres y transgénicas	38
Figura 13	Plantas adultas de <i>A. thaliana</i>	39
Figura 14	Contenido total de celulosa en pared celular	40
Figura 15	Contenido total de ácidos urónicos en pared celular	41
Figura 16	Contenido de azúcares totales en pared celular	42
Figura 17	Contenido de azúcares totales en pared celular excluyendo glucosa	43

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Características de los transportadores AtUTr _n	4
Tabla 2	Partidores utilizados en el clonamiento de los genes AtUTr _n	10
Tabla 3	Partidores utilizados en la amplificación control del RT-PCR	18
Tabla 4	Segregación en T2 de líneas transgénicas para los genes AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7	29

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	: Aminoácidos
AGI	: Arabidopsis Genome Initiative
Ara	: Arabinosa
AU	: Ácidos Urónicos
BCA	: Ácido Bicinconínico
DMSO	: Dimetil Sulfóxido
dNTPs	: Desoxinucleótidos Trifosfato
DO ₆₀₀	: Densidad óptica a 600 nm
DTT	: Ditioneitol
EDTA	: Ácido Etileno Di-amino Tetracético
Fuc	: Fucosa
<i>g</i>	: Aceleración de gravedad
Gal	: Galactosa
GDP	: Guanosina Difosfato
Glu	: Glucosa
kDa	: Kilo Dalton
Man	: Manosa
min	: Minutos
NA	: Nucleótido Azúcar
NS	: Nucleotide sugar
NDP	: Nucleósido Difosfato
NMP	: Nucleósido Monofosfato
pb	: Pares de bases
PBS	: Tampón Fosfato
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa.
Pi	: Fosfato inorgánico
PIPES	: Ácido Piperazine N-N-bis 2-etano sulfónico
PM	: Peso Molecular
PMSF	: Fenil Metil Sulfonil Fluoruro

PVDF	: Polyvinylidene Difluoride
Ram	: Ramnosa
rpm	: Revoluciones por minuto
RT-PCR	: PCR en transcripción reversa
SDS	: Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS
SPM	: Tampón Sacarosa Fosfato Magnesio
STM ^d	: Segmentos Trans-Membrana
STM	: Tampón Sacarosa Tris Magnesio
TAE	: Tampón Tris Acetato EDTA
TBS	: Tampón Tris
TFA	: Ácido Trifluoro Acético
TNA	: Transportador de Nucleótidos Azúcar
NST	: Nucleotide Sugar Transporter
TX-100	: Tritón X-100
UDP	: Uridina Difosfato
Xil	: Xilosa

RESUMEN

Todas las células necesitan de una matriz que las envuelva y proteja. En las células vegetales ésta recibe el nombre de pared celular, y además de estar involucrada en una serie de procesos fisiológicos es esencial para su desarrollo y crecimiento, variando su composición y estructura en el tiempo.

La pared celular es una estructura compleja, donde microfibrillas de celulosa se unen por polímeros estructurados llamados hemicelulosas, todo embebido en una matriz gel de pectinas. Se puede clasificar en dos tipos: la pared celular primaria formada en las células en crecimiento, similar en todos los tipos celulares; y la pared celular secundaria formada en células que han detenido su crecimiento, de composición diferente a la anterior.

La síntesis de los componentes celulósicos ocurre en la membrana plasmática, mientras que la de hemicelulosas y pectinas ocurre en el lumen del aparato de Golgi.

En el mecanismo de síntesis de componentes de pared celular en el Golgi existe un problema topológico ya que las glicosiltransferasas encargadas del proceso, tienen su sitio catalítico orientado hacia el lumen del organelo, mientras los nucleótidos azúcar (NA) que utilizan como sustrato son sintetizados en el citoplasma. Por lo tanto se requeriría un mecanismo para la entrada de los NA al aparato de Golgi.

Hoy en día se ha probado la existencia de transportadores de nucleótidos azúcares (TNAs) en el aparato de Golgi de variados organismos y se han encontrado secuencias homólogas a ellos en *Arabidopsis thaliana*. Un ejemplo de esto es la familia AtUTr donde se han identificado 7 genes que codifican para TNAs.

Bajo estas evidencias se ha propuesto un modelo donde el NA ingresa al aparato de Golgi a través del transportador de nucleótidos azúcar. Luego, el azúcar es transferido a los polisacáridos en crecimiento por una glicosiltransferasa, liberando NDP; el cual es clivado por una NDPasa formando NMP y Pi. El NMP es devuelto al citoplasma por el transportador de nucleótidos azúcar en anti-transporte con el NA entrante, y el Pi es liberado al citoplasma por un transportador distinto.

En este trabajo los genes de los TNAs AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7, que transportan selectivamente UDP-galactosa y/o UDP-glucosa, se sobreexpresaron en *A. thaliana*. Para ello los genes fueron clonados en un vector binario fusionados a un epítipo Myc.His bajo el control de un promotor constitutivo.

Primero, para corroborar su actividad, se expresaron los transportadores transitoriamente en hojas de tabaco, observando una acumulación de la proteína mediante western blot en fracciones celulares enriquecidas en aparato de Golgi y retículo endoplásmico. Además, encontramos que una mayor expresión de estos transportadores conlleva una mayor incorporación de los NA en fracciones subcelulares microsomales.

Luego, mediante análisis RT-PCR de las plantas de *A. thaliana* transformadas con los genes AtUTr, se observó una alta expresión del transgen en cada uno de los casos, la cual variaba según las condiciones de crecimiento. Análisis cuantitativos de los componentes de la pared celular mediante espectrometría de masa mostraron un aumento de hasta 80% en el contenido de galactosa y manosa en las plantas transformadas respecto a las silvestres.

Todos estos resultados apuntan a que los transportadores de nucleótidos azúcar estarían jugando un rol importante en la regulación de la síntesis de pared celular, pudiendo con ello a futuro modificar su composición selectivamente.

ABSTRACT

All cells are surrounded by a protective matrix. In plant cells, this matrix is named the cell wall, and apart from being involved in many physiological processes, it is essential for the development and growth of the cell, with a variable composition and structure.

The cell wall is a complex structure, with cellulose microfibrils joined by structured polymers termed hemicelluloses, embedded in a pectin gel matrix. It can be classified into two types: the primary cell wall produced in growing cells is similar in all cell types whereas the secondary cell wall produced in cells that have stopped growing, possesses a different composition to the primary cell wall.

The synthesis of cellulosic compounds occurs at the plasma membrane, whilst the synthesis of hemicelluloses and pectins takes place in the lumen of the Golgi apparatus.

A topological problem exists for the synthesis of cell wall components in the Golgi because the glycosyltransferases responsible for their synthesis possess catalytic sites facing the Golgi lumen, whereas the nucleotide sugar substrate (NS) are synthesized in the cytoplasm. Therefore, a mechanism is required to import NS into the Golgi lumen.

Nucleotide sugar transporters (NSTs) have been shown to exist in the Golgi apparatus of a wide range of animals and homologous sequences have been found in *Arabidopsis thaliana*. One example in *A. thaliana* is the AtUTr family, composed of 7 members.

Taken together, a model has been proposed whereby the NS substrate enters the Golgi apparatus via an NST. Subsequently, the sugar is transferred to the growing polysaccharide by a glycosyltransferase releasing NDP, which is cleaved by an NDPase forming NMP and Pi. The NMP is returned to the cytoplasm by the NST in

antiport with the incoming NS, and the Pi is exported to the cytoplasm by a different transporter.

In this work, the NSTs AtUTr1, AtUTr2 and AtUTr7 which selectively transport UDP-galactose and/or UDP-glucose, were over-expressed in *A. thaliana*. For this purpose the genes were cloned in a binary vector with a Myc.His epitope under the control of a constitutive promoter.

First, to verify their activity, the transporters were transiently expressed in tobacco leaves, with protein accumulation in Golgi and endoplasmic reticulum enriched fractions detected by western blot analysis. Furthermore, we found that a higher level of expression of these transporters resulted in a greater incorporation of the NS into microsomal fractions.

Subsequently, using RT-PCR analysis of *A. thaliana* plants transformed with the AtUTr genes, a high level of expression of the transgenes was observed in each case, although levels varied depending on the growth conditions. Quantitative analysis of cell wall components by mass spectrometry showed an increase of up to 80% in the galactose and mannose content of transformed plants with respect to wild type controls. These results suggest that nucleotide sugar transporters play an important role in the regulation of cell wall synthesis, leading to the possibility of selectively modifying the composition of the matrix in the future.

INTRODUCCIÓN

La pared celular vegetal es la estructura encargada de entregar resistencia mecánica en las plantas y dar forma a las células, además de ser una barrera a la entrada de patógenos, participar en señalización celular y regular de forma indirecta el volumen celular. Debido a sus diversas funciones la estructura de la pared celular vegetal es variada y compleja, formándose una red organizada donde hemicelulosas se unen fuertemente a microfibrillas de celulosa embebidas en un gel de pectinas y proteínas.

Según sus características la pared celular se clasifica en dos tipos: pared celular primaria y pared celular secundaria. La pared celular primaria está presente en todos los tipos celulares, presentando características similares. Está constituida en un 25% por celulosa, 25% de hemicelulosas y 35% de pectinas, siendo el resto proteínas estructurales. En cambio, la pared celular secundaria se forma en células que han detenido su crecimiento y es mucho más especializada en estructura y composición, presentando un mayor porcentaje de celulosa, menor de pectinas y un cambio a nivel de hemicelulosas, además de un polímero distinto denominado lignina (Carpita y Gibeaut, 1993).

La celulosa es un polímero formado por un conjunto de microfibrillas constituidas por docenas de cadenas lineales de 1→4-β-D-glucosa, unidas entre sí por puentes de hidrógenos. Junto a la callosa, son los únicos polímeros sintetizados en la membrana plasmática de la célula vegetal, proceso que es llevado a cabo por complejos multiméricos de la enzima celulosa sintasa, localizados en el extremo creciente de las microfibrillas. Su sustrato principal es la UDP-glucosa, la cual también es utilizada en el

aparato de Golgi para la síntesis de otros componentes de la pared celular (Carpita y McCann, 2002).

Las hemicelulosas son polímeros que se unen a las microfibrillas de celulosa dando resistencia mecánica a la pared, siendo el xiloglucano la hemicelulosa más abundante en la pared primaria de dicotiledóneas. Al igual que la celulosa, este polisacárido tiene un esqueleto de 1→4-β-D-glucosa, pero con ramificaciones laterales de xilosa, galactosa y fucosa en diferentes combinaciones (Carpita y McCann, 2002). En *Arabidopsis thaliana*, al analizar la estructura del xiloglucano, sólo algunas de las posibles estructuras a formar son encontradas, indicándonos que la síntesis de polímeros de la pared celular no es al azar, y que debe existir alguna regulación.

Finalmente, las pectinas son una mezcla de polímeros de azúcar cargados negativamente como el ácido galacturónico (GalA), y neutros como ramnosa, galactosa y arabinosa, donde los grupos carboxilos de GalA están unidos por Ca^{+2} formando un gel altamente hidratado.

Se sabe que la síntesis de hemicelulosas y pectinas ocurre en el lumen del aparato de Golgi, y que las enzimas encargadas de este proceso son las glicosiltransferasas. Hasta el momento todas las glicosiltransferasas descritas en planta son proteínas de membrana de tipo II (Perrin y col, 1999; Faik y col, 2000; Faik y col, 2002; Madson y col, 2003), presentando una porción pequeña hacia el citoplasma en su extremo N-terminal, un segmento transmembrana, y la mayor parte de la proteína, incluido su sitio catalítico, orientado hacia el lumen del organelo, lo que ha sido demostrado en varios estudios bioquímicos (Muñoz y col, 1996; Wulff y col, 2000; Sterling y col, 2001).

Por otro lado, algunos investigadores han propuesto como participantes de la síntesis de polímeros no celulósicos a proteínas llamadas Csl (Cellulose synthase like), con características similares a las enzimas encargadas de la síntesis de celulosa, esto es

proteínas transmembrana capaces de tomar el sustrato desde el citoplasma y transferirlo hacia el polímero en la pared (Gibeaut, 2000; Richmond and Somerville, 2001). Y aunque las evidencias experimentales para esta hipótesis son escasas, y en nuestro laboratorio nos basamos en la síntesis mediada por glicosiltransferasas tipo II, recientemente se ha probado que proteínas tipo Csl están envueltas en la síntesis de β -glicanos en plantas, específicamente en la formación del esqueleto de β -1,4-manano del galactomanano (Dhugga y col, 2004).

De lo dicho anteriormente se puede deducir que las enzimas glicosiltransferasas al tener su sitio catalítico hacia el lumen del aparato de Golgi necesitan que los nucleótidos azúcar, utilizados como sustrato, se encuentren disponibles al interior de las vesículas de Golgi.

Sin embargo, las enzimas que sintetizan los nucleótidos azúcar, en su gran mayoría, se encuentran localizadas en el citoplasma, como ha sido probado para UDP-glucosa, UDP-galactosa y GDP-fucosa. Y como éstos sustratos no son capaces de difundir libremente, deben ser transportados a través de la membrana del aparato de Golgi, hacia su interior.

Actualmente existe evidencia del transporte de UDP-glucosa (Muñoz y col, 1996; Neckelman y col, 1998), UDP-galactosa (Norambuena y col, 2002), GDP-manosa (Baldwin y col, 2001), y GDP-fucosa (Wulff y col, 2000) en el aparato de Golgi de células vegetales. Además, mediante herramientas bioinformáticas se han identificado genes que codifican para putativos transportadores de nucleótidos azúcar (TNAs) en *Arabidopsis thaliana*, utilizando como base la homología con transportadores descritos en otros organismos. De este modo, en nuestro laboratorio se han clonado dos genes de *Arabidopsis* semejantes a transportadores de células animales que han sido denominados AtUTr1 y AtUTr2 (Norambuena, 2004), dos genes semejantes al

transportador de GDP-manosa de levadura VRG4 (Bastías, 2005) y un gen semejante al transportador SQV7 de *C. elegans* denominado AtUTr7 (Segura, 2003); identificándose además, otros transportadores de características similares a los anteriores en el genoma de *Arabidopsis*, algunos de los cuales han sido agrupados en la familia AtUTr (*Arabidopsis thaliana* UDP-galactose T_ransporter).

Dentro de esta familia se encuentran los ya mencionados: AtUTr1, un transportador de UDP-glucosa y UDP-galactosa de retículo endoplásmico (Norambuena y col, 2002; Reyes y col, 2006), AtUTr2, un transportador de UDP-galactosa de aparato de Golgi (Norambuena y col, 2005), y AtUTr7, un transportador de UDP-glucosa y UDP-galactosa de Golgi (Segura, 2003; Handford y col, 2005). Para todos ellos la actividad transportadora ha sido ensayada en levadura, y su localización subcelular ha sido estudiada mediante fusión a la proteína fluorescente verde y transformación de hojas de tabaco y/o células epidermales de cebolla (Norambuena, 2004; Handford y col, 2005; Reyes y col, 2006). En la Tabla 1 se muestran algunas características de los transportadores descritos anteriormente basadas principalmente en su secuencia génica.

Tabla 1

Características de los transportadores AtUTr_n

Gen	AGI^a	pb^b	aa^c	kDa^d	STM^e
AtUTr1	At2g02810	969	332	36,9	8
AtUTr2	At4g23010	1089	362	38,4	8
AtUTr7	At4g31600	972	296	34,6	9

^a: **AGI**: número de acceso en Arabidopsis Genome Initiative. ^b: **pb**: pares de bases. ^c: **aa**: número de aminoácidos, ^d: **kDa**: peso molecular de la proteína, ^e: **STM**: número de segmentos transmembrana.

Según el modelo propuesto por Neckelmann y Orellana (1998) los TNAs permitirían la entrada de nucleótidos azúcar al interior del aparato de Golgi, ahí el azúcar sería

transferido a un polímero en crecimiento por una glicosiltransferasa, liberándose NDP, el que sería sustrato para una NDPasa, liberando como productos NMP y Pi. El NDP sería contra-transportado hacia el citosol junto con la entrada del nucleótido azúcar por el TNA. Mientras que el Pi sería liberado al citoplasma por un transportador de fosfato (Figura 1).

Al observar este modelo surge la pregunta: ¿podrán los TNAs regular el transporte de nucleótidos azúcar y por ende producir un efecto en la síntesis de polisacáridos y glicoconjugados?. Seguramente su ausencia tendrá un efecto considerable en la síntesis de la pared celular; pero ¿aumentará la incorporación de nucleótidos azúcar al aparato de Golgi si aumenta la expresión de los TNAs?, y de ser así, ¿se alterará la composición de la pared celular?

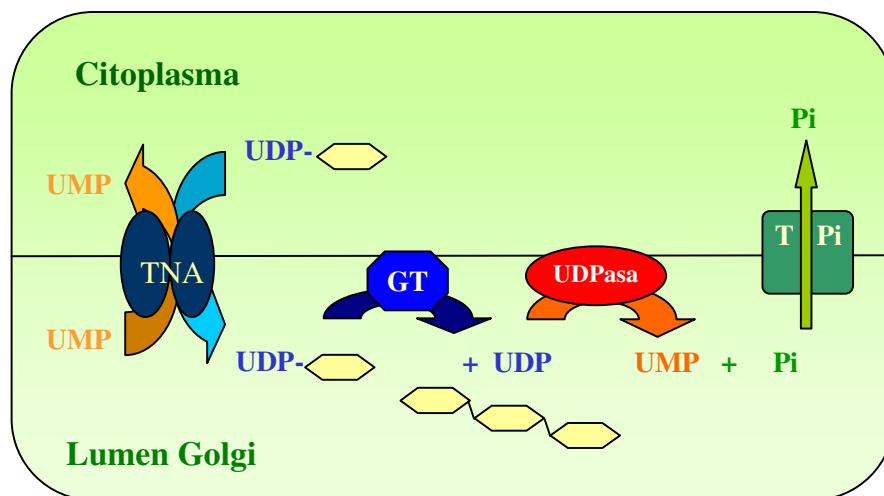



Figura 1. **Modelo de síntesis de polisacáridos en el aparato de Golgi.** Los nucleótidos azúcar (UDP-) sintetizados en el citoplasma entran al Golgi a través de un transportador de nucleótidos azúcar (TNA), siendo tomados por una glicosiltransferasa (GT) que transfiere el azúcar a una nueva cadena de polisacáridos, liberando UDP. Este UDP es tomado por una UDPasa que lo hidroliza en UMP y Pi, el primero sale contratransportado por el TNA y el Pi es liberado al citoplasma por un transportador de fosfato (T Pi). Modificado de Neckelman y Orellana (1998).

Para responder estas y otras interrogantes, decidimos sobreexpresar los transportadores de nucleótidos azúcar AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 en *Arabidopsis thaliana*, y así analizar los posibles cambios producidos a nivel de pared celular.

Además, a modo de complementar el trabajo y obtener resultados más rápidos, se expresó los transportadores AtUTr transientemente en tabaco.

Finalmente cabe decir que, debido al uso que se da a algunos componentes de la pared celular en la industria, como son la celulosa en la industria papelera y de madera, y las hemicelulosas y pectinas en la industria alimenticia y de polímeros. Resulta de gran relevancia el estudio de la síntesis de la pared, ya que una vez conocidos los mecanismos de formación y regulación de la biosíntesis de polisacáridos y sus funciones, podríamos manejar su composición en la pared celular utilizando la biotecnología, para obtener productos de mayor calidad o con nuevas aplicaciones.

HIPÓTESIS

Al aumentar el número de transportadores de nucleótidos azúcar en la membrana del aparato de Golgi debería producirse una mayor incorporación de nucleótidos azúcar al interior de este organelo, lo que finalmente derivaría en un cambio en los componentes de la pared celular vegetal.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la sobreexpresión de los transportadores de nucleótidos azúcar AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 en *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos específicos

1. Clonamiento de versiones etiquetadas de los genes AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 en un vector de expresión en plantas.
2. Análisis *in vitro* de la actividad de los transportadores expresados en planta.
3. Generación de plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresen los transportadores de nucleótidos azúcar.
4. Análisis de azúcares totales y componentes de la pared celular de plantas sobreexpresantes de los transportadores.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Medios de cultivos

Bacterias

- Luria Bertoni (LB): Bacto triptona 1%, NaCl 1%, extracto de levadura 0,5%.

Plantas

- Murashige & Skoog (MS): Medio base MS 0,43% pH 5,8.

4.2. Reactivos

Todos los reactivos utilizados son de calidad para biología molecular y/o calidad para análisis obtenidos de Merck, Sigma, US Biological, Winkler, Phyto Technology Laboratories, Mo Bio y Calbiochem. Los sustratos radioactivos UDP-[³H]galactosa (8,1 Ci/mmol) y UDP-[³H]glucosa (11,5 Ci/mmol) fueron obtenidos de NEN-Du Pont.

4.3. Material Biológico

- *Escherichia coli*, DH5 α : Se crecieron en medio LB líquido a 37 °C durante 16 horas, o en medio LB agar 2% a 37 °C durante 6 horas. La selección de bacterias transformantes se realizó en kanamicina o ampicilina 100 μ g/mL.
- *Agrobacterium tumefaciens*, GV3101: Se crecieron en medio LB líquido o LB agar 2% con gentamicina 25 μ g/mL a 28 °C durante 48 horas. La selección de bacterias transformantes se realizó en kanamicina 50 μ g/mL.
- *Nicotiana tabacum*, cultivar Xanthi NN (tabaco): Se crecieron semillas de tabaco en una mezcla de tierra de hoja y vermiculita (3:1). Se colocaron en una cámara de

crecimiento a 22 °C bajo luz blanca con un ciclo de luz de 16 horas. El riego se realizó regularmente con agua cada 5 días.

- *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia: Se crecieron semillas de *Arabidopsis* sobre una mezcla tierra de hoja y vermiculita (3:1). Para la selección de transgénicas se utilizaron semillas esterilizadas con el método TX-100, en el cual las semillas se lavan primero con una solución etanol 70%, TX-100 0,1% por 2 min, luego se elimina el líquido y se lavan con solución de hipoclorito de sodio 5%, TX-100 0,1% por 8 min, siendo finalmente lavadas 6 veces con agua estéril. Las semillas estériles fueron crecidas en placas con medio MS conteniendo sacarosa 1%, agar 0,8% en presencia de kanamicina 50 µg/mL, en cámara de crecimiento a 22 °C y 16 horas de luz durante 2 semanas. Las plantas seleccionadas fueron traspasadas a la mezcla tierra de hoja y vermiculita. Las plantas se colocaron en una cámara de crecimiento a 22 °C bajo luz blanca con un ciclo de luz de 16 horas. El riego se realizó regularmente con agua cada 4 días.

Para la obtención de ARN total las semillas se crecieron en medio líquido MS conteniendo sacarosa 2% en presencia de kanamicina 50 µg/mL y oscuridad con agitación a 80 rpm durante 10 días.

Para realizar fraccionamiento subcelular las semillas se crecieron en medio líquido MS conteniendo sacarosa 2% y oscuridad con agitación 80 rpm durante 14 días.

4.4. Clonamiento de los genes AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7

Utilizando los plasmidios de levadura p426GPD-AtUTr1.Myc.His p426GPD-AtUTr2.Myc.His p426GPD-AtUTr7.Myc.His se amplificó el ADNc de los genes AtUTr_n conteniendo el epítipo Myc.His en el extremo C-terminal. Para ello se

utilizaron los partidores previamente diseñados 5'Bam HI específicos para cada uno de los genes, que agrega un sitio Bam HI; y el partidor universal GDP426Myc3'Sacl que agrega un sitio Sacl (Tabla 2). Los fragmentos amplificados (AtUT_n-Myc.His) se clonaron en el vector pGEM-T (Invitrogen), obteniéndose de esta manera los plasmidios pGEMT-AtUT_n-Myc.His.

Posteriormente, utilizando las enzimas de restricción BamHI y Sacl, se escindió el inserto AtUT_n-Myc.His desde pGEMT-AtUT_n-Myc.His para su clonamiento en forma sitio dirigida en el vector de expresión en plantas pBI121 (Clontech), obteniéndose los plasmidios pBI121-AtUT_n-Myc.His.

Tabla 2

Partidores utilizados en el clonamiento de los genes AtUT_n

Partidor	Secuencia	Nt^a	Tm^b
AtUTr1 5'Bam	5' TCACGGATCCTAATGGAGGTCCATGGCTCC 3'	30	66
AtUTr2 5'Bam	5' GTAAGGATCCATGAAGGAGGAACAAAC 3'	27	58
AtUTr7 5'Bam	5' ATCACTCTTGGATCCCCATGGA 3'	22	55
Universal 3'Myc	5' GGCACAGTCGAGCTCGATCAGCGGTTT 3'	28	66

^a: Nt: Número de nucleótidos, ^b: Tm: Temperatura de apareamiento calculada.

Sitios Señalados: BamHI: GGATCC

Sacl: GAGCTC

Inicio Traducción: ATG

4.5. Técnicas generales de Biología Molecular

- Reacción de PCR: La reacción de PCR se hizo en presencia de 1 unidad de enzima AccuTherm ADN polimerasa, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Tris/HCl pH 8,5 20 mM, MgCl₂ 20 mM, TX-100 0,1%, Tween-20 0,001% y glicerol 5%, dNTPs 200 μM, 0,5 μM de cada partidor y 1 ng de ADN plasmidial. La temperatura de apareamiento de

los partidores fue de 50 °C para AtUTr1 y AtUTr7 y de 53 °C para AtUTr2, en un total de 30 ciclos (MyCycler, Biorad).

- Corte con enzimas de restricción: Se utilizaron 1,5-2 µg de ADN en presencia de 20 unidades de la enzima de restricción con el tampón correspondiente y las condiciones recomendadas por la empresa.
- Ligación: Se utilizó una relación 3:1 en ng de inserto respecto a ng de vector. La reacción se realizó con la enzima T4 ADN Ligasa (New England's BioLabs) y su tampón correspondiente a 16 °C toda la noche. En el caso de pGEM-T se siguieron las instrucciones del fabricante.
- Preparación de ADN plasmidial: A partir de cultivos de *E. coli* se preparó ADN plasmidial utilizando el kit Wizard Plus Minipreps o Midipreps ADN Purification Systems de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Purificación de ADN en gel: La banda de interés fue escindida del gel y el ADN purificado a través del kit de extracción QIAEX® II de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Electroforesis de ADN: Para separar fragmentos de ADN de tamaños entre 0,1 y 10 kb se prepararon geles de agarosa entre 0,8 y 1,2% p/v en tampón TAE (Tris 40 mM, CH₃COONa 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8). Como marcador de peso molecular se utilizó DNA ladder 1Kb de Fermentas. La electroforesis se corrió a 100 V.

4.6. Transformación de *Escherichia coli*

- Preparación de *E. coli* DH5α competentes: Las células competentes se prepararon según el método de Inoue y col (1990). Se inocularon 3 mL de medio LB con una colonia de *E. coli* DH5α y se creció a 37 °C con agitación por 16 horas. Se tomo 1

mL de este cultivo y se creció en 250 mL de LB a 25 °C hasta D.O₆₀₀ 0,6. Se incubó por 10 min en hielo y se centrifugó a 2.500 g por 10 min a 4 °C. El sedimento fue resuspendido en 20 mL de tampón TB frío (PIPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl pH 6,7 250 mM, KOH 5 N y MnCl₂ 55 mM). Se centrifugó a 2.500 g por 10 min a 4 °C y el sedimento se resuspendió en tampón TB frío. Se agregó DMSO hasta concentración 7% y se prepararon alícuotas que fueron congeladas en N₂ líquido y guardadas a -70 °C.

- Transformación de células DH5α competentes: Se incubó 50 µL de células competentes con 150-200 ng de ADN plasmidial en hielo por 15-20 min. Luego se dejaron las células a 42 °C por 2 min (50 s en el caso de pGEM-T) y en hielo por 2 min más. Se agregó 1 mL de LB y se crecieron las células a 37 °C con agitación por 1 hora. El cultivo fue sembrado en placas LB agar kanamicina 100 µg/mL (pBI121) o LB agar ampicilina 100 µg/mL, Xgal 25 µg/mL, IPTG 25 µg/mL (pGEM-T) para seleccionar bacterias transformantes.

4.7. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

- Preparación de *A. tumefaciens* GV3101 competentes: Las células competentes de *A. tumefaciens* fueron preparadas según el protocolo de Chen y col (1994). Se inoculó medio LB gentamicina 100 ng/µL con una colonia de *A. tumefaciens* y se creció a 28 °C. Se tomó 2 mL de este cultivo y se creció en 50 mL de LB gentamicina a 28 °C hasta D.O₆₀₀ 0,5. Las células se incubaron por 10 min en hielo y se centrifugó a 3.000 g por 5 min a 4 °C. El sedimento fue resuspendido en 1 mL de CaCl₂ 20 mM y se prepararon alícuotas que fueron congeladas en N₂ líquido y guardadas a -80 °C.

- Transformación *A. tumefaciens*: Se incubó 100 µL de células competentes con 1-2 µg de ADN plasmidial y se congelaron en N₂ líquido por 5 min. Se dejaron a 37 °C por 25 min y luego se agregó 1 mL de LB gentamicina (25 µg/mL), creciendo las células a 28 °C durante la noche. El cultivo se sembró en placas LB agar gentamicina 25 µg/mL, kanamicina 50 µg/mL y se creció a 28 °C por 72 horas para seleccionar transformantes.

4.8. Transformación de hojas de tabaco por infiltración con *A. tumefaciens*

Para la transformación transiente de tabaco se realizó infiltración según una modificación del protocolo de Kato y col (2002). Se preparó un cultivo de *A. tumefaciens* solo o transformado con el vector de interés, usando medio de selección LB gentamicina o LB gentamicina/kanamicina. Se creció a 28 °C por 48 horas, se centrifugó a 6.000 rpm y se resuspendió en agua destilada hasta D.O₆₀₀ 0,5. Se realizaron microinyecciones utilizando una jeringa de 1 mL en la cara abaxial de toda la hoja con alcance de 2 cm de diámetro, y luego de 4 días las hojas fueron cosechadas.

4.9. Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Plantas de *A. thaliana* fueron transformadas usando el método de inmersión floral descrito por Clough y Bent (1998). Para ello, plantas silvestres fueron crecidas en tierra hasta la aparición del meristema floral, el cual fue cortado en 2 oportunidades para aumentar el número de flores. Se creció un cultivo de *A. tumefaciens* en 250 mL de LB gentamicina-kanamicina a 28 °C por 48 horas. Se centrifugó a 6.500 rpm por 10 min y el sedimento fue resuspendido en solución sacarosa 5% y Silwet-L77 0,01% hasta D.O₆₀₀. Las flores de cada planta fueron sumergidas por 3-4 seg en la

solución para su transformación Las plantas se mantuvieron recostadas y tapadas durante 2 días, luego de los cuales fueron descubiertas para la obtención de semillas.

La selección de transformantes se realizó en presencia de kanamicina (50 µg/mL).

4.10. Preparación de fracción microsomal de hojas de tabaco

Para obtener fracciones enriquecidas en aparato de Golgi y retículo se infiltraron hojas de tabaco con una suspensión de *A. tumefaciens*, y se siguió el protocolo de fraccionamiento descrito por Órdenes y col (2002). El tejido fue pesado, cortado con hoja de afeitar y luego homogenizado en mortero en presencia de un volumen de solución de sacarosa 0,5 M (sacarosa 0,5 M, KH₂PO₄ pH 6,5 100 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM y PMSF 2 mM). Posteriormente fue filtrado en malla Miracloth y centrifugado a 1.000 *g* y 4 °C por 10 min. El sobrenadante fue trasladado a tubo de ultracentrífuga con 8 mL de solución de sacarosa 1,3 M y centrifugado a 100.000 *g* y 4 °C por 1 hora 30 min. Se descartó la fase superior y sobre la fracción de membranas se colocó 8 mL de solución sacarosa 1,1 M, 7 mL de sacarosa 0,7 M y 5 mL de sacarosa 0,25 M. Se centrifugó a 100.000 *g* y 4 °C por 1 hora 30 min. Se colectaron las interfases entre sacarosa 0,7 y 1,1 M (fracción Golgi y retículo) y sacarosa 1,1 y 1,3 M (fracción cloroplastos) y se colocaron en tubos separados agregando 1 volumen de agua fría. Se centrifugó a 100.000 *g* y 4 °C por 1 hora. El sedimento fue resuspendido en tampón STM (sacarosa 8,56 %; Tris HCl pH 7,5 10 mM y MgCl₂ 1mM), homogenizado y guardado a -20 °C.

4.11. Fraccionamiento subcelular de plantas de *A. thaliana*

Para obtener fracciones enriquecidas en Golgi y retículo de *A. thaliana* se utilizó una modificación del protocolo de fraccionamiento para tabaco (Materiales y métodos 4.10). Las soluciones de SPM y STM utilizadas fueron las mismas, a excepción de la SPM 0,7 M que en este caso no fue utilizada; a cambio de ello luego de la segunda centrifugación se cargó, una vez botado el sobrenadante, 16 mL de SPM 1,1 M y 5 mL de SPM 0,25 M. Las velocidades, tiempos y temperaturas de centrifugación fueron las mismas, y las interfases colectadas luego de la tercera centrifugación fueron entre sacarosa 0,25 y 1,1 M (fracción Golgi) y sacarosa 1,1 y 1,3 M (fracción retículo). Las vesículas finales fueron resuspendidas en STM y guardadas a -80 °C. El enriquecimiento de cada organelo en las fracciones colectadas fue verificado mediante western blot utilizando anticuerpos contra las proteínas RGP (Reverse Glycosylated protein) (Dhugga y col, 1997) y xiloglucano fucosiltransferasa (Vanzin y col, 2002), ambos marcadores de Golgi; y ensayo enzimático de la NADH citocromo C reductasa insensible a antimicina A, como marcador de retículo endoplásmico (Hodges y Leonard, 1974). Siguiendo en cada caso protocolos similares a los utilizados por Reyes y col (2006).

4.12. Medición de proteínas

La medición de la concentración de proteínas de una muestra se basó en el método del ácido bicinonínico (Bollag y Edelstein, 1991), usando el kit BCA (Pierce Chemical Co).

4.13. Inmunodetección de las proteínas AtUTr_n-Myc.His

Para detectar las proteínas etiquetadas correspondientes a los transportadores se realizó un western blot. Aproximadamente 30 µg de las proteínas correspondientes a las fracciones subcelulares de plantas fueron preincubadas a 65 °C por 10 min con el tampón de carga 4X (Tris-HCl 12 mM pH 6,8, glicerol 5%, SDS 0,4%, azul de bromofenol 0,02% y β-mercaptoetanol 2,9 mM). Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida SDS al 12% en la parte separadora y 4% en la concentradora, cargándose a la vez 4 µL del patrón de peso molecular preteñido (Fermentas, lote 1621). La electroforesis se corrió a 100 V por 2 horas.

Las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de Nitrocelulosa (BioRad) en el caso de tabaco, y a una membrana de polyvinylidene difluoride (PDVF, Millipore) en el caso de *A. thaliana*, utilizando la cámara Mini-Protean II (BioRad). Las condiciones de transferencia fueron de 350 mA y 4 °C por 1 hora y 30 min.

Para bloquear la membrana se incubó 1 hora a temperatura ambiente y toda la noche a 4 °C en una solución de PBS (o TBS) leche descremada 5%. La membrana fue lavada posteriormente con TPBS (PBS, Tween-20 0,1%) o TTBS (TBS, Tween-20 0,1%) e incubada por 2 horas con el anticuerpo primario monoclonal de ratón Anti-His (Santa Cruz Biotechnology) en dilución 1:400 para tabaco o el anticuerpo primario monoclonal de ratón Anti-Myc (Santa Cruz Biotechnology) en dilución 1:500 para *A. thaliana*. Luego la membrana se lavó repetidamente con TPBS para incubarla por 1 hora con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) en dilución 1:10.000. Luego de realizar los lavados pertinentes se realizó la reacción

de peroxidasa con luminol en la membrana mediante el kit Renaissance (NEN™). Las impresiones de las membranas se obtuvieron en placas radiográficas (Eastman Kodak).

4.14. Ensayo de incorporación de nucleótidos azúcar

Para realizar el ensayo de transporte y/o incorporación de nucleótidos azúcar se utilizaron las vesículas de Golgi y retículo obtenidas en los fraccionamientos subcelulares de plantas de tabaco o *A. thaliana*. En el ensayo 75 o 50 µg de proteína fueron incubadas con 1 µM de UDP-azúcar y 0,1 µCi de UDP[³H]-glucosa o UDP[³H]-galactosa, en un volumen final de 100 µL a 25 °C por 3 min. La reacción fue detenida con 10 volúmenes de tampón STM, pasada por filtros de nitrocelulosa de 0,45 µm y lavada con 10 mL de STM frío. El conteo se realizó con líquido de centelleo en equipo Beckman LS6000SC. Cada experimento fue realizado por triplicado.

4.15. Extracción de ARN de plantas de *A. thaliana*

Para la extracción de ARN se crecieron plantas de *A. thaliana* transgénicas y silvestres en medio líquido y oscuridad por 10 días. La extracción se realizó para 100 mg de tejido con el reactivo Trizol (Gibco-BRL) según especificaciones del fabricante, utilizando el Pellet Pestle Motor con varillas para homogenizar el tejido.

4.16. Ensayo de RT-PCR

A muestras de ARN obtenidas de plantas de *A. thaliana* se les realizó transcripción inversa para obtener su ADN complementario. Para ello se utilizó 1 µg de ARN total con el Sistema de Transcripción Reversa ImProm-II™ (Promega), siguiendo las

instrucciones del fabricante. A los ADNc obtenidos se les realizó PCR semicuantitativo en las mismas condiciones utilizadas para el clonamiento de los genes AtUTr_n. A modo de control se amplificó el gen actina utilizando los partidores que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Partidores utilizados en la amplificación control del RT-PCR

Partidor	Secuencia	Nt^a	Tm^b
Actina 5'	5' CACACTTTCTACAATGAGCT 3'	20	48
Actina 3'	5' GCAGTGATCTCTTTGCTCAT 3'	20	50

^a: Nt: Número de nucleótidos, ^b: Tm: Temperatura de apareamiento calculada.

4.17. Preparación de extracto de pared celular

Se crecieron plantas transgénicas y silvestres de *A. thaliana* durante 2 semanas en placas y posteriormente se pasaron a tierra hasta completar 5 semanas de edad. Hojas provenientes de estas plantas se colectaron y congelaron en N₂ líquido. Posteriormente fueron homogenizadas en un tubo eppendorf, usando el Pellet Pestle Motor, se agregó 1 mL de etanol 70%, se homogenizó y se centrifugó para obtener el sedimento. Se agregó 300 µL de solución metanol:cloroformo (1:1), se homogenizó, centrifugó y descarto el sobrenadante 3 veces. El sedimento fue secado a 37 °C.

4.18. Análisis de componentes de pared celular

Para romper la muestra de pared celular se realizó hidrólisis ácida usando ácido trifluoroacético (TFA) 2 M por 1 hora a 121 °C. Luego de esto se secó la muestra y se lavó 3 veces con isopropanol, evaporando cada vez. Se resuspendió en agua,

centrifugó y se separó el sedimento del sobrenadante; el primero se utilizó para el análisis de celulosa y el segundo para hemicelulosas y pectinas.

- Determinación del contenido de celulosa:

El contenido de celulosa se determinó por el método descrito por Updegraff (1969). El sedimento obtenido de la hidrólisis ácida de pared celular se trató con 3 mL del reactivo de Updegraff (ácido acético : ácido nítrico : agua , 8:1:2) a 100 °C por 30 min. Se centrifugó la muestra a 3700 rpm por 5 min y se lavó con agua, para luego lavar 5 veces con acetona y secar completamente bajo vacío. Para hidrolizar la muestra se agregó 175 µL de ácido sulfúrico 72% y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente, se sonicó por 15 min y se agitó por 15 min más a temperatura ambiente. Se agregó 825 µL de agua, se agitó, se centrifugó a 3700 rpm por 5 min y el sobrenadante se utilizó para medir celulosa usando el método de la antrona descrito por Dische (1964). Para ello se agrega a 50 µL de la muestra en volumen de 500 µL total, 1 mL del reactivo antrona (antrocenona 0,2% p/p en H₂SO₄), y se incuba a 100 °C por 5 min. La lectura de absorbancia se realiza a 620 nm y el contenido de glucosa/mg de material se calcula en base a una curva estándar preparada con diferentes concentraciones de glucosa (10, 20, 50, 100, 200 y 500 µg/mL). La conversión a porcentaje de celulosa se calcula en base a los pesos moleculares del agua y glucosa en la muestra.

- Determinación de ácidos urónicos:

La determinación de ácidos urónicos se realizó según el protocolo de Filisetti-Cozzi y Carpita (1991). Al líquido sobrenadante se agrega reactivo sulfamato (ácido sulfámico 3 M, KOH pH 1,6) y tampón borato (Na₂B₄O₇ 0,0125 M en H₂SO₄), se mezcla y calienta 5 min a 100 °C. Una vez frío se distribuye en alícuotas de 200 µL en placa de Elisa y se agrega la solución bifenilo (*m*-hidroxi-bifenilo 0,15% en

NaOH 0,5%). Se incuba durante 10 min y luego se lee la absorbancia a 540 nm para cuantificar. Los valores se comparan con una curva estándar elaborada a diferentes concentraciones de ácidos urónicos, como ácido galacturónico o glucurónico (10, 20, 50 ,100, 150, 200 µg/mL)

- Determinación de azúcares alditol acetato:

El líquido del sobrenadante fue evaporado y a la muestra se agregó el agente reductor borohidrato de sodio en NH_4OH 1 M, incubando por 1 hora a temperatura ambiente. Para la reducción de alditoles se agregó ácido acético glacial hasta neutralizar y se lavó y evaporó 3 veces con ácido acético /metanol, para luego lavar y evaporar 4 veces con metanol. La acetilación se realizó con piridina/aceticanhidrato a 121 °C por 20 min, y la muestra se lavó y evaporó 2 veces con tolueno. Se lavó la muestra con cloruro de metilo en agua y la fase inferior (cloruro) se transfirió a un tubo para su evaporación. La muestra final fue resuspendida en acetona y analizada por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (Albersheim y col, 1967).

RESULTADOS

5.1. Clonamiento de los genes AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 codificantes para transportadores de nucleótidos azúcar de *Arabidopsis thaliana*

Los genes que codifican para transportadores de nucleótidos azúcar AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 de *A. thaliana* habían sido clonados con anterioridad en el vector p426GPD-Myc.His (Segura, 2003; Norambuena, 2004) (Figura 2-A). Se utilizó este plasmidio como fuente de ADNc ya que las proteínas clonadas en él estaban etiquetadas con los epítopes Myc.His, lo que permite evaluar la acumulación de la proteína mediante el uso de anticuerpos específicos para los transgenes.

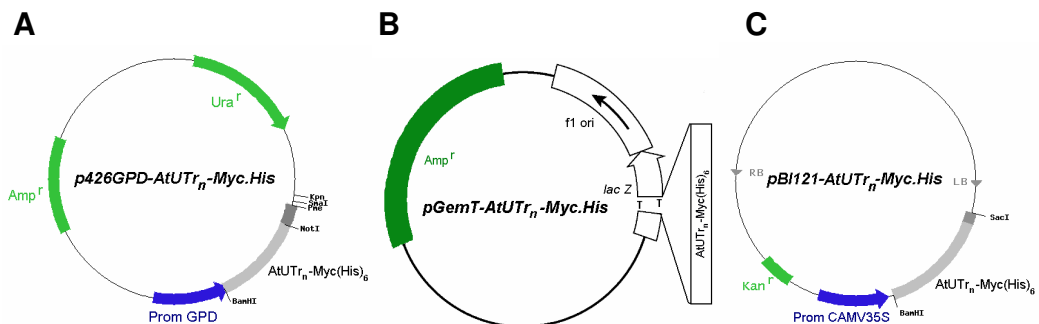


Figura 2. **Plasmidios usados en el clonamiento de los genes AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 etiquetados con el epítipo Myc.His.** A: Plasmidio p426GPD-AtUTr_n-Myc.His. B: Plasmidio pGEMT-AtUTr_n-Myc.His. C: Plasmidio pBI121-AtUTr_n-Myc.His. AtUTr_n: AtUTr1 o AtUTr2 o AtUTr7; Ura^r: auxotrofia uracilo; Kan^r: resistencia kanamicina; Amp^r: resistencia ampicilina; Prom CAMV35S: Promotor virus mosaico de la coliflor.

A partir de estos plasmidios se amplificó el ADN que contiene la región codificante de los genes AtUTr_n con el epítipo Myc.His, clonándose posteriormente en el vector binario pBI121. Para ello se tomaron los partidores previamente diseñados que agregan un sitio de restricción BamHI en el extremo 5' y un sitio SacI en el extremo 3' (Tabla 2). Utilizando los partidores correspondientes en cada caso, se

amplificaron los insertos AtUTr1-Myc.His, AtUTr2-Myc.His y AtUTr7-Myc.His. Estos insertos fueron posteriormente clonados en el vector pGEM-T, obteniéndose de esta manera los plasmidios pGEMT-AtUTr1-Myc.His pGEMT-AtUTr2-Myc.His y pGEMT-AtUTr7-Myc.His (Figura 2-B). Luego, estos plasmidios fueron utilizados para transformar *E. coli*, corroborando que las secuencias clonadas fueran las correctas mediante una digestión de los productos de PCR con enzimas de restricción de corte poco frecuente (Figura 3). En el caso de AtUTr1 se utilizó la enzima KpnI que da fragmentos de 602 y 533 pb; para AtUTr2 la enzima NcoI con fragmentos de 711, 428 y 84 pb; y finalmente la enzima EcoRI para AtUTr7 que da fragmentos de 645 y 468 pb. En todos los casos se obtuvieron bandas que concuerdan con los tamaños predichos.

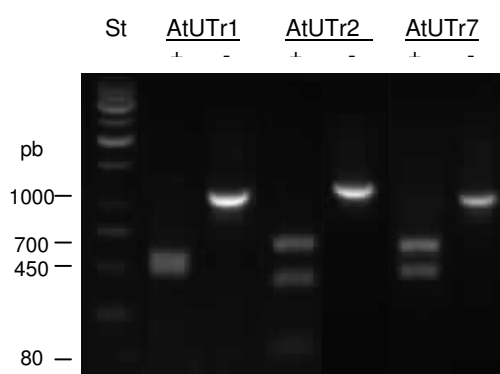


Figura 3. **Análisis de restricción de los genes clonados en el vector pGEM-T.** Gel de agarosa 1%. Patrón con enzima (+) y sin enzima (-), al tratar los genes AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 (Myc.His) con las enzimas de restricción KpnI, NcoI y EcoRI respectivamente.

Posteriormente los fragmentos fueron secuenciados y comparados con la base de datos de TAIR (Figura 4) ingresando los números AGI para cada transportador (Tabla1). De esta forma se encontró que para AtUTr1 ocurrieron cambios a nivel nucleotídico que sustituyeron los aminoácidos M²¹⁹ por I²¹⁹, y K²³² por E²³². En el primer caso ambos aminoácidos son apolares, y sus estructuras son similares; en el segundo caso se cambia un aminoácido positivo por otro negativo. Para analizar el

origen de los cambios, la secuencia obtenida fue comparada con la originalmente clonada para AtUTr1 en p426GPD-Myc.His, pudiéndose observar que dichos cambios ya estaban presentes en aquel plasmidio; y como ya se había observado que aquel era funcional, se utilizó esta secuencia de igual modo.

Para AtUTr2 se observaron cambios a nivel de nucleótido que no afectaron la secuencia de aminoácidos. Mientras que AtUTr7 no presentó variaciones en su secuencia.

AtUTr1 (At2g02810)

```

1      MEVHGSGFRRILLALLCISGIWSAYIYQGVLQETLSTKRFGPDEKRFEHL
51     AFLNLAQSVVCLIWSYIMIKLWSNAGNGGAPWWTYWSAGITNTIGPAMGI
101    EALKYISYPAQVLAKSSKMIPVMLMGTLVYGIRYTFPEYMCTFLVAGGVS
151    IFALKTSSKTI SKLAHPNAPLGYALCSLNLAFDGF1TNATQDSIASRYPK
201    TEAWD IMLGMNLWGTIYNI2IYMFGLPQGGIGFEAIQFCKLHPEAAWDILKY
251    CICGAVGQNFIFMTISNFGSLANTTITTTTRKFVSVIVSSVM3SGNPLSLKQ
301    WGCVSMVFGGLAYQIYLKWKKLQRVEK4KKQKS*
```

AtUTr2 (At4g23010)

```

1      MKEEQTRSLFGISLSDKPTWQQFLICTSGFFFGYLVNGVCEEYVYNRLQF
51     SFGWYFTFIQGFVYLF1LIY2LQGF3TTKHIVNPMRTYVKLSAVLMGSHGLTK
101    GSLAYLNYPAQIMFKSTKVLPMIMGAFIPGLRRKYPVHEYISAFLLVLG
151    LILFTLADAQMSPNFSMIGIMMITGALIMDAFLGNLQEAI4FTMNPETTQM
201    EMLFCSTVVGLPFLFVPMVLTGEVFRAWTACAQHPYVYGVLVFEAMATFI
251    GQVSVLSLIALFGAATTALITTARKGV5TLLLSYLIFTKPLTEQHGSGLLL
301    IAMGIVLKMVPMSKAPAKIPARPAVRIAGGDGDREDEERKSLV*
```

AtUTr7 (At4g31600)

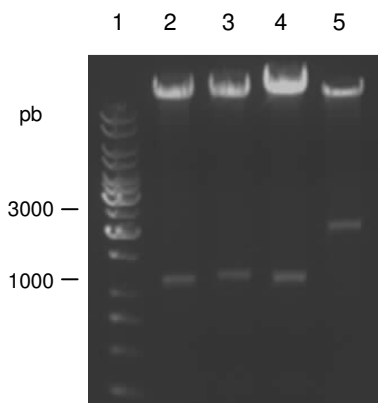
```

1      MEVQAEMEPTSSISLVAAVSYGIASAMAMVFIN1KAVIMQYPHSMTVLT2LQQ
51     LATSLLIHFGRRMGYTRAKGIDMATAKLLPVSIFYNANVAFALASLKG3V
101    NIPMYIAIKRLTPLAVLISGVLF4GKGKPTTQVALSVLLTAAGCVIAALGD
151    F5SFDLFGYGLALTSVFFQ6TMYLVLVEKSGAEDGLSSIEIMFYNSFLSLPF
201    LSILII7VTGEFPNSLSLLLAKCSYLPFLVILILSLVMGIVLNF8TMFLCTI
251    VNSALTTTIVGV9LKGVGSTTLG10FVLLGGVEVHALNVSGLVVNTAGGVWYS
301    YAKYRQKKAKPAK11MSDLEAHKK*
```

Figura 4. **Secuencias clonadas de los genes AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7.** Los genes AtUTr_n provenientes de GPD426 clonados en el vector pGEMT fueron secuenciados y comparados con la base de datos de TAIR. Los aminoácidos sustituidos se subrayan, y entre paréntesis se señala el número AGI de cada proteína.

Finalmente se clonó el inserto AtUTr_n-Myc.His en forma sitio dirigida en el vector de expresión en plantas pBI121, obteniéndose los plasmidios pBI121-AtUTr1-Myc.His, pBI121-AtUTr2-Myc.His y pBI121-AtUTr7-Myc.His (Figura 2-C). Las secuencias clonadas fueron escindidas del vector con las enzimas de restricción BamHI y SacI para corroborar sus tamaños (Figura 5), obteniéndose fragmentos de alrededor de 1 kb para los genes AtUTr_n y de 3 kb para el vector control conteniendo el gen GUS.

Figura 5. **Análisis de restricción del plasmidio pBI121-AtUTr_n-Myc.His.** Gel agarosa 0,8% y los fragmentos liberados al realizar una digestión doble con las enzimas BamHI y SacI. (1) Estándar PM (2) pBI121-AtUTr1-Myc.His, (3) pBI121-AtUTr2-Myc.His, (4) pBI121-AtUTr7-Myc.His, (5) pBI121-GUS.



5.2. Expresión de los transportadores de nucleótidos azúcar AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 de *Arabidopsis thaliana* en hojas de *Nicotiana tabacum*

Para corroborar la funcionalidad de los genes clonados en pBI121 se decidió expresar los genes AtUTr_n-Myc.His en hojas de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Para ello se procedió a infiltrar hojas de tabaco con cepas de *A. tumefaciens* transformadas con los plasmidios pBI121-AtUTr1-Myc.His, pBI121-AtUTr2-Myc.His y pBI121-AtUTr7-Myc.His.

Luego de 4 días se preparó una fracción microsomal enriquecida en retículo endoplásmico y aparato de Golgi a partir de las hojas transformadas con cada uno de los plasmidios pBI121-AtUTr_n-Myc.His, confirmándose la presencia de estos

organelos en cada fracción mediante marcadores enzimáticos y anticuerpos contra proteínas presentes en ellos (datos no mostrados).

5.2.1. Análisis de acumulación de las proteínas AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 fusionadas a Myc.His en fracción microsomal de plantas de tabaco transformadas

Para verificar la expresión de las proteínas AtUTr_n-Myc.His se realizó un western blot utilizando un anticuerpo contra la polihistidina presente en el epítipo Myc.His (Figura 6). Para ello utilizamos las fracciones microsomales obtenidas a partir de las hojas de tabaco infiltradas con *A. tumefaciens* solo y transformado con los plasmidios pBI121-AtUTr1-Myc.His, pBI121-AtUTr2-Myc.His, pBI121-AtUTr7-Myc.His. En un gel SDS-PAGE se separaron proteínas provenientes de la fracción microsomal y de cloroplastos de tabaco, las estas fueron posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con el anticuerpo anti-His. De este modo pudimos observar una banda de aproximadamente 35 kDa en la fracción microsomal proveniente de las hojas infiltradas con *A. tumefaciens* conteniendo los genes AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7. Esto no se observó en la fracción de cloroplastos ni en las muestras de tabaco control (Figura 6).

Este resultado nos indica que las proteínas correspondientes a los transportadores se expresan en tabaco, presentando pesos moleculares similares a los vistos anteriormente para ellos. Y además se destinan al aparato de Golgi y/o retículo endoplásmico, y no a cloroplasto.

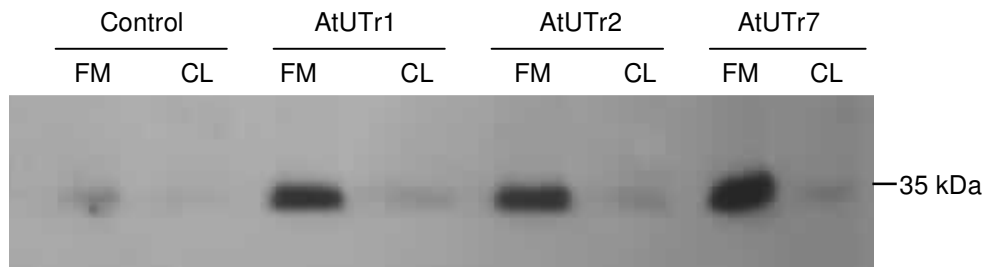


Figura 6. **Acumulación de las proteínas AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 en fracción microsomal de hojas de tabaco.** Plantas de tabaco fueron infiltradas con *Agrobacterium tumefaciens* solo (Control), *Agro* pBI121-AtUTr1-Myc.His, *Agro* pBI121-AtUTr2-Myc.His y *Agro* pBI121-AtUTr7-Myc.His. Las hojas fueron homogenizadas y los organelos separados por centrifugación diferencial. 10 μ g de proteína de fracción microsomal (FM) y de cloroplastos (CL) fueron separadas por SDS-PAGE. Posteriormente se realizó western blot usando anticuerpos dirigidos contra el epítotope His en membrana de nitrocelulosa.

5.2.2. Ensayos de incorporación de UDP-azúcares en fracción microsomal de tabaco expresando AtUTr1-Myc.His, AtUTr2-Myc.His y AtUTr7-Myc.His

Para verificar la funcionalidad de los transportadores clonados en el vector binario se realizaron ensayos de incorporación de UDP-azúcares en las fracciones enriquecidas en Golgi y retículo (fracción microsomal) obtenidas de la infiltración de hojas de tabaco con *A. tumefaciens* transformado con los plasmidios pBI121-AtUTr_n-Myc.His. Los ensayos se realizaron a 25 °C por 3 min, utilizándose como sustrato UDP-[³H]glucosa para AtUTr1 y AtUTr7, y UDP-[³H]galactosa para AtUTr2 (Figura 7). A modo de control se utilizó hojas de tabaco infiltradas con *A. tumefaciens* sin transformar y las fracciones enriquecidas en cloroplasto.

En estos ensayos pudimos observar en todos los casos una mayor incorporación de UDP-azúcar en la fracción microsomal comparado con la fracción enriquecida en cloroplastos, existiendo una diferencia de hasta 5 veces. Para AtUTr1 y AtUTr7 se observó un aumento de 12 veces en el transporte de UDP-glucosa respecto a la

muestra control, mientras que para AtUTr2 el incremento en el transporte de UDP-galactosa fue de 24 veces respecto al control.

Estos resultados nos indican que la expresión de los transportadores en hojas de tabaco estimula la incorporación de UDP-azúcares en fracciones microsomales, sugiriendo que un aumento en la expresión de estas proteínas conlleva un incremento considerable en los niveles de transporte de los UDP-azúcares ensayados.

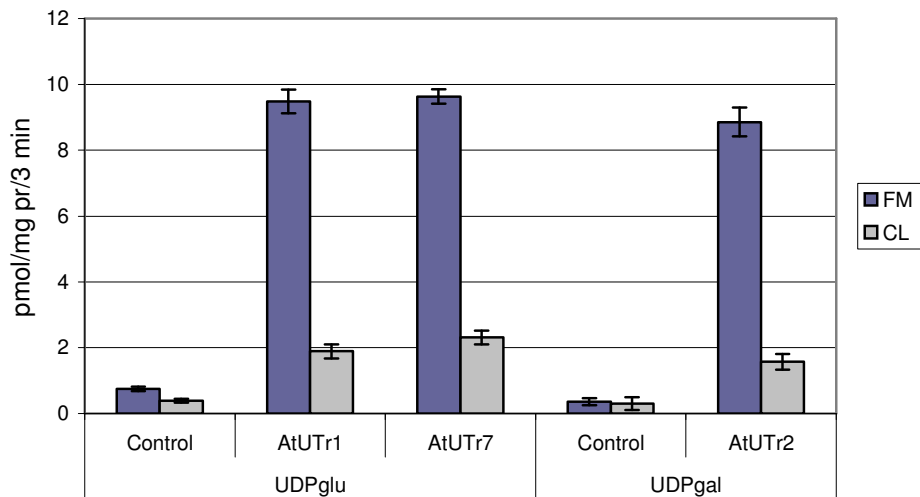


Figura 7. **Incorporación de UDP-glucosa y UDP-galactosa en hojas de tabaco expresando AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7.** Se utilizó fracción microsomal (FM) y enriquecida en cloroplasto (CL) de hojas infiltradas con *Agrobacterium* solo (Control) y *Agrobacterium* transformado con pBI121-AtUTr1-Myc.His, pBI121-AtUTr2-Myc.His y pBI121-AtUTr7-Myc.His. En 75 µg de cada fracción se determinó la capacidad para incorporar UDP-[³H]glucosa o UDP-[³H]galactosa a 25 °C durante 3 min. Se muestran las barras de error correspondientes al triplicado de los experimentos.

5.3. Generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresen los transportadores de nucleótidos azúcar AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7

Una vez comprobada la expresión, funcionalidad y actividad de los transportadores en tabaco se procedió a transformar plantas de *A. thaliana*. Para ello se realizó inmersión floral con plantas silvestres (T0) en una solución de *Agrobacterium* transformado con los plasmidios pBI121-AtUTr_n-Myc.His. Se obtuvieron semillas y se seleccionaron las transformantes (T1) en kanamicina. Luego, se colectaron semillas de las transformantes y con la nueva generación de plantas (T2) se realizaron los experimentos de RT-PCR y análisis de pared celular. Posteriormente se recolectaron semillas de la generación T2 obteniéndose líneas de plantas (T3) 100% homocigotas en las que analizamos la acumulación del transcrito, de la proteína y realizamos ensayos de incorporación de nucleótidos azúcar.

Cada una de las generaciones fue analizada con el fin de observar si existían cambios fenotípicos, realizándose una descripción de los rasgos más relevantes.

La segregación de cada una de las líneas de plantas para cada transportador, respecto a su resistencia o sensibilidad a kanamicina, fue analizada mediante el test de Chi cuadrado. A modo de ejemplo se muestra la segregación para la generación de plantas T2 (Tabla 4).

Tabla 4**Segregación en T2 de líneas transgénicas para los genes AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7**

Gen	Línea	Resistentes	Sensibles	Chi²	Conclusión
AtUTr1	1	93	23	1,655	M
	2	127	28	3,976	NM
	3	81	19	1,920	M
	4	79	20	1,215	M
	5	56	18	0,018	M
	6	127	3	35,703	NM
AtUTr2	1	68	2	18,305	NM
	2	68	17	1,133	M
	3	71	21	0,232	M
	4	58	19	0,004	M
	5	101	5	23,258	NM
	6	84	14	6,000	NM
AtUTr7	1	72	17	1,652	M
	2	43	15	0,023	M
	3	64	24	0,242	M
	4	90	3	23,516	NM
	5	62	23	0,192	M
	6	71	23	0,014	M

Selección de transgénicas a través de resistencia a kanamicina. Conclusión calculada a probabilidad χ^2 0,1. (M) Segregación Mendeliana 3:1, (NM) Segregación no mendeliana.

5.3.1. Presencia de los transcritos AtUTr1-Myc.His, AtUTr2-Myc.His y AtUTr7-

Myc.His en hojas de roseta de plantas de *A. thaliana*

Para verificar la expresión de los transgenes en las plantas de *A. thaliana* transformadas (T2), se crecieron varias líneas y se realizó un análisis de las hojas de la roseta mediante RT-PCR. A cada muestra se le extrajo su ARN y se obtuvo el ADNc mediante la reacción de transcripción reversa. Utilizando los mismos partidores que en el proceso de clonamiento de los genes AtUTr_n (Tabla 2), se realizó el análisis por PCR, donde solo se amplificó el transgen y no el gen silvestre correspondiente a los transportadores, ya que el partidor 3' hibrida con la secuencia Myc presente solo en los genes introducidos. De esta manera se pudo observar una banda de poco más de 1 kb en cada una de las tres líneas escogidas para cada transportador (líneas 4, 5 y 6 para AtUTr1; líneas 3, 4 y 5 para AtUTr2; y líneas 2, 4, y 6 para AtUTr7), las cuales al tener diferentes intensidades nos sugieren una expresión diferencial de los genes AtUTr_n. En las plantas silvestres no se observó expresión significativa para ninguno de los transgenes, aunque en el caso de AtUTr2 se observa un poco de amplificación debido a contaminación, la cual fue restada para los cálculos de expresión relativa (Figura 8-A).

A modo de control se amplificó el gen endógeno actina utilizando los partidores correspondientes (Tabla 3), ya que este mantiene su nivel de expresión en todas las muestras (Figura 8-B).

Posteriormente se calculó la expresión relativa de cada transgen como la razón entre la cantidad amplificada del transgen y la de actina para cada línea (figura 8-C), pudiendo identificar que el mayor nivel de sobreexpresión en el caso de AtUTr1 y AtUTr7 se observa en las líneas con segregación no mendeliana.

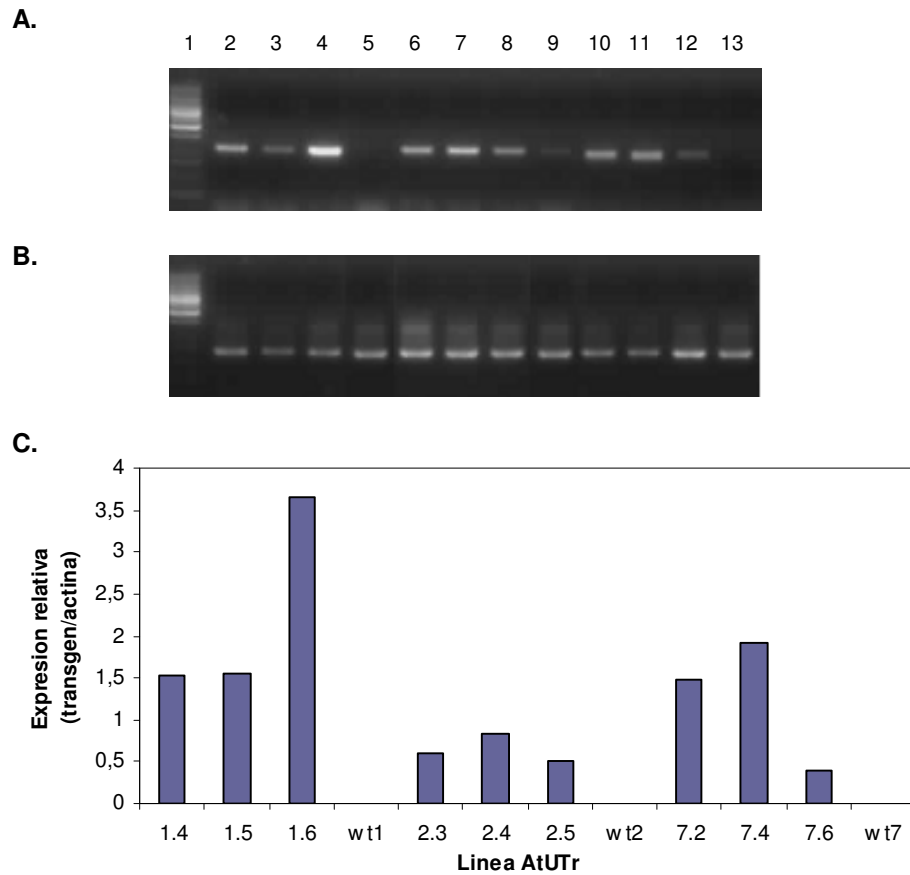


Figura 8. **Expresión de los transgenes en hojas de roseta de plantas transformadas de *A. thaliana*.** Gel agarosa 1%. **A:** Mediante RT-PCR se observó la expresión relativa de los transgenes. (1)Estándar PM, (2-4)líneas AtUTr1-partidor AtUTr1, (5)control wt-partidor AtUTr1, (6-8)líneas AtUTr2-partidor AtUTr2, (9)control wt-partidor AtUTr2, (10-12)líneas AtUTr7-partidor AtUTr7, (13)control wt-partidor AtUTr7. **B:** Control actina. **C:** Expresión relativa de los transgenes (razón transgen/actina).

5.3.2. Análisis de acumulación de las proteínas AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 fusionadas a Myc.His en fracciones subcelulares de plantas de *A. thaliana* transformadas

Para detectar la acumulación de las proteínas transportadoras en plantas transgénicas (T3) de *A. thaliana* se realizó fraccionamiento subcelular de plantas crecidas en medio líquido y oscuridad durante 2 semanas. Esto, ya que el protocolo para realizar fraccionamiento subcelular en *Arabidopsis* está establecido bajo estas condiciones. Se recolectaron las fracciones correspondientes a retículo endoplásmico y Golgi, y las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE. Posteriormente fueron transferidas a membranas de PVDF e incubadas con un anticuerpo anti-Myc.

En estas condiciones sólo pudimos observar la presencia de la proteína transgénica (40 kDa) en la línea de plantas AtUTr1-5, y no para los otros dos transportadores ni la planta silvestre (Figura 9).

Este experimento fue repetido para las líneas transgénicas AtUTr2-3, 4, 5 y para las líneas AtUtr7-2, 4, 6, y en ninguno de los casos se logró ver acumulación de la proteína transportadora (resultados no mostrados).

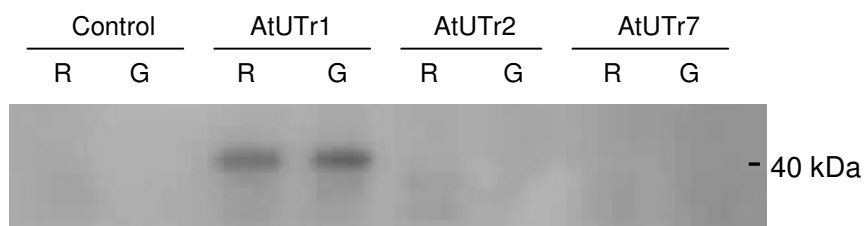


Figura 9. **Acumulación de las proteínas AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 en fracciones de retículo y Golgi de *A. thaliana*.** Fracciones subcelulares enriquecidas en retículo (R) o Golgi (G) fueron preparadas a partir de plantas de *A. thaliana* silvestres (Control) o transgénicas para líneas AtUTr1-5, AtUTr2-4 y AtUTr7-2. Se realizó western blot utilizando 30 µg de cada fracción. Las proteínas fueron reveladas utilizando un anticuerpo anti-Myc en membrana de PVDF.

5.3.3. Ensayos de incorporación de UDP-azúcares en fracciones subcelulares de plantas de *A. thaliana* transgénicas para AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7

Utilizando las fracciones subcelulares preparadas a partir de plantas silvestres y transgénicas (T3) de *A. thaliana* crecidas en medio líquido y oscuridad durante 2 semanas, se realizaron ensayos de incorporación de UDP-³H]galactosa similares a los realizados en tabaco utilizando filtros de nitrocelulosa. Los ensayos se realizaron por triplicado a 25 °C por 3 min, y se comparó la capacidad de incorporación entre fracciones enriquecidas en Golgi y en retículo, y entre plantas silvestres y transgénicas para los transportadores (Figura 10).

En este ensayo observamos que en las líneas analizadas para cada transportador (AtUTr1-5, AtUTr2-5 y AtUTr7-6) el transporte en la fracción enriquecida en Golgi era mucho mayor al de retículo, incluso en plantas de la línea AtUTr1-5, donde habíamos comprobado la sobreexpresión de la proteína transportadora.

Sin embargo, en ninguno de los casos se observó un aumento en la incorporación de nucleótidos azúcar en las plantas transgénicas respecto a las silvestres, por el contrario, hubo una disminución en la incorporación, la que en el caso de AtUTr1-5 llegó a un 40% menos, en AtUTr7-6 a un 30 % menos y en AtUTr2-5 a valores similares al control.

Este resultado estaría sugiriendo un efecto inverso, en donde la única línea que presentaba una acumulación significativa de proteína en el ensayo de western blot (AtUTr1-5), disminuye drásticamente la incorporación de nucleótidos azúcar a sus organelos respecto a la planta silvestre control.

Estos experimentos no fueron repetidos para el resto de las líneas estudiadas.

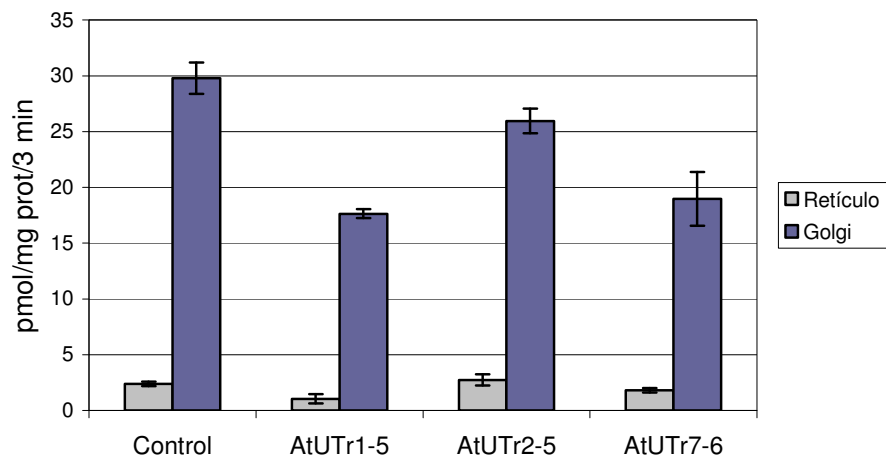


Figura 10. **Incorporación de UDP-galactosa en plantas etioladas de *A. thaliana*.** Se utilizó fracciones enriquecidas en Golgi o retículo preparadas a partir de plantas de *A. thaliana* silvestres (Control) o transformadas con pBI121-AtUTr1-Myc.His línea 5, pBI121-AtUTr2-Myc.His línea 5 y pBI121-AtUTr7-Myc.His línea 6. En 50 μ g de cada fracción se determinó la capacidad para incorporar UDP- 3 H]galactosa a 25°C por 3 min. Los experimentos se realizaron en triplicado y se muestran las barras de error correspondientes.

5.3.4. Presencia de los transcritos AtUTr1-Myc.His, AtUTr2-Myc.His y AtUTr7-Myc.His en plantas etioladas de *A. thaliana*

Para determinar si los transgenes se expresan en las plantas transgénicas (T3) de *A. thaliana* crecidas en medio líquido en ausencia de luz realizamos análisis por RT-PCR. Siguiendo el protocolo utilizado con anterioridad para la extracción de ARN y RT-PCR pudimos observar solo en las plantas transgénicas (líneas 4, 5 y 6 para AtUTr1; líneas 3, 4 y 5 para AtUTr2; y líneas 2, 4, y 6 para AtUTr7), y no en las silvestres, la banda de aproximadamente 1 kb correspondiente al transgen de cada uno de los transportadores (Figura 11-A), además de la banda de actina amplificada como control (Figura 11-B).

Para cada muestra se calculó la expresión relativa transgen/actina (Figura 11-C), la que fue nula para las plantas silvestres, a excepción de cuando se usó el partidor de AtUTr2, el cual presenta contaminación que fue restada para este cálculo. Por su parte, en las plantas transgénicas se observó expresión, pero con niveles por debajo a los vistos en muestras de hojas de roseta de las mismas plantas crecidas en luz. Esto se dio en la mayoría de los casos, excepto en el caso de las líneas AtUTr1-4 y 5 y AtUTr2-3 que presentaron un mayor nivel de expresión, similar al encontrado en hojas de roseta (Figura 8); concordando esto con lo observado para la línea AtUTr1-5 mediante western blot en estas mismas condiciones de crecimiento.

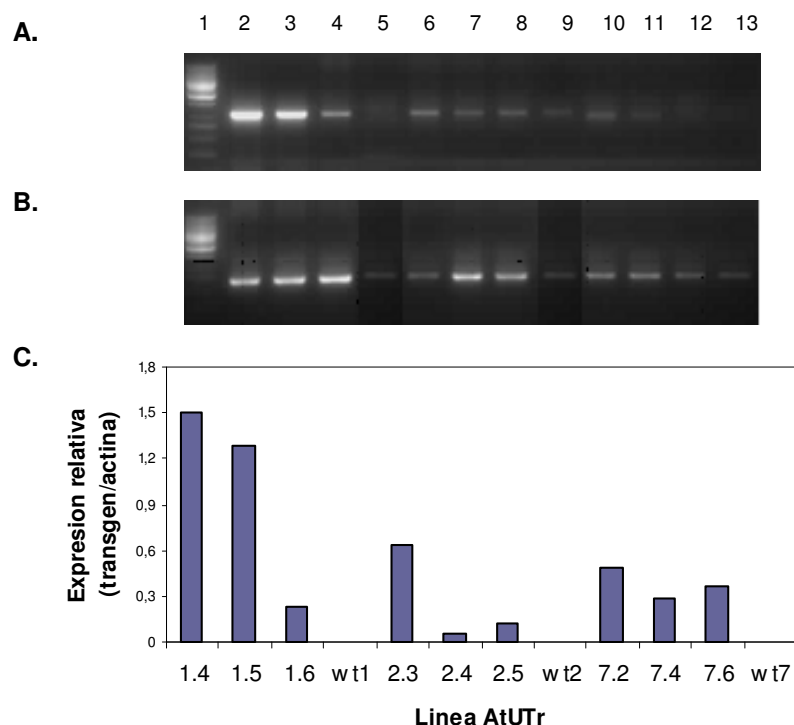


Figura 11. **Expresión de los transgenes en plantas etioladas de *A. thaliana*.** **A:** Expresión medida por RT-PCR. (1)Estándar PM, (2-4)líneas AtUTr1-partidor AtUTr1, (5)control wt-partidor AtUTr1, (6-8)líneas AtUTr2-partidor AtUTr2, (9)control wt-partidor AtUTr2, (10-12)líneas AtUTr7-partidor AtUTr7 (9)control wt-partidor AtUTr7. **B:** Control amplificación actina. **C:** Expresión relativa de los transgenes (razón transgen/actina)

5.4. Análisis fenotípico de plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas para los transportadores de nucleótidos azúcar AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7

Analizamos si la expresión de los transgenes produjo algún cambio en la planta de manera que generara la aparición de un fenotipo diferente al de la planta silvestre. De esta forma se realizó un análisis visual de las líneas de *A. thaliana* que sobreexpresan los genes de los transportadores AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7, además de un análisis de los componentes de su pared celular.

5.4.1. Caracterización visual de plantas de *A. thaliana* transformadas con los transportadores AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7

En la caracterización visual de las plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas se analizaron rasgos macroscópicos tales como el tamaño de la raíz e hipocotilo en plantas pequeñas, y el tamaño y grosor de tallo en plantas adultas.

- Análisis de plántulas en placa

Para observar el tamaño y salida de raíces se crecieron plantas de *A. thaliana* en placas conteniendo medio MS con sacarosa 2% en presencia de luz y posición vertical durante 3 semanas. En cada placa se sembró una línea transgénica (T3) y plantas silvestres en paralelo para efectos de la comparación. En un comienzo la salida de raíces, su largo y el tamaño del hipocotilo fueron similares entre las plantas, pero en la segunda semana comenzó a observarse que el largo de las raíces en plantas silvestres era mayor al de plantas transgénicas, con diferencias entre 0,3 a 1,2 cm (Figura 12).

Esta diferencia fue significativa para las líneas AtUTr1-4 y 5, para las líneas AtUTr2-3 y 5, y para todas las líneas analizadas para AtUTr7 (2, 4 y 6), aunque la disminución en el tamaño de la raíz, respecto a las silvestres, para las transgénicas

de este último transportador no fue tan severo como para los otros dos. En el caso de las líneas AtUTr1-6 y AtUTr2-4 la diferencia en longitud de la raíz no resultó significativa.

- Análisis de plantas en tierra

El análisis de plantas adultas se realizó con plantas transgénicas (T3) y silvestres de *A. thaliana* crecidas en placas conteniendo medio MS con sacarosa 1% durante 2 semanas y posteriormente trasplantadas a tierra. En el crecimiento en placa no se observaron grandes diferencias en la roseta entre líneas transgénicas ni con la silvestre, ni tampoco durante las primeras semanas en tierra. A la quinta semana de edad se pudo apreciar en plantas de varias de las líneas transgénicas un mayor tamaño, con hojas y tallos más gruesos (Figura 13). Sin embargo, aunque el fenotipo fue similar para los tres transportadores, los resultados no resultaron concluyentes debido al bajo número de plantas analizado y las variaciones entre muestras.

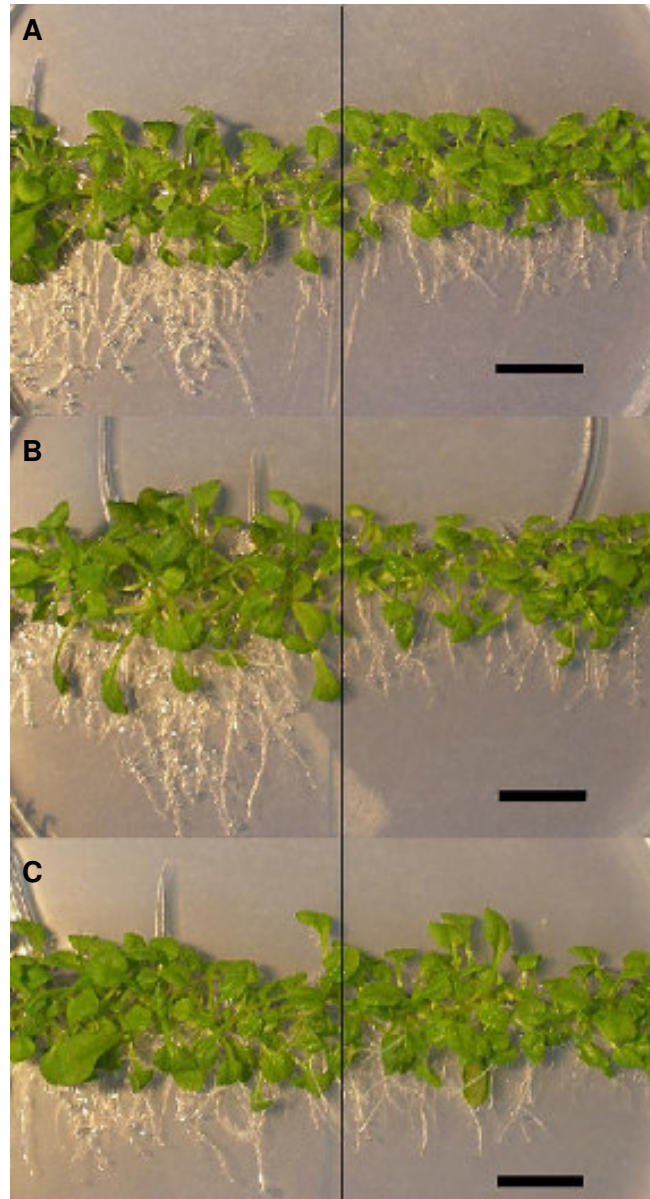


Figura 12. **Comparación de plántulas de *A. thaliana* silvestres y transgénicas.** Plantas de *A. thaliana* fueron crecidas en placas verticales de MS sacarosa 2% para la observación de raíces e hipocotilos. Se comparan plántulas silvestres (izquierda) y transgénicas (derecha). **A:** Línea AtUTr1, **B:** Línea AtUTr2. **C:** Línea AtUTr7. La barra de tamaño representa 1 cm.



Figura 13. **Plantas adultas de *A. thaliana***. Semillas de *A. thaliana* fueron crecidas en placas de medio MS con sacarosa 1% y luego pasadas a tierra. A 5 semanas de edad se comparan plantas silvestres (izquierda) y transgénicas (derecha). **A:** Línea AtUTr1, **B:** Línea AtUTr2. **C:** Línea AtUTr7. La barra de tamaño representa 1 cm.

5.4.2. Análisis de componentes de pared celular de plantas transgénicas para los transportadores AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7

Para el análisis de pared celular de plantas transgénicas (T2), se tomaron las hojas de roseta de plantas de 5 semanas de edad crecidas primero en placa y luego en tierra, todas en iguales condiciones. Se preparó pared celular utilizando el método

etanol, cloroformo:metanol (1:1), y el posterior tratamiento con TFA. De esta forma se pudo medir el contenido total de celulosa, ácidos urónicos y azúcares alditol acetato. Para cada conjunto de plantas transgénicas de los transportadores (AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7) se analizaron tres líneas diferentes, cada una con tres muestras biológicas distintas y para cada muestra tres mediciones por separado; se realizó lo mismo para la planta silvestre. Los datos fueron analizados con el test estadístico t-student para reconocer diferencias significativas.

- Análisis de Celulosa

Respecto al contenido de celulosa total, medido por el método de la antrona (Dische, 1964), no se observó mayores diferencias en el contenido entre líneas transgénicas ni con la silvestre, excepto en el caso de líneas sobreexpresando AtUTr7 que estuvieron muy cerca de tener un contenido significativamente menor. Estos resultados confirman la hipótesis que estos transportadores no están involucrados en la biosíntesis de éste polímero (Figura 14).

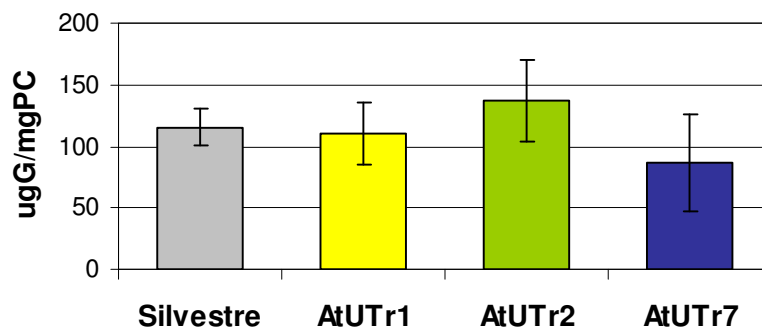


Figura 14. **Contenido total de celulosa en pared celular.** A partir de un extracto de pared celular de plantas de *A. thaliana* se midió el contenido de celulosa como glucosa total medida a absorbancia 640 nm con el reactivo antrocenona. Se muestran los resultados promedios de 3 plantas silvestres y 3 líneas transgénicas para cada transportador con la desviación estándar correspondiente. Los resultados se expresan como μg de glucosa por mg de extracto de pared celular

- Análisis de Ácidos Urónicos

En el análisis de ácidos urónicos totales, realizado con el ensayo del bifenilo (Filisetti-Cozzi y Carpita, 1991), no se observaron diferencias entre líneas transformadas con los distintos transportadores ni con la silvestre, lo que sugiere que estas proteínas no estarían transportando sustratos como ácido glucorónico o galacturónico (Figura 15).

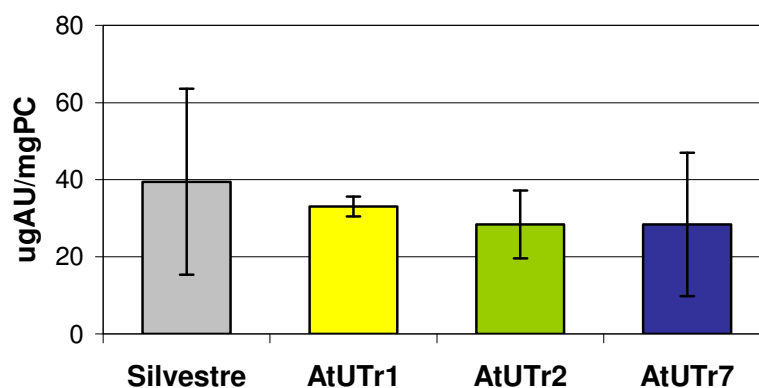


Figura 15. **Contenido total de ácidos urónicos en pared celular.** A partir de un extracto de pared celular de plantas de *A. thaliana* se midió la cantidad de ácidos urónicos por el ensayo del bifenilo como absorbancia a 540 nm. Se muestran los resultados promedios de 3 y 9 muestras para plantas silvestres y transgénicas respectivamente, con la desviación estándar correspondiente. Los resultados se expresan como μg de ácidos urónicos por mg de extracto de pared celular.

- Análisis de Azúcares totales

Mediante el análisis de los alditol acetato se determinó el contenido total de ramnosa, arabinosa, fucosa, manosa, glucosa y galactosa en la pared celular.

En muestras crecidas en luz el contenido de glucosa es muy alto debido al almidón presente, y en nuestro caso esto se observó para todas las plantas, y en especial para las transgénicas que mostraron un aumento importante de este azúcar respecto a la silvestre (Figura 16). Además, se observó un aumento significativo en

el contenido de galactosa y manosa en plantas transgénicas respecto a las silvestres.

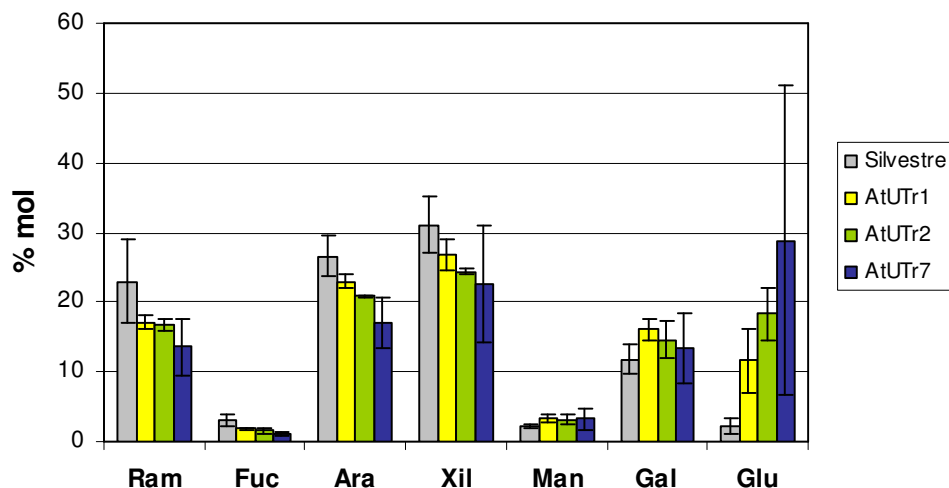


Figura 16. **Contenido de azúcares totales en pared celular.** Utilizando el extracto de pared celular de plantas de *A. thaliana* se midió la cantidad de azúcares alditol acetato. Se muestran los resultados promedios de 3 y 9 muestras para plantas silvestres y transgénicas respectivamente, con la correspondiente desviación estándar. Los resultados se expresan como porcentaje molar.

Estos resultados fueron más evidentes al eliminar los valores de glucosa del análisis, es decir, hacer el análisis estadístico t-student tomando en cuenta todos los azúcares a excepción de la glucosa, e incluyendo en su reemplazo los valores correspondientes al porcentaje molar de ácidos urónicos (Figura 17). De este modo se observaron cambios significativos en la mayoría de las líneas analizadas, a excepción de AtUTr1-4 y AtUTr2-3, en las cuales el aumento de manosa y galactosa no representó un valor tan significativo (Figura 17-A).

En el caso de galactosa el aumento promedio en las plantas transgénicas fue de un 80-90% respecto a las silvestres, mientras que para manosa fue de hasta un 100% (Figura 17-B). Para el resto de los azúcares no se observaron cambios

significativos, manteniéndose en general las proporciones observadas respecto a plantas silvestres en el análisis incluyendo glucosa.

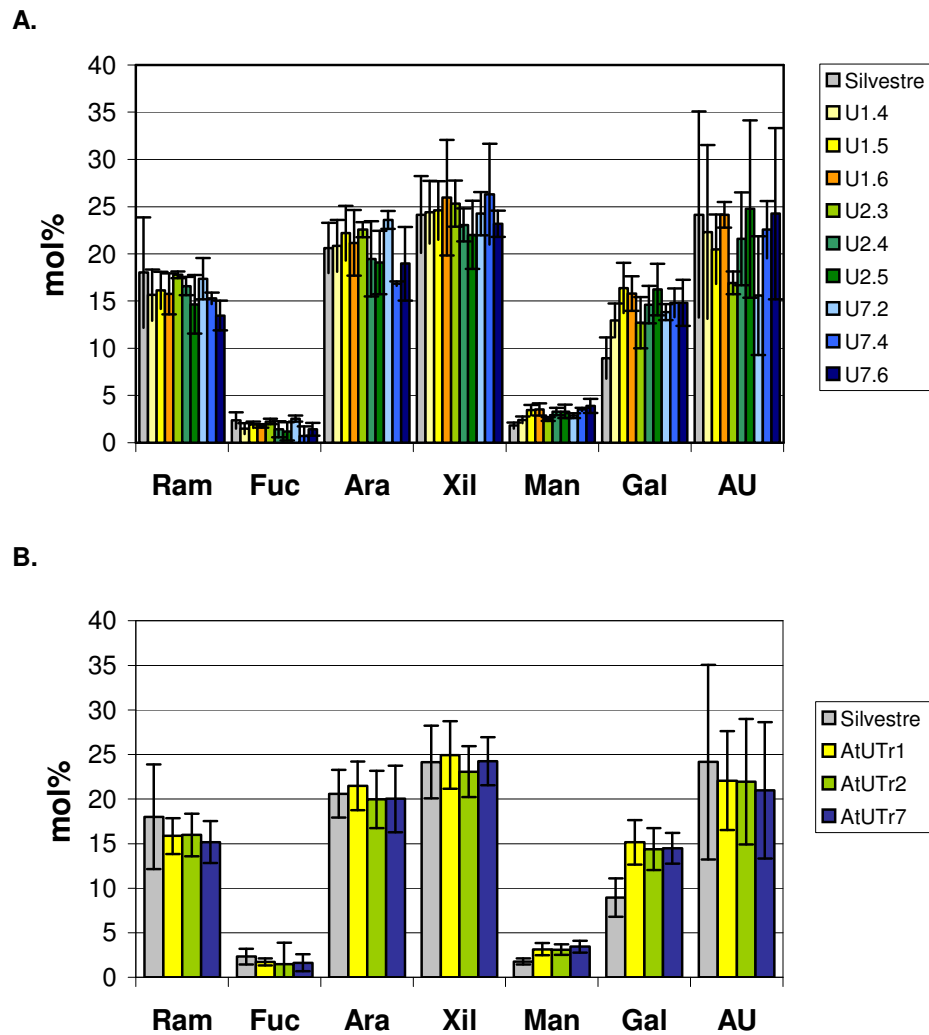


Figura 17. **Contenido de azúcares totales en pared celular excluyendo glucosa.** Usando los datos obtenidos del análisis de azúcares alditol acetato en pared celular de plantas de *A. thaliana* se recalcularon los porcentajes molares de todos los azúcares eliminando glucosa y agregando ácidos urónicos. **A:** Resultados promedio para 3 mediciones de cada línea transgénica de los transportadores. **B:** Resultados promedio para total de transgénicas por cada transportador. Se muestran además resultados para plantas silvestres y la correspondiente desviación estándar.

DISCUSIÓN

Las plantas fijan gran cantidad de carbono proveniente del CO₂, el cual en su mayoría es utilizado para la síntesis de carbohidratos, incluyendo los polisacáridos de la pared celular. Entre dichos componentes se encuentran la celulosa, pectinas como el Arabinano o homogalacturonano, y hemicelulosas como el xiloglucano o glucomanano, todos los cuales son sintetizados por enzimas específicas.

Es sabido que las enzimas glicosiltransferasas juegan un importantísimo rol en la síntesis de pared celular, y que tienen su sitio catalítico hacia el lumen del aparato de Golgi. Como los nucleótidos azúcar, sustratos de estas enzimas, se sintetizan en su mayoría en el citosol deben ser transportados hacia el interior del Golgi, función que es adjudicada a los transportadores de nucleótidos azúcar (Muñoz y col, 1996; Neckelman y Orellana, 1998; Wulff y col, 2000).

Mediante este trabajo realizado en dos modelos vegetales hemos corroborado, en tabaco, que los transportadores de nucleótidos azúcar (TNAs) son capaces de ingresar nucleótidos azúcar al aparato de Golgi y que son además un factor limitante del tipo y cantidad de azúcar incorporado a la pared. Por su parte, el trabajo en *Arabidopsis thaliana*, demostró que la sobreexpresión de los TNAs en esta especie puede afectar tanto el fenotipo visible de las plantas como la composición de la pared celular, demostrando su directa relación con el proceso de síntesis de ella. Sin embargo, al no ser posible observar acumulación de la proteína, ni un aumento en la incorporación de nucleótidos azúcar al Golgi en las plantas transgénicas, se postula la existencia de silenciamiento génico en estas plantas, con posibilidad de activación de mecanismos compensatorios que serían responsables de los cambios observados.

6.1. Expresión de los transportadores de nucleótidos azúcar AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 de *A. thaliana* en hojas de *Nicotiana tabacum*

La expresión de los transportadores AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 de *Arabidopsis thaliana* en hojas de tabaco nos ha dejado en claro que la sobreexpresión de los TNAs estimula la incorporación de UDP-azúcares en fracciones microsomales preparadas a partir de dichas hojas.

El hecho de que en tabaco no hayamos podido separar bien las fracciones de retículo y Golgi nos dificulta establecer en qué organelos se encuentran ubicados cada uno de nuestros transportadores, sin embargo gracias a trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio sabemos que versiones fusionadas de los transportadores a la proteína fluorescente verde han localizado a AtUTr1 en retículo endoplásmico (Reyes y col, 2006), a AtUTr2 en el aparato de Golgi (Norambuena y col, 2005) y a AtUTr7 también en Golgi (Handford y col, 2005). Por lo que es posible que el aumento en la incorporación de UDP-azúcares ocurra en estos organelos.

Por otro lado sabemos que la sobreexpresión de proteínas puede modificar la localización subcelular de estas (Bassham y Raikhel, 2000). Es por esta razón que suponemos que existe una gran parte de los transportadores que podría estar recirculando entre retículo y Golgi, ejerciendo tal vez, su actividad transportadora en ambos organelos.

Sin embargo, aunque no podemos localizar con precisión la actividad transportadora, es relevante que logramos sobreexpresar los transportadores en tabaco, observando gran acumulación de la proteína y aumento en la actividad de incorporación de nucleótidos azúcar mediante ensayos *in vitro*. Comprobando la hipótesis que en plantas los transportadores de nucleótidos azúcar, como los de la familia AtUTr, son los

encargados de determinar el tipo y cantidad de nucleótido azúcar incorporado al aparato de Golgi.

6.2. Generación de plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresen los transportadores de nucleótidos azúcar AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7

Habiendo comprobado la funcionalidad de los genes AtUTr_n fusionados a Myc.His en tabaco, transformamos plantas de *A. thaliana* silvestres con el vector que contiene esta versión etiquetada de los genes transportadores intentando obtener líneas transgénicas que los sobreexpresen.

Mediante selección en kanamicina identificamos las plantas transformadas y confirmamos que la resistencia al antibiótico se mantenía a través de las generaciones. A través de RT-PCR observamos que todas las líneas seleccionadas expresaban el transgen y que el nivel de expresión variaba para cada línea, observándose que aquellas líneas con segregación no mendeliana (AtUTr1.6 y AtUTr7.4) presentaban un mayor nivel de expresión en la roseta (Figura 8), lo que podría deberse a la inserción de más de una copia del gen AtUTr_n en el genoma de la planta.

Sin embargo, al intentar observar la acumulación de las proteínas codificadas por los transgenes y medir su funcionalidad como transportadores, los resultados no fueron los esperados. La obtención de fracciones enriquecidas en aparato de Golgi había sido implementada en nuestro laboratorio a partir de plantas etioladas crecidas en medio líquido, por lo que las plantas transgénicas fueron crecidas de este modo para la obtención de fracciones. Desdichadamente, en estas condiciones no fue posible ver la acumulación de las proteínas transgénicas en las fracciones, excepto para la línea AtUTr1-5, así como tampoco se observó un aumento en la incorporación de UDP-

galactosa respecto a plantas silvestres, habiendo incluso una disminución en la actividad transportadora.

Se sabe que cada uno de los transportadores endógenos tiene su propia regulación en la planta, habiéndose observado diferencias de expresión entre distintos tejidos y estadios del desarrollo de la planta (Marchant, 2004; Norambuena y col, 2005; Handford y col, 2005). Sin embargo, como los transgenes se insertaron al azar en el genoma y están bajo el control del promotor 35S, su regulación no tendría que ver con la expresión de los genes endógenos, si no más bien con la expresión de la zona del genoma en que se insertaron.

Respecto a esto, una posible explicación al fenómeno es que las condiciones en las que crecimos las plantas no favorezcan la expresión de los transportadores AtUTr_n, ya que la zona de inserción no se encuentra transcripcionalmente activa. Esta situación se da en una amplia variedad de genes, por ejemplo aquellos regulados por luz como los genes *cab* que codifican para proteínas unidas a clorofila *a/b* que captan luz, que son en su mayoría foto-regulados en angiospermas (Tobin y Silverthorne, 1985).

Por esta razón verificamos los niveles de expresión del transgen en las plantas etioladas por RT-PCR, observándose que los niveles de expresión eran menores a los medidos para plantas crecidas en tierra y luz en todas las líneas transgénicas, a excepción de la línea AtUTr2-3, la que presentaba niveles similares de expresión. Sin embargo, aunque la expresión del transgen es menor, igual está presente, por lo que debiéramos ser capaces de detectar la proteína en todas las líneas analizadas.

Con estos datos, creo que la posibilidad más real es que en el intento de sobreexpresión se estén formando ARNs de interferencia a partir de las secuencias génicas introducidas, las que podrían estar silenciando la expresión de los transportadores. Esta situación es bastante posible considerando la gran cantidad de

antecedentes de silenciamiento que existen en experimentos en plantas (Maztke y Matzke, 2004), como por ejemplo en la sobreexpresión del gen chalcona sintasa en pétalos pigmentados de petunia (Napoli y col, 1990), donde inesperadamente el gen introducido produjo un bloqueo en la biosíntesis de antocianina. En esto último cabe destacar que *Arabidopsis* posee toda la maquinaria necesaria para el proceso de silenciamiento de genes, teniendo un alto número de copias de las proteínas DICER y RDR (Schauer y col, 2002; Maztke y Matzke, 2004).

El hecho que no veamos aumento en el nivel de transporte en las plantas transgénicas versus las silvestres coincide con el hecho que no se acumulen las proteínas transportadoras. Sin embargo, para el caso de la línea AtUTr1-5 esta relación no es aplicable, pudiendo argumentar que este transportador se ha relacionado recientemente con procesos de control de plegamiento de proteínas en retículo endoplásmico (Reyes y col, 2006), y en las condiciones de crecimiento que utilizamos para este experimento no estamos promoviendo este proceso, por lo que sería esperable que la incorporación de nucleótidos azúcar en las plantas de la línea AtUTr1-5 sea similar a lo presentado por la planta silvestre.

Por otro lado debe recalarse que aunque AtUTr1 es capaz de transportar UDP-glucosa y UDP-galactosa, el nivel de transporte para UDP-glucosa es mucho mayor que para UDP-galactosa, utilizado como sustrato en esta parte de la investigación. Por lo que tal vez, al aumentar la cantidad de proteína transportadora AtUTr1, se ve favorecida la incorporación de UDP-glucosa al retículo endoplásmico (y tal vez al Golgi por el exceso de transportador), desbalanceando el ingreso de otros sustratos, como UDP-galactosa.

6.3. Análisis fenotípico de plantas de *A. thaliana* transgénicas para los transportadores de nucleótidos azúcar AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7

Cuando uno analiza plantas transgénicas o mutantes para un gen particular puede ocurrir que exista un fenotipo visible, o a nivel celular, el cuál requerirá de técnicas especiales para visualizarlo. O de otro modo, puede que no existan cambios detectables en la planta más allá de los niveles de expresión del gen de interés.

En nuestro laboratorio se ha trabajado con plantas mutantes para los genes AtUTr1 y AtUTr7 (Reyes y col, 2006; Handford y col, 2005), pero no se han realizado análisis en plantas que sobreexpresen estas proteínas. Basándonos en fenotipos encontrados para la mutante del transportador AtUTr7 que presenta variaciones en la salida de raíces laterales y tamaño de éstas (Handford y col, 2005), decidimos crecer las mutantes en condiciones que favorecieran la observación de las raíces en condiciones normales de crecimiento, con el fin de analizar si presentaban alguna anomalía respecto a las plantas silvestres de *Arabidopsis*.

De esta forma se encontró que las raíces de plántulas silvestres presentaban un largo mayor al de algunas líneas sobreexpresantes para los TNAs. Este resultado concuerda con la idea de silenciamiento génico, ya que una disminución del transcrito, y por ende de la proteína transportadora debiera, producir una disminución en la incorporación de azúcares al Golgi, lo que a la larga podría traducirse en una menor síntesis de pared celular o cambio en su composición, que podría afectar el tamaño celular o el tamaño final de la planta. Este fenómeno podría afectar más a las raíces que a otras estructuras de la planta ya que es donde ocurre mayor elongación celular en etapas tempranas.

Además, en otros trabajos se ha observado que el cambio en la cantidad de algunos componentes de la pared celular puede afectar la elongación celular debido a que

oligosacáridos provenientes de componentes de la pared, como xiloglucano, participan como señales para la elongación celular mediada por auxinas (York y col, 1984).

Respecto al aumento de tamaño de hoja observado para plantas de algunas líneas transgénicas como AtUTr1-4 y 6, AtUTr2-3 y 4 y AtUTr7-2, posteriores análisis demostraron que algunas de estas líneas que presentaban un cambio significativo, como AtUTr1-4 y AtUTr2-3 (datos no mostrados), no presentaban alteraciones significativas en los azúcares de pared celular (Figura 17-A). Por esta razón creo que las diferencias observadas en hojas y tallos pueden ser un artificio dado por la variabilidad misma que existe en las muestras, ya que el crecimiento en tierra no es completamente homogéneo para todas las plantas.

Debido a la participación que tendrían los transportadores en la síntesis de componentes de la pared celular, y al hecho que se ha visto que mutantes para genes involucrados en la síntesis de la pared presentan alteraciones en sus componentes (Reiter y col, 1997; Lerouxel y col, 2002), decidimos hacer un análisis de la composición de la pared celular de las plantas transgénicas para los transportadores AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7.

Los resultados obtenidos son interesantes, ya que aunque sólo pudimos demostrar la expresión del transgen en hojas de roseta de plantas transformadas de *A. thaliana*, sin estudiar la actividad transportadora bajo estas condiciones de crecimiento, el análisis de pared celular mostró una alteración en su composición.

Como se esperaba no se observaron diferencias entre plantas silvestres y transgénicas para el contenido de celulosa ya que dicho polímero se sintetizaría en la membrana celular, donde los TNAs no serían requeridos.

Tampoco se observaron variaciones en el contenido de los ácidos urónicos (ácido glucurónico o galacturónico) entre muestras, los cuales a pesar de ser componentes de

las pectinas sintetizadas en el Golgi, no han sido probados como sustrato de los transportadores en estudio.

Los resultados del contenido de azúcares en la pared celular de las plantas transgénicas mostraron una importante diferencia en el contenido de glucosa. Este podría explicarse por el hecho que dos de los transportadores (AtUTr1 y AtUTr7) incorporarían dicho sustrato al lumen del Golgi. Sin embargo, como AtUTr2 no transporta dicho sustrato, creemos que el aumento de glucosa observado en la mayoría de los casos se debe a la gran cantidad de almidón presente en las muestras. Por esta razón se hizo el análisis estadístico del contenido de azúcares presentes en la muestra sin considerar la glucosa, pero incluyendo los ácidos urónicos. De esta forma observamos que se produce un aumento significativo del contenido de galactosa y manosa en la pared de plantas transgénicas al compararlas con las silvestres.

El hecho de que galactosa varíe no es sorpresa, ya que para los tres transportadores (AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7) se ha demostrado su capacidad para incorporar UDP-galactosa tanto en levaduras como en plantas (Norambuena y col, 2002, 2005; Segura, 2003). Lo que resulta extraño es que una disminución en el número de transportadores, hipotetizado por la falta de la proteína transportadora sobreexpresada, produzca un aumento en el contenido de este azúcar, cuando pensando lógicamente un menor transporte debiera estar relacionado con un menor porcentaje del azúcar en la pared. Sin embargo, resulta interesante que este resultado corrobore la idea de que los TNAs son limitantes en la incorporación de azúcares a la pared, y que las glicosiltransferasas estarían actuando reguladas por la cantidad de sustrato, aunque probablemente tienen una velocidad limitada.

En el caso de manosa es difícil atribuir su aumento a los transportadores utilizados en este trabajo ya que no se ha visto que en plantas éstos sean capaces de transportar

GDP-manosa. Sólo en levadura se observó que AtUTr2 presentaba una pequeña actividad de transporte de GDP-manosa (Norambuena, 2004), sin embargo esto no se ha observado para los otros dos transportadores. Además, se sabe que la mayoría de los TNAs encontrados hasta hoy son específicos para un sólo tipo de nucleótido azúcar (Hirschberg y col, 1998), y que los que transportan más de un tipo de nucleótido azúcar reconocen generalmente sólo un tipo de nucleótido, GDP o UDP, como ocurre en SQV7 de *C. elegans* el cual transporta UDP-GlcA, UDP-galNac y UDP-Gal (Berninsone y col, 2001). Esto debido a que se cree que el nucleótido sería necesario para el anclaje al transportador, pero no suficiente para el transporte, dependiendo esto último del azúcar específico unido al nucleótido (Capasso y Hirschberg, 1984).

Podría ocurrir que al haber menor cantidad de los transportadores AtUTr_n la planta activara la expresión de otros transportadores de nucleótidos azúcar que transportaran UDP-glucosa, y que estos a su vez fueran capaces de transportar GDP-manosa, aunque no se ha probado la existencia de algún transportador que utilice ambos azúcares como sustrato, por las razones indicadas en el párrafo anterior.

Sin embargo, podría ocurrir que de forma separada diferentes transportadores fueran sobreexpresados naturalmente por la planta, aumentándose conjuntamente el transporte de UDP-galactosa y GDP-manosa al Golgi para la síntesis de un polímero común que contenga ambos NDP-azúcares. Entre estos posibles blancos se encuentra GONST1, identificado en *Arabidopsis* como un transportador de GDP-manosa localizado en Golgi (Baldwin y col, 2001), y los mismos transportadores AtUTr2 o AtUTr7 que podrían ser preferentemente expresados en el caso de que su par esté siendo silenciado.

Manosa constituye 4 a 9 % de los azúcares neutros presentes en la pared de hojas de *Arabidopsis* (Reiter y col, 1997), y los polisacáridos que poseen este azúcar en mayor

cantidad son los mananos, de esqueleto β -(1→4) manosa, glucomananos, con glucosa y manosa en el esqueleto, y galactomananos con residuos de galactosa α -(1→6) unidos a manosa. La síntesis de este último polisacárido podría ser la consecuencia del transporte conjunto de UDP-glucosa y GDP-manosa, debido a la carencia de transportadores AtUTr2 o 7.

Hasta el momento, no se ha probado la existencia de galactomananos en *Arabidopsis*, pero tampoco se ha determinado que no existan. Se sabe que al igual que los mananos, encontrados en semillas de mono y dicotiledóneas, funcionan como polisacárido de almacenaje, encontrándose en el endosperma de muchas semillas leguminosas (Buckeridge y col, 2000). Quizás existan otras funciones desconocidas para galactomananos u otros polisacáridos en los que se encuentre manosa y galactosa en las hojas de *Arabidopsis* y sea ésta la razón del porque ambos azúcares aumentan su contenido en la pared celular al sobreexpresar TNAs como los analizados en este trabajo.

Otras opciones para explicar el aumento del contenido de manosa sería que mediante epimerasas y otras enzimas una parte de la galactosa se convierta en manosa. Es posible llegar desde D-galactosa a GDP-D-galactosa y luego por varias reacciones a GDP-D-manosa (Reiter y Vanzin, 2001), sin embargo, este es un camino largo y complejo, que no ocurre al interior del Golgi. Otra vía es el uso de una reacción directa mediante la cual GDP-D-manosa es convertida en GDP-L-galactosa y viceversa mediante una GDP-D-manosa-3,5-epimerasa (Reiter y Vanzin, 2001). Se ha visto que la GDP-L-galactosa puede ser usada por las glicosiltransferasas, y que en oligosacáridos de xiloglucano de la mutante *mur1* de *Arabidopsis* L-galactosa reemplaza a L-fucosa (Zablackis y col, 1996). Sin embargo es D-galactosa y no L-galactosa la que compone mayormente la pared celular, por lo que no podría

conseguirse gran aumento de manosa y galactosa por esta vía, por lo menos en *Arabidopsis*.

De este modo, lo único que se puede decir con certeza es que un cambio en la expresión de los TNAs utilizados en este trabajo produce un cambio en la composición de la pared celular, sin estar claro aún el mecanismo por el cual ocurre este fenómeno.

Finalmente, cabe decir que aunque los resultados de este trabajo no son totalmente concluyentes, se puede hipotetizar que un fenómeno de silenciamiento génico podría estar ocurriendo al sobreexpresar los transportadores AtUTr_n de *Arabidopsis* en esta misma planta. Para poder corroborar esto se necesitaría medir la expresión del gen endógeno de cada transportador, así como medir la acumulación de la proteína endógena utilizando anticuerpos específicos para cada transportador, de los cuales ya se ha elaborado un anticuerpo anti-AtUTr1 (Reyes y col, 2006). Además, sería necesario ver que está ocurriendo con la incorporación de otros azúcares en el Golgi y retículo como UDP-glucosa y GDP-manosa. Y analizar un mayor número de líneas transgénicas, para obtener conclusiones mejor fundadas.

Sin embargo, debido a los antecedentes encontrados en tabaco y a lo observado en el análisis fenotípico de las plantas transgénicas de *Arabidopsis*, se puede concluir que tal como se ha pensado, los transportadores de nucleótidos azúcar serían los encargados de transportar los nucleótidos azúcar hacia el interior del aparato de Golgi, y que este evento estaría regulando de cierta forma la incorporación de azúcares a los componentes de pared celular.

CONCLUSIONES

1. La expresión transiente de los transportadores AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7 fusionados a Myc.His en *Nicotiana tabaco*:
 - Produce una acumulación de las proteínas transportadoras en fracción microsomal de plantas transformadas.
 - Produce un aumento en la incorporación de UDP-azúcares en fracciones microsomales de plantas transformadas.
2. Las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* para los transportadores AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7:
 - Muestran sobreexpresión del transgen dependiente de las condiciones de crecimiento.
 - Presentan disminución en la incorporación de UDP-galactosa respecto a la planta silvestre.
 - Podrían presentar un evento de silenciamiento génico debido a la sobreexpresión.
3. Las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* para los transportadores AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr7, en su fenotipo respecto a las plantas silvestres:
 - Muestran raíces más cortas.
 - No presentan variaciones en el largo de su hipocotilo.
 - No presentan variaciones en el contenido de celulosa ni ácidos urónicos.
 - No presentan variaciones significativas en el contenido de los azúcares glucosa, ramnosa, fucosa, arabinosa y xilosa.
 - Poseen un contenido mayor de los azúcares galactosa y manosa.

BIBLIOGRAFÍA

- Albersheim P, Nevins DJ, English PD, Karr A. (1967). A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr Res* **5**: 340–345.
- Baldwin TC, Handford MG, Yuseff MI, Orellana A, Dupree P. (2001). Identification and characterization of GONST1, a Golgi-localized GDP-mannose transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 2283-95.
- Bassham DC, Raikhel NV. (2000). Plant cells are not just green yeast. *Plant Physiol* **122**: 999-1001.
- Bastías R. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* como sistema heterólogo para el estudio de potenciales transportadores de GDP-fucosa de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Berninsone P, Hwang H-Y, Zemtseva I, Horvitz HR, Hirschberg C. (2001). SQV-7, a protein involved in *Caenorhabditis elegans* epithelial invagination and early embryogenesis, transports UDP-glucuronic acid, UDP-N-acetylgalactosamine, and UDP-galactose. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(7): 3738-43.
- Bollag DM, Edelman SJ. (1991). *Protein Methods*. Wiley-Liss, New York.
- Buckeridge MS, Dos Santos HP, Tiné MAS. (2000). Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiol Biochem* **38**(1/2): 141-156.
- Capasso J, Hirschberg C. (1984). Effect of nucleotides on translocation of sugar nucleotides and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate into Golgi apparatus vesicles. *Biochim Biophys Acta* **777**: 133-139.
- Carpita N, Gibeaut DM. (1993). Structural models of primary cells walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the wall during growth. *Plant J* **3**(1): 1-30.
- Carpita N, McCann M. (2002). The Cell Wall. En: Buchanan B, Gruissem W, Jones R, eds. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Primera Edición. Capítulo **2**: 52-108. John Wiley & Sons.
- Chen H, Nelson RS, Sherwood JL. (1994). Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection. *Biotechniques* **16**(4):664-8, 670.

Clough SJ, Bent AF. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**(6): 735–743.

Dhugga KS, Tiwari SC, Ray PM. (1997). A reversibly glycosylated polypeptide (RGP1) possibly involved in plant cell wall synthesis: Purification, gene cloning, and trans-Golgi localization. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 7679-7684.

Dhugga KS, Barreiro R, Whitten B, Stecca K, Hazebroek J, Randhawa GS, Dolan M, Kinney AJ, Tomes D, Nichols S, Anderson P. (2004). Guar Seed β -Mannan Synthase Is a Member of the Cellulose Synthase Super Gene Family. *Science* **303**: 363-366.

Dische Z. (1964). *Methods Carbohydr Chem.* **1**: 478-481.

Faik A, Bar-Peled M, De Rocher AE, Zeng W, Perrin RM, Wilkerson C, Raikhel NV, Keegstra K. (2000). Biochemical characterization and molecular cloning of an α -1,2-fucosyltransferase that catalyzes the last step of cell wall xyloglucan biosynthesis in pea. *J Biol Chem* **275**(20): 15082-89.

Faik A, Price NJ, Raikhel NV, Keegstra K. (2002). An *Arabidopsis* gene encoding an α -xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(11): 7797-802.

Filisetti-Cozzi TM, Carpita NC. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal Biochem* **197**: 157-162.

Gibeaut DM. (2000). Nucleotide-sugars and glycosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides. *Plant Physiol Biochem* **38**(1/2): 69-80.

Handford M, Rodríguez C, Gómez D, Segura M, Marchant L, Orellana A. (2005). Análisis y caracterización funcional de un mutante insercional de AtUTr7, un transportador de UDP azúcares localizado en el aparato de Golgi de *Arabidopsis thaliana*. XIX Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. 16-20 Octubre 2005. Gran Hotel Pucón, Pucón, Chile. Pág 20.

Hirschberg C, Robbins P, Abeijon C. (1998). Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem* **67**: 49-69.

Hodges TK, Leonard RT. (1974). Purification of a plasma membrane-bound adenosine triphosphatase from plant roots. *Methods Enzymol* **32**(Part B): 392-406.

Inoue H, Nojima H, Okayama H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.

Kato N, Pontier D, Lam E. (2002). Spectral profiling for the simultaneous observation of four distinct fluorescent proteins and detection of protein-protein interaction via

fluorescence resonance energy transfer in tobacco leaf nuclei. *Plant Physiol* **129**: 931-942.

Lerouxel O, Choo TS, Séveno M, Usadel B, Faye L, Lerouge P, Pauly M. (2002). Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. *Plant Physiol* **130**: 1754-63.

Madson M, Dunand C, Li X, Verma R, Vanzin G, Caplan J, Shoue D, Carpita N, Reiter WD. (2003). The MUR3 gene of *Arabidopsis* encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionary related to animal exostosins. *Plant Cell* **15**: 1662-70.

Marchant L. (2004). Participación in vivo de los transportadores de nucleótidos azúcar de aparato de Golgi en la biosíntesis de hemicelulosas y pectinas de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Matzke MA, Matzke AJM. (2004). Planting the Seeds of a New Paradigm. *PLoS Biol* **2**(5): 0582-0586.

Muñoz P, Norambuena L, Orellana A. (1996). Evidence for a UDP-Glucose Transporter in Golgi Apparatus-Derived Vesicles from Pea and Its Possible Role in Polysaccharide Biosynthesis. *Plant Physiol* **112**: 1585-94.

Napoli C, Lemieux C, and Jorgensen R. (1990). Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell* **2**: 279-289.

Neckelmann G, Orellana A. (1998). Metabolism of Uridine 5'-Diphosphate-glucose in Golgi vesicles from pea stems. *Plant Physiol* **117**: 1007-14.

Norambuena L. (2004). Transporte de UDP-galactosa en el aparato de Golgi de células vegetales. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

Norambuena L, Marchant L, Berninsone P, Hirshberg C, Silva H, Orellana A. (2002). Transport of UDP-galactose in plants: Identification and functional characterization of AtUTr1, an *Arabidopsis thaliana* UDP-galactose/UDP-glucose transporter. *J Biol Chem* **277**(36): 32923-29.

Norambuena L, Nilo R, Handford M, Reyes F, Marchant L, Meisel L, Orellana A. (2005). AtUTr2 is an *Arabidopsis thaliana* nucleotide sugar transporter located in the Golgi apparatus capable of transporting UDP-galactose. *Planta* **222**: 521-529.

Órdenes VR, Reyes FC, Wolff D, Orellana A. (2002). A thapsigargin-sensitive Ca^{2+} pump is present in the pea Golgi apparatus membrane. *Plant Physiol* **129**:1820-28.

Perrin RM, De Rocher A, Bar-Peled M, Zeng W, Norambuena L, Orellana A, Raikhel N, Keegstra K. (1999). Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. *Science* **284**: 1976-79.

Reiter WD, Chapple, Somerville CR. (1997). Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. *Plant J* **12**(2): 335-345.

Reiter WD, Vanzin G. (2001). Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. *Plant Mol Biol* **47**: 95-113.

Reyes F, Marchant L, Norambuena L, Nilo R, Silva H, Orellana A. (2006). AtUTr1, a UDP-glucose/UDP-galactose transporter from *Arabidopsis thaliana*, is located in the endoplasmic reticulum and up-regulated by the unfolded protein response. *J Biol Chem* **281**(14): 9145-51.

Richmond T, Somerville C. (2001). Integrative approaches to determining Csl function. *Plant Mol Biol* **47**: 131-143.

Schauer S, Jacobsen S, Meinke D, Ray A. (2002). DICER-LIKE1: Blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci* **7**(11):487-491.

Segura M. (2003). Expresión y caracterización del transportador AtSQV7 de *Arabidopsis thaliana*, homólogo al gen SQV-7 de *Caenorhabditis elegans*. Tesis de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Sterling J, Quigley H, Orellana A, Mohnen D. (2001). The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme α -1,4-galacturonosyltransferase is located in the lumen of the Golgi. *Plant Physiol* **127**: 360-371.

Tobin EM, Silverthorne J. (1985). Light regulation of gene expression in higher plants. *Annu Rev. Plant Physiol* **36**: 569-593.

Updegraff DM. (1969). Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal Biochem* **32**: 420-424.

Vanzin GF, Madson M, Carpita NC, Raikhel NV, Keegstra K, Reiter WD. (2002). The *mur2* mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** (5): 3340-45.

Wulff C, Norambuena L, Orellana A. (2000). GDP-Fucose uptake into the Golgi apparatus during xyloglucan biosynthesis requires the activity of a transporter like protein other than the UDP-glucose transporter. *Plant Physiol* **122**: 867-877.

York W, Darvill A, Albersheim P. (1984). Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan oligosaccharide. *Plant Physiol* **75**: 295-297.

Zabackis E, York WS, Pauly M, Hantus S, Reiter SD, Chapple CCS, Albersheim P, Darvill A. (1996). Substitution of L-fucose by L-galactose in cell walls of *Arabidopsis mur1*. *Science* **272**: 1808-10.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo de tesis ha sido financiado por:

- Proyecto FONDECYT regular # 1030551
- Núcleo Milenio en Biología Celular Vegetal PCB-MN ICM P02-009-F