

UCH FC  
Biotecnología  
M671  
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**Desarrollo de herramientas para el estudio del rol de  
GONST3, un transportador de nucleótidos-azúcar de  
*Arabidopsis thaliana*.**



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

**José Patricio Miranda Marín**

2009

Santiago, Chile

Director del Seminario de Título: **Dr. Michael Handford**



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

### “Desarrollo de herramientas para el estudio del rol de GONST3, un transportador de nucleótidos-azúcar de *Arabidopsis thaliana*”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

**JOSÉ PATRICIO MIRANDA MARÍN**

Dr. Michael Handford  
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de Michael Handford sobre una línea horizontal.

#### Comisión de Evaluación

Dra. Victoria Guixé  
Presidenta Comisión

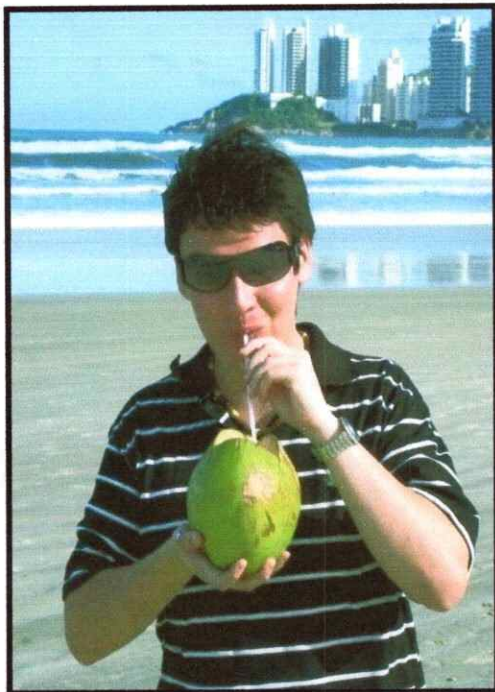
Firma manuscrita en azul de Victoria Guixé sobre una línea horizontal.



Dra. Lorena Norambuena  
Evaluadora

Firma manuscrita en azul de Lorena Norambuena sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Agosto de 2009



Nací en la comuna de Rengo un 7 de julio de 1983. Realicé mi enseñanza pre-básica en la escuela D-186, donde, unas tías con mucha paciencia, supieron lidiar con mi niñez carente de ritualín. No era un niño malo, pero por alguna extraña razón, todo lo que tocaba, o incluso sólo miraba, terminaba destruido.

Luego realicé mi enseñanza básica en el Centro Educacional Asunción, y con el tiempo fui madurando. Ya no rompía las cosas, y siendo muy joven empezó mi inquietud científica. Aún recuerdo cuando, en compañía de mi vecino, el Camilo Soto, metimos un gato a la lavadora, pero nos descubrió la nana y nos retó. Luego nos llevamos el gato, lo agarre por la cola y lo lance a más de 10 metros hacia arriba para ver si era verdad que caían de pie, total como tienen 7 vidas, a lo más perdía una. Efectivamente cayó de pie, corroborando la hipótesis, pero le costó caminar después de eso.

Después, fui un amante de la religión católica, al punto que un día de verano, nos regalaron un Nuevo Testamento evangélico, lo cual fue una herejía para mí, así que lo quemamos en la chimenea. Nuevamente nos descubrió la nana, nuevamente reto. Luego fue el tiempo de la pandilla de la población y aun recuerdo el fortín de piedra que armamos, desde ahí nos escondíamos y le tirábamos piedras a todos los que no fueran de la población y querían acercarse a jugar.

Mi enseñanza media la realicé en el mismo colegio, ahí fui el ñoño fome con las mejores notas, pero eso fue sólo hasta segundo medio, cuando me transformé en el ñoño sociable que trasciende hasta hoy. Me encantaba capear clases, así que estuve en las academias de periodismo, coro, teatro, folclor, y, aunque suene raro, hasta intente en futbol y basquetbol. En el colegio conocí a las grandes amigas de la vida, entre ellas, la Carolina Pardo, la Paulina Aliaga y la Talía González, con quienes pasamos momentos memorables y censurables.

La gran influencia hacia la ciencia vino por las enseñanzas de mis abuelos, cuando nos sentábamos de noche en el campo a contar satélites. Al principio pensé estudiar medicina, pero ya en primero medio me decidí por estudiar Biotecnología, lo cual claramente logré. Luego de una larga estadía en la carrera, hoy termino ese proceso, donde también conocí a grandes amigos como el Andrés Lagos, la Claudia Huerta, la Lore Pizarro y muchos más (perdón por no nombrarlos a todos). En el futuro, espero seguir por el camino de la Biología Vegetal, aplicando las enseñanzas adquiridas en el laboratorio y aprendiendo aún más.



## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer, primero que todo, a quienes hicieron posible que siguiera los estudios universitarios, mis padres, gracias por el gran esfuerzo que han hecho.

A mi familia, el Carlos, la Naty, la Irene, la Javi y mi abuelo, por su apoyo incondicional.

En tercer lugar, agradecer a mis amigas de la vida, la Talu, Parduqui, la Pauli Aliaga, Tunish, Carola Albornoz, por los grandes momentos que hemos compartido juntos.

Al Andrés, Lore, Mati, Claudia, Oriana, Giss, Yu, Marito Leiva, Kuri, Jorge Vera, Cinthia, Nallat y Vale por todas esas conversaciones ñoñas y ebrias; al Nelson, por su amistad, compañía y grandes consejos; a la Mariela, Pauli Fuentes, Juan-K, Guille, Pato Mandujano, Pato Pérez, Sofi, Carlos Flores, Lelo, Isa, Mariela, Ale y Carlos Rubilar, por hacer del laboratorio un agradable y alegre lugar de trabajo diario.

A la Barbarilla y Pamelilla por esas idas a la piojera y geniales momentos vividos.

A mi tutor, Michael Handford por apoyo y sus consejos, tanto en la vida diaria como en la vida científica; por introducirme al camino de la Biología Vegetal, en el cual deseo seguir avanzando.

A Claudia Stange, Ange y Lorena Norambuena por todas sus enseñanzas.

A mis amigos del Oasis, especialmente a Mark y Ely Jackson, Noemi, Andrew y Katy Mosby, Lukas Fortunato, Ely Wiener, Gianfranco, Carla Ossa, Karina y Nicole.

Y a quien siempre me cuida desde el cielo, mi abuelita, mi mami Inés...

*“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir”*

**Albert Einstein**



*A mis padres...*



## ÍNDICE DE CONTENIDOS



Reseña Biográfica.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de Tablas.....	vii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Abreviaturas.....	xi
Resumen.....	xiii
Abstract.....	xv
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 La Pared Celular y su Importancia.....	1
1.2 Composición y Síntesis de La Pared Celular.....	1
1.3 Necesidad de Transportadores de Nucleótidos-Azúcar.....	4
1.4 Identificación de la Familia de TNAs GONST.....	6
1.5 Herramientas para la Caracterización Génica.....	7
1.6 Propósito del Seminario de Título.....	8
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>10</b>
2.1 Objetivo General.....	10
2.2 Objetivos Específicos.....	10
2.2.1 Disminuir los Niveles de Expresión de GONST3.....	10
2.2.2 Aumentar los Niveles de Expresión de GONST3.....	10
<b>3. Materiales y Métodos.....</b>	<b>11</b>
3.1 Material Biológico.....	11
3.1.1 Crecimiento bacteriano.....	11
3.1.1.1 Obtención de <i>E. coli</i> químicamente competente.....	11
3.1.1.2 Transformación de <i>E. coli</i> por golpe térmico.....	12
3.1.1.3 Obtención de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> químicamente competente.....	12
3.1.1.4 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por golpe frío.....	12
3.1.2 Crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Nicotiana tabacum</i> .....	13
3.1.3.1 Transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	14
3.1.3.2 Transformación transitoria de hojas de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	15
3.2 Extracción de ADN.....	15
3.2.1 Extracción de ADN plasmidial.....	15
3.2.2 Extracción de ADN desde plantas.....	15
3.3 Extracción de ARN de plantas.....	16
3.4 Diseño de partidores.....	17
3.5 Reacción de RT.....	18
3.6 Reacciones de PCR.....	18
3.7 Análisis de ADN o ARN mediante gel de agarosa.....	20
3.8 Técnicas de Biología Molecular.....	20
3.8.1 Vectores utilizados.....	20
3.8.1.1 pHELLSGATE12-GONST3-RNAi (G3-RNAi).....	20
3.8.1.2 pGWB8-GONST3-His (G3-His) y	



pGWB5-GONST3-GFP (G3-GFP).....	21
3.8.2. Construcción y verificación de pCR8-G3.....	21
3.8.3. Construcción y verificación de G3-His y G3-GFP.....	23
<b>4. Resultados</b> .....	<b>25</b>
4.1 Disminución de los niveles de expresión de GONST3.....	25
4.2 Aumento de los niveles de expresión de GONST3.....	28
4.2.1 Obtención de la construcción de entrada PCR8-GONST3.....	28
4.2.2 Obtención de la construcción pGWB8-GONST3-His.....	30
4.2.3 Obtención de la construcción pGWB8-GONST3-GFP.....	37
<b>5. Discusión</b> .....	<b>44</b>
<b>6. Conclusión</b> .....	<b>53</b>
<b>7. Proyecciones</b> .....	<b>54</b>
<b>8. Bibliografía</b> .....	<b>55</b>

## LISTA DE TABLAS



Tabla I. Partidores utilizados en este seminario de título.....	17
Tabla II. Programa utilizado para retrotranscripción del ARN.....	18
Tabla III. Programas de PCR utilizados en el seminario de título.....	19
Tabla IV. Tasa de transformación para <i>Arabidopsis</i> transformada con G3-His.....	33
Tabla V. Tasa de transformación para <i>Arabidopsis</i> transformada con G3-GFP.....	40





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la Pared Celular.....	3
Figura 2. Modelos para la síntesis de polisacáridos no celulósicos en el aparato de Golgi vegetal.....	5
Figura 3. Cultivos hidropónicos utilizados en el seminario de título.....	14
Figura 4. Esquema que representa la clonación de GONST3 en pGWB5 y pGWB8.....	22
Figura 5. Esquema de las construcciones de ADN utilizadas.....	24
Figura 6. Análisis de la funcionalidad de la construcción de ADN pHELLSGATE12-GONST3-RNAi.....	26
Figura 7. Amplificación del marco de lectura abierto de GONST3 con Pfu ADN polimerasa.....	28
Figura 8. Digestión enzimática de la construcción de ADN pCR8-GONST3 de las colonias 1, 2 y 3.....	30
Figura 9. Análisis por PCR de colonias de <i>E. coli</i> transformadas con pGWB8-GONST3-His .....	31
Figura 10. Digestión enzimática de la construcción de ADN pGWB8-GONST3-His.....	31
Figura 11. Análisis de la funcionalidad de la construcción de ADN pGWB8-GONST3-His.....	32
Figura 12. Transformación estable de <i>Arabidopsis</i> con el vector pGWB8-GONST3-His.....	33
Figura 13. Análisis de transformantes G3-His.....	34
Figura 14. GONST3-His es transcrito en <i>Arabidopsis</i> transformada con G3-His.....	35
Figura 15. Semicuantificación de la abundancia relativa de ARNm de GONST3 en transformantes G3-His.....	36
Figura 16. Digestión enzimática de la construcción de ADN pGWB5-GONST3-GFP.....	38
Figura 17. Análisis de la funcionalidad de la construcción de ADN pGWB5-GONST3-GFP.....	38
Figura 18. Transformación estable de <i>Arabidopsis</i> con el vector pGWB5-GONST3-GFP.....	40

Figura 19. Semicuantificación de la abundancia relativa de ARNm de *GONST3* en transformantes G3-GFP..... 42

Figura 20. Análisis de la Presencia de Dominios Diacídicos en 4 TNAs de la Familia *GONST*..... 50

Figura 21. Análisis de la estabilidad del ARNm de *GONST3*, *GONST3-His* y *GONST3-GFP*..... 52



## LISTA DE ABREVIATURAS

ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
°C	Grado Centígrado
DEPC	DiEtil Piro Carbonato
dNTP	Desoxiribonucleótido Tri-fosfato
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
GAPA	Gliceraldehido 3-fosfato Dehidrogenasa Subunidad A
GFP	<i>Green Fluorescent Protéin</i> (Proteína Fluorescente Verde)
GONST	Transportador de Nucleótido-Azúcar del Aparato de Golgi
His	Histidina
kb	Kilobase
kcal	Kilocaloría
LB	Medio Luria Bertani
M	Molar
µg	Micro Gramo
µl	Micro Litro
µM	Micro Molar
mM	Mili Molar
MS	Medio Murashigue & Skoog
nm	Nanometro
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Marco de Lectura Abierto)
pb	Par de Bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

<b>RNAi</b>	ARN de Interferencia
<b>RT</b>	Transcriptasa Reversa
<b>RT-PCR</b>	Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>SGPT</b>	Silenciamiento Génico Post-Transcripcional
<b>TAE</b>	Tris-acetato EDTA
<b>TNA</b>	Transportador de Nucleótido-Azúcar

## RESUMEN

Para el metabolismo de azúcares en el interior del aparato de Golgi en plantas, se requiere la activación de ellos mediante la unión de nucleótidos, formando UDP- o GDP-azúcares. La mayoría son sintetizados en el citosol y dado su impedimento para ingresar en forma directa al lumen del aparato de Golgi, se hace necesaria la presencia de transportadores específicos en su membrana. En *Arabidopsis thaliana*, se describió una familia de transportadores denominados GONST1-5 (Golgi-localised Nucleotide Sugar Transporter), de los cuales se sabe que GONST1 transporta GDP-manosa. Sin embargo, el papel funcional del resto de la familia de transportadores es desconocido, por lo que en el presente trabajo, se desarrolló herramientas que permitirán la caracterización de GONST3.

Para esto, se propusieron 2 estrategias: la disminución de los niveles de expresión mediante RNAi, y el aumento de los niveles de expresión. Para disminuir los niveles de expresión, a pesar de que se confirmó la funcionalidad de la construcción de ADN pHELLSGATE12-GONST3-RNAi en tabaco, al transformar plantas de *Arabidopsis* de forma estable con esta construcción, no se obtuvo transformantes. Para la sobreexpresión se realizaron las construcciones de ADN pGWB8-GONST3-His y pGWB5-GONST3-GFP, que genera una proteína de fusión entre GONST3 y una cola de 6 histidinas o la proteína fluorescente verde en el extremo C-terminal, respectivamente. Se confirmó la funcionalidad de ambas mediante la transformación transitoria de tabaco. Luego, y de forma independiente, se transformaron *Arabidopsis* establemente con estas construcciones. Se determinó, mediante RT-PCR semicuantitativa, que líneas transformadas con pGWB8-GONST3-His, poseen entre un

44 a un 184% mayor niveles de expresión de *GONST3* respecto de una línea silvestre. Sin embargo, la inhabilidad de detectar la acumulación de GONST3-His proteína en las transformantes sugiere que este transportador no tolera fusiones en el extremo C-terminal. Al transformar *Arabidopsis* con pGWB5-GONST3-GFP, se gatilló silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT) mediante co-supresión, obteniendo un rango de 16 a 80% de acumulación de transcritos de *GONST3* en 5 líneas independientes respecto a una línea silvestre. Estas líneas, donde se gatilló SGPT, representan un importante avance en el estudio de este *GONST3*, dado que representan la única forma descrita en que se ha logrado disminuir los niveles de expresión de este TNA, por lo que seguirán siendo analizadas para contribuir a la caracterización de *GONST3*.

## ABSTRACT

For the metabolism of sugars in the Golgi apparatus in plants, these substrates are activated by the addition of a nucleotide, forming UDP- or GDP-sugars. Most are synthesized in the cytosol and because of their inability to enter directly into the lumen of the Golgi, the presence of specific membrane transporters is necessary. In *Arabidopsis thaliana*, a family of transporters was described, called GONST1-5 (Golgi-localised Nucleotide Sugar Transporter), of which GONST1 is known to transport GDP-mannose. However, the functional role of the remaining members is unknown and so in this work tools have been developed that will allow the characterisation of GONST3.

Two strategies were proposed: to decrease the expression levels by RNAi, and to increase the expression levels. To reduce the expression levels, even though the pHELLSGATE-GONST3-RNAi construct was shown to function in tobacco plants, when *Arabidopsis* plants were stably transformed with this vector, no transformants were obtained. pGWB8-His-GONST3 and pGWB5-GONST3-GFP, which generate C-terminal fusion proteins between GONST3 and a 6-histidine tag or green fluorescent protein, respectively, were constructed in order to overexpress GONST3. The functionality of both vectors was confirmed using tobacco, and subsequently *Arabidopsis* plants were independently and stably transformed with each vector. Using semi-quantitative RT-PCR, lines transformed with pGWB8-His-GONST3 have between 44 and 184% higher expression levels of *GONST3*, compared to a wild-type line. However, the inability to detect the GONST3-His fusion protein suggests that this transporter does not tolerate C-terminal fusions. On transforming *Arabidopsis* with pGWB5-GONST3-GFP, co-suppressive post-transcriptional gene silencing (PTGS) was



triggered, with 5 independent lines harbouring between 16 and 80% of *GONST3* transcript levels compared to wild-type plants. These PTGS-triggered lines represent a major advance in the study of *GONST3*, since they represent the only means thus far achieved to lower expression levels of this NST. Their analysis will help to characterize *GONST3*.

## **1. Introducción**

### **1.1 La Pared Celular y su Importancia**

La pared celular es un componente dinámico que rodea la célula vegetal, la cual juega un importante papel en la resistencia de la presión osmótica, contribuye a la rigidez de los organismos al cementar las células adyacentes y provee un medio poroso para la distribución y circulación de agua, minerales y pequeños nutrientes. Además juega un importante papel en la expansión celular y protección ante el ataque de patógenos, siendo una fuente de moléculas señales para el proceso de defensa contra ellos (Handford, 2006; Carpita *et al.*, 2001; Vorwerk *et al.*, 2004).

### **1.2 Composición y Síntesis de La Pared Celular**

La pared celular está compuesta principalmente por celulosa, glicoproteínas y polisacáridos no celulósicos: hemicelulosas y pectinas (Cosgrove, 2006). También son componentes importantes la lignina y otras proteínas (Figura 1).

La celulosa es un polímero lineal altamente insoluble de  $\beta$ -1,4-glucosa, con cada residuo de glucosa orientado en  $180^\circ$  respecto de los residuos contiguos, por lo que la unidad de repetición polimérica es la celobiosa (Brown *et al.*, 1996). Este polímero es sintetizado en la membrana plasmática de la célula vegetal por acción de las enzimas celulosa sintasa. Los polímeros de celulosa pueden estructurarse luego en microfibrillas, formadas por la unión de 30 a 36 cadenas de  $\beta$ -1,4-glucosa, las cuales se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals (Handford, 2006). La unión que se establece entre las microfibrillas de celulosa es la que determina principalmente la rigidez de la pared celular.

Por otro lado, los polisacáridos no celulósicos son sintetizados y/o modificados en el

lumen del aparato de Golgi (Reiter, 2002), de una forma soluble, y generalmente no forman fibrillas debido a la presencia de cadenas laterales u otras modificaciones como esterificaciones (Handford, 2006). Estos polisacáridos son capaces de interconectar las microfibrillas de celulosa al unirse de forma no covalente a ellas (Figura 1) y, además, estarían involucrados en el proceso de lignificación dado que tienen la capacidad de unirse a precursores que determinan la estructura de la lignina (Atalla, 1995).

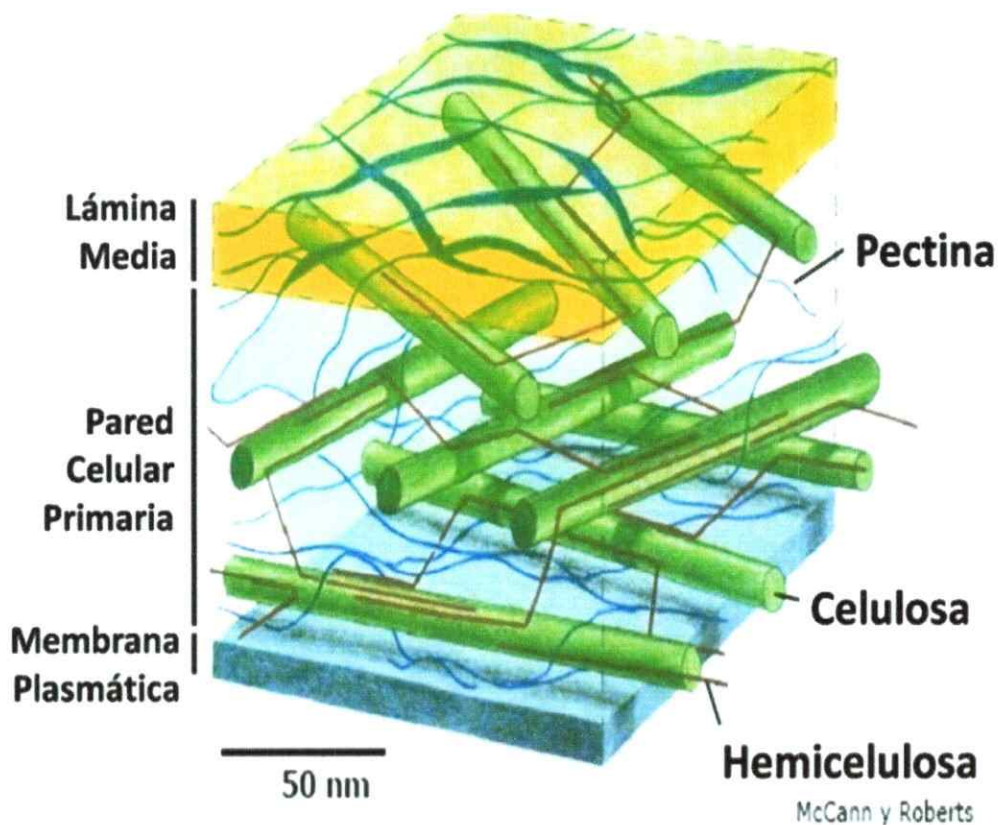
El polisacárido no celulósico más común en plantas dicotiledóneas es el xiloglucano (Perrin *et al.*, 2003), el cual comparte el mismo esqueleto de  $\beta$ -1,4-glucosa de la celulosa, pero aproximadamente el 75% de las unidades de glucosa posee unido D-xilosa, a las cuales se les puede unir además D-galactosa y/o L-fucosa.

Entre las pectinas se encuentra el homogalacturonano, el cual posee un esqueleto de  $\alpha$ -1,4-ácido-D-galacturónico o el ramnogalacturonano II (RGII), que corresponde al polisacárido más complejo de la naturaleza, debido a los más de 20 diferentes tipos de enlaces y 12 distintos azúcares que lo componen (Scheller *et al.*, 2007). Las pectinas son los polisacáridos que determinan la porosidad celular y además están involucradas en la adhesión entre las células (Carpita y McCann, 2000).

Entre las glicoproteínas se encuentran los N-glicanos, que poseen varias funciones en plantas, tales como protección de degradación proteolítica o inducir el correcto plegamiento de las proteínas (Lerouge *et al.*, 1998). Además se encuentran las proteínas arabinogalactano (AGP), que son glicoproteínas extracelulares compuestas en más de un 95% de carbohidratos y que están involucradas en el crecimiento y desarrollo de las plantas, y se piensa que estarían involucradas en muerte celular programada, interacciones moleculares y señalización celular (Showalter, 2001).

Las enzimas responsables de la elongación de las cadenas principales y

ramificaciones de los glicanos son llamadas glicosiltransferasas (Ross *et al.*, 2001; Handford, 2006). Estas enzimas requieren como sustrato azúcares activados por la presencia de un nucleótido (nucleótidos-azúcar), los cuales se pueden encontrar en la forma de UDP o GDP-azúcares (Hassid *et al.*, 1959). La mayoría de los nucleótidos-azúcar, incluyendo todos los GDP-azúcares como GDP-manosa, -fucosa, y L-galactosa son sintetizados en el citosol de la célula vegetal y solo algunos UDP-azúcares serían sintetizados en el aparato de Golgi (Seifert, 2004).



**Figura 1. Esquema de la Pared Celular.** En la figura se muestra la disposición de los polisacáridos que conforman la pared celular vegetal. Modificado de McCann y Roberts (1991).

Existen 3 modelos para la elongación y ramificación de polisacáridos no celulósicos en el lumen del aparato de Golgi (Figura 2). Un modelo incluye la presencia de una glicosiltransferasa tipo celulosa sintasa (CSL) con múltiples pasos de transmembrana

(Figura 2.A). Este modelo da cuenta de la formación de  $\beta$ -1,4-glicanos, pero no es conocido si el nucleótido-azúcar requerido debe estar en el lumen del aparato de Golgi o en el citosol celular.

Un segundo modelo (Figura 2.B), da cuenta de la adición de azúcares a la cadena principal, mediado por una glicosiltransferasa tipo II anclada a la membrana interna del Golgi, y para la validación de este modelo se requiere que los nucleótido-azúcares ingresen al lumen del Golgi desde el citosol, lugar donde son sintetizados. Este modelo también incluye la presencia de enzimas interconvertidoras en el lumen del Golgi, que podrían modificar algunos UDP-azúcares en el lumen del organelo.

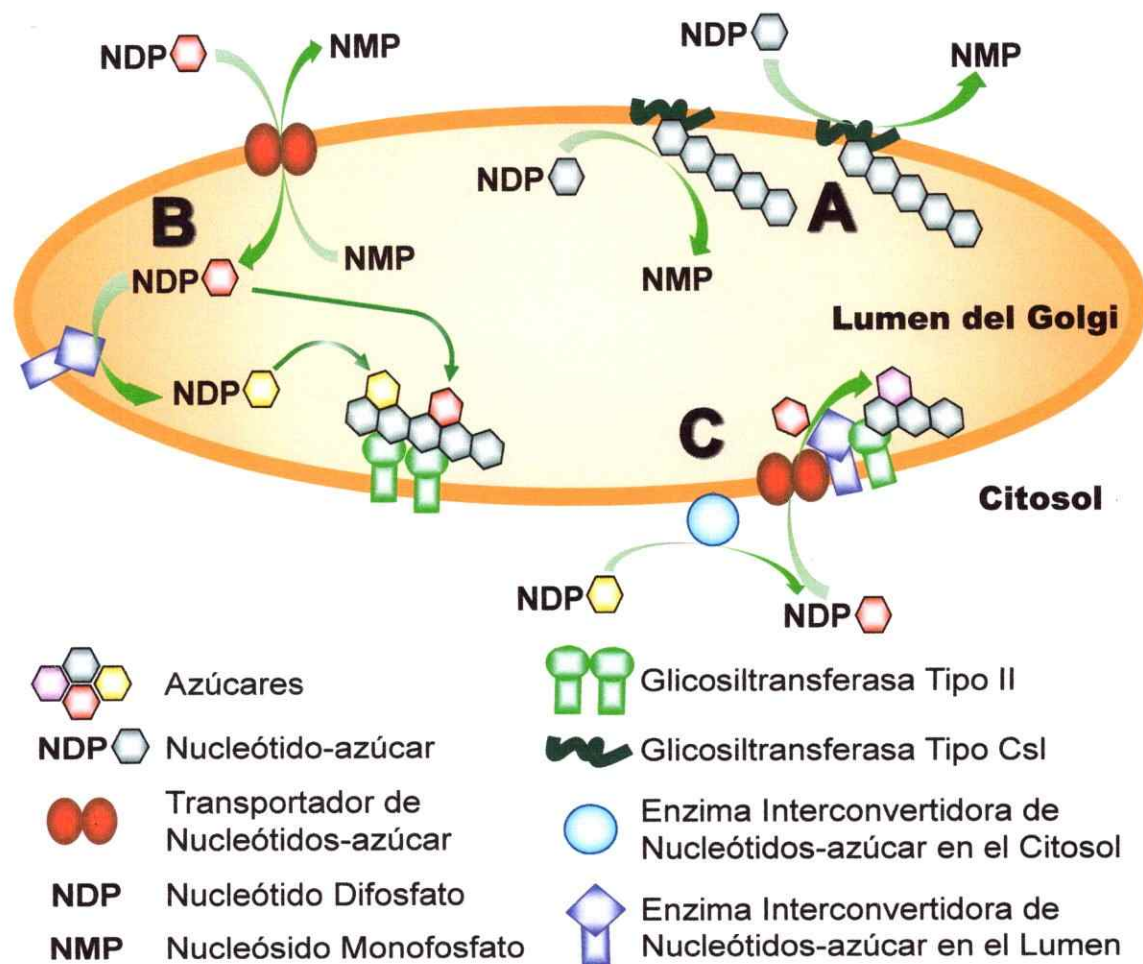
El tercer modelo (Figura 2.C), es una modificación del modelo anterior e implica la existencia hipotética de un complejo multiprotéico capaz de ingresar al lumen del Golgi los nucleótido-azúcares y añadirlos a la cadena principal del glicano, lo cual significa una forma más eficiente del modelo 2.B.

### **1.3 Necesidad de Transportadores de Nucleótidos-Azúcar**

Debido a que el importe directo de los nucleótidos-azúcares citosólicos hacia el lumen del Golgi a través de la bicapa lipídica se ve altamente impedido, dado su gran tamaño y perfil hidrofóbico, se han descrito transportadores de nucleótidos-azúcar (TNAs) (Gibeaut, 2000). Los TNAs son proteínas muy hidrofóbicas compuestas de 320 a 400 residuos aminoacídicos, que poseen de 6 a 10 pasos transmembrana y al parecer se asocian como homodímeros (Csala *et al.*, 2007; Caffaro *et al.*, 2006). Su función es la de contratransportadores, dado que permiten el ingreso de los nucleótidos-azúcar hacia el lumen del Golgi a cambio de la salida del correspondiente nucleósido monofostato (Csala *et al.*, 2007). Mutantes en los genes que codifican para los TNAs generan diferentes fenotipos en el desarrollo, los cuales han sido descritos en

organismos como *Caenorhabditis elegans* (Höflich *et al.*, 2004), en levaduras (Abeijon *et al.*, 1996), *Leishmania donovani* (Hong *et al.*, 1999), *Drosophila melanogaster* (Selva *et al.*, 2001) y en humanos (Helmus *et al.*, 2006).

Hasta el momento, en la planta modelo, *Arabidopsis thaliana*, se han descrito por análisis bioinformático unos 10 a 15 transportadores de nucleótidos-azúcar (Reyes y Orellana, 2008), y sólo algunos de ellos han sido caracterizados, incluyendo AtUTr1, que transporta UDP-D-galactosa y UDP-D-glucosa (Norambuena *et al.*, 2002).



**Figura 2. Modelos para la síntesis de polisacáridos no celulósicos en el aparato de Golgi vegetal.** A. Modelo que da cuenta de la síntesis de glicanos lineales con enlace  $\beta$ 1-4. B. Modelo que da cuenta de los azúcares accesorios a la cadena principal de glicanos. C. Modelo que indica la presencia de un complejo multiprotéico, una forma más eficiente del modelo 2.B. Explicado en detalle en el texto. Modificado de Handford, 2006.

#### 1.4 Identificación de la Familia de TNAs GONST

Entre los TNAs descritos en *Arabidopsis*, se identificó GONST1 por genética reversa. Para ello se consideró que la proteína VRG4p de *Saccharomyces cerevisiae* transportaba GDP-D-manosa (Dean *et al.*, 1997) y que GONST1 posee un 25% de identidad a nivel aminoacídico con VRG4p. Cuando se expresó GONST1 en *vrg4* mutante, se complementó su deficiencia de transporte de GDP-D-manosa, lo cual indica que este sería el sustrato de GONST1 (Baldwin *et al.*, 2001).

En base a análisis bioinformático y tomando la secuencia aminoacídica de GONST1 como base, se describió posteriormente una familia de estos transportadores, denominada GONST (Golgi-localised Nucleotide-Sugar Transporters), la cual está compuesta por 5 miembros, GONST1-5 (Handford *et al.*, 2004). Todos estos transportadores comparten el conservado dominio de unión a GDP cercano a su extremo carboxilo terminal GX(LV)NK (Gao *et al.*, 2001), además de poseer un tamaño molecular similar.

Como se indicó, GONST1 transporta GDP-D-manosa y el hecho que GONST1 posea un 60,9% de identidad a nivel aminoacídico con GONST2, sugiere que este último también transportaría GDP-D-manosa. Por otro lado, GONST3 y GONST4 poseen entre ellos un 35% de identidad a nivel aminoacídico y se postula que ambos serían transportadores de GDP-L-fucosa, dada su homología con TNAs descritos en otros organismos (Adams *et al.*, 2000; Lübke *et al.*, 2001; Lühn *et al.*, 2004). Además, dada la necesidad de transportar GDP-L-galactosa para la decoración de RGII y considerando que GDP-L-fucosa posee una estructura muy similar a GDP-L-galactosa, ambos TNAs también podrían internalizar este nucleótido azúcar (demostrado para GONST4 en el laboratorio del Dr. Handford). GONST5 es el miembro más alejado de la



familia y alineamientos múltiples con secuencias aminoacídicas de TNAs caracterizados, sugieren que podría ser un transportador de UDP-galactosa (Bakker *et al.*, 2004).

En el laboratorio, estamos interesados en la caracterización de GONST3 y GONST4 y dado que se postula que ambos transportarían GDP-L-fucosa y/o GDP-L-galactosa, es importante tener en cuenta cuales son los glicoconjugados que poseen en sus ramificaciones estos nucleótidos-azúcar. Entre los glicoconjugados que poseen fucosa se encuentran el xiloglucano, el ramnogalacturonano II (RGII), las glicoproteínas N-glicanos y proteínas arabinogalactano (AGP). L-galactosa solo se encuentra en una ramificación del RGII.

### **1.5 Herramientas para la caracterización génica**

Entre las estrategias utilizadas para la caracterización de genes en plantas, se utiliza la ganancia, pérdida o disminución de función mediante la alteración de los niveles de expresión del gen de interés. La disminución de los niveles de expresión se puede lograr mediante silenciamiento génico transcripcional (SGT), es decir, a través de la supresión de la transcripción (inserciones de ADN) o activando un proceso de degradación de ARNs específicos, mediante silenciamiento génico post transcripcional (SGPT) o ARN de interferencia (RNAi) (Agrawal *et al.*, 2003). Cuando se gatilla SGPT/RNAi, moléculas de ARN de doble hebra son procesadas en pequeñas moléculas de 21 a 26 nucleótidos, denominadas ARN interferentes pequeños (siRNAs) o microARNs (miRNAs) (Baulcombe, 2004). Estas moléculas actúan como activadoras del proceso de silenciamiento génico y, como resultado, el ARNm blanco no se puede acumular en el citosol, a pesar de que si es detectable en el núcleo (Fagard y Vaucheret, 2000). La obtención de líneas de plantas transformantes con pérdida de

función o con menores niveles de expresión génica, en algunos casos, es acompañada de cambios fenotípicos en esta, por lo que al analizar la morfología de la planta se puede llegar a inferir el o los procesos en que estaría involucrado el gen que se estudia. Tal es el caso de la mutante de *Arabidopsis mur1*, la cual posee una mutación en el gen que codifica para una isoforma de la enzima GDP-D-manosa-4,6-dehidratasa, que cataliza el primer paso de la síntesis *de novo* de GDP-L-fucosa (Bonin *et al.*, 1997). Estas mutantes, poseen un fenotipo enano y sus tallos son más frágiles, comparado a plantas de *Arabidopsis silvestres* (Reiter *et al.*, 1993).

Por otro lado, el análisis de la expresión génica y el estudio de sus productos ha sido favorecido con la generación de fusiones génicas entre el gen blanco y reporteros que facilitan su estudio, entre los que se encuentran enzimas para analizar el patrón de expresión espacio-temporal ( $\beta$ -glucoronidasa), proteínas que permiten analizar la localización subcelular (por ejemplo, Proteína Fluorescente Verde, GFP), y epítomos que permiten la inmunodetección mediante western blot (por ejemplo, cola de poli histidina (His)) (Jefferson *et al.*, 1987; Nakagawa *et al.*, 2007).

### **1.6 Propósito del Seminario de Título**

Debido a que aun no se ha determinado la función bioquímica y fisiológica de GONST3, en el presente trabajo se desarrollarán herramientas que conduzcan a la caracterización funcional de este TNA en *Arabidopsis*, para lo cual se han elaborado dos estrategias: disminución de los niveles de expresión (RNAi), y aumento de los niveles de expresión.

Para la primera estrategia, se transformarán plantas de *Arabidopsis* con una construcción de ADN (pHELLSGATE12-GONST3-RNAi), que permite la transcripción de un ARN de interferencia (RNAi), el cual podrá disminuir los niveles de expresión de

GONST3 mediante SGPT.

Para la segunda estrategia, se generarán 2 construcciones de ADN para sobreexpresión. Una de ellas (GONST3-His), permitiría la acumulación de una proteína de fusión entre GONST3 y una cola C-terminal de 6 histidinas, con la cual se podrá determinar la localización subcelular de GONST3 mediante western blot. La otra construcción (GONST3-GFP), se espera que permita la acumulación de una proteína de fusión entre GONST3 y la proteína fluorescente verde (GFP), por lo que permitirá determinar la localización subcelular de GONST3 mediante microscopía fluorescente.

Con cada construcción de ADN para sobreexpresión de GONST3, se transformarán plantas de *Arabidopsis*, por lo que se podrá conocer *in vivo* la localización subcelular de este TNA mediante las 2 técnicas propuestas. Además, se podrán realizar ensayos de transporte, utilizando nucleótidos-azúcares marcados radioactivamente, para conocer la especificidad de sustrato de GONST3.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Construir y utilizar herramientas moleculares que permitan la caracterización funcional de GONST3, transportador de nucleótidos-azúcar de *Arabidopsis thaliana*.

### 2.2 Objetivos Específicos

#### 2.2.1 Disminuir los Niveles de Expresión de *GONST3*

Transformar *Arabidopsis* con una construcción de ADN para RNAi (pHELLSGATE12-GONST3-RNAi) y analizar los niveles de expresión de *GONST3* en las transformantes obtenidas.

#### 2.2.2 Aumentar los Niveles de Expresión de *GONST3*

- Generar las construcciones de sobreexpresión pGWB8-GONST3-His y pGWB5-GONST3-GFP
- Determinar la localización subcelular de GONST3-His y GONST3-GFP.
- Transformar *Arabidopsis* con pGWB8-GONST3-His y pGWB5-GONST3-GFP y semicuantificar los niveles de expresión de *GONST3* en los transformantes obtenidos.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 Material Biológico

##### 3.1.1 Crecimiento bacteriano

Las bacterias utilizadas fueron *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$  y *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101, las cuales fueron cultivadas a 37° y 28°C, respectivamente, con agitación en medio LB (1% triptona, 1% NaCl y 0,5% extracto de levadura), al cual se le agregaron los antibióticos de selección correspondientes. Para el crecimiento en medio sólido, se agregó 1,5% agar al medio LB.

Se obtuvieron cepas de *E. coli* transformada con la construcción de ADN pHELLSGATE12, la cual le otorga resistencia a 100  $\mu$ g/ml espectinomicina; una cepa transformada con la construcción de ADN de entrada pCR8, que le otorga resistencia a 100  $\mu$ g/ml espectinomicina y también se obtuvo cepas transformadas con las construcciones de ADN derivadas de la serie pGWB (se utilizó pGWB5 y pGWB8), que le otorgan resistencia a 50  $\mu$ g/ml kanamicina.

Para la selección de *Agrobacterium* se utilizó 25  $\mu$ g/ml gentamicina, resistencia otorgada por el plásmido Ti. Además se utilizó los mismos antibióticos a los cuales le confiere resistencia las construcciones de ADN pHELLSGATE12, y las derivadas de la serie pGWB, luego de la obtención de cepas transformadas con estas construcciones.

##### 3.1.1.1 Obtención de *E. coli* químicamente competente

Con el fin de poder transformar *E. coli* por golpe térmico, éstas fueron tratadas para llevarlas a un estado de competencia, en el cual son capaces de aceptar una construcción de ADN foránea. Para esto, se creció el cultivo de *E. coli* (3.1.1), hasta

alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,3 a 0,4 medida en un espectrofotómetro a 600 nm. Posteriormente se sedimentaron las células a 1.000g por 10 minutos a 4 °C y se resuspendieron en TSS 1x (10% polietilenglicol, 5% DMSO, 1% MgCl<sub>2</sub>, 84% medio LB) usando 1/10 del volumen inicial. Finalmente las células se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

#### **3.1.1.2 Transformación de *E. coli* por golpe térmico**

Se descongeló una alícuota de 200 µl de *E. coli* competente y se incubó por 15 minutos en hielo con 50-150 ng de la construcción de ADN deseada. Luego se traspasó a 42°C durante 90 segundos y se devolvió a hielo. Posteriormente, se le adicionó 1 ml LB y se incubó con agitación a 37°C durante 1 hora, para luego sembrar en LB-agar suplementado con el antibiótico de selección correspondiente.

#### **3.1.1.3 Obtención de *Agrobacterium tumefaciens* químicamente competente**

Se incubó un preinóculo de 5 ml de *Agrobacterium* (3.1.1) durante toda la noche. Luego, 4 ml del preinóculo fueron agregados a 100 ml LB-gentamicina 25 µg/ml e incubado hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> = 0,5. Se incubó el cultivo por 10 minutos en hielo y se sedimentaron las bacterias a 3.000g (20 minutos, 4°C). Se las resuspendió, bajo mechero, en 2 ml de 20 mM CaCl<sub>2</sub> estéril y alícuotas de 100 µl fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C.

#### **3.1.1.4 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* por golpe frío**

El procedimiento se realizó según lo descrito por Kato *et al.*(2002). Para esto, se descongeló una alícuota de *Agrobacterium* competente, se le agregó 50-150 ng de la construcción deseada y se depositó por 5 minutos en nitrógeno líquido. Luego, se

descongeló a temperatura ambiente por 15 minutos, se le agregó 1 ml de LB y se realizó un cultivo de 16 horas a 28 °C con agitación. Posteriormente, se centrifugó a 12.000g para sedimentar las bacterias, las cuales se sembraron en LB-gentamicina 25 µg/ml y el antibiótico de selección al cual confiere resistencia la construcción utilizada.

### **3.1.2 Crecimiento de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum***

Para el desarrollo del Seminario de Título, se trabajó con plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia y con *Nicotiana tabacum*.

Se utilizó medio MS (4,43 g/l medio basal Murashige & Skoog, 3% sacarosa, 60 mg/l mio inositol, 0,6% agar, pH 5,7) (Murashige y Skoog, 1962) para el crecimiento *in vitro* de plantas de *Arabidopsis*. Para esto, las semillas fueron esterilizadas agregándoles 0,1% Tritón X-100 durante 30 minutos, luego 70% etanol en 0,1% Tritón X-100 durante 5 minutos y 1,5% cloro en 0,1% Tritón X-100 durante 10 minutos. Luego, las semillas fueron lavadas 4 veces en agua destilada estéril, y estratificadas por 16 horas a 4°C y en oscuridad antes de sembrar en placas de MS. Para plantas transformadas con la construcción de ADN pHELLSGATE12-GONST3-RNAi, se suplementó el medio MS con 50 µg/ml kanamicina, y en el caso de haber sido transformadas con construcciones derivadas de la serie pGWB se suplementó el medio MS con 25 µg/ml higromicina.

Para el crecimiento de tabaco y plántulas de *Arabidopsis* mayores de 2-3 semanas, se utilizó un medio hidropónico descrito por Gibeaut et al., 1997 (Figura 3). Para su elaboración se preparó inicialmente una solución nutritiva 100X pH 5,0 que contenía 125 mM KNO<sub>3</sub>, 150 mM Ca(NO<sub>3</sub>), 75 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM KCl, 5 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1 mM MnSO<sub>4</sub>, 200 µM ZnSO<sub>4</sub>, 150 µM CuSO<sub>4</sub>, 7,5 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, 7,2 mM Sprint 330 (Fe quelado en DTPA). Para preparar 5 l de esta solución se disolvió en aproximadamente 3 l de agua destilada, con agitación constante y en



forma secuencial, todos los componentes del medio, con excepción del  $\text{Ca}(\text{NO}_3)$  y del  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ . El  $\text{Ca}(\text{NO}_3)$  fue disuelto por separado y agregado lentamente a la solución, la cual fue llevada a un volumen aproximado de 4,5 l, se ajustó el pH a 5 con 10 M KOH, se agregaba el  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  y se ajustaba el volumen a 5 l. El medio fue utilizado a una concentración de 1X, diluyendo el stock con agua destilada.

Se mantuvieron todas las plantas (en placas y medio hidropónico) a 22°C, con un fotoperiodo de 16 horas luz (intensidad lumínica 4.500-6.500 Lux) y 8 horas oscuridad.



**Figura 3. Cultivos hidropónicos utilizados en el seminario de título. A. Cultivo de *Arabidopsis thaliana*. B. Cultivo de *Nicotiana tabacum*.**

### **3.1.3.1 Transformación estable de *Arabidopsis thaliana***

Para la transformación estable de *Arabidopsis* se utilizó el método de inmersión floral modificado de Martínez *et al.*, 2004. Se creció *Agrobacterium* (3.1.1), se sedimentó a 5.000g y se resuspendió en medio de transformación (0,5X MS, 0,05% Silwet L-77 y 5% sacarosa), en el cual luego se sumergieron flores de *Arabidopsis* durante 15 segundos. Las plantas se dejaron por 12 horas de forma horizontal y en oscuridad y

pasado este tiempo, se volvieron a dejar en forma vertical, permitiendo así la formación de las semillas.

### **3.1.3.2 Transformación transitoria de hojas de *Nicotiana tabacum***

La transformación transitoria de hojas de tabaco permite un análisis rápido de la funcionalidad transcripcional de las construcciones de ADN. Para esto, se creció una alícuota de *Agrobacterium* (3.1.1), transformado con la construcción correspondiente. Luego las bacterias se sedimentaron a 5.000g y se resuspendieron en 1 volumen de medio de infiltración (4,43 g/l medio MS, 1,5% sacarosa, 0,1 g/l mio inositol, 300 µM acetosiringona, pH 5,7), con agitación suave durante una hora. Luego se infiltró la suspensión obtenida utilizando una jeringa, a través de pequeñas heridas generadas en la cara abaxial de la hoja (previamente asperjada con agua) y aplicando presión para lograr el ingreso de la solución a través de los estomas.

## **3.2 Extracción de ADN**

### **3.2.1 Extracción de ADN plasmidial**

Se realizó un cultivo de 5 ml de LB suplementado con el antibiótico de selección correspondiente, para luego realizar extracción de ADN plasmidial utilizando el kit AxyPrep™ Plasmid (Axygen, extracción por afinidad en columna) según indicaciones del fabricante.

### **3.2.2 Extracción de ADN desde plantas**

Para la extracción del ADN genómico desde hojas de *Arabidopsis*, destinado a las construcciones de ADN, se utilizó el Genomic DNA Purification Kit (Fermentas,

extracción por afinidad en columna), según indicaciones del fabricante.

Para la identificación de plantas transformantes de *Arabidopsis* mediante PCR se utilizó el protocolo descrito por Kang y Yang (2004). Para esto, se molió aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> de hoja en 200 µl de buffer de extracción (500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7,5 y 50 mM EDTA pH 7,5). Luego se le agregó 20 µl de 20% SDS, se agitó vigorosamente por 30 segundos y se incubó a 65°C por 10 minutos. Posteriormente se le agregó 250 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó vigorosamente por 30 segundos y se centrifugó a 10.000g durante 3 minutos. Finalmente, el sobrenadante se diluyó 5 veces en agua nanopura, de lo cual se tomó 1 µl como molde para la reacción de PCR.

Las muestras de ADN obtenidas fueron almacenadas a -20°C.

### **3.3 Extracción de ARN de plantas**

La extracción de ARN total desde hojas de plantas se realizó mediante la utilización del reactivo RNA-Solv<sup>®</sup> (Omega Bio-tek, extracción fenólica), para lo cual, por cada gramo de tejido pulverizado en nitrógeno líquido, se agregó 1 ml de RNA-Solv<sup>®</sup> y se siguió homogenizando. Se añadió 0,8 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Se incubó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 12.000g por 15 minutos a temperatura ambiente. Se rescató ~80% de la fase superior (acuosa) y se transfirió a un nuevo tubo. Se precipitó el ARN con 0,5 ml de isopropanol frío y se incubó a -20°C durante 15 minutos. Se centrifugó a 12.000g por 10 minutos a temperatura ambiente y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol 80% en agua DEPC frío por cada ml de RNA-Solv<sup>®</sup> agregado al principio. Se centrifugó por 3 minutos a 21.000g y el sedimento obtenido se dejó secar por 15 minutos a temperatura ambiente, el cual luego se resuspendió en 70 µl de agua DEPC. El ARN obtenido se cuantificó en un

espectrofotómetro NanoDrop 1.000 (Thermo Scientific) y se almacenó a -20°C.

### 3.4 Diseño de Partidores

Para el diseño de partidores específicos se utilizó el programa Primer3 Input versión 0.4.0 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) y para analizar que cada partidor no hibridara con sí mismo o con el otro partidor, se utilizó el programa Oligo Analyzer versión 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Se muestran los partidores utilizados en la Tabla I.

**Tabla I. Partidores utilizados en este seminario de título.** Entre paréntesis se muestra el nombre común de algunos de los partidores (ver Figura 5).

Partidor	Secuencia partidor	Descripción
G3s (P1)	5' CACCATGTCGACGAATGAT GAGGAAA3'	Partidor directo que junto a G3full amplifica el ORF de GONST3. Junto a G3as amplifica el fragmento para RNAi.
G3full (P2)	5' CTCTGAAATCAGAAGAGAA ACTA 3'	Partidor reverso que junto a G3s amplifica el ORF de GONST3.
His 3' (P3)	5' GCATGATGATGATGA 3'	Partidor reverso que amplifica desde la cola 6x-His de la construcción G3-His.
G3as (P4)	5' AGCTCACTGTTGGTAAACA GAG 3'	Partidor reverso que permite la amplificación del fragmento de RNAi con el partidor G3s.
GFP 3' (P5)	5' ATGGATATGAGGATAATGT GA 3'	Partidor reverso que amplifica desde la cola GFP de la construcción G3-GFP.
GAPA-F	5' GGTAGGATCGGGAGGAAC 3'	Hibrida con una región 5' interna del ADN de la gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa.
GAPA-R	5' CTGGTGCCAAGAAGGTTAT C 3'	Hibrida con una región 3' interna del ADN de la gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa
Oligo AP	5' CGCCACGCGTCTCGACTAGTA CTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'	Partidor utilizado para la retrotranscripción del ARN. Hibrida con la cola de poliadenina del ARN <sub>m</sub> .

### 3.5 Reacción de RT

Previo a la reacción de retrotranscripción del ARN, se eliminó cualquier contaminación por ADN realizando un tratamiento con DNAasa. Para esto se mezcló 4 µg de ARN (3.3), 1X buffer DNAasa, 2 U DNAasa (Fermentas), 80 U inhibidor RNAasa (Fermentas), se llevó a un volumen de 18 µl con agua DEPC y se incubó a 37°C durante 20 minutos. Luego las muestras fueron puestas en hielo y se le agregó 2 mM EDTA (concentración final). Cada muestra se separó en 2 tubos con 10 µl cada uno (controles positivo y negativo). A cada tubo se le agregó 0,5 µg de oligo AP (Tabla I) y 6 µl de agua DEPC. Los tubos fueron puestos a 70°C durante 5 minutos y luego se pusieron en hielo, donde se les agregó una mezcla que llevó a una concentración final por reacción de 1X buffer de reacción ImProm-II™, 0,5 mM dNTPs en agua DEPC y 3 mM MgCl<sub>2</sub>. Al control positivo, se le agregó 1 µl de transcriptasa reversa (Promega), mientras que al control negativo, se le agregó 1 µl de agua DEPC. Finalmente los tubos fueron dispuestos en un termociclador con el programa que se puede ver en la Tabla II.

**Tabla II. Programa utilizado para retrotranscripción del ARN.**

Estado	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	70°C	5 min	1
Poner en hielo mientras se agrega la mezcla.			
2	25°C	5 min	1
3	42°C	60 min	1
4	70°C	15 min	1

### 3.6 Reacciones de PCR

Para todas las reacciones de PCR, salvo la clonación génica, se utilizó Paq5000 ADN polimerasa (Stratagene), la cual tiene como característica que su buffer provee Mg<sup>2+</sup> a una concentración final de 2 mM, por lo cual no fue necesario agregar MgCl<sub>2</sub> a la

mezcla de PCR estándar. Para la clonación génica, se utilizó *Pfu* ADN polimerasa (Fermentas), que posee actividad correctora 3'→5' exonucleasa, lo cual disminuye la probabilidad de que la polimerasa pueda incorporar nucleótidos erróneos a la secuencia.

La mezcla estándar de PCR provee una concentración final de 1X buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 1 μM partidor directo, 1 μM partidor reverso y 5 unidades de ADN polimerasa, mientras que de molde de ADN se uso aproximadamente 100 ng para el caso de ADN genómico y 5-30 ng para el caso de construcciones de ADN. Se muestran los programas de PCR utilizados en la Tabla III.

**Tabla III. Programas de PCR utilizada en el seminario de título.** Se indica en el caso de haber alteraciones en la composición de la reacción de PCR.

**Gonst ant.** Programa que se utilizó en RT-PCR para determinar la expresión de GONST3 en *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis*. Se utilizaron los partidores P1 y P4.

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	94°C	5 min	1
2	1	94°C	30 seg	30
	2	58°C	30 seg	
	3	72°C	1 min	
3	1	72°C	10 min	1
		4°C	∞	

**Gonst Orf PFU.** Programa que se utilizó para amplificar el marco de lectura abierto de GONST3 sin codón de término para la obtención de las construcciones de ADN. Se utilizaron los partidores P1 y P2. En el estado 4 se agregó 5 U de taq polimerasa y 0,2 mM de dATP para agregar una adenina terminal necesaria para el clonamiento de GONST3.

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	94°C	5 min	1
2	1	94°C	30 seg	30
	2	58°C	30 seg	
	3	72°C	2 min 20 seg	
3	1	72°C	10 min	1
		4°C	∞	
4	1	72°C	10 min	1
		4°C	∞	

**Mike 11.** Programa que se utilizó para verificar la calidad del ADN extraído de plantas. Se utilizaron los partidores GAPA-F y GAPA-R.

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	94°C	5 min	1
2	1	94°C	30 seg	30
	2	58°C	30 seg	
	3	72°C	1 min	
3	1	72°C	10 min	1
		4°C	∞	

**PCR His.** Programa que se utilizó para confirmar los transformantes G3-His en *Arabidopsis thaliana*. En este caso la concentración de MgCl<sub>2</sub> es de 5 mM en lugar de 2 mM. Se utilizaron los partidores P1 y P3.

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	94°C	5 min	1
2	1	94°C	30 sec	30
	2	55,5°C	30 sec	
	3	72°C	2 min	
3	1	72°C	10 min	1
		4°C	∞	

### 3.7 Análisis de ADN o ARN mediante gel de agarosa

Para la visualización del ADN y del ARN se utilizaron geles de 1% agarosa en TAE 1X (40 mM Tris-base, 19 mM ácido acético glacial y 1 mM EDTA pH 8), con 0,5 µg/ml bromuro de etidio. Las muestras se mezclaron con 2 µl de buffer de carga (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol FF, 30% ficol) y se corrieron a un voltaje de 100 V para el caso del ADN y a 70 V para el caso del ARN. Como marcador de peso molecular se usó Gene Ruler™ (Fermentas) de 100 a 1.000 pb y de 0,25 a 10 kb.

### 3.8 Técnicas de Biología Molecular

#### 3.8.1 Vectores utilizados

##### 3.8.1.1 pHELLSGATE12-GONST3-RNAi (G3-RNAi)

Se utilizó la construcción de ADN pHELLSGATE12-GONST3-RNAi (G3-RNAi; figura 5.A), la cual posee el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor y dirige la transcripción de un fragmento de ADN (Helliwell y Waterhouse, 2003), cuyo ARN mensajero es capaz de hibridar y formar un ARN de doble hebra, lo cual trae como consecuencia la activación de la maquinaria RISC, que lleva al silenciamiento génico post-transcripcional de *GONST3*. Esta construcción fue realizada por Rodrigo Caroca, en el laboratorio del Dr. Michael Handford.

#### **3.8.1.2 pGWB8-GONST3-His (G3-His) y pGWB5-GONST3-GFP (G3-GFP)**

Con la finalidad de aumentar los niveles de expresión de *GONST3* en plantas de *Arabidopsis*, se realizaron 2 construcciones de ADN (Figura 5.B y C). pGWB8-GONST3-His (G3-His) permitirá la acumulación de una proteína de fusión entre *GONST3* y una cola C-terminal de 6 histidinas, la cual se utilizará para inmunodetección mediante western blot. La otra construcción de ADN para sobreexpresión es pGWB5-GONST3-GFP (G3-GFP), la cual permitirá la acumulación de una proteína de fusión entre *GONST3* y la Proteína Fluorescente Verde (GFP, C-terminal). Ambas construcciones servirán para analizar la localización subcelular de *GONST3*.

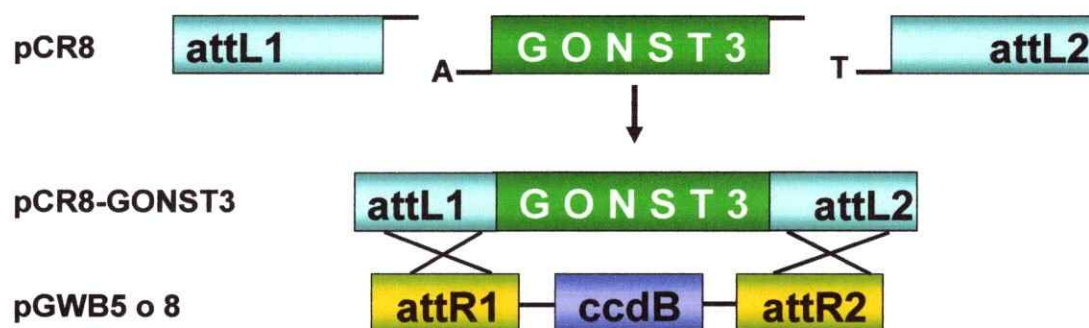
#### **3.8.2 Construcción y verificación de pCR8-G3**

Para la elaboración de G3-GFP y G3-His, primero se clonó el marco de lectura abierto de *GONST3*, sin incluir el codón de término (necesario para generar una fusión C-terminal), en la construcción de entrada (Gateway compatible) pCR8/GW/TOPO® (Invitrogen). La inserción de un fragmento de ADN en este vector es por clonación tipo TA, es decir, el fragmento a clonar posee una adenina terminal, mientras que la



construcción de entrada posee una timina, por lo que el clonamiento ocurre por apareamiento de bases. GONST3 ORF fue amplificado con los partidores P1 y P2 (Tabla I) utilizando *Pfu* polimerasa y el programa de PCR "Gonst Orf PFU" (Tabla III). Como molde se utilizó ADN genómico de *Arabidopsis* extraídos por kit (3.2.2). Dado que la amplificación con *Pfu* resulta en fragmentos con extremos romos, se realizó un tiempo de extensión adicional, donde se añadió 5 U de Taq polimerasa (Fermentas), para añadir una adenina terminal, necesaria para el clonamiento tipo TA. Además se añadió 0,2 mM de dATP.

Los productos de la reacción de PCR fueron separados en un gel de TAE-1% agarosa. La banda correspondiente al tamaño esperado (1.119 pb) se escindió con bisturí bajo luz UV y se purificó el amplificado con el kit Invisorb Spin DNA Extraction (Invitex). Este producto de PCR purificado se ligó con la construcción de entrada pCR8, según indicaciones del fabricante, para generar la construcción pCR8-G3 (Figura 4).



**Figura 4. Esquema que representa la clonación de GONST3 en pGWB5 y pGWB8.** En la parte superior se muestra la ligación con la construcción de ADN de entrada, pCR8, para originar la construcción pCR8-GONST3, la cual se recombinó con las construcciones pGWB8 y pGWB5 para generar las construcciones para sobreexpresión (ver Figura 5).

Luego de transformar *E. coli* con los productos de la ligación (3.1.1.2), ADN plasmidial fue extraído (3.2.1) de las colonias que crecieron en medio de selección (3.1.1). Dado

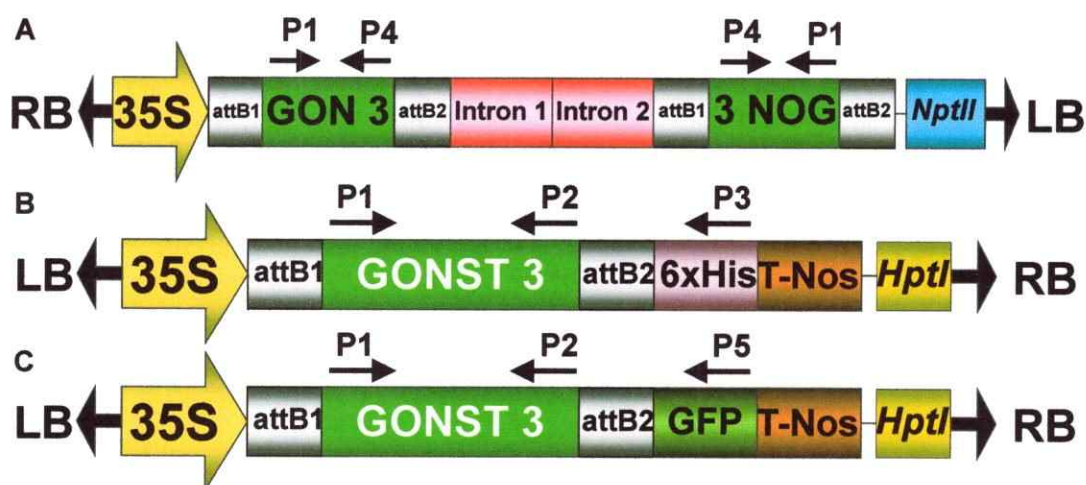
que la clonación de cualquier fragmento de ADN en pCR8 no es direccional, se verificó la orientación de *GONST3* en la construcción de ADN de entrada por restricción enzimática con *HindIII* y *HpaI*. Para esto, se incubó 1µg de pCR8-GONST3 purificado de cada colonia analizada, 20 U *HindIII*, 20 U *HpaI*, 1X Buffer Tango™ (33 mM Tris-acetato pH 7,9, 10 mM acetato de magnesio, 66 mM acetato de potasio, 0,1 mg/ml BSA) en un volumen total de 20 µl, durante 1 hora a 37°C. Se seleccionó una colonia que contenía la construcción de ADN con el inserto de *GONST3* en sentido y se almacenó una muestra a -80°C. La construcción purificada de esta colonia se secuenció (250 ng de ADN por reacción, con partidores universales M13 directo y reverso).

### **3.8.3 Construcción y verificación de G3-His y G3-GFP**

En el sistema Gateway, la inserción de un fragmento clonado desde la construcción de entrada hacia la construcción de destinación, es por recombinación homóloga, utilizando los sitios attL1 y attL2 del primero (pCR8) y attR1 y attR2 del segundo (pGWB5 o pGWB8; Figura 4). Para la recombinación de las construcciones se mezcló 120 ng de pCR8-GONST3, 300 ng de pGWB8 o de pGWB5, 2 µl de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8) y 2 µl de LR clonasa (Invitrogen) en un volumen total de 8 µl, y se incubó a 25°C durante 1 hora. Luego se añadió 1 µg de Proteinasa K para detener la reacción, se agitó vigorosamente y se incubó a 37°C por 10 minutos. Luego se tomaron 3 µl de reacción con los cuales se transformó *E. coli* One Shot®, según indicaciones del fabricante (Invitrogen). Se seleccionaron los transformantes (3.1.1) y se extrajo ADN plasmidial (3.2.1).

Para corroborar la presencia de *GONST3* en pGWB5 y pGWB8, se realizó un PCR con los partidores P1 y P4 (Tabla I) con el programa de PCR "Gonst ant" (Tabla III).

Además, se realizó una digestión enzimática con la enzima *HindIII* para determinar la dirección del inserto. Para esto, se incubó 1 µg de cada construcción realizada, 20 U *HindIII* y 1X Buffer Tango™ en un volumen total de 20 µl, durante 1 hora a 37°C. Una vez corroborada la identidad de G3-His y G3-GFP, se transformó *Agrobacterium* (3.1.1.4 y 3.1.1). Muestras de *Agrobacterium* conteniendo cada construcción, fueron almacenadas a -80°C.



**Figura 5. Esquema de las construcciones de ADN utilizadas.** A. Construcción G3-RNAi, utilizada para transformar *Arabidopsis* con el fin de disminuir los niveles de expresión de GONST3. *NptII* otorga resistencia a kanamicina en plantas. B y C. Construcciones realizadas para aumentar los niveles de expresión de GONST3 en *Arabidopsis*. Estas construcciones permiten la acumulación de una proteína de fusión de GONST3 con el epítipo 6xHis (G3-His) (B), o con la Proteína Fluorescente Verde (G3-GFP) (C) y *HptI* confiere resistencia a higromicina en plantas. P1 a P5 son los nombres comunes de los partidores utilizados para la amplificación por PCR del fragmento indicado por las flechas (ver Tabla I). Todas las construcciones poseen el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor. En el esquema sólo se muestra el fragmento de la construcción que es capaz de integrarse al genoma de la planta, delimitado por las regiones LB (Left Border) y RB (Right Border). Los sitios attB1 y attB2 son los productos de la recombinación entre attL1/attR1 y attL2/attR2, respectivamente (Figura 4). T-nos. Terminador de la nopalina sintasa.

## 4. Resultados

### 4.1 Disminución de los niveles de expresión de GONST3

Con la finalidad de disminuir los niveles de expresión de *GONST3*, se clonó un fragmento de 350 pb del marco de lectura abierto, en sentido y en antisentido, en la construcción binaria de ADN pHELLSGATE12 (trabajo realizado por Rodrigo Caroca). Esta construcción, al ser transcrita, debería generar un ARNm, el cual es capaz de auto-hibridar, generando un ARN de doble hebra, el cual gatilla SGPT.

Con la finalidad de obtener una mayor cantidad de ésta construcción de ADN, se transformó *E. coli* competente con esta construcción (3.1.1.2), se seleccionó una colonia y se creció en medio LB. Posteriormente se extrajo ADN plasmidial (3.2.1) y se procedió a transformar *Agrobacterium* (3.1.1.4), y se tomó una de las colonias resistentes al medio de selección, la cual fue utilizada para ensayos posteriores.

Para determinar la funcionalidad transcripcional de la construcción, se realizó una transformación transitoria de hojas de tabaco (3.1.3.2) con la colonia de *Agrobacterium* seleccionada, que contiene la construcción para RNAi. Al cabo de 5 días, se extrajo ARN desde hojas infiltradas con la construcción de ADN y desde hojas sin infiltrar, las cuales son utilizadas como control negativo, y se realizó un RT-PCR (Figura 6).

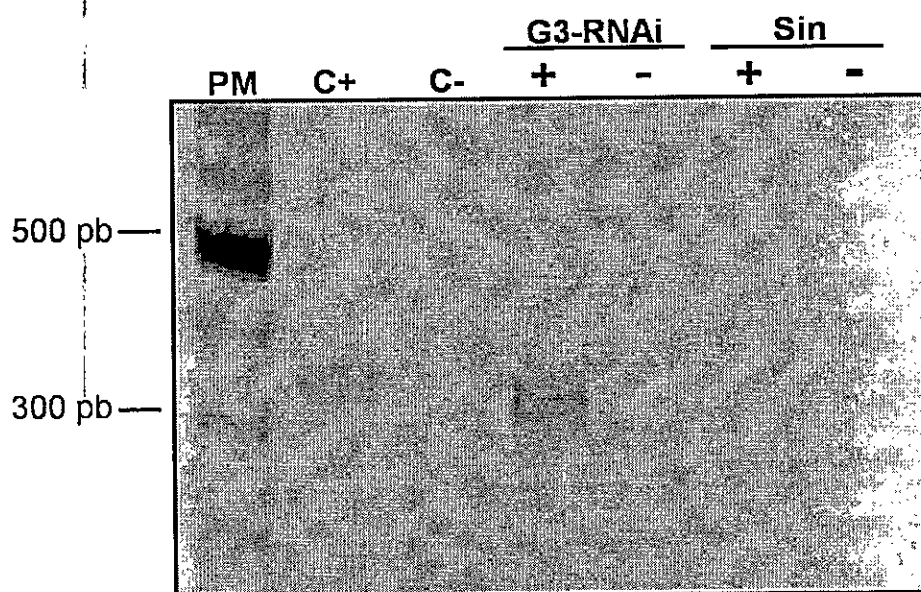


Figura 6. Análisis de la funcionalidad de la construcción de ADN pHELLSGATE12-GONST3-RNAi. RT-PCR de ARN extraído de hojas de tabaco infiltrado con la construcción de ADN pHELLSGATE12-GONST3-RNAi (**G3-RNAi**) o desde hojas sin infiltrar (**Sin**) utilizando partidores específicos P1 y P4 (ver Figura 5). + y - indica presencia o ausencia de transcriptasa reversa, respectivamente. **C+**, **C-**. Control positivo y negativo de PCR, respectivamente. **PM**. Marcador de peso molecular.

En la figura 6 se puede ver que se encuentra el amplificado esperado de 350 pb sólo en las hojas infiltradas con la construcción de ADN y en el control positivo (construcción de ADN pHELLSGATE-GONST3-RNAi purificada), indicando que se transcribe el ARNm de GONST3 en tejidos vegetales. La carencia de amplificado en hojas de tabaco sin infiltrar indica que la amplificación depende de la presencia de la construcción infiltrada y además que los partidores utilizados no son capaces de unirse de forma inespecífica al ADNc de tabaco. Por otro lado, la falta de amplificado en las reacciones sin RT, indica que el ARN no poseía contaminación por ADN.

Luego de confirmar la funcionalidad de la construcción de ADN de forma transitoria en hojas de tabaco, se procedió a transformar plantas de *Arabidopsis* de forma estable (3.1.3.1), con el fin de reducir los niveles de expresión de *GONST3*. Luego de la transformación, las semillas fueron esterilizadas y sembradas en medio MS kanamicina

50 µg/ml (1.100 semillas aproximadamente, debido a que se ha descrito (Martínez *et al.*, 2004) que la eficiencia de transformación varía en torno al 1-2%, por lo tanto, se esperaba encontrar cerca de 10 plantas transformantes resistentes al medio de selección).

Sorprendentemente, ninguna planta fue capaz de crecer en el medio de selección. Por lo tanto, se redujo la concentración de antibiótico a 25 µg/ml, sembrando unas 1.000 semillas. Sin embargo ninguna planta fue capaz de crecer nuevamente (datos no mostrados). Dada esta situación, se analizó si las mismas semillas sembradas en medio MS sin antibiótico de selección eran capaces de desarrollarse normalmente (datos no mostrados). Luego de 2 semanas, tanto las semillas provenientes de las plantas transformadas con pHELLSGATE12-GONST3-RNAi, como las de plantas silvestres, germinaron y crecieron a la misma tasa. Estas plantas no fueron analizadas por PCR, debido a que por probabilidad, cada 100 reacciones de PCR, se podría encontrar una planta transformante. Para desarrollar análisis fenotípicos se necesitan varias líneas independientes, por lo que hubiera sido necesario realizar varios cientos de reacciones de PCR.

Estos resultados indican que la transformación estable de plantas con pHELLSGATE12-GONST3-RNAi no fue efectiva o que las plantas transformantes no estarían transcribiendo el gen que otorga la resistencia a la kanamicina (lo cual se podría demostrar mediante PCR, utilizando como molde ADN genómico y partidores específicos para el gen *NptII*, que otorga la resistencia a kanamicina).

Dada la carencia de plantas transformantes para ser analizadas, se decidió no continuar con esta estrategia para reducir los niveles de expresión de *GONST3*, y se continuó avanzando con los otros objetivos del seminario.

## 4.2 Aumento de los niveles de expresión de *GONST3*

Para aumentar los niveles de expresión de *GONST3* se realizaron, en paralelo, las construcciones de ADN pGWB8-*GONST3*-His (G3-His) y pGWB5-*GONST3*-GFP (G3-GFP) y los resultados de este proceso son mostrados en los puntos siguientes.

### 4.2.1 Obtención de la construcción de entrada pCR8-*GONST3*

Para desarrollar la construcción de ADN de entrada pCR8-*GONST3*, se amplificó inicialmente el marco de lectura de *GONST3* sin incluir el codón de término (necesario para generar una fusión C-terminal), con los partidores P1 y P2 (Figura 5) en el programa de PCR "Gonst Orf PFU" (Tabla III). Dado que el gen no posee intrones (Handford *et al.*, 2004), se utilizó ADN genómico de *Arabidopsis* como molde. El amplificado obtenido concuerda con el tamaño esperado del ORF de *GONST3* (1.119 pb; Figura 7).

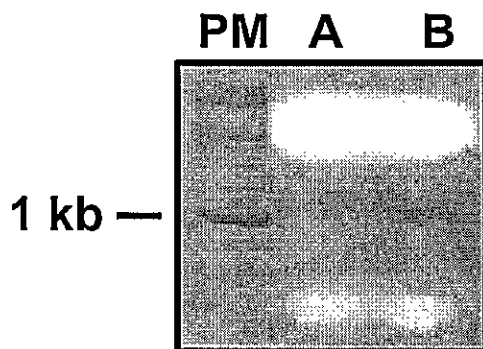


Figura 7. Amplificación del marco de lectura abierto de *GONST3* con Pfu ADN polimerasa. A. Control negativo de PCR. B. PCR con ADN genómico de *Arabidopsis* como molde. Se usó partidores P1 y P2 (Figura 5). PM. Marcador de peso molecular.



El producto de PCR fue purificado (3.8.2) y se ligó con la construcción pCR8. Con la mezcla de la ligación se transformó *E. coli* competente y se seleccionó en LB espectinomicina. Se seleccionaron 3 colonias, a las cuales se les realizó un PCR con los partidores P1 y P4 que confirmó que la construcción de ADN, en los 3 casos, poseía el ORF de *GONST3* (datos no mostrados).

Para determinar la orientación del ORF de *GONST3* en pCR8, se extrajo ADN plasmidial desde las tres colonias, con la finalidad de realizar una digestión enzimática (Figura 8).

Las enzimas utilizadas para la digestión fueron *HindIII* y *HpaI*. La enzima *HindIII* corta en el fragmento de ADN de *GONST3*, mientras que la enzima *HpaI* corta en la construcción pCR8, la cual, con el inserto de *GONST3* tiene 3.937 pb. Si el inserto de *GONST3* está en sentido (la dirección deseada), en la digestión doble se verán bandas de 3.656 pb y 281 pb, pero si está al revés se obtendrán bandas de 2.736 pb y 1.201 pb.



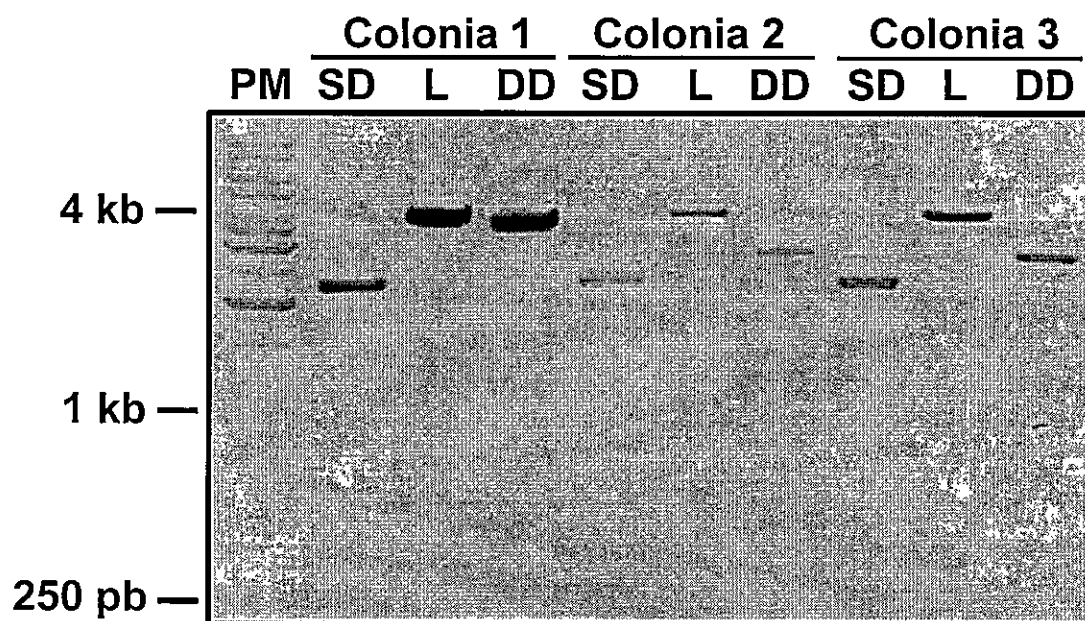


Figura 8. Digestión enzimática de la construcción de ADN pCR8-GONST3 de las colonias 1, 2 y 3. SD. Sin digerir. L. Construcción linearizada con *HindIII*. DD. digestión enzimática doble con *HindIII* y *HpaI*. PM. Marcador de peso molecular.

Como se puede ver en la figura 8, sólo la colonia 1 posee el inserto de GONST3 en sentido, mientras que las otras dos colonias analizadas lo poseen en antisentido.

El ADN plasmidial de esta colonia fue secuenciado. En el cromatograma no se encontró ningún cambio entre la secuencia depositada en GenBank de *GONST3* (Numero de acceso, **At1g76340**) y la secuencia clonada en pCR8.

#### 4.2.2 Obtención de la construcción pGWB8-GONST3-His

El ADN de la construcción pCR8-GONST3 de la colonia 1 (4.2.1) fue recombinado con la construcción de destinación pGWB8 (3.8.3) (Nakagawa *et al.*, 2007), para dar origen a la construcción pGWB8-G3 (G3-His). Con la mezcla de la ligación se transformó *E. coli* competente y se seleccionó en LB kanamicina. Se analizaron 10 de las colonias

que crecieron mediante PCR con los partidores P1 y P4, lo cual confirmó que contenían el ORF de *GONST3* (Figura 9).

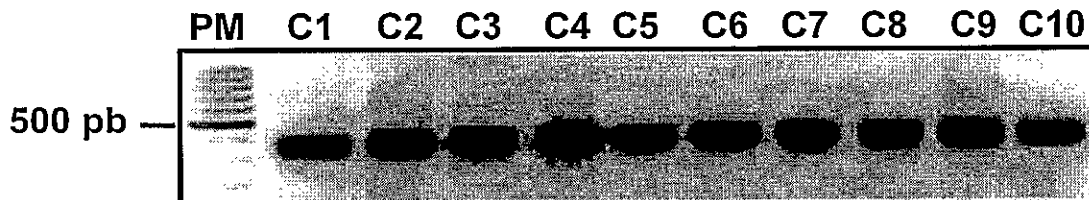


Figura 9. Análisis por PCR de colonias de *E. coli* transformadas con pGWB8-GONST3-His. PCR con partidores P1 y P4. C1-10. Colonias analizadas. PM. Marcador de peso molecular.

De la figura 9 se puede ver que todas las colonias analizadas poseen la construcción pGWB8-GONST3-His, por lo cual se extrajo ADN plasmidial de la colonia 1. Al ADN purificado se le realizó una digestión enzimática con la enzima *HindIII*, la cual corta tanto en la secuencia de ADN de *GONST3*, como en la secuencia de pGWB8. Si la recombinación fue exitosa, al digerir con *HindIII* se generará un fragmento 17 kb y otro de 1,2 kb (Figura 10).

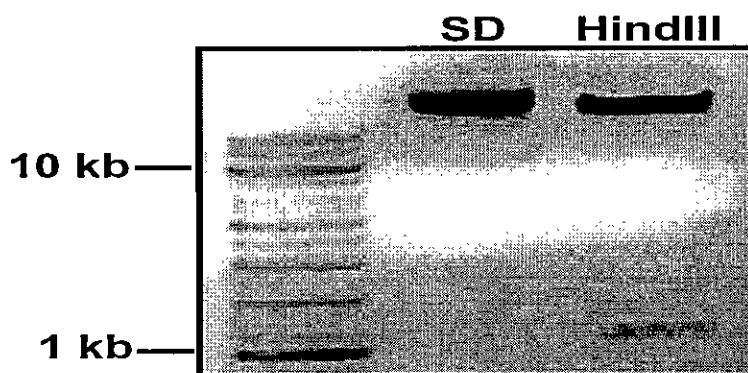


Figura 10. Digestión enzimática de la construcción de ADN pGWB8-GONST3-His. La enzima *HindIII* corta una vez en la construcción de ADN y una vez en el inserto de *GONST3*, generando fragmentos de 17 y 1,2 kb. SD. Sin digerir. *HindIII*. Digestión enzimática con la enzima *HindIII*. PM. Marcador de peso molecular.

De la figura 10 se puede ver que la recombinación fue exitosa y el marco de lectura de GONST3 sin codón de término está insertado correctamente en la construcción de destinación.

Luego de transformar *Agrobacterium* con la construcción pGWB8-GONST3-His se procedió a agroinfiltrar hojas de tabaco (3.1.3.2) para analizar la funcionalidad de la construcción mediante un RT-PCR realizado 5 días después de la infiltración (Figura 11).

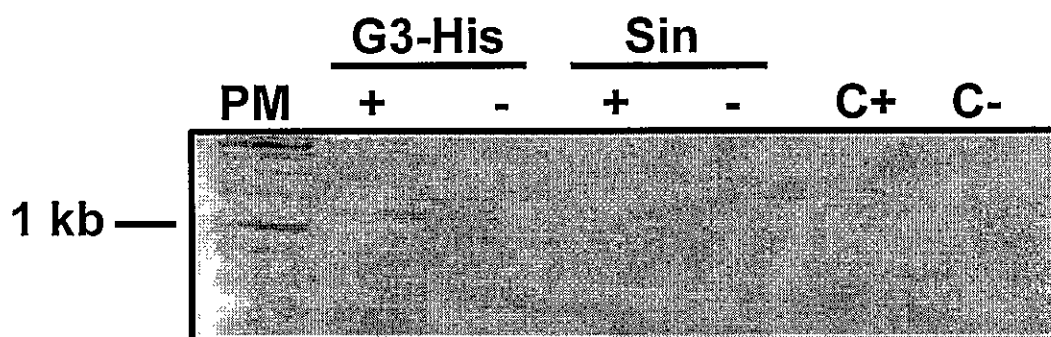


Figura 11. Análisis de la funcionalidad de la construcción de ADN pGWB8-GONST3-His. RT-PCR de ARN extraído de hojas de tabaco infiltrado con la construcción de ADN pGWB8-GONST3-His (G3-His) o desde hojas sin infiltrar (Sin) utilizando partidores específicos P1 y P4 (ver Figura 5). + y - indica presencia o ausencia de transcriptasa reversa, respectivamente. C+, C-. Control positivo y negativo de PCR, respectivamente. PM. Marcador de peso molecular.

De la figura 11 se puede ver que la construcción es funcional transcripcionalmente en planta, dado que sólo se detecta amplificado en las hojas de tabaco agroinfiltradas con pGWB8-GONST3-His y en el control positivo de PCR, el cual corresponde a la construcción de ADN purificada.

Es por esto que se procedió a transformar plantas de *Arabidopsis* de forma estable (3.1.3.1), cuyas semillas, luego de ser esterilizadas, fueron sembradas en medio MS higromicina (1.100 semillas aproximadamente). En la Tabla IV se muestra el número de plantas capaces de crecer en el medio de selección y se muestra además la

eficiencia de transformación, la cual está acorde con lo descrito en la literatura (Martínez *et al.*, 2004). A su vez en la figura 12 se puede ver un ejemplo de las plantas resistentes al medio de selección, las cuales son fácilmente identificables, dado su mayor tamaño.

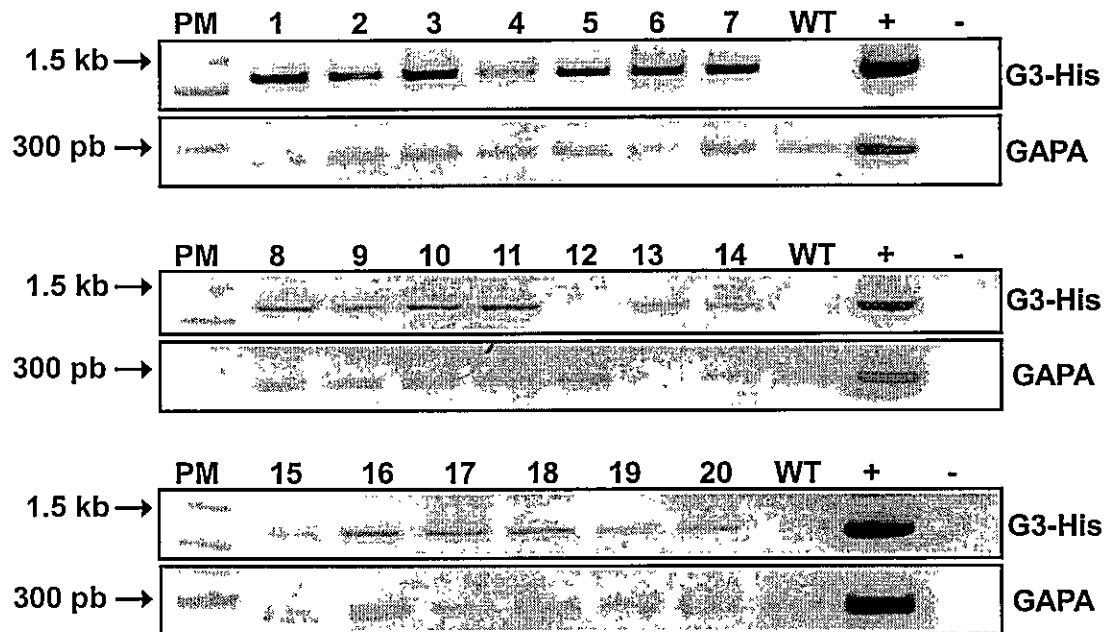
**Tabla IV. Tasa de transformación para *Arabidopsis* transformada con G3-His.**

	Semillas Sembradas	Resistentes a Higromicina	Eficiencia de Transformación
Número	1100	30	2,73%



**Figura 12. Transformación estable de *Arabidopsis* con el vector pGWB8-GONST3-His.** En la figura se muestran las plántulas obtenidas tras 2 semanas de la siembra en medio de selección con higromicina (25  $\mu\text{g/ml}$ ), de las semillas obtenidas a partir de la inmersión floral. Con la flecha se indica una de las 30 plántulas resistentes obtenidas.

A 20 de las 30 plantas resistentes a higromicina se les realizó una extracción de ADN y un posterior PCR con los partidores P1 y P3 para asegurar que éstas sean transformantes (Figura 13), dado que el partidor P3 hibrida en la secuencia que codifica para la cola de histidina de la proteína de fusión, la cual no se encuentra en una planta silvestre.



**Figura 13. Análisis de transformantes G3-His.** Se realizó un PCR con ADN genómico como molde de 20 de los 30 transformantes G3-His utilizando los partidores P1 y P3. Como control de la calidad del ADN se amplificó un fragmento del gen constitutivo GAPDH, lo cual permitió ver que la línea 12 no es transformante. WT. Línea silvestre de *Arabidopsis thaliana*. 1-20. Líneas transformantes. PM. Marcador de peso molecular. +. Control positivo. -. Control negativo.

De la imagen anterior se puede ver que de las 20 plantas resistentes al antibiótico, en 19 se encuentra amplificado por PCR con los partidores P1 y P3, lo cual indica que son transformantes. Dado que existe la posibilidad que en la línea 12 el ADN sea de mala calidad para una amplificación por PCR, se utilizó además los partidores para un gen control, GAPDH, donde si se encuentra amplificado (Figura 13). Esto indica que el ADN de la línea 12 es de buena calidad, por lo tanto se trata de una línea no transformante. Al azar, algunas de estas líneas fueron seleccionadas y se les realizó un RT-PCR (Figura 14).

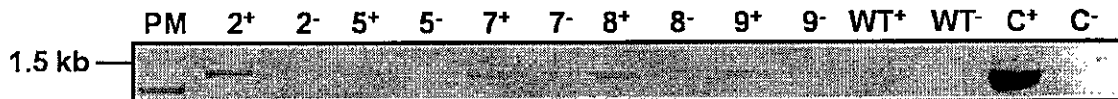
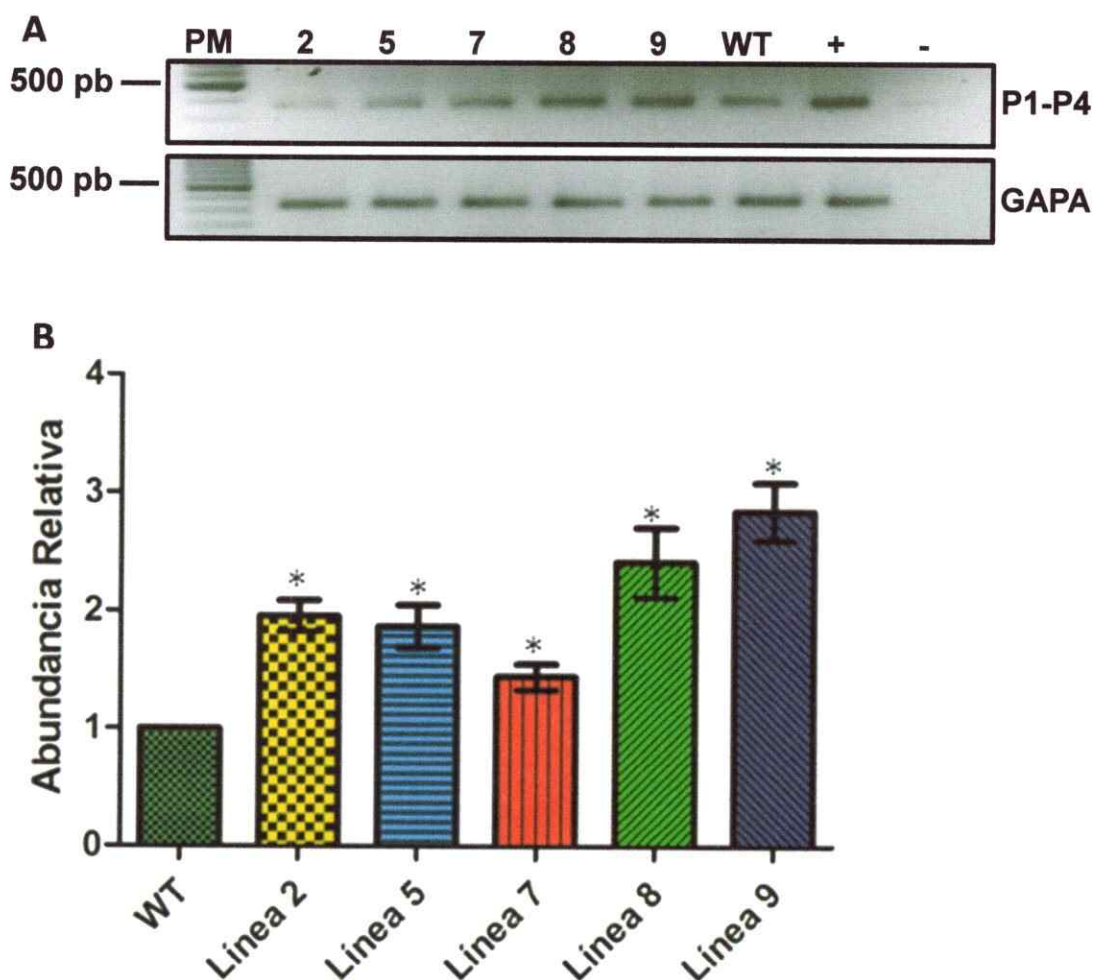


Figura 14. *GONST3-His* es transcrito en *Arabidopsis* transformada con G3-His. Se realizó un RT-PCR a 5 transformantes G3-His. Para el PCR se utilizó los partidores P1 y P3. WT. Línea silvestre de *Arabidopsis thaliana*. 2, 5, 7, 8, 9. Líneas transformantes. PM. Marcador de peso molecular. + o -. Presencia o ausencia de transcriptasa reversa, respectivamente. C<sup>+</sup> y C<sup>-</sup>. Control positivo y negativo del PCR, respectivamente.

En el RT-PCR anterior se utilizó los partidores P1 y P3. Como se mencionó anteriormente, el partidador P3 hibrida a la secuencia de ADN de la cola de histidina de la construcción G3-His, es por esto que se encuentra amplificado solo en las líneas transformantes donde el transgén se está transcribiendo, no así en plantas silvestres. La falta de amplificado en las muestras sin RT (Muestras -), indica que no hay contaminación por ADN genómico, por lo cual, el resultado es confiable. De esta imagen se puede concluir que el transgén es transcripcionalmente funcional en las 5 líneas analizadas.

Con el fin de semicuantificar los niveles de expresión de *GONST3*, se utilizó el ADNc obtenido del RT-PCR de líneas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción de ADN G3-His. Para esto, se realizó un PCR en triplicado técnico, utilizando los partidores P1 y P4 por un lado, y los partidores GAPA-F y GAPA-R por otro. Los resultados son relativos a la expresión del gen constitutivo *GAPA* y normalizado a la expresión de una planta silvestre (Figura 15). El programa de PCR utilizado fue "GONST ant" (ver Tabla III) con 30 ciclos, lo cual corresponde a la fase de amplificación exponencial para ambos genes (datos no mostrados)





**Figura 15. Semicuantificación de la abundancia relativa de ARNm de *GONST3* en transformantes G3-His.** **A.** A cada muestra de ADNc se le realizó un PCR con los partidores P1 y P4, y con GAPA-F y GAPA-R, ambos en triplicado técnico. **PM.** Marcador de peso molecular. **+ y -.** Controles positivo y negativo, respectivamente. **B.** Se grafica la abundancia de ARNm de *GONST3-His*, la cual es relativa a la expresión del gen constitutivo *GAPA* y normalizada a la abundancia de una línea silvestre de *Arabidopsis* (**WT**). \*=  $P < 0,05$  en Prueba T de 2 colas.

Del gráfico anterior se puede ver que en todas las líneas analizadas hay un aumento estadísticamente significativo en la acumulación del transcrito de *GONST3*, desde un 44% (línea 7) a un 184% (línea 9) por sobre la expresión de una línea silvestre.

Para determinar la presencia de *GONST3-His*, se realizó un fraccionamiento subcelular de las hojas de plantas silvestres y de las 5 líneas transformantes para obtener una

fracción de membranas enriquecidas en aparato de Golgi y de retículo endoplasmático, compartimentos de la célula donde se podría acumular GONST3. Sin embargo, al realizar un western blot con un anticuerpo anti-His, no se detectó la presencia de una proteína de fusión, lo cual si se pudo ver para un control positivo (datos no mostrados).

Si bien se obtuvieron plantas de *Arabidopsis* transformantes con mayores niveles de expresión, éste aumento no se ve acompañado de un aumento en la acumulación de GONST3, por lo cual estas líneas no constituyen la mejor herramienta para avanzar en la caracterización de GONST3.

#### **4.2.3 Obtención de la construcción pGWB8-GONST3-GFP**

Paralelo a la recombinación de pCR8-GONST3 con la construcción de destinación pGWB8, se recombinó también con la construcción pGWB5 (Nakagawa *et al.*, 2007), la cual se espera que permita la acumulación de la proteína GONST3 con la proteína fluorescente verde (GFP) fusionada en su extremo carboxilo terminal. Los procedimientos de la clonación fueron los mismos que para G3-His y también una colonia resistente al medio de selección fue utilizada para extraer su ADN plasmidial.

Se realizó una digestión enzimática de pGWB5-G3-GFP con la enzima *HindIII*, la cual corta tanto en la secuencia de ADN de GONST3, como en la secuencia de la construcción. Si la recombinación fue exitosa, al digerir con *HindIII* se generará un fragmento 17 kb y otro de 1,2 kb. El producto de la digestión se puede visualizar en la Figura 16.



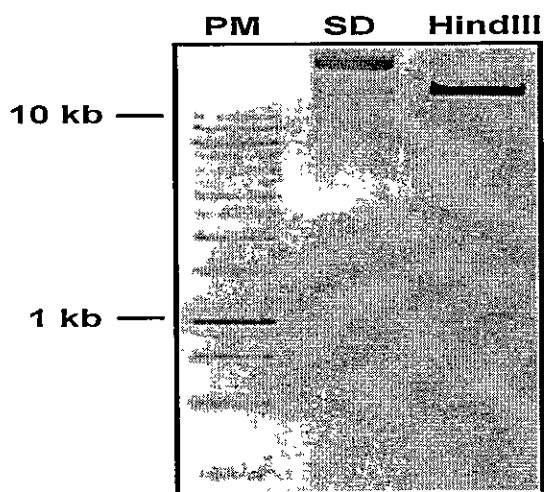


Figura 16. Digestión enzimática de la construcción de ADN pGWB5-GONST3-GFP. La enzima *HindIII* corta una vez en la construcción de ADN y una vez en el inserto de GONST3, generando fragmentos de 17 y 1,2 kb. **SD**. Sin digerir. **HindIII**. Digestión enzimática con la enzima *HindIII*. **PM**. Marcador de peso molecular.

Según la digestión enzimática, se concluye que el marco de lectura abierto de *GONST3* sin incluir el codón de término, se ha insertado correctamente en la construcción de destinación pGWB5, para formar la construcción pGWB5-GONST3-GFP. Luego de transformar *Agrobacterium* con esta construcción, se procedió a transformar hojas de tabaco de forma transitoria para determinar la funcionalidad de la construcción por RT-PCR (Figura 17).

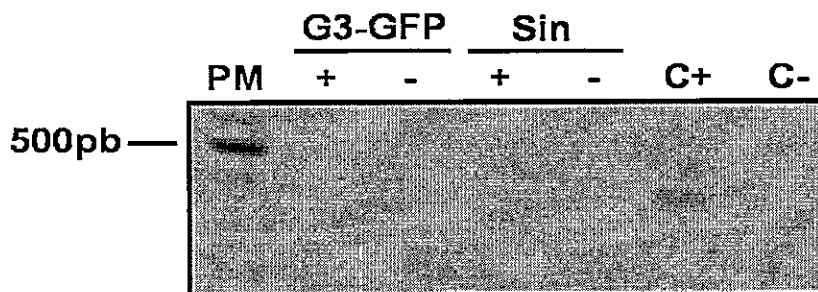


Figura 17. Análisis de la funcionalidad de la construcción de ADN pGWB5-GONST3-GFP. RT-PCR de ARN extraído de hojas de tabaco infiltrado con la construcción de ADN pGWB5-GONST3-GFP (**G3-GFP**) o desde hojas sin infiltrar (**Sin**) utilizando partidores específicos P1 y P4 (ver Figura 5). + y - indica presencia o ausencia de transcriptasa reversa, respectivamente. **C+**, **C-**. Control positivo y negativo de PCR, respectivamente. **PM**. Marcador de peso molecular.

De la imagen anterior se puede ver que la construcción es funcional en plantas al encontrar amplificado en hojas de tabaco infiltrado con la construcción y en el control positivo de PCR.

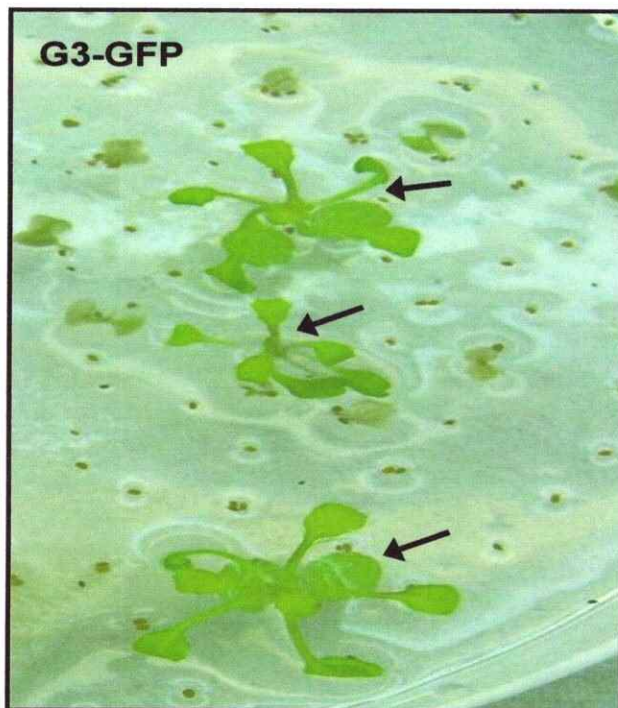
Dado que se observó una acumulación del transcrito *GONST3-GFP* en las hojas de tabaco transformada transitoriamente con la construcción, se procedió a observar la epidermis de dicha hoja mediante microscopía de epifluorescencia para detectar la presencia y patrón de fluorescencia emitida por la proteína de fusión *GONST3-GFP*, y así determinar la localización subcelular de este TNA. Sin embargo, a pesar de realizar 4 intentos, no se observó fluorescencia en los fragmentos de tabaco analizados, la cual si se observó en los controles positivos usados (*AtUtr3-GFP*, localizado en retículo endoplasmático y aparato de Golgi (facilitado por el laboratorio del Dr. Ariel Orellana), y *GONST1-YFP*, localizado en el Golgi (Baldwin *et al.*, 2001), resultados no mostrados). Pensando que algún cambio en el protocolo de transformación permitiría ver la fluorescencia producto de la construcción diseñada, se disminuyó la DO de la suspensión de *Agrobacterium* de 0,8 a 0,6, y 0,4, ya que suspensiones muy concentradas en *Agrobacterium* pueden influir en la efectividad de la transformación, y también se redujo los días después de la infiltración de 5 a 3, ya que las construcciones de ADN ya son activas transcripcionalmente desde el segundo día post infiltración, pero aun así no se encontró fluorescencia.

Esto podría estar ocurriendo dado que la forma de expresión es heteróloga (proteína de *Arabidopsis* expresado en tabaco) y podría haber un mal plegamiento de la proteína de fusión debido a no encontrarse ésta en su ambiente nativo, lo cual impide ver la fluorescencia. Considerando este hecho y habiendo confirmado la funcionalidad de la construcción pGWB5-GONST3-GFP solo mediante RT-PCR, se procedió a transformar plantas de *Arabidopsis* de forma estable, esperando encontrar la acumulación de la

proteína de fusión ahora en su medio nativo. Cerca de 800 semillas obtenidas fueron esterilizadas y luego sembradas en medio MS higromicina. En la tabla V se puede apreciar el número de plantas resistentes y la eficiencia de transformación, mientras que en la Figura 18 se pueden observar 3 de las 15 plantas resistentes, las cuales son distinguibles fácilmente debido a su mayor tamaño.

**Tabla V. Tasa de transformación para *Arabidopsis* transformada con G3-GFP.**

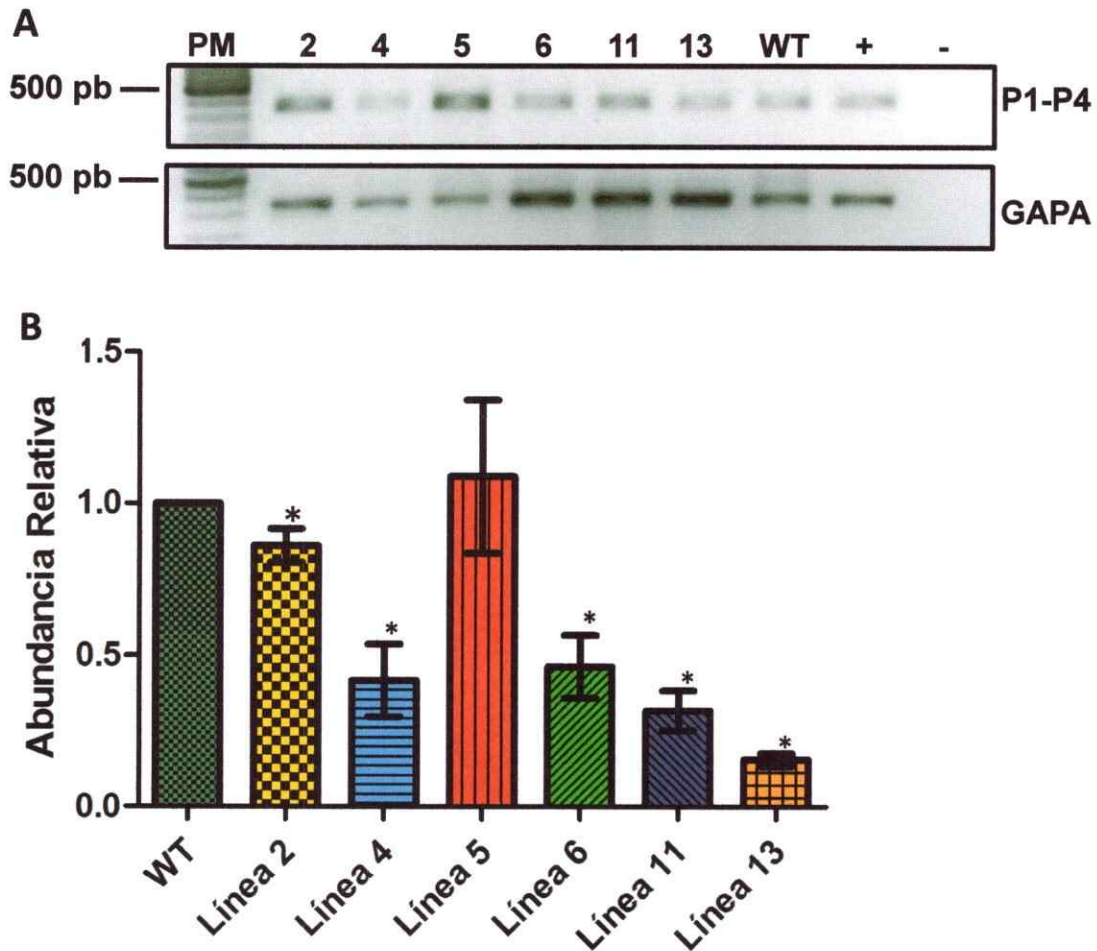
	Semillas Sembradas	Resistentes a Higromicina	Eficiencia de Transformación
Número	800	15	1,86%



**Figura 18. Transformación estable de *Arabidopsis* con el vector pGWB5-GONST3-GFP.** En la figura se muestran las plántulas obtenidas tras 2 semanas de la siembra en medio de selección con higromicina (25  $\mu\text{g/ml}$ ), de las semillas obtenidas a partir de la inmersión floral. Con las flechas se indican tres de las 15 plántulas resistentes obtenidas.

Se crecieron 6 de las trece plantas resistentes, las cuales no se pudieron analizar mediante PCR si son transformantes, dado que no fue posible la estandarización de un

buen protocolo para la utilización de los partidores P1 y P5 (Figura 5). A estas plantas se les extrajo ARN desde hojas caulinares y de roseta al cabo de 4 semanas y como control se utilizó plantas de *Arabidopsis* silvestre. Se procedió a realizar un RT-PCR semicuantitativo, y para esto, utilizando el ADNc obtenido luego de la reacción de RT-PCR, se realizó un PCR en triplicado técnico, utilizando los partidores P1 y P4 (ver Figura 5) por un lado, y los partidores GAPA-F y GAPA-R por otro (Tabla I), con el fin de semicuantificar los niveles de expresión de *GONST3*, relativo a la expresión del gen constitutivo *GAPA* y normalizado a la expresión de una planta silvestre (Figura 19). El programa de PCR utilizado fue "GONST ant" (Tabla III) con 30 ciclos, lo cual corresponde a la fase de amplificación exponencial para ambos genes (datos no mostrados).



**Figura 19. Semicuantificación de la abundancia relativa de ARNm de *GONST3* en transformantes G3-GFP. A.** A cada muestra de ADNc se le realizó un PCR con los partidores P1 y P4 y con GAPA-F y GAPA-R, ambos en triplicado técnico. **PM.** Marcador de peso molecular. **B.** Se grafica la abundancia de ARNm, la cual es relativa a la expresión del gen constitutivo *GAPA* y normalizada a la abundancia de una línea silvestre de *Arabidopsis* (**WT**). \*= $P < 0,05$  en Prueba T de 2 colas.

De la figura anterior se puede ver que en vez de aumentar los niveles de expresión de *GONST3*, estos se encuentran disminuidos de forma significativa en 5 de las 6 líneas analizadas. Por lo tanto, esta construcción ha gatillado silenciamiento génico post-transcripcional por co-supresión, obteniendo un rango de acumulación de *GONST3* de entre 16% (línea 13) y 80% (línea 2) comparado con plantas silvestres. Para

comprobar este hallazgo, se analizaron epicotilos de plantas de 7 días mediante microscopía de epifluorescencia y confocal. No se observó fluorescencia en ninguna de las 6 líneas analizadas (2, 4, 5, 6, 11 y 13; datos no mostrados) y al realizar un western blot utilizando un anticuerpo anti-GFP tampoco se detectó una proteína de fusión (datos no mostrados). Estos resultados avalan la hipótesis de que se ha gatillado silenciamiento génico post-transcripcional, dado que por RT-PCR en tabaco se vio que la construcción si es funcional (Figura 17). Este resultado es inesperado, sin embargo, las líneas obtenidas en el Seminario de Título, son las únicas descritas hasta el momento que poseen menores niveles de expresión de *GONST3*, con lo cual se cumplió con el objetivo 2.2.1. Estas líneas representan una importante herramienta para la realización de estudios fenotípicos, lo cual aportaría importante información sobre este TNA.

## 5. Discusión

Un número limitado de glicoconjugados vegetales - los polisacáridos (xiloglucano y RGII) y las glicoproteínas (N-glicanos y AGPs) - se encuentran fucosilados y/o L-galactosilados. Análisis bioinformáticos sugieren que GONST3 podría ser el transportador que importa GDP-fucosa y/o GDP L-galactosa hacia el lumen del aparato de Golgi para la glicosilación de las ramificaciones de estas macromoléculas. En el presente seminario de título se plantearon los objetivos de generar herramientas moleculares para la obtención de plantas de *Arabidopsis* que tuvieran niveles de expresión de GONST3 alterados comparados con plantas silvestres.

Para intentar reducir la expresión de GONST3 mediante RNAi, se utilizó el vector pHELLSGATE-12-GONST3 el cual posee clonado un fragmento de 350 pb en sentido y en antisentido (ver Figura 5), separados por un intrón, por lo que, luego de la transcripción de estos fragmentos, el ARNm es capaz de auto-hibridar por complementariedad, formando un ARN de doble hebra, el cual se esperaba que fuera capaz de gatillar SGPT.

La funcionalidad transcripcional de esta construcción fue comprobada mediante RT-PCR (Figura 7) y plantas de *Arabidopsis* fueron transformadas de forma estable. Sin embargo, al sembrar las semillas de estas plantas, no se obtuvieron plantas resistentes al medio de selección, las cuales si fueron capaces de germinar en un medio carente de antibióticos. Esto podría estar ocurriendo por 2 razones. Una de ellas es que el gen *NptII*, cuyo producto génico le otorga resistencia a kanamicina a las plantas, estuviera silenciado, lo que ha sido ya descrito en otros modelos, donde al crecer las plantas sin medio de selección es posible encontrar transformantes al analizarlos mediante PCR (Fladung, 1999; Domínguez *et al.*, 2002). La otra posibilidad es que hubiese ocurrido

algún error en la transformación o que las flores no se hayan encontrado en un estado receptivo, es decir, que éstas ya hayan sido autopolinizadas y las semillas ya estaban en formación, por lo cual no fueron susceptibles a transformación genética.

Es importante destacar que la carencia de transformantes no se debe a que la disminución de los niveles de expresión de *GONST3* sea letal, dado que en el marco de este Seminario de Título, se encontró plantas de *Arabidopsis* con hasta un 84% menor expresión de este TNA respecto de una línea silvestre (ver Figura 20). Además, cada evento de transformación es independiente y al azar, por lo que mediante la técnica utilizada se obtienen grados de silenciamiento. Según esto, se debería haber encontrado transformantes con, a lo menos, un bajo porcentaje de SGPT.

Resulta curioso, y vale la pena mencionar, la carencia de líneas silenciadas en *GONST3* por RNAi en los bancos de semillas generados por proyectos internacionales, cuyo objetivo es reducir sistemáticamente la expresión de cada uno de los ~25.000 genes presentes en *Arabidopsis*. Entre ellos se encuentra el consorcio AGRIKOLA (*Arabidopsis* Genomic RNAi Knock-out Line Analysis) de la Unión Europea (Hilson *et al.*, 2004). Sin embargo, en este consorcio, sí se dispone de líneas de RNAi para *GONST4*, TNA que se supone tendría características fisiológicas y bioquímicas similares a *GONST3*.

Una alternativa que se propone para solucionar los problemas que surgieron en esta parte del trabajo, es la utilización de construcciones de ADN para RNAi inducibles por diversos compuestos, por ejemplo, inducibles por la hormona dexametasona (Wielopolska *et al.*, 2005), la cual permite una activación del RNAi en el estadio de desarrollo que se estime conveniente, mediante la aplicación exógena de la hormona, mientras que al no agregar ésta, no se transcribe el RNAi.



Otro de los objetivos del seminario de título fue aumentar los niveles de expresión de *GONST3* y para esto se desarrollaron 2 construcciones de ADN, una de ellas (G3-His) debería haber permitido la acumulación de una proteína de fusión de *GONST3* con una cola de 6 histidinas en su extremo carboxilo terminal, mientras que la otra construcción (G3-GFP), debería haber generado una proteína de fusión entre *GONST3* y la proteína fluorescente verde (ver Figura 5).

Mediante RT-PCR a hojas de tabaco transformadas transitoriamente con cada construcción, se confirmó la funcionalidad transcripcional de ellas (ver Figura 12 y 19, respectivamente), por lo cual se transformó *Arabidopsis* de forma estable con cada una de estas construcciones.

Al realizar una semicuantificación de los niveles de expresión de *GONST3* en cinco de las líneas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción G3-His, se encontraron que en todas las líneas analizadas hay un aumento significativo entre un 44% y un 184% respecto de una línea silvestre en la acumulación total de transcritos del TNA (tanto *GONST3* endógeno como *GONST3-His*) (ver Figura 16). Sin embargo, a pesar de que la construcción es funcional transcripcionalmente en planta y aumenta los niveles de expresión de *GONST3*, no se detectó la proteína de fusión al realizar un western blot utilizando un anticuerpo anti-His. Esto indica que, probablemente, el ARNm no se estaría traduciendo (aunque la estrategia de clonación implementada asegura que *GONST3* se encuentra en marco lectura con la cola poli-histidina) o también podría ocurrir que la proteína de fusión no está siendo bien plegada y en vez de acumularse se está degradando por el control de calidad de la célula. Estas líneas obtenidas permitieron cumplir con el objetivo 2.2.2 del trabajo, sin embargo no constituyen una buena herramienta para la caracterización de *GONST3*, dado que no

se consiguió un aumento en la acumulación de este TNA.

Por otro lado, al realizar un western blot a vesículas de Golgi y retículo endoplasmático extraídas desde hojas de tabaco infiltradas con la construcción G3-GFP, no se detectó la proteína de fusión y tampoco se observó fluorescencia al analizar la epidermis, por lo que se planteó la posibilidad de que esto ocurriera dado que la expresión es en un sistema heterólogo (proteína de *Arabidopsis* acumulada en tabaco). Considerando este hecho, se decidió transformar *Arabidopsis* de forma estable con esta construcción para corroborar esta hipótesis.

A las líneas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción G3-GFP, se les realizó una semicuantificación de los niveles de expresión de *GONST3*, encontrándose que se gatilló silenciamiento génico post-transcripcional por co-supresión, obteniendo un rango de acumulación de *GONST3* de entre 16% y 80% comparado con plantas silvestres (ver Figura 20). La co-supresión es otra forma de lograr SGPT. Este tipo de silenciamiento fue inicialmente descrito en la planta de petunia, donde se sobreexpresó el gen de la chalcona sintasa *chsA*, utilizando una construcción de ADN que poseía el promotor 35S, al igual que las construcciones utilizadas en el Seminario de Título (Napoli *et al.*, 1990). El gatillante del SGPT, en esta situación, se debería a la existencia y acumulación de una población de ARNm aberrante, en cuanto a su estructura tridimensional o a su procesamiento, entre los transcritos producidos.

En un estado de pre-silenciamiento, la tasa de transcripción podría resultar en un prominente flujo de transcritos correctamente procesados desde el núcleo al citosol, sin embargo, en secuencias génicas particulares, como en el caso de *GONST3*, que no posee intrones (Handford *et al.*, 2004), sumado al hecho de la generación de una fusión génica a GFP, aumenta la posibilidad de generar moléculas de ARN aberrante.

Estas moléculas aberrantes no son reconocidas por los ribosomas en el citosol, por lo cual son reconocidas como ARN no productivo, el cual es enviado al núcleo.

Una vez en el núcleo, estas moléculas de ARN no productivo, son capaces de unirse al ADN, formando híbridos, lo cual lleva a la producción de cortas moléculas de ARN antisentido. Luego las moléculas pequeñas de ARN antisentido son exportadas al citosol, donde se unen a degradosomas, que son los encargados de degradar el ARNm endógeno, estado donde se ha gatillado el silenciamiento génico (Depicker y Montegu, 1997).

Corroborando la hipótesis de que SGPT había sido gatillado en las plantas transformadas con GONST3-GFP es que, al realizar un western blot a vesículas de aparato de Golgi y retículo endoplasmático de estas líneas (compartimentos donde se podría localizar este TNA), utilizando un anticuerpo anti-GFP, tampoco se encontró una banda que identificara la proteína de fusión. Esto concuerda con la carencia de fluorescencia al analizar estas líneas mediante microscopía de epifluorescencia y confocal. Es por esto que el tipo de silenciamiento génico sería en trans, es decir, el ARN transcrito tanto desde el transgén, como el gen homólogo (*GONST3*) es degradado (Fagard y Vaucheret, 2000). Sin embargo, el hecho de que se haya gatillado SGPT en *Arabidopsis* impide concluir si la falta de fluorescencia en tabaco es producto del organismo elegido como modelo heterólogo, o porque fusiones C-terminales a *GONST3* son inestables. En relación a la segunda alternativa, en el marco de este Seminario se realizaron 2 fusiones de este tipo (G3-GFP y G3-His) y anterior a este trabajo se habían realizado 3 construcciones más, que también generan fusiones C-terminales (pK7FWG2-G3-GFP (datos no publicados), pVKH18En6-G3-GFP (Handford *et al.*, 2004) y pBI121-G3-V5-His (datos no publicados). En ninguno de los casos ha sido posible detectar la presencia de la proteína de fusión).

En el caso de haber una inestabilidad, debido a las distintas fusiones de GONST3, el problema podría encontrarse en el ARNm. Sin embargo, dado que para el caso de G3-His se detectó un aumento estadísticamente significativo de GONST3 en las líneas de *Arabidopsis* analizadas, y para la línea 5 de la serie G3-GFP, los niveles de expresión son iguales a una línea silvestre, no se puede descartar que el problema se encuentre en la proteína que se puede estar acumulando.

Una posible explicación para la falta de acumulación de las proteínas de fusión, se puede encontrar en el hecho de que en levadura y en mamíferos, se han identificado varias clases de señales de exportación desde el retículo endoplasmático. Una de estas señales, son los motivos diacídicos, quienes serían los responsables de la destinación de proteínas hacia el aparato de Golgi y corresponden a 2 residuos acídicos separados por otro aminoácido, representados comúnmente de la forma DXE (Asp-X-Glu) o DXD (Asp-X-Asp). Estos motivos también son funcionales en proteínas vegetales, incluyendo GONST1 (Hanton *et al.*, 2005). En el caso del TNA GONST1, se describió un dominio diacídico del tipo DXE en su extremo N-terminal, el cual también es posible encontrarlo en GONST3 (Figura 20). Sin embargo, en el caso de este último TNA, existen otros dominios diacídicos en su extremo C-terminal, y por lo tanto, al realizar fusiones C-terminales se podría estar alterando esta señal de exportación, lo cual podría llevar a una errónea destinación de la proteína de fusión, activándose la maquinaria de degradación.

## N-terminal

```
GONST3 -----MSTNDEENGTVIEVKNVPEPSPETWYSVFLRQASVYG----- 37
GONST4 -----MSSSRFDSN-----KQLTTSS----- 16
GONST1 -----MKLYERDGVDL-----EDGKTIVKSG-----GDKP-----I 25
GONST2 MSAVKLEAIVCHEPEDESELHSLSDNGSKTKNGVVFQLLDQKSSEHRWFSEFLWRRRYL 60
```

## C-terminal

```
GONST3 GTLGLLVCMFGGVMYQQST-IKKPNATQEAKPQEQDEEQEKLEMQENKESNSVDIKETLKSEEKL 372
GONST4 GLVCLLFTICGGVGYQQSVKLDKPIEKVSEKFDSEKRGEEDEELTQLVPGKLASVV----- 341
GONST1 NSASILFGLVAGVVFARAKMREKS----- 333
GONST2 NLFSILFGLFAGVVFARAKMS----- 375
```

**Figura 20. Análisis de la Presencia de Dominios Diacídicos en 4 TNAs de la Familia GONST.** En azul se muestran los residuos aminoacídicos ácidos y los dominios diacídicos encontrados están resaltados en amarillo. El alineamiento se realizó utilizando ClustaW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

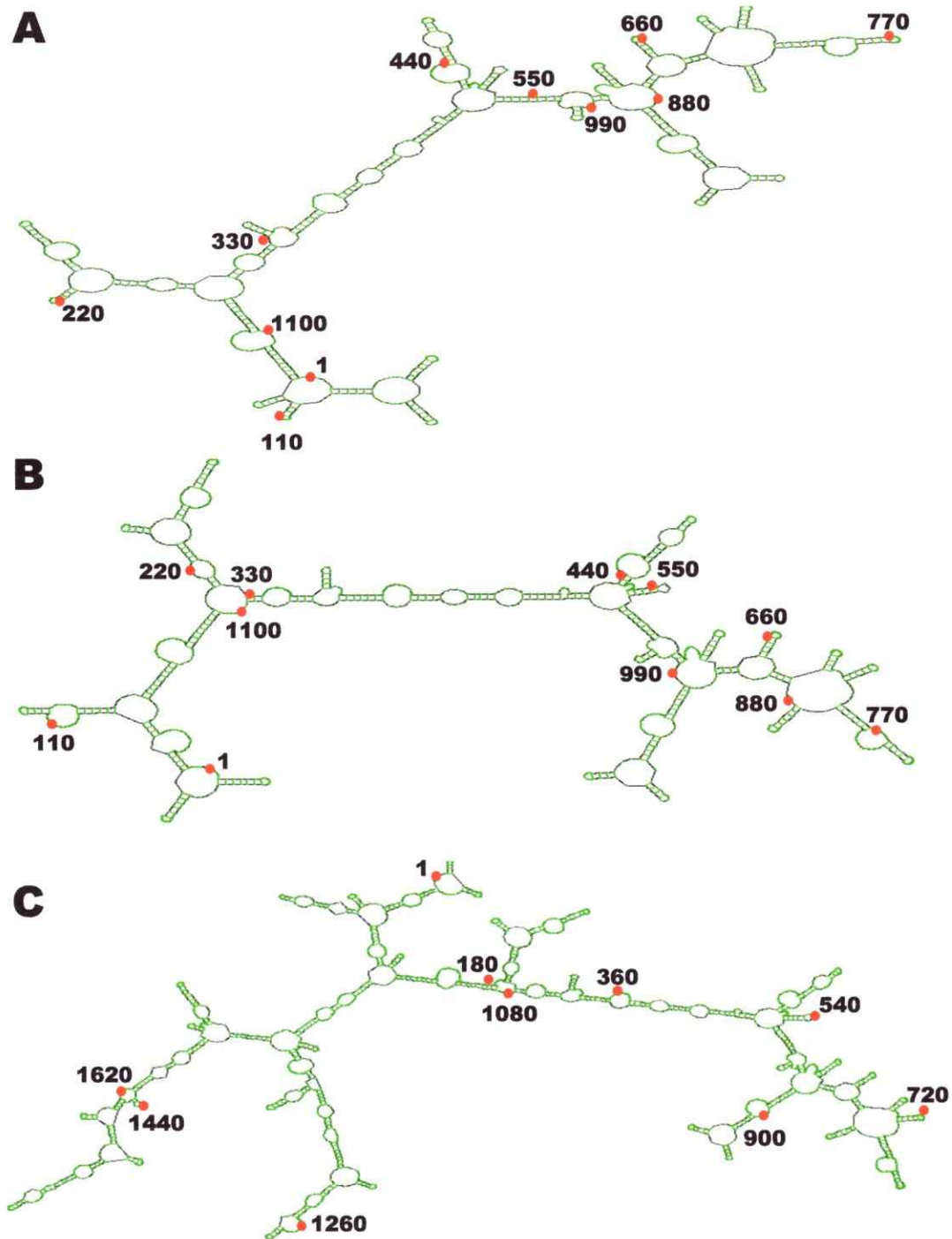
Mediante lo anterior, se puede explicar la carencia de las proteínas de fusión G3-His y G3-GFP luego de los análisis realizados, sin embargo no explica por qué en el caso de las líneas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción G3-His hay un aumento de los niveles de expresión de GONST3, mientras que en 4 de las 5 líneas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción G3-GFP se habría gatillado SGPT. Una posible explicación se basa en la estabilidad de los ARNm de cada proteína de fusión. Para esto se analizó la energía libre para la formación de la estructura del ARNm de GONST3, de GONST3-His y de GONST3-GFP (Figura 21), encontrándose los valores de -174,1, -182,2 y -375,8 kcal/mol, respectivamente.

Según esto, se puede ver que la fusión de GONST3 a GFP, generó un ARNm que es ~2 veces más estable que los otros, por lo tanto aumentaron de tal forma los niveles de expresión de GONST3-GFP, que se alcanzó el umbral necesario para gatillar SGPT por co-supresión, como ya se mencionó anteriormente.

Una posible solución para poder sobreexpresar GONST3, es por lo tanto, la utilización de construcciones que permitan la acumulación de una proteína de fusión N-terminal,

como por ejemplo pGWB12 (Nakagawa *et al.*, 2007), que fusiona el epítipo FLAG (DYKDDDDK) al gen de interés. También es una posibilidad la de utilizar construcciones de expresión con promotores inducibles, con lo cual se puede controlar los niveles de expresión y el estadio de desarrollo en que se induce el transgén.

A pesar de que en las líneas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción G3-GFP no se pudo analizar la localización subcelular de GONST3, estas constituyen un gran avance para el estudio de éste TNA, ya que representan la única forma de abordar el análisis de plantas con menores niveles de expresión de GONST3, dada la carencia de líneas transformantes por RNAi o de mutantes insercionales para este TNA en ninguno de los bancos de semillas existentes.



**Figura 21. Análisis de la estabilidad del ARNm de *GONST3*, *GONST3-His* y *GONST3-GFP*.** A. Estructura del ARNm de *GONST3*, con una energía libre de formación de  $-174,1$  kcal/mol. B. ARNm de *GONST3-His*, posee una energía libre de formación de  $-182,2$ . C. ARNm de *GONST3-GFP*, posee una energía libre de formación de  $-375,8$  kcal/mol. Se indican los números de bases de cada secuencia. Se utilizó el programa online RNA secondary structure prediction ([http://www.genebee.msu.su/services/rna2\\_reduced.html](http://www.genebee.msu.su/services/rna2_reduced.html)).

## 6. Conclusiones

- Se confirmó la funcionalidad transcripcional de la construcción pHELLSGATE12-GONST3-RNAi mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco. Sin embargo, al transformar *Arabidopsis* en forma estable, no se encontraron plantas transformantes.
- Se realizaron las construcciones de sobreexpresión pGWB8-GONST3-His y pGWB5-GONST3-GFP, las cuales se corroboraron su funcionalidad mediante RT-PCR de hojas de tabaco transformadas transitoriamente.
- Al transformar *Arabidopsis*, la construcción pGWB8-GONST3-His permitió aumentar los niveles de expresión de *GONST3 in vivo*, sin embargo no fue detectada la proteína de fusión GONST3-His.
- Al transformar *Arabidopsis*, la construcción pGWB5-GONST3-GFP gatilló SGPT por co-supresión, por lo cual no se observó la proteína de fusión GONST3-GFP.
- GONST3 podría ser inestable al poseer fusiones C-terminales, posiblemente porque dichas fusiones interfieren con las señales de exportación desde el retículo al Golgi.
- Las líneas de *Arabidopsis* transformantes con la construcción GONST3-GFP, constituyen una importante herramienta para la caracterización de *GONST3*, dado que son las únicas descritas con menor nivel de expresión de este TNA.



## 7. Proyecciones

Como proyección al trabajo realizado, se seguirán analizando las líneas *Arabidopsis* transformadas con la construcción GONST3-GFP. En estas líneas se analizará tanto la morfología, para determinar el rol funcional de este TNA, como aspectos bioquímicos, donde se analizará la composición de la pared celular, específicamente viendo el patrón de fucosilación y de L-galactosilación. Los glicoconjugados fucosilados que utilizan como fuente la GDP-fucosa son el xiloglucano, los N-glicanos, las proteínas arabinogalactano y el RGII, mientras que el glicoconjugado que utiliza como fuente la GDP-L-galactosa es sólo el RGII. En las mutantes simples, si existiera un defecto en algunos pero no todos los glicoconjugados analizados, esto entregará evidencia funcional de la existencia de complejos multiprotéicos, avalando (o no) el modelo en Figura 2C.

En estos análisis, se utilizarán líneas transformantes y silvestres de *Arabidopsis*, analizando tanto raíces como hojas, por separado, lo cual entregará información sobre la organización metabólica del aparato de Golgi.

Además en estas líneas, se realizarán ensayos de transporte a vesículas de Golgi y de retículo endoplasmático obtenidas por gradiente discontinuo de sacarosa, incubándolas con una solución que contiene los nucleótidos-azúcar marcados radioactivamente GDP-fucosa, UDP-glucosa (control) disponibles comercialmente o GDP-L-galactosa (sintetizado en el laboratorio a partir de GDP-manosa, Wolucka et al., 2001).

Otra proyección es la realización de construcciones de ADN que permitan dilucidar la especificidad de sustrato y localización subcelular de GONST3, generando fusiones N-terminales.

## 8. Bibliografía

- Abeijon C, Mandon E, Robbins P, Hirschberg C.** 1996. A Mutant Yeast Deficient in Golgi Transport of Uridine Diphosphate *N*-Acetylglucosamine. *AmSoc Bioch Mol Biol* 271:8851-8854.
- Agrawal N, Dasaradhi P, Mohammed A, Malhorta P, Bhatnagar R, Mukherjee S.** 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microb and Mol Biol Rev* 67:657-685.
- Atalla R.** 1995. Cellulose and the hemicelluloses: patterns for cell wall architecture and the assembly of lignin. 8<sup>th</sup> simposium on wood and pulping chemistry June 6-9 Helsinki, Finland, p 77-84.
- Baldwin T, Handford M, Yuseff M, Orellana A, Dupree P.** 2001. Identification and Characterization of GONST1, a Golgi-Localized GDP-Mannose Transporter in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13:2283-2295.
- Baulcombe D.** 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431:356-363.
- Bakker H, Routier F, Oelmann S, Jordi W, Lommen A, Gerardy-Schahn R, Bosch D.** 2004. Molecular cloning of two *Arabidopsis* UDP-galactose transporters by complementation of a deficient Chinese hamster ovary cell line. *Glycob* 15:193-200.
- Bonin C, Potter I, Vanzin G, Reiter W.** 1997. The *MUR1* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalyzing the first step in the de novo synthesis of GDP-L-fucose. *Plant Biol* 94:2085-2090.
- Brown R, Saxena I, Kudlicka K.** 1996. Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends In Plant Sci* 1:149-156.
- Caffaro C, Hirschberg C, Berninsone P.** 2006. Independent and simultaneous translocation of two substrates by a nucleotide sugar transporter. *PNAS* 103:16176-16681.
- Carpita N, McCann M.** 2000. The cell wall. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. capítulo 2. Editado por Buchanan B. p 52-108. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.
- Carpita N, Tierney M, Campbel M.** 2001. Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. *Plant Mol Biol* 47:1-5.
- Cosgrove D.** 2006. Growth of the plant cell wall. *Nature* 6:580-861.
- Csala M, Marcolongo P, Lizák B, Senesi S, Margittai E, Fulceri R, Magyar J, Benedetti A, Bánhegyi G.** 2007. Transport and transporters in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768:1325-1341.

- Dean N, Zhang Y, Poster J.** 1997. The VRG4 Gene is Required for GDP-mannose Transport into the Lumen of the Golgi in the Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**:31908-31914.
- Depicker A, Montagu M.** 1997. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Curr. Op. in Cell Biol* **9**:373-382.
- Domínguez A, Fagoaga C, Navarro L, Moreno P, Peña L.** 2002. Regeneration of transgenic citrus plants under non selective conditions results in high-frequency recovery of plants with silenced transgenes. *Mol Genet Genom* **267**:544-556.
- Fagard M, Vaucheret H.** 2000. (Trans) gene silencing in plants: how many mechanisms?. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**:167-194.
- Fladung M.** 1999. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*).I. Flanking DNA sequences and T-DNA structure. *Mol Gen Genet* **260**:574-581
- Gao X, Nishikawa A, Dean N.** 2001. Identification of a conserved motif in the yeast golgi GDP-mannose transporter required for binding to nucleotide sugar. *J Biol Chem* **276**:4424-4432.
- Gibeaut D, Hulett J, Cramer G, Seemann J.** 1997. Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiol* **115**: 317-319.
- Gibeaut D.** 2000. Nucleotide sugars and glycosyltransferases for synthesis of the cell wall matrix polysaccharides. *Plant Physiol Biochem* **38**:69-80.
- Handford M, Sicilia F, Brandizzi F, Chung J, Dupre P.** 2004. *Arabidopsis thaliana* expresses multiple Golgi-localised nucleotide-sugar transporters related to GONST1. *Mol Genet Genom* **272**:397-410.
- Handford M.** 2006. Biosynthesis of Plant Cell Walls. *Cien Inv Agr* **33**:179-196.
- Hanton S, Renna L, Bortolotti L, Chatre L, Stefano G, Brandizzi F.** 2005. Diacidic Motifs Influence the Export of Transmembrane Proteins from the Endoplasmic Reticulum in Plant Cells. *The Plant Cell* **17**:3081-3093.
- Hassid W, Neufeld E, Feinglod D.** 1959. Sugar nucleotides in the interconversion of carbohydrates in higher plants. *Proc Nat Ac Sci* **45**:905-915.
- Helliwell C, Waterhouse P.** 2003. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods* **30**:289-295.
- Helmus Y, Denecke J, Yakubenia S, Robinson P, Lühn K, Watson D, McGrogan P, Vestweber D, Marquardt T, Wild M.** 2006. Leukocyte adhesion deficiency II patients with a dual defect of the GDP-fucose transporter. *Immunobiol* **107**:3959-3966.
- Hilson P, Allemeersch J, Altmann T, Aubourg S, Avon A, Beynon J, Bhalerao RP,**

- Bitton F, Caboche M, Cannoot B, Chardakov V, Cognet-Holliger C, Colot V, Crowe M, Darimont C, Durinck S, Eickhoff H, Falcon de Longevialle A, Farmer EE, Grant M, Kuiper MTR, Lehrach H, Léon C, Leyva A, Lundeberg J, Lurin C, Moreau Y, Nietfeld W, Paz-Ares J, Reymond P, Rouzé P, Sandberg G, Dolores Segura M, Serizet C, Tabrett A, Taconnat L, Thareau V, Van Hummelen P, Vercruyse S, Vuylsteke M, Weingartner M, Weisbeek P J, Wirta V, Wittink FRA, Zabeau M, Small I. 2004. Versatile gene-specific sequence tags for *Arabidopsis* functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications. *Gen Res* 14:2176-2189.
- Höfllich J, Berninsone P, Göbel C, Gravato-Nobre M, Libby B, Darby C, Politz S, Hodgkin J, Hirschberg C, Baumeister R. 2004. Loss of *srf-3*-encoded Nucleotide Sugar Transporter Activity in *Caenorhabditis elegans* Alters Surface Antigenicity and Prevents Bacterial Adherence. *J Biol Chem* 279:30440-30448.
- Hong K, Ma D, Beverley S, Turco S. 1999. The *Leishmania* GDP-Mannose Transporter Is an Autonomous, Multi-specific, Hexameric Complex of LPG2 Subunits. *Biochem* 39:2013-2022.
- Jefferson R, Kavanagh T, Bevan N. 1987. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journ* 6:3901-3907.
- Kang T, Yang M. 2004. Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic plants. *BMC Biotech* 4:20-32
- 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.
- Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Rayon C, Fischette-Lainé A, Gomord V, Faye L. 1998. N-Glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol Biol* 38:31-48.
- Lübke T, Marquardt T, Etzioni A, Hartmann E, von Figura K, Körner C. 2001. Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. *Nat Genet* 28:73-76.
- Lühn K, Laskowska A, Pielage J, Klämbt C, Ipe U, Vestweber D, Wild M. 2004. Identification and molecular cloning of a functional GDP-fucose transporter in *Drosophila melanogaster*. *Exp Cell Res* 301:242-250.
- McCann MC, Roberts K. 1991. Architecture of the primary cell wall. In *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form* (CW Lloyd ed), *Academic Press*, p. 109-129.
- Martinez M, Limones V, Cabrera J, Herrera L. 2004. Improving Transformation Efficiency of *Arabidopsis thaliana* by Modifying the Floral Dip Method. *Plant Mol Biol*

22:63-70.

- Murashige T. and Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Phys Plant* **15**:473-497.
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jimbo T, Kimura T.** 2007. Development of Series of Gateway Binary Vectors, pGWBs, for Realizing Efficient Construction of Fusion Genes for Plant Transformation. *J Bios and Bioeng* **104**:34-41.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R.** 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell* **2**:279-209.
- Norambuena L, Marchant L, Bernisone P, Hirschberg CB, 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**:32923-32929.
- 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.
- Perrin R, Jia Z, Wagner T, O'Neill M, Sarria R, York W, Raikhel N, Keegstra K.** 2003. Analysis of Xyloglucan Fucosylation in *Arabidopsis*. *Plant Phys* **132**:768-778.
- Reiter W, Chapple C, Somerville C.** 1993. Altered growth and cell walls in a fucose-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Science* **261**:1032-1035.
- Reiter W.** 2002. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* **5**:536-542.
- Reyes F, Orellana A.** 2008. Golgi transporters: opening the gate to cell wall polysaccharide biosynthesis. *Curr Op Plant Biol* **11**:244-251.
- Ross J, Li Y, Lim E, Bowles D.** 2001. Higher plant glycosyltransferases. *Gen Biol* **2**:3004.1-3004.6.
- Scheller H, Jensen J, Sørensen S, Harholt J, Geshi N.** 2007. Biosynthesis of pectin. *Phys Plant* **129**:283-295.
- Seifert G.** 2004. Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to outside. *Curr Opin Plant Biol* **7**:277-284.
- Selva E, Hong K, Gaeg G, Beverley S, Turco S, Perrimon N, Häcker U.** 2001. Dual role of the *fringe connection* gene in both heparan sulphate and *fringe*-dependent signalling events. *Nat Cell Biol* **3**:809-815.
- Showalter A.** 2001. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *CMLS* **58**:1399-1417.

- Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, Fujimoto E, Goeke N, Olson B and Klenk D.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**:76-85.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium.** 1998. Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* **282**:2012–2018.
- Vorwek S, Somerville S, Somerville C.** 2004. The role of plant cell polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci* **9**:203-209.
- Wielopolska A, Townley H, Moore I, Waterhouse P, Helliwell.** 2005. A high-throughput inducible RNAi vector for plants. *Plant Biotech Jour* **3**:583-590.
- Wolucka B, Davey M, Boerjan W.** (2001) A High-Performance Liquid Chromatography Radio Method for Determination of L-Ascorbic Acid and Guanosine-Diphosphate-L-Galactose, Key Metabolites of the Plant Vitamin C Pathway. *Anal Biochem* **294**:161–168.