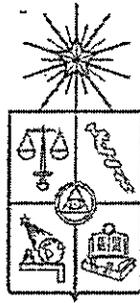


UCH-FC  
Biotecnología  
T693  
C-1

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



**INCORPORACION DE NUCLEOTIDOS AZUCARES EN VESICULAS DE  
APARATO DE GOLGI DE PLANTAS 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

**RAFAEL PABLO TORRES BRAVO**



**Director de Seminario de Título: Dr. Ariel Orellana López**

**2011**

**Santiago-Chile**



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

**RAFAEL PABLO TORRES BRAVO**

### **“INCORPORACIÓN DE NUCLEOTIDOS AZUCARES EN VESÍCULAS DE APARATO DE GOLGI DE PLANTAS 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

Dr. Ariel Orellana López  
**Director Seminario de Título**

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

Dra. Lorena Norambuena Morales  
**Presidenta Comisión**

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.  
Un sello circular en tinta azul que contiene el texto: "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL", "U. DE CHILE".

Dr. Michael Handford  
**Evaluador**

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.



Este trabajo se lo dedico a toda mi familia por su gran apoyo durante toda mi vida.

**DEDICATORIA**



Le agradezco sinceramente a Francisca Reyes por su gran apoyo, al grupo de amigos y profesores del laboratorio de Plantas de la Facultad de Ciencias por los buenos momentos vividos durante la realización de este trabajo, y a mi actual grupo de laboratorio, Laboratorio de Biotecnología del INTA, por su gran aporte a mi carrera profesional.

**AGRADECIMIENTOS**



## INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	
AGRADECIMIENTOS .....	iii
INDICE DE CONTENIDO .....	iv
INDICE DE TABLAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
HIPOTESIS .....	11
OBJETIVOS GENERALES.....	11
OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	11
1 Obtener y caracterizar fracciones subcelulares de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> . .....	11
2 Caracterizar la incorporación de nucleótidos-azúcar en fracciones subcelulares de <i>Arabidopsis thaliana</i> . .....	12
3 Caracterizar la incorporación de nucleótidos-azúcar en vesículas de aparato de Golgi obtenidas de plantas mutantes en distintos transportadores de nucleótidos azúcar. ....	12
4 Medir actividad de la enzima XG-Fucosiltransferasa en fracciones provenientes del gradiente de sacarosa, luego del fraccionamiento subcelular, de plantas silvestres y mutantes en los transportadores. ....	12
MATERIALES Y METODOS .....	13
MATERIALES .....	13
Material Biológico:.....	13
Reactivos: .....	13
MÉTODOS .....	15
Crecimiento de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> :.....	15
Preparación de una fracción enriquecida en vesículas de Golgi:.....	15
Medición del porcentaje de sacarosa en muestras provenientes del gradiente de sacarosa luego del fraccionamiento subcelular realizado en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> :.....	16
Ensayos de medición de actividad UDPasa: .....	16
Medición de actividad XG-FucTasa:.....	16
Medición de actividad NADH citocromo c reductasa insensible a antimicina A: ...	17
Medición de actividad Glucosidasa II: .....	17
Electroforesis en condiciones no denaturantes. Geles Nativos: .....	19
Determinación de actividadde la enzima UDPasa en gel nativo:.....	19
Determinación de proteínas: Método del Ácido Bicinconinico (BCA):.....	19
Integridad de vesículas de Golgi de <i>Arabidopsis thaliana</i> :.....	20
Incorporación de nucleótidos azúcar en fracciones del gradiente:.....	20
Incorporación de nucleótidos azúcar en interfases del gradiente: .....	21
Incorporación de nucleótidos azúcar en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi en dependencia con la temperatura:.....	21
Incorporación de nucleótidos azúcar en fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi: .....	22
Obtención de RNA a partir de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> : .....	22
Experimentos de PCR:.....	23
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):.....	23
Electroforesis de DNA:.....	23
RESULTADOS .....	25
Fraccionamiento Subcelular en <i>Arabidopsis thaliana</i> : .....	25



Incorporación de nucleótidos-azúcar en fracciones subcelulares de <i>Arabidopsis thaliana</i> : .....	28
Incorporación de nucleótidos azúcares en interfases del gradiente obtenido luego del fraccionamiento subcelular: .....	31
Incorporación de nucleótidos azúcares en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi y su dependencia de la temperatura: .....	32
Incorporación de diferentes nucleótidos azúcar en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi: .....	33
Identificación de plantas mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> AtUTr2 y AtUTr7: .....	34
Comparación de actividad UDPasa de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> silvestre y mutantes AtUTr2 y AtUTr7: .....	36
Incorporación de nucleótidos azúcar en gradientes de <i>Arabidopsis thaliana</i> silvestre y en las mutantes para los genes AtUTr2 y AtUTr7: .....	38
Incorporación de nucleótidos azúcar en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> silvestres y mutantes para las proteínas AtUTr2 y AtUTr7, respectivamente: .....	41
Actividad XG-Fucosiltransferasa en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> silvestre y mutante AtUTr7: .....	47
Fraccionamiento subcelular .....	50
Incorporación de Nucleótidos azúcar en plantas mutantes para transportadores de nucleótidos azúcares .....	52
CONCLUSIONES .....	56
PROYECCIONES .....	57
PRESENTACION .....	57
BIBLIOGRAFIA .....	58



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de la síntesis de polisacáridos de pared celular en el aparato de Golgi de células vegetales.....	6
Figura 2. Esquema de fraccionamiento subcelular de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	26
Figura 3. Marcadores de aparato de Golgi. ....	27
Figura 4. Marcadores de retículo endoplasmático. ....	29
Figura 5. Incorporación de distintos nucleótidos azúcar en fracciones de gradientes de <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	30
Figura 6. Incorporación de UDP-glucosa en interfases enriquecidas en GO y RE en función de la temperatura. ....	31
Figura 7. Incorporación de UDP-glucosa <sup>3</sup> H en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi. ....	32
Figura 8. Incorporación de diferentes NA en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi a 25°C durante 3 minutos de incubación. ....	33
Figura 9. Identificación de plantas mutantes.....	35
Figura 10. Medición de actividad UDPasa de vesículas enriquecidas en aparato de Golgi. ....	37
Figura 11. Incorporación relativa de UDP-galactosa [ <sup>3</sup> H] en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	39
Figura 12. Incorporación relativa de GDP-fucosa [ <sup>3</sup> H] en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	40
Figura 13. Incorporación de UDP-galactosa en vesículas de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	44
Figura 14. Incorporación de GDP-fucosa [ <sup>3</sup> H] en vesículas de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	45
Figura 15. Medición de actividad XG-Fucosiltransferasa. ....	49



### INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Partidores utilizados para experimentos de PCR.....	24
Tabla 2. Valores promedio junto a sus desviaciones estándar, de diferentes nucleótidos azúcar incorporados en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi provenientes de plantas de <i>A. Thaliana</i> Col-0. ....	34
Tabla 3. Test de hipótesis para el promedio de Pi liberado por la enzima UDPasa en plantas de <i>A.thaliana</i> . ....	37
Tabla 4. Test de hipótesis para el promedio de pmol incorporados de UDP-galactosa/mg de proteína incorporados en vesículas Golgi de plantas de <i>A.thaliana</i> . ....	42
Tabla 5. Test de hipótesis para el promedio de pmol incorporados de UDP-galactosa/mg de proteína incorporados en vesículas de retículo endoplásmico de plantas de <i>A.thaliana</i> . ....	43
Tabla 6. Test de hipótesis para el promedio de fmol incorporados de GDP-fucosa/mg de proteína, incorporados en vesículas de Aparato de Golgi de plantas de <i>A.thaliana</i> . ....	46
Tabla 7 Test de hipótesis para el promedio de fmol incorporados de GDP-fucosa/mg de proteína, incorporados en vesículas de retículo endoplásmico de plantas de <i>A.thaliana</i> . ....	46
Tabla 8. Test de hipótesis para el promedio de pmol incorporados por la enzima XG-FucTasa en la fracción 9 de gradientes de <i>A.thaliana</i> . ....	48

## ABREVIATURAS

EDTA: Ácido Etilen diamino tetra acético.

GDP: Guanosina 5'-difosfato.

GDP-Fucosa: Guanosina 5'-difosfato- $\beta$ -L-Fucosa.

GTP: Guanosina 5'-trifosfato.

HEPES: Ácido 4 etano-(2-hidroxietil)-piperazino propan osulfónico.

MES: Ácido 4-morfolino etanosulfónico.

NDP: Nucleótido difosfato.

NDP-azúcar: Nucleótido azúcar.

NMP: nucleótido monofosfato.

NDPasa: nucleósido di fosfatasa.

Pi: fosfato inorgánico.

SDS: Dodecilsulfato de sodio.

STM: Sacarosa 0,25 M; Tris-HCl 10 mM pH7,5; MgCl<sub>2</sub> 1mM.

TNA: proteína transportadora de nucleótido-azúcar

Tx-100: Triton X-100.

UDP: Uridina 5'-difosfato.

UDP-Galactosa: Uridina 5'-difosfato- $\beta$ -L-Galactosa

UDP-Glucosa: Uridina 5'-difosfato- $\beta$ -L-Glucosa

UMP: Uridina 5'-monofosfato.

XG: Xiloglucano de Tamarindo

XG-FucTasa: Xiloglucano  $\alpha$ -1,2-Fucosil Transferasa

## RESUMEN

La pared celular de las células vegetales es una estructura compleja formada por polímeros de azúcar ensamblados en una red que además posee proteínas estructurales y enzimas. En *Arabidopsis thaliana* la biosíntesis de polisacáridos no celulósicos se lleva a cabo en el aparato de Golgi, y en ella tendrían un papel preponderante las proteínas transportadoras de nucleótidos azúcar, proteínas que se ubican en la membrana de este organelo. Tales transportadores son los encargados del suministro de nucleótidos azúcar al interior del aparato de Golgi para su utilización en el ensamblaje de polímeros de azúcares, función que desempeñan las glicosiltransferasas.

En este trabajo se estudio "*in planta*" la función de proteínas transportadoras de nucleótidos azúcares mediante la medición de incorporación de estos sustratos en fracciones enriquecidas en aparato de Golgi de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y mutantes en genes que codifican para proteínas transportadoras de nucleótidos azúcar (AtUtr2 y AtUTr7).

Al analizar la incorporación de UDP-galactosa en fracciones de vesículas enriquecidas en aparato de Golgi provenientes de plantas silvestres, mutantes para la proteína AtUtr2 y mutantes para la proteína AtUTr7, se observó que la incorporación de UDP-galactosa no se ve afectada en las plantas mutantes en comparación con las plantas silvestres. Sin embargo, al analizar la incorporación de GDP-fucosa en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi de plantas mutantes para AtUTr7, se observó que disminuye significativamente respecto de las plantas silvestres.

## ABSTRACT

The cell wall of plant cells is a complex structure assembled by sugar polymers in a network that also has structural proteins and enzymes. In *Arabidopsis thaliana* the biosynthesis of non-cellulosic polysaccharides occurs in the Golgi apparatus, and it would have a role of sugar nucleotide transport proteins, proteins that are located in the membrane of this organelle. These transporters are responsible for the supply of sugar nucleotides into the Golgi apparatus for use in the assembly of polymers of sugars, glycosyltransferases role.

In this work we study "in plant" the role of sugar nucleotide transport proteins by measuring the incorporation of these substrates in fractions enriched in Golgi apparatus of *Arabidopsis thaliana* wild plants and mutants in genes coding for sugar nucleotide transport proteins (AtUtr2 and AtUTr7).

In analyzing the incorporation of UDP-galactose in fractions of vesicles enriched in Golgi apparatus from wild plants, protein mutants and mutant AtUtr2 AtUTr7 protein, we observed that the incorporation of UDP-galactose is not affected in plants mutant compared with wild plants. However, when analyzing the incorporation of GDP-fucose in vesicles enriched in Golgi AtUTr7 mutant plants was observed to decrease significantly from wild plants.

## INTRODUCCION

### La Pared celular

Las células vegetales poseen varias estructuras que las distingue de las células animales: una de éstas es la pared celular. Esta matriz extracelular le entrega características importantes a la célula vegetal: le da forma y rigidez, participa en la comunicación intercelular, favorece la resistencia mecánica y le permite defenderse frente al ataque de patógenos (Brett y Waldron , 1996).

La pared celular es una estructura compleja formada por polímeros de azúcar ensamblados en una red que además posee proteínas estructurales y enzimas, más lignina. La pared celular se puede clasificar en dos tipos: la pared primaria, presente en todas las células vegetales y la pared secundaria que se encuentra sólo en algunos tipos celulares en estado adulto. La pared celular primaria está compuesta por glicoproteínas y polisacáridos tales como celulosa, hemicelulosa y pectina, siendo estos dos últimos, un 70% del total de polisacáridos (Carpita y Gibeau, 1993). Por otro lado la pared celular secundaria está formada por lignina y polisacáridos siendo los principales la celulosa y la hemicelulosa (Carpita y Gibeau, 1993)..Entre las hemicelulosas más importantes esta el xiloglucano, que es la hemicelulosa más abundante en la pared celular primaria de las plantas dicotiledóneas. Esta constituido por una cadena lineal de glucosas sustituidas entre un 50-75% por residuos de xilosa. Estos residuos de xilosa pueden estar sustituidos en específicas posiciones por residuos de galactosa, los que a su vez pueden ser sustituidos por residuos de fucosa, esta última acción, se lleva a cabo en el aparato de Golgi, mediante la acción de la enzima Fucosiltransfera (Farkas y Maclachlan, 1998).

La biosíntesis de polisacáridos no celulósicos se lleva a cabo en el lumen del aparato de Golgi y en ella participan numerosas enzimas, entre las cuales están las glicosiltransferasas, cuya función es transferir específicamente un azúcar al polímero que está siendo sintetizado (Reid, 2000; Keegstra y Raikhel, 2001). Sin embargo, para que este residuo de azúcar sea reconocido por las glicosiltransferasas e incorporado al polímero en elongación se debe encontrar en su forma activada, es decir como nucleótido-azúcar (Bonin y cols., 1997; Dörman y Benning, 1998). Varias de las glicosiltransferasas descritas tienen su sitio catalítico orientado hacia el lumen del aparato de Golgi (Price, y cols, 2002). Sin embargo, la mayoría de los nucleótidos azúcar son sintetizados en el citosol de la célula, además la carga negativa de los nucleótidos azúcar impide que estos difundan a través de la membrana del aparato de Golgi, por lo que se requieren proteínas transportadoras de nucleótidos azúcar (TNAs) para el suministro de los nucleótidos-azúcar.

Estos transportadores se ubican en la membrana del aparato de Golgi y mediante su acción, permiten que este impedimento topológico sea sobrellevado (Hirschberg y cols. 1998; Handford y cols., 2006). De esta manera, los TNAs suministran los nucleótidos azúcar hacia el lumen de este organelo, en donde luego una glicosiltransferasa transfiere el azúcar al aceptor correspondiente. Sumado a esto, el nucleótido difosfato (NDP) es liberado y rápidamente hidrolizado por la enzima NDPasa, generando nucleótido monofosfato (NMP) y fosfato inorgánico (Pi), los que abandonarían el lumen del aparato de Golgi por mecanismos de contra transporte, junto con la entrada del nucleótido-azúcar respectivamente (Neckelmann y Orellana, 1998; Hirschberg y cols. 1998) (Figura1).

Varios factores pueden regular la acción de cada glicosiltransferasa del aparato Golgi, incluyendo la concentración luminal del nucleótido azúcar que fue transportado desde el citosol, la competencia con otra glicosiltransferasa que ocupa

el mismo dador o aceptor, la concentración luminal de aceptores, el pH luminal y el tiempo que toma en pasar una molécula aceptora por un compartimiento dado del aparato de Golgi.

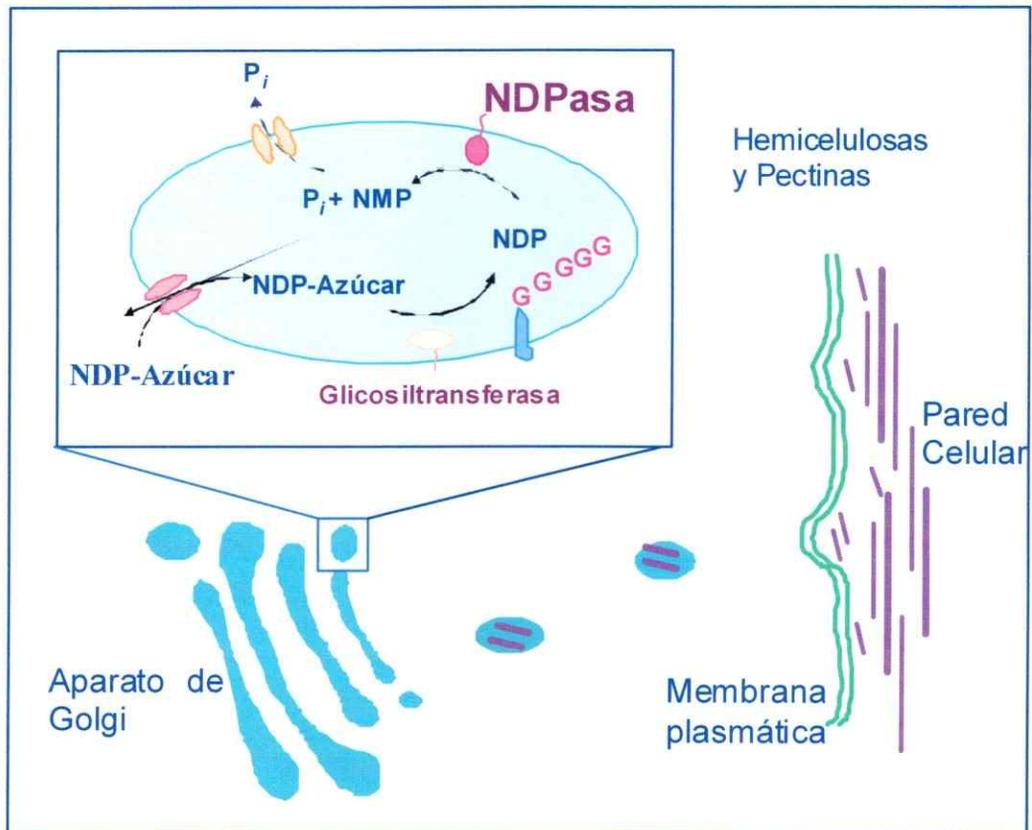


Figura 1. Modelo de la síntesis de polisacáridos de pared celular en el aparato de Golgi de células vegetales.

El nucleótido azúcar (NDP-azúcar) es transportado desde el citosol hacia el lumen del aparato de Golgi por acción de una proteína de membrana específica (TNA); una vez adentro, es tomado por la enzima glicosiltransferasa la cual transfiere el azúcar a un aceptores específico, liberando el nucleótido difosfato (NDP), el que luego es hidrolizado a nucleótido monofosfato (NMP) y fósforo inorgánico (Pi) por la acción de una enzima nucleótido difosfatasa (NDPasa). El NMP sale del lumen del aparato de Golgi acoplado a la entrada de NDP-azúcar en un mecanismo de cotransporte. Por su parte el Pi tendría una salida mediada por una proteína de membrana. Finalmente el polisacárido viajaría hacia la pared celular desde el aparato de Golgi.

En una célula intacta muchos o todos los factores antes mencionados, pueden interactuar para determinar la estructura final de un polímero sintetizado en

el aparato de Golgi (Varki y cols.1999). De esta manera, en la biosíntesis de polisacáridos dentro del aparato de Golgi, los transportadores de nucleótidos-azúcar deberían tener un papel importante en la regulación de la síntesis de polisacáridos de la pared celular, debido a que son los encargados de abastecer de sustratos a las glicosiltransferasas.

La importancia de los TNAs ha quedado en evidencia, al reportarse las asociaciones de enfermedades con el defecto en la traslocación de un nucleótido azúcar. Una de estas enfermedades, reportada en humanos, pertenece al grupo de síndrome de glicoproteínas deficientes en carbohidratos (CDGS), que es un grupo de desordenes hereditarios en los que está dañada la glicosilación de nuevas proteínas; como consecuencia los pacientes presentan severos retardos psicomotores y mentales, además defectos en su sistema inmune. (Hirschberg y cols., 1998; Lübke y cols., 1999).

En lo respectivo al transporte de nucleótidos azúcar en plantas, la primera evidencia fue entregada por nuestro laboratorio e indica que en vesículas del aparato de Golgi provenientes de arvejas, hay transporte de UDP-glucosa y de GDP-fucosa mediados por distintas proteínas (Muñoz y cols., 1996; Wullf, y cols., 2000). Utilizando como criterio la búsqueda de proteínas que presentan identidad con TNAs descritos en otros sistemas y la complementación de mutantes de TNAs del aparato de Golgi, se han descrito al menos tres familias de TNAs en *Arabidopsis thaliana*: GONST (Golgi Nucleotide Sugar Transporter; Baldwin y cols., 2001), AtUTr (*Arabidopsis thaliana* UDP-Galactose transporter; Norambuena y cols., 2002) y AtNST-KT(At: *Arabidopsis thaliana* NST: nucleotide sugar transport -KT; Rollwits y cols., 2006). De esta manera y por complementación de levaduras mutantes, se describió a GONST1 como un transportador de GDP-Manosa y se determinó mediante una fusión con la proteína fluorescente amarilla, que se localizaba en el aparato de Golgi (Baldwin y cols., 2001). Mediante esta última técnica, pero

utilizando la proteína fluorescente verde (GFP) también GONST 2, 3, 4 y 5 como proteínas residentes en el aparato de Golgi. Además, se ha determinado mediante complementación de levaduras deficientes en el transporte de GDP-manosa que poseen actividad transportadora de nucleótidos-azúcar (Handford y cols., 2004). Por otro lado, AtNST-KT1 se describió como un transportador de UDP-galactosa y se observó, utilizando microscopía, que este transportador fusionado a la proteína GFP, también se localizaba en las membranas de Golgi (Rollwits y cols., 2006).

En nuestro laboratorio nos hemos enfocado al estudio de los TNAs pertenecientes a la familia AtUTr. Para ello se han clonado y caracterizado los TNAs AtUTr1 (Norambuena y cols., 2002; Reyes, Tesis doctoral 2008), AtUTr2 (Norambuena y cols., 2005), AtUTr7 (Segura 2005 Tesis de Pregrado) y AtUTr3 (Reyes, Tesis doctoral 2008). La caracterización bioquímica mediante la expresión en levaduras y la incorporación a liposomas, ha permitido demostrar que transportan UDP-glucosa/UDP-galactosa (AtUTr1; Norambuena y cols., 2002), UDP-galactosa (AtUTr2; Norambuena y cols., 2005). UDP-glucosa/UDP-galactosa (AtUTr7; Segura, 2005) y UDP-glucosa (AtUTr3). A pesar de estos estudios y su utilidad para la caracterización de genes, se debe ser cauto al asignar localización así como función, a proteínas provenientes de plantas cuando éstas son estudiadas en sistemas heterólogos como la levadura. Las proteínas de plantas no siempre serán correctamente localizadas cuando se expresan en levaduras, sobretodo cuando estas son sobre expresadas desde plásmidos multicopias y cuando la ubicación subcelular pueda depender de el número de proteínas presentes. Además la actividad de proteínas-transportadoras en plantas puede estar modulada por su interacción con otras proteínas que están ausentes en levaduras, y la expresión de genes podría estar regulada tanto por el desarrollo de la planta como por su ambiente, lo cual podría contribuir a su función específica (Bassham y Raikhel,2000). Un ejemplo de esto es lo que se observa para AtUTr1, el cual se

localiza en el retículo endoplasmático de células vegetales (Reyes y cols., 2006) y no en el aparato de Golgi, como sugerían los ensayos realizados en levaduras y la complementación de una mutante de un transportador de UDP-galactosa de células de mamíferos (Norambuena y cols., 2002). Se vio que AtUTr1 respondía activamente frente a la respuesta al mal plegamiento de proteínas (UPR), incrementándose su expresión al menos 9 veces en el retículo endoplasmático. Su función en este caso era de proveer de UDP-glucosa a la glicosiltransferasa (UGGT) que une UDP-glucosa a glicoproteínas.

De esta manera resulta de gran importancia estudiar *in planta* la función de estos transportadores de nucleótidos-azúcar. Una forma de hacerlo es, por ejemplo, utilizando fraccionamiento subcelular provenientes de plantas silvestres y deficientes en estos transportadores, que nos permitan relacionar función y localización. En este contexto *Arabidopsis thaliana* aparece como un buen organismo modelo y ofrece una serie de ventajas para realizar este tipo de estudios, ya que se dispone de múltiples herramientas informáticas y de bancos de mutantes insercionales mediante los cuales podemos identificar mutantes en nuestras proteínas de interés. Es así como en nuestro laboratorio se lograron identificar mutantes insercionales en los genes que codifican para TNAs que se habían caracterizado previamente en sistemas heterólogos (AtUTr1, AtUtr2 y AtUTr7; Marchant, Tesis Doctoral, 2004, resultados no publicados).

El principal objetivo de este trabajo es analizar *in planta* la función de los transportadores de nucleótidos-azúcar, por lo que proponemos realizar el fraccionamiento subcelular de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y mutantes en los transportadores AtUTr2 y AtUTr7, lo que nos permitirá obtener fracciones enriquecidas en vesículas de aparato de Golgi y medir en ellas la incorporación de diferentes nucleótidos-azúcar. Además podremos ver, de que manera se ve afectado el sistema de la síntesis de pared celular, por la presencia de mutaciones

en genes para proteínas transportadoras de nucleótidos azúcar, evaluando como afectan a la actividad de enzimas que participen en ella.

## HIPOTESIS

Mutantes insercionales en transportadores de nucleótidos azúcar, presentan disminución en la incorporación de nucleótidos azúcar al lumen del aparato de Golgi de células vegetales.

## OBJETIVOS GENERALES

- Caracterizar un sistema que permita medir la incorporación de nucleótidos azúcar en fracciones de aparato de Golgi de plantas de *Arabidopsis thaliana*.
- Determinar el efecto que producen mutaciones en genes de proteínas transportadoras de nucleótidos azúcar, en la incorporación de estos sustratos en fracciones enriquecidas en vesículas de aparato de Golgi.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1 Obtener y caracterizar fracciones subcelulares de plantas de *Arabidopsis thaliana*.**
  - 1.1** Realizar fraccionamiento subcelular a partir de plantas de *Arabidopsis thaliana* que permita obtener fracciones de membranas enriquecidas en vesículas de Golgi.
  - 1.2** Caracterizar las fracciones obtenidas luego del fraccionamiento subcelular de plantas de *Arabidopsis thaliana*, utilizando marcadores bioquímicos de membranas de retículo endoplasmático y aparato de Golgi.

**2 Caracterizar la incorporación de nucleótidos-azúcar en fracciones subcelulares de *Arabidopsis thaliana*.**

**2.1 Medir incorporación de distintos nucleótidos-azúcar en las fracciones obtenidas a lo largo del gradiente de sacarosa, luego del fraccionamiento subcelular de *Arabidopsis thaliana*.**

**2.2 Medir incorporación de distintos nucleótidos-azúcar en fracciones enriquecidas en vesículas de aparato de Golgi de *Arabidopsis thaliana*.**

**3 Caracterizar la incorporación de nucleótidos-azúcar en vesículas de aparato de Golgi obtenidas de plantas mutantes en distintos transportadores de nucleótidos azúcar.**

**3.1 Verificar la presencia de mutaciones en genes para proteínas transportadoras de nucleótidos-azúcar de aparato de Golgi, en el genoma de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y mutantes en estos genes, que fueron proporcionadas para el estudio..**

**3.2 Medir la incorporación de distintos nucleótidos-azúcar en fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi obtenidas a partir de plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes en los genes que codifican para los transportadores.**

**4 Medir actividad de la enzima XG-Fucosiltransferasa en fracciones provenientes del gradiente de sacarosa, luego del fraccionamiento subcelular, de plantas silvestres y mutantes en los transportadores.**

## MATERIALES Y METODOS

### MATERIALES

#### Material Biológico:

Semillas de *Arabidopsis thaliana* AtUTr2 y AtUTr7, mutantes por inserción de T-DNA, fueron facilitadas por Lorena Marchant, AtUTr2-2 y AtUTr7-1 (Marchant Tesis Doctoral, 2004); estas eran provenientes del Instituto Torrey Mesa de la Empresa Syngenta (Torrey Mesa Research Institute, <http://www.tmri.org/index.html>) y del Instituto SIGNAL (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, <http://signal.salk.edu>).

#### Reactivos:

Los sustratos radioactivos GDP- $^3\text{H}$  fucosa (fucosa-2- $^3\text{H}$ (N)) (20Ci/mmol), UDP- $^3\text{H}$  galactosa (galactosa-1- $^3\text{H}$ (N)) (9,1Ci/mmol), UDP- $^{14}\text{C}$  glucosa (glucosa- $^{14}\text{C}$  (U)) (200mCi/mmol) fueron obtenidos de NEN. UDP- $^3\text{H}$  glucosa (4.5 Ci/mmol) proveniente de Amersham.

De Calbiochem: Miraclon

De GIBCO: Sacarosa, Tris Base.

De JT. Baker: Glicerol.

De Merck: Ácido Maléico, EDTA, Etanol, Metanol,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2$ , NaCl,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , Agarosa.

De Megazyme: Xiloglucano de Tamarindo.

De Millipore: filtros de ester de celulosa, 0.45  $\mu\text{m}$  de poro

De Phyto Technology Laboratories: medio murashige skoog 1962

De Sigma: Glucosa, GDP-fucosa, HEPES,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Triton X-100, Sacarosa para gradientes,  $\beta$ -D-Glucopiranosido, citocromo C, Antimicina A, NADH, Nicotinamida,

NaCN, Glicina, UDP, UDP-galactosa, UDP-glucosa, GDP-fucosa, dodecilsulfato  
sódico(SDS).

Otros: Tierra de hojas, vermiculita, H<sub>2</sub>O nanopura.

## MÉTODOS

### **Crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana*:**

Semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (25 mg), fueron esterilizadas en solución 5% hipoclorito de sodio, 0.1% Tritón X-100 durante 8 minutos, luego fueron lavadas con 5 volúmenes de agua estéril. Con el objetivo de sincronizar la germinación se mantuvieron durante 2 días a 4°C. Se germinaron 200 ml de medio líquido Murashige-Skoog 1962, pH 5,7, suplementado con sacarosa al 2%, previo shock de luz de 30 minutos, durante 14 días en oscuridad, con agitación constante de 90 rpm. y a 25°C. Para la realización de los experimentos se utilizaron 15 gramos de plantas frescas enteras.

### **Preparación de una fracción enriquecida en vesículas de Golgi:**

Plantas frescas de *Arabidopsis thaliana* fueron homogenizadas en mortero con un volumen de solución de sacarosa 0,5 M que contenía  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1M, pH 6,5;  $\text{MgCl}_2$  5mM, luego fueron filtradas utilizando una malla Miracloth y se centrifugaron a 1.000Xg durante 5 minutos. El sobrenadante se fraccionó por centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa de tres etapas: sacarosa 1,3 M; sacarosa 1,1 M y sacarosa 0,25M como se describe en Muñoz, P. y cols. (1996). Todas las soluciones contenían  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1M, pH 6,5 y  $\text{MgCl}_2$  5mM.

Se colectaron alícuotas de 1 ml a lo largo del fraccionamiento utilizando el colector de fracciones Labconco, las cuales fueron luego almacenadas a -80°C hasta el momento de uso.

En los experimentos realizados en fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi y en vesículas de retículo endoplasmático (RE), tanto el material presente entre la interfase (1,1M / 0,25M) correspondiente a aparato de Golgi y entre (1,3M / 1,1M) correspondientes a RE fue colectado, mezclado con un volumen igual de agua destilada y sedimentado a 100.000Xg en rotor Sorvall AH629.5 por 50

minutos. Esta fracción se resuspendió y homogeneizó en STM y se almacenó a -80°C, hasta el momento de usar.

**Medición del porcentaje de sacarosa en muestras provenientes del gradiente de sacarosa luego del fraccionamiento subcelular realizado en plantas de *Arabidopsis thaliana*:**

Se tomaron 200 µl de cada fracción y se midió el porcentaje de sacarosa %(p/v) usando un refractómetro.

**Ensayos de medición de actividad UDPasa:**

Se realizaron las mediciones de actividad de la enzima UDPasa de acuerdo al protocolo descrito por Briskin y cols., (1987). Las muestras (20 µl) se incubaron en un volumen final de 200 µl en presencia de Tris/MES 30 mM pH 6,5; UDP 3 mM, MgSO<sub>4</sub> 3 mM y Triton X-100 (Tx-100) a una concentración final de 0,05%. La reacción se realizó a 25°C durante 15 minutos y se detuvo agregando SDS de manera que alcanzara una concentración final de 1%. El fosfato liberado de la hidrólisis del NDP se determinó utilizando el método descrito por Ames (1966), que consiste en la formación de un complejo químico que se mide espectrofotométricamente a 650 nm.

**Medición de actividad XG-FucTasa:**

El ensayo para medición de la actividad de la enzima XG-FucTasa fue realizado como describe Farkas y Maclachlan (1998). Las muestras (50 µl) fueron incubadas en un volumen final de 100 µl en presencia de GDP-fucos a 1 µM; Hepes 20 mM pH 7,0; MnCl<sub>2</sub> 10 mM; Xiloglucano (XG-Tamarindo) de Tamarindo 1mg/ml y Tx-100 0,05%. Se utilizaron 0,4 µCi de GDP-[<sup>3</sup>H]-Fucosa por ensayo. La reacción

se realizó a 25°C durante 30 minutos y se detuvo agregando Etanol 95% frío, de forma que la concentración final fuera 70%. Se dejó en hielo durante toda la noche y se filtró utilizando filtros Millipore de ester de celulosa 0,45  $\mu\text{m}$  de poro. Los filtros fueron lavados 3 veces con 1 ml de Etanol 70%, 1mM EDTA (frío), se pusieron a secar, se les agregó 1,5 ml de líquido de centelleo y se cuantifico la marca radioactiva en contador de centelleo.

#### **Medición de actividad NADH citocromo c reductasa insensible a antimicina A:**

El ensayo se realizó utilizando el protocolo descrito por Briskin y cols., (1987). Se tomaron 10  $\mu\text{l}$  provenientes fracciones del gradiente de sacarosa las cuales fueron disueltas en 35  $\mu\text{l}$  de STM cada una. Luego fueron incubadas en presencia de  $\text{K}_3\text{PO}_4$  40mM, pH 7,4, Nicotinamida 30mM, NaCN 25 $\mu\text{M}$ , citocromo C 0,6 mg/ml y Antimicina 1 $\mu\text{M}$ , en un volumen final de 480 $\mu\text{l}$  durante 5 minutos a 25°C. Finalmente se agregó NADH a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  en un volumen final de 500 $\mu\text{l}$ . Se registro la absorbancia cada 30 segundos durante un período de 5 minutos a una longitud de onda de 550nm. A cada registro se le calculó la pendiente, la que finalmente se graficó.

#### **Medición de actividad Glucosidasa II:**

El ensayo se realizó utilizando el protocolo descrito por Burns y Touster, (1982). Se tomaron 50  $\mu\text{l}$  de cada fracción proveniente del gradiente de sacarosa, las cuales fueron incubadas durante 30 minutos en Hepes 20mM pH 7,5,  $\beta$ -D-glucopiranosido 5mM y Tx-100 0,1% en un volumen final de reacción de 100  $\mu\text{l}$ . Se detuvo la reacción con 300  $\mu\text{l}$  de solución Tris base 2M, SDS 2,5%. Además se hicieron mediciones a tiempo cero. Luego se procedió a medir absorbancia a

longitud de onda de 405 nm, restando finalmente la absorbancia del tiempo cero a la absorbancia a 30 minutos para cada muestra.

### **Electroforesis en condiciones no denaturantes. Geles Nativos:**

El gel nativo se realizó utilizando el protocolo descrito por Bollag y Edelstein, (1993 a). Se usó un gel concentrador de 3% poliacrilamida en Tris-HCl 125 mM, pH 6,8 y el gel separador de poliacrilamida 10% en Tris-HCl 375 mM, pH8,8. Ambos geles contenían 0.1% de Tx-100. Las muestras (25  $\mu$ l) se incubaron en de Tx-100 1,5% durante 15 minutos a 4°C y luego se ajustaron con Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 glicerol 10% y Azul de Bromofenol 0,01%. La electroforesis se realizó a 80 voltios constantes por 5 horas.

### **Determinación de actividadde la enzima UDPasa en gel nativo:**

El gel proveniente de la electroforesis en condiciones no denaturantes fue incubado en una solución que contenía Tris-Maleato 0,1 M;  $MgSO_4$  10 mM;  $Pb(NO_3)_2$  1,5 mM; Glucosa 5% y UDP 3 mM, durante 15 minutos a 37°C. Luego se lavó 3 veces con agua destilada y se reveló con una solución de  $(NH_4)_2S$  al 1%.

### **Determinación de proteínas: Método del Ácido Bicinconinico (BCA):**

La determinación de proteínas por el método del BCA fue realizado como fue descrito por Bollag (Bollag y Edelstein;1993 c). Para la determinación de la cantidad de proteínas de una muestra, éstas se llevaron a un volumen de 20  $\mu$ l y se agregaron 180  $\mu$ l de reactivo BCA, el que reacciona con los iones  $Cu^{+1}$ , los cuales se forman luego que las proteínas reaccionan con iones  $Cu^{+2}$ . Luego fueron incubadas a 37°C por 30 minutos y se determinó su absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 562nm. Como estándar se empleó seroalbúmina de bovino.

### **Integridad de vesículas de Golgi de *Arabidopsis thaliana*:**

Para realizar la medición de la incorporación de NDP-azúcares se requirió que las vesículas obtenidas tuviesen una integridad así como una orientación correcta. Para este fin se midió la actividad UDPasa, una enzima luminal del aparato de Golgi, en presencia y ausencia de Tritón X-100 0,05%. Se tomaron 5 µg de proteínas provenientes de fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi y se llevaron con STM hasta un volumen final de 15 µl; se incubaron junto con 15 µl de una mezcla que contenía UDP 6 µM, con y sin detergente Tritón X-100 0,1% según correspondiera. La reacción se llevó a cabo a 25 °C por 15 minutos en un baño termorregulado. Luego, el fosfato inorgánico liberado se midió de acuerdo al método de Ames (1966). Las muestras fueron incubadas con el reactivo de Ames (Una parte de ácido ascórbico 10% por 6 partes de molibdato de amonio 0,42%) por 20 minutos a 45 °C. La medición se realizó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 660nm. Con los valores de cantidad de fosfato presente, la latencia de UDPasa se calculó de acuerdo a la siguiente relación:

$$\% \text{Latencia} = [1 - (P_{i,vn} / P_{i,vtot})] * 100\%$$

$P_{i,vn}$ : Cantidad de fosfato liberado tras incubación con UDP, correspondiente a las vesículas no latentes.

$P_{i,vtot}$  : Cantidad de fosfato liberado tras incubación con UDP en presencia de Triton X-100 0,05%, correspondiente al fosfato total contenido en las vesículas.

### **Incorporación de nucleótidos azúcar en fracciones del gradiente:**

Se tomaron 90 µl de cada fracción del gradiente de sacarosa, los cuales fueron incubados durante 3 minutos en presencia del NDP-azúcar marcado radioactivamente a una concentración de 0.1µCi en el ensayo, y del correspondiente NDP-azúcar no marcado a una concentración de 1µM, en un

volumen final de 100 $\mu$ l en el ensayo. La reacción se detuvo agregando 10 volúmenes de STM frío. Luego se tomaron las fracciones y se filtraron en filtros Millipore de ester de celulosa 0.45  $\mu$ m de poro, y se lavaron con 5 ml de STM. Finalmente los filtros fueron secados a temperatura ambiente, se les agregó líquido de centelleo y se contabilizó la marca radioactiva en un contador de centelleo.

#### **Incorporación de nucleótidos azúcar en interfases del gradiente:**

Se tomaron 90  $\mu$ l desde las interfases (1,3/ 1,1M) y (1,1/ 0,25M) del gradiente de sacarosa. Se incubaron durante 3 minutos en presencia de UDP-glucosa[<sup>3</sup>H] marcado radiactivamente a una concentración de 0,1  $\mu$ Ci en el ensayo, y de UDP-glucosa no marcada a una concentración de 1 $\mu$ M en un volumen final de 100 $\mu$ l en el ensayo. La reacción se detuvo agregando 10 volúmenes de STM frío. Luego se tomaron las reacciones y se filtraron en filtros Millipore de ester de celulosa 0,45  $\mu$ m de poro; los filtros se lavaron con 5 ml de STM. Finalmente los filtros fueron secados a temperatura ambiente, se les agregó líquido de centelleo y se contabilizó la marca radioactiva en un contador de centelleo.

#### **Incorporación de nucleótidos azúcar en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi en dependencia con la temperatura:**

Una cantidad total de 25  $\mu$ g de vesículas enriquecidas en aparato de Golgi, obtenidas luego del fraccionamiento subcelular, fueron incubadas durante 3 minutos con 0,1  $\mu$ Ci de UDP-Glucosa [<sup>3</sup>H] y con UDP-glucosa a una concentración final de 1 $\mu$ M en el ensayo, variandose la temperatura del ensayo. Las temperaturas de incubación fueron de 0°C y 25°C. Como control fueron utilizadas vesículas que se hirvieron a 100°C durante 5 minutos, las que fueron incubadas posteriormente a 25°C. Luego se tomaron las muestras, se filtraron en filtros Millipore de ester de

celulosa 0.45  $\mu\text{m}$  de poro, y se lavaron con 5 ml de STM. Finalmente los filtros se secaron a temperatura ambiente, se les agregó líquido de centelleo y se contabilizó la marca radioactiva en un contador de centelleo.

#### **Incorporación de nucleótidos azúcar en fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi:**

Se tomaron 25  $\mu\text{g}$  de proteína provenientes del fraccionamiento subcelular realizado en *Arabidopsis thaliana* correspondiente a la fracción enriquecida en vesículas de Golgi, y se pusieron a incubar durante 3 minutos junto con el NDP-azúcar radiactivo a una concentración de 0,1 $\mu\text{Ci}$  por ensayo y el correspondiente NDP-azúcar no marcado a una concentración final de 1  $\mu\text{M}$  en el ensayo, en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ . La reacción fue detenida agregando 10 volúmenes de STM frío. Luego se tomaron las fracciones y se filtraron en filtros Millipore de ester de celulosa 0,45  $\mu\text{m}$  de poro, y se lavaron con 5 ml de STM. Finalmente los filtros fueron secados a temperatura ambiente, se les agregó líquido de centelleo y se contabilizó la marca radioactiva en un contador de centelleo.

#### **Obtención de RNA a partir de plantas de *Arabidopsis thaliana*:**

A partir de 100 mg de plantas frescas crecidas en medio líquido de *Arabidopsis thaliana* silvestre, mutantes para el gen de la proteína AtUTr2 y mutantes para el gen de la proteína AtUtr7, se obtuvieron RNA total utilizando el reactivo TRIzol (Gibco-BRL) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente se cuantifico tomando en cuenta la proporción de absorbancia de la muestras para longitudes de onda de 260 y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ).

### **Construcción de DNA complementario:**

Los cDNAs fueron sintetizados a partir de 1 µg de RNA utilizando el sistema RT-PCR Improm de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Experimentos de PCR:**

Se realizaron reacciones de PCR para los genes *AtUTr2*, *AtUTr7* y Actina, ocupando como templado cDNAs para la identificación de las plantas mutantes. Ver partidores en la tabla 1.

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):**

Para todas las reacciones de PCR se utilizó la enzima Taq DNA polimerasa de Invitrogen, su tampón correspondiente, mezcla de nucleótidos 0,2 mM, cloruro de magnesio 1,5 mM, y 0,25 [pmoles/µl] de cada partidador. La cantidad de templado utilizada fue de aproximadamente 10 ng los que se cuantificaron previamente en gel de agarosa. Se hizo una denaturación inicial a 95°C por 5 minutos. Luego 30 ciclos con una temperatura de denaturación de 94°C durante 30 segundos; temperatura de *annealing* de 50°C por 30 segundos y extensión durante 1 minuto 30 segundos a 72°C. Por último se hizo una extensión final durante 10 minutos a 72°C.

### **Electroforesis de DNA:**

Para ver los fragmentos de DNA provenientes de las reacciones de PCR, se realizaron electroforesis horizontales en geles de agarosa al 1% p/v en tampón TAE, (Tris 40 mM, CH<sub>3</sub>COONa 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). Se cargaron 5 µl de reacción junto a 2 µl de buffer de carga, se hizo la electroforesis y luego se puso el gel en presencia de solución de bromuro de etidio; se visualizo la marca bajo luz

ultravioleta. Como marcador de peso molecular se utilizó el estándar de 1 kb de Fermentas.

Partidor	Secuencia	Tamaño de Fragmento amplificado (pb)
AtUTr2 sentido	5'-CACATTTATCGGTCAAGTCCTCCGTT-3'	950
AtUTr2 anti sentido	5'-TCTTCTCTATCACCATCGCCTCCTGCGA-3'	
AtUTr7 sentido	5'-CATTGCTTCAATGGCAATGG-3'	950
AtUTr7 anti sentido	5'-CCGGACCGAAATTCTCATTT-3'	
Actina sentido	5'-CACACTTTCTACAATGAGCT-3'	950
Actina anti sentido	5'-GCAGTGATCTCTTTGCTCAT-3'	

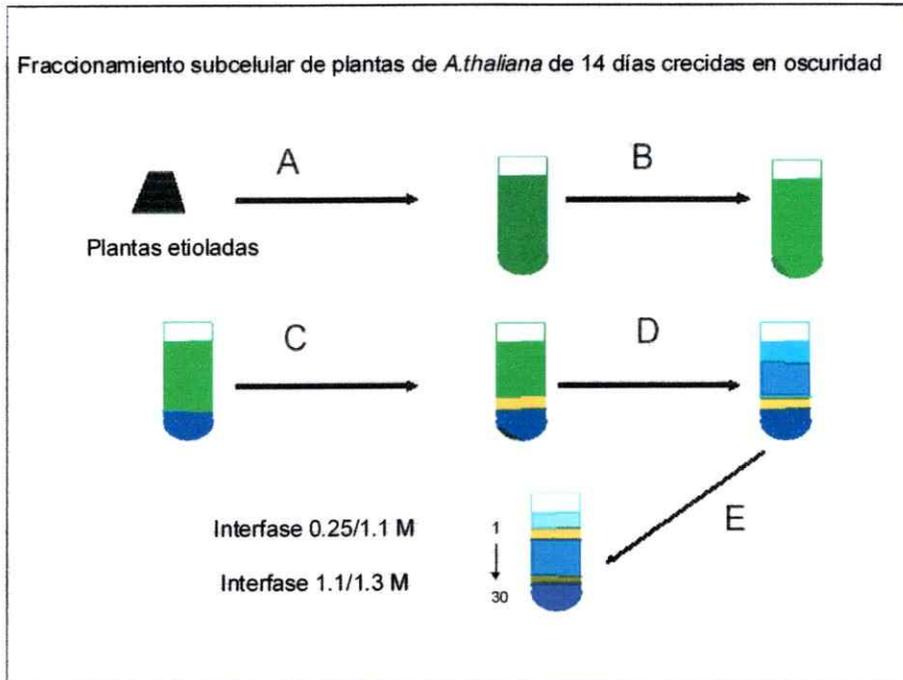
**Tabla 1: Partidores utilizados para experimentos de PCR.**

## RESULTADOS

### Fraccionamiento Subcelular en *Arabidopsis thaliana*:

Uno de los puntos importantes en este trabajo, fue establecer un procedimiento de fraccionamiento subcelular en plantas de *Arabidopsis thaliana* de 14 días, crecidas en oscuridad. El énfasis de este procedimiento estuvo dirigido a determinar la localización y el grado de enriquecimiento de organelos como aparato de Golgi y retículo endoplasmático. Para analizar esto, se utilizaron enzimas marcadoras de aparato de Golgi y de retículo endoplasmático, las que se evaluaron en las distintas fracciones obtenidas a partir de un gradiente de sacarosa (Figura 2).

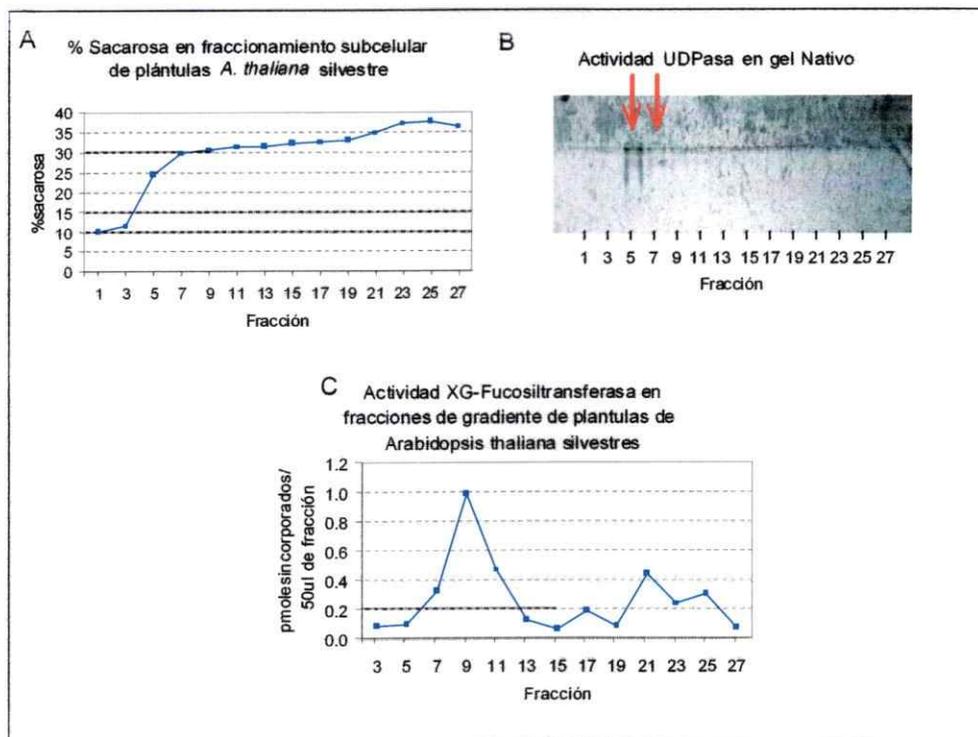
En la Figura 3A, se muestra el porcentaje de sacarosa en las fracciones colectadas a través del gradiente de sacarosa luego del fraccionamiento subcelular, que da cuenta de la presencia de dos interfases. Como enzimas marcadoras de aparato de Golgi se utilizaron la actividad UDPasa y la enzima xiloglucano (XG)-Fucosiltransferasa. La actividad de la enzima UDPasa se determinó utilizando geles nativos. La Figura 3B muestra la aparición de bandas de actividad en las fracciones 5 y 7, También se muestra la enzima XG-Fucosiltransferasa (Figura 3C), observándose la mayor actividad en la fracción 8. Estos resultados indican que actividades de las enzimas asociadas a aparato de Golgi se localizan entre la interfase 1,1/ 0,25 M sacarosa (Figura 2).



**Figura 2. Esquema de fraccionamiento subcelular de plantas de *Arabidopsis thaliana*.**

Se tomaron 15 g de plantas de 14 días de edad y se homogeneizaron en una solución de sacarosa 0,5M (A), luego se filtró el homogeneizado utilizando una malla Miracloth y se sedimentó a 1.000 x g durante 5 minutos (B). El sobrenadante se puso sobre un colchón de sacarosa 1,3M y se fraccionó durante 90 minutos a 100.000 x g (C). Luego se retiró la fase sobre el colchón de 1,3M sacarosa y se cargo en primera instancia una fase 1,1M sacarosa y sobre ésta una fase 0,25M sacarosa (D), llevándose luego a equilibrio durante 110 minutos (E).

En los experimentos en que se utilizaron vesículas enriquecidas, se tomaron las interfases 0,25/ 1,1M sacarosa y 1,1/1,3M sacarosa, se les agregó un volumen de agua y se sedimentaron a 100.000x g durante 50 minutos. Finalmente fueron resuspendidas en STM.



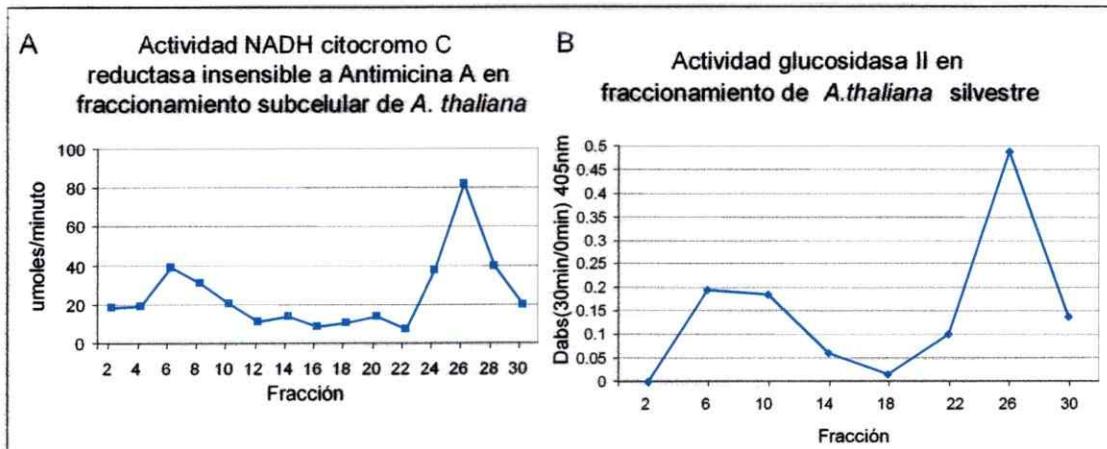
**Figura 3. Marcadores de aparato de Golgi.**

A. Gráfico del porcentaje de sacarosa en muestras colectadas a través del gradiente de sacarosa luego del fraccionamiento subcelular. B. Gel nativo para detectar actividad UDPasa en fracciones provenientes del gradiente de sacarosa, luego del fraccionamiento subcelular. C. Medición de actividad XG-Fucosiltransferasa en fracciones provenientes del gradiente de sacarosa, luego del fraccionamiento subcelular. Este ensayo es representativo de 3 experimentos independientes, realizados por duplicado.

De igual manera, se evaluó la actividad de enzimas asociadas a retículo endoplasmático. En este caso se midieron tanto la actividad de la enzima NADH citocromo C reductasa insensible a Antimicina A (Briskin y cols., 1987), como la de la enzima Glucosidasa II (Burns M. y Touster O., 1982), enzimas que se encuentran en el lumen del retículo endoplasmático. En la Figura 4 A y B se observa que los marcadores de retículo endoplasmático se localizan en la fracción 26 que corresponde a la interfase 1,1/ 1,3M de sacarosa.

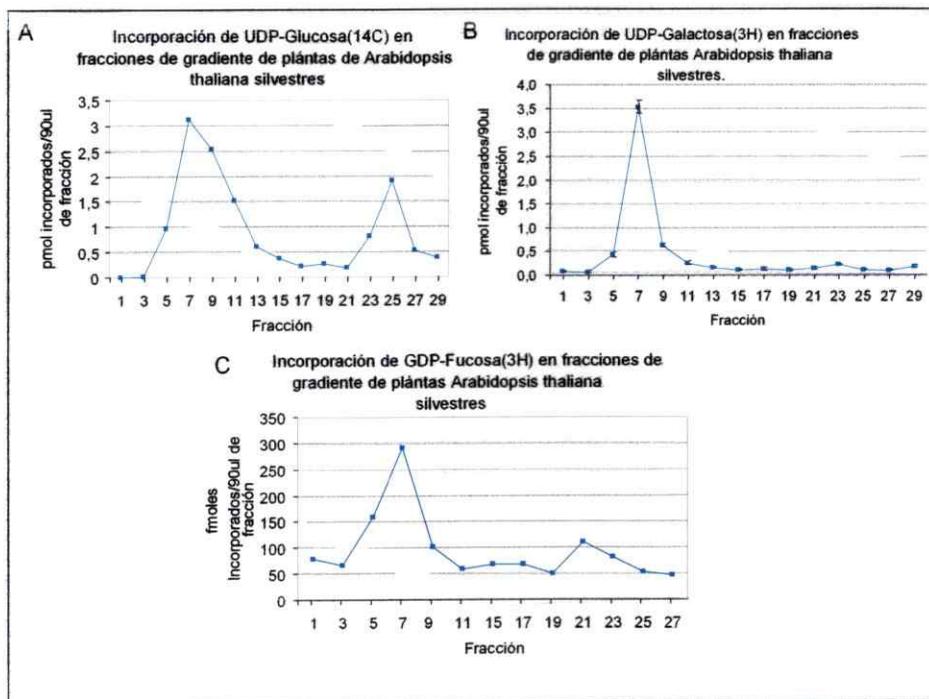
### **Incorporación de nucleótidos azúcar en fracciones subcelulares de *Arabidopsis thaliana*:**

Para determinar la distribución de la incorporación de distintos nucleótidos-azúcar en las fracciones obtenidas luego del fraccionamiento subcelular, muestras del gradiente de sacarosa obtenidas a partir de plantas de *Arabidopsis thaliana* fueron incubadas como se describe en materiales y métodos junto a nucleótidos azúcar marcados radiactivamente (Figura 5). Los resultados muestran que UDP-glucosa fue incorporada principalmente en fracciones enriquecidas en aparato de Golgi, aunque también se observó incorporación de UDP-glucosa en fracciones de RE. Por otro lado, los nucleótidos azúcar UDP-galactosa y GDP-fucosa fueron incorporados principalmente en el aparato de Golgi. La incorporación en fracciones de RE fue baja en el caso de GDP-fucosa e indetectable en el caso de UDP-galactosa. Esto confirma que sustratos utilizados en la síntesis de polisacáridos son incorporados principalmente en fracciones enriquecidas en aparato de Golgi. La significativa incorporación de UDP-glucosa en el RE puede ser producto de la transferencia de glucosa a dolicol y/o alternativamente al transporte al lumen del RE reportado por Reyes y cols. (2006).



**Figura 4. Marcadores de retículo endoplasmático.**

A. Muestra la medición de actividad NADH citocromo C reductasa insensible a Antimicina A en fracciones provenientes del gradiente de sacarosa, luego del fraccionamiento subcelular; ensayo representativo n=3 (los ensayos se realizaron en duplicado) B. Medición de actividad de Glucosidasa-II en muestras consecutivas sedimentadas de fracciones provenientes del gradiente de sacarosa, luego del fraccionamiento subcelular; ensayo representativo de 3 experimentos independientes realizado por duplicado.

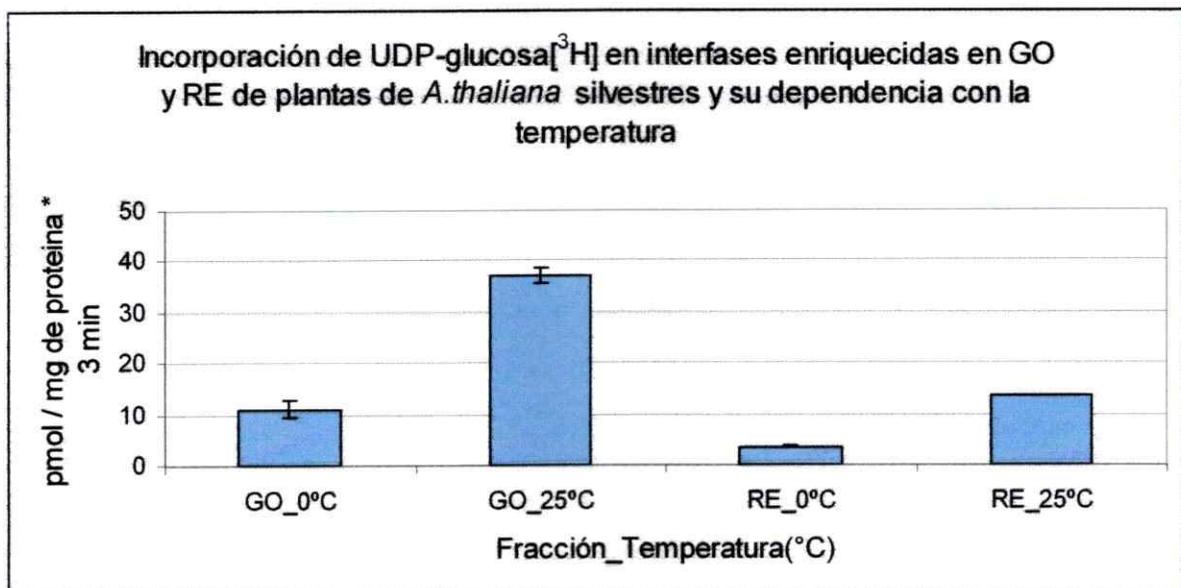


**Figura 5. Incorporación de distintos nucleótidos azúcar en fracciones de gradientes de *Arabidopsis thaliana*.**

A. Incorporación de UDP-glucosa [<sup>14</sup>C] en fracciones provenientes del gradiente de sacarosa, luego del fraccionamiento subcelular plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres de 14 días crecidas en oscuridad. B. Incorporación de UDP-galactosa [<sup>3</sup>H] en fracciones provenientes del gradiente de sacarosa, luego del fraccionamiento subcelular de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres de 14 días crecidas en oscuridad. C. Incorporación de GDP-fucosa [<sup>3</sup>H] en fracciones provenientes del gradiente de sacarosa, luego del fraccionamiento subcelular de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres de 14 días crecidas en oscuridad. El ensayo se realizó en duplicado.

**Incorporación de nucleótidos azúcares en interfases del gradiente obtenido luego del fraccionamiento subcelular:**

En este experimento, se utilizaron las fracciones que quedaron en las interfases 0,25/ 1,1 M y 1,1/ 1,3 M de sacarosa, después de realizado el fraccionamiento subcelular. La cantidad de proteínas presentes en estas interfases fue cuantificada y se ocuparon 25 µg de proteína para cada ensayo. De este modo se confirmó que existe una mayor incorporación de UDP-glucosa [<sup>3</sup>H] asociada a la interfase en donde se existe una mayor actividad de enzimas marcadoras de aparato de Golgi (Figura 6).

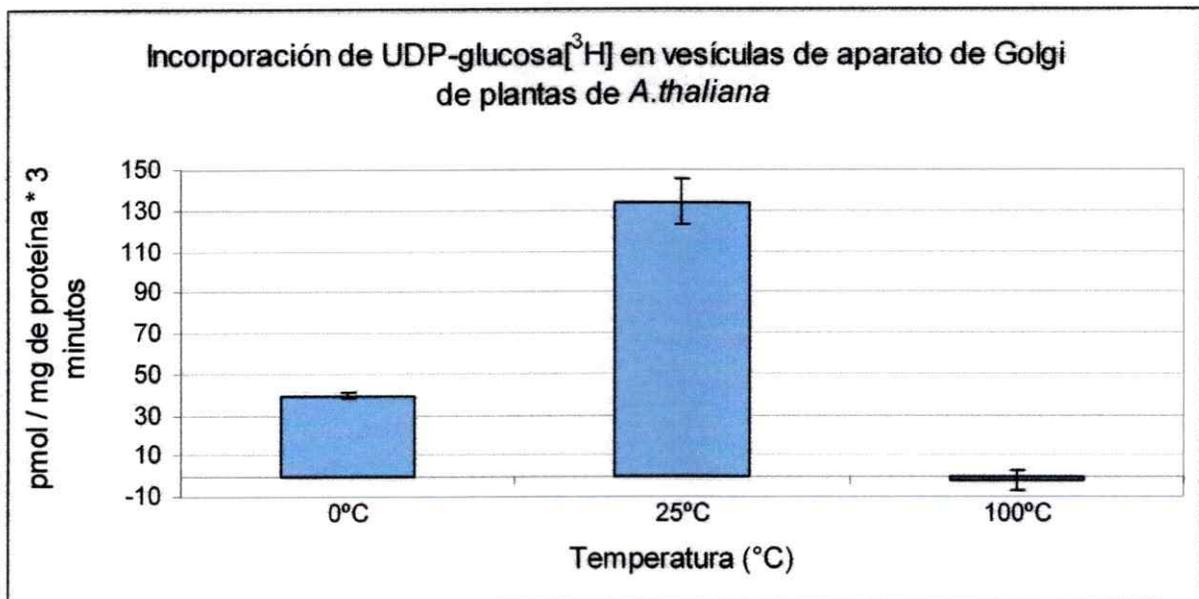


**Figura 6. Incorporación de UDP-glucosa en interfases enriquecidas en GO y RE en función de la temperatura.**

La incorporación de UDP-glucosa [<sup>3</sup>H] en las interfases 0,25/ 1,1M y 1,1/ 1,3M del gradiente de sacarosa, luego del fraccionamiento subcelular correspondientes a aparato de Golgi (GO) y retículo endoplasmático (RE), respectivamente, durante 3 minutos a 0°C y 25°C de temperatura. Los resultados muestran el promedio de 3 replicas técnicas con sus respectivas desviaciones estándar.

**Incorporación de nucleótidos azúcares en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi y su dependencia de la temperatura:**

Para ver la posible acción de proteínas en el transporte de nucleótidos azúcares, se tomo una cantidad de 25  $\mu\text{g}$  de vesículas enriquecidas en aparato de Golgi, obtenidas luego del fraccionamiento subcelular. Fueron incubadas en presencia de 0,1  $\mu\text{Ci}$  de UDP-glucosa [ $^3\text{H}$ ] a distintas temperaturas. Observamos que a 0°C prácticamente no hay incorporación del nucleótido azúcar en comparación a 25 °C. De igual manera, la incorporación se anuló por completo en vesículas que fueron hervidas a 100°C durante 5 minutos previo al experimento (Figura 7). Estos resultados nos dan una evidencia que el transporte se asocia a la acción de proteínas.

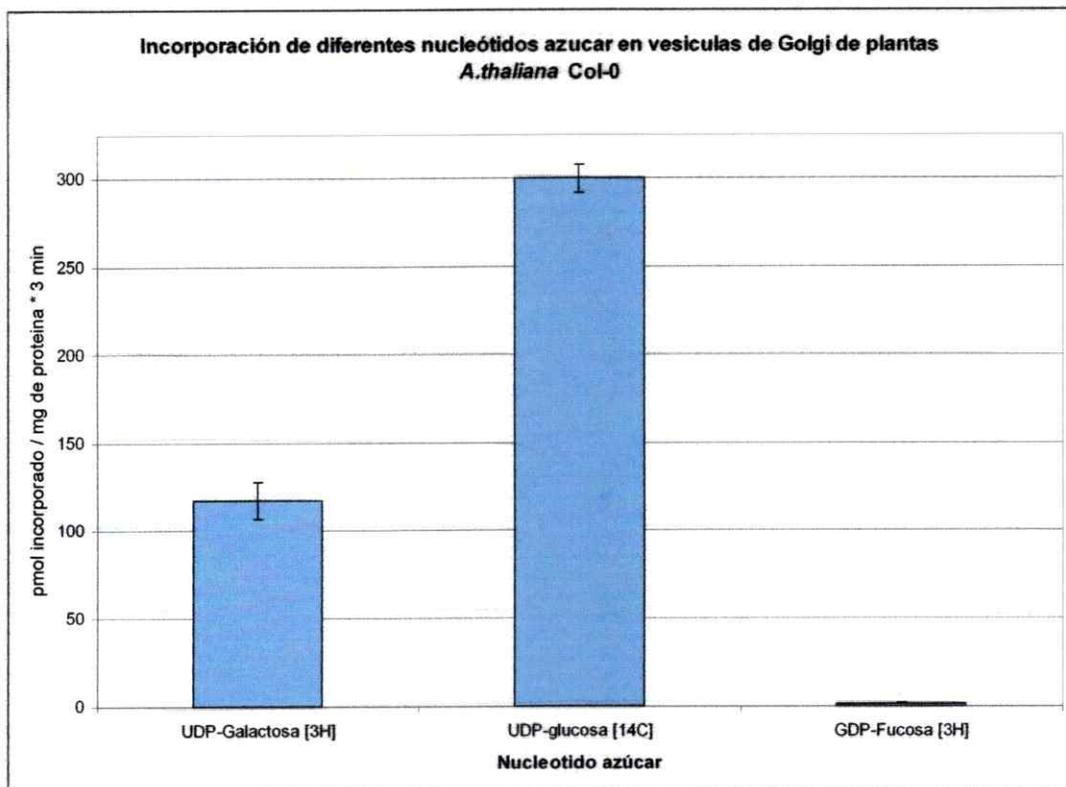


**Figura 7. Incorporación de UDP-glucosa  $^3\text{H}$  en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi.**

Se muestra la incorporación de UDP-glucosa [ $^3\text{H}$ ] en vesículas hervidas a 100°C durante 5 minutos, en vesículas intactas incubadas a 0 y 25°C respectivamente. Las vesículas fueron incubadas durante 3 minutos en presencia del sustrato radiactivo. Los resultados muestran el promedio de 3 replicas técnicas con sus respectivas desviaciones estándar.

### Incorporación de diferentes nucleótidos azúcar en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi:

Una vez optimizadas las condiciones en las cuales se debía realizar el ensayo de incorporación utilizando vesículas extraídas de planta, se probó la incorporación de distintos nucleótidos azúcares. Se utilizó UDP-glucosa [ $^{14}\text{C}$ ], UDP-galactosa [ $^3\text{H}$ ] y GDP-fucosa [ $^3\text{H}$ ] (Figura 8). Se observó que todos los nucleótidos azúcar probados son incorporados en vesículas de Golgi, sin embargo la magnitud de este transporte es mayor para UDP-glucosa y UDP-galactosa, que para GDP-fucosa, (tabla 2)



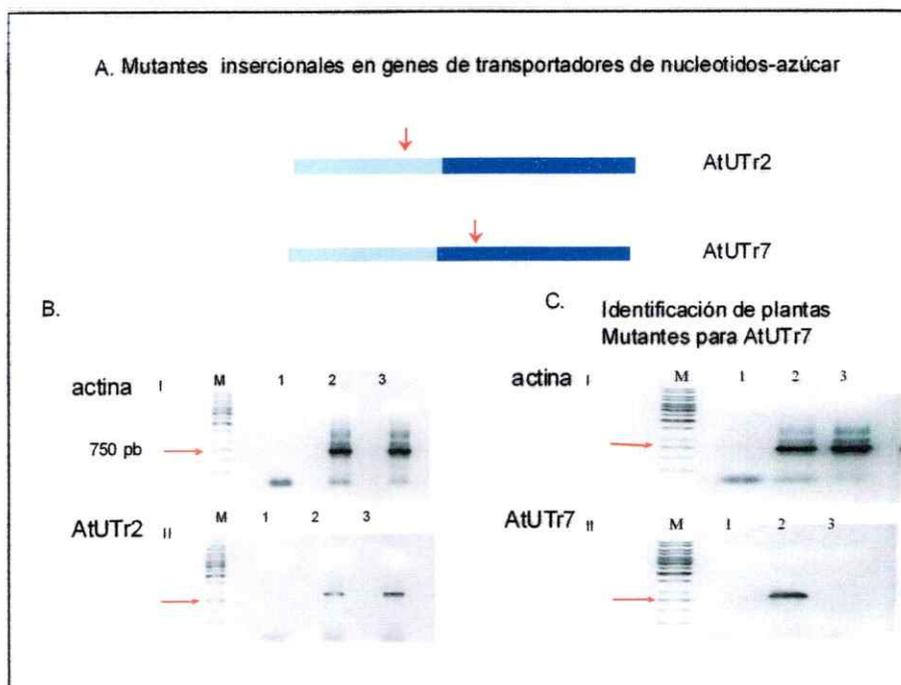
**Figura 8. Incorporación de diferentes NA en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi a 25°C durante 3 minutos de incubación.** Se ocuparon UDP-galactosa [ $^3\text{H}$ ], UDP-glucosa [ $^{14}\text{C}$ ] y GDP-Fucosa [ $^3\text{H}$ ] para los ensayos. Los resultados muestran el promedio de 3 replicas técnicas con sus respectivas desviaciones estándar.

	Promedio, [pmol/mg de proteína]	Desviación estándar, [pmol/mg de proteína]
UDP-Galactosa[3H]	117,59	10,50
UDP-glucosa[14C]	299,96	7,80
GDP-Fucosa[3H]	1,82	0,40

**Tabla 2. Valores promedio junto a sus desviaciones estándar, de diferentes nucleótidos azúcar incorporados en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi provenientes de plantas de *A. Thaliana* Col-0.**

#### **Identificación de plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* AtUTr2 y AtUTr7:**

Para la comprobar que las plantas utilizadas en el estudio de *Arabidopsis thaliana* eran mutantes en los genes *AtUTr2* y *AtUTr7*, los cuales codifican para transportadores de UDP-galactosa y UDP-glucosa/UDP-galactosa respectivamente, se realizaron reacciones de PCR a partir de cDNA extraído de plantas crecidas durante 2 semanas en medio líquido y oscuridad como se explica en materiales y métodos. En la Figura 9 se muestran los geles de agarosa en donde se aprecian los productos de amplificación utilizando los distintos partidores. Como se aprecia en la Figura 9A, la mutante en *AtUTr2*, es una mutante cuyo T-DNA se encuentra en la región promotora, sin embargo, continúa observándose acumulación de transcrito en la planta mutante (Figura 9B carril 3). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Vergara 2008, Tesis de Pregrado) indican que la mutante en *AtUTr2* posee un transcrito de este gen pero con un tamaño mayor al observado en la planta silvestre, sin embargo al hacer la electroforesis se vió un transcrito del mismo tamaño, pero no sabemos si este es funcional. El análisis de las mutantes en el gen *AtUTr7*, las cuales poseen el T-DNA inserto en la región codificante, no detecta el transcrito del gen (Figura 9C).



**Figura 9. Identificación de plantas mutantes.**

(A). Mutantes insercionales en genes de transportadores de nucleótidos azúcar. La figura muestra con flechas los sitios putativos de inserción del T-DNA en los genes de transportadores de nucleótidos azúcar de *Arabidopsis thaliana*. En azul se indica la secuencia codificante y en celeste la putativa región promotora. Al lado derecho de cada figura se indica el nombre asignado a cada mutante. (B). RT-PCR para identificación de plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes AtUTr2. Carril 1, controles negativos sin cDNA para la reacción. Carril 2, cDNA provenientes de plantas Col-0. Carril 3, cDNA de plantas mutantes en AtUTr2. M corresponde al estándar de PM de DNA (1 kb) I. Reacciones de PCR utilizando los partidores de Actina, II. Reacciones utilizando los partidores para AtUTr2. (C). RT-PCR para identificación de plantas de *Arabidopsis thaliana* AtUTr7 mutantes. Carril 1 controles negativos sin cDNA para la reacción. Carril 2 cDNA provenientes de plantas silvestres. Carril 3 cDNA de plantas mutantes AtUTr7. M corresponde al estándar de PM de DNA (1 kb) I. Reacciones de PCR utilizando los partidores de Actina, II. Reacciones de PCR utilizando los partidores para AtUTr7.

### **Comparación de actividad UDPasa de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestre y mutantes AtUTr2 y AtUTr7:**

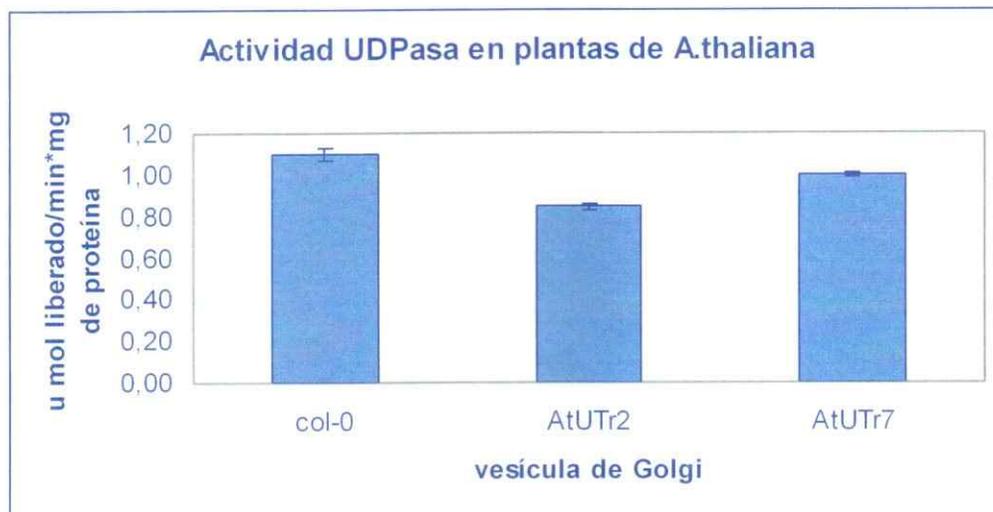
Para comparar la actividad de una enzima asociada a la síntesis de polisacáridos en el aparato de Golgi y ver su comportamiento en plantas silvestres como en plantas mutantes, se midió la actividad de una enzima que reside en el aparato de Golgi, la UDPasa, la cual hidroliza UDP generando como productos UMP y fósforo inorgánico (PI). El objetivo era ver si en las plantas mutantes se veía una diferencia en esta enzima con respecto a plantas silvestre que hiciera pensar que todo el sistema había sido alterado por la presencia de la mutación en los genes de los transportadores de nucleótidos azúcar. La actividad UDPasa se midió como se describe en materiales y métodos. Se determinó mediante test de hipótesis (tabla 3) y ocupando la distribución de t-student con un 5% de significancia, que hay evidencia para sostener que tanto la actividad de la UDPasa en las plantas mutantes para los genes ATUTr2 y AtUTr7 tiene distinta actividad respecto a la actividad que esta misma enzima muestra en la planta silvestre, y hacen pensar que otras enzimas relacionadas a la síntesis de pared celular primaria pueden estar siendo afectadas por el hecho de que estas plantas posean una inserción de T-DNA en los genes *AtUTr2* y *AtUTr7*, respectivamente (Figura 10).

Ho: Promedio de liberación de Pi en planta silvestre = Promedio de liberación de Pi en planta AtUTr(2/7)

	Promedio umol liberados /min*mg de proteína	Desviación Estandar pmol liberados	Limite Inferior	Limite superior
Col-O	1,10	0,03	1,02	1,17
AtUTr2	0,85	0,01	promedio fuera(<)	
AtUTr7	1,00	0,01	promedio fuera(<)	

**Tabla 3. Test de hipótesis para el promedio de Pi liberado por la enzima UDPasa en plantas de *A.thaliana*.**

Como hipótesis nula(Ho) se considero que el promedio de Pi liberado en plantas silvestres es el mismo que en plantas mutantes en el gen AtUTr2 y AtUTr7 . Se calcularon los valores del intervalo de confianza acupando la distribución de t-student, donde  $t_{0,975}=4,302$  y  $t_{0,025}=-4,302$ ; Promedio(X)= 1,1 ;Desviación estándar(S) = 0,03 y n=3. Para el calculo de los limites del intervalo se calculo el límite inferior:  $[X+( t_{0,025}*S)/raiz\ cuadrada(3)]=1,02$ , para el limite inferior  $[X+( t_{0,975}*S)/raiz\ cuadrada(3)]=1,17$ . Se ve que el valor promedio de umol liberado para AtUTr2(0,85) cae fuera del intervalo construido[1,02;1,17], al igual que el valor promedio umol liberado para AtUTr7(1,00), por lo que existe evidencia muestral para suponer que el promedio no es de 1,10 en AtUTr2 y AtUTr7, por lo que son distintos de Col-0 y se rechaza Ho.



**Figura 10. Medición de actividad UDPasa de vesículas enriquecidas en aparato de Golgi.**

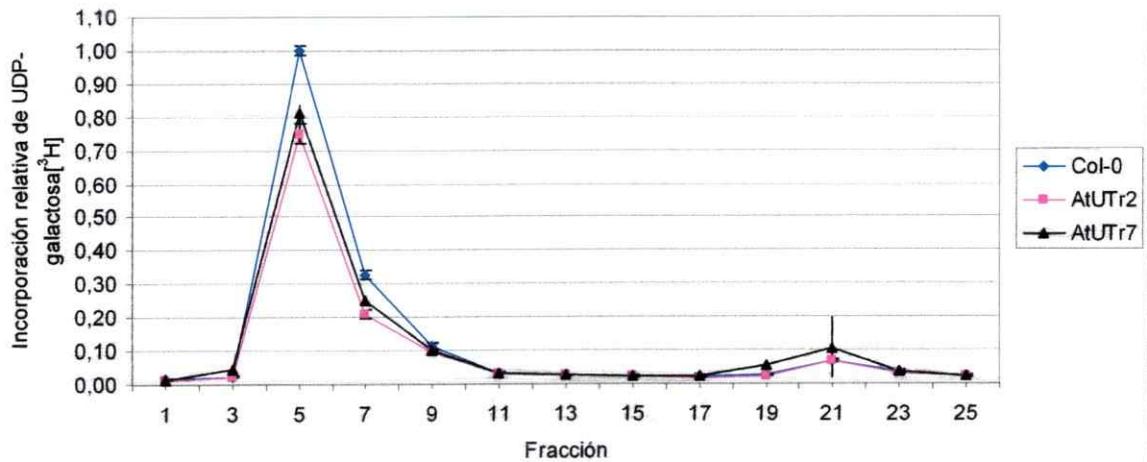
Vesículas provenientes de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (Col-0) y plantas mutantes en AtUTr2 y en AtUTr7 fueron utilizadas para medir la actividad UDPasa. Los resultados muestran el promedio de 3 replicas técnicas con sus respectivos valores de desviación estándar.

### **Incorporación de nucleótidos azúcar en gradientes de *Arabidopsis thaliana* silvestre y en las mutantes para los genes AtUTr2 y AtUTr7:**

Fracciones de gradientes de sacarosa obtenidas luego del fraccionamiento subcelular de plantas de *Arabidopsis thaliana* fueron incubados con UDP-galactosa y GDP-fucosa, como se describe en materiales y métodos. Se probaron estos dos nucleótidos azúcar, por cuanto de UDP-galactosa se había visto previamente que era transportado por AtUTr2 (Norambuena y cols., 2005), y se había visto que AtUTr7 era capaz de transportar UDP-glucosa/UDP-galactosa (AtUTr7; Segura M., 2005). Por otra parte se tomó GDP-fucosa con la expectativa que no fuera transportado debido a que en la caracterización bioquímica no se había visto esto.

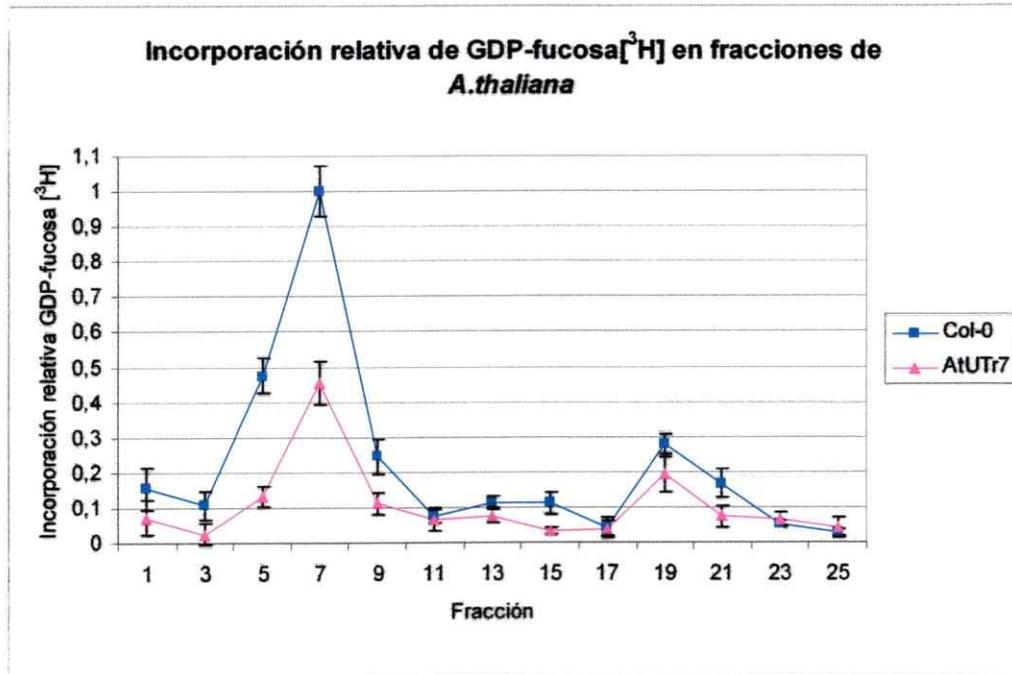
Se tomaron los valores de sustrato incorporados y se asignó el valor de 1 a la mayor incorporación. Se apreció incorporación relativa de UDP-galactosa tanto en la planta mutante en el gen AtUTr2 y para la planta mutante en el gen AtUTr7, y una distribución similar a lo largo del gradiente. (Figura 11). Del mismo modo se hizo el ensayo comparando la incorporación relativa de GDP-fucosa en fracciones de plantas silvestres (Col-0) con los de la mutante en AtUTr7. Se apreció una distribución similar en sus incorporaciones a lo largo del gradiente (Figura 12).

### Incorporación relativa de UDP-galactosa [<sup>3</sup>H] en plantas de *A.thaliana*



**Figura 11. Incorporación relativa de UDP-galactosa [<sup>3</sup>H] en plantas de *Arabidopsis thaliana*.**

Incorporación de UDP-galactosa en fracciones provenientes del gradiente de sacarosa, luego del fraccionamiento subcelular de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (Col-0), comparadas contra las mutantes en AtUTr2 y en AtUTr7. La incorporación de UDP-galactosa se graficó asignando el valor de 1 al valor máximo de UDP-galactosa incorporado por ensayo, de manera de comparar el promedio de 3 experimentos independientes.



**Figura 12. Incorporación relativa de GDP-fucosa<sup>[3H]</sup> en plantas de *Arabidopsis thaliana*.**

Incorporación de GDP-fucosa en fracciones provenientes del gradiente de sacarosa, luego del fraccionamiento subcelular de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (Col-0), comparada con la planta mutante AtUTr7. La incorporación de GDP-fucosa se graficó asignando el valor de 1 al valor máximo de GDP-fucosa incorporado por ensayo, de manera de comparar el promedio de 3 experimentos independientes.

**Incorporación de nucleótidos azúcar en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi en plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y mutantes para las proteínas AtUTr2 y AtUTr7, respectivamente:**

Vesículas enriquecidas en aparato de Golgi se incubaron con UDP-galactosa para ver la incorporación de este NDP-azúcar en plantas silvestres y mutantes, ya que tanto AtUTr2 como AtUTr7 habían sido descritos anteriormente como transportadores de UDP-galactosa. En un experimento independiente, se incubaron en presencia de GDP-fucosa, por cuanto GDP-fucosa no había sido transportada por las proteínas AtUTr2 u AtUTr7 en estudios previos (Norambuena y cols., 2005) y (AtUTr7; Segura M., 2005) respectivamente.

Se determinó mediante test de hipótesis a través de construcción intervalo para el promedio de [pmol incorporados/mg de proteína], ocupando la distribución t-student con una confianza del 95%, y tomando como supuesto que los parámetros normales son los correspondientes al promedio y desviación estándar de la planta silvestre col-0, que no existen diferencias significativas en la incorporación de UDP-galactosa en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi (tabla 4) y en retículo endoplásmico (tabla 5) de plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes para las proteínas AtUTr2 y AtUTr7 respectivamente (Figura 13).

Ho: Promedio de incorporación de UDP-galactosa/mg de proteína en planta silvestre = Promedio de incorporación de UDP-galactosa/mg de proteína en planta mutante AtUTr(2/7)

Aparato de Golgi

	Promedio [pmol incorporado/mg ]	Desviación Estandar [ pmol incorporados/mg]	Limite Inferior	Limite superior
Col-O	117,58	13,60	83,80	151,36
AtUTr2	122,31	13,16	promedio dentro	
AtUTr7	104,44	5,08	promedio dentro	

**Tabla 4.** Test de hipótesis para el promedio de pmol incorporados de UDP-galactosa/mg de proteína incorporados en vesículas Golgi de plantas de A.thaliana.

Como hipótesis nula(Ho) se considero que el promedio de pmol incorporados de UDP-galactosa/mg en plantas silvestres es el mismo que en plantas mutantes en el gen AtUTr2 y AtUTr7 . Se calcularon los valores del intervalo de confianza acupando la distribución de t- student, donde  $t_{0,975}=4,302$  y  $t_{0,025}=-4,302$ ; Promedio(X)= 117,58 ;Desviación estándar(S) = 13,6 y n=3. Para el calculo de los limites del intervalo se calculo el límite inferior:  $[X+(t_{0,025}*S)/\text{raiz cuadrada}(3)]=83,8$ , para el limite inferior  $[X+(t_{0,975}*S)/\text{raiz cuadrada}(3)]=151,36$ . Se ve que el valor promedio de pmol incorporados/mg de AtUTr2(122,31) cae dentro del intervalo [83,80;151,36] al igual que el valor promedio de AtUTr7(104,44), por lo que hay evidencia muestral para aceptar Ho, y afirmar que no existen diferencias entre los promedios de [pmoles incorporados/mg] en las plantas mutantes respecto de la planta silvestre.

$H_0$ : Promedio de incorporación de UDP-galactosa/mg de proteína de planta silvestre = Promedio de incorporación de UDP-galactosa/mg de proteína de planta mutantes AtUTr(2/7)

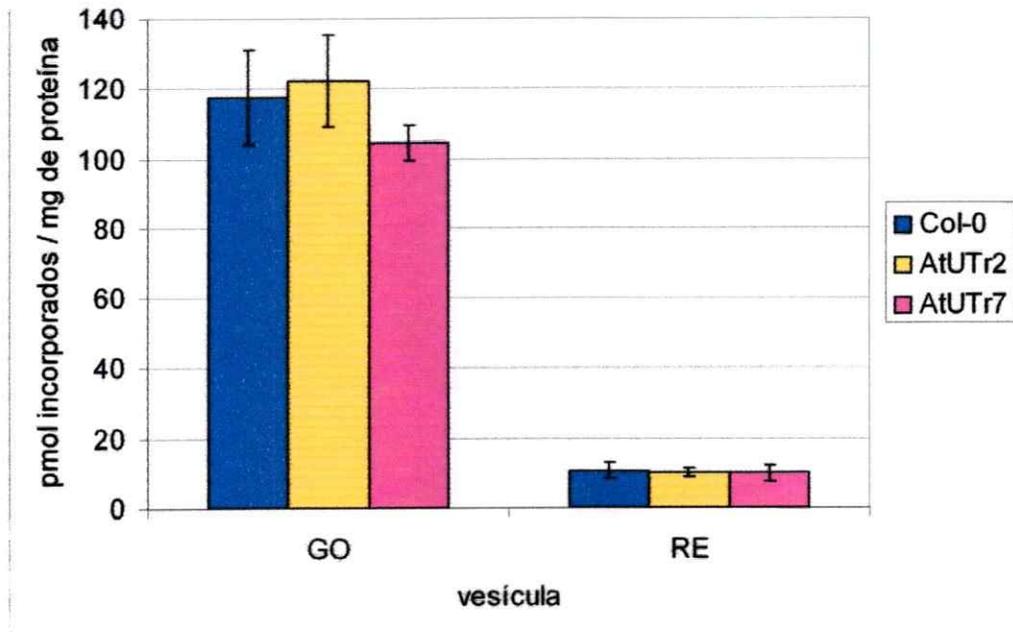
Reticulo Endoplásmico

	Promedio pmol incorporado/mg	Desviación Estandar pmol incorporados/mg	Limite inferior	Limite superior
Col-O	10,67	2,35	4,83	16,51
AtUTr2	10,21	1,21	promedio dentro	
AtUTr7	9,96	2,47	promedio dentro	

Tabla 5. Test de hipótesis para el promedio de pmol incorporados de UDP-galactosa/mg de proteína incorporados en vesículas de retículo endoplásmico de plantas de *A.thaliana*.

Como hipótesis nula( $H_0$ ) se considero que el promedio de pmol incorporados de UDP-galactosa/mg en plantas silvestres es el mismo que en plantas mutantes en el gen AtUTr2 y AtUTr7 . Se calcularon los valores del intervalo de confianza acupando la distribución de t- student, donde  $t_{0,975}=4,302$  y  $t_{0,025}=-4,302$ ; Promedio( $X$ )= 117,58 ;Desviación estándar( $S$ ) = 13,6 y  $n=3$ . Para el calculo de los limites del intervalo se calculo el límite inferior:  $[X+( (t_{0,025}*S)/raiz\ cuadrada(3))]=4,83$ , para el limite inferior  $[X+( (t_{0,975}*S)/raiz\ cuadrada(3))]=16,51$ . Se ve que el valor promedio de pmol incorporados/mg de AtUTr2(10,21) cae dentro del intervalo construido [4,83;16,51]al igual que el valor promedio de AtUTr7(9,96), por lo que hay evidencia muestral para aceptar  $H_0$ , y afirmar que no existen diferencias entre los promedios de pmoles incorporados/mg en las plantas mutantes respecto de la planta silvestre.

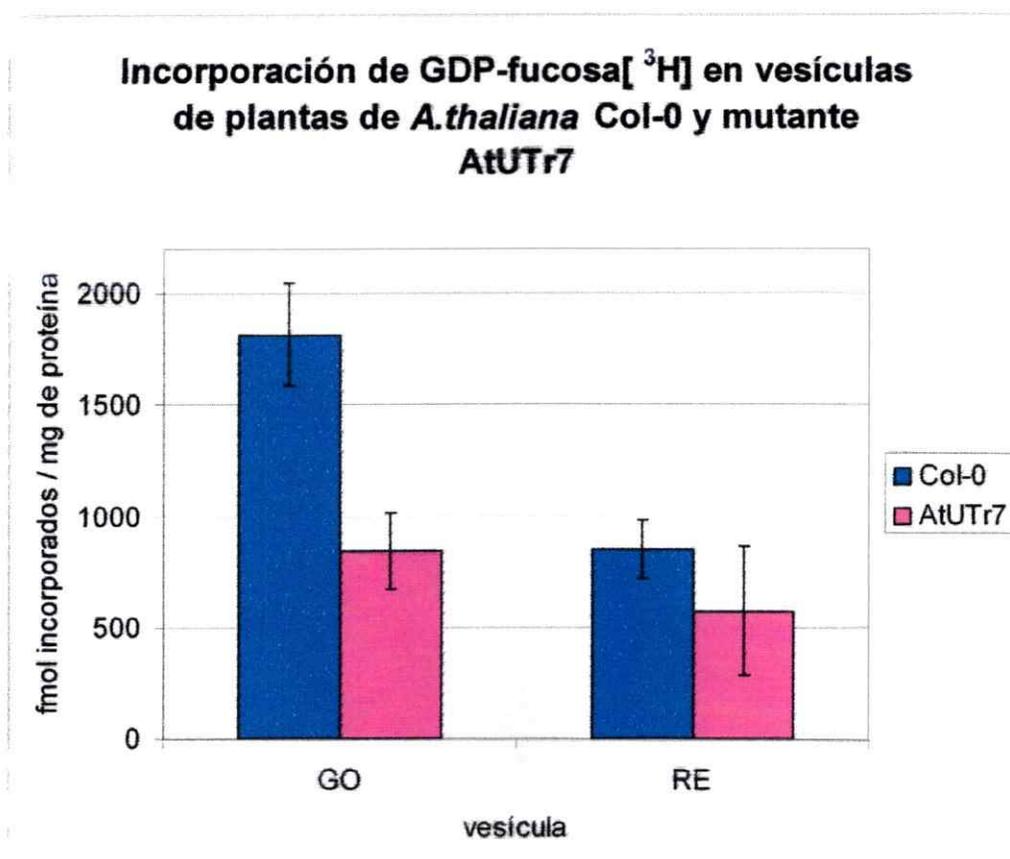
### Incorporación de UDP-galactosa [ $^3\text{H}$ ] en vesículas de plantas de *A.thaliana* Col-0 y mutantes AtUTr2 y AtUTr7



**Figura 13. Incorporación de UDP-galactosa en vesículas de plantas de *Arabidopsis thaliana*.**

Comparación de la Incorporación de UDP-galactosa [ $^3\text{H}$ ] en vesículas de aparato de Golgi (GO) y retículo (RE) endoplásmico proveniente de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (Col-0) y mutantes en AtUTr2 y en AtUTr7. Experimento representativo, el cual se repitió 3 veces. Los resultados muestran el promedio de 3 replicas técnicas con sus respectivas desviaciones estándar.

En lo que respecta a la incorporación de GDP-fucosa en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutante para la proteína AtUTr7, se vio una disminución significativa (tabla 6) en la cantidad de GDP-fucosa incorporada en vesículas de aparato de Golgi con respecto a plantas silvestres (figura 14). En retículo endoplasmático no se apreciaron diferencias significativas (tabla 7)



**Figura 14. Incorporación de GDP-fucosa [ $^3\text{H}$ ] en vesículas de plantas de *Arabidopsis thaliana*.**

Comparación de la incorporación de GDP-fucosa [ $^3\text{H}$ ] en vesículas de aparato de Golgi (GO) y retículo endoplásmico (RE) provenientes de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (Col-0) y mutante AtUTr7. Experimento tipo, el cual se repitió 3 veces. Los resultados muestran el promedio de 3 replicas técnicas con sus respectivas desviaciones estándar.

Ho: Promedio de incorporación de GDP-fucosa/mg de proteína de planta silvestre = Promedio de incorporación de GDP-fucosa/mg de proteína de planta mutantes AtUTr(2/7)

Aparato de Golgi

	Promedio fmol incorporado/mg	Desviación Estandar fmol incorporados/mg	Limite Inferior	Limite superior
Col-O	1817,15	227,15	1252,96	2381,35
AtUTr7	843,58	171,05	promedio fuera	

**Tabla 6. Test de hipótesis para el promedio de fmol incorporados de GDP-fucosa/mg de proteína, incorporados en vesículas de Aparato de Golgi de plantas de A.thaliana.**

Como hipótesis nula(Ho) se considero que el promedio de fmol incorporados de GDP-fucosa/mg de proteína, en plantas silvestres es el mismo que en plantas mutantes en el gen AtUTr7 . Se calcularon los valores del intervalo de confianza ocupando la distribución de t- student, donde  $t_{0,975}=4,302$  y  $t_{0,025}=-4,302$ ; Promedio(X)= 1817,15 ;Desviación estándar(S) = 227,15 y n=3. Para el cálculo de los límites del intervalo se calculo el límite inferior:  $[X+((t_{0,025}*S)/\text{raiz cuadrada}(3))]=1252,96$  ; para el limite superior  $[X+((t_{0,975}*S)/\text{raiz cuadrada}(3))]=2381,35$ . Se ve que el valor promedio de pmol incorporados/mg de proteína en AtUTr7(843,58) cae fuera del intervalo construido [1252,96;2381,35], por lo que hay evidencia muestral para rechazar Ho, y afirmar que existen diferencias entre los promedios de fmoles incorporados/mg en las planta mutante AtUTr7 respecto de la planta silvestre Col-0.

Ho: Promedio de incorporación de GDP-fucosa/mg de proteína de planta silvestre = Promedio de incorporación de GDP-fucosa/mg de proteína de planta mutantes AtUTr(2/7)

Reticulo Endoplásmico

	Promedio pmol incorporado/mg	Desviación Estandar pmol incorporados/mg	Limite Inferior	Limite superior
Col-O	849,51	134,62	515,15	1183,88
AtUTr7	574,83	291,43	promedio dentro	

**Tabla 7 Test de hipótesis para el promedio de fmol incorporados de GDP-fucosa/mg de proteína, incorporados en vesículas de retículo endoplásmico de plantas de A.thaliana.**

Como hipótesis nula(Ho) se considero que el promedio de fmol incorporados de GDP-fucosa/mg de proteína, en plantas silvestres es el mismo que en plantas mutantes en el gen AtUTr7 . Se calcularon los valores del intervalo de confianza ocupando la distribución de t- student, donde  $t_{0,975}=4,302$  y  $t_{0,025}=-4,302$ ; Promedio(X)= 849,51 ;Desviación estándar(S) = 134,62 y n=3. Para el cálculo de los límites del intervalo se calculo el límite inferior:  $[X+((t_{0,025}*S)/\text{raiz cuadrada}(3))]=515,15$  ; para el limite superior  $[X+((t_{0,975}*S)/\text{raiz cuadrada}(3))]=1183,88$ . Se ve que el valor promedio de pmol incorporados/mg de proteína en AtUTr7(574,83) cae fuera del intervalo construido [515,15;1183,88], por lo que hay evidencia muestral para aceptar Ho, y afirmar que no existen diferencias entre los promedios de fmoles incorporados/mg en el RE de la planta mutante AtUTr7 respecto de la planta silvestre Col-0.

**Actividad XG-Fucosiltransferasa en plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestre y mutante AtUTr7:**

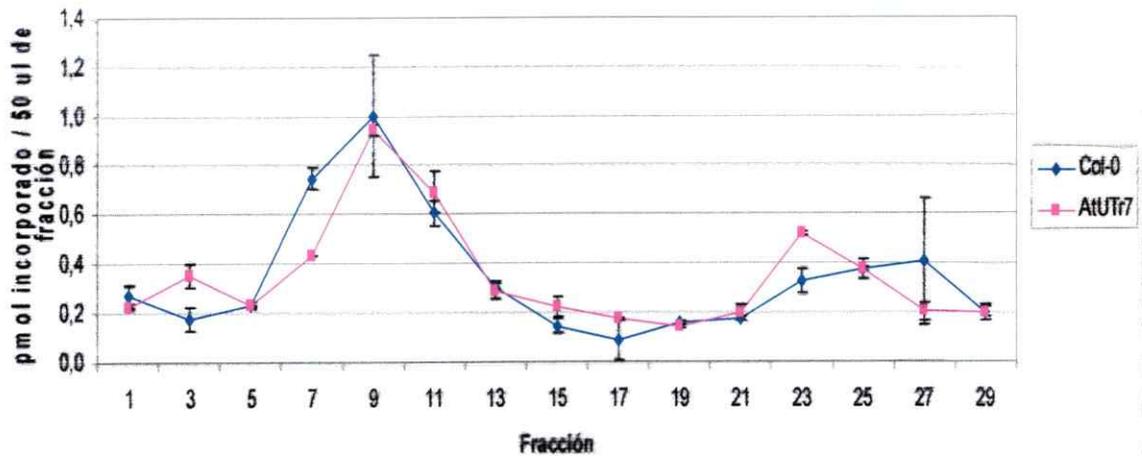
Luego de ver que la cantidad de GDP-fucosa incorporada en vesículas de aparato de Golgi de plantas mutantes para AtUTr7 era cuantitativamente menor que en plantas silvestres, se quiso ver que ocurría con la actividad de la XG-fucosiltransferasa, una de las principales enzimas que utiliza GDP-fucosa en el aparato de Golgi de *Arabidopsis thaliana* y que participa en la síntesis de la hemicelulosa más abundante en la pared celular de esta planta. De esta forma, se determino la actividad XG-fucosiltransferasa en fracciones de gradientes de sacarosa obtenidos por fraccionamiento subcelular a partir de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y de plantas mutantes en AtUTr7. Se observó que la actividad XG-fucosiltransferasa no cambia en forma significativa en la planta que contiene la mutación en el gen al compararla con la planta silvestre; para ello se tomo la fracción con más actividad en una y otra planta(fracción 9) y se le practico un test de hipótesis para diferencia de promedios construyendo un intervalo(tabla 8). La Figura 15 muestra un ensayo representativo, de un experimento que se realizo 3 veces. Este resultado podría indicar que la disminución en la incorporación de GDP-fucosa no tiene que ver con un problema en una de las principales enzimas que utiliza este sustrato.

	Promedio [pmol incorporado/mg]	Desviación Estandar [pmol incorporados/mg]	Limite inferior	Limite superior
Col-O	1,00	0,25	0,38	1,58
AtUTr7	0,94	0,03	promedio dentro	

**Tabla 8.** Test de hipótesis para el promedio de pmol incorporados por la enzima XG-FucTasa en la fracción 9 de gradientes de *A.thaliana*.

Como hipótesis nula ( $H_0$ ) se considero que el promedio de pmol incorporados de GDP-fucosa/50 ul de fracción por la XG-FucTasa en plantas silvestres es el mismo que en plantas mutantes en el gen *AtUTr7*. Se calcularon los valores del intervalo de confianza ocupando la distribución de t- student, donde  $t_{0,975}=4,302$  y  $t_{0,025}=-4,302$ ; Promedio( $X$ )= 1,0 ;Desviación estándar( $S$ ) = 0,25 y  $n=3$ . Para el cálculo de los límites del intervalo se calculo el límite inferior:  $[X+( (t_{0,025}*S)/\text{raiz cuadrada}(3))]=0,38$  para el límite superior  $[X+( (t_{0,975}*S)/\text{raiz cuadrada}(3))]=1,58$ . Se ve que el valor promedio de [pmol incorporados/50 ul de fracción] de *AtUTr7*(0,94) cae dentro del intervalo construido [0,38;1,58], por lo que hay evidencia muestral para aceptar  $H_0$ , y afirmar que no existen diferencias entre los promedios de [pmoles incorporados/50 ul de fracción] entre las planta mutante *AtUTr7* y la planta silvestre Col-0.

### Actividad XG-FucTasa en plantas de *A.thaliana* Col-0 y mutante AtUTr7



**Figura 15. Medición de actividad XG-Fucosiltransferasa.**

Se muestra la medición de actividad de la enzima XG-FucTasa en fracciones del Gradiente obtenido mediante fraccionamiento subcelular, en plantas silvestres como en plantas mutantes AtUTr7.

## DISCUSION

En este trabajo se evaluó el efecto que generan mutaciones en transportadores de nucleótidos azúcar en la incorporación de UDP-galactosa y GDP-fucosa hacia aparato de Golgi. Para ello se trabajó con mutantes insercionales en los genes *AtUTr2* y *AtUTr7*, los cuales han sido previamente caracterizados en sistemas heterólogos en nuestro laboratorio (Norambuena et al., 2005; Segura 2005). Para analizar los efectos en la incorporación de nucleótidos azúcar en el aparato de Golgi fue necesario implementar una metodología de separación de organelos a partir de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

### Fraccionamiento subcelular

Para la determinación *in planta* del efecto de la ausencia de TNAs, fue de suma importancia establecer un buen sistema de separación de organelos de *Arabidopsis thaliana*, de modo de obtener fracciones enriquecidas en vesículas de aparato de Golgi. También fue necesario poner a punto un sistema en el cual lográramos obtener una cantidad considerable de proteínas para poder realizar ensayos de incorporación de nucleótidos azúcar. Por estos motivos se eligió crecer las plantas en medio líquido, de modo de obtener cantidades considerables de tejido inicial para el posterior fraccionamiento subcelular.

Después de implementar la metodología, pudimos obtener fracciones enriquecidas en los distintos organelos y no fracciones 100% puras. Lo anterior es un hecho inevitable puesto que proteínas residentes del sistema de endomembranas están en un constante movimiento entre compartimentos. Esto último se ha evidenciado al utilizar técnicas de identificación de proteínas pertenecientes a distintos organelos mediante la metodología de LOPIT (Localization of Organelle Proteins by Isotope Tagging), en la cual se ha mostrado

que las proteínas pertenecientes a un organelo en particular, tienen distribuciones similares al ser fraccionadas en gradientes de densidad (Dunkley y cols., 2004).

Existe además, evidencia de que la actividad de las enzimas glicosiltransferasas se ubica en el lumen del aparato de Golgi (Wulff y col., 1998; Keegstra y Raikhel 2001;) y que sus sustratos son sintetizados en el citosol; en este trabajo se pudo ver que, en las fracciones enriquecidas en aparato de Golgi provenientes de plantas de *Arabidopsis thaliana*, se visualiza mayormente las actividades de enzimas asociadas a aparato de Golgi en el gradiente, la XG-Fucosiltransferasa y la UDPasa, corroborando lo que se ha visto en trabajos anteriores.

Por otro lado, la mayor actividad de enzimas marcadoras de retículo endoplasmático como lo son NADH citocromo C reductasa insensible a Antimicina A, y la Glucosidasa II, aparecen principalmente en fracciones que están claramente separadas de las enzimas marcadoras de aparato de Golgi. Se tomaron estos dos marcadores para tener una mayor certeza de lo que se estaba viendo por distintas metodologías.

A pesar de lo anterior, debo decir que no se determinó en el gradiente la presencia de otros organelos, si embargo se puede argüir que las actividades de las proteínas transportadoras de nucleótidos azúcares no ha sido evidenciada en otro tipo de membranas que no sean la de aparato de Golgi y la de retículo endoplasmático.

### **Incorporación de Nucleótidos azúcar en plantas mutantes para transportadores de nucleótidos azúcares.**

En los ensayos de incorporación de nucleótidos azúcares se observó que en las plantas mutantes en los genes *AtUTr2* y *AtUTr7*, los que codifican para transportadores que al ser expresados en levaduras transportan UDP-galactosa, y UDP-galactosa/UDP-glucosa, respectivamente, no se apreció una diferencia significativa en la incorporación de UDP-galactosa en las fracciones enriquecidas en aparato de Golgi de dichas plantas mutantes con respecto a las plantas silvestres. Este hecho no era lo esperado, puesto que al haber una inserción de un elemento T-DNA dentro de estos genes, se esperaba que la función que fue asignada a las proteínas codificadas por estos genes se hubiese visto afectada en la planta; sin embargo, al realizar la comparación con plantas silvestres, no se observaron diferencias significativas en la incorporación de UDP-galactosa. Lo anterior puede explicarse con el hecho que *Arabidopsis thaliana* es portadora de una amplia gama de TNAs por lo que otras proteínas podrían estar supliendo la función del transportador ausente. Otro hecho que pudiese explicar este resultado en las plantas *AtUTr2*, es el hecho de que el mensajero de *AtUTr2* aun se encontró presente, si bien en una cantidad menor que en la planta silvestre, no se puede descartar que mantuviera alguna funcionalidad. Por otro lado, entre algunos TNAs correspondientes a familias de TNAs, se han reportado porcentajes de identidad superiores al 80 %. Ejemplo de esto, es el gen *AtUTr1*, el cual es un transportador de UDP-glucosa de *Arabidopsis thaliana* (Norambuena L. y cols., 2002), al cual se ha asociado un gen con el cual comparten identidad en un 83%, el gen *AtUTr3* ; en la misma línea, se vio previamente una gran similitud entre *AtUTr2* y *AtUTr4*, del 88% en su secuencia aminoacídica (Marchant Tesis Doctoral, 2004), a partir de lo cual se sugiere que los partidores utilizados para la amplificación de *AtUTr2* provenientes del cDNA de las plantas mutantes, pudiesen estar de alguna manera

reconociendo al transcrito de AtUTr4, y a partir de eso se podría explicar la menor eficiencia de la reacción de PCR, la que finalmente se traduce en una visualización de una banda más débil de la amplificación de este transcrito en la planta mutante para el gen AtUTr2, como se puede apreciar en la Figura 9.

Por otro lado, Handford y cols., (2004), complementaron mutantes de levaduras deficientes en el transporte de GDP-manosa con cDNAs provenientes de genes de *A.thaliana* que poseen similitud a GONST1, un transportador de GDP-manosa (Baldwin y cols., 2001). Los resultados indicaron que sólo GONST2, el cual posee una similitud del 61% con GONST1, fue capaz de complementar la mutante deficiente en el transporte de GDP-manosa. Esto podría indicar que en la planta los otros TNAs homólogos a GONST1, podrían transportar otros NDP-azúcares o bien el mismo pero en menor magnitud (Handford y cols., 2004). Los resultados expuestos anteriormente nos confirma que en *Arabidopsis thaliana* los transportadores de nucleótidos azúcares se encuentran como familias de transportadores y que debido a ello la ausencia de alguno de sus miembros podría estar siendo suplida por algún transportador homólogo al que en este caso se encontraba mutado por la inserción del elemento T-DNA, como por ejemplo AtUTr4, explicando de esta forma la ausencia en una disminución en la incorporación de UDP-galactosa en las mutantes de AtUTr2 y de AtUTr7.

En lo referente a la incorporación de GDP-fucosa en las vesículas de aparato de Golgi de *Arabidopsis thaliana*, se apreció una disminución significativa en la incorporación de GDP-fucosa en la planta mutante en AtUTr7 con respecto a la planta silvestre. Este resultado no lo esperábamos, por el contrario, se pensaba que la incorporación de GDP-fucosa tanto en la planta mutante como en la silvestre debía mantenerse inalterada por cuanto este transportador al ser caracterizado en el sistema heterólogo mostró tener actividad transportadora de UDP-glucosa/ UDP-galactosa (Segura 2005); además un transportador homólogo a AtUTr7, la proteína

SQV-7, pertenecientes al organismo *Caenorhabditis elegans* (Berninsone y cols. 2001), muestra ser un transportador de nucleótidos azúcar para UDP-acido glucurónico, UDP-N-acetilgalactosamine y UDP-galactosa, y no ser transportador de CMP-ácido sialico, GDP-fucosa, UDP-N-acetilglucosamine, UDP-glucosa y GDP-manosa. Sin embargo una proteína *in vivo*, es decir en la planta, podría tener otra función que la descrita en un sistema heterólogo, por cuanto el ambiente proteico es muy distinto al que tendrá ella en la levadura (Bassham y Raikhel, 2000.). De otro modo, se ha visto un transportador de nucleótidos azúcar perteneciente a humanos, homólogo a SQV-7 de *C. elegans*, el cual presenta funciones diferenciales dependiendo del organismo en el que se exprese (Takeshi y cols., 2004); en este caso el gen *hfrcl* expresado en levaduras es capaz de transportar múltiples sustratos, entre ellos UDP-N-acetilglucosamina, UDP-glucosa y GDP-manosa, sin embargo cuando se expresa en células de mamífero, el mismo transportador solo transporta UDP-N-acetilglucosamina y UDP-glucosa.

De este modo se sugiere que AtUTr7 podría estar transportando GDP-fucosa *in planta* o bien tener alguna relación estructural con la fucosiltransferasa, que hace que en su ausencia esta actividad se vea disminuida. Sin embargo, al comparar la actividad XG-Fucosiltransferasa de las plantas mutantes para la proteína AtUTr7 con respecto a las plantas silvestres Col-0, se vió que no hay un cambio significativo en esta actividad de una con respecto a la otra (tabla 8).

A pesar que anteriormente dijimos que *Arabidopsis thaliana* posee múltiples TNAs, ello no basta para que la incorporación de GDP-fucosa sea suplida totalmente por otros transportadores que transporten GDP-fucosa ya que en las plantas mutantes en AtUTr7 se produjo una menor incorporación de GDP-fucosa en vesículas enriquecidas en aparato de Golgi al compararlo con la incorporación de este nucleótido azúcar en las plantas silvestres. Esto bien podría estar ocurriendo, ya que "in planta", estas proteínas transportadoras podrían estar siendo moduladas

por sus interacciones con otras proteínas ausentes en las levaduras, y la expresión de genes podría estar siendo regulada en el desarrollo o por su ambiente, lo cual podría contribuir a su función específica en la planta (Bassham y Raikhel, 2000). Además de esto, estudios en levaduras sobre genes duplicados han demostrado que ellos exhiben funciones de respaldo, adquisición de nuevas funciones o bien de regulación frente a cambios del ambiente (Kuepfer y cols., 2005). Por ello, trabajar con sistemas en que se presenten la mayoría de los parámetros reales, es decir, que estén los elementos regulatorios, las proteínas que interactúan endogenamente con las que se quiere estudiar y que se encuentren genes que puedan suplir función, como es el caso de estudiar a los transportadores "in vivo", puede ser visto como un buen acercamiento a la realidad, observando lo que pueda ocasionar la pérdida de un gen en un sistema, en desmedro de una visión menos sistémica, como lo es una expresión heteróloga.

Por estos motivos, creo que es interesante el análisis que podría hacerse en el aparato de Golgi, del papel que tienen las proteínas transportadoras de nucleótidos azúcar en el control de la biosíntesis de hemicelulosas, ya que lo visto, por lo menos para el transporte de GDP-Fucosa en la planta mutante para el gen AtUTr7, es una evidencia de que se podría estar limitando el paso de los sustratos que ocupan las glicosiltransferasas para la formación de polímeros no celulósicos en el aparato de Golgi de plantas, lo que en algún momento podría influir en alguna vía en que este sustrato este siendo ocupado.

## CONCLUSIONES

Se logró fraccionar membranas de aparato de Golgi de modo de obtener una buena separación con respecto a membranas retículo endoplasmático, y a la vez se obtuvieron fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi con una concentración de proteínas que permitió realizar ensayos de incorporación de NDP-azúcares.

Se observó que la incorporación de UDP- galactosa en vesículas de aparato de Golgi de las plantas mutantes en AtUTr2 y AtUTr7, no se vio afectada al comparar su incorporación con la incorporación de este nucleótido azúcar en plantas silvestres.

Se observó en plantas AtUTr7, que la incorporación de GDP-fucosa en las vesículas de aparato de Golgi de *Arabidopsis thaliana*, disminuyó con respecto a la incorporación de GDP-fucosa en la plantas silvestres.

## **PROYECCIONES**

Me parece que sería interesante evaluar en plantas mutantes para AtUTr7, qué genes de transportadores de nucleótidos azúcar están siendo expresados de manera más fuerte, y poder analizar cómo es que el sistema reacciona ante una disminución de la cantidad de GDP-fucosa incorporada en las vesículas de aparato de Golgi; además poder ver cómo ello afecta a la composición de la pared celular con sus consecuencias respectivas en propiedades de resistencia y elasticidad, o quien sabe, de resistencia ante ataque de patógenos.

## **PRESENTACION**

Este trabajo fue presentado en la XX reunión anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile, el año 2006 que se llevo a cabo en Pucón, Chile.

## BIBLIOGRAFIA

- Ames, BN. (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods in Enzymology*, 8: 115-118.
- Baldwin TC, Handford MG, Yuseff MI, Orellana A, Dupree P. (2001) Identification and characterization of GONST1, a golgi-localized GDP-mannose transporter in Arabidopsis. *The Plant Cell* 13(10):2283-95.
- Bassham, DC. y Raikhel, NV.,2000. Plant cells are not just green yeast. *Plant Physiology* 122(4):999-1001.
- Berninsone, P., Hwang H., Zemtseva I., Horvitz H. y Hirschberg C. (2001). SQV-7, a protein involved in *Caenorhabditis elegans* epithelial invagination and early embryogenesis, transports UDP-glucuronic acid, UDP-Nacetylgalactosamine, and UDP-galactose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(7):3738-43.
- Bollag, DM. y Edelstein, (SJ. 1993 b) Bollag, DM., Edelstein, SJ. (1993 b). En *Protein Methods*. Wiley-Liss, Inc, New York. páginas: 97-113.
- Bollag, DM. y Edelstein, SJ., (1993 a) Bollag, DM., Edelstein, SJ. (1993 a). En *Protein Methods*. Wiley-Liss, Inc, New York. páginas: 145-153.
- Bonin CP, Potter I, Vanzin GF, Reiter WD.(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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(5):2085-90.
- Brett C. y Waldron K. *Physiology and Biochemistry of Plant Cells Walls*. Second Edition. Chapman &Hall, 1996.
- Briskin, D., Leonard, R., Hodges, T., 1987. Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Methods in Enzymology*, 148: 542-569.

- Burns D. y Touster O.,1982. Purification and Characterization of Glucosidase II, an Endoplasmic Reticulum Hydrolase Involved in Glycoprotein Biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 257:9991-10000.
- Carpita NC. y Gibeau DM.,1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant journal* 3(1):1-30
- Dörman P. y Benning C., 1998. Dörmann P, Benning C.,1998. The role of UDP-glucose epimerase in carbohydrate metabolism of Arabidopsis. *The Plant journal* 13(5):641-52.
- Dunkley TP, Hester S, Shadforth IP, Runions J, Weimar T, Hanton SL, Griffin JL, Bessant C, Brandizzi F, Hawes C, Watson RB, Dupree P, Lilley KS.,2006. Mapping the Arabidopsis organelle proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(17):6518-23.
- Dunkley TP, Watson R, Griffin JL, Dupree P, Lilley KS.,2004. Localization of organelle proteins by isotope tagging (LOPIT). *Molecular & cellular proteomics* 3(11):1128-34.
- Farkas, V. y Maclachlan, G.,1988. Fucosylation of exogenous Xyloglucans by Pea microsomal membranes *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 264, nº1: 48-53.
- Handford M, Rodriguez-Furlán C, Orellana A.,2006. Nucleotide-sugar transporters: structure, function and roles in vivo. *Brazilian journal of medical and biological research* 39(9):1149-58.
- Handford MG, Sicilia F, Brandizzi F, Chung JH, Dupree P., 2004. Arabidopsis thaliana expresses multiple Golgi-localised nucleotide-sugar transporters related to GONST1. *Molecular genetics and genomics* 272(4):397-410.

Hirschberg CB, Robbins PW, Abeijon C., 1998. Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Annual review of biochemistry 67:49-69.

Keegstra, K. y Raikhel, NV., 2001. Plant glycosyltransferases. Current opinion in plant biology 4(3):219-24.

Lübke T., Marquardt T., von Figura K., Körner C., 1999. A new type of carbohydrate deficient glycoprotein síndrome due to a decreased import of GDP-Fucose into the Golgi. The Journal of Biological Chemistry, 274: 25986-25989.

Marchant, L., 2004. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Participación in vivo de los transportadores de nucleótidos azúcar de aparato de Golgi en la biosíntesis de hemicelulosas y pectinas de *Arabidopsis thaliana*.

Muñoz P, Norambuena L, Orellana A., 1996. Evidence for a UDP-Glucose Transporter in Golgi Apparatus-Derived Vesicles from Pea and Its Possible Role in Polysaccharide Biosynthesis. Plant Physiology 112(4):1585-1594.

Neckelmann, G. y Orellana, A., 1998. Metabolism of uridine 5'-diphosphate-glucose in golgi vesicles from pea stems. Plant Physiology 117(3): 1007-1014.

Norambuena L, Marchant L, Berninsone P, Hirschberg CB, Silva H, Orellana A., 2002. Transport of UDP-galactose in plants. Identification and functional characterization of AtUTr1, an Arabidopsis thaliana UDP-galactos/UDP-glucose transporter. The Journal of biological chemistry 277(36):32923-9.

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(3):521-9.

Price N., Reiter W., Raikhel NV., 2002. Molecular Genetics of Non-processive Glycosyltransferases., The Arabidopsis Book. CR Somerville, EM Meyerowitz, eds. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.

Reid, JSG., 2000. Reid JS Grant (2000) Cementing the cell wall: cell wall polysaccharide synthesising enzymes. Current Opinion in Plant Biology, 3: 512-516.

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

Reyes F., 2008. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Participación de los transportadores de UDP-glucosa de Arabidopsis thaliana, AtUTr1 y AtUTr3, en mecanismos de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático.

Rollwitz I., Santaella M., Hille D., Flügge UI., Fischer K., 2006. Characterization of AtNST-KT1, a novel UDP-galactose transporter from Arabidopsis thaliana. FEBS Letters 580(17):4246-51.

Segura, 2005. Tesis para optar al grado de Ingeniero en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Expresión y caracterización del transportador AtSQV7 de Arabidopsis thaliana homólogo al gen SQV7 de Caenorhabditis elegans.

Suda T., Kamiyama S., Suzuki M., Kikushi N., Nakayama K., Narimatsu H., Jigami Y. Aoki T. y Nishihara S., 2004. Molecular cloning and characterization of a human multisubstrate specific nucleotide-sugar transporter homologous to Drosophila fringe connection. The Journal of biological chemistry 279(25):26469-74.

Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J. (eds) (1999) *Essentials of Glycobiology*, Capitulo 17: General Properties of Glycosyltransferase Reactions, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Wulff, C. y cols., 2000. Wulff, C., Norambuena, L. y Orellana, A. (2000) GDP-Fucose uptake into the Golgi apparatus during Xyloglucan Biosynthesis requires the activity of a transporter-like protein other than the UDP-Glucose transporter. *Plant Physiology*, 122: 867-877.