

UCH-FC

Doc- BMCN

R456

C1 ↓

**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.**

**Tesis**

**Entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de**

**Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular,  
Celular y Neurociencias**

**Facultad de Ciencias**

**Por**

**Francisca Cecilia Reyes Márquez**

**Enero, 2008**

**Director de Tesis: Dr. Ariel Orellana**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE DOCTORADO**

**Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.**

**FRANCISCA C. REYES MÁRQUEZ**

**Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 11 de enero de 2008.**

**Director de Tesis:**

**Dr. Ariel Orellana**



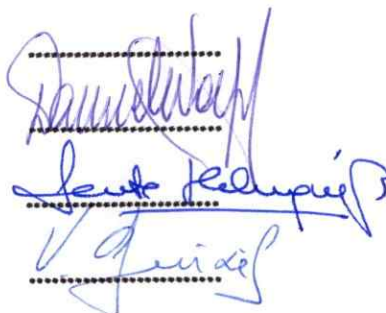
**Comisión de Evaluación de la Tesis**

**Dr. Octavio Monasterio**

**Dr. Daniel Wolff**

**Dra. Loreto Holuigue**

**Dra. Victoria Guixé**





## AGRADECIMIENTOS

A Ariel, por tantos años de trabajo juntos, por haberme ayudado a crecer como estudiante y ser quien soy hoy. Por la confianza que me entregó en los momentos buenos (y de los otros); por tener la certeza de que, pese a la premura del tiempo y de los miles de compromisos, en un momento de confusión, frustración científica o alegría por algún "descubrimiento", podía golpear la puerta y tener "unos minutos" para conversar.

A Gabo! Por estos dos años de trabajo y amistad, que me mostraron la pasión con la que vives y haces ciencia. Por tu generosidad para enseñar, compartir tu tiempo y tu saber y porque me recordaste que uno nunca deja de sorprenderse. Estoy segura que llegarás lejos "Dr. GI" y que tu vida será completa simplemente, porque es lo que te mereces.

A mis compañeros: Ceci, Alex, Adrián, Consu, Rodrigo, Su, Cami, Marce, Maribel, Gabo y Ricky, porque sin ustedes este tiempo no habría sido lo mismo y por lo que aprendí de ustedes: la valentía de la Ceci; lo aventurado de Alex; la cautela de Adrián; la prolijidad de la Consu; la rigurosidad de Rodrigo; la responsabilidad de la Su; las ganas de aprender de la Cami; la alegría de la Marce; la constancia de Maribel; el compañerismo del Gabo y la ambición de Ricardo. Sólo me queda desearles lo mejor y decirles que ustedes serán mi "grupo AO" para siempre.

A mis compañeros del "CenBioVeg", los LAM: Dani, Feña, Igna, Paula, Mauricio y Ricardo y los HS: Mayi, Dayan, Loreto, Icha, Sergio, Juan Carlos, Andrea, Jonathan, además de María José y Raúl, que hacían de este laboratorio un lugar especial para compartir. A ustedes y a los AO, mil gracias por las horas juntos, por compartir tantas historias y experiencias, por la risa diaria en los almuerzos y en las celebraciones.

A Herman y Lee, por las muchas veces en que me escucharon y compartieron su experiencia conmigo. Gracias por sus aportes y críticas que me entregaron otro punto de vista y me ayudaron a mejorar.

A Susana, Conchito, Lore y Simón, por la amistad que empezó en el laboratorio y que se ha extendido en el tiempo (y en el espacio). Gracias queridísimos, por las conversaciones, el ánimo y los sueños compartidos, por tantos momentos de risas, de lágrimas, de vida...

A Alicia, Bárbara, Darío y Eugenia, mis "amigos de la vida", ustedes saben cuánto los quiero y cuánto les agradezco su amistad. Muchas cosas no hubieran sido lo mismo sin ustedes y sin su apoyo. Sé que cuento con ustedes siempre, eso basta y me hace feliz.

A un amigo que encontré en el camino y que en muchas formas lo ilumina: Rodri, muchas gracias, por este tiempo y por compartir un poquito de nuestras vidas. Sé que triunfarás en lo que sigas y alcanzarás tus sueños. Mientras tanto, yo estaré por ahí, esperando para darte un abrazo, conversar y tomarnos un heladito.

A Dan, Ara, Marcia, Sole, Mauricio, Pancho y Guillermo: que les puedo decir además de que espero que sepan lo importante que son para mí y cuánto los quiero. Quién diría que llegaríamos hasta acá juntos; luego de años de bioquímica, matrimonios, nacimientos, doctorados, etc. Supongo que lo que nos mantiene unidos está preparado para cualquier cosa, después de todo no ha sido poco lo que hemos vivido juntos, muchas gracias amigos.

Javier, Chinito, Clau, Pancha, Pauli y Patty, mis queridísimos amigos "del colegio" a los que conozco de toda la vida y que agradezco siempre que sigan aquí. Muchas gracias por tratar de entender lo que hago, aunque a veces (o casi siempre en realidad) resulte incomprendible. Sólo un mensaje, no tengan miedo de las plantas mutantes o de los clones, ya verán que si se acercan esto no es tan terrible como suena.

A Edna, mi profe de danza, con quién aprendí una nueva forma de expresión capaz de llenar el alma y vaciar la mente. Que lo importante sea nunca dejar de bailar y, como en la vida, aunque se pierda el paso o el ritmo, siempre seguir bailando.

A mis papás, Mario y Mónica, que me acompañaron en esta "aventura" de hacer un doctorado y que permitieron, con su apoyo y contención, que hoy esté terminando con la frente en alto. Los quiero mucho, espero que así lo sientan.

A Javi, Mauro y Nacho, gracias por todo. Supongo que es difícil decir exactamente por qué, pero sé que ustedes lo sabrán porque después de todo "está en nuestros genes". Mucho éxito y felicidad en sus vidas, triunfen en lo que emprendan. Con amor, para ustedes y Clavito, su hermana.

Finalmente, quiero agradecer a nuestros colaboradores internacionales, los doctores: Andreas Weber (Michigan State University, USA), Markus Pauly (Max Planck Institute, Alemania); Armando Parodi (Instituto Leloir, Argentina) y Federica Brandizzi (Michigan State University, USA), por recibirme y participar de mi trabajo de tesis entregándome nuevas herramientas.

Francisca

29 de enero, 2008

## ÍNDICE DE MATERIAS

<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>vi</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>ix</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>10</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>10</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>10</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>11</b>
Material Biológico	<b>11</b>
Reactivos	<b>18</b>
Técnicas de Biología Molecular	<b>19</b>
Técnicas bioquímicas y de biología celular	<b>29</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>42</b>
<b>1. Establecer si en el RE de células vegetales existe incorporación de la UDP-Glucosa requerida para procesos de reglucosilación de proteínas.</b>	<b>42</b>
1.1 Incorporación de UDP-glucosa en el retículo endoplasmático de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	<b>42</b>
1.2 Medición de actividad UGGT en retículo endoplasmático de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	<b>43</b>
<b>2. Determinar si AtUTr1 y AtUTr3 son transportadores de UDP-glucosa localizados en el RE.</b>	<b>45</b>
2.1 Ensayos funcionales de AtUTr3: expresión en levaduras, reconstitución en liposomas y ensayos de transporte.	<b>45</b>
2.2 Localización subcelular de los transportadores AtUTr1 y AtUTr3 por inmunodetección	<b>50</b>
2.3 Localización subcelular de los transportadores AtUTr1 y AtUTr3 fusionados a proteínas fluorescentes mediante técnicas de microscopía confocal.	<b>52</b>

<b>3. Analizar si en las condiciones en las que se induce acumulación de proteínas mal plegadas en el RE se producen cambios en la expresión de AtUTr1 y AtUTr3 y determinar si estos cambios se relacionan con diferencias en el transporte de UDP-glucosa.</b>	<b>54</b>
3.1 Análisis de la expresión y acumulación de AtUTr1/3 en plantas tratadas con estímulos que inducen acumulación de proteínas mal plegadas en el RE.	54
3.2 Elementos regulatorios de respuesta a estrés presentes en los promotores de los genes AtUTr1 y AtUTr3 determinan que éstos formen parte de los genes de respuesta a acumulación de proteínas mal plegadas en el RE.	58
<b>4. Obtener y caracterizar plantas mutantes en AtUTr1 y AtUTr3, que permitan estudiar el papel <i>in vivo</i> de éstos transportadores.</b>	<b>61</b>
4.1 Búsqueda de mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> para los genes AtUTr1 y AtUTr3.	61
4.2 Caracterización molecular de la mutante <i>utr1.2</i> .	63
4.3 Caracterización molecular de las mutantes en AtUTr3: <i>utr3.1</i> y <i>utr3.2</i> .	63
4.4 Análisis de fenotipo de las mutantes <i>utr1.1</i> , <i>utr1.2</i> , <i>utr3.1</i> y <i>utr3.2</i> .	66
4.5 Incorporación de UDP-glucosa en fracciones de RE provenientes de las mutantes <i>utr1.1</i> , <i>utr1.2</i> , <i>utr3.1</i> y <i>utr3.2</i> .	67
4.6 Expresión de genes marcadores de UPR en las mutantes de AtUTr1 y AtUTr3.	69
4.7 Generación de plantas doble mutantes en AtUTr1 y AtUTr3.	71
4.8 Análisis de la transmisión de las mutaciones a través de los gametos.	75
4.9 AtUTr1 y AtUTr3 en el desarrollo del polen y efecto de su ausencia en la gametogénesis masculina.	80
4.10 Análisis de la estructura de los granos de polen <i>utr1 atutr3</i> .	81
4.11 Efecto de la ausencia de AtUTr1 y AtUTr3 en la gametogénesis femenina.	87
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>102</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>103</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Partidores diseñados para el clonamiento de los genes en distintos plásmidos.	16
<b>Tabla 2:</b> Partidores diseñados para la obtención de sondas, amplificaciones en PCR tiempo real y verificación de inserciones en las mutantes de los transportadores.	17
<b>Tabla 3.</b> Programa utilizado para las reacciones de PCR en tiempo real para AtUTr1, Cnx, BiP, AtUTr2 y Actina, en el sistema LightCycler.	27



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del oligosacárido presente en glicoproteínas y su procesamiento en el RE.	3
Figura 2: Comparación de las secuencias primarias de AtUTr1 y AtUTr3.	7
Figura 3: Modelo propuesto para la participación de los transportadores AtUTr1 y AtUTr3 en el control de calidad de la síntesis de glicoproteínas.	9
Figura 4: Incorporación de UDP-glucosa en el retículo endoplasmático de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	43
Figura 5: Actividad UGGT y análisis de oligosacáridos presentes en glicoproteínas de retículo endoplasmático de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	44
Figura 6: Expresión de AtUTr3 en fracciones microsomales de levaduras.	46
Figura 7: Reconstitución en liposomas de AtUTr3 y ensayos de transporte de UDP-glucosa.	47
Figura 8: Curva de saturación con UDP-glucosa para el transportador AtUTr3.	48
Figura 9: Ensayo de transporte de UDP-glucosa utilizando liposomas reconstituidos con AtUTr3 purificado.	49
Figura 10: Localización subcelular de los transportadores AtUTr1 y AtUTr3 mediante inmunodetección.	51
Figura 11: Localización subcelular de AtUTr1-GFP mediante microscopía confocal.	52
Figura 12: Localización subcelular de AtUTr3-YFP mediante microscopía confocal.	53
Figura 13: Acumulación de los transcritos de AtUTr1 y AtUTr3 en plantas tratadas con DTT y tunicamicina, mediante northern blot.	55
Figura 14: Análisis de los niveles de transcrito de AtUTr1 y AtUTr3 en plantas tratadas con DTT y tunicamicina mediante PCR en tiempo real.	56
Figura 15: Acumulación de los transportadores AtUTr1 y AtUTr3 en plantas tratadas con DTT y tunicamicina.	57
Figura 16: Incorporación de UDP-glucosa en membranas de RE provenientes de plantas de <i>Arabidopsis</i> tratadas con DTT y tunicamicina.	57
Figura 17: AtUTr1 y AtUTr3 coexpresan con genes que codifican para proteínas relacionadas con plegamiento de proteínas.	60

Figura 18: Esquema de las estructuras de los genes que codifican para AtUTr1 y AtUTr3 y de sus mutantes insercionales.	62
Figura 19: Caracterización molecular de la mutante insercional <i>utr1.2</i> .	64
Figura 20: Caracterización molecular de las mutantes insercionales <i>utr3.1</i> y <i>utr3.2</i> .	65
Figura 21: Análisis fenotípico de las plantas mutantes en AtUTr1 y AtUTr3.	66
Figura 22: Incorporación de UDP-glucosa en vesículas de retículo endoplasmático y de aparato de Golgi provenientes de plantas silvestres y mutantes en los transportadores.	68
Figura 23: Expresión de marcadores de UPR en las mutantes de AtUTr1 y AtUTr3.	70
Figura 24: Segregación esperada para la descendencia de plantas dobles mutantes heterocigotas.	71
Figura 25: Análisis de segregación para la descendencia de plantas mutantes homocigotas en uno de los transportadores y heterocigota en el otro.	73
Figura 26: Segregación de una mutación en la descendencia de individuos homocigotos para una mutación y heterocigotos para una segunda mutación.	74
Figura 27: Análisis de transmisión de los alelos mutantes <i>atutr1atutr3</i> a través del polen.	77
Figura 28: Análisis de transmisión de los alelos mutantes <i>atutr1atutr3</i> a través de los óvulos.	78
Figura 29: Comparación del número de semillas en frutos de plantas mutantes que poseen sólo una copia funcional de los transportadores con el número de semillas obtenidas en frutos de plantas silvestres.	79
Figura 30: Expresión de AtUTr1 y AtUTr3 durante el desarrollo del polen.	80
Figura 31: Análisis estructural de granos de polen de plantas mutantes.	82
Figura 32: Análisis de viabilidad del polen usando la tinción de Alexander.	84
Figura 33: Análisis de microscopía en secciones de anteras de plantas silvestres y mutantes.	86
Figura 34: Análisis morfológicos del saco embrionario en las plantas mutantes <i>atutr1/atutr1AtUTr3/atutr3</i> y <i>AtUTr1/atutr1 atutr3/atutr3</i> .	88

## **ABREVIATURAS**

**BiP:** Binding Protein o proteína que se une

**Cnx:** Calnexina

**Crt:** Calreticulina

**cDNA:** Secuencia codificante de DNA

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DTT:** Ditioneitol

**DMSO:** Dimetil sulfóxido

**EST:** Transcritos de secuencias expresadas

**kb:** kilo bases

**kDa:** kilo Dalton

**OD:** Densidad óptica

**pb:** Pares de bases

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PM:** Peso molecular

**PMSF:** Fenil metil sulfonil fluoruro

**RE:** Retículo endoplasmático

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RT-PCR:** PCR acoplado a una reacción de transcripción inversa

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio

**TNA:** Transportador de nucleótidos-azúcar

**UTR:** Secuencia no traducida

## RESUMEN

El control de calidad de la síntesis de glicoproteínas que ocurre en el lumen del RE requiere del suministro de UDP-glucosa para la reglucosilación de proteínas mal plegadas. UDP-glucosa, el sustrato de la reglucosilación, es sintetizada en el citosol y por lo tanto, se requiere translocarla hacia el lumen del RE. En *Arabidopsis thaliana* serían los transportadores AtUTr1 y AtUTr3, quienes suministran UDP-glucosa hacia el lumen del RE. Nuestros experimentos mostraron que estímulos que promueven la acumulación de proteínas mal plegadas aumentan la acumulación de los transcritos y de las proteínas de AtUTr1 y AtUTr3, junto con un aumento en el transporte de UDP-glucosa hacia el RE. Además, determinamos que plantas que carecen de AtUTr1 ó AtUTr3 poseen una disminución, cercana al 50%, en la incorporación de UDP-glucosa en vesículas de RE comparado con plantas silvestres. Una menor disponibilidad de UDP-glucosa en el lumen del RE trae como consecuencia una disminución en la capacidad de reglucosilar proteínas mal plegadas, las que se acumulan en el interior del RE e inducen la transcripción de un gran número de chaperonas, en un mecanismo conocido como respuesta a proteínas mal plegadas (Unfolded Protein Response) o UPR. Las plantas mutantes en AtUTr1 ó AtUTr3, presentan un mecanismo UPR constitutivamente activado, indicando que el suministro de UDP-glucosa hacia el RE es crítico para permitir una adecuada reglucosilación de proteínas. Finalmente, quisimos evaluar las consecuencias fisiológicas de la ausencia de transporte de UDP-glucosa en el RE, generando plantas doble mutantes en los transportadores. No obtuvimos plantas dobles mutantes y razones distorsionadas de segregación y análisis morfológicos, nos entregaron evidencias claras de que la ausencia de ambos transportadores produce defectos en el desarrollo de los gametos. En esta tesis, entregamos la primera evidencia de la existencia de transportadores de UDP-glucosa de RE, involucrados en mecanismos de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas y determinamos que AtUTr1 y AtUTr3 son importantes en la gametogénesis y esenciales para el desarrollo del polen.

## SUMMARY

The quality control mechanism for glycoproteins synthesis takes place in the ER lumen and requires UDP-glucose as substrate for protein reglucosylation. UDP-glucose is synthesized in the cytosol, therefore it must be translocated into the ER. We propose that the *Arabidopsis thaliana* nucleotide sugar transporters, AtUTr1 and AtUTr3, are supplying UDP-glucose into the ER. In this work, we showed that AtUTr1 and AtUTr3 are ER located proteins. Stimulus that trigger misfolded proteins accumulation in the ER, increase the transcription and levels of both protein and activity of these transporters in *Arabidopsis* plants. These results suggest that ER stress conditions, where misfolded proteins are accumulated in the ER, increases the requirement of UDP-glucose for reglucosylation to overcome the stress.

*Arabidopsis* AtUTr1 or AtUTr3 mutants plants display 50% less incorporation of UDP-glucose into ER vesicles. These mutants plants have activated the unfolded protein response (UPR) system constitutively, which was evaluated by the transcription levels of ER located chaperones. This UPR activation can be due to the accumulation of misfolded proteins inside of the ER leads by a diminished UDP-glucose incorporation. Finally, in order to study the physiological effect of lost of function of both AtUTr1 and AtUTr3, we decided to use a genetic approach. However, we were not able to obtain any double mutants plants. Further analysis showed clear evidences that the absence of these transporters causes alterations in both male and female gametes.

In this work, we provide the first evidence for the existence of ER located UDP-glucose transporters, which would supply UDP-glucose into the ER for quality control. Furthermore, we showed that the AtUTr1 and AtUTr3 are necessary for *Arabidopsis*'s gametes development and essential for pollen development.

## INTRODUCCIÓN

### **Síntesis de glicoproteínas y el control de calidad.**

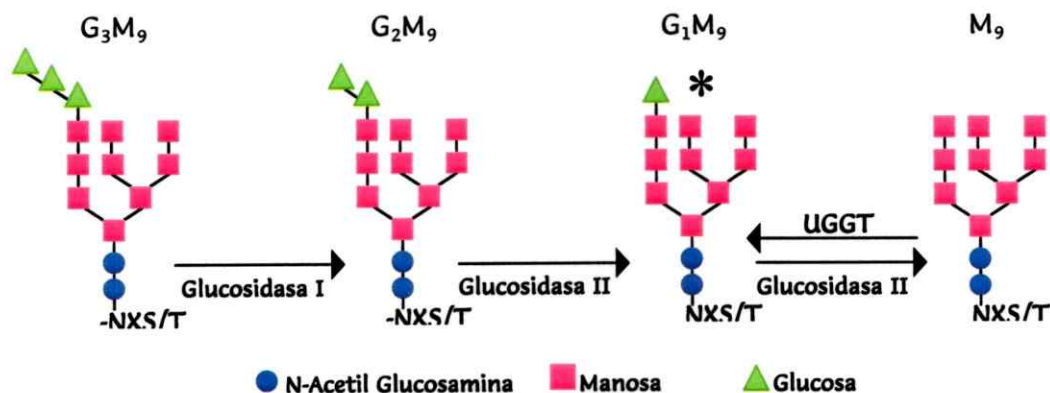
Se calcula que un 50% de las proteínas que posee una célula eucarionte típica son glicoproteínas y de ellas, un 90% corresponden a N-glicoproteínas, es decir, a proteínas que poseen sustituciones de un árbol de azúcar en un residuo de asparragina (N) dentro de una secuencia consenso NXS/T (Apweiler y col., 1999; Recientemente revisado por Helenius y Aebi, 2004).

La síntesis de las glicoproteínas es finalizada en el retículo endoplasmático (RE), donde se les agrega el árbol de glicosilación. Para que la célula funcione correctamente, es necesario que cada una de estas glicoproteínas adquieran una conformación correcta y una localización adecuada en la célula, que le permitan finalmente, llevar a cabo su función. Antes de que una glicoproteína alcance su destino sufre diversas modificaciones, como la adición y procesamiento de carbohidratos, la formación de puentes disulfuros, plegamiento, ensamblaje de subunidades y en algunos casos clivajes proteolíticos específicos, que llevarán, finalmente, a que ésta adquiera una conformación estable. Para ello, existen unas proteínas conocidas como chaperonas, que en términos generales promueven el correcto plegamiento de las glicoproteínas que están siendo sintetizadas. Algunas de éstas chaperonas actúan reteniendo en el RE a las proteínas que se están sintetizando, hasta que adquieran una conformación correcta. Por lo tanto, a la vez que ocurre la síntesis y plegamiento de las glicoproteínas en el RE, se realiza un control de calidad que implica la detección, retención y reparación de proteínas mal plegadas, o bien, la degradación de éstas en un proceso asociado a degradación en el proteosoma o ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) (Werner y col., 1996; Ng y col., 2000; Rutkowski y Kaufman., 2004; Vitale y Ceriotti., 2004).

### **Síntesis de las glicoproteínas.**

El oligosacárido presente en la N-glicoproteínas, posee una estructura bien definida y conservada, que está formada por 3 residuos de glucosa (Glc), 9 manosas (Man) y 2 N-Acetil Glucosamina (GlcNAc), ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  o  $\text{G}_3\text{M}_9$ ), que es transferida en bloque a la proteína naciente (Revisado en Trombetta y Parodi, 2003; Helenius y Aebi, 2004). Inmediatamente después de su transferencia, éste árbol de azúcar es procesado y 2 residuos de glucosa son removidos secuencialmente por glucosidasas específicas (Glucosidasas I y II, respectivamente). La nueva estructura adoptada por los residuos de azúcar ( $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  o  $\text{G}_1\text{M}_9$ ), tiene un papel clave para permitir el correcto plegamiento de las glicoproteínas que son sintetizadas en el RE (Kornfeld y Kornfeld., 1985; Trombetta y col., 1996; Parodi., 2000). En este contexto, existen dos chaperonas claves: calnexina (Cnx) y calreticulina (Crt), que se asocian específicamente a glicoproteínas que poseen un intermediario monoglucosilado en el árbol de azúcares (Hammond y col., 1994). Cnx y Crt entonces, actuarán como chaperonas moleculares, previniendo la agregación y favoreciendo el correcto plegamiento de las proteína. Para liberar a las glicoproteínas de su asociación con Cnx y Crt, es necesario remover el residuo de glucosa restante en el árbol de glicosilación, acción que es llevada a cabo por glucosidasa II (Trombetta y col., 1996; D'Alessio y col., 1999) (Figura 1).

Luego de la acción de las chaperonas Cnx y Crt, una glicoproteína tiene 3 posibilidades: 1. Alcanzar un correcto plegamiento, lo que le permitirá abandonar el RE y llegar a su destino final en la célula; 2. Continuar mal plegada y ser excluida del RE para su degradación ó 3. Continuar mal plegada, ser retenida en el RE y entrar en un nuevo proceso de plegamiento. A este último fenómeno se le conoce como el ciclo de la calnexina y constituye uno de los mecanismos de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas más estudiado.



**Figura 1: Estructura del oligosacárido presente en glicoproteínas y su procesamiento en el RE.** El oligosacárido  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  ( $\text{G}_3\text{M}_9$ ) es transferido a una Asparagina (N) que se encuentra en una secuencia consenso NXS/T en la proteína que está siendo sintetizada en el RE. Inmediatamente el oligosacárido es procesado por la acción secuencial de las glucosidasas I y II, generando las estructuras  $\text{G}_2\text{M}_9$  y  $\text{G}_1\text{M}_9$ . El oligosacárido monoglucosilado  $^*\text{G}_1\text{M}_9$ , es reconocido por las chaperonas calnexina y calreticulina. Este residuo de glucosa es finalmente removido por glucosidasa II, generando la estructura  $\text{M}_9$ , que puede ser reglucosilada por UGGT para generar nuevamente la estructura  $\text{G}_1\text{M}_9$ . (Adaptado de Helenius y Aebi., 2004)

### Ciclo de la calnexina y el control de calidad, papel de la proteína UGGT.

Para terminar la asociación de una glicoproteína con las chaperonas Cnx y Crt, el residuo de glucosa terminal del árbol de glicosilación debe ser removido. Una glicoproteína que no se ha plegado correctamente puede volver a ser reconocida por estas chaperonas y por lo tanto, entrar nuevamente a un proceso de plegamiento, sí y sólo sí, el residuo de glucosa terminal está presente en el árbol de glicosilación. Entonces una glicoproteína mal plegada se encontrará en el ciclo de la calnexina, pero ¿Cómo es reconocida una glicoproteína mal plegada?, ¿Cómo se obtiene el residuo de glucosa necesario para el reconocimiento de las chaperonas?

En el lumen del RE de diferentes organismos (mamíferos, insectos, protozoos) se ha identificado una proteína conocida como UDP-glucosa Glicoproteína Glucosil Transferasa (UGGT) (Sousa y col., 1992; Trombeta y Parodi., 1992; Parker y col., 1995), que es clave en el proceso de control de calidad, ya que es capaz de reconocer y retener glicoproteínas mal plegadas, a la vez que puede transferirles el residuo de glucosa necesario para su reconocimiento por las chaperonas y entrada a un nuevo proceso de plegamiento (Fanchiotti y col., 1998; Fernández y col., 1994; Ritter y col., 2000; Caramelo y col., 2004).



7  
Para la reglucosilación de glicoproteínas, la proteína UGGT utiliza UDP-glucosa como sustrato y por lo tanto, debe estar disponible en el lumen del RE. Sin embargo, UDP-glucosa es sintetizada en el citosol de la célula y debe, necesariamente ingresar al lumen del RE para ser utilizada por la UGGT. Lo anterior hace pensar que es necesaria la existencia de un mecanismo capaz de suministrar este nucleótido-azúcar al lumen del RE donde será utilizado.

### **El suministro de nucleótidos-azúcar hacia el lumen de distintos organelos está mediado por proteínas transportadoras.**

En levaduras, protozoos, mamíferos y plantas se han identificado proteínas altamente hidrofóbicas, que poseen entre 6 y 10 segmentos de transmembrana, que tienen un tamaño promedio de 325 aminoácidos y que son capaces de transportar nucleótidos-azúcar desde el citosol hacia el lumen del aparato de Golgi. En este organelo, suministran el sustrato para procesos de glicosilación (revisado por Berninsone y Hirschberg, 2000; Handford y col., 2006) y, en el caso de células vegetales, también para la síntesis de polisacáridos de pared celular (Baldwin y col., 2001; Handford y col., 2004; Norambuena y col., 2002 y 2005; Rollwitz y col., 2006).

Aún cuando se han identificado transportadores de nucleótidos-azúcar (TNAs) residentes en el RE de *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*: ScHut1 y SpHut1, respectivamente, no se ha establecido una relación directa entre ellos y el suministro de UDP-glucosa para mecanismos de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas porque: se desconoce la función bioquímica de estos transportadores (Nakanishi y col., 2001); en *S. cerevisiae* no se ha detectado la presencia de una proteína UGGT (Fernández y col., 1994) y porque la mutante de *S. pombe* en el transportador SpHUT1 no posee el fenotipo asociado a problemas en el control de calidad de plegamiento de proteínas, que sí aparece en una mutante del gen SpUGGT (Fanchiotti y col., 1998).

### **AtUTr1, un transportador de UDP-glucosa de *Arabidopsis thaliana*.**

Teniendo en cuenta las características de los TNAs conocidos actualmente se han identificado un gran número de genes que codifican para proteínas con características de TNA en el genoma de diversas especies como *Kluyveromyces lactis*, *Candida* spp, el parásito protozoario *Leishmania donovani* y *Drosophila melanogaster*. Fue así, como en el genoma de *Arabidopsis thaliana* se identificó el gen At2g02810, que codifica para una proteína con características de TNA, la que fue llamada AtUTr1 (*Arabidopsis thaliana* UDP-Galactose/Glucose Transporter 1) (Norambuena y col., 2002). Cuando la secuencia que codifica para AtUTr1 fue clonada y expresada en *S. cerevisiae* desde donde se aisló una fracción microsomal, se determinó que éste es capaz de transportar tanto UDP-galactosa como UDP-glucosa, pero que transporta 200 veces más UDP-glucosa (Norambuena y col., 2002). Además, AtUTr1 posee un motivo KKXX en su extremo carboxilo terminal, el que ha sido descrito como una señal de retención en el RE para proteínas de membrana (Jackson y col., 1993; Benghezal y col., 2000), lo que sugiere que se trata de una proteína residente en este organelo.

### **La respuesta a proteínas mal plegadas o unfolded protein response (UPR), es conservada en eucariontes y aparece en *Arabidopsis thaliana*.**

Por otra parte, se ha descrito que cuando los mecanismos de degradación de proteínas se ven sobrepasados o bien los mecanismos de plegamiento son insuficientes, lo que ocurre es una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE. Ésta condición induce la transcripción de un gran número de genes, muchos de los cuales codifican para proteínas que promueven el plegamiento de proteínas, en un mecanismo que se conoce como respuesta a proteínas mal plegadas (UPR ó Unfolded Protein Response) (Cox y col., 1997; Sidrauski y col., 1998; Patil y Walter., 2001). Martínez y Chrispeels en el año 2003 realizaron un análisis de la expresión de 8297 genes en plantas de *Arabidopsis* tratadas con DTT y tunicamicina, dos agentes que inducen la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE.

Este análisis mostró que el gen que codifica para AtUTr1 presenta un aumento promedio de 7 veces en su expresión luego de estos tratamientos, lo que sugiere que AtUTr1 forma parte de los genes regulados en respuesta a acumulación de proteínas mal plegadas y por lo tanto, su función, podría estar involucrada en mecanismos de plegamiento de proteínas.

### **AtUTr1 posee un gen homólogo en *Arabidopsis thaliana*, llamado AtUTr3.**

AtUTr1 pertenece a una familia génica presente en *Arabidopsis thaliana*, denominada AtUTr. En esta familia, se encuentra un segundo gen (At1g14360) que fue denominado AtUTr3, que resulta de gran interés porque presenta un 83% de identidad a nivel de secuencia nucleotídica y un 87% de identidad a nivel aminoacídico con AtUTr1 (Norambuena y col., 2002; Marchant., 2004). Y, además, al igual que AtUTr1, posee un motivo KKXX en su extremo carboxilo terminal, lo que hace pensar que se trata de una proteína residente en el RE (Figura 2).

Entonces, teniendo en cuenta que la matriz donde se realizó el análisis de expresión de genes en respuesta a acumulación de proteínas mal plegadas no contiene el cDNA específico de AtUTr3 y que la secuencia de cDNA utilizada podría, eventualmente, reconocer ambos genes. Es posible que el resultado obtenido en el análisis de expresión génica corresponda además de AtUTr1 a AtUTr3 y por lo tanto, ambos genes formen parte de los genes de respuesta a proteínas mal plegadas en el RE.

La información disponible en bases de datos de expresión de genes de *Arabidopsis* (Genevestigator ([www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch)) y "Comprehensive System-Biology database" ([www.csbdb.mpimp-golm.mpg.de](http://www.csbdb.mpimp-golm.mpg.de)), respecto de la expresión de los transportadores en distintas estructuras de la planta nos indica que ambos se expresan y aún cuando poseen un patrón de expresión diferencial en los distintos tejidos de la planta, existen tejidos, como el floral, en los que éstos están coexpresando, sugiriendo que el sistema de control de calidad, que requiere incorporar UDP-glucosa desde el citosol al lumen del RE, requeriría de la presencia de ambos transportadores en la planta.

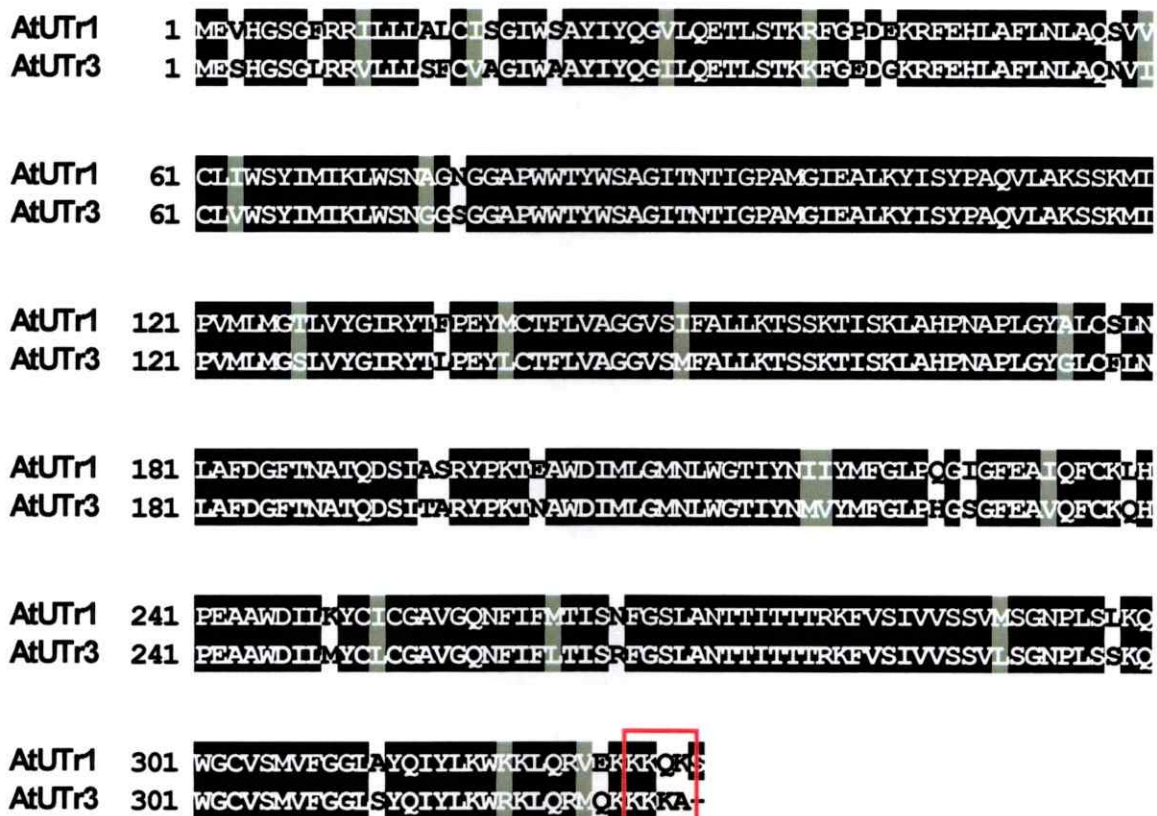


Figura 2: Comparación de las secuencias primarias de AtUTr1 y AtUTr3. Las secuencias primarias de AtUTr1 (At2g02810) y de AtUTr3 (At1g14360) fueron comparadas usando el programa Clustalw y luego alineadas usando el programa Shadebox. Las cajas negras indican los aminoácidos idénticos y las cajas grises, los aminoácidos similares. La señal de retención en el RE para proteínas de membrana se encuentra resaltada en rojo.

**Las proteínas participantes en el control de calidad se encuentran en *Arabidopsis thaliana*.**

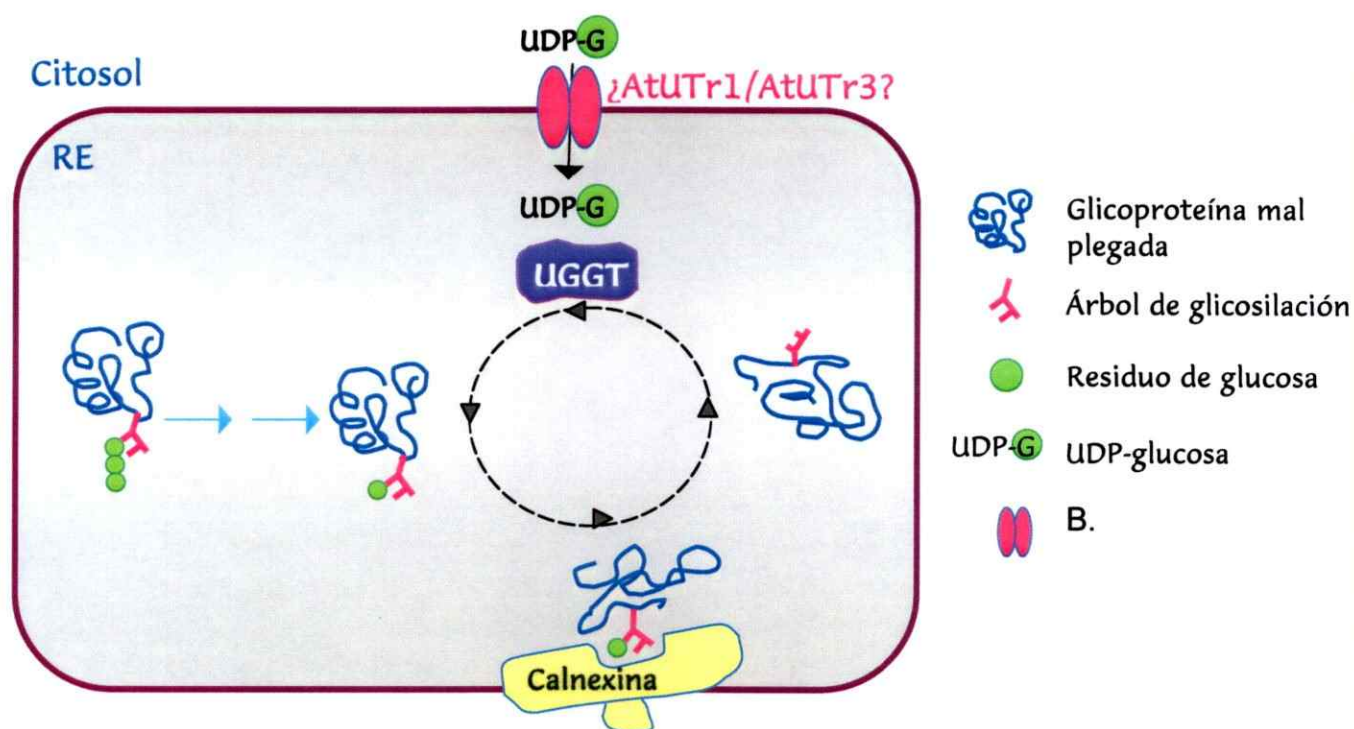
Las proteínas involucradas en el ciclo de la calnexina/calreticulina son conservadas y han sido caracterizadas en distintos sistemas eucariontes. La planta modelo *Arabidopsis thaliana* no es la excepción y en ella se han descrito también: calnexina (Huang y col., 1993; Boyce y col., 1994); calreticulina (Nelson y col., 1997), glucosidasa I (Boisson y cols, 2001) y glucosidasa II (Burn y cols, 2002).

Sin embargo, para que la presencia de los transportadores AtUTr1 y AtUTr3 en el RE de las células vegetales sea relevante en el mecanismo de control de calidad del ciclo de la calnexina, se necesita que la enzima UGGT este presente en este organelo. Esta situación no siempre se cumple, ya que si bien la retención de proteínas mal plegadas en el RE como parte del control de calidad es conservado en distintos eucariontes, existen organismos como *S. cerevisiae*, en los que a pesar de poseer un transportador de UDP-glucosa en el RE (Castro y col., 1999) no se detecta una actividad UGGT (Fernández y col., 1994). Se ha postulado entonces, que los transportadores de UDP-glucosa localizados en el RE de la levadura estarían involucrados en el suministrando de sustrato para etapas tempranas de la síntesis de pared celular.

En *Arabidopsis thaliana* no existen antecedentes bioquímicos de la actividad UGGT. Sin embargo, en base a homología de secuencias con las UGGT descritas en rata, *Drosophila* y levadura (Trombetta y Parodi., 1992; Fernández., 1994; Parker y col., 1995; Tessier y col., 2000), se ha identificado, el gen At1g71220, que presenta entre un 49 y un 56% de identidad con las anteriormente descritas. Durante el desarrollo de esta tesis, se describió una mutante en el gen que codifica para la UGGT (Jin y col., 2007), que posee una deficiencia en la retención en el RE de un receptor de brasinosteroides que posee un defecto en su plegamiento; sugiriendo que en plantas existe al menos un control de calidad mediado por UGGT y que podría ser esta proteína quien utilice el sustrato suministrado por los transportadores, probablemente en mecanismos de control de calidad de plegamiento de proteínas.

Entonces, en este trabajo de tesis, nos planteamos la siguiente pregunta: ¿Es posible que AtUTr1 y AtUTr3 sean las proteínas que transporten UDP-glucosa al lumen del RE de células vegetales y por lo tanto, entreguen el sustrato para la UGGT?

Los antecedentes anteriormente presentados apoyan esta hipótesis y sugieren que ambos transportadores podrían ser capaces de suministrar UDP-glucosa para la reglicosilación de glicoproteínas en el RE de células vegetales, formando entonces, parte de la maquinaria proteica involucrada en control de calidad del plegamiento de glicoproteínas (figura 3).



**Figura 3: Modelo propuesto para la participación de los transportadores AtUTr1 y AtUTr3 en el control de calidad de la síntesis de glicoproteínas.** Durante la síntesis de glicoproteínas, ocurre el procesamiento de los residuos de glucosa terminales del árbol de glicosilación. Una glicoproteína monoglucosilada, será sustrato para las chaperonas calnexina y calreticulina (no mostrada). Luego de la acción de las chaperonas el residuo de glucosa es removido. Si la proteína permanece mal plegada será retenida en el RE, dónde será reconocida por UGGT quien, utilizando UDP-glucosa como sustrato, le transferirá el residuo de glucosa necesario para volver a ser reconocida por calnexina y calreticulina. AtUTr1 y AtUTr3 serían los encargados de suministrar UDP-glucosa para la UGGT y por lo tanto para el control de calidad mediado por el ciclo de la calnexina.

## **HIPÓTESIS:**

AtUTr1 y AtUTr3 son transportadores de UDP-glucosa de *Arabidopsis thaliana* que se inducen frente a estímulos que producen acumulación de proteínas mal plegadas y forman parte de la maquinaria de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático.

## **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar si los transportadores AtUTr1 y AtUTr3 proveen el sustrato necesario para mecanismos de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el retículo endoplasmático de células vegetales.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Establecer si en el RE de células vegetales existe transporte de la UDP-glucosa requerida para procesos de reglucosilación de proteínas.
2. Determinar si AtUTr1 y AtUTr3 son transportadores de UDP-glucosa y si se encuentran localizados en el RE
3. Analizar si en las condiciones en las que se induce acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, se producen cambios en la expresión de AtUTr1 y AtUTr3 y determinar si estos cambios se relacionan con diferencias en el transporte de UDP-glucosa.
4. Obtener y caracterizar plantas mutantes en AtUTr1 y AtUTr3, que permitan estudiar el papel *in vivo* de éstos transportadores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Biológico

#### Plantas y condiciones de crecimiento

*Arabidopsis thaliana*: Se utilizaron plantas de los ecotipos Columbia (Col), Landsberg Erecta (Ler) y Nössen (NO). La mutante insercional por transposición *utr1.1* fue obtenida desde el banco de Sundaresan (Sundaresan y col., 1995) a través del Instituto NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, <http://nasc.nott.ac.uk>). Las semillas de la planta mutante por inserción de T-DNA (*utr1.2*) fueron facilitadas por el German Plant Genomics Research Program (GABI) del Max Planck Institute for Plant Breeding Research ([www.gabi-kat.de](http://www.gabi-kat.de)). Finalmente, las mutantes *utr3.1* y *utr3.2*, fueron obtenidas desde el Plant Functional Genomic Research Group GSC RIKEN de Japón ([www.gsc.riken.go.jp](http://www.gsc.riken.go.jp)).

Todas las semillas fueron esterilizadas usando una solución de Etanol 70% (v/v) con agitación constante durante 5 minutos, luego una solución de hipoclorito de sodio 5% (v/v) y SDS 1% (v/v) por 15 minutos y posteriormente se lavaron 5 veces con 1 ml de agua estéril. Luego de esterilizadas, las semillas se dejaron durante 48 horas a 4°C antes de ser transferidas a la cámara de cultivo de tejido, con el objetivo de sincronizar la germinación.

Para realizar la genotipificación, las plantas fueron crecidas en placas de medio basal Murashige y Skoog (pH 5,8) con sacarosa 1% (p/v) y agar 1,5 % (p/v), en condiciones estériles.

Para la mantención de líneas, recolección de tejidos adultos, cruza y para transformación, las semillas fueron sembradas en una mezcla 2:1 de tierra de hoja y vermiculita o bien en un medio de cultivo hidropónico descrito por Elorza (2004). El medio hidropónico corresponde a una solución nutritiva que se prepara 100X a pH 5,0 con los siguientes nutrientes: KNO<sub>3</sub> 125 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 150 mM, MgSO<sub>4</sub> 75 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, KCl 5 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 5 mM, MnSO<sub>4</sub> 1 mM, ZnSO<sub>4</sub> 200 μM, CuSO<sub>4</sub> 150 μM, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 7,5 μM, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 10 mM, Sprint 330 7,2 mM (hierro quelado en DTPA). El medio hidropónico se utilizó a una concentración 1X y a pH6.



Para los experimentos de inducción de estrés, las plantas fueron crecidas en medio líquido Murashige y Skoog (pH 5,8) con sacarosa 1% (p/v), durante 6 días. Al cabo de ese tiempo se realizaron los respectivos tratamientos con DTT (10 mM) o Tunicamicina (5 µg/ml) durante 5 horas.

*Nicotiana tabacum*: Para los experimentos de agroinfiltración se utilizaron plantas de tabaco SR1 (cv Petit havana) de dos meses crecidas en tierra.

Todas las plantas fueron crecidas a 23°C y con un régimen de luz de 16 horas.

### **Bacterias y condiciones de cultivo**

Para los clonamientos se utilizaron bacterias *Escherichia coli* cepa DH5α, las que fueron crecidas en medio Luria Bertoni (LB) líquido (bacto triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v) y NaCl 1% (p/v) o sólido (Medio LB + agar 1,5% (p/v)), con los respectivos antibióticos de selección, a 37°C por 16 horas.

Para los ensayos de transformación transiente de plantas de tabaco se utilizaron bacterias de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101, las que fueron crecidas en medio LB (líquido o sólido) con los antibióticos Rifampicina (10 µg/ml), Gentamicina (100 µg/ml) (resistencia codificada en el genoma y en el plásmido Ti respectivamente) a 25°C durante 48 horas.

### **Levaduras y condiciones de cultivo**

Para la expresión en sistema heterólogo se utilizaron levaduras *Saccharomyces cerevisiae* cepa RSY255 (MATα *ura3-52 leu2-211*) y la cepa INVSc1 (*his3 Δ1/his3 Δ1 leu2/leu2 trp1-289/trp1-289 ura3-52/ura3-52*), que fueron crecidas en medio mínimo líquido (base nitrogenada de levaduras (YNB) 0,67% (p/v), fuente de carbono (Glucosa 2% (p/v), Rafinosa 2%(p/v) o Galactosa 2% (p/v)), y aminoácidos 0,01% (p/v) o sólido (Medio mínimo + agar 1,5% (p/v)), en ausencia de uracilo, a 30°C durante 48 horas.

## Plásmidos

### Plásmidos donados

- APD06f05: Plásmido bluescript II SK que contiene la secuencia del EST de AtUTr1 (Asamizu y col., 2000).
- 249D21T7: Plásmido pZL1 que contiene la secuencia del EST de AtUTr3 (Donado por Arabidopsis Biological Resource Center).
- pHDEL-GFP: Plásmido de expresión en plantas que contiene la secuencia que codifica para la señal de retención de proteínas solubles en el retículo endoplasmático (RE) HDEL fusionada a la de la proteína fluorescente verde (GFP) en el extremo 3'. (Haseloff y col., 1997).
- pGONST1-YFP: Plásmido de expresión en plantas que contiene la secuencia del marco de lectura abierto de GONST1 (Golgi Nucleotide Sugar Transporter1) fusionada a la proteína fluorescente amarilla (YFP) en el extremo 3' (Baldwin y col., 2001).

### **Plásmidos construidos durante esta tesis**

**AtUTr3-pGEMT:** plásmido de clonamiento, que contiene la secuencia del marco de lectura abierto de AtUTr3 obtenida desde el EST del plásmido 249D21T7.

**AtUTr3MycHis-GPD426:** plásmido para la expresión constitutiva en levaduras. Posee la secuencia completa del marco de lectura abierto de AtUTr3 entre los sitios 5' *Bam*HI y 3' *Not*I y se encuentra en marco de lectura con los epítopes de myc e His en el extremo 3'.

**AtUTr3myc-pGEMT:** plásmido pGEMT con la secuencia completa del marco de lectura abierto de AtUTr3 en marco de lectura con el epítope myc en el extremo 3'.

**AtUTr3myc-pBI121:** plásmido binario, para transformación de *Arabidopsis* e infiltración de tabaco, con la secuencia del marco de lectura abierto de AtUTr3 en marco de lectura con el epítope myc en el extremo 3', clonado entre los sitios *Bam*HI y *Sac*I obtenido desde AtUTr3myc-pGEMT.

**AtUTr3-YFP-pGEMT:** plásmido pGEMT con la secuencia completa del marco de lectura abierto de AtUTr3 en marco de lectura con el de la proteína fluorescente amarilla (YFP).

**AtUTr3-YFP-pBI121:** plásmido binario, para transformación de *Arabidopsis* e infiltración de tabaco, con la secuencia del marco de lectura abierto de AtUTr3 en marco de lectura con el de la proteína fluorescente amarilla (YFP) en el extremo 3', clonado entre los sitios *Bam*HI y *Sac*I.

**AfUTr1-GFP-pVKH18:** plásmido binario, para transformación de *Arabidopsis* e infiltración de tabaco, con la secuencia del marco de lectura abierto de AfUTr1 en marco de lectura con el de la proteína fluorescente verde (GFP) en el extremo 3', clonado entre los sitios *Kba*I y *Sal*I.

## Partidores

La tabla 1 resume los partidores diseñados durante esta tesis. Los que poseen sitios de restricción se utilizaron para los distintos clonamientos y los partidores exactos, para la amplificación por PCR y para verificar las inserciones en las plantas mutantes.

Partidores utilizados para el clonamiento de los genes en los distintos vectores.		
Partidor	Sitio de Restricción	Secuencia
5' AtUTr3	<i>Bam</i> HI	ACGTGGATCCATGGAATCTCACGGTT
3' AtUTr3	<i>Not</i> I	CAAGCGGCCGCCCTCCGGCCTTTTCTT
3' AtUTr3-Stop	<i>Not</i> I	CAAGCGGCCGCCCTCAGGCCTTTTCTTC
3' myc GPD	<i>Sac</i> I	GGCACAGTCGAGCTCGATCAGCGGGTTT
5' AtUTr1	<i>Bam</i> HI	TCTAGGATCCTAATGGAGGTCCATGGC
3' AtUTr1-Stop	<i>Not</i> I	CAAGCGGCCGCCCTCAACTCTTTTGCTTCTTC
3' YFP	<i>Sac</i> I	AGATCTGAGCTCTCACTTGTACAGCTCGTCCAT
3' AtUTr3-YFP		GCCCTTGCTCACCATTCCGGCCTTTTCTT
5' YFP-AtUTr3		AAGAAAAAGGCCGGAATGGTGAGCAAGGGC
5' AtUTr1-GFP	<i>Xba</i> I	GGAGTCTAGATGGAGGTCCATGGCTCCGGATT
3' AtUTr1-GFP	<i>Sal</i> I	GAGGGAAGTCGACTTACTCTTTTGCTTCTTCTTC

Tabla 1: Partidores diseñados para el clonamiento de los genes en distintos plásmidos. Se especifican los sitios de restricción (si es que lo poseen) y la secuencia del partidor en orientación 5' → 3'.

Partidores exactos para amplificaciones por PCR de fragmentos de cDNA para ser utilizados como sonda.

Partidor	Secuencia
5' de Actina	CACACTTTCTACAATGAGCT
3' de Actina	GCAGTGATCTCTTIGCICAT
5' de BiP	ATGGCTCGCTCGTTTGGAGC
3' de BiP	AAGTTTCCIGTCCTTTTGAA
5' de Calnexina	ATGAGACAACGGCAACTATT
3' de Calnexina	TTCCTGAGGACGGAGGTACT
5' de AtUTr2	CACATTTATCGGTCAAGTCTCCGTT
3' de AtUTr2	TCTTCTCTATCACCATCGCCTCCTGCGA
5' de Clatrina	GAAACATGGTGGATC
3' de Clatrina	CTCAACAACAAATTT

Partidores exactos para la verificación de las inserciones en las líneas mutantes.

Partidor	Secuencia
Extremo izquierdo del T-DNA de la línea de GABI-Kat	CCCATTGGACGTGAATGTAGACAC
Internos (directo e inverso) para verificar inserción mutante <i>utr1.2</i>	GACATTGCAACAGAACATAGA TGACCCGAAGTTACTTAT
Extremo izquierdo del T-DNA de las líneas de RIKEN	GTAAAAAACGAAAACGGAACGGA
Internos (directo e inverso) para verificar inserción mutante <i>utr3.1</i>	TCATAATTTGATCGCAAAC CGAACAAACAGAATCGAGCA
Internos (directo e inverso) para verificar inserción <i>utr3.2</i>	GCTGGGATCTGGGCAGCTTA ATGAAGATGCCCTACTCACT

**Tabla 2:** Partidores diseñados para la obtención de sondas, amplificaciones en PCR tiempo real y verificación de inserciones en las mutantes de los transportadores. La secuencia de cada partidor se encuentra anotada en orientación 5' → 3'.

## Reactivos

- De Amersham-Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia): columnas Sephadex G-50 y la membrana Hybond-N<sup>+</sup>.
- De BioLabs (New England, USA): DNA ligasa y enzimas de restricción.
- De Fermentas (Ontario, Canadá): enzimas de restricción, *Taq* y PFU DNA polimerasa, el Hexalabel DNA kit, marcador de PM de DNA de 1 kb, marcador de PM de proteínas, espermio de salmón.
- De Invitrogen (New York, USA), el sistema de, el marcador de PM de RNA, Plásmidos pYESA y pYESC y medios de cultivo de bacterias.
- De Merck (Darmstadt, Alemania): todos los solventes de grado analítico y las sales.
- De Moravек Biochemicals and Radiochemicals (Brea, USA), UMP
- De NEN (Actualmente Perkin Elmer) (Massachusset, USA): [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP, [<sup>14</sup>C]-UDP-glucosa.
- De PhytoTechnology (Kansas, USA) medio basal Murashige y Skoog (MS) y el agar para plantas.
- De Promega (Wisconsin, USA): sistema de purificación de DNA plasmidial "Wizard", el sistema de transcripción reversa (Improm), sistema de revelado de western blot acoplado a fosfatasa alcalina.
- De Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA): antibióticos, sustratos y reactivos químicos generales.
- De Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA): anticuerpos anti myc, anti ratón acoplado a HRP, anti conejo acoplado a HRP.
- De Qiagen (Hilden, Alemania): se obtuvo el sistema de purificación de productos de PCR y de DNA desde geles de agarosa "Qiaex" y el anticuerpo anti His.

## **Técnicas de Biología Molecular**

### **Preparación y transformación de células competentes de *Escherichia coli*.**

Para la preparación de células competentes, se utilizó el método descrito por Inoue (Inoue, 1990). 250 ml de medio SOB (triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM) fueron inoculados con un precultivo de *E. coli* DH5 $\alpha$  crecido durante 16 horas a 37°C, y se creció a 23°C con agitación vigorosa hasta una D.O<sub>600</sub> = 0,6 unidades. Se enfriaron en hielo por 10 minutos y se centrifugaron a 2.500 xg por 10 minutos a 4°C. El sedimento fue resuspendido en 80 ml de tampón TB frío (Pipes 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 55 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 250 mM), incubado en hielo por 10 minutos y centrifugado a 2500 xg por 10 minutos a 4°C. Finalmente el sedimento fue resuspendido en 20 ml de tampón TB frío, con DMSO a una concentración final de 7% (v/v) y congelado en Nitrógeno líquido en alícuotas de 200  $\mu$ l.

La transformación de células competentes de *E. coli* se realizó por el método de shock térmico (Inoue, 1990) para ello a 50  $\mu$ l de células competentes, se le agregaron de 1 a 5  $\mu$ l de DNA (20 - 100 ng). Ésta mezcla se incubó 30 minutos en hielo, luego 5 minutos a 37°C y finalmente 5 minutos en hielo. A continuación se agregó 1 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó por 1 hora a 37°C con agitación. Posteriormente se sembraron sobre una placa de LB/agar con antibiótico de selección (según el plásmido) y se incubaron a 37°C toda la noche.

### **Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens***

Se utilizó el método descrito por Chen (Chen, 1994), donde un preinóculo de 15 ml es crecido a 28 °C en medio LB/Gentamicina/Rifampicina hasta fase logarítmica. Con 2 ml de este cultivo se inocularon 50 ml de medio LB/Gentamicina/Rifampicina el que fue crecido hasta una O.D<sub>600</sub> = 0,5. Las células se enfriaron en hielo por 10 minutos y luego se centrifugaron a 3000 xg por 5 minutos. El sedimento se resuspendió cuidadosamente en 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 20 mM y las células se guardaron a -70 °C en alícuotas de 100  $\mu$ l.



### **Transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens***

Se utilizó el método descrito por Chen y col (1994), donde 100 µl de células competentes se mezclaron con 1 µg de DNA, se congelaron en Nitrógeno líquido por 5 minutos y luego se incubaron a 37 °C por 25 minutos. Se agregó 1 ml de medio LB/Gentamicina/Rifampicina y se incubaron por 3 horas a 28°C con agitación constante. Posteriormente las células se sembraron sobre una placa de LB/agar con el respectivo antibiótico de selección y se incubaron a 28°C toda la noche.

### **Preparación de células competentes de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Se utilizó el método de acetato de litio descrito en el manual de instrucciones de la empresa Invitrogen para la expresión de proteínas recombinantes en levaduras. Una colonia única fue crecida en un preinóculo de 15 ml de medio YPD, toda la noche a 30°C hasta una DO<sub>600</sub> de 1. Luego se transfirieron 5 ml de este preinóculo a 300 ml de YPD y las levaduras se crecieron a 30°C con agitación, hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,3. Una vez alcanzada esta DO, las levaduras fueron centrifugadas a 1000 xg 10 minutos y lavadas 2 veces con agua estéril. Finalmente se resuspendieron en una solución de Acetato de litio 100mM en TE pH 7,5 y se mantuvieron en hielo hasta ser utilizadas.

### **Transformación de células competentes de levaduras**

Se utilizó el método descrito por Gietz y Schiestl (1995), donde 100 µl de levaduras competentes fueron incubadas con 100 µg de espermio de salmón y 1 µg de DNA. Luego se incubaron por 30 minutos a 30°C utilizando una solución de Acetato de litio 100mM y PEG 40 %(p/v) en TE pH 7,5. Se agregó DMSO a una concentración final de 10 %(v/v), se incubaron 15 minutos a 42°C y finalmente en hielo por 5 minutos. Posteriormente las células se sembraron sobre una placa de medio mínimo-2% Glucosa, sin uracilo y se incubaron a 30°C por 48 hrs.

### **Minipreparación de DNA plasmidial para análisis de restricción.**

Se utilizó el protocolo descrito por Xiang y col., 1994. 1,5 ml de cultivo crecido por 16 horas fue centrifugado por 1 minuto a 12.000 xg. El sedimento fue resuspendido en 100 µl de solución I (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8), se agregaron 200 µl de solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1%) y se mezcló por inversión. Luego se agregaron 150 µl de solución III (Acetato de Potasio 5M, pH 4,7 ajustado con Ácido Acético Glacial), se mezcló por inversión y se centrifugó a 12.000xg por 5 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se agrega 1 ml de Etanol 100%. Posteriormente se centrifugó a 12.000xg por 5 minutos a 4°C y el sedimento fue lavado con Etanol 70%. Se dejó secar por 10 minutos y se resuspendió en 40µl de agua con RNasa (20 µg/ml) e incubó a 37°C por 10 minutos antes de ser utilizado.

### **Midipreparación de DNA plasmidial**

Se utilizó el sistema de preparación de DNA Wizard de Promega (Schoenfeld, 1995). Con el que obtienen aproximadamente 200 µg de DNA plasmidial, de buena calidad.

### **Electroforesis de DNA**

Para separar fragmentos de DNA de tamaños entre 1 a 14 kb o de 100 a 500 pb, se realizaron electroforesis horizontales de agarosa al 1% (p/v) y al 2% (p/v), respectivamente, en tampón TAE (Tris 40 mM, CH<sub>3</sub>COONa 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8). Como marcadores de peso molecular (PM) se utilizó el marcador 1 kb o 100 pb, ambos de Fermentas.

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

Para todas las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando *Taq*DNA polimerasa o *Pfu*DNA polimerasa de Fermentas, en su correspondiente tampón, mezcla de nucleótidos 0,2 mM, Cloruro de Magnesio 1,5 mM, 12 pmoles de cada partidor y aproximadamente 10 ng de templado. La temperatura de apareamiento y el tiempo de extensión utilizada para amplificaciones desde DNA plasmidial fue de 50-55°C por 1 minuto y 1,5 minutos respectivamente. Para amplificaciones desde DNA genómico para verificar las inserciones, las temperaturas de apareamiento fueron diferentes para cada par de partidores y el tiempo de extensión fue de 3 minutos.

### **Preparación rápida de DNA genómico para análisis por PCR**

Este método se utilizó rutinariamente para genotipificar plantas de *Arabidopsis*, donde se necesitaban cantidades pequeñas de DNA de calidad suficiente para ser usado como molde en reacciones de PCR. Se utilizó un cotiledón u hoja pequeña de una planta (3 mm<sup>2</sup>), los que se depositaron en un tubo Eppendorf que contenía 100 µl de solución de extracción TNE/SDS (Tris-HCl 200 mM, pH 8,0; NaCl 250 mM, EDTA 20 mM y SDS 0,5% (p/v)). Para homogeneizar, se utilizó un vástago plástico adaptado a un taladro portátil Dremel™ modelo Minimate 762. Se homogeneizó aplicando presión suave y utilizando el taladro en velocidad alta (12.000 rpm) por 5 seg. El homogeneizado se centrifugó a 10.000 x g por 5 min, y el DNA fue precipitado con un volumen de isopropanol igual al del sobrenadante. Se centrifugó nuevamente durante 5 min a 10.000 x g y el sobrenadante fue descartado. El sedimento fue lavado con 1 volumen de etanol 70% (v/v) y centrifugado nuevamente por 5 min a 10.000 x g. El sobrenadante fue eliminado y el sedimento resuspendido en 20 µl de agua estéril. El DNA preparado por este método y guardado a -20°C es estable por al menos 12 meses.

### **Genotipificación de las plantas mutantes.**

El genotipo de las plantas fue determinado mediante reacciones de PCR, para ello, en una reacción de PCR se utilizaron partidores específicos para amplificar el alelo silvestre y en otra reacción de PCR se empleaban partidores específicos para amplificar el alelo mutante. El DNA molde utilizado fue preparado tal como se describe anteriormente y los productos de PCR obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa.

Se consideraron homocigotas mutantes a aquellas plantas en que sólo se obtuvo el producto de la amplificación del alelo mutante, homocigotas silvestres a aquellas plantas en que sólo se obtuvo el producto de la amplificación del alelo silvestre, y heterocigotas a aquellas plantas en cuyo caso era posible amplificar ambos productos.

En todos los casos se utilizaron dos controles: DNA molde obtenido de plantas silvestres y una reacción en la que no se agregaba DNA molde. Además, en los experimentos iniciales de genotipificación de cada línea mutante, se incluía un control positivo de PCR. Este consistía en amplificar un fragmento de 250 pb o de 750 pb del gen de actina 4 de *Arabidopsis*, utilizando los pares de partidores actina, respectivamente. Este control era importante para poder concluir que la ausencia de un producto determinado no se debía a una falla en la reacción de PCR.

### **Preparación de RNA para Northern-blot**

RNA de buena calidad y de óptima concentración (2-4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) fue preparado a partir de 1-2 gramos de tejido utilizando el protocolo descrito por Das (Das y col. 1990). Con este método se obtiene RNA en condiciones óptimas para ser utilizado en experimentos de Northern-blot.

### **Preparación de RNA para reacciones de RT-PCR**

RNA de calidad y concentración suficiente para realizar experimentos de transcripción inversa (aproximadamente  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), fue preparado a partir de 100 mg de tejido, utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### **Obtención de sondas mediante "random-primer"**

Los fragmentos de cDNA para los genes AtUTr2, actina, BiP y Calnexina fueron amplificados usando los respectivos partidores 5' y 3' de los genes y una genoteca de cDNA como templado. Estos productos de PCR se purificaron mediante el sistema Qiaex de Qiagen.

Para obtener las sondas cDNA marcadas con  $^{32}\text{P}$  se utilizó el sistema "Hexalabel DNA Labeling" de Fermentas. La mezcla de reacción posee 100 ng de producto de PCR, tampón de reacción que incluye los hexanucleótidos (Tris-HCl 0,25 M,  $\text{MgCl}_2$  25 mM, DTT 5 mM y "random-primer" 7,5 o.u./ml), mezcla de dNTP (dGTP, dATP, dTTP 0,33 mM), 50  $\mu\text{Ci}$  de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  (Perkin Elmer) y 5 unidades de enzima Klenow (exo-). Se incubaron 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y después se eliminaron los dNTP no incorporados mediante cromatografía líquida sobre una columna Sephadex G-50 (Amersham). La radioactividad fue cuantificada en un contador beta BECKMAN LS 6000SC.

### **Obtención de sondas mediante PCR**

La síntesis de sondas radioactivas específicas de las regiones 3'UTR para AtUTr1 y AtUTr3, se realizó mediante PCR según Mertz y Rashtchian. En un volumen de reacción de 20  $\mu$ l se utilizó como templado 100 pg del vector pBluescript-3'UTR-AtUTr1 y del vector que contiene el EST de AtUTr3 y los partidores específicos para la secuencia 3'UTR de AtUTr1 (150 pb) y 3' UTR de AtUTr3 (100 pb) a una concentración final de 250 nM. Además la reacción contiene 3,3  $\mu$ l de una mezcla de dNTP (sin dCTP) 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ l de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP 3,3  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 1 $\mu$ l de enzima *Taq* polimerasa y tampón de reacción de la enzima. Se emplearon 30 ciclos de amplificación con una T° de apareamiento de 50°C y un tiempo de extensión de 1,5 minutos. Posteriormente la sonda fue purificada mediante cromatografía líquida en una columna Sephadex G-50 (Amersham) y su radioactividad cuantificada en un contador beta BECKMAN LS 6000SC.

### **Experimentos de Northern-Blot**

30  $\mu$ g de RNA total fueron fraccionados en un gel de Agarosa al 1.5% en condiciones desnaturantes (Formaldehído 1,11 % (v/v), tampón MOPS (MOPS 10X: 0,2 M; Acetato de Sodio 0,05 M; Na<sub>2</sub>EDTA 0,01 M). Antes de cargar las muestras en el gel, se desnaturaron con 3 volúmenes de buffer de desnaturación (Formaldehído 8 % (v/v) , Formamida 65 % (v/v) en tampón MOPS) incubando a 70°C por 10 minutos y se les agregó 5  $\mu$ l de una solución 1:1 ((Azul de Bromofenol al 1 % (p/v), EDTA 1 mM, Glicerol 50 % (v/v)) : Bromuro de Etidio 0,1 mg/ml). El DNA fue transferido a una membrana cargada positivamente (Hybond-N+, Amersham) mediante capilaridad en una solución SSC 10X (SSC 1X: Cloruro de Sodio 0,15 M, Citrato de Sodio 0,015 M, pH 7) por 12 horas. Luego de la transferencia el DNA fue fijado a la membrana usando luz ultravioleta (Crosslinker modelo CL-1000, UVP). La prehibridación fue realizada a 65°C por 3 horas en tampón de prehibridación (SSC 5X, Fosfato de Sodio 0,05M pH 6,8;

Denhardt's 5X (Denhardt's 1X: Polivinilpirrolidona 0,02 % (v/v), Albumina de suero bovino 0,02 % (v/v), Ficoll 0,02 % (v/v) ), EDTA 1 mM pH 8, DNA de espermio de salmón 10 µg/ml, SDS 1 % (v/v) ). Luego las membranas fueron hibridadas a 65°C por 16 horas en tampón de hibridación (igual al de prehibridación pero con SDS 0,1 % (v/v)) con la sonda purificada y cuantificada a una concentración de  $3-4 \times 10^6$  cpm/ml.

Para BiP, Cnx y Actina las membranas fueron lavadas a 65°C en forma consecutiva por 15 minutos con SSC 5X/SDS 0,1% (p/v), por 30 minutos en SSC 2X/SDS 0,1% (p/v), y por 5 minutos en SSC 0,1X/SDS 0,1% (p/v).

Para los Northern-blot de AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr3 las membranas fueron lavadas a 42°C en forma consecutiva por 15 minutos en SSC 5X/SDS 0,1 % (p/v) y luego por 30 minutos en SSC 2X/SDS 0,1 % (p/v).

Las membranas fueron expuestas en una pantalla "Phosphor Screen" (Bio-Rad,) y analizadas en un equipo Molecular Imager FX (Bio-Rad).

Para hibridar la membrana con una sonda diferente, ésta fue hervida por 10 minutos en solución SSC 0,1X/SDS 0,1 % (p/v) y enfriada lentamente antes de reutilizarla.

### **RT-PCR**

La síntesis de la hebra complementaria se realizó utilizando el sistema Improm-II™ Reverse Transcription System de Promega, a partir de 1 µg de RNA total, siguiendo instrucciones del fabricante. Los cDNAs obtenidos de plantas sin tratamiento y plantas tratadas con DIT fueron utilizados para realizar reacciones de PCR cualitativas utilizando actina y clatrina como control. Estos mismos cDNAs fueron utilizados luego para realizar reacciones de PCR cuantitativo usando PCR en tiempo real.

### PCR en tiempo real.

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron utilizando el sistema LightCycler (Roche) en un volumen final de 20  $\mu$ l que contenía 50 ng de cDNA total + QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix 1x (DNA polimerasa HotStar + tampón QuantiTect SYBR Green RT-PCR + dATP + dUTP + dCTP + dGTP + SYBR Green I +  $MgCl_2$  7,5 mM) + partidior sentido 0,5  $\mu$ M y antisentido 0,5  $\mu$ M para cada gen. El programa utilizado para cada gen se describe en la siguiente tabla y lo único que varía entre los genes es el tiempo de amplificación de acuerdo al largo del amplicón: Para AtUTr1, AtUTr2 y AtUTr3: 5 segundos; para Clatrina y BiP: 10 segundos y para Actina: 15 segundos.

Etapa	Nº Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Variación de temperatura (°C/s)	Detección de fluorescencia
Activación de DNA polimerasa	1	95	600	20	no
Amplificación:	35				
denaturación		94	15	20	no
apareamiento		57	20	20	no
extensión		72	X	20	sí
Curva de denaturación:	1				
denaturación		95	0	20	no
renaturación		65	10	20	no
denaturación		95	0	0,1	sí
Enfriamiento	1	40	30	20	no

Tabla 3. Programa utilizado para las reacciones de PCR en tiempo real para AtUTr1, Cnx, BiP, AtUTr2 y Actina, en el sistema LightCycler. X segundos utilizados según el largo del amplicón.



La señal analizada corresponde a la fluorescencia que emite el SYBR Green al intercalarse en la doble hebra de DNA del amplicón. Ésta fue detectada en el canal F1 (530 nm) al final de cada ciclo de amplificación para determinar el aumento de producto en función del aumento de fluorescencia, y durante toda la etapa de denaturación final para construir la curva de denaturación y verificar que el amplicón generado correspondía al esperado.

## **Técnicas bioquímicas y de biología celular.**

### **1. Expresión de los transportadores en levaduras y ensayos de transporte.**

#### **Preparación de cultivos de levaduras que expresan los transportadores AtUTr1 y AtUTr3.**

El cDNAs que codifica para AtUTr3 fue clonados, en marco de lectura con un epítotope Myc seguido de 6 Histidinas (His<sub>6</sub>), en un vectores de expresión en levaduras, que poseen un promotor constitutivo. Las levaduras fueron transformadas como se describió anteriormente y 5 ml de un cultivo que contiene colonias positivas para la transformación fueron crecidas durante 18 h a 30°C en medio mínimo suplementado con aminoácidos (sin uracilo) y adenina. Luego de este tiempo se determinó la DO<sub>600</sub> del cultivo y se inocularon, a una DO<sub>600</sub> de 0,4, 50 ml de un cultivo de medio mínimo. En el caso de las levaduras transformadas con los transportadores cuya expresión es inducible por Galactosa, el medio mínimo contenía Glucosa 2% como fuente de carbono.

Los cultivos de 50 ml fueron crecido a 30°C con agitación hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,6, posteriormente las levaduras fueron sedimentadas a 2500 xg durante 10 minutos, lavadas con agua estéril y almacenadas a -80 °C.

#### **Obtención de una fracción enriquecida de membranas de levaduras que expresan los transportadores.**

Se utilizó el protocolo recomendado por el fabricante de los vectores de expresión de levaduras de Invitrogen. Brevemente, las levaduras que expresan el transportador y almacenadas a -80°C, fueron rotas en forma mecánica utilizando vortex, bolitas de vidrio y tampón de ruptura (fosfato de sodio 50mM pH 7,5; Glicerol 5% (v/v); PMSF 1mM; Pepstatina 1 µM y AEBSF 10 µM). Luego se centrifugaron a 1000xg para sedimentar las células no rotas, los restos celulares y las bolitas de vidrio y el sobrenadante fue centrifugado a 100.000 xg durante 50

minutos. El sedimento obtenido, que corresponde a las membranas celulares que expresan AtUTr3, fue resuspendido en una solución de Hepes 10 mM pH 7,5 y MgCl<sub>2</sub> 0,8 mM y almacenado a -80°C hasta su utilización.

#### **Purificación de los transportadores utilizando cromatografía de afinidad.**

300 µl de membranas de levaduras que expresan AtUTr3 fueron resuspendidas en tampón fosfato 100 mM pH 7,6 y Tx-100 a una concentración final de 3-3,5% (v/v) y diluidas a 2 ml usando el tampón de unión a la columna (tampón fosfato 100 mM pH 7,6, Imidazol 8 mM y Tx-100 0,05% (v/v)). Luego, las membranas fueron centrifugadas 2 minutos a 2000xg y el sobrenadante fue cargado directamente en la resina Ni-NTA agarosa, previamente equilibrada con tampón de unión a la columna. Durante 30 minutos el sobrenadante fue incubado con la resina y al cabo de este tiempo, fue centrifugado 2 minutos a 2000 xg para eliminar el sobrenadante que contiene las proteínas no unidas a la resina. Luego la resina unida a AtUTr3 fue lavada 5 veces por centrifugación con tampón de lavado (Tampón fosfato 10 mM, Imidazol 8 mM y Tx-100 0,05% (v/v)). Finalmente AtUTr3 fue eluido de la columna usando 400 µl de tampón de elución (Tampón fosfato 10 mM, Imidazol 150 mM y Tx-100 0,05% (p/v)), durante 4 veces consecutivas.

#### **Reconstitución de los transportadores en liposomas.**

Para la reconstitución de los transportadores en liposomas, se utilizó el método de ("freeze-thaw-sonicate procedure"), descrito por Loddenkötter y col., 1993.

**Purificación de fosfolípidos.** Los liposomas fueron preparados a partir de L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (Sigma), lavada con 3 volúmenes de cloroformo 100% y 18 volúmenes de Acetona 100% fría. Esta suspensión fue agitada por 2 horas a temperatura ambiente y los fosfolípidos precipitados toda la noche a 4°C. El sobrenadante fue descartado y los fosfolípidos secados usando N<sub>2</sub> gaseoso y guardados a -20°C.

### **Preparación de liposomas a partir de la suspensión de fosfolípidos**

25 mg/ml de fosfolípidos preparados como se describe anteriormente fueron disueltos usando un medio interno que contiene Gluconato de potasio 140 mM y Tampón fosfato 10 mM pH 7,6 y el sustrato a ser ensayado en una concentración de 200  $\mu$ M. Los liposomas se prepararon por sonicación usando el sonicador , equipado con una micro punta, a intervalos de 30 segundos y poder de salida de 4. Una vez obtenida que los fosfolípidos fueron disueltos, AtUTr3 proveniente de las membranas o directamente de la purificación fue reconstituido en los liposomas mediante congelamiento rápido en N<sub>2</sub> líquido como describe Rollwitz y col., 2006. Los liposomas así obtenidos se mantuvieron en N<sub>2</sub> hasta su utilización en los ensayos de transporte.

### **Ensayos de transporte en liposomas reconstituidos con membranas que expresan AtUTr3 o AtUTr3 purificado.**

Los ensayos de transporte fueron iniciados agregando 4 $\mu$ M de [<sup>14</sup>C] UDP-glucosa durante 5 minutos y terminados por filtración, de los liposomas, mediante columnas de intercambio iónico (Dowex AG1-X8 de BioRad). La marca radioactiva de [<sup>14</sup>C] UDP-glucosa que ingresó a los liposomas, fue determinada luego al eluir los liposomas desde la columna utilizando acetato de sodio 150 mM y la radioactividad fue determinada usando un contador de centelleo.

## **2. Expresión de los transportadores en células vegetales y determinación de localización subcelular.**

### **Agroinfiltración de hojas de tabaco.**

Hojas de plantas de tabaco de 4 a 6 semanas fueron agroinfiltradas utilizando el protocolo descrito por Batoko y col., 2000. Brevemente, cultivos de *Agrobacterium* fueron lavados con  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  2mM, Glucosa 5 mg/mL, MES 5mM pH 5,6 y Acetosiringona 1 mM y resuspendidos a una D.O<sub>600</sub> de 0,1. Luego, 1 ml de la suspensión de bacterias fue infiltrado en la cara abaxial de las hojas de tabaco. El análisis de las hojas transformadas se realizó luego de 48 horas utilizando técnicas de microscopía.

### **Análisis de localización subcelular utilizando microscopía.**

Las hojas de tabaco transformadas con las distintas construcciones fueron observadas usando el microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta Olympus. Tanto para comandar el microscopio como para a obtención de imágenes se utilizó el programa diseñado por Zeiss. El procesamiento y la exportación de imágenes se realizó utilizando el programa Zeiss LSM Image Browser.

### **3. Técnicas de fraccionamiento subcelular y obtención de fracciones enriquecidas en membranas.**

#### **Fraccionamiento subcelular y preparación de fracciones enriquecidas en RE y Aparato de Golgi de *Arabidopsis thaliana*.**

Plantas de *Arabidopsis* fueron homogenizadas en una solución de sacarosa 0.5M usando una hoja de afeitar, molidas con mortero y filtradas con una malla Miracloth (Calbiochem). El homogenizado fue centrifugado 3 minutos a 1.000xg y el sobrenadante obtenido se fraccionó a 100.000xg en un gradiente discontinuo de sacarosa de 3 etapas: 1,3M, 1,1M y 0,25M como el descrito por Muñoz y cols. (1996) Todas las soluciones utilizadas contenían  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1M, pH 6,7 y  $\text{MgCl}_2$  5mM. Las membranas presente en la interfase 1,3/1,1 fueron colectadas, diluidas con 1 volumen de agua nanopura y centrifugadas 1 hora a 100.000xg. El sedimento obtenido se resuspendió en solución STM (Sacarosa 0,25 M, Tris/HCl 10 mM y  $\text{MgCl}_2$  1mM) y fue almacenado a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### **Medición de marcadores de RE y Aparato de Golgi, luego del fraccionamiento subcelular.**

Para determinar el enriquecimiento de las distintas fracciones en membranas de RE, se utilizó el marcador NADH citocromo C reductasa insensible a antimicina A (Briskin y col., 1987). Como marcador de aparato de Golgi se utilizaron la protefna glicosilada reversiblemente (RGP) (Dhugga y col., 1997) y la xiloglucano fucosil Transferasa (XG-FucTasa) (Madson y col. 2003).

#### **4. Ensayos bioquímicos en fracciones de membranas.**

##### **Incorporación de UDP-glucosa en vesículas de RE de *Arabidopsis thaliana*.**

La incorporación de UDP-glucosa se determinó utilizando el protocolo descrito por Norambuena y col., 2002. 100 µg de proteínas de vesículas de RE fueron incubadas 3 minutos con UDP-[<sup>14</sup>C]Glucosa 1 µM en STM a 25 °C. La reacción fue detenida por dilución adicionando 10 volúmenes de STM. Luego las vesículas se separaron usando filtros de éster de celulosa (0,45 µm de tamaño de poro) (Millipore). La radioactividad asociada a las vesículas fue determinada usando un contador de centelleo BECKMAN LS 6000SC.

##### **Determinación de actividad UGGT en fracciones de RE de *Arabidopsis thaliana*.**

##### **Medición de actividad UGGT utilizando tiroglobulina desnaturada como sustrato.**

La determinación de la actividad UGGT fue realizada como describe Sousa y col. (1992). Vesículas de RE de *Arabidopsis thaliana* fueron solubilizadas usando lubrol 0,7% (v/v) e incubadas con HEPES 50 mM, pH 7,2; CaCl<sub>2</sub> 20 mM; Deoxynojirimicina (DNJ) 0,5 mM, UDP-[<sup>3</sup>H] Glucosa en presencia o ausencia de 20 µg de tiroglobulina desnaturada durante 30 minutos a 25°C. La reacción fue detenida agregando 10 volúmenes de Ácido tricloroacético 10 % (v/v) e hirviendo durante 5 minutos. El sedimento obtenido fue lavado 3 veces con 10 volúmenes de TCA 10% (v/v), resuspendido en hidróxido de Hiamina (NEN) y la radioactividad asociada a las proteínas determinada usando un contador de centelleo BECKMAN LS 5000TD.

### **Análisis electroforético y cromatográfico de los oligosacáridos presentes en tiroglobulina.**

Los oligosacáridos presentes en tiroglobulina de RE de Arabidopsis fueron analizados como describe Parodi y col. (1984). Para ello, el último paso del método descrito anteriormente fue eliminado y las proteínas fueron tratadas con Pronasa (Sigma) toda la noche a 37°C y centrifugadas a 10.000xg durante 3 minutos. El sobrenadante fue cargado en una columna G10 y la elusión se realizó utilizando isopropanol al 7% (p/v). Los oligosacáridos se recolectaron a partir del volumen muerto y se secaron con aire en un baño a 95°C. Posteriormente se realizó una electroforesis de 2,5 horas en papel (Whatman 1) utilizando ácido fórmico 0,8% (p/v) como tampón. Los oligosacáridos cargados positivamente presentes en la muestra fueron eluidos a partir del papel y tratados con endoglucosidasa H (Sigma). Posteriormente éstos fueron separados usando cromatografía en papel descendente en tampón n-propanol:nitrometano:agua en una razón 5:2:4 y finalmente el papel fue cortado y contado utilizando un contador de centelleo BECKMAN LS 5000TD. En la cromatografía final se utilizó como estándar una mezcla de oligosacáridos que contienen (Glucosa 1-Manosa 9) G1M9 y (Glucosa 1-Manosa 8) G1M8, obtenidos a partir de glicoproteínas de levaduras.



## **5. Análisis fenotípicos y morfológicos de las plantas mutantes**

El análisis morfológico de las plantas mutantes se realizó de acuerdo a lo descrito por Boyes y col., 2001. Básicamente, se analizaron cuantitativa y cualitativamente diferentes aspectos del desarrollo de *Arabidopsis*, estudiando caracteres correspondientes tanto al desarrollo vegetativo como al reproductivo. Se seleccionaron diversos parámetros para comparar el desarrollo de plantas mutantes con el de plantas silvestres, siguiendo las recomendaciones descritas para plantas silvestres de *Arabidopsis* del ecotipo Col (Boyes y col., 2001). Como control en todos los análisis se utilizaron plantas silvestres del mismo ecotipo que las mutantes analizadas, ya sea Col, Ler o NO. Para ello, las plantas silvestres y mutantes fueron crecidas en las mismas condiciones, ya sea placas de MS, medio hidropónico o tierra, con el fin de minimizar las diferencias en el desarrollo producidas por diferencias en las condiciones de crecimiento.

Como no hubo diferencias en el crecimiento vegetativo, es decir en tamaño o desarrollo de la raíz, hojas de la roseta o tejido aéreo, sólo se describirá en detalle los análisis realizados en el tejido que permite el desarrollo reproductivo de *Arabidopsis*.

### **Desarrollo de la flor.**

El tamaño, la estructura y la apariencia general de la flor, se analizaron poniendo énfasis en los órganos reproductivos masculino (estambre) y femenino (pistilo). Los estambres están compuestos por un filamento que termina en una estructura abultada (antera), dentro de la que se encuentran los granos de polen en desarrollo. En el grano de polen se desarrolla el gametofito masculino, que en *Arabidopsis* está compuesto por 3 células haploides (1 célula vegetativa y 2 células generativas). Cada flor en *Arabidopsis* posee 6 estambres, de los cuales 4 terminan su desarrollo cuando alcanzan la misma altura que el pistilo (estambres largos) y 2 terminan su desarrollo con una altura inferior (estambres cortos).

Las anteras de flores en desarrollo pasan de color verde a amarillo mientras el filamento elonga y las flores abiertas tienen abundante polen maduro (amarillo) en la superficie. El pistilo está compuesto por 2 carpelos fusionados que forman el ovario, y ocupa una posición central en la flor, donde se desarrolla rodeado por los estambres. Los pistilos en desarrollo son verdes, y al alcanzar la madurez muestran una papila estigmática turgente. En el interior de los ovarios se encuentran los óvulos, en número entre 40-60 para los ecotipo Nössen (NO), Landsberg erecta (Ler) y Columbia (Col), los que se desarrollan interdigitados. Los óvulos deben ser translúcidos y turgentes donde, en su interior, se desarrolla el gametofito femenino.

#### **Desarrollo del saco embrionario (gametofito femenino).**

Flores de las plantas mutantes y silvestres fueron emasculadas entre 48 y 72 h antes de ser analizadas. Para esto, con la ayuda de una lupa de disección se seleccionaron flores cerradas en las que las puntas de los pétalos eran apenas visibles. Estas flores se abrieron de manera manual, con pinzas de puntas muy finas, retirando los sépalos, los pétalos y los estambres, cuidando de no dañar el pistilo. Las flores seleccionadas se marcaron y se dejaban en la planta por 48 a 72 h para que se completara el desarrollo de los óvulos, es decir hasta que la papila estigmática se volviera receptiva (turgente). Luego, los pistilos maduros eran disectados e incubados con una gota de solución de fijación FAA que contiene etanol 50% (v/v), ácido acético glacial 5% (v/v), y 1/10 de volumen de formaldehído 37% (p/v). Bajo una lupa estereoscópica y con la ayuda de una aguja hipodérmica muy fina, se realizaron cortes a lo largo de la pared de los carpelos, cuidando de no dañar los óvulos. El tejido se fijó en 1 ml de FAA durante una noche a temperatura ambiente y se montó en 20 µl de una solución de ablandamiento (4 g de hidrato de cloral, 1 ml de glicerol y 0,5 ml de agua). Los óvulos fueron disectados cuidadosamente, eliminando todo el tejido restante, bajo la lupa y con la ayuda de una aguja hipodérmica muy fina. Finalmente la preparación se cubrió con un cubreobjetos y se selló con esmalte de uñas para evitar que la muestra se seque.

Las muestras de óvulos fueron analizadas teniendo en cuenta que en *Arabidopsis* está compuesto por 6 células haploides (3 células antipodales, 2 células sinérgidas y una célula huevo) y 1 célula diploide (célula central). Para los análisis morfológicos de los óvulos se utilizó un microscopio (Nikon Optiphot-2) equipado con el sistema óptico de Nomarski (DIC, Differential Interference Contrast) y se tomaron fotografías con una cámara digital Nikon Coolpix 4500.

### **Análisis morfológicos del polen (gametofito masculino).**

Muestras de flores de diferentes edades se recolectaron de acuerdo a su apariencia externa (Bowman, 1994). Éstas se fijaron durante 12 horas a temperatura ambiente en una solución de glutaraldehído 3% (v/v) y luego fueron embebidas en resina Epon. Se hicieron cortes semifinos (de 2  $\mu\text{m}$ ), los que fueron teñidos con azul de toluidina, analizados al microscopio de luz (Olympus IX2-UCB) y fotografiados con una cámara digital Nikon Coolpix 4500.

Para análisis de microscopía electrónica, se recurrió al Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Biológicas (PUC). Se realizaron cortes ultra finos de las mismas muestras (60 nm), que fueron teñidos por 30 minutos con acetato de uranilo 4 % (p/v) y citrato de plomo 4% (p/v). Las muestras fueron analizadas en un microscopio de transmisión de electrones Philips Tecnai 12 a 80 k y las fotografías se tomaron utilizando películas Kodak Electron Image SO163.

El polen maduro se obtuvo a partir de estambres de flores recién abiertas y para ello, con la antera se tocó la superficie de una gota de agarosa 1% (p/v) solidificada sobre un portaobjetos y el polen fue observado al microscopio de luz (Olympus IX2-UCB). Las fotografías se tomaron con una cámara digital.

La viabilidad del polen fue estimada utilizando la tinción de Alexander (Alexander, 1969). La solución de Alexander contiene 1 ml de etanol 95% (v/v); 0,5 ml de una solución 1% (p/v) de verde malaquita en etanol; 0,5 ml de una solución al 1% (p/v) de fucsina ácida en agua; 50  $\mu\text{l}$  de una solución al 1% (p/v) de anaranjado G en agua; 0,5 g de fenol; 0,2 ml de ácido acético glacial; 2,5 ml de glicerol y 5 ml de agua. 6 estambres de una flor recién abierta se montaron sobre un portaobjetos en 20  $\mu\text{l}$  de una dilución 1:20 de solución de Alexander en agua. La preparación se cubrió con un cubreobjetos y se dejó teñir por 15 minutos a temperatura ambiente. La preparación se observó con un microscopio de luz (Olympus IX2-UCB). El citoplasma de los granos de polen vivos se tiñe de color púrpura y la cubierta externa (exina) se tiñe de color verde. Los granos de polen muertos solo muestran la tinción de la cubierta de externa, por lo que se ven de color verde.

## 6. Cruces y análisis genéticos para la generación de plantas doble mutantes.

### Cruces para obtención de plantas dobles mutantes homocigotas.

Se tomaron plantas homocigotas mutantes en AtUTr1 (*utr1.1* y *utr1.2*) y en AtUTr3 (*utr3.1* y *utr3.2*) y silvestres de los mismos ecotipos (Col, Ler y NO), y se cortaron todas las flores abiertas. Luego se emascularon entre 2 y 5 flores de cada planta, para esto se seleccionaron, con la ayuda de una lupa de disección (Olympus SZX7), flores cerradas en las que las puntas de los pétalos eran apenas visibles. Con pinzas de puntas muy finas se abrían estas flores de manera manual y se retiraban los sépalos, los pétalos y los estambres, cuidando de no dañar el pistilo. Se marcaban las flores con una etiqueta y se dejaban en la planta 48-72 h para que se completara el desarrollo de los óvulos, es decir hasta que la papila estigmática se volviera receptiva (turgente). Los carpelos se dejaron madurar (48-72 h) y se polinizaron manualmente: los carpelos maduros de las plantas mutantes en AtUTr1 con polen de plantas mutantes en AtUTr3 y los carpelos maduros de las plantas mutantes en AtUTr3 con polen de plantas mutantes en AtUTr1. Así mismo se realizaron los cruces para los distintos ecotipos silvestres. Se esperaron 15-20 días hasta completar el desarrollo de los frutos y se recolectaron las semillas. Luego, éstas eran sembradas en medio y al cabo de 6 o 7 días se preparó DNA genómico de cada plántula, tal como se describe en la sección de técnicas de biología molecular y se usó para experimentos de genotipificación por PCR.

### **Segregación de las mutaciones en cruces recíprocos.**

Para determinar la capacidad del gameto masculino de transmitir la mutación, se realizaron cruces recíprocos. Para esto, se tomaron plantas mutantes (genotipo *AtUTr1/atutr1 atutr3/atutr3* y *atutr1/atutr1 AtUTr3/atutr3*) y silvestres provenientes del cruce Ler x NO del mismo ecotipo, y se cortaron todas las flores abiertas. Se emascularon entre 2 y 5 flores de plantas silvestres, tal como se describe en la sección anterior. Los carpelos de las plantas silvestres se dejaron madurar entre 48 y 72 h y se polinizaron manualmente con polen de plantas mutantes. Se realizó el mismo procedimiento para realizar el cruce recíproco, es decir, utilizando granos de polen silvestre y óvulos provenientes de plantas mutantes. Una vez completo el desarrollo del fruto (15-20 días) las semillas fueron recolectadas a partir de cada uno de los frutos en forma independiente y se sembraron en medio MS sólido. Al cabo de 6 o 7 días se preparó DNA genómico de cada plántula, el que se usó para la genotipificación por PCR, tal como se describe en la sección técnicas de biología molecular.

El porcentaje de eficiencia de transmisión de la mutación en los cruces recíprocos fue calculado dividiendo el número de plantas que poseen el alelo mutante por las plantas que no lo poseen y multiplicando este valor por 100 (Park y col., 1998).

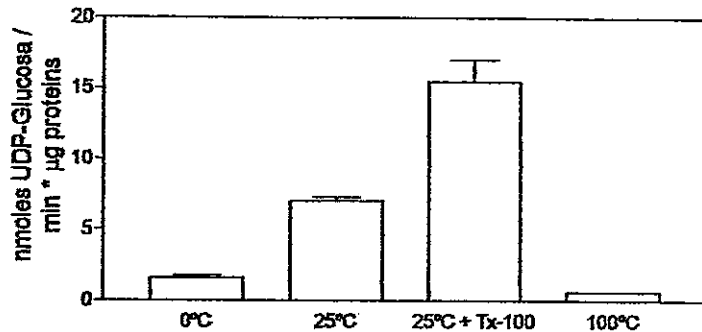
## RESULTADOS

**1. Establecer si en el RE de células vegetales existe incorporación de la UDP-glucosa requerida para procesos de reglucosilación de proteínas.**

Para resolver este objetivo, determinamos si en el RE de células vegetales existe transporte de UDP-glucosa y si existe una actividad con características de UGGT, que sea capaz de utilizar UDP-glucosa como sustrato para transferir el residuo de glucosa a glicoproteínas mal plegadas.

### 1.1 Incorporación de UDP-glucosa en el RE de *Arabidopsis thaliana*.

Para determinar si existe incorporación de UDP-glucosa en RE de células vegetales, plantas de *Arabidopsis thaliana* de 6 semanas crecidas en tierra, fueron sometidas a fraccionamiento subcelular en un gradiente discontinuo de sacarosa como el descrito por Muñoz y col., 1996. Utilizando membranas provenientes de una fracción enriquecida en RE, realizamos un ensayo de incorporación de UDP-<sup>14</sup>C]glucosa en 3 minutos, tiempo en el previamente habíamos mostrado que el transporte de nucleótidos-azúcar se encuentra en velocidad inicial (Norambuena y col., 2002). El resultado obtenido muestra que en esta fracción de membranas existe incorporación de UDP-glucosa y que éste es 6 veces mayor cuando el ensayo se realiza a 25°C que cuando se realiza a 0°C. Además cuando permeabilizamos las vesículas con detergente, observamos una gran incorporación de UDP-glucosa a las vesículas, lo que sugiere que en presencia de detergente la entrada del sustrato al interior del RE no está limitada lo que favorece la glucosilación de aceptores de naturaleza lipídica y/o protéica presentes en el interior de las vesículas. Finalmente, observamos que la incorporación de UDP-glucosa desciende casi hasta niveles basales cuando las vesículas de RE son previamente desnaturadas a 100°C durante 10 minutos (Figura 4)



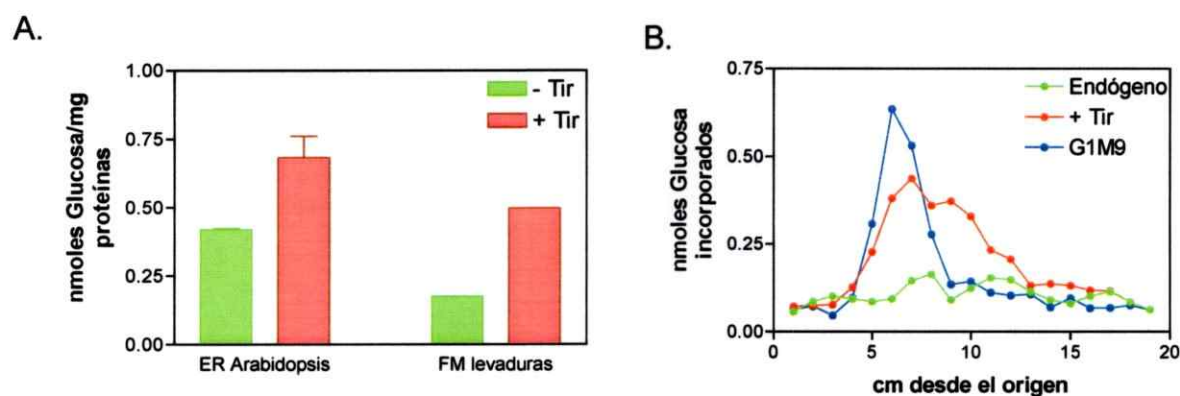
**Figura 4:** Incorporación de UDP-glucosa en el retículo endoplasmático de *Arabidopsis thaliana*. Plantas de *Arabidopsis* de 6 semanas crecidas en tierra fueron homogenizadas y se obtuvo una fracción enriquecida en membranas de RE. 50 µg de membranas fueron incubados durante 3 minutos con [<sup>14</sup>C] UDP-glucosa 1 µM. Al cabo de ese tiempo la reacción se detuvo por dilución, seguido de filtración y se contó la radioactividad presente en el interior de las vesículas de RE. El ensayo se realizó a 0°C (baño de agua/hielo) y a 25°C usando un baño termoregulado, 100°C corresponde a vesículas incubadas previamente durante 10 minutos a 100°C y 25°C+Tx-100 a vesículas permeabilizadas con Tx-100 0,1% (v/v).

## 1.2 Medición de actividad UGGT en retículo endoplasmático de *Arabidopsis thaliana*

La presencia, en el RE de *Arabidopsis*, de una enzima capaz de utilizar UDP-glucosa como sustrato y transferirlo a proteínas mal plegadas se determinó midiendo la actividad enzimática de la UDP-glucosa glicoproteína glucosil transferasa (UGGT). Para ello fracciones de retículo endoplasmático (RE) de plantas de *Arabidopsis* de 6 semanas crecidas en tierra fueron solubilizadas usando detergente y la actividad UGGT fue determinada utilizando tiroglobulina desnaturada como aceptor y UDP-[<sup>14</sup>C] glucosa como sustrato. Observamos que, al igual que lo que ocurre en las levaduras que expresan la UGGT, utilizadas como control positivo, la presencia de tiroglobulina desnaturada produce un aumento, de aproximadamente el doble, en la incorporación de <sup>14</sup>C-Glucosa por sobre lo detectado en la fracción sin tiroglobulina (Figura 5A). La señal detectada corresponde a glucosilación observada por la presencia de tiroglobulina por sobre la glucosilación inespecífica de estructuras de naturaleza desconocida, presumiblemente protéicas, presentes en la fracción enriquecida en membranas de RE de *Arabidopsis* (Figura 5A).



Por otra parte realizamos un análisis electroforético y cromatográfico de los oligosacáridos presentes en tiroglobulina desnaturalada luego de la incubación con una fracción enriquecida en RE de *Arabidopsis*. Este análisis indica que estos oligosacáridos corresponden a los de una estructura del tipo G1M9 (glucosa 1 manosa 9) ó  $\text{GlcNAc}_1\text{Man}_9\text{Glc}_1$  y G1M8 (glucosa 1 manosa 8) ó  $\text{GlcNAc}_1\text{Man}_8\text{Glc}_1$  (Figura 5B) que han sido descritas como estructuras de oligosacáridos originados por acción de la enzima UGGT (Parodi y col., 1984). Los antecedentes entregados sugieren fuertemente que en el RE de *Arabidopsis thaliana* existe una proteína con actividad UGGT, que reconoce glicoproteínas mal plegadas y que es capaz de transferirles glucosa a partir de UDP-glucosa como sustrato.



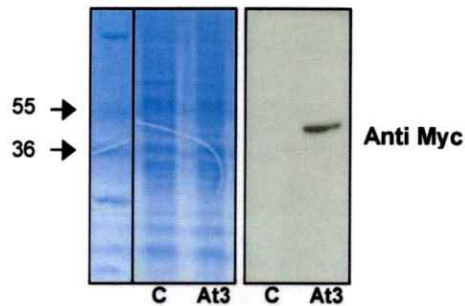
**Figura 5: Actividad UGGT y análisis de oligosacáridos presentes en glicoproteínas de retículo endoplasmático de *Arabidopsis thaliana*.** 100  $\mu\text{g}$  de membranas de RE fueron incubadas durante 30 minutos a 25°C con UDP-[ $^{14}\text{C}$ ] Glucosa en presencia (+) o ausencia (-) de Tiroglobulina (Tir). La reacción fue detenida precipitando con TCA 10% y temperatura (100°C, durante 5 minutos), la radioactividad presente en la fracción precipitada fue cuantificada usando un contador de centelleo líquido. **A. Ensayo UGGT:** La incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Glucosa a material insoluble en TCA10%, mediada por una actividad presente en una fracción enriquecida en RE, fue determinada en presencia (+) y ausencia (-) de tiroglobulina. Como control se utilizó una fracción microsomal de levaduras que expresan la UGGT de *S. pombe*. **B. Análisis de oligosacáridos presentes en glicoproteínas de RE de *Arabidopsis*.** La fracción de glicoproteínas proveniente de un ensayo UGGT (+ Tiroglobulina) y las glicoproteínas endógenas fueron analizadas por electroforesis y cromatografía de manera de obtener los oligosacáridos presentes en N-glicoproteínas. Para determinar la estructura de los oligosacáridos obtenidos se utilizó un estándar de levadura, que contiene las estructuras  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  (G1M9),  $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  (G1M8) y  $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  (G1M7), las que se indican con las respectivas flechas.

## **2. Determinar si AtUTr1 y AtUTr3 son transportadores de UDP-glucosa localizados en el RE.**

Teniendo en cuenta que AtUTr1 es capaz de transportar UDP-glucosa (Norambuena y col., 2002), nos faltaba caracterizar funcionalmente AtUTr3. Con el propósito de resolver este objetivo, clonamos AtUTr3 y lo expresamos en membranas de levaduras las que se utilizaron para realizar la caracterización de este transportador. Además, determinamos la localización subcelular de AtUTr1 y AtUTr3 fusionando la secuencia de ambos transportadores a las de proteínas fluorescentes y utilizando el anticuerpo diseñado contra el extremo C-terminal de ambos transportadores.

### **2.1 Ensayos funcionales de AtUTr3: expresión en levaduras, reconstitución en liposomas y ensayos de transporte.**

Levaduras silvestres de las cepas RSY255 fueron transformadas con el vector que porta la construcción AtUTr3mycHis pGPD426 y con el vector vacío pGPD426 como control. Las colonias transformantes fueron seleccionadas por auxotrofia en medio mínimo sin uracilo y la búsqueda de las colonias positivas para la transformación se realizó aislando fracciones microsomales de las colonias transformantes y realizando ensayos de western blot usando el anticuerpo contra el epítipo de myc o His. Cuando se utilizó el anticuerpo anti myc, se detectó una banda de proteínas de aproximadamente 38 kDa, que correspondería al monómero de AtUTr3. Fracciones de membranas de levaduras transformadas con el vector vacío fueron utilizadas como control negativo (Figura 6)

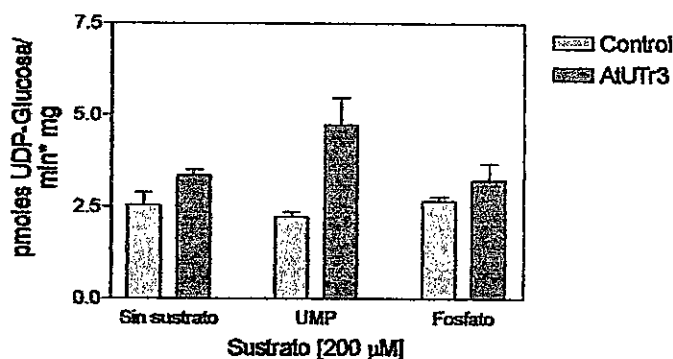


**Figura 6: Expresión de AtUTr3 en fracciones microsomales de levaduras.** 25  $\mu\text{g}$  de proteínas de fracciones microsomales de levaduras transformadas con la construcción AtUTr3MycHis, fueron separadas usando geles desnaturalantes de poliacrilamida al 12%. El panel izquierdo corresponde a las proteínas presentes en el gel teñidas con azul de coomasie y el panel derecho a la membrana revelada utilizando un anticuerpo contra Myc. At3 corresponde a las levaduras transformadas con la construcción AtUTr3MycHis y C al vector vacío pGPD426, que fue utilizado como control. A la izquierda se muestra el carril correspondiente al estándar de peso molecular con los respectivos tamaños.

El modelo actual del funcionamiento de los transportadores de nucleótidos-azúcar y que ha sido validado en *Arabidopsis thaliana* para el transportador de UDP-galactosa AtNST-KT (Rollwitz y col., 2006), indica que éstos trabajan como contra-transportadores, importando el nucleótido-azúcar desde el citosol hacia el lumen del organelo, a la vez que el nucleótido monofosfato es exportado hacia el citosol (Hirschberg y col., 1998). Para probar este modelo y determinar si AtUTr3 es capaz de transportar UDP-glucosa, realizamos su reconstitución en liposomas y realizamos ensayos de transporte de UDP-glucosa.

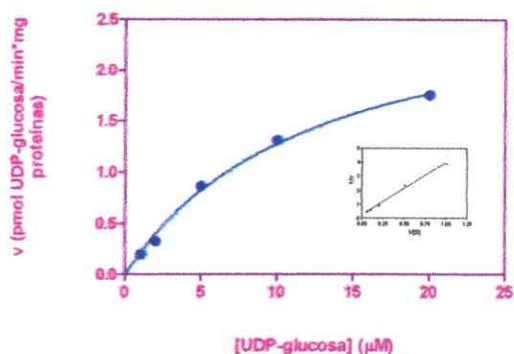
Los ensayos de transporte fueron realizados como describe Loddenkotter y col., 1997 y Rollwitz y col., 2006, con pequeñas modificaciones. Los liposomas fueron precargados con UMP 200  $\mu\text{M}$  y el ensayo de transporte fue iniciado por la adición de [ $^{14}\text{C}$ ]-UDP-glucosa 4  $\mu\text{M}$  y detenidos por filtración. En un comienzo se realizó una curva de tiempo para la reacción de 30 segundos, 1, 3, 5 y 10 minutos y se determinó que en 3 minutos de reacción nos encontramos en condiciones de velocidad inicial (Dato no mostrado).

Utilizando un tiempo de reacción de 3 minutos, realizamos los ensayos de transporte precargando los liposomas con distintos sustratos: UMP y fosfato (que podrían encontrarse en el lumen del RE según el actual modelo de funcionamiento de los transportadores) y un control sin sustrato. Sólo cuando los liposomas fueron precargados con UMP y en presencia de AtUTr3, observamos transporte de UDP-glucosa hacia el lumen de los liposomas (figura 7). Sugiriendo que AtUTr3 funciona como un contra transportador de UDP-glucosa/UMP.



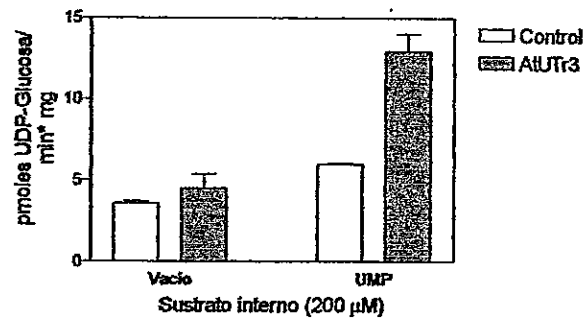
**Figura 7: Reconstitución en liposomas de AtUTr3 y ensayos de transporte de UDP-glucosa.** Membranas de levaduras que sobreexpresan AtUTr3 fueron directamente reconstituidas en liposomas precargados con UMP ó Fosfato de potasio (Fosfato) (200 μM). Como control se utilizaron liposomas que no poseían sustrato a probar en su interior (Sin sustrato). El ensayo de transporte fue iniciado usando [14C]UDP-glucosa 4 μM y detenido por filtración a los 3 minutos. La radioactividad presente en los liposomas fue cuantificada usando un contador de centelleo líquido.

Junto con determinar que AtUTr3 transporta UDP-glucosa y que funciona como contra transportador, determinamos su Km aparente por UDP-glucosa utilizando UMP como contrasustrato. Al realizar el análisis de dobles recíprocos, determinamos que el valor de Km aparente es de  $6,4 \pm 0,7 \mu\text{M}$  de UDP-glucosa, con una Vmax aparente de 4,2 pmoles UDP-glucosa/min\*mg proteínas (inserto en figura 8).



**Figura 8:** Curva de saturación con UDP-glucosa para el transportador AtUTr3. Ensayo de transporte de UDP-glucosa utilizando membranas de levaduras que sobreexpresan AtUTr3 directamente reconstituidas en liposomas precargados con UMP 200  $\mu\text{M}$ . El ensayo de transporte se inició usando  $[^{14}\text{C}]$ UDP-glucosa en las concentraciones indicadas y fue detenido por filtración a los 3 minutos. La radioactividad presente en los liposomas fue cuantificada usando un contador de centelleo líquido. (Inserto) Gráfico del cálculo de los dobles recíprocos para el transporte de UDP-glucosa mediado por AtUTr3.

Finalmente realizamos ensayos de transporte de UDP-glucosa utilizando el transportador purificado. Para ello solubilizamos membranas de levaduras que acumulan AtUTr3, y lo purificamos utilizando una resina de afinidad de  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA. AtUTr3 purificado fue inmediatamente reconstituido en liposomas precargados o no con UMP 200  $\mu\text{M}$  y el ensayo de transporte se inició al agregar  $[^{14}\text{C}]$ -UDP-glucosa 4  $\mu\text{M}$ . Se observaron diferencias significativas para el transporte de UDP-glucosa sólo en presencia de AtUTr3 y UMP, confirmando que AtUTr3 funciona como contratrtransportador de UDP-glucosa y UMP (figura 9).

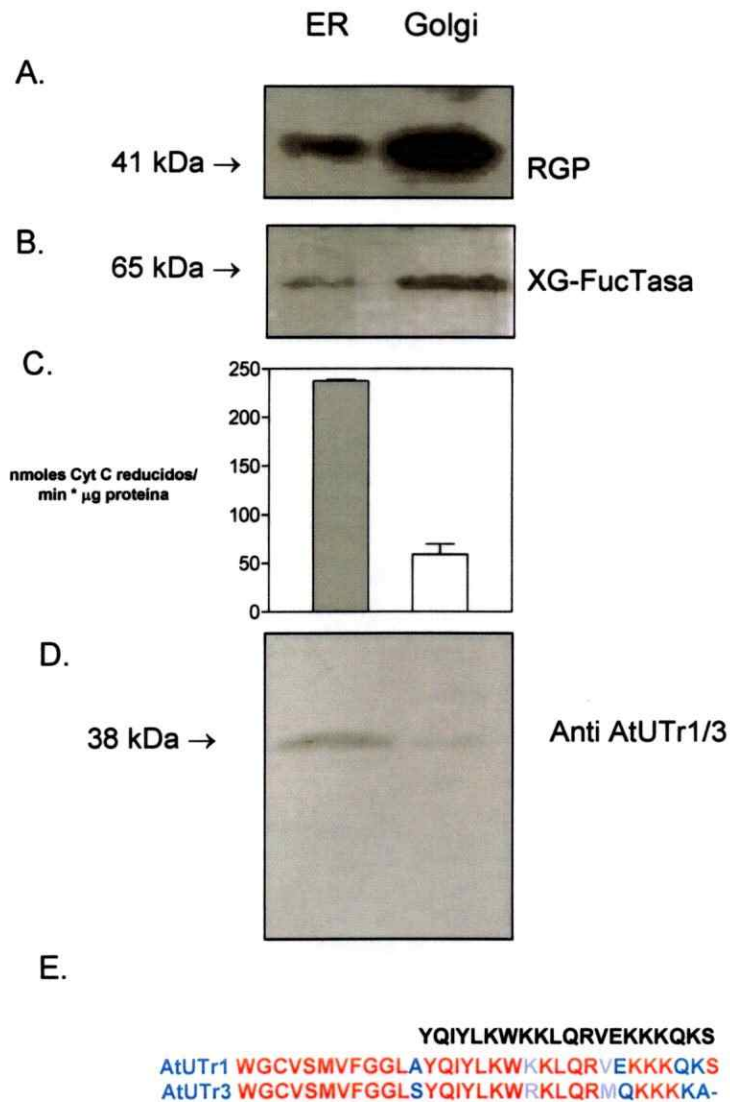


**Figura 9: Ensayo de transporte de UDP-glucosa utilizando liposomas reconstituidos con AtUTr3 purificado.** AtUTr3 fue purificado y directamente reconstituido en liposomas precargados con UMP 200  $\mu\text{M}$  o sin UMP (vacío). Como control se realizó el mismo ensayo pero en liposomas reconstituidos sin el transportador. El ensayo de transporte fue iniciado utilizando  $[^{14}\text{C}]$ UDP-glucosa 4  $\mu\text{M}$  y detenido por filtración a los 3 minutos. La radioactividad presente en los liposomas fue cuantificada usando un contador de centelleo líquido.

## 2.2 Localización subcelular de los transportadores AtUTr1 y AtUTr3 por inmunodetección.

Plantas de *Arabidopsis thaliana* de 6 semanas crecidas en tierra, fueron sometidas a fraccionamiento subcelular en un gradiente discontinuo de sacarosa como el descrito por Muñoz y col. (1996). Mediante esta técnica obtuvimos 2 fracciones enriquecidas en membranas de RE y de Aparato de Golgi, según los marcadores utilizados y estimamos que existiría una contaminación cruzada cercana al 15% de ambas fracciones de membranas.

La localización subcelular de los transportadores fue determinada utilizando un anticuerpo policlonal inmunopurificado contra el péptido que se utilizó para producir el anticuerpo y que se encuentra contenido en el extremo carboxilo terminal de AtUTr1/AtUTr3. Observamos que la señal reconocida por el anticuerpo se encuentra preferentemente en la fracción enriquecida en RE (Figura 10) sin embargo, dado el alto nivel de identidad a nivel aminoacídico entre AtUTr1 y AtUTr3 (87%), es muy probable que el anticuerpo esté reconociendo ambos transportadores.

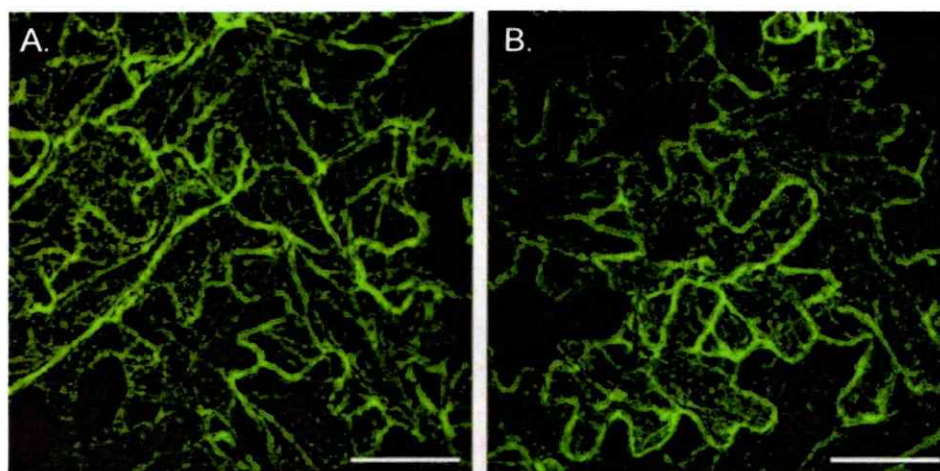


**Figura 10: Localización subcelular de los transportadores AtUTr1 y AtUTr3 mediante inmunodetección.** Plantas de *Arabidopsis* fueron homogenizadas y centrifugadas en un gradiente discontinuo de sacarosa. Se obtuvieron 2 fracciones enriquecidas en membranas que fueron caracterizadas utilizando un anticuerpo contra la proteína glicosilada reversiblemente (RGP) (A) y contra la proteína Xiloglucano fucosil Transferasa (XG FucTasa) (B), ambas marcadores de Golgi y midiendo la actividad NADH citocromo C reductasa insensible a antimicina A como marcador de RE (C). (D) AtUTr1/AtUTr3 fueron detectados en las fracciones caracterizadas anteriormente utilizando el anticuerpo diseñado contra un péptido (en negro) en el extremo C-terminal de los transportadores (E).

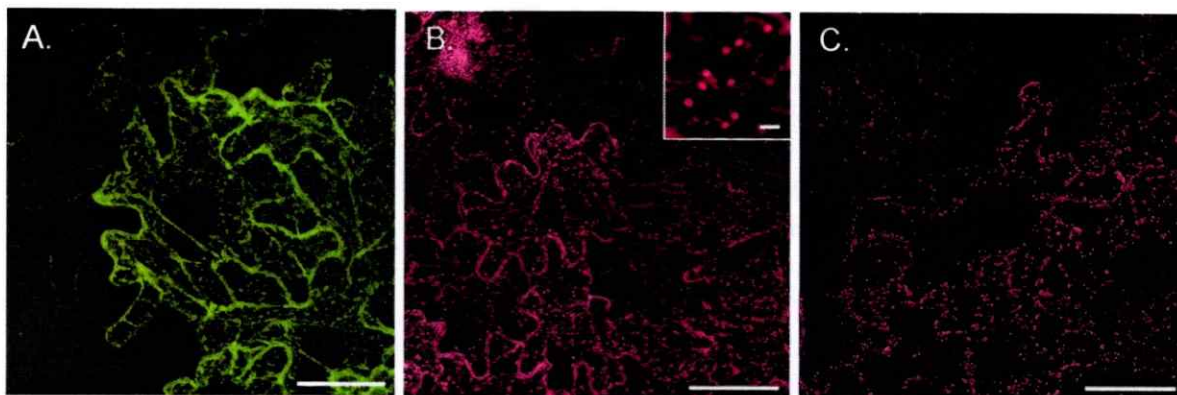


### 2.3 Localización subcelular de los transportadores AtUTr1 y AtUTr3 fusionados a proteínas fluorescentes mediante técnicas de microscopía confocal.

El patrón de distribución de los transportadores AtUTr1 y AtUTr3 en células vegetales fue determinado a través de agroinfiltración de las construcciones de AtUTr1 con la proteína fluorescente verde (GFP) AtUTr1-GFP y de AtUTr3 con la proteína fluorescente amarilla (YFP) AtUTr3-YFP, en células epiteliales de hojas de tabaco, seguido de la observación al microscopio confocal. El patrón de distribución de la fusión AtUTr1-GFP es reticulado y similar al que presenta el marcador de RE fusionado a la proteína fluorescente verde (GFP) (Figura 11). Mientras que el patrón de distribución de la proteína de fusión AtUTr3-YFP comparte características del marcador de RE como de un marcador de aparato de Golgi (figura 12).



**Figura 11: Localización subcelular de AtUTr1-GFP mediante microscopía confocal.** Hojas de tabaco fueron infiltradas con un cultivo de *Agrobacterium* transformado con el marcador de RE KDEL-GFP (A) y con AtUTr1-GFP (B) y, la distribución subcelular de ambas proteínas se analizó en las células epidermales de la hoja. La figura muestra una imagen representativa de las células transformadas que presentaban fluorescencia y corresponde a la fusión de 14 imágenes de 1  $\mu\text{m}$  cada uno obtenidas en el plano z. La barra de tamaño es de 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 12: Localización subcelular de AtUTr3-YFP mediante microscopía confocal.** Hojas de tabaco fueron infiltradas con un cultivo de *Agrobacterium* transformado con HDEL-GFP (A), AtUTr3-YFP (B) y recuadro al interior de la figura (B) y GONST-YFP (C), la distribución subcelular de todas las proteínas se analizó en las células epidermales de la hoja. La figura muestra una imagen representativa de las células transformadas que presentaban fluorescencia y corresponde a la fusión de 14 imágenes 1  $\mu\text{m}$  obtenidas en el plano z. La barra de tamaño es de 20  $\mu\text{m}$ . En el recuadro en B se muestra una magnificación de uno de los planos y la barra de tamaño corresponde a 5  $\mu\text{m}$ .

**3. Analizar si en las condiciones en las que se induce acumulación de proteínas mal plegadas en el RE se producen cambios en la expresión de AtUTr1 y AtUTr3 y determinar si estos cambios se relacionan con diferencias en el transporte de UDP-glucosa.**

Inducimos acumulación de proteínas mal plegadas en el RE de plantas de *Arabidopsis* y determinamos si estos estímulos producen cambios en la acumulación de los transcritos de AtUTr1 y AtUTr3, de las proteínas codificadas por éstos. Además, utilizando estos estímulos determinamos si éstos producen variación en los niveles de transporte de UDP-glucosa en el RE.

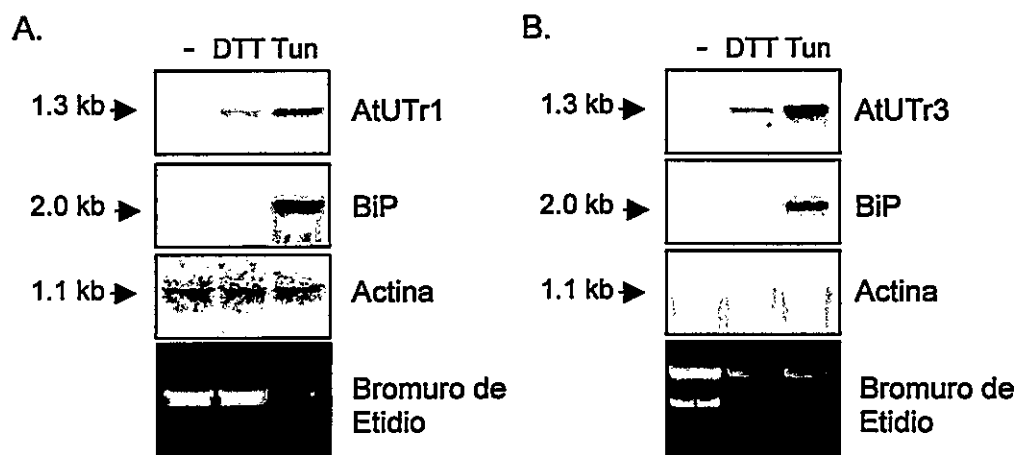
### 3.1 Análisis de la expresión y acumulación de AtUTr1/3 en plantas tratadas con estímulos que inducen acumulación de proteínas mal plegadas en el RE.

Para inducir acumulación de proteínas mal plegadas tratamos plantas de *Arabidopsis* de 6 días con ditionitrotol (DTT) 10 mM, un agente químico que reduce los puentes disulfuros presentes en las proteínas desestabilizando su estructura terciaria, y tunicamicina 5 µg/ml, un antibiótico que bloquea la primera etapa de síntesis del oligosacárido presente en glicoproteínas y por lo tanto, no permite la síntesis *de novo* de glicoproteínas. Al cabo de 5 horas de tratamiento se extrajo RNA y se realizó un fraccionamiento subcelular en un gradiente discontinuo de sacarosa.

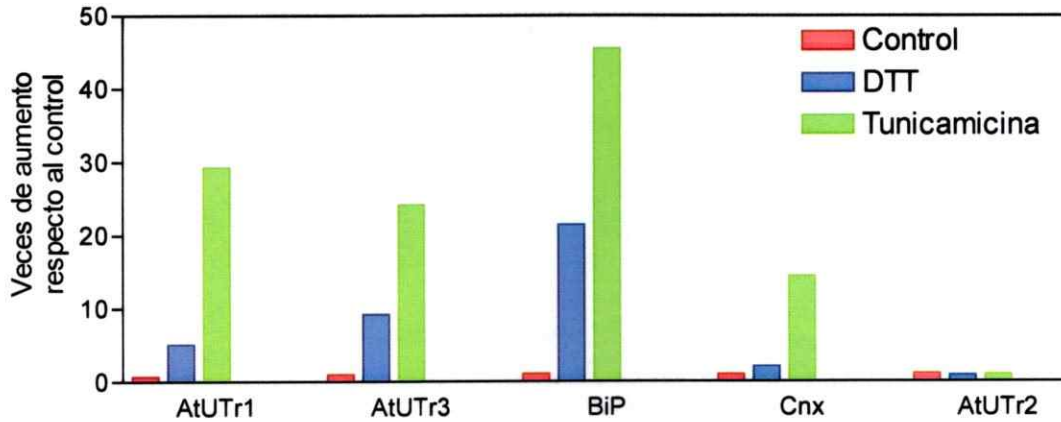
Cuando se analizaron los niveles de acumulación de los transcritos de AtUTr1 y de AtUTr3 utilizando la técnica de northern blot (Figura 13A y 13B) observamos que estímulos que inducen la acumulación de proteínas mal plegadas, producen un aumento significativo de los transcritos de AtUTr1 y AtUTr3, al igual que lo que ocurre para el transcrito de la chaperona BiP. Como control utilizamos una sonda dirigida contra actina y observamos que su expresión no cambio luego del tratamiento.

Estos resultados fueron confirmados usando la técnica de PCR en tiempo real, que arrojó como resultado un aumento, respecto al control, de alrededor de 9 veces en la acumulación de los transcritos de los transportadores al tratar las plantas con DTT y de aproximadamente 25 veces al tratar las plantas con tunicamicina (Figura 14).

Además en este experimento incluimos como control la cuantificación del transcrito de AtUTr2, un transportador que pertenece a la familia AtUTr, que transporta UDP-galactosa y que se localiza en el aparato de Golgi (Norambuena y col., 2002 y 2005), observando que ninguno de los estímulos utilizados (DTT o tunicamicina) producen cambios significativos en la acumulación de su transcrito (figura 14) y sugiriendo que la respuesta a estrés en el RE es específica para AtUTr1 y AtUTr3. Tanto los resultados obtenidos en los experimentos de northern blot como los de PCR en tiempo real, confirman que AtUTr1 y AtUTr3 forman parte de los genes que responden a acumulación de proteínas mal plegadas en el RE.

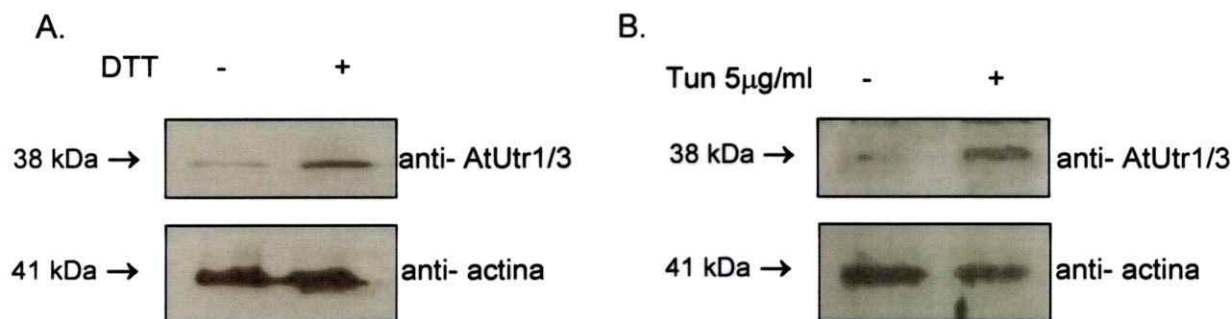


**Figura 13: Acumulación de los transcritos de AtUTr1 y AtUTr3 en plantas tratadas con DTT y tunicamicina, mediante northern blot.** Plantas de *Arabidopsis* de 6 días crecidas en medio líquido fueron tratadas durante 5 horas con DTT 10 mM (DTT) o tunicamicina 5 µg/ml (Tun), estímulos que inducen la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE. 30 µg de RNA total de las plantas con tratamiento (DTT y Tun) o sin tratamiento (-) fueron separados en un gel de formaldehído-agarosa y transferidos a una membrana de nylon. La membrana fue hibridizada con las sondas <sup>32</sup>P para el extremo 3'UTR de AtUTr1 (A), 3'UTR de AtUTr3 (B), BiP1 y actina. En el panel inferior se muestra la tinción con bromuro de etidio de los RNAs utilizados.

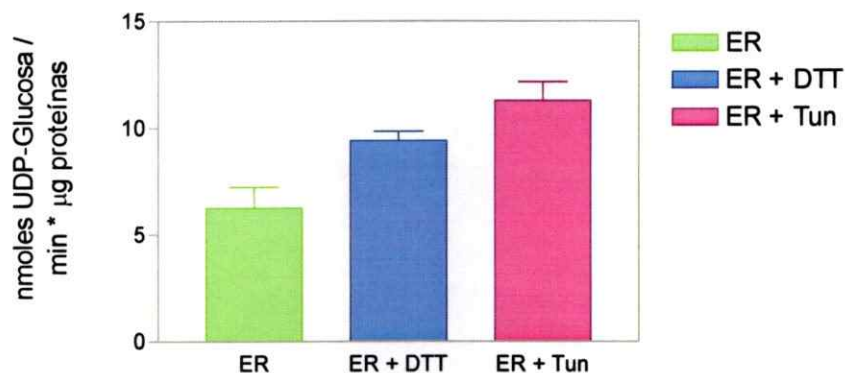


**Figura 14: Análisis de los niveles de transcrito de AtUTr1 y AtUTr3 en plantas tratadas con DTT y tunicamicina mediante PCR en tiempo real.** Plantas de *Arabidopsis* de 6 días crecidas en medio líquido fueron tratadas durante 5 horas con DTT 10 mM (DTT) o Tunicamicina 5 µg/ml (Tun). 50 ng de cDNA provenientes de las plantas con tratamiento (DTT y Tun) o sin tratamiento (Control) fueron utilizados como templado para las reacciones de PCR en tiempo real. Se obtuvieron productos de amplificación para los genes AtUTr1, AtUTr3, BiP1, Calnexina y AtUTr2. Los resultados fueron expresados como veces de aumento respecto al control y respecto al nivel de transcrito del gen de referencia.

Por otra parte cuando analizamos la acumulación de ambos transportadores en extractos proteicos de plantas tratadas con DTT utilizando el anticuerpo contra AtUTr1/AtUTr3 observamos que el aumento a nivel de transcrito se traduce, en términos de proteína, en un aumento de aproximadamente 2 veces para DTT y 3 veces para tunicamicina (determinado como la densidad de la banda reconocida por el anticuerpo), en la acumulación de AtUTr1/AtUTr3 (Figura 15). Para determinar si esta mayor acumulación estaba dando cuenta de una mayor incorporación de UDP-glucosa en el RE, aislamos fracciones enriquecidas en RE de las plantas tratadas y realizamos ensayos de incorporación, observamos que fracciones de RE provenientes de plantas tratadas tanto con DTT como con tunicamicina presentan un aumento de casi el doble en la incorporación de UDP-glucosa comparado con el control (figura 16).



**Figura 15: Acumulación de las proteínas de AtUtr1 y AtUtr3 en plantas tratadas con DTT y tunicamicina.** Plantas de *Arabidopsis* de 6 días crecidas en medio líquido fueron tratadas con DTT 10 mM ó tunicamicina 5 µg/ml durante 5 horas. 30 µg de proteínas totales de plantas que fueron incubadas en presencia (+) o ausencia (-) de DTT (A) ó tunicamicina (Tun) (B), fueron cargadas en un gel de poliacrilamida desnaturalante y transferidos a una membrana de PVDF. La banda correspondiente a AtUtr1/AtUtr3 fue detectada usando el anticuerpo contra el extremo C-terminal de los transportadores y un anticuerpo monoclonal contra actina fue utilizado para determinar la presencia de actina, que fue utilizado como control de carga.



**Figura 16: Incorporación de UDP-glucosa en membranas de RE provenientes de plantas de *Arabidopsis* tratadas con DTT y tunicamicina.** Plantas de *Arabidopsis* de 6 días crecidas en medio líquido fueron tratadas durante 5 horas con DTT 10 mM (DTT) o tunicamicina 5µg/ml (Tun). Al cabo de este tiempo fueron lavadas, homogenizadas y centrifugadas en un gradiente discontinuo de sacarosa, desde el cual se obtuvo una fracción de vesículas enriquecida en RE. 50 µg de proteínas de esta fracción fueron incubados durante 3 minutos, a 25°C, con UDP-glucosa 1 µM. Al cabo de ese tiempo la reacción se detuvo por dilución, seguida de filtración y se contó la radioactividad presente en el interior de las vesículas de RE.

### 3.2 Elementos reguladores de respuesta a estrés presentes en los promotores de los genes AtUTr1 y AtUTr3 determinan que éstos formen parte de los genes de respuesta a acumulación de proteínas mal plegadas en el RE.

El análisis de la expresión de AtUTr1 y AtUTr3, junto con la de otros genes que se co-expresen con ellos en distintas condiciones, nos permitiría predecir uno o varios procesos celulares en los que los transportadores están participando. Al realizar un análisis de coexpresión de AtUTr1 y AtUTr3 con otros 15375 genes utilizando la información disponible en la base de datos "A comprehensive system biology database CSB.DB" ([www.csbdb.mpimp-golm.mpg.de](http://www.csbdb.mpimp-golm.mpg.de)), pudimos predecir que un 67% de los genes que se coexpresan con los transportadores AtUTr1 y AtUTr3 en distintas condiciones de estrés abiótico como frío, calor, desecación, compuestos genotóxicos y estrés oxidativo entre otros, corresponden a genes involucrados en plegamiento de proteínas (figura 17A). En esta categoría encontramos genes que codifican para proteínas involucradas directamente en el plegamiento de proteínas (chaperonas) y para procesos celulares como glicosilación, degradación y tráfico celular; cuya expresión es regulada como respuesta a estrés de forma de revertir esta condición en la célula (revisado recientemente por Urade, 2007).

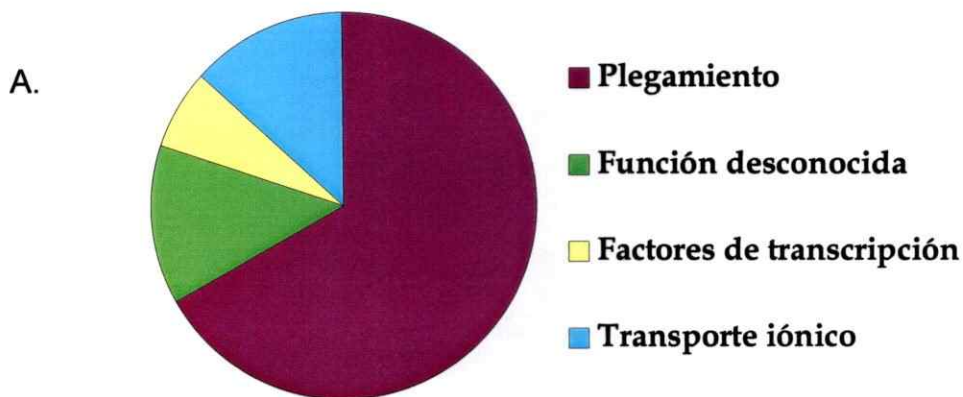
Además, sabemos que la expresión de los transportadores varía en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE (figuras 13 y 14), por lo tanto, es posible pensar que en sus promotores existen secuencias reguladoras comunes a las de otros genes que también responden a este estrés, lo que podría explicar la coexpresión con genes involucrados en plegamiento (figura 17 A).

Tres elementos de respuesta a estrés en el RE, han sido descritos en las secuencias promotoras de los llamados genes de respuesta a proteínas mal plegadas ó "Unfolded Protein Response genes (UPR genes)". Estos elementos, conocidos como UPRE (Unfolded Protein Response Element o elemento de respuesta a proteínas mal plegadas), ERSE (Endoplasmic Reticulum Stress Element o elemento de estrés en el retículo endoplasmático) y XBP1-BS (un elemento de respuesta a estrés, que responde a factores de transcripción tipo b-ZIP), han sido descritos en muchos de los genes de respuesta a estrés en el RE caracterizados en *Arabidopsis thaliana* (Martinez y Chrispeels, 2003; Kamauchi y col., 2005).

Utilizando entonces las secuencias conocidas de los elementos reguladores de respuesta a estrés en el RE, realizamos una búsqueda de éstos en las secuencias promotoras de AtUTr1 y AtUTr3 y encontramos que ambos transportadores poseen el elemento de respuesta a estrés tipo ERSE CC-N<sub>12</sub>-CCACG (figura 17B), que se localizan a 920 pares de bases río arriba del codón de inicio de la traducción de AtUTr1 y AtUTr3, que corresponde a la región promotora de los genes. Sería este elemento entonces reconocido por factores de transcripción activados en respuesta a estrés de RE (como el producido frente al tratamiento con DTT y tunicamicina) y su activación sería responsable del aumento en la acumulación de los transcritos de AtUTr1 y AtUTr3 en condiciones de estrés.

Por lo tanto, los patrones de acumulación de los mensajeros de los transportadores en condiciones que promueven la acumulación de proteínas mal plegadas, la presencia del elemento regulatorio tipo ERSE en las secuencias de ambos promotores y su coexpresión con genes que codifican para proteínas involucradas en el plegamiento de proteínas, nos permite afirmar que AtUTr1 y AtUTr3, forman parte de los genes UPR en *Arabidopsis thaliana*.





B.

Elemento de respuesta ERSE like  
 Secuencia en promotor de AtUTr1  
 Secuencia en promotor de AtUTr3

CCAGTGATTAGCTTCACG  
CCAGTGATTAGCTTCACG  
CCAATGACACAGTTACACG

**Figura 17: AtUTr1 y AtUTr3 coexpresan con genes que codifican para proteínas relacionadas con plegamiento de proteínas.** (A.) Distribución de la clasificación de los genes que coexpresan con AtUTr1 y AtUTr3, utilizando la base de datos de co-respondencia de estrés abiótico (At.CSB.DB). El gráfico muestra las categorías en las cuales los genes fueron agrupados. (B.) Elemento de respuesta a estrés "ERSE like" encontrado en las secuencias promotoras de AtUTr1 y AtUTr3. El elemento ERSE CC-N12-CACG se encuentra destacado en azul, los nucleótidos idénticos entre el elemento de respuesta ERSE y las secuencias promotoras se encuentran subrayados.

**4. Obtener y caracterizar plantas mutantes en AtUTr1 y AtUTr3, que permitan estudiar el papel *in vivo* de éstos transportadores.**

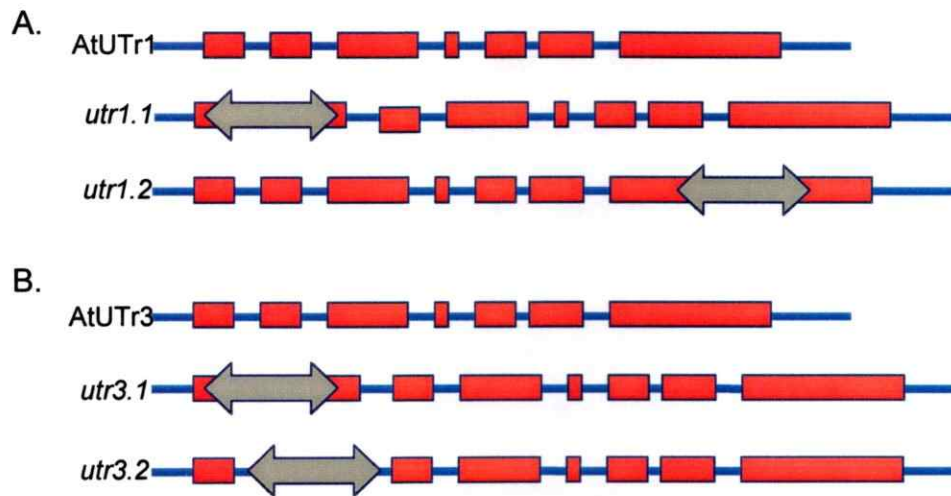
Utilizamos plantas mutantes en AtUTr1 y AtUTr3, las que fueron caracterizadas y utilizadas para generar plantas dobles mutantes en los transportadores.

#### 4.1 Búsqueda de mutantes de *Arabidopsis thaliana* para los genes AtUTr1 y AtUTr3.

Usando las bases de datos de bancos de mutantes de *Arabidopsis thaliana*, encontramos 3 líneas de plantas que poseen inserciones en los genes de AtUTr1 (GABi-Kat) y AtUTr3 (RIKEN).

Para AtUTr1, contábamos con una planta mutante en AtUTr1 llamada *utr1.1*, que fue previamente descrita por Lorena Marchant (Tesis de Doctorado, 2004) y encontramos la línea 493a10 en el banco de mutantes Gabi-Kat (Alemania), que fue denominada *utr1.2* y que presenta una inserción en el séptimo de 7 exones (figura 18 A).

En el caso de AtUTr3 se identificaron 2 líneas insercionales: 11-1551-1 y 15-0571-1 en el banco de mutantes de RIKEN (Japón), la primera denominada *utr3.1*, presenta una inserción en el primero de 7 exones y la segunda *utr3.2*, presenta una inserción en el primer intrón (figura 18B).



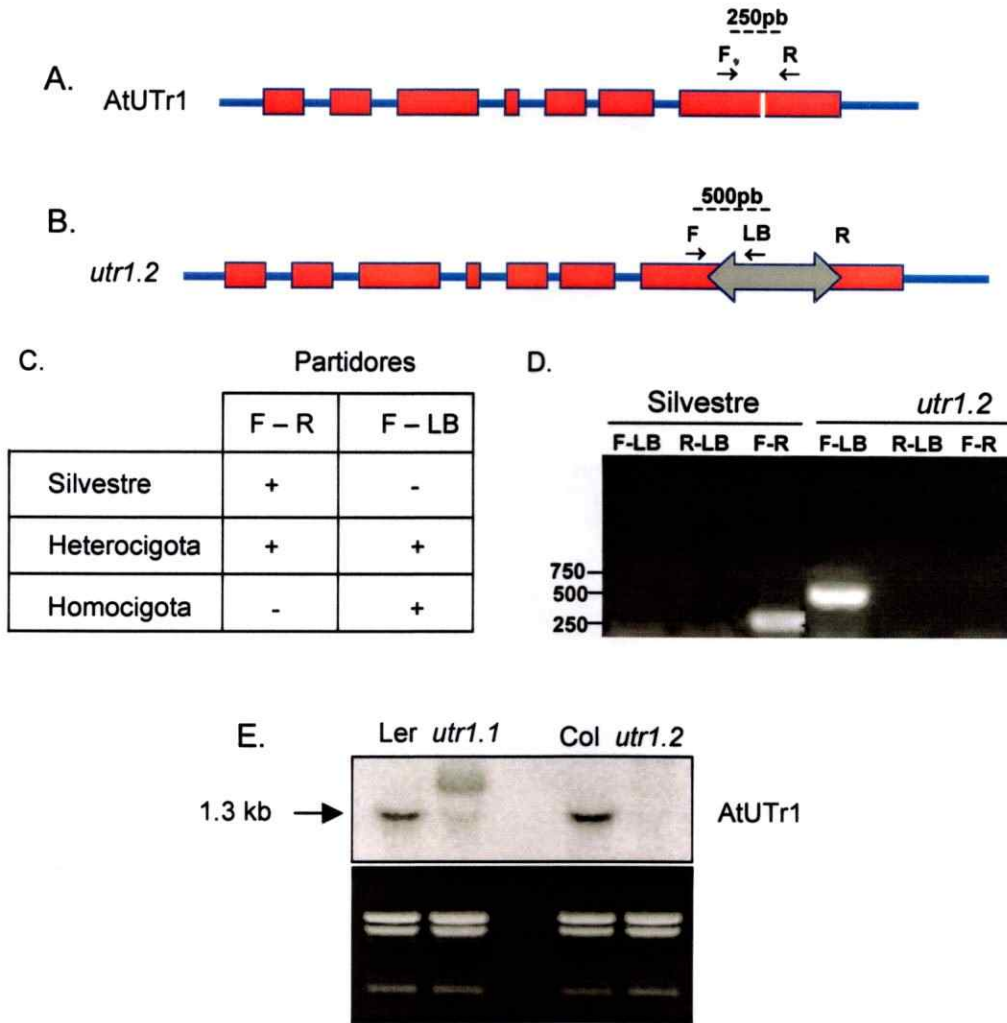
**Figura 18: Esquema de las estructuras de los genes que codifican para AtUTr1 y AtUTr3 y de sus mutantes insercionales.** La estructura de los genes AtUTr1 (A) y AtUTr3 (B) está esquematizada, de manera que las cajas rojas corresponden a los exones y en azul se muestran los intrones y las regiones no codificantes. La doble flecha gris, corresponde al elemento insercional presente en la secuencia genómica de las mutantes *utr1.1* y *utr1.2* (A) y *utr3.1* y *utr3.2* (B).

#### 4.2 Caracterización molecular de la mutante *utr1.2*.

Plantas mutantes y silvestres fueron genotipificadas por PCR (figura 19 A y B) con el fin de determinar si se trataba de plantas heterocigotas u homocigotas para la inserción. El análisis por PCR indicó que la línea *utr1.2* es homocigota para la inserción en AtUTr1 (figura 19D). Además, utilizando una sonda específica del extremo 3' no traducido (3'UTR) de AtUTr1, confirmamos que tanto en la mutante *utr1.1*, como en la mutante *utr1.2* hay ausencia del transcrito que codifica para AtUTr1 (figura 19E).

#### 4.3 Caracterización molecular de las mutantes en AtUTr3: *utr3.1* y *utr3.2*.

Plantas de las líneas mutantes *utr3.1* y *utr3.2* y silvestres de ecotipo Nössen, fueron genotipificadas por PCR, con el fin de determinar si se trataba de plantas mutantes hetero u homocigotas (figura 20 A y B). Este análisis nos indicó que ambas líneas mutantes *utr3.1* y *utr3.2* son homocigotas para la inserción en AtUTr3 (figura 20D). Además, utilizando una sonda específica del extremo 3' no traducido (3'UTR) de AtUTr3, confirmamos que ambas mutantes no presentan el transcrito de AtUTr3 (figura 20E).



**Figura 19: Caracterización molecular de la mutante insercional *utr1.2*.**

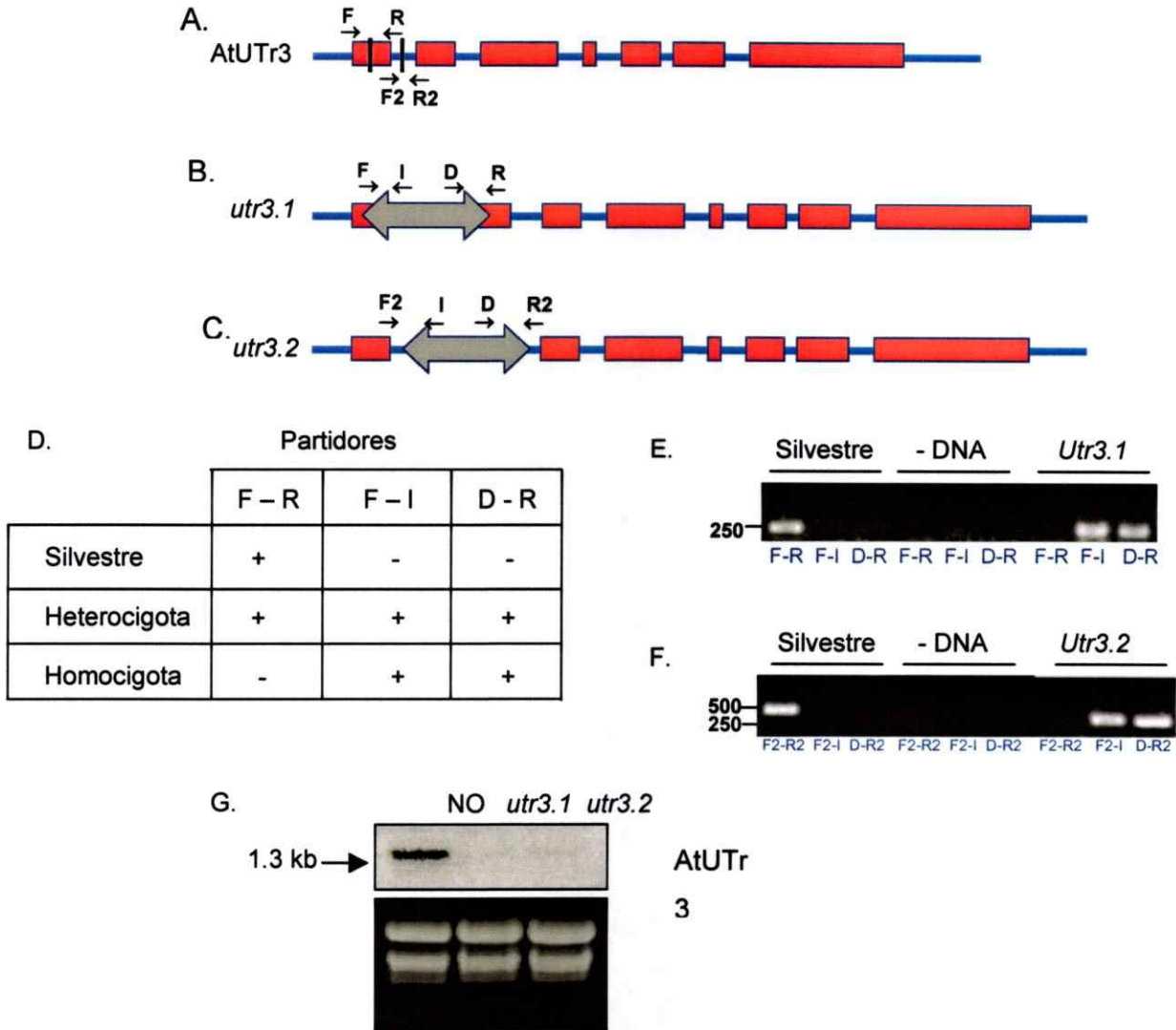
**A:** Secuencia genómica del gen *AtUTr1*. Las cajas rojas representan los exones y la línea azul los intrones. La línea blanca representa el sitio de la inserción del elemento DS en el séptimo exón. F y R corresponden a los partidores que flanquean la inserción y que permiten amplificar en el alelo silvestre una banda de 250 pares de base (250pb).

**B:** Esquema del gen *AtUTr1* con el elemento insercional (doble flecha gris) presente en el séptimo exón, LB representa la secuencia de un partidor diseñado en el borde externo del elemento insercional.

**C:** Tabla resumen de los productos de PCR esperados utilizando los partidores F, R y LB, donde + representa la presencia de un producto de amplificación y - su ausencia.

**D:** Gel de agarosa al 2% donde se observan los productos de PCR obtenidos a partir de DNA genómico de una planta silvestre (ecotipo Columbia (Col)) y de la mutante (*utr1.2*) utilizando los partidores indicados. Los tamaños de amplificación mostrados corresponden a la migración del estándar de DNA 1kb.

**E:** Northern blot a partir de RNA total de las distintas plantas silvestres (Ler y Col) y de las mutantes (*utr1.1* y *utr1.2*) utilizando la sonda del 3'UTR específica para el gen *AtUTr1*. El panel inferior muestra el gel de RNA teñido con bromuro de etidio.



**Figura 20. Caracterización molecular de las mutantes insercionales *utr3.1* y *utr3.2*.**

**A:** Secuencia genómica del gen *AtUTr3*. Las cajas rojas representan los exones y la línea azul los intrones. Las líneas negras representan los sitios de la inserción en el primer y segundo exón para cada mutante. F y F2 corresponden a los partidores "forward" y R y R2 a los partidores "reverse" para amplificar el alelo silvestre.

**B y C:** Esquema del gen *AtUTr3* con el elemento DS (doble flecha gris) inserto en el primer exón y primer intrón respectivamente, I y D representan la secuencia de los partidores diseñados en cada uno de los bordes del elemento insercional.

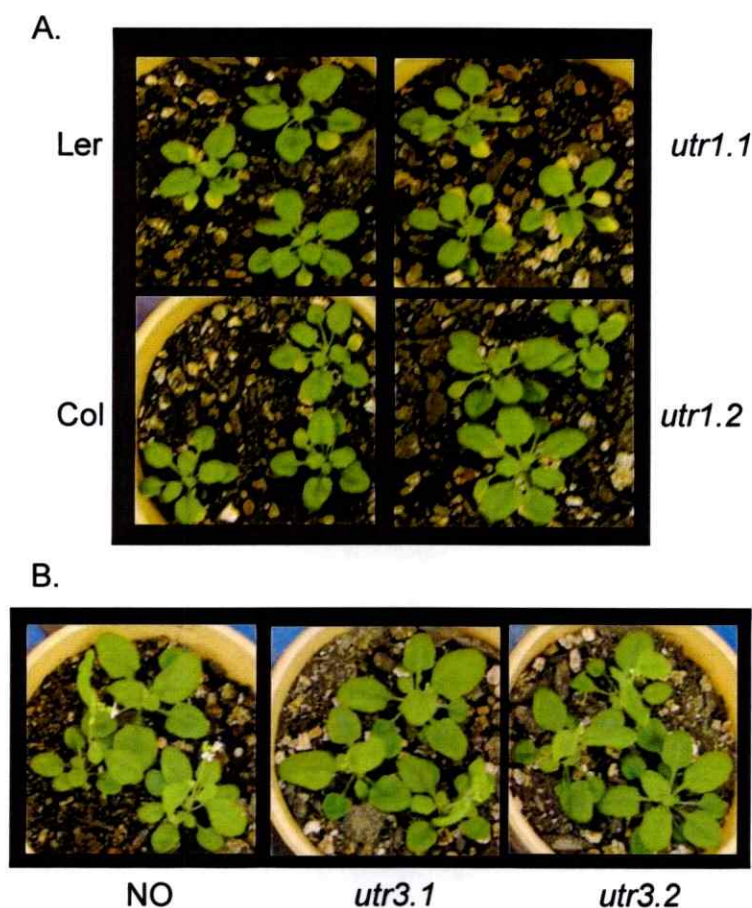
**D:** Tabla resumen de los productos de PCR esperados utilizando los partidores F (o F2), R (o R2), D e I donde + representa la presencia de un producto de amplificación y - su ausencia.

**E y F:** Gel de agarosa al 2% donde se observan los productos de PCR obtenidos a partir de DNA genómico de una planta silvestre (NO) y las mutantes *utr3.1* y *utr3.2*, utilizando los partidores indicados. Los tamaños de amplificación mostrados corresponden a la migración del estándar de DNA 1kb.

**G:** Northern blot a partir de RNA total de una planta silvestre (NO) y de las mutantes (*utr3.1* y *utr3.2*) utilizando la sonda del 3'UTR específica para el gen *AtUTr3*. El panel inferior muestra el gel de RNA teñido con bromuro de etidio.

#### 4.4 Análisis de fenotipo de las mutantes *utr1.1*, *utr1.2*, *utr3.1* y *utr3.2*.

Para todas las plantas homocigotas mutantes se realizaron análisis fenotípicos con el fin de detectar diferencias morfológicas entre éstas y las plantas silvestres. Sin embargo, bajo nuestras condiciones de crecimiento, no detectamos ningún tipo de diferencias significativas entre ellas en los tejidos vegetativos aéreos, en tejido reproductivo o en raíces (figura 21).



**Figura 21: Análisis fenotípico de las plantas mutantes en AtUTr1 y AtUTr3. Apariencia general del tejido vegetativo aéreo, luego de 3 semanas creciendo en tierra, de plantas homocigotas mutantes en AtUTr1 (A), AtUTr3 (B) y de plantas silvestres del mismo ecotipo.**

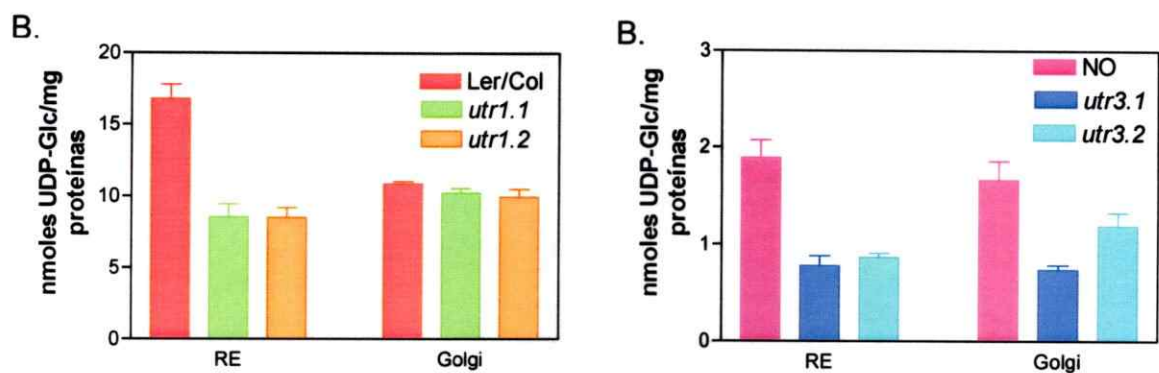
#### 4.5 Incorporación de UDP-glucosa en fracciones de RE provenientes de las mutantes *utr1.1*, *utr1.2*, *utr3.1* y *utr3.2*

Para determinar si la ausencia de los transportadores tiene algún efecto en la incorporación de UDP-glucosa hacia el lumen del RE, obtuvimos fracciones enriquecidas en RE de las plantas silvestres y de las mutantes en AtUTr1 y AtUTr3. En el caso de las mutantes *utr1.1* y *utr1.2* observamos que la incorporación de UDP-glucosa en vesículas de RE disminuyó aproximadamente en un 50% comparada con lo que ocurre en el RE de plantas silvestres. No observamos diferencias significativas en la incorporación de UDP-glucosa en la fracción correspondiente a vesículas de Golgi al comparar las mutantes con las plantas silvestres (Figura 22A). Para las mutantes *utr3.1* y *utr3.2* observamos que, al igual que lo que ocurre con las mutante en AtUTr1, la incorporación de UDP-glucosa en el RE disminuye a la mitad e interesantemente, también disminuye la incorporación de UDP-glucosa en las vesículas de Golgi (Figura 22B), confirmando los resultados de localización subcelular doble que presenta AtUTr3.

Cabe destacar que las diferencias observadas en términos de nmoles de UDP-glucosa incorporados/min\*mg proteínas entre el set de plantas utilizadas para la caracterización de las mutantes AtUTr1 y AtUTr3 se debe a los diferentes ecotipos o "background" genéticos que presentan las plantas. Plantas silvestres de ecotipo Columbia (Col) o Landsberg (Ler) presentan valores similares de transporte de UDP-glucosa en el RE, promediando los 17 nmoles de UDP-glucosa/min\*mg proteínas, mientras que en el caso de las plantas de ecotipo Nössen (NO) esta actividad alcanza valores cercanos a 2 nmoles de UDP-glucosa/min\*mg proteínas (figura 22 A y B). Este mismo tipo de diferencias son observadas en el caso de las vesículas de Golgi, lo que da cuenta de un efecto del ecotipo en el transporte de UDP-glucosa hacia los organelos membranosos de éstas células.

Aún teniendo en cuenta las diferencias en los valores de actividad observados, los resultados presentados sugieren fuertemente que la incorporación de UDP-glucosa en el RE está mediada por AtUTr1 y AtUTr3.



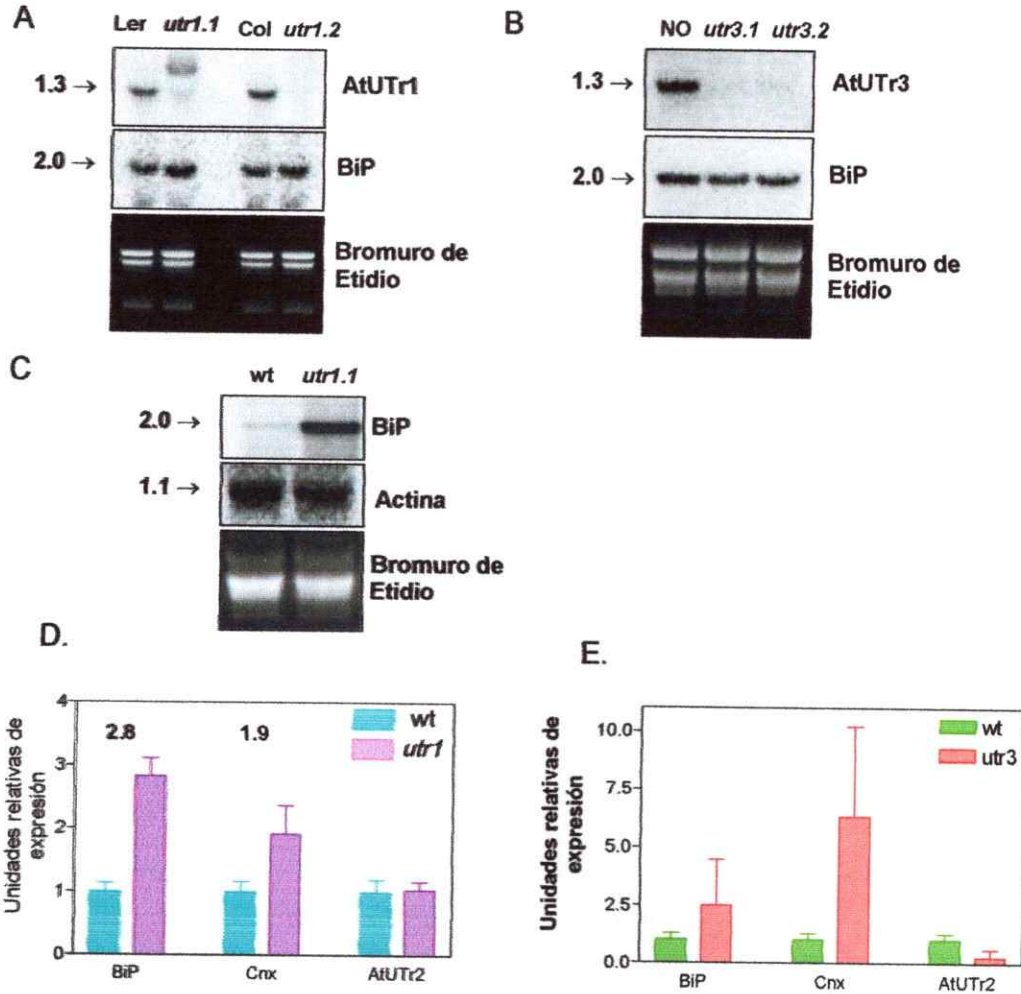


**Figura 22: Incorporación de UDP-glucosa en vesículas de retículo endoplasmático (RE) y de aparato de Golgi (Golgi) provenientes de plantas silvestres y mutantes en los transportadores.** Plantas de *Arabidopsis* silvestres (Ler, Col y NO) y las distintas mutantes, fueron homogenizadas y los organelos separados en un gradiente discontinuo de sacarosa. Se obtuvo una fracción enriquecida en vesículas de retículo endoplasmático (RE) y una enriquecida en aparato de Golgi (Golgi). 50  $\mu$ g de proteínas de cada fracción fueron incubados durante 3 minutos, a 25°C, con [ $^{14}$ C]-UDP-glucosa 1  $\mu$ M y al cabo de ese tiempo se detuvo la reacción por dilución seguida de filtración y se contó la radioactividad asociada a las vesículas. Los experimentos fueron realizados por triplicado y el experimento mostrado es el promedio de 3 experimentos independientes.

#### 4.6 Expresión de genes marcadores de UPR en las mutantes de AtUTr1 y AtUTr3.

Si efectivamente los transportadores suministran el sustrato para la reglucosilación de proteínas mal plegadas en el RE, en ausencia de ellos disminuiría el sustrato para reglucosilar proteínas mal plegadas, las que se acumularían en el RE. Esto traería como consecuencia la activación de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y por lo tanto, la inducción de la expresión de los genes UPR. De esta forma, procedimos a extraer RNA desde plantas silvestres y mutantes y evaluamos la expresión del gen de la chaperona BiP, que es un marcador de UPR.

El análisis de la expresión de BiP, utilizando la técnica de northern blot, en el RNA obtenido desde plantas mutantes *utr1.1* y *utr1.2*, muestra un aumento en la acumulación del mRNA del marcador BiP en condiciones estándar de crecimiento de las plantas (Figura 23A). Como una forma de evidenciar de mejor manera el resultado obtenido y dado que AtUTr1 se expresa mayormente en tejido floral, aislamos RNA desde flores y analizamos la expresión del marcador BiP usando northern blot y PCR en tiempo real. En este caso, la técnica de northern blot nos muestra un claro aumento en la acumulación del mensajero de BiP (figura 23C), el que fue confirmado utilizando la técnica de PCR en tiempo real, donde se determinó que en la mutante de AtUTr1 existe un aumento significativo en la expresión de BiP (2,8 veces) y de la chaperona Calnexina (1,4 veces), respecto de las plantas silvestres (Figura 23D). Estos resultados sugieren fuertemente que en ausencia de AtUTr1 el sistema de UPR se encuentra constitutivamente activo. En el caso de las mutantes en AtUTr3, experimentos de northern blot no son concluyentes respecto de diferencias significativas en la acumulación del transcrito de BiP (figura 23B), sin embargo experimentos preliminares de cuantificación de los transcritos de los genes UPR mediante la técnica de PCR en tiempo real (A. Moreno, tesista de pregrado de Bioquímica) sugieren que al igual que lo ocurrido con las mutantes de AtUTr1, las mutantes de AtUTr3 poseen una activación constitutiva del mecanismo UPR.



**Figura 23. Expresión de marcadores de UPR en las mutantes de AtUTR1 y AtUTR3.**

RNA proveniente de plantas silvestres (wt): Ler, Col ó N, crecidas en tierra durante 4 semanas fue utilizado para experimentos de northern blot o como templado para reacciones de transcripción inversa y experimentos de PCR en tiempo real.

A. Northern blot utilizando 30 µg de RNA total de plantas silvestres y mutantes en AtUTR1. Se utilizó una sonda específica para AtUTR1 y una sonda contra el mensajero de BiP; en el panel inferior se muestra la tinción del RNA utilizando bromuro de etidio.

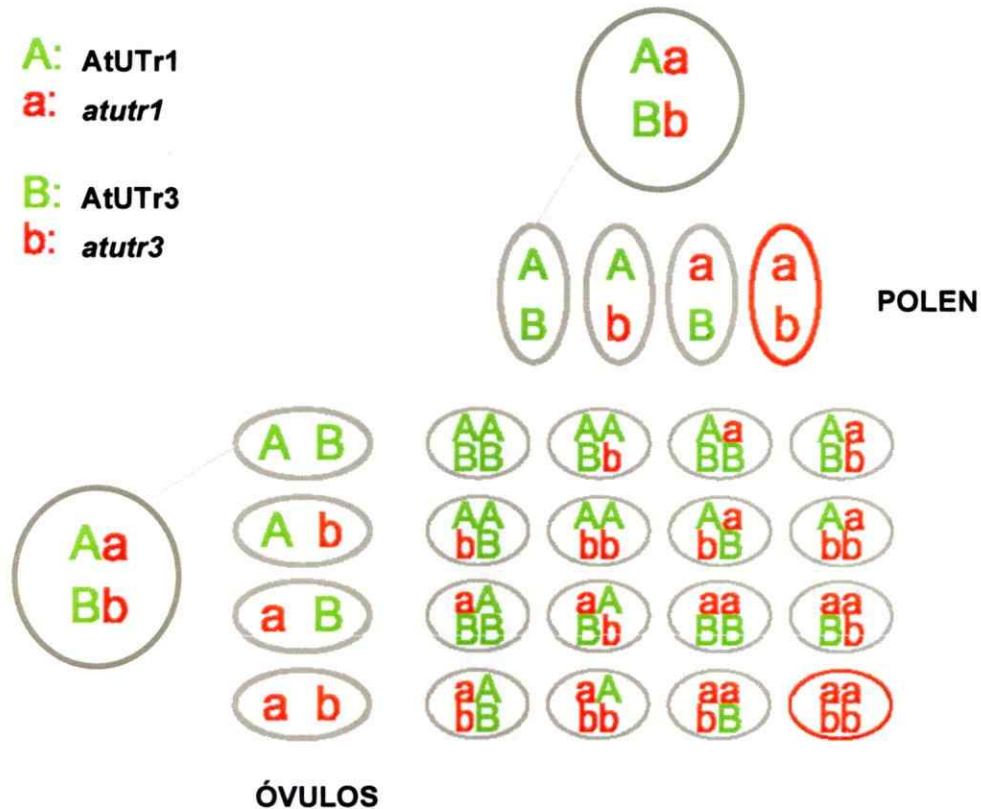
B. Northern blot utilizando 30 µg de RNA total de plantas silvestres y mutantes en AtUTR3. Se utilizó una sonda específica para AtUTR3 y una sonda para BiP; en el panel inferior se muestra a tinción del RNA utilizando bromuro de etidio.

C: Northern blot para la mutante de AtUTR1. 30 µg de RNA de flores fue hibridado con una sonda específica contra el marcador de UPR, BiP y como control de carga se utilizó la expresión del mensajero de actina.

D y E: Cuantificación de los transcritos de BiP, Calnexina y AtUTR2 en las mutantes de AtUTR1 (*utr1*) y AtUTR3 respectivamente (*utr3*). 50 ng de cDNA de flores fue utilizado como templado para las reacciones de PCR en tiempo real utilizando partidores para BiP, Calnexina, AtUTR2 y Actina o clatrina, que fueron utilizados como genes normalizadores.

#### 4.7 Generación de plantas dobles mutantes en AtUTr1 y AtUTr3

Teniendo en cuenta que tanto AtUTr1 como AtUTr3 son capaces de transportar UDP-glucosa hacia el RE y que, aún en ausencia de uno de ellos las plantas son capaces de crecer con aparente normalidad, decidimos investigar el efecto *in planta* de la ausencia de ambos transportadores. Para ello, cruzamos plantas homocigotas *utr1.1* con plantas homocigotas *utr3.1*, con el fin de generar plantas dobles mutantes heterocigotas (F1). Producto de la autofecundación de éstas plantas, se obtuvo una descendencia de semillas (F2), que fue genotipificada por PCR y donde esperábamos que 1/16 de la descendencia fuese doble homocigota mutante, ya que esperamos una segregación mendeliana de dos alelos (figura 24).



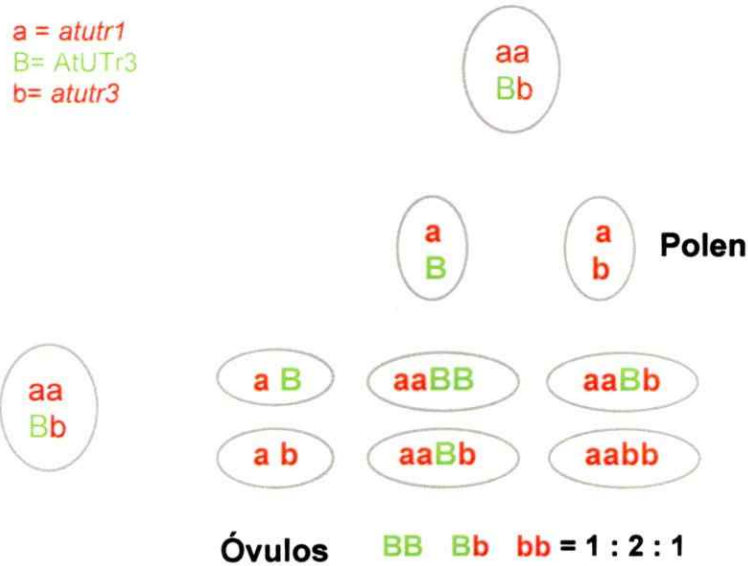
**Figura 24: Segregación esperada para la descendencia de plantas dobles mutantes heterocigotas.** Producto de la gametogénesis de la doble mutante heterocigota (*AtUTr1/atutr1 AtUTr3/atutr3*), se obtendrán las siguientes combinaciones de gametos femeninos (óvulos) y masculinos (polen) AB, Ab, aB y ab, donde A y B corresponden a los alelos silvestres de AtUTr1 y AtUTr3, mientras que a y b corresponden a los respectivos alelos mutantes. Luego de la autofecundación de éstas plantas se espera obtener una descendencia que presente los distintos genotipos esquematizados y que 1/16 de la descendencia presente en genotipo doble mutante homocigoto.

En un primer análisis y luego de genotipificar una población de 214 plantas pertenecientes a la generación F<sub>2</sub>, no encontramos dobles mutantes homocigotas en los transportadores (de 13 plantas esperadas), a la vez que encontramos todos los otros genotipos posibles esperados (figura 24). Dentro de ellas, encontramos plantas que presentan un genotipo heterocigoto en uno de los transportadores y homocigoto mutante en el otro, ya sea AtUTr1 o AtUTr3. Sugiriendo que una copia silvestre de los transportadores es necesaria y suficiente para permitir el desarrollo vegetativo de las plantas. Para facilitar los análisis de segregación, analizamos la progenie (F<sub>3</sub>) de plantas *atutr1/atutr1* AtUTr3/*atutr3* ó AtUTr1/*atutr1* *atutr3/atutr3*, dónde sólo uno de los alelos está segregando (figura 25). En este caso entonces, la segregación tendrá razones de 1:2:1, con respecto al alelo segregante, para los genotipos esperados silvestre:heterocigoto:mutante (figura 25A). Como lo muestra la tabla de segregación de la figura 25B, no encontramos plantas que presentaran el genotipo doble mutante en la descendencia de ambas mutantes. Además, encontramos claras alteraciones en la razón de segregación, encontrando valores de 1:0,32 y 1:0,2 para los genotipos silvestre y heterocigoto del gen segregante.

Distintas condiciones producen razones distorsionadas de segregación, como las ejemplificadas en la figura 26, sin embargo y dado que la segregación observada es de 1:<1, es posible predecir que se trata de una mutación gametofítica que no permite que la doble mutación se transmita a través de uno de los gametos y que afecta parcialmente la transmisión a través del otro (Howden y col, 1998) (Figura 26D).

Una forma de determinar a través de cual(es) gameto(s) se está transmitiendo la mutación, es realizar cruces recíprocos. Esto implica tomar polen de plantas mutantes y cruzarlo, manualmente, con óvulos de plantas silvestres y viceversa; para luego analizar, en la progenie de ambos cruces, la aparición del alelo mutante.

A.



B.

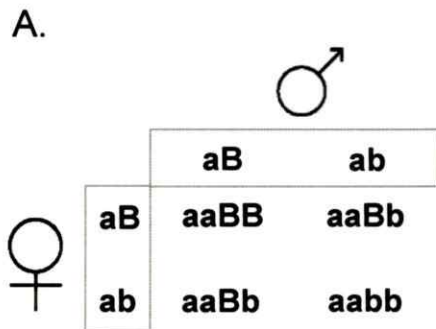
Genotipo para AtUTr1

Genotipo planta mutante	Silvestre (+/+)	Heterocigoto (+/-)	Homocigoto (-/-)	razón
$AtUTr1/atutr1$ $atutr3/atutr3$	68	22	0	1:0,32

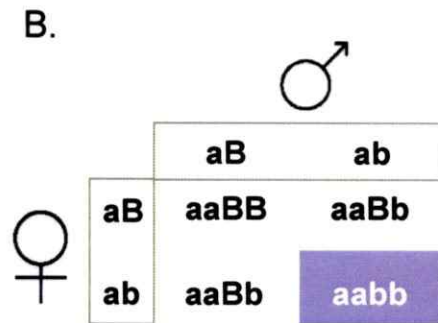
Genotipo para AtUTr3

Genotipo planta mutante	Silvestre (+/+)	Heterocigoto (+/-)	Homocigoto (-/-)	razón
$atutr1/atutr1$ $AtUTr3/atutr3$	73	15	0	1:0,2

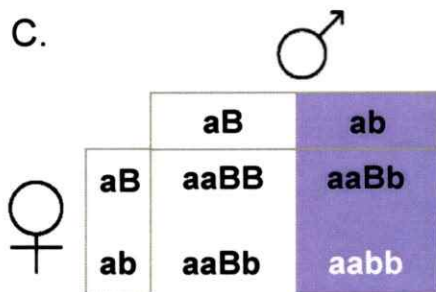
**Figura 25: Análisis de segregación para la descendencia de plantas mutantes homocigotas en uno de los transportadores y heterocigota en el otro.** A. Genotipos de los gametos femeninos (óvulos), masculinos (polen) y de la descendencia (F3) de la planta homocigota mutante para AtUTr1, heterocigota en AtUTr3. Dónde *atutr1* corresponde al genotipo mutante de AtUTr1 y AtUTr3 y *atutr3* a los genotipos silvestre y mutante, respectivamente. La razón mostrada corresponde a la razón esperada para los genotipos que se indican. B. Tabla resumen del análisis de genotipificación de la población F3 de las plantas homocigotas mutantes en uno de los transportadores y heterocigota en el otro.



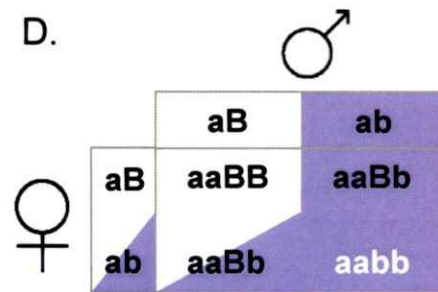
Segregación normal 1:2:1



Mutación letal embrionaria  
segregación 2:1



Mutación gametofítica (un gameto) segregación 1:1



Mutación gametofítica (ambos gametos) segregación <1:1

Figura 26: Segregación de una mutación en la descendencia de individuos homocigotos para una mutación y heterocigotos para una segunda mutación. Segregación de los alelos B (silvestre) y b (mutante), en individuos que poseen una segunda mutación homocigota mutante. Se muestran las posibles mutaciones, dónde los genotipos en morado son genotipos letales. A. Todos los gametos son viables y se produce una segregación mendeliana normal, 1:2:1. B. Todos los gametos son viables, sin embargo, el embrión homocigoto mutante no es viable. Se habla de una mutación letal embrionaria, que presenta una segregación 2:1. C. La mutación es letal para uno de los gametos, en el ejemplo, para el polen, que se denomina gametofítica masculina. Produce una segregación 1:1. D. La mutación es letal para uno de los gametos (en el ejemplo, para el polen) y parcialmente letal para el otro. Se denomina mutación gametofítica general y su segregación es <1:1. Si la mutación es letal para ambos gametos, sólo se obtendrán individuos homocigotos silvestres.

#### 4.8 Análisis de la transmisión de las mutaciones a través de los gametos.

Para cuantificar la capacidad de los gametos masculinos mutantes de transmitir la mutación, realizamos un análisis de la eficiencia de transmisión (ET), a través de cruces manuales con gametos femeninos silvestres (figura 27A). Utilizamos polen de plantas de genotipo *AtUTr1/atutr1 atutr3/atutr3*, donde el genotipo del polen es: *AtUTr1/atutr3* ó *atutr1/atutr3*, para fecundar óvulos silvestres. Una vez obtenidas las semillas de estos cruces (F1), 92 plantas de su descendencia fueron genotificada por PCR, obteniendo una ET de 0% para el alelo mutante *atutr1*. El mismo resultado (ET 0%) fue obtenido cuando se utilizó polen de plantas de genotipo *atutr1/atutr1 AtUTr3/atutr3*, donde el genotipo de polen es: *atutr1 AtUTr3* ó *atutr1 atutr3* y se analizó el genotipo de 90 plantas (Figura 27B). Estos análisis genéticos muestran que la doble mutación no puede ser transmitida a través del gameto masculino, por lo que es posible especular que el desarrollo del polen o su función se ve afectado en aquellos granos de polen que portan copias mutadas de ambos transportadores. Además sugieren que el gameto que se ve parcialmente afectado por la doble mutación es el gameto femenino.

La eficiencia de transmisión a través del gameto femenino, fue determinada a través del cruce en que se utilizó polen proveniente de plantas silvestres para fecundar óvulos mutantes, que portan sólo una copia funcional de los transportadores (Figura 28).

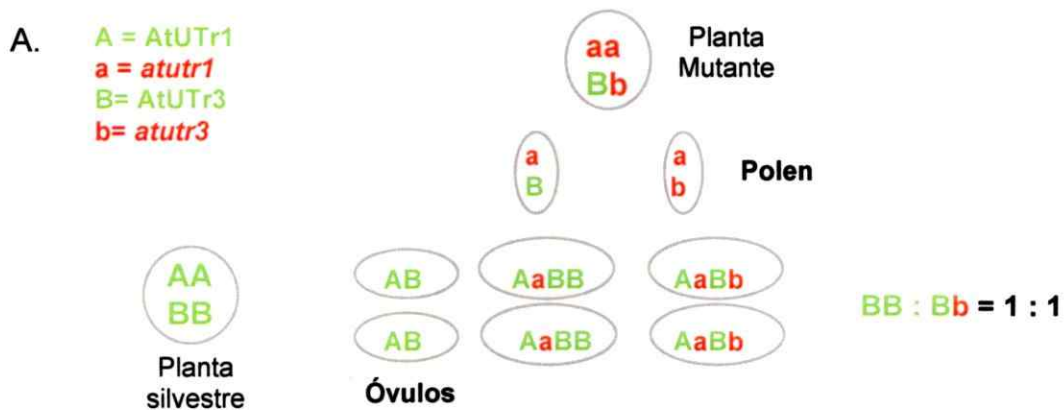
Cuando analizamos la segregación en la descendencia de un cruce realizado utilizando óvulos de plantas mutantes y granos de polen silvestre, donde el genotipo de los óvulos es *atutr1/atutr3* o *AtUTr1/atutr3* ó (*atutr1/atutr3* o *atutr1/AtUTr3*) y el de los granos de polen silvestre (*AtUTr1/AtUTr3*) (figura 28A), encontramos que la segregación de la mutación sólo se transmite en un 17,8%, es decir en 23 de 129 plantas analizadas (figura 28B). Esto implica que de un total de 50% de gametos que portan ambas mutaciones, sólo un 20% llega a ser fecundado.



La pregunta entonces, es ¿qué ocurre con el resto de los gametos femeninos dobles mutantes? El carpelo de *Arabidopsis thaliana* contiene un gran número de óvulos (alrededor de 50 dependiendo del ecotipo), dentro de los cuales se desarrolla, de manera sincrónica el gametofito femenino (Christensen y col., 1997). Estos óvulos son aptos de ser fecundados y por lo tanto, el número de semillas obtenidos a partir de cada uno de estos frutos, dará cuenta del número inicial de óvulos presentes. Entonces, una mutación gametofítica femenina que se transmite parcialmente, producirá una reducción significativa en el número de semillas obtenidas por fruto.

Lo que hicimos entonces, fue cuantificar el número de semillas por fruto utilizando 3 plantas mutantes (que poseen una copia funcional de AtUTr1 ó de AtUTr3) y las comparamos con el número de semillas por fruto obtenidas para una planta silvestre, que posee el mismo ecotipo que las plantas parentales que originaron la doble mutante. Para las plantas mutantes 1, 2 y 3, contamos las semillas de 18, 11 y 13 frutos respectivamente y para la planta silvestre contamos las semillas provenientes de 8 frutos. Encontramos una disminución significativa en el número de semillas comparado con el número de semillas encontradas en la planta silvestre (figura 29). Este resultado sumado a la disminución en la eficiencia de transmisión de la mutación a través del gameto femenino, apoya fuertemente la hipótesis de que la doble mutación puede ser sólo parcialmente transmitida a través de este gameto y sugiere que sería la doble mutación lo que causa la muerte o el arresto en el desarrollo de algunos óvulos.

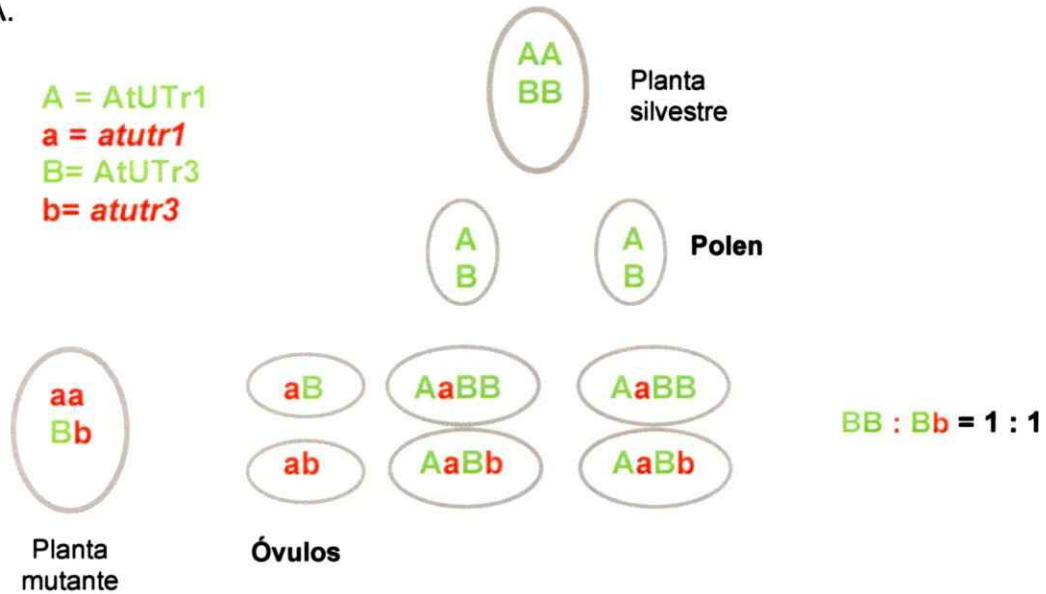
Quisimos entonces, determinar cual es el efecto de la ausencia de los transportadores en la gametogénesis masculina y femenina, realizando análisis morfológicos de ambos gametos.



Genotipo planta mutante	Genotipo del polen	Genotipo óvulos	Plantas analizadas	%TE de transmisión alelo mutante
<i>AtUTr1/atutr1</i> <i>atutr3/atutr3</i>	<i>atutr1 atutr3</i>	<i>AtUTr1</i> <i>AtUTr3</i>	92	0 (0/92)
<i>atutr1/atutr1</i> <i>AtUTr3/atutr3</i>	<i>atutr1atutr3</i>	<i>AtUTr1</i> <i>AtUTr3</i>	90	0 (0/90)

**Figura 27. Análisis de transmisión de los alelos mutantes *atutr1atutr3* a través del polen.** A. Esquema de los cruces realizados y de los genotipos esperados, al utilizar polen de plantas que poseen una sola copia funcional de los transportadores. En la figura se esquematiza la segregación esperada para el cruce de la planta mutante *atutr1/atutr1 AtUTr3/atutr3* con óvulos provenientes de una planta silvestre. B. Tabla resumen de la genotipificación de la población F1 de plantas provenientes del cruce realizado para la transmisión del alelo mutante.

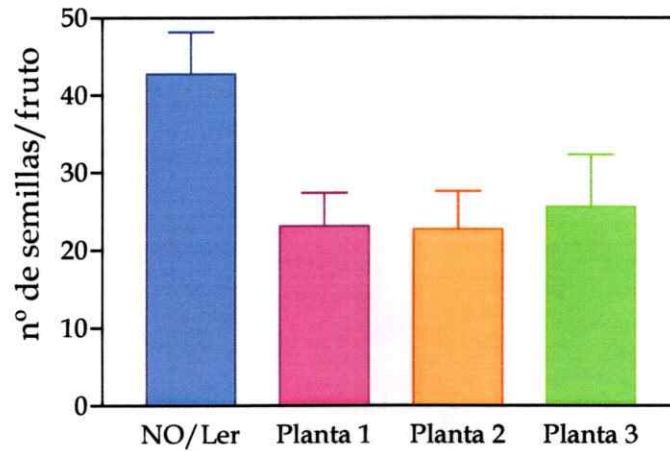
A.



B.

Genotipo planta mutante	Genotipo de los óvulos	Genotipo polen	Plantas analizadas	%TE de transmisión alelo mutante
<i>AtUTr1/atutr1</i> <i>atutr3/atutr3</i>	<i>Atutr1/atutr3</i> <i>atutr1/atutr3</i>	<i>AtUTr1</i> <i>AtUTr3</i>	129	17,8
<i>Atutr1/atutr1</i> <i>AtUTr3/atutr3</i>	<i>atutr1atutr3</i> <i>atutr1/AtUTr3</i>			

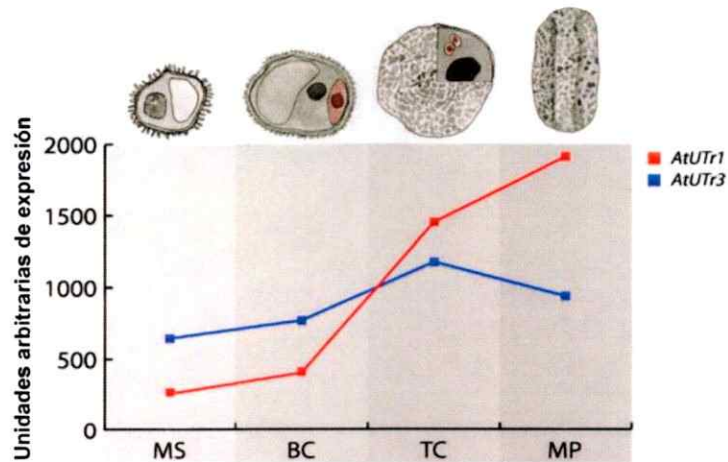
**Figura 28. Análisis de transmisión de los alelos mutantes *atutr1atutr3* a través de los óvulos.** A. Esquema de los cruces realizados y de los genotipos esperados, al utilizar óvulos que poseen una sola copia funcional de los transportadores. En la figura se esquematiza la segregación esperada para el cruce de polen proveniente de una planta silvestre con óvulos de plantas mutantes *atutr1/atutr1 AtUTr3/atutr3* y *AtUTr1/atutr1 atutr3/atutr3*. B. Tabla resumen de la genotipificación de la población F1 de plantas provenientes del cruce realizado para la transmisión del alelo mutante por el gameto femenino.



**Figura 29.** Comparación del número de semillas en frutos de plantas mutantes que poseen solo una copia funcional de los transportadores con el número de semillas obtenidas en frutos de plantas silvestres. Frutos de plantas mutantes y silvestres fueron recolectados en forma individual y se contaron las semillas presentes en cada uno de ellos. En el caso de las plantas mutantes, se utilizaron 3 plantas que poseían 18, 11 y 13 frutos, respectivamente. En el caso de las plantas silvestres se contaron las semillas presentes en 9 frutos. Los resultados de la cuantificación, fueron graficados como el promedio de semillas +/- el respectivo error estándar.

#### 4.9 AtUTr1 y AtUTr3 en el desarrollo del polen y efecto de su ausencia en la gametogénesis masculina.

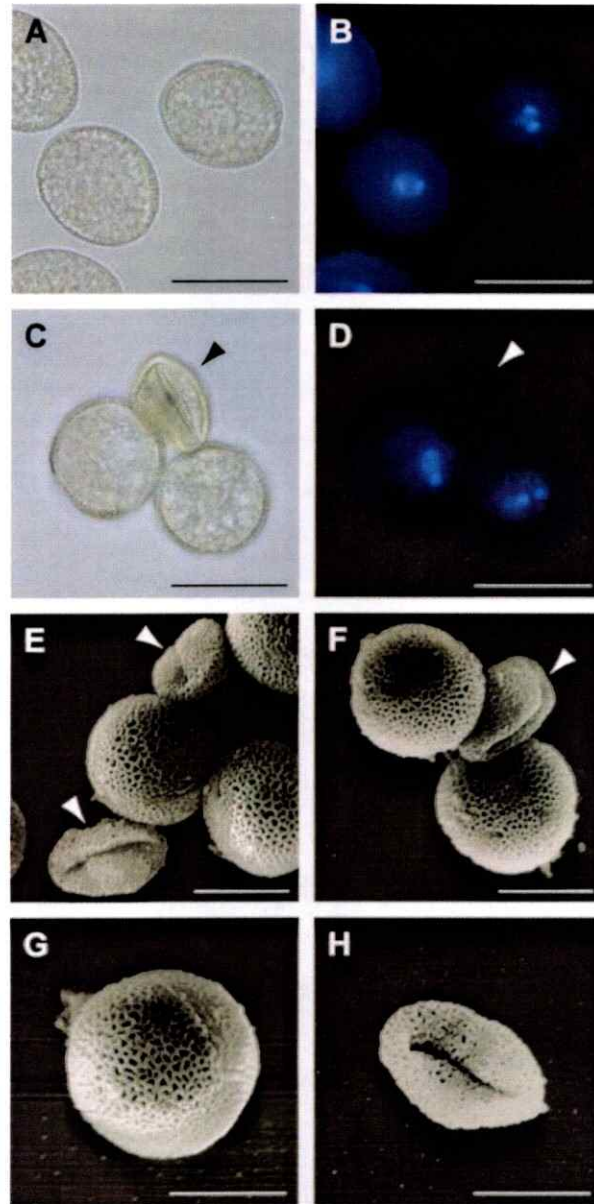
Las mutaciones gametofíticas masculinas afectan a genes que son importantes en la fase haploide del desarrollo del polen y por lo tanto, sólo los granos de polen que posean el alelo mutante se verán afectados, es decir un 50%. Para determinar si la expresión de los transportadores AtUTr1 y AtUTr3 es relevante durante el desarrollo del polen utilizamos datos de microarreglos disponibles en la base de datos de Genevestigator y un análisis de la expresión de todos los transportadores de *Arabidopsis thaliana* realizado por Bock y col., 2006 durante la microgametogénesis masculina. Ambos resultados muestran que la expresión de los transportadores AtUTr1 y AtUTr3, aumenta en forma conjunta con el desarrollo del polen (figura 30). Más aún, el trabajo de Bock y col., 2006 define la expresión de los transportadores AtUTr1 y AtUTr3 como, específica y preferencial de polen con respecto al resto de los tejidos de la planta, respectivamente, sugiriendo un papel relevante de los transportadores en el desarrollo del gameto masculino.



**Figura 30: Expresión de AtUTr1 y AtUTr3 durante el desarrollo del polen.** Valores de expresión de AtUTr1 y AtUTr3, durante las 4 etapas del desarrollo del polen: MS (microespora), BC (bicelular), TC (tricelular) y MP (polen maduro). En el panel superior se muestra una representación gráfica de la estructura del polen en las mismas etapas de desarrollo (Modificado de Bock y col., 2006).

#### 4.10 Análisis de la estructura de los granos de polen *utr1 atutr3*.

Si la ausencia de los transportadores tiene un efecto en el desarrollo o función de los granos de polen que portan ambos genes mutados, podemos esperar que existan anomalías morfológicas o funcionales en los granos de polen *atutr1/atutr3*. Cuando los granos de polen maduros provenientes de plantas *AtUTR1/atutr1 atutr3/atutr3* fueron analizados mediante microscopía óptica, se observó una población heterogénea de granos de polen, dónde muchos de ellos presentaban una estructura colapsada sobre sí mismos y cuando se utilizó la tinción de DAPI no fue posible distinguir el núcleo (Figura 31A a 31D). Esta apariencia anormal de la estructura de los granos de polen fue confirmada al utilizar microscopía electrónica de barrido, dónde observamos que los granos de polen silvestres poseen una estructura normal y una cubierta de exina esculpida (Figure 31E y 31G), mientras que en plantas mutantes, los granos de polen de apariencia normal co-existen con granos de polen de estructura anormal y colapsada (Figures 31F y 31H).

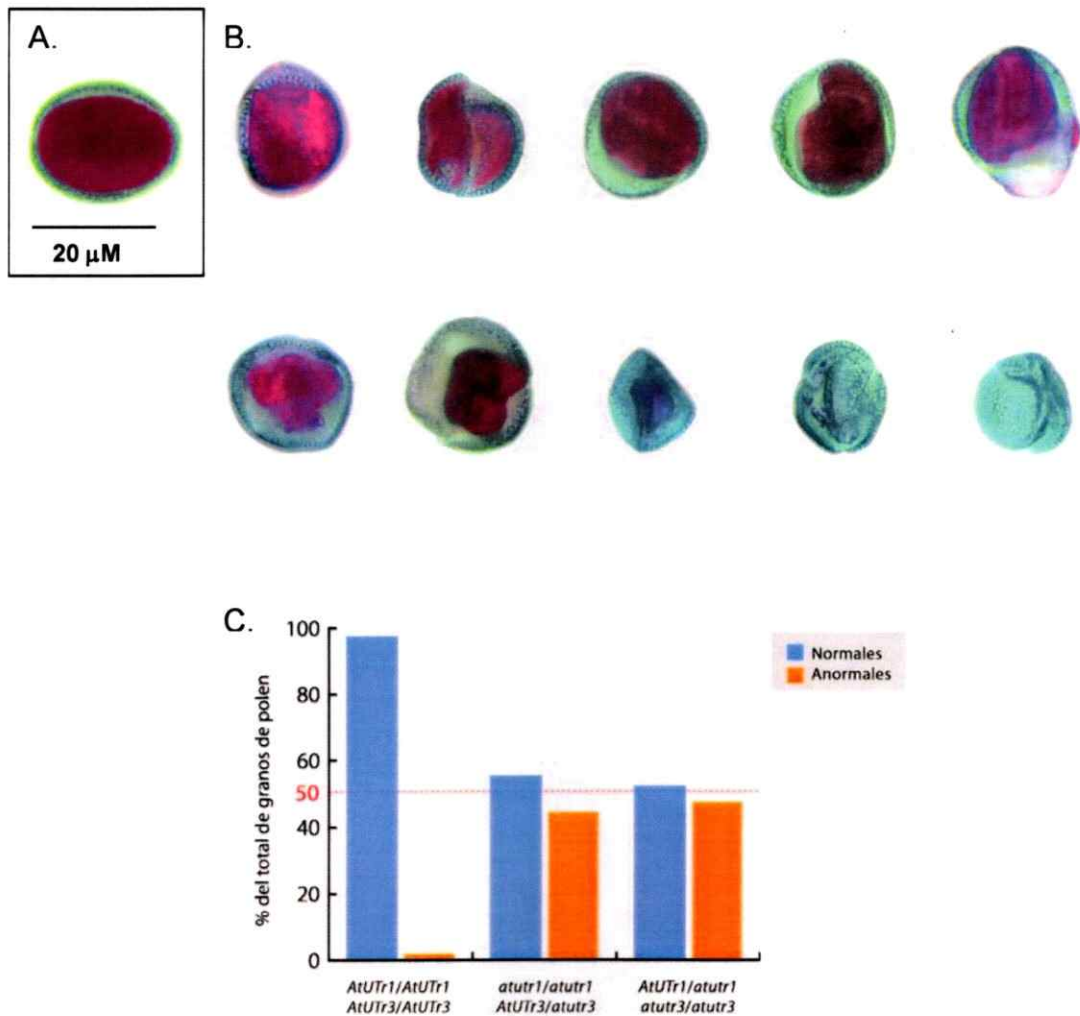


**Figura 31: Análisis estructural de granos de polen de plantas mutantes.** (A-D) Imágenes de microscopía de epifluorescencia de granos de polen de apariencia silvestre y alterada (flecha blanca) teñidos con DAPI. (E-F) Imágenes de microscopía electrónica de barrido de granos de polen silvestre y mutantes (flechas blancas). G y H corresponden a imágenes de granos de polen silvestre (G) y mutante (H). De A-F la barra de tamaño corresponde a 20  $\mu\text{m}$ , para G y H es de 5  $\mu\text{m}$ .

La tinción de Alexander permite determinar fácilmente la viabilidad de un grano de polen maduro, ya que es capaz de tefir el citoplasma de color púrpura y en verde la cubierta externa de exina (Figura 32A). Para el análisis de viabilidad de los granos de polen provenientes de plantas *AtUTr1/atutr1 atutr3/atutr3* y *atutr1/atutr1 AtUTr3/atutr3*, las anteras fueron incubadas en la solución de Alexander y luego analizadas mediante microscopía. Bajo esta tinción, pudimos observar una población heterogénea de granos de polen, que presentaban alteraciones de su morfología y del contenido de citoplasma. Las estructuras de los granos de polen de las plantas mutantes eran diversas y poseían aspectos diversos que iban desde granos de polen de apariencia silvestre, granos de polen con un citoplasma condensado, otros carentes de citoplasma y granos de polen muertos (Figura 32B).

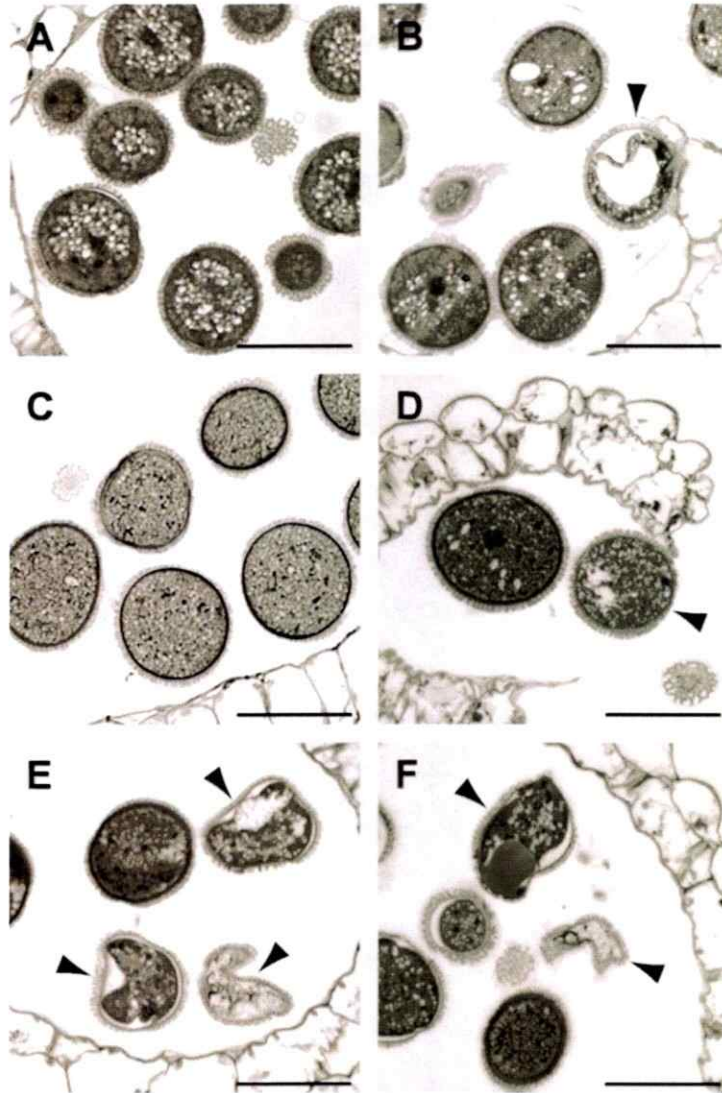
La aparición de granos de polen de morfología anormal fue cuantificada utilizando granos de polen provenientes de plantas silvestres y plantas mutantes, observando porcentajes menores al 2% en las plantas silvestres, mientras que en las plantas mutantes las estructuras anómalas alcanzaron valores entre 44% y 47% (Figura 32C).





**Figura 32: Análisis de viabilidad del polen usando la tinción de Alexander.** Los granos de polen provenientes de plantas silvestres ó de plantas mutantes fueron teñidos usando la tinción de Alexander y su morfología se analizó utilizando un microscopio óptico. (A y B) Imágenes de campo claro de granos de polen teñidos con la tinción de Alexander, el citoplasma se observa de color púrpura homogéneo y la cubierta de exina presenta un color verde. (A) Grano de polen proveniente de una planta silvestre. (B) Granos de polen mutantes que muestran diversas anomalías morfológicas respecto del contenido y distribución del citoplasma, hasta algunos que carecen absolutamente de éste. (C) Cuantificación de los granos de polen de morfología normal y anormal en plantas silvestres (*AtUTr1/AtUTr1 AtUTr3/AtUTr3*) y en plantas mutantes que poseen sólo una copia funcional de los transportadores, ya sea *AtUTr3* (*atutr1/atutr1 AtUTr3/atutr3*) ó *AtUTr1* (*AtUTr1/atutr1 atutr3/atutr3*).

Además, cuando analizamos la estructura de las anteras utilizando microscopía óptica, en secciones provenientes de plantas silvestres y mutantes *AtUTr1/atutr1 atutr3/atutr3* y *atutr1/atutr1 AtUTr3/ atutr3*, observamos que los granos de polen maduros presentes en ellas, presentan claras diferencias. En las anteras de las plantas silvestres observamos que el polen constituye una población homogénea, con granos de polen de un tamaño promedio de 20µm, de forma redondeada, con un citoplasma denso rodeado por una cubierta de exina característica (Figura 33A). En las anteras de las plantas mutantes en cambio, la población de polen es bastante heterogénea y comprende desde granos de apariencia normal, hasta granos de polen de forma y tamaño anómalos que presentan grandes vacuolas y en algunos casos ausencia de citoplasma (Figura 33B a 33D). A pesar de estas diferencias morfológicas, la cubierta de exina y el tejido esporofítico de la antera son estructuralmente normales. Los análisis genéticos y morfológicos de los granos de polen, sugieren fuertemente que aquellos granos que poseen ambas copias mutadas de los transportadores no son viables y establecen un papel de los transportadores de UDP-glucosa, *AtUTr1* y *AtUTr3*, durante la gametogénesis masculina, específicamente en el desarrollo del polen en *Arabidopsis thaliana*.



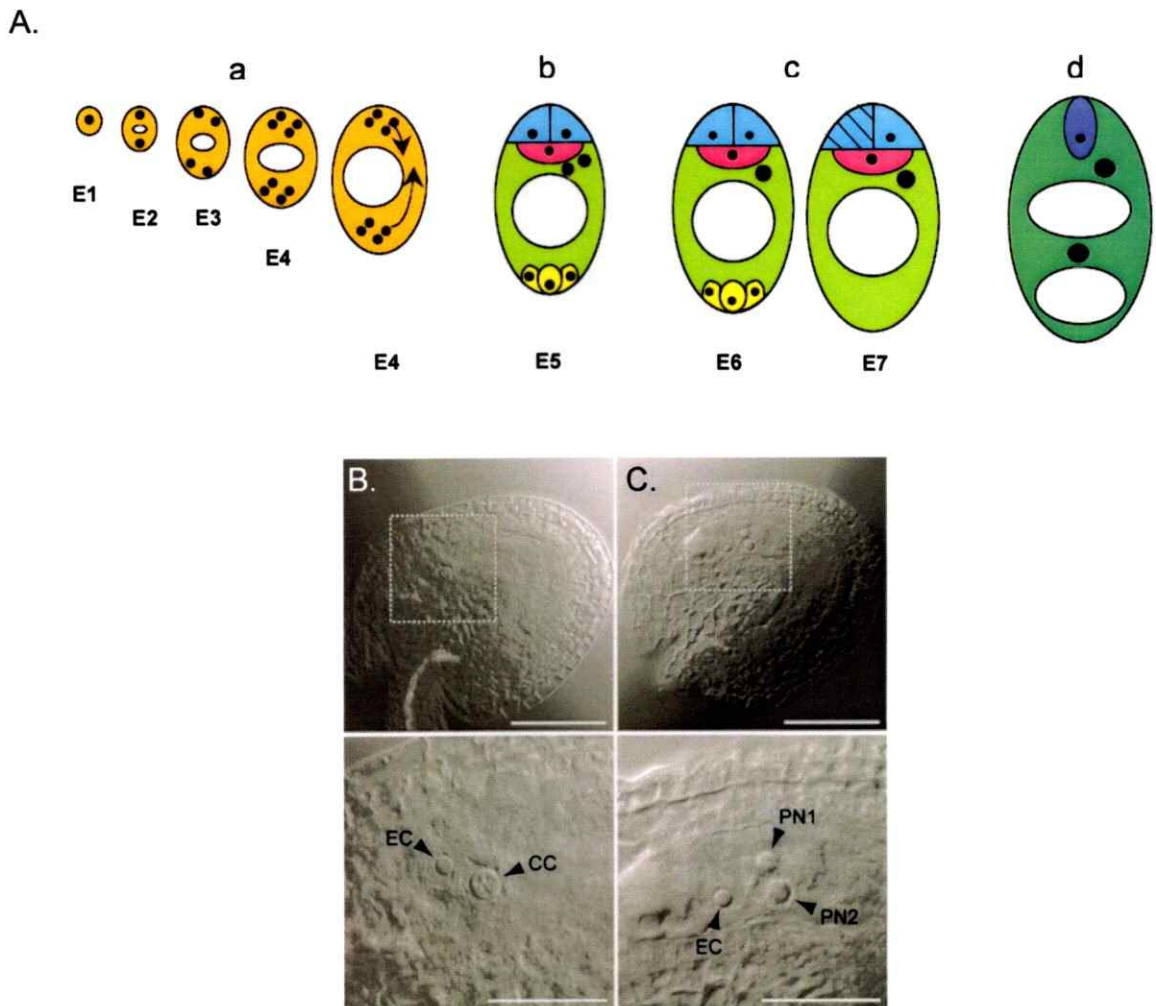
**Figura 33: Análisis de microscopía en secciones de anteras de plantas silvestres y mutantes.** Secciones de anteras de plantas silvestres y mutantes (*atutr1/atutr1* *AtUTr3/atutr3* ó *AtUTr1/atutr1* *atutr3/atutr3*), fueron teñidos con azul de toluidina y observadas al microscopio. (A y B) Granos de polen inmaduros de plantas silvestres (A) y mutantes (B), se observa una gran cantidad de vacuolas al interior del citoplasma, de acuerdo al estadio de desarrollo del polen (flechas), en B además se observa un grano de polen que presenta una estructura citoplasmática anormal con una gran vacuola central (cabeza de flecha). (C) Granos de polen maduros de plantas silvestres, con un tamaño y apariencia normal: citoplasma homogéneo y carente de vacuolas. (D-F) Granos de polen maduros de plantas mutantes, donde coexisten granos de polen de aspecto normal con granos de polen de tamaño y forma anormales y con vacuolas citoplasmáticas (cabeza de flecha). La barra corresponde a 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.11 Efecto de la ausencia de AtUTr1 y AtUTr3 en la gametogénesis femenina.

La disminución en el número de semillas observada en las plantas mutantes que poseen solo una copia funcional de los transportadores, sugiere que existirían defectos durante la gametogénesis femenina que no permitirían que ésta se complete exitosamente, lo que se traduce, finalmente, en una disminución en el número de semillas en cada uno de los frutos de la planta.

Para determinar si existen defectos en alguna de las etapas de desarrollo del gameto femenino, analizamos la morfología de los óvulos provenientes de plantas mutantes (que portan sólo una copia funcional de los transportadores) y de óvulos obtenidos a partir de plantas silvestres, utilizando microscopía de Nomarski.

Analizamos la estructura de 131 óvulos mutantes y encontramos que 108 de ellos (82,4%) presentan una estructura tipo silvestre y 23 de ellos (17,6%), poseen un fenotipo alterado en el desarrollo del gameto femenino (figura 34 A). El fenotipo observado en los sacos embrionarios mutantes corresponde al de núcleos polares no fusionados (PN1 y PN2) (figura 34C), que no permiten generar el núcleo de la célula central (CC) como el observado en los sacos embrionarios silvestres (figuras 34B), que dará origen al endosperma, y por lo tanto, resulta ser inviable. Tanto los análisis genéticos, como los morfológicos realizados en el gameto femenino de plantas mutantes, sugieren que en la ausencia ambos transportadores produce defectos en el desarrollo del gameto femenino.



**Figura 34:** Análisis morfológicos del saco embrionario en las plantas mutantes *atutr1/atutr1* *AtUTr3/atutr3* y *AtUTr1/atutr1 atutr3/atutr3*. 131 Sacos embrionarios fueron analizados utilizando microscopía de Nomarski.

(A) Desarrollo del gametofito femenino. a: Tres divisiones nucleares forman el gametofito femenino compuesto de 8 núcleos. Desde cada polo migrará un núcleo polar hacia el centro de la célula. b: La celularización del gametofito femenino formará una estructura de 7 células y 8 núcleos con 2 células sinérgidas (azul), una célula huevo (rosado), una célula central binucleada (verde) y 3 células antipodales (amarillo). c: antes de la fertilización el gametofito se diferencia completamente: Los dos núcleos polares se fusionan para formar el núcleo secundario del endosperma (homodiploide), las células antipodales sufren muerte celular programada. Una de las células sinérgidas degenera con la llegada del tubo polínico. d: durante la fertilización una célula espermática se fusiona con la célula huevo que forma el cigoto diploide (morado), una segunda célula espermática fertiliza la célula central para formar el endosperma (verde oscuro)

(B) Arriba: Estructura silvestre del saco embrionario presentada por un 82,4% de los sacos embrionarios analizados; Abajo: magnificación de la zona marcada arriba (C) Arriba: Estructura anormal del saco embrionario encontrada en un 17,6% de los sacos embrionarios analizados; Abajo: magnificación CC, núcleo de la célula central; EC, célula huevo; S1 y S2, núcleos de las células sinérgidas 1 y 2, respectivamente; NP1 y NP2, núcleo polar 1 y 2, respectivamente.

## DISCUSIÓN

**UDP-glucosa es incorporada al lumen del RE de *Arabidopsis thaliana* a través de los transportadores AtUTr1 y AtUTr3.**

UDP-glucosa es probablemente uno de los metabolitos que se encuentra en mayor concentración en el citosol de las células vegetales, alcanzando rangos milimolares (Dancer y cols., 1990). En el citosol UDP-glucosa es utilizada como sustrato para la síntesis de otros nucleótidos azúcar que se destinarán al aparato de Golgi y para la formación del "pool" de hexosas que será utilizado en los plastidios. En el RE en cambio, la UDP-glucosa es utilizada en dos reacciones de glucosilación: la glucosilación de dolicol y la reglucosilación de glicoproteínas mal plegadas. La primera de estas reacciones tiene lugar en la cara citosólica de la membrana del RE, mientras que la segunda ocurre en el lumen del RE. En este último caso, sería necesario importar la UDP-glucosa desde el citosol al lumen del RE, donde sería utilizada por la proteína UGGT quién es capaz de reconocer y retener glicoproteínas mal plegadas, a la vez que les transfiere un residuo de glucosa utilizando UDP-glucosa como sustrato. Este último paso es clave en el mecanismo de control de calidad de la síntesis de glicoproteínas, ya que permite que proteínas mal plegadas entren en una nueva ronda de plegamiento.

Entonces, en el contexto del control de calidad, la presencia de UDP-glucosa en el lumen de RE es esencial y debe, necesariamente, ser importada desde el citosol al lumen del RE. Hasta el desarrollo de esta tesis, la forma en que UDP-glucosa ingresaba al lumen del RE era una interrogante y aún cuando se especulaba de la participación de transportadores específicos en la membrana del RE, esta hipótesis no había sido comprobada. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, nos permiten entregar la primera evidencia de la existencia de transportadores de UDP-glucosa de RE, que proveerían del sustrato necesario para la reglucosilación de glicoproteínas en el contexto del control de calidad de la síntesis de proteínas.

En esta tesis determinamos que AtUTr1 y AtUTr3 son dos transportadores de UDP-glucosa de *Arabidopsis thaliana* que se localizan en el RE en células vegetales y demostramos que estímulos capaces de inducir la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE producen aumentos significativos en la acumulación de los transcritos y de las proteínas AtUTr1 y AtUTr3. Más importante aún, observamos un aumento en la incorporación de UDP-Glucosa hacia el lumen de vesículas de RE.

Se ha determinado que la concentración citosólica de UDP-glucosa en células vegetales alcanza valores de 1 mM (Dancer y cols, 1990) y que el valor de Km de todos los transportadores de nucleótidos-azúcar descritos varía entre 1 y 10  $\mu$ M (Hirschberg y Snider, 1987; Abeijon y col., 1989). Teniendo en cuenta además que AtUTr3 presenta un valor de Km para UDP-glucosa de 6,4  $\mu$ M, podemos postular que los transportadores AtUTr1 y AtUTr3 se encuentran expuestos a una concentración de UDP-glucosa saturante. Este hecho nos permite inferir que ambos transportadores se encuentran permanentemente trabajando en condiciones de velocidad máxima.

Como comentamos anteriormente, hemos observado un aumento en la incorporación de UDP-glucosa en plantas que sometidas a estímulos que inducen la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE. Este aumento puede ser consecuencia de dos hechos: un aumento del número de transportadores capaces de unir UDP-glucosa y transportarla al RE ó de un cambio en la afinidad de los transportadores por UDP-glucosa, reflejado en una disminución de la Km. Los resultados de acumulación de transportadores en condiciones de estrés de RE demuestran que existe un aumento en el número de transportadores presentes en células vegetales bajo condiciones de estrés, sugiriendo fuertemente que los cambios observados en la velocidad se deben a un aumento en el número de transportadores en las membranas del RE y por ende un cambio en la velocidad máxima.

En forma alternativa, no podemos descartar que exista un cambio en la afinidad de los transportadores por UDP-glucosa. Sin embargo, esta hipótesis puede ser resuelta realizando ensayos de transporte de UDP-glucosa para cada uno de los tratamientos en condiciones de sustrato subsaturante, de manera de atribuir los cambios en la actividad de transporte a una variación en la afinidad del transportador por su sustrato o saturante para observar el efecto sobre la velocidad máxima.

Por lo tanto, los transportadores se encuentran trabajando en velocidad máxima y condiciones que promueven la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE son capaces de incrementar su número. Creemos que es poco probable que, en condiciones normales, la concentración de UDP-glucosa que es aportada por los transportadores permita que la UGGT alcance su velocidad máxima (la  $K_m$  descrita para la UGGT presenta valores entre 10 y 40  $\mu M$ ) (Sousa y col., 1992; Trombeta y Parodi., 1992; Parker y col., 1995; Tessier y col. 2000). Estos antecedentes nos permiten proponer que el suministro de UDP-glucosa constituye el paso limitante en la etapa de reglucosilación de proteínas mal plegadas y resulta bastante sugerente pensar que la disponibilidad de UDP-glucosa en el lumen del RE, determinada por la cantidad de transportadores presentes en la membrana, es crítica para permitir la reglucosilación de proteínas mal plegadas y por lo tanto una correcta respuesta de la célula frente a una acumulación de éstas.



La existencia de dos proteínas, casi idénticas, que realizan la misma función podría ser calificada de redundancia funcional insinuando un vestigio de la evolución que ha tenido *Arabidopsis* en términos genómicos (de ser un organismo tetraploide a un organismo diploide) (Revisado por Bancroft, 2001). Sin embargo, también es posible especular que dada la importancia del proceso en el que los transportadores se encuentran participando, poseer dos proteínas que realizan la misma función en el RE, es una manera de asegurar un adecuado suministro de UDP-glucosa hacia este organelo. En este sentido, ya mencionamos que UDP-glucosa no es un sustrato limitante en el citosol de las células vegetales y por lo tanto, para mecanismos de control de calidad, el número de transportadores en la membrana del RE es crítico. Además, debemos tener en cuenta que las plantas no pueden moverse y por lo tanto, su capacidad de adaptarse y soportar distintos tipos de estrés medioambientales, que puedan afectar directamente su metabolismo, es fundamental para su supervivencia. En este escenario tendría sentido que AtUTr1 y AtUTr3 tuvieran una función redundante en el RE de las células vegetales.

#### **AtUTr3, al igual que AtUTr1, es un transportador de UDP-Glucosa**

Los transportadores de nucleótidos azúcar han sido descritos como contra transportadores y se ha mostrado que el ingreso del nucleótido difosfato (NDP-azúcar) requiere necesariamente de la salida del nucleósido monofosfato (NMP) (Capasso y Hirschberg, 1984; Waldman y Rudnick, 1990; Rollwitz y col., 2006). Cuando reconstituimos AtUTr3 en liposomas para analizar su función, observamos que AtUTr3 es capaz de transportar UDP-glucosa en forma dependiente de UMP, con una  $K_m$  aparente para UDP-glucosa de 6,4  $\mu$ M.

En el modelo actual del mecanismo de acción de los transportadores, se sugiere que la fuente más probable de UMP es el UDP liberado luego de la transferencia de glucosa, a partir de UDP-glucosa. Este hecho hace que sea necesario hidrolizar el UDP a UMP y Pi. Esta reacción es llevada a cabo por la enzima UDPasa, sin embargo, hasta la fecha, no hay evidencia de UDPasas localizadas en el RE de *Arabidopsis*, aunque se sabe que en su genoma existen 6 putativas UDPasas y al menos dos de ellas son activas y se localizan en el aparato de Golgi (Steinebrunner y col., 2000 y 2003; Dunkley y col., 2006). De modo que es posible que una de las otras cuatro putativas UDPasas provean de UMP como contra sustrato para la entrada de UDP-glucosa mediada por AtUTr1 y AtUTr3. En forma alternativa, es posible que el UDP sea hidrolizado en el aparato de Golgi y que producto del flujo retrógrado de vesículas desde el aparato de Golgi hacia el RE, el UMP se encuentre disponible en este último organelo para acoplar su salida a la entrada de UDP-glucosa mediada por AtUTr1 y AtUTr3. Por lo tanto, teniendo en mente el mecanismo de acción de los transportadores podríamos especular que el mecanismo de control de calidad también requiere de una actividad UDPasa. Esta hipótesis parece ser bastante probable ya que se ha descrito en *Caenorhabditis elegans* que UDA-1, una UDPasa del compartimento intermedio RE-Golgi, es regulada por estímulos que promueven estrés en el RE (Uccelletti y col., 2004).

#### **Efecto *in planta* de la ausencia de AtUTr1 o AtUTr3**

Para determinar el rol fisiológico de los transportadores AtUTr1 y AtUTr3, identificamos y analizamos plantas mutantes en estos genes (dos líneas mutantes en AtUTr1 y dos líneas mutantes en AtUTr3). Ninguna de estas 4 líneas analizadas mostraron alteraciones morfológicas evidentes, aún cuando las plantas fueron sometidas a distintos tipos de estrés, por lo que creemos que en ausencia de uno de los transportadores de UDP-glucosa en el RE, el restante, ya sea AtUTr1 o AtUTr3, es suficiente para suministrar el sustrato para la UGGT.

En forma alternativa, es posible que otro transportador de nucleótidos-azúcar sea capaz de reciclar desde el Golgi hacia el RE, a suplir el sustrato requerido, como ocurre en mamíferos para un transportador de UDP-Galactosa (Sprong y col., 2003). Por lo tanto, ya sea por la presencia de uno de los transportadores AtUTr1 ó AtUTr3 o la participación de un transportador extra, el sustrato necesario para la enzima UGGT es incorporado al RE de las plantas mutantes simples y las mantiene creciendo en forma aparentemente normal.

A pesar de no existir alteraciones morfológicas evidentes, al analizar los niveles de incorporación de UDP-glucosa en fracciones de RE y de aparato de Golgi provenientes de plantas de Arabidopsis mutantes en AtUTr1, encontramos que éstas presentan una disminución de alrededor del 50% en la incorporación de UDP-glucosa a vesículas de RE, comparado con las plantas silvestres, mientras que en las mutantes de AtUTr3 la incorporación de UDP-glucosa disminuyó cerca del 50% tanto en vesículas provenientes de RE como en vesículas provenientes de aparato de Golgi. Los resultados obtenidos para ambas mutantes, dejaron en evidencia que la ausencia de los transportadores afecta directamente la capacidad de translocar UDP-glucosa hacia el lumen del RE y confirmaron además los resultados de localización subcelular observados para los transportadores donde AtUTr1 se localiza exclusivamente en membranas de RE, mientras que AtUTr3 lo hace tanto en membranas de RE como en membranas de aparato de Golgi. La localización dual de AtUTr3 no deja de ser sorprendente, ya que la identidad a nivel aminoacídico con AtUTr1 es bastante alta 87% y ambas poseen la señal de retención en el RE para proteínas de membrana (Jackson y col., 1993; Benghezal y col., 2000).

De nuestro conocimiento, es la primera evidencia de una proteína de membrana que posee el tetrapéptido KKXX, que se localiza tanto en RE como en aparato de Golgi sugiriendo que la señal encontrada en los extremos C-terminal de AtUTr1 y AtUTr3 podría estar influenciada por el ambiente aminoacídico en el que se encuentra, ya que es precisamente esta región de las proteínas la que presenta mayor variabilidad aminoacídica y podría, de alguna forma, perturbar el reconocimiento de esta señal por el receptor localizado en el aparato de Golgi, que es quien finalmente promueve que las proteínas sean transportadas en forma retrógrada al RE.

#### **Consecuencias de la disminución en la incorporación de UDP-glucosa hacia el RE de células vegetales.**

Hemos destacado que el destino más probable de la UDP-glucosa que ingresa al RE a través de los transportadores es la reglucosilación de proteínas. De modo que mutantes en AtUTr1 y AtUTr3 presentarán una menor disponibilidad de sustrato para la enzima UGGT. Lo anterior traería como consecuencia la disminución en la capacidad de reglucosilar proteínas mal plegadas y por lo tanto, se produciría una acumulación de proteínas mal plegadas, generando la respuesta UPR (Unfolded Protein Response). Efectivamente, cuando analizamos la expresión de dos genes marcadores de UPR, como las chaperonas BiP (Leborgne-Castel y col., 1999) y calnexina en las mutantes de los transportadores, encontramos que las mutantes de AtUTr1 poseen una mayor acumulación de los transcritos de éstas chaperonas, sugiriendo que en estas mutantes existe una activación constitutiva del mecanismo UPR. Lo mismo ocurre para las mutantes de AtUTr3, donde observamos diferencias significativas en la acumulación de los transcritos de las chaperonas en condiciones estándar de crecimiento.

Teniendo en cuenta los resultados de acumulación de los transcritos de los genes UPR en las mutantes y la localización subcelular de los transportadores, podemos proponer que existiría una concentración umbral de UDP-glucosa bajo la cual se induce el mecanismo UPR. Y si bien, esta concentración no es alcanzada en ausencia de uno de los transportadores, el suministro de UDP-glucosa es suficiente para mantener a las células funcionando con aparente normalidad y como consecuencia de ello no se observan diferencias morfológicas evidentes entre las mutantes y las plantas silvestres. Todos los resultados obtenidos nos permiten apoyar la hipótesis de que la disponibilidad de UDP-glucosa en el lumen del RE, mediada por los transportadores AtUTr1 y AtUTr3, modula la reglucosilación catalizada por la UGGT.

#### **AtUTr1 y AtUTr3 forman parte de los genes UPR en Arabidopsis.**

Nuestros resultados de una mayor acumulación de los mensajeros de AtUTr1 y AtUTr3 en condiciones de estrés en el RE, apuntan en la misma dirección de los reportado por Martínez y Chrispeels (2003) y Kamauchi y col., (2005), quienes usando microarreglos mostraron un aumento significativo de la expresión del transcrito de AtUTr1 y de un número significativo de genes cuyos productos se encuentran involucrados en plegamiento de proteínas, principalmente chaperonas como: BiP, calnexina y calreticulina, proteínas de la familia PDI, etc. A los genes capaces de responder a esta acumulación de proteínas se les denominó genes UPR, de manera que tanto AtUTr1 como AtUTr3 formarían parte de estos genes.

La razón para el aumento en la expresión de los mensajeros de AtUTr1 y AtUTr3, junto al de genes marcadores de UPR, puede encontrarse en elementos presentes en la región promotora de estos genes: un elemento en cis tipo "ERSE" (Endoplasmic Reticulum Stress Element) CC-N<sub>12</sub>-CCACG (Yoshida y col., 1998), que es reconocido por AtbZIP60, un factor de transcripción de *Arabidopsis thaliana* que media la vía de transducción de señales activada en respuesta a estrés en el RE (Iwata y Koizumi, 2005).

Otra evidencia que indica que AtUTr1 y AtUTr3 poseen elementos de regulación comunes a los de genes que codifican para proteínas involucradas en plegamiento, proviene del análisis de bases de datos de co-expresión de genes de *Arabidopsis thaliana*. Estas bases de datos incluyen resultados de una gran número de experimentos realizados para determinar cambios en la expresión, de casi la mitad de los genes de *Arabidopsis*, frente a distintos tipos de estrés abióticos ([www.csbdb.mpimp-golm.mpg.de](http://www.csbdb.mpimp-golm.mpg.de) y Steinhauser y col., 2004). Al analizar los resultados presentes en las distintas bases de datos, observamos que AtUTr1 y AtUTr3 se coexpresan mayoritariamente con genes cuyos productos están involucrados en plegamiento de proteínas.

Nuestros resultados de acumulación de los mensajeros de AtUTr1 y AtUTr3, junto a las evidencias provenientes de los análisis de expresión a gran escala de genes de *Arabidopsis*, nos permiten afirmar que AtUTr1 y AtUTr3 son genes UPR, cuya expresión se induce en respuesta a acumulación de proteínas mal plegadas en el RE.

**El transporte de UDP-glucosa es esencial para el desarrollo de un organismo multicelular.**

Teniendo en cuenta la redundancia funcional de AtUTr1 y AtUTr3 en el RE, una evaluación apropiada del efecto de la ausencia de UDP-glucosa en el lumen del RE puede ser obtenido analizando lo que ocurre en ausencia de AtUTr1 y AtUTr3. Plantas heterocigotas mutantes en ambos transportadores (AtUTr1/*atutr1* AtUTr3/*atutr3*) no presentan un fenotipo morfológico evidente y son capaces de autofecundarse y generar descendencia. Sin embargo luego de analizar alrededor de 400 plantas no encontramos plantas dobles mutantes homocigotas. Una posible explicación en este punto era que los embriones dobles mutantes homocigotos no fueran capaces de completar su desarrollo y mueran antes de germinar (Mutación letal embrionaria), sin embargo, esta condición produce una disminución en el número de semillas de aspecto normal (~25%) que, por poseer embriones abortados, presentan un aspecto rugoso y de color anómalo al madurar. Ninguno de los análisis morfológicos realizados en los frutos o en las semillas dan evidencia de que estamos en presencia de una mutación letal embrionaria.

Un análisis más exhaustivo respecto de la segregación de los genotipos en la descendencia de plantas que poseen sólo un alelo de los transportadores funcional (ya sea AtUTr1 o AtUTr3) mostró una distorsión dramática de la segregación, la que presentó una razón promedio de 1:0,26 para el alelo segregante (silvestre:heterocigoto). Esta distorsión en la segregación sugiere un efecto de letalidad parcial en uno de los gametos y un efecto de letalidad total en el otro. A través de cruces recíprocos de las plantas mutantes con plantas de genotipo silvestre, determinamos que la mutación no es transmitida por el gameto masculino (polen) y que es sólo parcialmente transmitida a través del gameto femenino (óvulo). Estos resultados hicieron imposible obtener una planta homocigota doble mutante en AtUTr1 y AtUTr3 y por lo tanto no pudimos evaluar *in vivo* el efecto de la ausencia del transporte de UDP-glucosa en el RE.

**El transporte de UDP-glucosa, mediado por AtUTr1 y AtUTr3, es fundamental en la gametogénesis de Arabidopsis.**

Entre las alteraciones que afectan el desarrollo del gameto femenino, se han descrito fenotipos de óvulos mutantes con: número y/o posición anormal del núcleo, fallas o retardo en el proceso de celularización y fallas en la fusión de los núcleos polares (Revisado recientemente por Yadegari y col., 2004). Nuestros análisis microscópicos mostraron que un 20% de los óvulos poseen un fenotipo terminal de núcleos polares no fusionados, que determina la letalidad de los óvulos y por lo tanto, su incapacidad para ser fecundados.

En *Arabidopsis thaliana* la fusión de los núcleos polares dará origen al núcleo de la célula central del endosperma que luego de la fertilización permitirá la mantención del embrión. La fusión de los núcleos polares implica, entre otros eventos, el reconocimiento de algunas moléculas de cubierta en las membranas de éstos. Ahora, aún cuando se ha caracterizado un número pequeño de mutantes deficientes en la fusión de los núcleos polares, no se ha descrito completamente la naturaleza de las proteínas afectadas en estas mutaciones (Christensen et al, 1997; Recientemente revisado por Yadegari y cols., 2004). Por lo tanto, es posible especular que en las envolturas nucleares de genotipo doble mutante, algunas de las proteínas importantes para el reconocimiento y fusión de las membranas no sean capaces de llegar en número o estructura apropiada a las envolturas nucleares y por lo tanto, la fusión de los núcleos polares falla. Podemos especular entonces que la presencia de una sola copia funcional de los transportadores afecta severamente el suministro de UDP-glucosa hacia el RE, afectando directamente los mecanismos de control de calidad, los que llevan a producir glicoproteínas defectuosas.



¿Por qué el efecto no es letal en la totalidad de los óvulos mutantes? Se sabe que durante la gametogénesis femenina, el gameto femenino no se encuentra aislado y de hecho, se encuentra completamente rodeado de tejido esporofítico. Eventualmente puede ser este tejido quien sostenga el desarrollo de un gameto femenino mutante hasta la fecundación. Luego de este evento el nuevo individuo originado tendrá una copia de uno de los transportadores y por lo tanto el RE poseerá un suministro de UDP-glucosa mínimo para soportar sus funciones.

En el caso de los gametos masculinos en cambio, se sabe que su capacidad de fertilizar depende de una apropiado desarrollo del gametofito masculino, de una exitosa germinación del polen, del crecimiento del tubo polínico y de la entrega de las células espermáticas al óvulo. En todos estos procesos se requiere el transporte de iones y metabolitos y se han descrito transportadores de:  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{K}^{+}$ , Boro,  $\text{H}^{+}$ /monosacáridos y Glucosa 6-fosfato, cuya función se ha asociado a diferentes etapas en el desarrollo del polen (Mouline y col., 2002; Schiott y col., 2004; Schneiderei y col., 2005; Woeste y Kieber, 2000; Takano y col., 2002; Niewiadomski y col., 2005).

El análisis de la expresión de todos los transportadores de Arabidopsis durante las cuatro etapas del desarrollo del gameto masculino (Bock y col., 2006), más resultados de microarreglos para estas mismas etapas, encontrados en las bases de datos de Genevestigator ([www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch)) y de "Comprehensive System-Biology database" ([www.csbdb.mpimp-golm.mpg.de](http://www.csbdb.mpimp-golm.mpg.de)), muestran que AtUTr1 y AtUTr3 se expresan principalmente en etapas tardías del desarrollo del polen, sugiriendo que el transporte de UDP-glucosa hacia el lumen del RE, mediado por AtUTr1 y AtUTr3, es importante en las últimas etapas de la gametogénesis masculina y/o para una exitosa germinación del tubo polínico.

Análisis estructurales de los granos de polen presentes en las plantas mutantes que poseen sólo una copia funcional de los transportadores (AtUTr1 ó AtUTr3) evidenciaron que un 50% de la población presenta anomalías morfológicas, las que van desde cambios en tamaño, forma, ausencia de citoplasma, aparición de vacuolas anómalas, ausencia de núcleo hasta la muerte de los granos de polen mutantes maduros. Estos resultados sugieren fuertemente que aquellos granos de polen que carecen de una copia funcional de los transportadores mueren durante su desarrollo.

Se sabe que para el desarrollo del grano de polen se requiere de una gran síntesis y secreción de glicoproteínas y de elementos que forman parte de su pared celular, que le permitirán elongar al menos 500 veces su tamaño para permitir la fecundación. Además durante todos su desarrollo el polen se comporta como una célula independiente, donde sólo los que se encuentren en óptimas condiciones serán capaces de fecundar. Por lo tanto, un correcto control de calidad es crítico para lograr un desarrollo exitoso del grano de polen, situación que en ausencia de ambos transportadores, no es posible conseguir. Finalmente podemos decir que el fenotipo observado sugiere que el transporte de UDP-glucosa hacia el RE es esencial para el desarrollo del polen y para completar exitosamente la gametogénesis masculina.

En resumen durante este trabajo de tesis, determinamos que AtUTr1 y AtUTr3 son transportadores de UDP-glucosa de RE y dado que la única función conocida de UDP-glucosa en el lumen del RE es la reglucosilación de proteínas mal plegadas proponemos que este sería el destino de la UDP-glucosa transportada por AtUTr1 y AtUTr3, estableciendo un nexo entre los transportadores de UDP- glucosa de RE y el mecanismo de control de calidad del ciclo de la calnexina mediado por la UGGT. Además determinamos que el transporte de UDP-glucosa hacia el RE es fundamental para la gametogénesis y particularmente esencial en el desarrollo del gameto masculino.

## CONCLUSIONES

1. AtUTr1 y AtUTr3, dos transportadores de UDP-glucosa de *Arabidopsis thaliana*, se localizan en el RE donde suministran el sustrato requerido para la reglucosilación de proteínas mal plegadas.
2. AtUTr1 y AtUTr3 coexpresan con genes que codifican para proteínas involucradas en plegamiento de proteína y forman parte de los genes de respuesta a proteínas mal plegadas o genes UPR.
3. Mutantes que no expresan AtUTr1 ó AtUTr3 presentan una disminución en la incorporación de UDP-glucosa a vesículas de RE, que se manifiesta en una activación basal del mecanismo de respuesta a proteínas mal plegadas.
4. La ausencia de AtUTr1 y AtUTr3 produce un defecto en el desarrollo de los gametos, siendo parcial en el caso de los femeninos y total en el caso de los gametos masculinos. Por lo tanto, no es posible obtener un planta que carece de AtUTr1 y AtUTr3 sugiriendo que el transporte de UDP-glucosa es esencial para sostener los requerimientos metabólicos de la célula.

## REFERENCIAS

- Abeijon C, Orlean P, Robbins PW y Hirschberg CB (1989) Topography of glycosylation in yeast: characterization of GDP-mannose transport and luminal guanosine diphosphatase activities in Golgi-like vesicles. *PNAS*, 86: 6935-6939.
- Alexander, M. (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol*, 44: 117-122.
- Apweiler, R., Hermjakob, H. y Sharon, N. (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1473: 4-8.
- Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S., Tabata, S. (2000). A large scale analysis of cDNA in *Arabidopsis thaliana*: Generation of 12,028 non-redundant expressed sequence tags from normalized and size-selected cDNA libraries. *DNA research*, 7:175-180.
- Baldwin TC, Handford MG, Yuseff MI, Orellana A, Dupree P. (2001) Identification and characterization of GONST1, a golgi-localized GDP-mannose transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13: 2283-2295.
- Bancroft, I. (2001) Duplicate and diverge: the evolution of plant genome microstructure. *Trends in Genetics*, 17: 89-93.
- Batoko, H., Zheng, HQ., Hawes, C. y Moore, L (2000) A Rab1 GTPase Is Required for Transport between the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus and for Normal Golgi Movement in Plants. *Plant Cell*, 12: 2201-2217.
- Benghezal, M., Wasteneys, G., y Jones, D. (2000) The C-Terminal Dilysine Motif Confers Endoplasmic Reticulum Localization to Type I Membrane Proteins in Plants. *Plant Cell*, 12: 1179-1201.
- Berrinsone, P. y Hirschberg, CB. (2000) Nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus. *Curr. Op. Structural Biology*, 10: 542-547.
- Bock, K., Honys, D., Ward, J., Padmanaban, S., Nawrocki, E., Hirschi, K., Twell, D y Sze, H (2006) Integrating Membrane Transport with Male Gametophyte Development and Function through Transcriptomics. *Plant Physiology*, 140: 1151-1168.
- Boisson M, Gomord V., Audran C, Berger N, Dubreucq B, Granier F, Lerouge P, Faye L, Caboche M, Lepiniec L. (2001) *Arabidopsis* glucosidase I mutants reveal a critical role of N-glycan trimming in seed development. *EMBO J*, 20: 1010-1019.
- Boyce, J., Coates, D., Fricker, M. y Evans, D. (1994) Genomic Sequence of a Calnexin Homolog from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Phys*, 106: 1691.

Boyes, D., Zayed, A., Ascenzi, R., McCaskill, A., Hoffman, N., Davis, K. y Gorlach, J. (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*, 13: 1499-1510.

Briskin, D., Leonard, R. y Hodges, T. (1987) Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Methods Enzymol*, 148: 542-584.

Burn, J., Hurley, U., Birch, R., Arioli, T., Cork, A. y Williamson, R. (2002) The cellulose-deficient Arabidopsis mutant *rsw3* is defective in a gene encoding a putative glucosidase II, an enzyme processing N-glycans during ER quality control. *Plant J*, 32: 949-960.

Capasso, JM. y Hirschberg, CB (1984) Mechanisms of glycosylation and sulfation in the Golgi apparatus: evidence for nucleotide sugar/nucleoside monophosphate and nucleotide sulfate/nucleoside monophosphate antiports in the Golgi apparatus membrane. *PNAS*, 81: 7051-7055.

Caramelo, J; Castro, O; Alonso, L; Prat-Gay, G y Parodi, A. (2003) UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates *PNAS* 100: 86-91.

Caramelo, J., Castro, O., Prat-Gay, G. y Parodi, A. (2004) The ER glucosyltransferase recognized nearly native glycoprotein folding intermediates. *JBC*, 279: 46280-46285.

Castro, O., Chen, L., Parodi, A. and Abeijon, C. (1999) Uridine Diphosphate-Glucose Transport into the Endoplasmic Reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*: In vivo and in vitro evidence. *Mol. Biol. Cell*, 10: 1019-1030.

Chen, H., Nelson, R., Sherwood, J. (1994). Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection. *Biotech*. 16: 664-669.

Christensen, C.A., King, E.J., Jordan, J.R., and Drews, G.N. (1997). Megagametogenesis in Arabidopsis wild type and the Gf mutant. *Sex. Plant Reprod*. 10, 49-64.

Cox, J., Chapman, R., y Walter, P. (1997) The Unfolded Protein Response Coordinates the Production of Endoplasmic Reticulum Protein and Endoplasmic Reticulum Membrane. *Mol. Biol. Cell*, 8: 1805-1814.

Dancer, J., Neuhaus, J and Stitt, M. (1990) Subcellular Compartmentation of Uridine Nucleotides and Nucleoside-5'-Diphosphate Kinase in Leaves. *Plant Physiol*, 92: 637-641.

D'Alessio, C., Fernández, F., Trombetta, S. y Parodi, A. (1999) Genetic evidence for the heterodimeric structure of glucosidase II. *JBC*, 274: 25899-25905.

Das, O.P., Cruz-Alvarez, C., Chaudhuri, S. y Messing, J. (1990). Molecular methods for genetic analysis of maize. *Methods Mol. Cell. Biol* 1:213-222.

Dhugga, KS., Tiwari, SC. y Ray, PM. (1997) A reversibly glycosylated polypeptide (RGPI) possibly involved in plant cell wall synthesis: purification, gene cloning, and trans-Golgi localization. *PNAS*, 94: 7679-84.

Dunkley, T., Hester, S., Shadforth, I., Runions, J., Weimar, T., Hanton, S., Griffin, J., Bessant, C., Brandizzi, F., Hawes, C., Watson, R., Dupree, P. y Lilley, K. (2006) Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome. *PNAS*, 103: 6518-6523.

Elorza, A. (2004) Estudio de la expresión de los genes nucleares que codifican para las proteínas mitocondriales PRS14 y SDH2 en *Arabidopsis thaliana*. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica.

Fanchiotti, S., Fernández, F., D'Alessio, C. y Parodi, A. (1998) The UDP-Glc Glycoprotein Glucosyltransferase is essential for *Schizosaccharomyces pombe* viability under conditions of extreme ER stress. *JBC*, 141: 625-635.

Fernández, F., Trombetta, S., Hellman, U. y Parodi, A. (1994) Purification to homogeneity of UDP-Glucose Glycoprotein Glucosyltransferase from *Schizosaccharomyces pombe* and apparent absence of the enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *JBC*, 269: 30701-30706.

Gietz, R.D. y Schiestl, R.H. (1995) Transforming Yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5: 255-269.

Handford MG, Sicilia F, Brandizzi F, Chung JH, Dupree P. (2004) *Arabidopsis thaliana* expresses multiple Golgi-localised nucleotide-sugar transporters related to GONST1. *Mol. Genet. Genomics*, 272: 397-410.

Handford M, Rodriguez-Furlán C, Orellana A: Nucleotide-sugar transporters: structure, function and roles *in vivo*. *Braz J. Med Biol Research* 2006, 39:1149-1158.

Hammond, C., Braakman, I., Helenius, A. (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, y calnexin in glycoprotein folding and quality control. *PNAS*, 91: 913-917.

Haseloff, J., Siemering, K., Prasher, D. y Hodge, S. (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *PNAS*, 94: 2122-2127.

Helenius, A. and Aebi M (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem*, 73: 1019-1049.

Hirschberg CB, Snider MD (1987) Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu. Rev Biochem*, 56: 63-87.

Huang, L., Franklin, A., Hoffman, N. (1993) Primary Structure and Characterization of an *Arabidopsis thaliana* Calnexin-like Protein. *JBC*, 268: 6560-6566.

Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1991). High efficiency transformation of E.Coli with plasmids. *Genetics*, 96: 23-28.

Iwata, Y and Koizumi, N (2005) An Arabidopsis transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *PNAS*, 102: 5280-5285.

Jackson, M., Nilsson, T. and Peterson, P. (1993) Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *JCB*, 121: 317-333.

Jin, H., Yan, Z., Nam, K. y Li, J. (2007) Allele-Specific Suppression of a Defective Brassinosteroid Receptor Reveals a Physiological Role of UGGT in ER Quality Control. *Molecular Cell*, 26: 821-830.

Kamauchi, S., Nakatani, H., Nakano, C. y Urade, R. (2005) Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS, J.* 272: 3461-3476.

Kornfeld, R. y Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 631-664.

Leborgne-Castel, N., Jelitto-Van Dooren, E., Crofts, A. y Denecke, J. (1999) Overexpression of BiP in Tobacco Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress. *Plant Cell*, 11: 459-469.

Loddenkotter, B., Kammerer, B., Fischer, K. y Flugge, UI. (1993) Expression of the functional mature chloroplast triose phosphate translocator in yeast internal membranes and purification of the histidine-tagged protein by a single metal-affinity chromatography step. *PNAS*, 90: 2155-2159.

Madson, M., Dunand, D., Li, X., Verma, R., Vanzin, GF., Caplan, J., Shoue, DA., Carpita, N. y Reiter, WD. (2003) The MUR3 gene of Arabidopsis encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins. *Plant Cell*, 15: 1662-1670.

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

Martinez y Chrispeels (2003) Genomic analysis of the UPR in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell*, 15: 561-576.

Mouline, K., Very, A., Gaymard, F., Boucherez, J., Pilot, G., Devic, M., Bouchez, D., Thibaud, JB., Sentenac, H. (2002) Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K<sup>(+)</sup> channel in Arabidopsis. *Genes Dev*, 16: 339-350.

Muñoz, P., Norambuena, L. and Orellana, A. (1997) Evidence for UDP-Glc transporter in golgi apparatus derived vesicles from pea and it possible role in polysaccharide biosynthesis. *Plant Phys*, 112: 1585-1594.

Nakanishi, H., Nakayama, K., Yokota, A., Tachikawa, H., Takahashi, N. and Jigami, Y. (2001) Hsc70 proteins identified in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* are functional homologues involved in the protein folding process at the ER. *Yeast*, 18:543-554.

Nelson, D., Glaunsinger, B. y Bohnert, H. (1997) Abundant Accumulation of the Calcium-Binding Molecular Chaperone Calreticulin in Specific Floral Tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Phys*, 114: 29-37.

Niewiadowski, P., Knappe, S., Geimer, S., Fischer, K., Schulz, B., Unte, U., Rosso, M., Ache, P., Flugge, U.I. y Schneider, A. (2005) The *Arabidopsis* plastidic Glucose 6-Phosphate/Phosphate translocator GPT1 is essential for pollen maturation and embryo sac development. *Plant Cell*, 17: 760-775.

Ng, D., Spear, E. y Walter, P. (2000) The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *J. Cell Biol*, 150: 77-88.

Norambuena, L., Marchant, L., Berninsone, P., Hirschberg, C., Silva, H. and Orellana, A. (2002) Transport of UDP-Galactose in plants. *JBC*, 277: 32923-32929.

Norambuena, L., Nilo, R., Handford, M., Reyes, F., Marchant, L., Meisel, L. y Orellana, A. (2005) AtUTR2 is an *Arabidopsis thaliana* nucleotide sugar transporter located in the Golgi apparatus capable of transporting UDP-galactose. *Planta*. 2005, 222: 521-529

Park, S., Howden, R. y Twell, D. (1998) The *Arabidopsis thaliana* gametophytic mutation *gemin1 pollen 1* disrupt microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate. *Development*, 125: 3789-3799.

Parodi, A., Mendelzong, D., Lederkremer, G. y Martin-Barrientos, J. (1984) Evidence That Transient Glucosylation of Protein-linked  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ , and  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  Occurs in Rat Liver and *Phaseolus vulgaris* Cells. *JBC*, 259: 6351-6357.

Parodi, A. (2000) Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem*, 69:69-93.

Parker, C.G., Fessler, L.L., Nelson, R.E., Fessler, J.H. (1995) *Drosophila* UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase: sequence and characterization of an enzyme that distinguishes between denatured and native proteins. *EMBO J*, 14: 1294-1303.

Patil, C. y Walter, P. (2001) Intracellular signaling from the ER to the nucleus: the UPR in yeast and mammals. *Curr. Op.Cell Biol*, 13: 349-356.

Ritter, C. y Helenius, A. (2000) Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-Glucose: glycoprotein glucosyltransferase. *Nat. Struc. Biol*, 7: 278-280.



- Rollwitz, L., Santaella, M., Hille, D., Flugge, U.I. y Fischer, K. (2006) Characterization of AtNST-KT1, a novel UDP-galactose transporter from *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters, 580: 4246-4251.
- Rutkowsky, T. y Kaufman, R. (2004) A trip to the ER: coping with stress. Trends in Cell Biol, 14: 20-28.
- Schiott, M., Romanowsky, S.M., Baekgaard, L., Jakobsen, M.K., Palmgren, M.G. y Harper, J.F. (2004) A plant plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. PNAS, 101: 9502-9507.
- Schneidereit, A., Scholz-Starke, J., Sauer, N. y Buttner, M. (2005) AtSTP11, a pollen tube-specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis*. Planta, 221: 48-55.
- Schoenfeld, T. (1995) DNA purification: Effects of bacterial strains carrying the endA1 genotype on DNA quality isolated with Wizard plasmid purification systems. Promega Notes 53, 12.
- Sidrauski, C., Chapman, R. y Walter, P. (1998) The UPR: an intracellular signalling pathway with many surprising features. Trends. Cell. Biol, 8: 245-249.
- Sousa, M., Ferrero-García, M. y Parodi, A. (1992) Recognition of the Oligosaccharide y protein moieties of Glycoproteins by the UDP-Glc:Glycoprotein Glucosyltransferase. Biochemistry, 31: 97-105.
- Sousa, M. y Parodi, A. (1995) The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. The EMBO Journal, 14: 4196-4203.
- Sprong, H., Degroote, S., Nilsson, T., Kawakita, M., Ishida, N., Van der Sluijs, P. y Van Meer, G. (2003). Association of the Golgi UDP-Galactose Transporter with UDP-Galactose:Ceramide Galactosyltransferase Allows UDP-Galactose Import in the Endoplasmic Reticulum. Molecular Biology of the Cell, 14: 3482-3493.
- Steinebrunner, I., Jeter, C., Song, C. y Roux, S. (2000) Molecular and biochemical comparison of two different apyrases from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol Biochem 38: 913-922
- Steinebrunner, I., Wu, J., Sun, Y., Corbett, A., y Roux, S. (2003) Disruption of Apyrases Inhibits Pollen Germination in *Arabidopsis*. Plant phys. 131: 1638-1641.
- Steinhauser, D., Usadel, B., Luedemann, A., Thimm, O. y Kopka, J. (2004) CSB.DB: a comprehensive system-biology database. Bioinformatics, 20: 3647-3651.
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T. y Fujiwara, T. (2002) *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. Nature 420: 337-340.

- Tessier, D., Dignard, D., Zapun, A., Radomska-Pandya, A., Parodi, A., Bergeron, JM. y Thomas, D. (2000) Cloning and characterization of mammalian UDP-Glucose glycoprotein: Glucosyltransferase and the development of a specific substrate for this enzyme. *Glycobiology* 10: 403-412.
- Trombetta, S. y Parodi, A. (1992) Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-Glucose:Glycoprotein Glucosyltransferase. *JBC*, 267: 9236-9240.
- Trombetta, S., Simons, J. y Helenius, A. (1996) Endoplasmic Reticulum Glucosidase II Is Composed of a Catalytic Subunit, Conserved from Yeast to Mammals, and a Tightly Bound Noncatalytic HDEL-containing Subunit. *JBC*, 271:27509-27516.
- Trombetta, S. y Parodi, A. (2003) Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 19:649-676.
- Uccelletti, D., O'Callaghan, C., Berninsone, P., Zemtseva, I., Abeijon, C. y Hirschberg, C. (2004) *ire-1*-dependent transcriptional Up-regulation of a luminal uridine diphosphatase from *Caenorhabditis elegans*. *JBC*, 279: 273-
- Urade, R. (2007) Cellular response to unfolded proteins in the endoplasmic reticulum of plants. *FEBS J*, 274: 1152-1171.
- Vitale, A. y Ceriotti, A. (2004) Protein quality control mechanisms y protein storage in the ER. A conflict of interests? *Plant Phys*, 136: 3420-3426.
- Woeste, KE. y Kieber, JJ. (2000) A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell* 12: 443-455.
- Xiang, C., Wang, H., Shiel, P., Berger, P. y Guerra, DJ. (1994) A modified alkaline lysis miniprep protocol using a single microcentrifuge tube. *Biotechniques* 17: 30-32.
- Yadegari, R. y Drews, G. (2004) Female Gametophyte Development. *Plant cell*, 16: S133-S141.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. y Mori, K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881-891.
- Waldman, BC. y Rudnick, G. (1990) UDP-GlcNAc transport across the Golgi membrane: electroneutral exchange for dianionic UMP. *Biochemistry*, 26: 44-52.
- Werner ED, Brodsky JL, McCracken AA. (1996) Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *PNAS*, 93: 13797-13.

**Este trabajo de tesis fue realizado gracias al financiamiento de:**

**Beca de doctorado CONICYT**

**Proyectos FONDECYT: 1030551 y 1070379**

**Proyectos Núcleo Milenio Biología Celular Vegetal: PCB P02-009F y PCB P06-065F**