



**“*Saccharomyces cerevisiae* como sistema heterólogo para el estudio de potenciales transportadores de GDP-fucosa de *Arabidopsis thaliana*”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**ROBERTO ANDRÉS BASTÍAS ROMO**

Dr. Ariel Orellana López  
Director de Memoria de Título

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

**Comisión de Evaluación de la Memoria de Título**

Dr. Marco Tulio Nuñez González  
Presidente Comisión

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dr. Daniel Wolff Fernández  
Profesor corrector

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.



Santiago de Chile, 29 julio 2005

UCH-FC  
Biotecnología  
B326  
C-1

ESCUELA DE PREGRADO -- FACULTAD DE CIENCIAS -- UNIVERSIDAD DE CHILE



**“*Saccharomyces cerevisiae* como sistema heterólogo para el estudio de potenciales transportadores de GDP-fucosa de *Arabidopsis thaliana*”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**ROBERTO ANDRÉS BASTÍAS ROMO**

Dr. Ariel Orellana López  
Director de Memoria de Título

\_\_\_\_\_

**Comisión de Evaluación de la Memoria de Título**

Dr. Marco Tulio Nuñez González  
Presidente Comisión

\_\_\_\_\_

Dr. Daniel Wolff Fernández  
Profesor corrector

\_\_\_\_\_



Santiago de Chile, \_\_\_\_\_ 2005



### ***-Just Do it!!***

Soy Roberto Bastías, nací en Santiago el 19 de diciembre de 1979. Soy el mayor de 3 hermanos. Mis primeros años los pase jugando en un barrio de San Joaquín y estudiando en el colegio Pío XII. A los 7 años nos mudamos junto a mi familia a Maipú, en ese entonces una comuna joven y aislada. El cambio trajo consigo nuevas amistades y un nuevo colegio, El Carolina Llonca de Cuevas donde estude hasta sexto básico. Terminé mi enseñanza básica en el colegio San José.

Mi enseñanza media la curse en el Liceo de Aplicación. En este periodo viví experiencias muy enriquecedoras y cultive amistades que hasta hoy perduran. Además, fue en estos años cuando adquirí interés por la biología y la ciencia en general, lo que me llevo luego a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile. Etapa que hoy felizmente concluye, luego de gran sacrificio y esfuerzo, el cual me llena de orgullo y optimismo respecto a los nuevos desafíos que afrontaré en mi futuro.

## Agradecimientos

A mi familia y Bárbara por brindarme todo su amor, apoyo y comprensión en estos años de trabajo.

A Ariel por ser mi tutor y guiarme en mi trabajo a través de sus críticas y enseñanzas.

Al los integrantes y ex-integrantes del grupo A. O. en especial a Lorena Norambuena por guiarme y enseñarme en mis primeros pasos en el laboratorio.

A la gente del Laboratorio de Genética Molecular Vegetal por toda lá buena onda y por hacer más gratas mis horas de trabajo.





## Índice General

página

### Índice de Figuras y Tablas

### Lista de Abreviaturas

### Resumen

### Summary

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. HIPÓTESIS</b>	5
<b>3. OBJETIVOS</b>	5
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	6
4.1. Material biológico.	6
4.2. Reactivos.	6
4.3. Medios de cultivo.	6
4.4. Reacción de PCR.	7
4.5. Obtención de <i>E. coli</i> competentes.	8
4.6. Transformación de <i>E. coli</i> .	8
4.7. Obtención de levaduras competentes.	9
4.8. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> .	9
4.9. Obtención de fracciones microsomales de levaduras.	9
4.10. Medición de proteínas.	10
4.11. Detección de las proteínas AtGTr1 y AtGTr2.	10
4.12. Preparación de extracto crudo de Liticasa.	11
4.13. Preparación de fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi de <i>S. cerevisiae</i> .	12
4.14. Integridad de vesículas de Golgi de levaduras.	13
4.15. Ensayos de transporte de NDP-azúcares en vesículas de Golgi de levaduras.	14
4.16. Determinación de volúmenes de vesículas para cálculos de Si.	15

4.17. Permeabilización de vesículas de Golgi con Triton X-100.	16
4.18. Análisis de metabolitos solubles al interior de las vesículas de Golgi por medio de HPLC.	16
4.19. Complementación de levaduras mutante <i>vrg4</i> .	16
<b>5. RESULTADOS</b>	17
5.1 Análisis del transporte endógeno de GDP-fucosa en vesículas aisladas de levaduras.	17
5.1.1. Análisis del transporte endógeno de GDP-fucosa en vesículas aisladas de levaduras silvestres.	17
5.1.1.1. Dependencia de temperatura del transporte de GDP-fucosa en levaduras.	17
5.1.1.2. Efecto de Triton X-100 en el transporte de GDP-fucosa.	18
5.1.1.3. Análisis por medio de HPLC de los sustratos incorporados en los experimentos de transporte.	19
5.1.1.4. Efecto de competencia con GDP-manosa en el transporte de GDP-fucosa.	20
5.1.2. Análisis del transporte de GDP-fucosa en levaduras mutantes en el gen VRG4.	21
5.1.2.1. Comparación del transporte de GDP-manosa entre levaduras silvestres y una mutante en el gen VRG4.	21
5.1.2.2. Comparación del transporte de GDP-fucosa en vesículas de Golgi de levaduras silvestre y levaduras mutantes en el gen VRG4.	22
5.1.2.3. Análisis por medio de HPLC de los sustratos incorporados en los experimentos de transporte en vesículas provenientes de mutante <i>vrg4</i> .	23
5.2. Identificación de genes homólogos al transportador de GDP-fucosa de <i>Homo sapiens</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	25
5.2.1 Análisis bioinformático de las secuencias seleccionadas AtGTr1 y AtGTr2.	26



5.2.2. Análisis de la expresión de los genes AtGTr1 y AtGTr2 a partir de información de affymetrix obtenida en bases de datos públicas.	28
5.3. Expresión heteróloga de AtGTr1 y AtGTr2 en levaduras <i>S. cerevisiae</i> .	29
5.3.1. Clonamiento de AtGTr1 y AtGTr2 en vector de expresión en levaduras.	29
5.3.2. Análisis de acumulación de las proteínas AtGTr1-myc y AtGTr2-myc en membranas de levaduras silvestres.	31
5.4. Análisis de actividad bioquímica de la proteína AtGTr2 en levaduras.	33
5.4.1. Análisis de actividad bioquímica de la proteína AtGTr2 en levaduras silvestres.	33
5.4.1.1. Capacidad de transporte de GDP-fucosa de AtGTr2.	33
5.4.1.2. Capacidad de transporte de UDP-galactosa y UDP-glucosa de AtGTr2.	34
5.4.2. Análisis de actividad bioquímica de AtGTr2 en levadura mutante <i>vrg4</i> .	35
5.5. Análisis de reversión de fenotipo mutante de levaduras mutante <i>vrg4</i> mediante complementación con AtGTr2.	36
<b>6. DISCUSIÓN</b>	37
6.1 Implicancias de transporte de GPD-fucosa en levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	37
6.2 ¿Son las proteínas AtGTrs transportadores de nucleótidos azúcar?	39
6.3 Rol biológico de AtGTr2.	41
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	44



## Índice de figuras y tablas

<b>Figura 1.</b> Modelo propuesto para la síntesis de polisacáridos en el Aparato de Golgi.	2
<b>Figura 2.</b> Ensayo de actividad de Liticasa.	12
<b>Figura 3.</b> Efecto de la temperatura en el transporte de GDP-fucosa.	17
<b>Figura 4.</b> Efecto de Triton X-100 en transporte de GDP-fucosa.	18
<b>Figura 5.</b> Radioactividad asociada a fracciones obtenidas por separación con HPLC de metabolitos incorporados en ensayos de transporte.	19
<b>Figura 6.</b> Competencia del transporte de GDP-fucosa con GDP-manosa.	20
<b>Figura 7.</b> Comparación del transporte de GDP-manosa en vesículas de Golgi obtenidas desde levaduras silvestre y levaduras mutante en <i>vrg4</i> .	21
<b>Figura 8.</b> Comparación del transporte de GDP-fucosa entre levadura silvestre y levadura mutante <i>vrg4</i> .	22
<b>Figura 9.</b> Radioactividad asociada a fracciones obtenidas por separación con HPLC de metabolitos incorporados en ensayos de transporte con vesículas provenientes de levaduras silvestres y levaduras mutantes <i>vrg4</i> .	24
<b>Figura 10.</b> Alineamiento de secuencias aminoacídicas de AtGTr1, AtGTr2, HuGFtr de humano y CeGFtr de <i>C. elegans</i> .	26
<b>Figura 11.</b> Modelo topológico de las proteínas AtGTr.	27
<b>Figura 12.</b> Expresión de genes AtGTr1 y AtGTr2.	28
<b>Figura 13.</b> Patrón de restricción de constructos AtGTr1 y AtGTr2.	30
<b>Figura 14.</b> Acumulación de proteína AtGTr2 en <i>S. cerevisiae</i> .	32
<b>Figura 15.</b> Ensayo de transporte de GDP-fucosa en levaduras silvestres que expresan AtGTr2.	34
<b>Figura 16.</b> Transporte de UDP-glucosa y UDP-galactosa en vesículas que expresan AtGTr2.	34
<b>Figura 17.</b> Transporte de GDP-fucosa en vesículas de levaduras mutantes <i>vrg4</i> transformadas con AtGTr2.	35
<b>Figura 18.</b> Ensayo de sensibilidad a Higromicina B en levadura mutante <i>vrg4</i> .	36





<b>Figura 19.</b> Árbol filogenético de TNAs y genes similares a TNAs.	43
<b>Tabla 1.</b> Acumulación de GDP-fucosa en vesículas de levadura	15
<b>Tabla 2.</b> Putativos transportadores de GDP-fucosa de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	25

## Lista de abreviaturas

- TNA : Transportador de Nucleótidos Azúcar
- NDP : Nucleósido difosfato
- NMP : Nucleósido Monofosfato
- UDP : Uridina difosfato
- GDP : Guanosina difosfato
- GMP : Guanosina monofosfato
- Glc : Glucosa
- Gal : Galactosa
- fuc : Fucosa
- man : Manosa
- aa : Aminoácidos
- pb : Pares de bases
- PCA : Ácido perclórico
- PEG : Polietilenglicol
- DMSO : Dimetilsulfóxido
- DIDS : Ácido 4,4'-diisotiocianato-estilbeno-2,2'-disulfónico (4,4'-diisothiocyanostilbene- 2,2'-disulfonic acid)
- DTT : Ditiotreitól
- EDTA : Acido Etileno Diamino Tetracético (ethylenediaminetetraacetic acid)
- PCR : Reacción en cadena de la polimerasa.
- min : Minutos
- PM : Peso Molecular
- DO<sub>600</sub> : Densidad óptica a 600 nm
- EST : Expressed sequence tag (etiqueta de secuencia expresada)
- VRG4 : Vanadate resistant glycosilation mutant # 4 (mutante # 4 en glicosilación resistente a vanadato)
- mut. : Mutante
- EST : Marcador de secuencias expresadas (expressed sequence tags)

## Resumen

Los transportadores de nucleótidos azúcar (TNA) son proteínas que permiten la entrada de estos sustratos que participan en la síntesis de glicoproteínas, glicolípidos y polisacáridos en el aparato de Golgi. La levadura ha sido ampliamente utilizada para realizar estudios de expresión funcional de genes que codifican potenciales TNAs de otras especies, dado que esencialmente transporta GDP-manosa y UDP-glucosa para sus diferentes reacciones de glicosilación. Evidencias obtenidas de la literatura y resultados previos obtenidos en el laboratorio sugieren que en vesículas de Golgi de *Saccharomyces cerevisiae* también existiría una actividad de transporte de GDP-fucosa.

En esta tesis se investigó la capacidad de la levadura de transportar GDP-fucosa *in vitro* y se encontró que en fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi existe una actividad de transporte de GDP-fucosa que es dependiente de temperatura y sensible a la acción de detergentes como Triton X-100. El análisis por HPLC de los metabolitos incorporados a las vesículas en los ensayos de transporte, reveló que la marca radioactiva incorporada a las vesículas correspondía efectivamente a GDP-fucosa. Ensayos de competencia con GDP-manosa indicaron que la actividad de transporte de GDP-fucosa disminuye en presencia de este sustrato. Este resultado sugiere que el transportador de GDP-manosa de levadura VRG4p además es capaz de transportar GDP-fucosa. Para evaluar esta hipótesis, se comparó la actividad de transporte de GDP-fucosa y GDP-manosa en levaduras silvestres y levaduras que tienen una mutación puntual en VRG4 lo que resulta en la actividad disminuida de la proteína. Se observó que la mutante presenta una disminución del transporte de ambos sustratos. Estos resultados indican que el transportador de GDP-manosa VRG4p, es capaz de transportar GDP-fucosa *in vitro*, lo que resulta especialmente interesante debido a que en la levadura no existen reacciones de fucosilación. Sin embargo, la actividad de transporte de GDP-fucosa, debido a su bajo nivel, no debería interferir con la actividad de un transportador específico para GDP-fucosa expresado heterológamente en levadura.

Además se investigó la presencia de transportadores de GDP-fucosa en plantas. Utilizando la secuencia del transportador de GDP-fucosa de humano y el programa BLAST, se encontró en el genoma de *Arabidopsis* dos genes homólogos a este transportador. AtGTr1 y AtGTr2 que cumplen con criterios comunes para los TNAs descritos hasta la fecha, además según datos de affimetrix presentes en Internet ambos genes son expresados en *Arabidopsis*. Estos datos sumados a las pruebas de existencia de transporte de GDP-fucosa en plantas nos hace pensar que estos genes podrían codificar para transportadores de GDP-fucosa de *Arabidopsis thaliana*. Ambos genes fueron subclonados a partir de ESTs con el fin de expresarlos heterológamente en levaduras y así analizar su especificidad como TNAs. Solo fue posible detectar la expresión de la proteína AtGTr2. Ensayos de transporte realizados en fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi de levaduras que expresan esta proteína de membrana indican que esta sería capaz de transportar GDP-fucosa, sin embargo, no en los niveles esperados para un transportador específico para este sustrato. Estudios con UDP-glucosa y UDP-galactosa revelan que AtGTr2 no utiliza estos nucleótidos azúcar como sustrato. Además un análisis de complementación del fenotipo mutante de la levadura *vrg4* sensible a higromicina B sugiere que AtGTr2 tampoco sería capaz de transportar GDP-manosa.

Los resultados obtenidos en esta tesis revelan que efectivamente existe una actividad de transporte de GDP-fucosa en el aparato de Golgi de *Saccharomyces cerevisiae* y que el responsable de esta actividad sería el transportador de GDP-manosa VRG4p. Además, AtGTr2, uno de los genes de *Arabidopsis thaliana* identificados en este estudio tendría la capacidad de transportar GDP-fucosa.

## Summary

Nucleotides sugar transporters (TNA) are proteins that allow substrates to enter into the Golgi apparatus for the synthesis of glycoproteins, glycolipids and polysaccharides. *Saccharomyces cerevisiae* has been widely used to perform studies of functional expression of putative genes that code for TNAs of other species, because essentially it transports only GDP-mannose and UDP-glucose for its different glycosylation reactions. Published results and evidence from our laboratory suggest that transport activity of GDP-fucose exists in vesicles of Golgi of *Saccharomyces cerevisiae*. In this work the capacity of yeast to transport GDP-fucose *in vitro* was analyzed. It was found that in fractions enriched in Golgi vesicles a temperature dependent transport activity of GDP-fucose exists which is sensitive to the action of detergents such as Triton X-100. In addition, HPLC analysis of the metabolites incorporated into the vesicles in the transport assay, showed that the incorporated radioactive label inside the vesicles did indeed correspond to GDP-fucose. Competition assays with GDP-mannose indicated that the activity of GDP-fucose transport decreases in the presence of this substrate. Therefore, it was proposed that the yeast GDP-mannose transporter VRG4p is also able to transport GDP-fucose. In order to evaluate this hypothesis, the transport activity of GDP-fucose and GDP-mannose in wild type yeast and in yeast that has a point mutation in VRG4 which results in a decrease in transport activity, was compared. It was observed that the mutant presents a reduction in the transport of both substrates. These results suggest that the GDP-mannose transporter VRG4p, is able to transport GDP-fucose *in vitro*, which is particularly interesting because in yeast fucosylation reactions do not exist. Nevertheless the endogenous level of GDP-fucose transport exhibited in yeast would not be an impediment for using this microorganism as a tool for studying GDP-fucose transporters from other organisms.

Finally using the sequence of the human GDP-fucose transporter and the program BLAST, two homologous genes to this transporter were found in the genome of *Arabidopsis thaliana*. AtGTr1 and AtGTr2 which possess characteristics typical of the TNAs described until now. In addition, according to affimetrix data present in Internet both genes are expressed in *Arabidopsis*. These data added to the evidence of the

existence of GDP-fucose transport in plants made us think that these genes could code for *Arabidopsis* GDP-fucose transporters.

Both were subcloned from ESTs with the purpose of expressing them heterologously in yeast and thus analyze their specificity as TNAs, however it was only possible to detect the expression of AtGTr2. Transport assays using fractions enriched in yeast Golgi vesicles that express this protein indicate that AtGTr2 is able to transport GDP-fucose, but not in the levels expected for a specific transporter for this substrate. Studies with UDP-glucose and UDP-galactose reveal that AtGTr2 does not use these nucleotide sugars as substrate.

In addition, the inability of AtGTr2 to complement the sensitivity of *vrg4* yeast to Hygromycin B indicates that this *Arabidopsis* TNA is unable to transport GDP-mannose.

The results obtained in this work reveal the existence of GDP-fucose transport activity in the Golgi apparatus of *Saccharomyces cerevisiae* and that the GDP-mannose transporter VRG4p is responsible for this activity. In addition, AtGTr2, one of the identified genes of *Arabidopsis thaliana* in this study has the capacity to transport GDP-fucose.

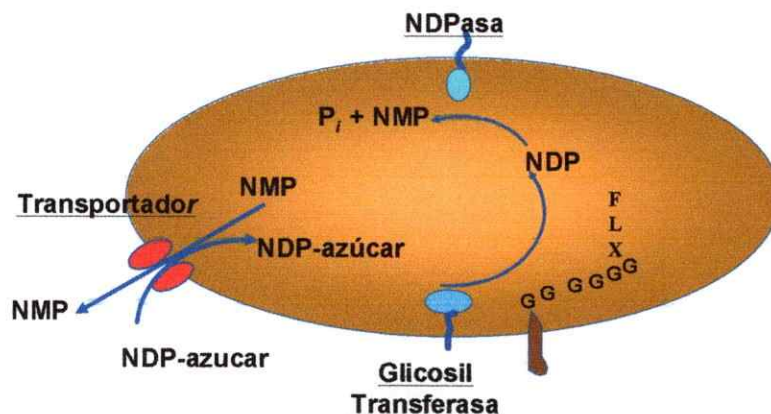
## 1. Introducción

Una serie de procesos en los que se produce una transferencia de azúcares desde nucleótidos azúcar a aceptores ocurren en el aparato de Golgi. Aunque las reacciones que conducen a la glicosilación de proteínas, síntesis de proteoglicanos, esfingolípidos y polisacáridos de la pared celular de plantas se llevan a cabo en el lumen de este organelo, sin embargo, la mayoría de los nucleótidos azúcar (NA) utilizados por las enzimas que participan en la síntesis de estos glicoconjugados y/o polisacáridos son sintetizados en el citosol. Por lo tanto, los NA deben ser transportados al interior del aparato de Golgi antes de que sean utilizados. Esta restricción topológica hace necesaria la presencia de proteínas transportadoras en la membrana del Golgi capaces de incorporar los NA al sitio donde son utilizados. Estas proteínas se conocen con el nombre de transportadores de nucleótidos azúcar (TNA).

El transporte de nucleótidos azúcar ha sido detectado bioquímicamente en vesículas de tejidos de mamíferos y líneas celulares de levaduras, protozoos y plantas. Entre sus características se cuentan la dependencia de temperatura y la saturabilidad a concentraciones que están en el rango de concentraciones micromolar. El clonamiento de algunos TNAs arrojó información adicional sobre estas proteínas. Su peso molecular aproximado es de 35 kDa y el análisis de la hidrofobicidad de su secuencia aminoacídica ha permitido predecir la presencia de una serie de segmentos de transmembrana (Berninsone y Hirschberg 2000). Estudios bioquímicos y genéticos han suministrado evidencia que indica que estos transportadores actúan como contratransportadores, donde la entrada del nucleótido azúcar al lumen del organelo está asociada a la salida del nucleótido monofosfato correspondiente. (Hirschberg y col. 1998).

Los TNAs han sido reconocidos como un elemento importante de la maquinaria responsable de la glicosilación y síntesis de polisacáridos puesto que son los mediadores del traspaso de los nucleótidos azúcar al lumen del aparato de Golgi, sitio donde se encuentra el sitio activo de las glicosiltransferasas. Una vez adentro, el nucleótido azúcar es captado por una glicosiltransferasa específica que transfiere el azúcar al aceptor

correspondiente. Adicionalmente, el nucleótido difosfato liberado es utilizado por una nucleósido difosfatasa (NDPasa), enzima que lo hidroliza generando nucleósido monofosfato y fósforo inorgánico ( $P_i$ ). El nucleósido monofosfato es movilizado hacia el citoplasma por el transportador del nucleótido azúcar correspondiente (Hirschberg y col. 1998), por lo que los TNAs corresponden a intercambiadores.



**Figura 1. Modelo propuesto para la glicosilación en el Aparato de Golgi.** El esquema muestra una sección de una cisterna del aparato de Golgi con sus componentes básicos. (Detalles en el texto).

Al ser los encargados de proporcionar el sustrato para las glicosiltransferasas se cree que los transportadores de nucleótidos azúcar cumplen un papel fundamental en la regulación de la síntesis de polisacáridos en plantas y glicosilación de proteínas. Esta idea está apoyada en el descubrimiento de mutantes en diferentes especies que poseen defectos en glicosilación causados por alteraciones en TNAs. Esto también ha facilitado enormemente el descubrimiento de nuevos transportadores, ya que, por medio de complementación de mutantes se ha logrado clonar varias de estas proteínas. Este es el caso de LPG2, un transportador de GDP-manosa proveniente del protozoo *Leishmania donovani*, el que *in vitro*, además es capaz de transportar GDP-fucosa y GDP-arabinosa (Hong y col. 2000). Esta singular capacidad de transportar más de un nucleótido azúcar no es compartida por todos los TNAs, por lo tanto al identificar un potencial TNA es importante conocer cuál es la especificidad del TNA identificado. Este aspecto es de



suma importancia para entender el papel de estas proteínas en las reacciones de glicosilación que ocurren en el aparato de Golgi. Además es especialmente interesante para nuestro laboratorio debido a que los principales esfuerzos de nuestro trabajo están enfocados en la búsqueda y caracterización de TNAs de *Arabidopsis thaliana*.

La caracterización funcional de un gen que codifica para un potencial TNA se realiza a través de un ensayo de transporte, utilizando la expresión de la proteína en un sistema heterólogo y aislando posteriormente vesículas que poseen el putativo TNA, las que posteriormente son utilizadas para medir la especificidad del TNA. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido ampliamente utilizada para realizar la caracterización funcional de genes que codifican para potenciales TNAs de otras especies. Una de las razones para usar esta levadura está dada porque, esencialmente transporta GDP-manosa y UDP-glucosa para sus diferentes reacciones de glicosilación en el aparato de Golgi y retículo endoplasmático(RE). El transporte de UDP-glucosa en el RE juega un papel primordial en la síntesis de  $\beta$ -1,6-glucanos, uno de los principales componentes de la pared celular de levadura (Castro y col. 1999), mientras que GDP-manosa es el sustrato utilizado por manosiltransferasas encargadas de glicosilar lípidos y proteínas en el aparato de Golgi. El gen VRG4 de la levadura ha sido identificado como el transportador de GDP-manosa de levadura, único proveedor de sustrato requerido para la glicosilación de proteínas en el Golgi, por lo tanto, es un gen esencial y su ausencia es letal para las levaduras. (Dean y col. 1997).

Estudios bioquímicos han entregado evidencia de que existe transporte de GDP-fucosa en vesículas de Golgi de arvejas, el que además es inhibido por GMP y DIDS, conocidos inhibidores de transportadores de GDP-azúcar (Wulff y col. 2000). Estos resultados sugieren fuertemente que en plantas existen transportadores de GDP-fucosa, sin embargo, hasta el momento solo se han logrado identificar y caracterizar funcionalmente genes de *Arabidopsis thaliana* que codifican para transportadores de UDP-azúcares (Norambuena y col., 2002; Bakker y col., 2004) y un transportador de GDP-manosa (Baldwin y col., 2000). Hace algunos años se describió un gen humano que codifica para un transportador de GDP-fucosa (Lübke y col. 2001; Lühn y col 2001), por lo tanto, a partir de la secuencia de este TNA y utilizando el programa BLAST, hemos identificado

dos genes de *Arabidopsis thaliana* que presentan homología a este TNA humano. Con el fin de caracterizar estos genes de potenciales transportadores de GDP-fucosa nos propusimos realizar la caracterización funcional de ellos a través de la expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura no utiliza GDP-fucosa en sus reacciones de glicosilación, lo que la hace una buena herramienta en el estudio de putativos transportadores de GDP-fucosa. Existen, sin embargo, estudios en levadura que registran actividad de transporte *in vitro* de sustratos que no son utilizados por este microorganismo (Muraoka y col. 2001; Bakker y col. 2005). Además, al realizar una búsqueda en el genoma de *S. cerevisiae* de genes homólogos al transportador de GDP-fucosa de humano (Lübke y col. 2001; Lühn y col 2001) se encontró que el gen que codifica para el transportador de GDP-manosa VRG4p, es el más semejante a nivel aminoacídico. Este resultado nos llevo a pensar que VRG4p podría tener la capacidad de transportar GDP-fucosa. De esta forma, previo a la caracterización funcional de los potenciales transportadores de GDP-fucosa de *Arabidopsis* nos planteamos realizar una caracterización más acabada de la capacidad de las vesículas de Golgi de levaduras de transportar GDP-fucosa *in vitro*.

## 2. Hipótesis

- 1.- El transportador de GDP-manosa VRG4p de Golgi de *Saccharomyces cerevisiae* puede transportar GDP-fucosa *in vitro*.
- 2.- Los genes At1g12500 (AtGTr1) y At5g05820 (AtGTr2) de *Arabidopsis thaliana* codifican para transportadores de GDP-fucosa.

## 3. Objetivos

### **Objetivo General:**

Estudiar el transporte de GDP-fucosa en levaduras control y transformadas con genes de *Arabidopsis thaliana* que codifican para potenciales transportadores de GDP-fucosa.

### **Objetivos Específicos:**

- 1.- Estudiar el transporte de GDP-fucosa en vesículas de Golgi de levadura.
- 2.- Identificación y clonamiento de los genes AtGTr1 y AtGTr2 de *Arabidopsis thaliana*.
- 3.- Caracterización funcional de los genes AtGTr1 y AtGTr2.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Material biológico

En las técnicas de biología molecular se utilizó la bacteria *E. coli* cepa DH5- $\alpha$ , su cultivo se realizó en medio LB a 37 °C. Mientras que para los ensayos bioquímicos se utilizó la levadura silvestre cepa RSY255 (Mat $\alpha$  Ura3-52, leu2-211) y la levadura mutante *vrg4* cepa NDY5 (Mat $\alpha$  Ura3-52, leu2-211, *vrg4-2*), donadas por la Dra. Neta Dean, del Departamento de Bioquímica y Biología del Estado de Nueva York en Stony Brooks, Nueva York (Poster y Dean, 1997). La selección y el crecimiento de levaduras transformantes se realizó en medio mínimo sólido o líquido a 30 °C. Para la obtención de vesículas enriquecidas con Aparato de Golgi, las levaduras se cultivaron en Medio Sintético Completo (SCM) a 30 °C. El crecimiento de los cultivos se monitoreó a través de la densidad óptica de alícuotas diluidas, las que luego fueron medidas en un espectrofotómetro (Lambda EZ201 Perkin Elmer).

### 4.2. Reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron todos de grado analítico y comercializados por las empresas Sigma, GIBCO-BRL y Merck.

Los sustratos radioactivos GDP-[<sup>3</sup>H]fucosa (fucosa-2-[<sup>3</sup>H](N)) (17,5Ci/mmol), GDP-[<sup>3</sup>H]manosa (manosa-2-[<sup>3</sup>H](N)) (17,5Ci/mmol), UDP-[<sup>3</sup>H]galactosa (galactosa-1-[<sup>3</sup>H](N)) (5,15Ci/mmol), UDP-[<sup>3</sup>H]glucosa (glucosa-6-[<sup>3</sup>H]) (15,7Ci/mmol) fueron obtenidos de NEN.

### 4.3. Medios de cultivo

LB líquido: Extracto de levadura 0,5%, Triptona 1%, NaCl 1%

LB sólido: Extracto de levadura 0,5%, Triptona 1%, NaCl 1%, Agar 1,5%

YPD líquido: Extracto de levadura 1%, Triptona 2%, glucosa 2%, KCl 0,5M,  
adenina 40  $\mu$ g/ml.

YPD sólido: Extracto de levadura 1%, Triptona 2%, glucosa 2%, adenina 40  $\mu$ g/ml,  
agar 1,5%.

Medio mínimo líquido: Base nitrogenada de levadura (YNB) 0,17%, sulfato de amonio 0,5%, glucosa 2%, KCl 0,5M, adenina 40µg/ml, triptofano 40µg/ml, leucina 60µg/ml, lisina 30µg/ml, histidina 20µg/ml.

Medio mínimo sólido: Agar 1,5%, base nitrogenada de levadura (YNB) 0,17%, sulfato de amonio 0,5%, glucosa 2%, KCl 0,5M, adenina 40µg/ml, triptofano 40µg/ml, leucina 60µg/ml, lisina 30µg/ml, histidina 20µg/ml

Medio sintético completo: Base nitrogenada de levadura (YNB) 0,67%, glucosa 2%, SCM-URA 0,2. En el que no se ha incluido uracilo.

#### 4.4. Reacción de PCR

Se utilizó como templado 10 a 100 ng de ADN plasmidial, los cuales se agregaron a una solución conteniendo 10 picomoles de partidores previamente diseñados y 0,2 mM dNTPs. Se diseñaron partidores específicos para los extremos de cada gen. A los partidores 5' se les agregó el sitio de restricción BglII, mientras que a los partidores 3' se les modificó el codón de término de la traducción para dejarlo en marco de lectura con un epitome myc incluido en el vector utilizado, y además se le agregó el sitio NotI que fue utilizado en el clonamiento. Las secuencias de los partidores son las siguientes:

AtGTr1

Partidor 5'

5'CGC CCC TAT CAG ATC TAT GGT TGA AGC T 3'

Partidor 3'

5'AAT CTT TCT CTT CGC GGC CGC AAC TTC TGG TTT A 3'

AtGTr2

Partidor 5'

5' ACC GAG AGA TCT CCA TCT CCT 3'

Partidor 3'

5' GTG TGT TGC GGC CGC AAA TTT TTG TT 3'

La enzima utilizada fue Pfu DNA polimerasa, la solución contenía 2 mM MgSO<sub>4</sub>, además del tampón correspondiente a la enzima en uso en concentración 1X. La reacción se lleva a cabo realizando 35 ciclos y con una temperatura de apareamiento de 52 °C. El termociclador utilizado fue MJ research modelos PTC-100 y Minicycler.

#### **4.5. Obtención de *E. coli* competentes**

Las células se prepararon según Inoue *et al.*, 1990. A partir de una colonia individual de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se inocularon 3 mL de medio LB y se incubaron a 37 °C por 16 horas con agitación de 250 rpm. Se agregó 1 mL de este cultivo a un volumen de 250 mL de medio LB, el cual se creció a 25°C hasta una D.O.<sub>600</sub> de 0,6. Se incubó por 10 minutos en hielo, y se transfirió a un tubo de centrifuga previamente frío. Se centrifugó a 2.500 g por 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 20 mL de tampón TB previamente frío (preparado con una solución 10 mM PIPES; 15 mM CaCl<sub>2</sub>; 250 mM KCl ajustando a pH 6,7 con 5N KOH y agregando MnCl<sub>2</sub> hasta una concentración de 55 mM). Se centrifugó nuevamente a 2.500xg por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en tampón TB frío. Se agregó DMSO hasta una concentración del 7% y se separaron alícuotas de 200  $\mu$ L en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL fríos. Estos se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C.

#### **4.6. Transformación de *E. coli*.**

El procedimiento se realizó según Inoue *et al.*, 1990. Se incubaron en hielo por 30 minutos, 50  $\mu$ L de células competentes con aproximadamente 10 ng de ADN plasmidial (en volumen de 1  $\mu$ L). Se transfirió a 37 °C por 5 minutos. Se enfrió en hielo, por 1 minuto. Se agregó 1 mL de medio LB, y se dejó a 37 °C con agitación de 250 rpm, por 1 hora. Terminado este tiempo, se colectaron las células por centrifugación por un período de 20 segundos a 10.000xg, y se descartó el sobrenadante mediante inversión suave del tubo, lo cual deja un remanente de

aproximadamente 100  $\mu$ L. Las células se resuspendieron por pipeteo suave, y se plaquearon en LB-agar, suplementado con el antibiótico correspondiente a la resistencia del ADN plasmidial

#### **4.7. Obtención de levaduras competentes**

Se cultivó la levadura en 300 ml de medio YPD hasta una  $DO_{600}$  de 0,2 - 0,3. Luego el cultivo se lavó dos veces en agua estéril y se resuspendió en 1,5 ml de solución fresca de acetato de litio (Acetato de litio 100mM en TE pH 7,5) para su uso. Este método fue utilizado de igual forma para las cepas RSY255 y NDY5

#### **4.8. Transformación de *S. cerevisiae*.**

Las transformaciones se realizaron mediante estrés térmico (manual CLONTECH). Se mezclaron 100  $\mu$ l de *S. cerevisiae* competentes con 100  $\mu$ g de ADN de espermio de salmón y 0,1  $\mu$ g del ADN plasmidial de GPD426myc, GPD426-AtGTr1myc o GPD426-AtGTr2myc. Se agregaron 600  $\mu$ l de una solución al 50% de polietilenglicol (PM 3.350) y acetato de litio 0,1 M, y se incubó a 30 °C por 30 min. con agitación constante. Se agregaron 70  $\mu$ l de DMSO. La mezcla completa se incubó en hielo por 10 min., luego a 42 °C por 15 min. e inmediatamente después se incubaron en hielo por 10 min. Las células se sedimentaron a 14.000xg, 4 °C durante 5 segundos y se resuspendieron en medio mínimo líquido. Para la selección de transformantes, las células sometidas al procedimiento anterior fueron cultivadas en medio mínimo a 30 °C por 16 horas en agitación. Posteriormente, alícuotas de cultivo fueron sembradas en medio mínimo sólido e incubadas a 30 °C por dos días o hasta la aparición de colonias.

#### **4.9. Obtención de fracciones microsomales de levaduras**

Se crecieron levaduras en 50ml de medio mínimo líquido hasta obtener un cultivo en fase estacionaria. Las levaduras fueron centrifugadas a 2.000xg durante 10 min. y luego lavadas con agua. Posteriormente se centrifugaron nuevamente para luego ser

resuspendidas en 2 volúmenes de tampón de membrana (Sorbitol 0,8 M, EDTA 1mM, TEA 10mM, pH 7,2) y dos volúmenes de bolitas de vidrio de tamaño 425-600  $\mu$ m (Sigma), a esta mezcla también se le agregaron inhibidores de proteasas.

Las levaduras se rompieron por medio de agitación vigorosa en Vortex durante 1min. luego fueron mantenidas en hielo por 2 min. Este paso fue repetido 5 veces. Se sedimentó a 2.000xg y se recolectó el sobrenadante. El ciclo completo fue repetido una vez más y los sobrenadantes obtenidos en cada ocasión se mezclaron.

El total de sobrenadante, se centrifugó a 10.000xg por 10 minutos a 4 °C (rotor GSA, centrífuga Sorvall, Dupont). A partir de este nuevo sobrenadante se obtuvo en el sedimento la fracción microsomal mediante centrifugación a 100.000xg por una hora en una ultracentrífuga Sorvall (rotor T880, Sorvall, Dupont). El sedimento se resuspendió en tampón de membrana y se midió su contenido de proteínas. Las fracciones se almacenaron a -20 °C para su uso posterior.

#### **4.10. Medición de proteínas**

Se realizó con el kit BCA (Pierce Chemical Co) basado en el método del ácido bicinonínico (Bollag y Edelstein, 1991).

#### **4.11. Detección de las proteínas AtGTr1 y AtGTr2**

La detección de las proteínas AtGTr se realizó mediante Western blot. Para esto se incubó 40 $\mu$ g de muestras de fracciones microsomales mezcladas con el tampón de carga (Tris-HCl 12mM pH6,8; glicerol 5%; SDS 0,4%;  $\beta$ -Mercaptoetanol 2,9 mM y azul de bromofenol 0,02%) a 60 °C durante 15 min. Las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 3% en su parte concentradora y al 10% el gel separador, al mismo tiempo se cargó 5 $\mu$ l del patrón de peso molecular preteñido (GIBCO). Las condiciones de electroforesis fueron 80 V por 3 horas.

La transferencia se realizó en una cámara Mini-Protean® II (BioRad). Se utilizó una membrana de PVDF, pretratada con metanol de grado analítico (Merck). Las proteínas fueron transferidas desde el gel de SDS-PAGE a 4 °C y 100 V (~300 mA) durante 3 horas, verificándose el proceso mediante inspección de los marcadores preteñidos en la

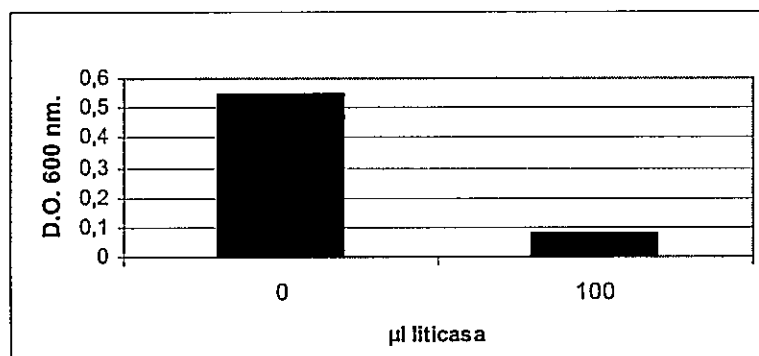


membrana y mediante tinción de Coomasie en el gel SDS-PAGE. La membrana se incubó toda la noche en una solución de bloqueo, la que contiene TBS (20mM Tris, pH 7,5 , 0,5M NaCl), leche descremada al 3% y gelatina de cerdo al 3% (SIGMA). La membrana se lavó de la solución de bloqueo con la solución TTBS (TBS; 0,05% Tween-20) y posteriormente se incubó durante tres horas con el anticuerpo monoclonal primario Anti c-myc (Santa Cruz Biotechnology) diluido 400 veces. La membrana se lavó con agitación y de forma repetida en volúmenes de TTBS hasta completar un litro solución de lavado circulante. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (PROMEGA). La membrana fue incubada por dos horas en una dilución 1:10.000 v/v de este anticuerpo en TTBS. Luego de lavar el anticuerpo inespecífico, se realizó la identificación de la actividad peroxidasa en la membrana mediante luminol utilizando el kit Renaissance® (NEN™). Se obtuvieron impresiones en placas autorradiograficas (Eastman Kodak) de las membranas.

#### **4.12. Preparación de extracto crudo de Liticasa**

Se creció un preinoculo de bacterias pUV5 DH5 $\alpha$  en medio LB durante una noche a 37 °C. Luego se inoculó 3L de medio LB y se creció a 37 °C hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0.5. Se indujo la producción de liticasa con 0.4mM de IPTG y se incubó a 30 °C durante 5 horas para permitir una gran producción de liticasa. A continuación se sedimentaron las bacterias por medio de centrifugación a 10.000xg por 10min.a 4 °C. Luego las bacterias se lavaron en dos ocasiones con Tris-HCl 25mM pH 7.4. Posteriormente las bacterias fueron resuspendidas en 2% del volumen original de una solución de Tris-HCl 25mM pH 7.4, EDTA 1mM, sacarosa 20% y se mantuvo en agitación en hielo por 20 min. Luego se sedimentaron por centrifugación a 10.000xg por 10min.a 4 °C. Para realizar una extracción periplasmática de liticasa, las bacterias se resuspendieron en 2% del volumen original de una solución de MgSO<sub>4</sub> 0.5 mM y se agitaron en hielo por 20 min. Finalmente las bacterias se centrifugaron a 12.000xg por 10 min. a 4 °C, luego se tomo el sobrenadante que contiene la Liticasa y se almaceno en tubos limpios a -80 °C para su posterior uso.

Para analizar la eficacia de la Liticasa en el rompimiento de la pared de las levaduras se creció un cultivo de levadura cepa RSY255 toda la noche a 30 °C. Las levaduras se incubaron en Tris-HCl 25mM pH 9.4 durante 10 min. con agitación, luego se sedimentaron por medio de centrifugación y se volvieron a resuspender en Tris-HCl 25mM pH 7.4. Las levaduras se separaron en alícuotas iguales y a cada alícuota se le agregó una cantidad determinada de Liticasa. Luego de una hora de incubación con agitación a 30 °C se midió la D.O.<sub>600</sub> de las levaduras digeridas diluidas en agua destilada (Fig. 2).(Shen S. y col. 1991)



**Figura 2. Ensayo de actividad de Liticasa.** Alícuotas de levadura crecidas toda la noche, preincubadas en Tris-HCl 25mM pH 9.4 fueron incubadas en Tris-HCl 25mM pH 7.4 y las cantidades de Liticasa indicadas en el grafico durante una hora, luego se midió la D.O.<sub>600</sub> de las alícuotas diluidas en agua destilada

#### **4.13. Preparación de fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi de *S. cerevisiae*.**

Se prepararon fracciones enriquecidas de vesículas de Golgi de levaduras RSY255 y NDY5 que acumulan la proteína AtGTr2 y de levaduras de las mismas cepas transformadas con GPD426myc utilizando el protocolo descrito por Berninsone y cols. (2001). Se crecieron las levaduras en 3 litros de medio mínimo SCM-URA 2 a 25 °C hasta obtener cultivos con una DO<sub>600</sub> máxima de 5,4. Se sedimentaron a 1.000xg por 10 min a 4 °C y el sedimento se lavó con azida de sodio 10 mM. Luego se incubó por 15 min. en Tris 25mM pH 9,4 y posteriormente se volvió a centrifugar.

Para digerir la pared celular de las levaduras se resuspendió el sedimento en tampón de esferoplastos modificado (Sorbitol 1,4M, Tris 500 mM pH 7,4, Azida de Sodio 5nM, DTT 250 mM, 6ml de extracto crudo de Liticasa) y se incubó a 30 °C con agitación. El avance de la digestión se monitoreó leyendo la DO<sub>600</sub> hasta obtener una caída mínima de 4 veces en la lectura tras diluir alícuotas de células en digestión con agua destilada. Los esferoplastos obtenidos, se sedimentaron a 2.000xg por 10 min a 4 °C y se resuspendieron en tampón de membrana (Sorbitol 0,8 M, EDTA 1 mM, TEA 10 mM, pH 7,2). Para romper los esferoplastos, éstos se pasaron repetidamente por una pipeta con propipeta y se sometieron a un homogenizador manual con vástago (Dounce), en presencia de inhibidores de proteasas (PMSF, PEPAS). Se recolectaron los sobrenadantes de dos lavados de los esferoplastos sedimentados a 2.000xg por 10 min. Este sobrenadante total se centrifugó a 450 g por 10 min. a 4 °C con lo que se obtuvo un sedimento (P1) y un sobrenadante (S1). El sobrenadante S1 se centrifugó a 10,000xg durante 20 min. con lo que se obtuvo el sedimento P2 y el sobrenadante S2. Este último sobrenadante fue centrifugado a 100.000xg obteniéndose el sobrenadante S3, el que se descarta. El sedimento o fracción P3 fue recolectado y resuspendido en un volumen mínimo de solución SET. La fracción P3 corresponde a una fracción enriquecida con membranas del Aparato de Golgi (Berninsone y cols 2001). Esta fracción fue alícuotada (habitualmente 2 ml en fracciones de 100 µl o 200 µl) y almacenada a -80 °C para los ensayos de transporte de NDP-azúcares.

#### **4.14. Integridad de vesículas de Golgi de levaduras**

Se realizó por medición de la actividad GDPasa Latente (Abeijon, 1989). 50 µl de tampón de membrana conteniendo 50 µg de vesículas de levadura, se incubaron junto con 50 µl de un cóctel 2X (Imidazol 0,4M, CaCl<sub>2</sub> 4mM) que además contenía el sustrato GDP o ADP (4 µM), y detergente (Triton X-100 0,1%) según correspondiera. La reacción se llevó a cabo a 30 °C por 20 minutos en un baño termorregulado. Luego, el fosfato inorgánico liberado se midió de acuerdo al método de Ames (1966). Las muestras se incubaron con el reactivo de Ames (Una parte de ácido ascórbico 10% por

6 partes de molibdato de amonio 0,42%) por 20 minutos a 45 °C. La medición se realizó de acuerdo a la DO<sub>660</sub>. Con los valores de cantidad de fosfato presente, la latencia de GDPasa se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$Latencia = \left( \frac{(G^T - A^T) - (G - A)}{(G^T - G)} \right)$$

donde G : Cantidad de fosfato liberado tras incubación con GDP

A : Cantidad de fosfato liberado tras incubación con ADP

G<sup>T</sup>: Cantidad de fosfato liberado tras incubación con GDP más TritonX-100

A<sup>T</sup>: Cantidad de fosfato liberado tras incubación con ADP más TritonX-100

#### 4.15. Ensayos de transporte de NA en vesículas de Golgi de levaduras

El protocolo para medir el transporte NA utilizado es una adaptación del protocolo de Berninsone y cols (2001). Vesículas de levadura (1 mg de proteína de fracción P3) se suspenden en tampón de transporte (Sacarosa 0,3M; TEA pH 7,2; MgSO<sub>4</sub> 5mM; MnSO<sub>4</sub> 5 mM). El ensayo se inició agregando a las vesículas de levadura, una solución que contiene tanto el nucleótido azúcar marcado (0,5 µCi), como nucleótido azúcar no marcado. Tras incubar durante 3 min. en un baño termostático a 30 °C se agregaron 4 ml de tampón de detención frío (Sacarosa 0,5M, EDTA 1mM). Se incubó 3 min. dado que experimentos control demostraron que a este tiempo aún se está en condición de velocidad inicial. La mezcla de reacción fue inmediatamente centrifugada en un rotor de ángulo fijo T880 por una hora (100.000 g a 4 °C). Se recolectó el sobrenadante para determinar la radioactividad utilizada en cada ensayo. La superficie del sedimento se lavó con una solución de sacarosa 0,25M y luego se resuspendió en agua. Se agregó un volumen de ácido perclórico (PCA) 8% y se incubó a 4 °C toda la noche. Se centrifugó a 10.000xg durante 15 min. en una microfuga (Enprotech ISS-112). El precipitado obtenido corresponde al material insoluble en PCA 4% (fracción T). La radioactividad asociada al sobrenadante corresponde al NDP-azúcar en la fracción soluble (fracción S<sub>1</sub>). La radioactividad asociada a estas fracciones fue determinada en un contador de centelleo líquido.

(Packard, TRI-CARB 2100TR), considerando el protocolo habitual para la lectura de emisiones provenientes de tritio (2 minutos).

El contenido de nucleótido azúcar en la fracción St [pmol/mg proteína] se calculó de acuerdo a Perez y Hirschberg (1987).

$$St = \frac{\text{Actividad soluble total del nucleótido azúcar tras precipitación con PCA 4\%} \quad [cpm / mg \text{ proteína}]}{\text{Actividad específica del nucleótido azúcar previo a la incubación} \quad [cpm / pmol]}$$

Los ensayos de transporte fueron hechos por triplicado o duplicado según el material disponible. Los resultados muestran un experimento representativo y se expresan como el promedio de las replicas y las barras de error corresponden al error estándar asociado al experimento.

#### 4.16. Determinación del volumen interno de las vesículas para cálculos de $S_i$

La determinación del volumen de las vesículas se realizó como se describe en Perez y Hirschberg (1987). Para ello se realizó un ensayo de transporte en condiciones estándar descritas anteriormente utilizando los sustratos Na-[ $^3H$ ] Acetato y [ $^3H$ ] deoxiglucosa. Los valores de volúmenes externos obtenidos en el laboratorio para las cepas RSY255 y NDY5 son 2,63  $\mu$ l/mg prot. y 2,21  $\mu$ l/mg prot respectivamente. En la Tabla 1 se muestra un ejemplo de los valores de  $S_i$  y  $S_o$  obtenidos en ensayos de transporte de GDP-fucosa.

levadura	$S_i$	$S_o$	$S_i$
Silvestre	7,04	1,41	5,625
Mutante <i>vrg4</i>	4,6	1,11	3,49
Silvestre AtGTr2	4,31	0,87	3,44
Mutante <i>vrg4</i> AtGTr2	4,418	1,047	3,37

Tabla 1. Acumulación de GDP-fucosa en vesículas de levadura. Fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi fueron incubadas por 3 min. Acumulación de sustrato fue medida como se describe en sección 4.15;  $S_i$ , Solutos totales asociados al pellet;  $S_o$ , Solutos fuera de las vesículas asociados al pellet;  $S_i$ , Solutos al interior de las vesículas asociados al pellet.

#### **4.17. Permeabilización de vesículas de Golgi con Triton X-100**

Para analizar el efecto de la permeabilización de vesículas en los ensayos de transporte, vesículas de levadura que expresan AtGTr2 fueron incubadas en hielo durante 20 min. en tampón de transporte con Triton X-100 al 1%. Inmediatamente después se realizó el ensayo de transporte tal como se describe la sección 4.15.

#### **4.18. Análisis de metabolitos solubles al interior de las vesículas de Golgi por medio de HPLC (cromatografía fina de alta resolución)**

Para realizar el análisis de HPLC de los sustratos incorporados en los experimentos de transporte, los metabolitos acumulados al interior de las vesículas se purificaron por extracción con cloroformo/metanol (Orellana A. y Mohnen D. 1999). Luego los metabolitos se separaron en HPLC utilizando una columna de intercambio aniónico (CarboPac PA1, Dionex) y un gradiente lineal de NH<sub>4</sub> Ac 1M. La detección se realizó por medio de una lámpara UV y un detector de absorbancia (AD25 Absorbance detector, Dionex), a 260 nm. Se recolectaron fracciones de 1 ml de los compuestos separados por HPLC y luego se midió radioactividad en cada una de las fracciones del mismo modo en que se describe 4.15.

#### **4.19. Ensayo de complementación de levaduras mutante *vrg4***

Para realizar este experimento las levaduras mutante *vrg4* transformadas con GPD426-AtGTr2myc, GPD426-NTPasa, GPD426myc y PRHL fueron incubadas en medio mínimo líquido, mientras que las levaduras silvestre y mutante *vrg4*, no transformadas, fueron incubadas en medio YPD líquido. La incubación se realizó en placas de 96 pocillos por 4 días a 30 °C con agitación. Luego las levaduras se transfirieron a placas de medio YPD sólido, preparadas con distintas concentraciones de higromicina B, donde fueron incubadas por 3 días a 30 °C. Las concentraciones utilizadas fueron 0µg, 10µg, 20µg, 30µg, 40µg, y 50µg. Además se prepararon placas sin higromicina B que se utilizaron como control de carga celular para cada concentración.

## 5. Resultados

### 5.1 Análisis del transporte endógeno de GDP-fucosa en vesículas aisladas de levaduras.

#### 5.1.1. Análisis del transporte endógeno de GDP-fucosa en vesículas aisladas de levaduras silvestres

##### 5.1.1.1. Dependencia de temperatura del transporte de GDP-fucosa en levaduras

Con el fin de analizar la factibilidad del uso de la levadura *S. cerevisia* como sistema heterólogo para la expresión funcional de transportadores de GDP-fucosa de *Arabidopsis thaliana*, en una primera etapa se realizó un estudio para determinar si existe transporte endógeno de GDP-fucosa en vesículas de membrana de aparato de Golgi.

De acuerdo con evidencias que muestran que el transporte de los nucleótidos azúcar está fuertemente determinado por la temperatura: Observamos que en vesículas incubadas por 10 min. a 30 °C la acumulación de GDP-fucosa fue 3,6 veces mayor que el observado en vesículas incubadas a 0 °C (Figura 3). Este ensayo también se realizó a 3 min. y la diferencia entre las vesículas incubadas a distintas temperaturas se mantuvo. Estos resultados son interesantes sobre todo porque en levadura no se ha descrito la presencia de un transportador para este sustrato.

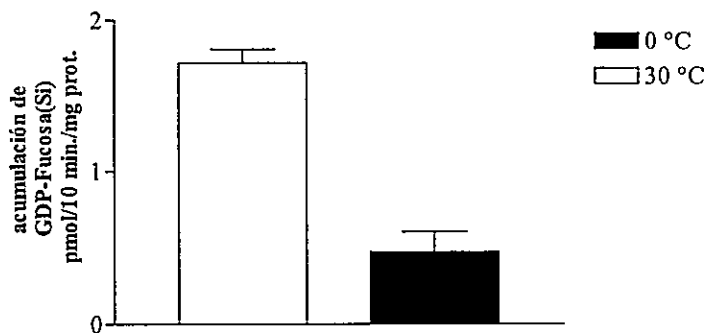
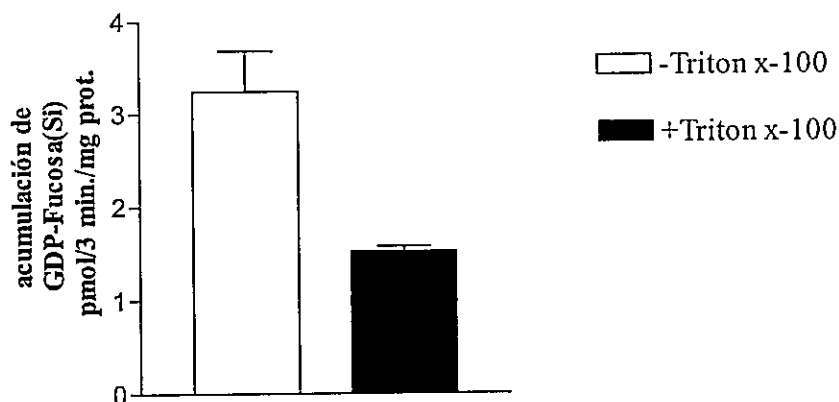


Figura 3. Efecto de la temperatura en la acumulación de GDP-fucosa. Vesículas de levadura silvestre fueron incubadas en presencia de 10 $\mu$ M de GDP-fucosa a las temperaturas señaladas en la figura durante 10 min.

### 5.1.1.2. Efecto de Triton X-100 en el transporte de GDP-fucosa

Para obtener evidencias adicionales de que GDP-fucosa es transportado al interior de vesículas de Golgi de levadura intactas, se analizó el efecto en la acumulación al permeabilizar las vesículas con el detergente Triton X-100. Para esto se preincubó las vesículas durante 20 min. con el detergente a una concentración 1%, para luego realizar el ensayo de transporte con GDP-fucosa. En la Figura 4 se puede apreciar que la acumulación disminuyó en un 53,2% con respecto al control que no fue preincubado con el detergente. La diferencia observada en este experimento entre las vesículas control y las preincubadas con el detergente refuerza la idea de que los resultados de observados corresponden a la acumulación de sustrato al interior de vesículas intactas. La fracción de GDP-fucosa que se mantuvo unida a las vesículas de membranas permeabilizadas, podría corresponder a la unión del sustrato a algún componente presente en dichas membranas.

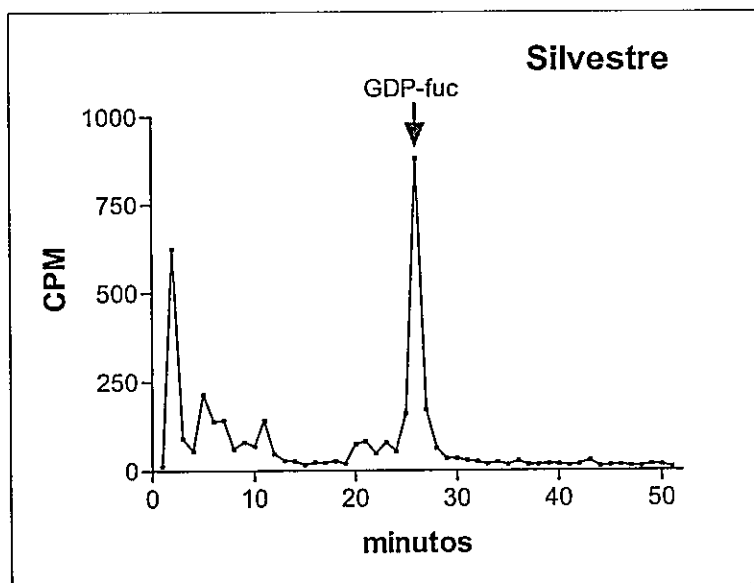


**Figura 4. Efecto de Triton X-100 en la acumulación GDP-fucosa.** Vesículas de levaduras fueron incubadas en hielo por 20 min. en presencia de 1% Triton X-100 (barra negra) o ausencia de Triton x-100 (barra blanca). Luego las vesículas fueron utilizadas para realizar un ensayo de transporte con 10 $\mu$ M GDP-fucosa y durante 3min. Los resultados del gráfico fueron normalizados por un control de tiempo cero incluido en el experimento.



### 5.1.1.3. Análisis por medio de HPLC de los sustratos incorporados en los experimentos de transporte.

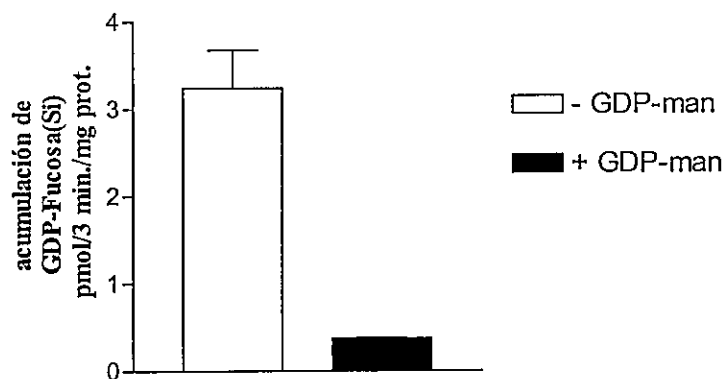
Con el fin confirmar que GDP-fucosa es transportada, se realizó un análisis de los metabolitos presentes en la fracción soluble de las vesículas utilizando HPLC. De esta forma se realizó un ensayo de transporte de GDP-fucosa con vesículas provenientes de levaduras silvestres. Posteriormente, los metabolitos incorporados en las vesículas fueron separados por HPLC. Se recolectaron fracciones de las muestras separadas en el HPLC y se midió la radioactividad en ellas. Con este experimento pudimos determinar que la marca radioactiva medida en los ensayos de transporte posee el mismo tiempo de retención (25 min) que un patrón de GDP-fucosa utilizado en la separación por HPLC, y que corresponde a la fracción donde se observa mayor cantidad de radioactividad. En la Figura 5 se muestra la radioactividad medida en los ensayos de transporte. Con estos resultados confirmamos que la marca radioactiva observada en los ensayos realizados con GDP-fucosa corresponde principalmente a este nucleótido azúcar y no a subproductos de él.



**Figura 5. Radioactividad asociada a fracciones obtenidas por separación con HPLC de metabolitos incorporados en ensayos de transporte.** Se realizó un ensayo de transporte con vesículas de levaduras silvestre, a 30 °C por 3 min., en presencia de 10µM de GDP-fucosa. Los solutos incorporados a las vesículas fueron extraídos y luego separados mediante un gradiente lineal de NH<sub>4</sub> Ac 1M en HPLC(Materiales y Métodos). La flecha indica el tiempo de retención del estándar de GDP-fucosa utilizado.

#### 5.1.1.4. Efecto de competencia con GDP -manosa en el transporte de GDP-fucosa.

Con el fin de encontrar la proteína responsable de la actividad de transporte observada, se realizó una búsqueda en el genoma de *S. cerevisiae* de genes homólogos al transportador de GDP-fucosa de humano. Se encontró que el gen que codifica para el transportador de GDP-manosa, VRG4p, es el que presenta mayor identidad a nivel aminoacídico con la secuencia usada como patrón. Esto sugiere que la proteína VRG4p podría ser responsable de la acumulación de GDP-fucosa en levadura. Para evaluar esta hipótesis se realizó un ensayo de competencia analizando si GDP-manosa interfiere con la acumulación de GDP-fucosa observado en vesículas de Golgi de levaduras. Los resultados del experimento mostraron que al realizar el ensayo de transporte de GDP-fucosa en presencia de una concentración molar 50 veces mayor de GDP-manosa la actividad disminuye considerablemente a un 11,8% del control. Este resultado sugiere que GDP-manosa inhibe el transporte y una de las posibilidades es que la proteína responsable de la acumulación de GDP-fucosa es VRG4p. Sin embargo, no podemos descartar que se trate de inhibición no competitiva.



**Figura 6. Competencia del transporte de GDP-fucosa con GDP-manosa.** Vesículas de levadura fueron incubadas a 30°C por 3 min. en presencia de 10µM GDP-fucosa. En un caso la incubación se realizó en ausencia de GDP-manosa (barra blanca) y en otro en presencia de 500µM de GDP-manosa (barra negra). Los resultados del gráfico fueron normalizados por un control de tiempo cero incluido en el experimento.

## 5.1.2 Análisis del transporte de GDP-fucosa en levaduras mutantes en el gen VRG4

### 5.1.2.1. Comparación del transporte de GDP-manosa entre levaduras silvestres y una mutante en el gen VRG4

Los resultados anteriores sugieren que el transportador de GDP-manosa VRG4p podría ser el responsable del transporte de GDP-fucosa en levaduras silvestres. Para obtener evidencia más directa que confirme esta hipótesis se utilizó una cepa de levadura mutante, cuya única diferencia con la levadura silvestre utilizada en este trabajo, corresponde a una mutación puntual en el gen que codifica para VRG4p lo que resulta en una proteína con la actividad considerablemente disminuida (Poster y Dean, 1997). Como no se ha medido directamente la actividad de transporte en vesículas de Golgi en estas mutantes procedimos a determinar que ocurre con el transporte de GDP-manosa. Los resultados permitieron apreciar que el transporte de GDP-manosa en levadura silvestre es 2,15 veces mayor que en la mutante *vrg4*, con una acumulación de 13,01 pmol/3min/mg. prot, versus 6,053 pmol/3min/mg. prot. del mutante (Figura 7). Este experimento confirma una disminución en el transporte de GDP-manosa en la mutante *vrg4*.

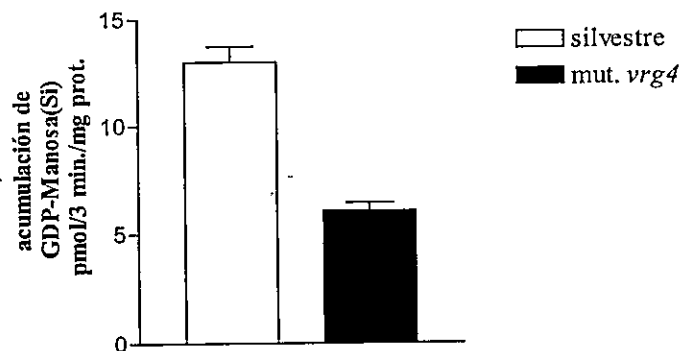


Figura 7. Comparación del transporte de GDP-manosa en vesículas de Golgi obtenidas de levaduras silvestres y levaduras mutantes en VRG4. Vesículas de ambas cepas fueron incubadas a 30°C por 3min. en presencia de 10µM de GDP-manosa.

### 5.1.2.2. Comparación del transporte de GDP-fucosa en vesículas de Golgi de levaduras silvestres y mutantes en el gen VRG4

Para obtener evidencia de la participación del transportador VRG4p en la actividad de transporte de GDP-fucosa, se realizó un ensayo de transporte de GDP-fucosa utilizando vesículas obtenidas de levaduras silvestres y mutantes en el gen VRG4.

Al igual que lo observado cuando se realizó el ensayo utilizando GDP-manosa como sustrato, las levaduras silvestres presentan una tasa de transporte 1.87 veces más alta que las mutantes en el gen VRG4 (Figura 8). Sin embargo, las tasas de transporte no superan en este caso los 2,5 pmol/3min./mg. Esto nos indica que una mutación en el transportador VRG4p, que provoca una disminución en el transporte de GDP-manosa, tiene un efecto similar en el transporte de GDP-fucosa. Este resultado refuerza la idea de que VRG4p es la proteína responsable del transporte de GDP-fucosa.

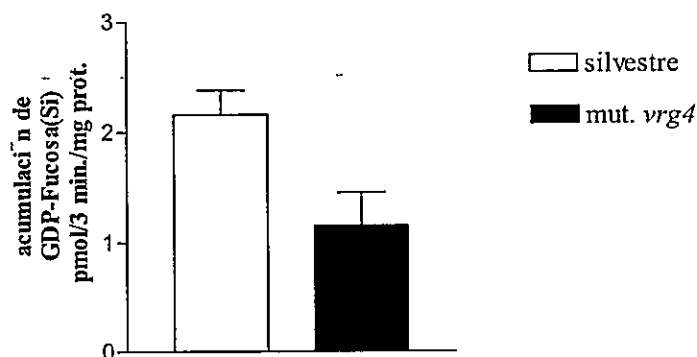


Figura 8. Comparación del transporte de GDP-fucosa entre levadura silvestre y levadura mutante *vrg4*. Vesículas de ambas cepas fueron incubadas a 30°C por 3min. en presencia de 10µM de GDP-fucosa.

### **5.1.2.3. Análisis por HPLC de los sustratos incorporados en los experimentos de transporte en vesículas provenientes de mutante *vrg4***

De forma similar a lo realizado anteriormente se analizó la radioactividad asociada a GDP-fucosa presente en la fracción soluble de vesículas provenientes de mutantes *vrg4*. Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.1.1.3 se determinó que la radioactividad registrada en los ensayos de transporte realizados con vesículas provenientes de mutantes *vrg4* tiene el mismo tiempo de retención que el patrón de GDP-fucosa utilizado en la separación con HPLC (Figura 9). Además, al hacer una comparación es posible ver que la cantidad de GDP-fucosa radioactiva es mayor en el ensayo realizado con las vesículas provenientes de levaduras silvestre que en las obtenidas de levaduras mutantes. Esto también se ve reflejado al calcular la cantidad de pmoles transportados

A partir de los resultados de los experimentos anteriores se puede concluir que en las fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi obtenidas de levadura, existe acumulación de GDP-fucosa, la que posiblemente se realiza mediante el transportador de GDP-manosa, VRG4p. Sin embargo, esta actividad es considerablemente menor a la observada cuando el sustrato utilizado es GDP-manosa.

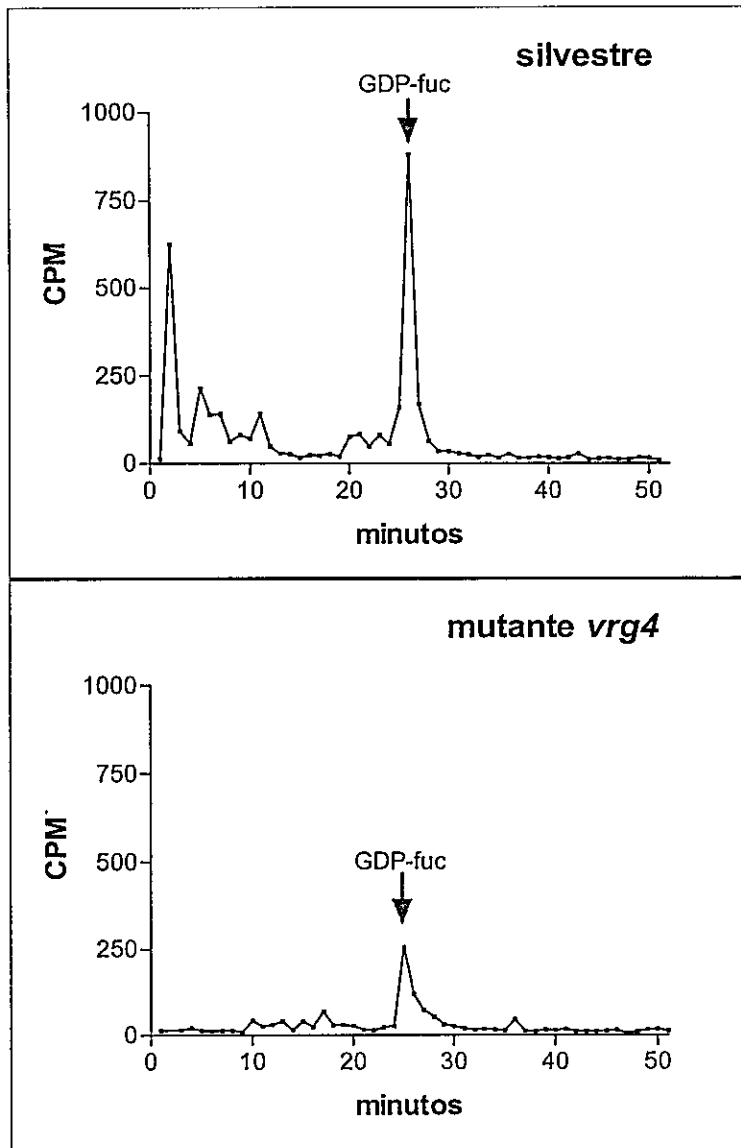


Figura 9. Radioactividad asociada a fracciones obtenidas por separación con HPLC de metabolitos incorporados en ensayos de transporte con vesículas provenientes de levaduras silvestres y levaduras mutantes *vrg4*. Se realizó un ensayo de transporte con vesículas de levaduras silvestre y levaduras mutante. El ensayo se realizó a 30°C por 3 min. en presencia de 10 $\mu$ M de GDP-fucosa. Los solutos incorporados a las vesículas fueron extraídos y luego separados mediante un gradiente lineal de NH<sub>4</sub>Ac 1M en HPLC (Materiales y Métodos). Las flechas indican el tiempo de retención del estándar de GDP-fucosa utilizado. El ensayo se realizó por duplicado y los pmoles totales transportados por las vesículas de levaduras silvestres y mutantes fueron 2,554 pmol/3min/mg. prot. y 1,872 pmol/3min/mg. prot. respectivamente

## 5.2. Identificación de genes homólogos al transportador de GDP-fucosa de *Homo sapiens* en *Arabidopsis thaliana*

La estrategia utilizada en el laboratorio para encontrar TNAs de *Arabidopsis thaliana* ha sido buscar secuencias homólogas a TNAs ya descritos en otras especies. Siguiendo este enfoque se realizó una búsqueda de genes homólogos usando el programa BLAST basándonos en la secuencia del transportador de GDP-fucosa de humano (Lübke y col. 2001). Los resultados (Tabla 1) arrojaron 5 posibles candidatos que cumplieran con el criterio de tener una alta similitud con el TNA usado para la búsqueda. Además las secuencias presentaban tamaños predichos alrededor de los 35kDa y secuencias aminoacídicas entre 300 y 350 residuos, parámetros que se repiten en los TNAs conocidos hasta la fecha. Estas secuencias fueron denominadas AtGTrs (por *Arabidopsis thaliana* GDP-fucose transporters) y enumerados del 1 al 5. Posteriormente se realizó una búsqueda de EST de estos genes con lo cual se seleccionó AtGTr1 y AtGTr2 ya que estaban disponibles para ser clonados

Nombre	Número AGL	Masa molecular (kDa)	Tamaño (aa)	EST
AtGTr1	At1g12500	38.9	361	AI995339 AV524415
AtGTr2	At5g05820	33.6	307	AV527442 H35989
AtGTr3	At5g04160	33.7	309	AU036566 AU036562
AtGTr4	At5g11230	39.2	351	-
AtGTr5	At1g21870	38.8	341	-

**Tabla 1. Potenciales transportadores de GDP-fucosa de *Arabidopsis thaliana*.** Los genes fueron seleccionados de acuerdo a su homología con el transportador de GDP-fucosa de humano y a criterios comunes para TNAs. Se denominaron AtGTr por *Arabidopsis thaliana* GDP-fucose transporters.

### 5.2.1 Análisis bioinformático de las secuencias seleccionadas AtGTr1 y AtGTr2

AtGTr1 y AtGTr2 presentan un alto porcentaje de identidad y similitud entre si a nivel aminoacídico, 63,8 % y 78% respectivamente. AtGTr1 posee una identidad aminoacídica de 25% y similitud de 43% con el transportador de GDP-fucosa de humano, mientras que AtGTr2 posee una identidad de 24% y similitud 41% con este transportador. Si bien los porcentajes de identidad y similitud no son altos, estos valores son los normalmente observados cuando se comparan TNAs similares de función conocida. Uno de los aspectos que llama la atención al comparar las secuencias AtGTr1, AtGTr2, el transportador de GDP-fucosa de humano y el transportador de GDP-fucosa de *C. elegans* (Lübke y col. 2001; Lühn y col 2001), es la presencia del motivo LNK, donde el residuo lisina se ha postulado como un aminoácido importante para la actividad transportadora TNAs ya que se conserva a través de muchos transportadores (Knappe, S. y col. 2003)

```

AtGtr2  1  -----MATNGRFPTI
AtGtr1  1  MNEAQSWTERRRISNPRFDAATAAAPTIVDIPGTPPHSSASSPLKPFLLSSETVSPPTLITA
HuGftr  1  MNEAPLKRERRILHMAITGASDDEAEAEANGE-----KFFELRALQIA
CeGftr  1  -KRLHEENNAALFEARRNRENPKWESY-----R-----QVI

AtGtr2  11  QIVASVYSSNIGVLLLNKYLLN--YGFKYPIFLTMCHMTACILSYVAIHWLKMVFP---
AtGtr1  61  ATIAARFGSNIGVLLLNKYLLFY--YGFRIPIFLTMTHMLSCAAYSSAVINAGVFP---
HuGftr  43  LNVSLVWVRSISVVF LNKYLLI SPSLRLDTPITFVTVQCLVTILLCKGLSALACCEGAV
CeGftr  32  TAVSALWVFSIGLIVLNKYLLSS--VQLDAPHFETWYQCLVTVFLCLFLSKTSKAYG-LF

AtGtr2  66  --MQTIRSRVQVFKLAALSIVFCVSVVFGNISLREL PVSFNQAIGATPPFTAVFAYLMT
AtGtr1  116  --RQHLSRROELKHLISLSAIFCLSVCCNTSLRYHPVSNQAIGATPPFTAVFSLIT
HuGftr  103  DFPSERLDRVARSVLPVSVVFTGMTENNECLZYVGVAFYVGRSLITVENVELSYLIL
CeGftr  89  KEPSMPTDAKISREVLPLSVVFMISNNLCLKVVGVSEYVGRSLITVENVVCNYLIL

AtGtr2  124  RKKEKALTYFTLVPWATGVVWASGGPSEHFLFGFLMCTAATAARALKSVLQGIILSSEGE
AtGtr1  174  CKTESTEVLLALLPVVGGIVLASNSPSEHFLFGFLICASTAARALKSVVQGIILISESE
HuGftr  163  KQTTSFYALLTCGILVGGFVLEVDQEGREGTLSMLGTVFCVLA SLCVSNAIYITKVLPA
CeGftr  149  GQKTSGCATGCCALVFCVLEVDQEGVTGTLSTVGVFCVLA SLSVALNAIYTRKVLSS

AtGtr2  184  KLNQSNLLLYMAPDAVVILLPATLHVEKNVVGITIALARDPFIWVYVLFNSALAYLVNL
AtGtr1  234  KLESNLLLYMAPDAACILLPFTLYHEGNVVRVLEKARTDPLIIEILAGNATVAVLVNL
HuGftr  223  VDGSRWRLEFYNNYACILFLFLILVLELQALRDRFAQLGSAIFVCGVITLGGIFGAGY
CeGftr  209  VGDCVWRLEMYNNENALVFLPLVLFNCEFGAVFYVDKLFDTTFWILVITLGGIFGAGY

AtGtr2  244  TNFLVTNHITSAITLQVLCNAKGA VAVVSLIERNNEVSVTGMGLYSITVCSVILYSEARK
AtGtr1  294  TNFLVTNHTSALTLQVLCNKA VAAVAVSVLIERNEVTVVGIAGFGVITMSVILYSEARK
HuGftr  283  VTGLQIKFTSPLTHVSGTAKACACTVAVLVVEETKSLVWVTSNMVVLGSSAVHWVRC
CeGftr  269  VTGWQIQARSPLTHVSGTAKAAACTVAVVWVISELKILLWVTSNFVVLFGSGAVHYVCK

AtGtr2  304  RNKN-----
AtGtr1  354  RSKLLNKK-----
HuGftr  343  WEMKTPPEPSPKDSKAMGV-----
CeGftr  329  RVMDKKNKSGASASEAKSDKVKLLGRDGNAAEESV

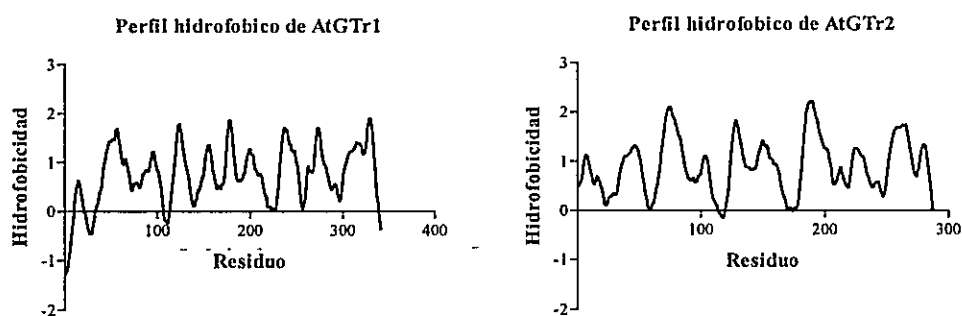
```

Figura 10. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de AtGTr1, AtGTr2, HuGftr de humano y CeGftr de *C. elegans*. Alineamiento según algoritmo de Clustalw entre secuencias proteicas de AtGTr1, AtGTr2, transportador de GDP-fucosa de humano (HuGftr) y putativo transportador de GDP-fucosa de *C. elegans* (CeGftr). Los aminoácidos idénticos entre secuencias se muestran en negro y los similares en gris. El recuadro señala el motivo LNK



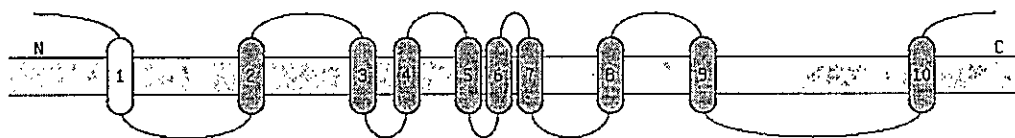
Al hacer un análisis de AtGTr1 y AtGTr2 se observa un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos en sus secuencias. Al usar distintos programas capaces de predecir segmentos de transmembrana, todos concuerdan en que ambas secuencias poseen múltiples dominios transmembrana, esta característica al igual que las anteriores mencionadas también es compartida por los TNAs descritos hasta ahora.

**A**

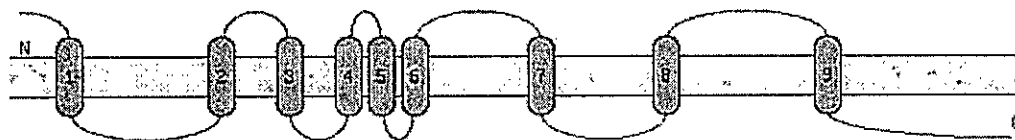


**B**

**AtGTr1**



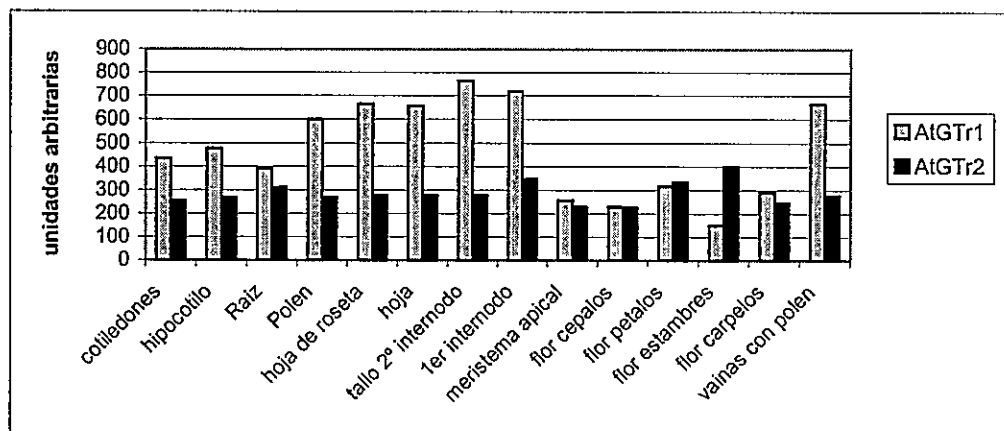
**AtGTr2**



**Figura 11. Modelo topológico de las proteínas AtGTr.** (A) Perfil hidrofóbico de AtGTr1 y AtGTr2 según algoritmo Kyte Doolittle, con una ventana de 10 aac. (B) Predicción de segmentos transmembrana de secuencias proteicas de AtGTr1 y AtGTr2. Los fragmentos de transmembrana que se predicen con una alta confiabilidad están representados en color gris y los que se predicen con una nivel de confiabilidad medio están representados en color blanco. Las predicciones y los esquemas fueron hechos con el programa TopPred2.

### 5.2.2. Análisis de la expresión de los genes AtGTr1 y AtGTr2 a partir de información de affymetrix obtenida desde bases de datos disponibles.

Al analizar datos obtenidos por affymetrix disponibles en Internet ([http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/dbc0r/ath/ath\\_txp.html](http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/dbc0r/ath/ath_txp.html)), se aprecia que tanto AtGTr1 como AtGTr2 se expresan en distintos órganos y tejidos de *Arabidopsis* (Figura 12). AtGTr1 se expresa principalmente en polen, hojas de roseta, hojas y los internodos, mientras que AtGTr2 se expresa en forma uniforme en los distintos tejidos. Estos datos sugieren que la expresión de AtGTr1 y AtGTr2 esta regulada de manera diferencial en distintos órganos de la planta, sin embargo, deberían ser correlacionados con estudios de expresión génica utilizando análisis de Northern o PCR cuantitativo. Aun así, estos datos, junto con la existencia de ESTs, nos entregan evidencia de que estos genes se expresan.



**Figura 12. Expresión de genes AtGTr1 y AtGTr2.** Los datos fueron obtenidos del sitio de internet ([csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/dbc0r/ath/ath\\_txp.html](http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/dbc0r/ath/ath_txp.html)), y consiste en experimentos de Microarrays utilizando el ecotipo Columbia de *Arabidopsis thaliana*. El eje Y muestra la señal obtenida del Chip de affymetrix expresada en unidades arbitrarias otorgadas por el programa utilizado, y en el eje X se muestran los distintos tejidos analizados.

### 5.3. Expresión heteróloga de AtGTr1 y AtGTr2 en levaduras *S. cerevisiae*.

#### 5.3.1. Clonamiento de AtGTR1 y AtGTr2 en vector de expresión en levaduras.

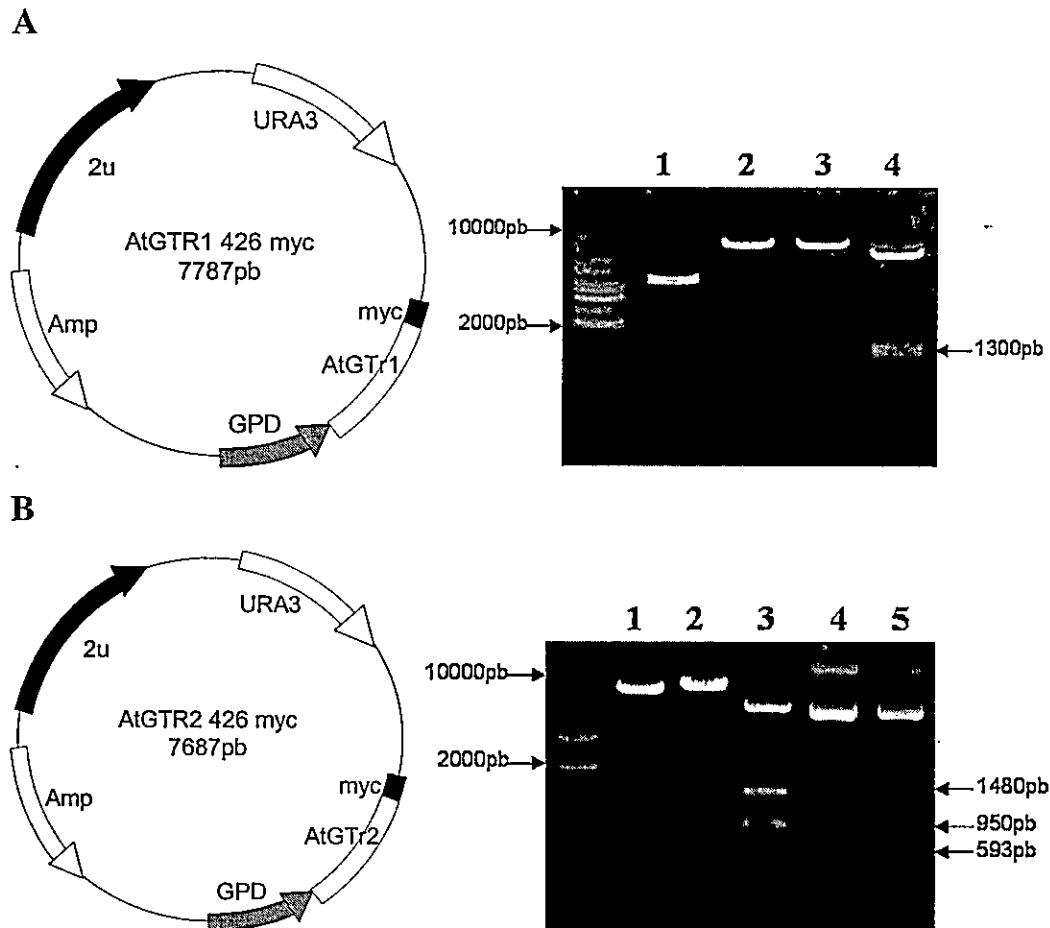
El vector GPD 426 myc posee el origen de replicación en levadura  $2\mu$  y el promotor constitutivo GPD que nos permite tener una expresión constante de los genes, además, posee el gen URA3 con el cual es posible seleccionar las levaduras transformadas por medio de auxotrofia, ya que la cepa utilizada es incapaz de crecer en un medio carente de Uracilo.

Los genes AtGTr1 y AtGTr2 fueron amplificados por PCR a partir de los ESTs AV524415 y AV527442, respectivamente. Estos ESTs contienen la secuencia completa de los genes y fueron clonados en el vector de expresión en levaduras GPD426 myc utilizando partidores específicos a los cuales se le agregaron sitios de restricción de enzimas usadas en el clonamiento, además, el partidor 3' de ambos genes se diseñó de manera de eliminar el codón de termino de la traducción y deja los genes en marco de lectura con el epítipo myc que está presente en el vector, lo que nos permitió usar un anticuerpo contra este epítipo para detectar la acumulación de la proteína codificada por los genes insertados.

Tanto para AtGTr1 como para AtGTr2 se agregó el sitio de restricción para la enzima BglII en el partidor 5', de manera de empalmarlo con el sitio de la enzima BamHI en el plasmidio, mientras que el partidor 3' incluye el sitio de restricción para la enzima NotI que empalma el mismo sitio en el plasmidio.

En la Figura 13 se aprecia un esquema de los constructos obtenidos al clonar los genes AtGTr1 y AtGTr2 en el vector de expresión en levadura. Los clones fueron analizados realizando digestiones con diferentes enzimas de restricción de manera de confirmar que los tamaños correspondieran con los que se predicen. En la Figura 13A se observa el resultado de las digestiones hechas al constructo AtGTr1, donde se utilizaron las enzimas NotI y BamHI que linearizan el constructo y la enzima SacI que libera un fragmento de 1,3 Kb, lo que está de acuerdo al patrón de digestión esperado. Mientras que la Figura 13B muestra el resultado de digestiones hechas al constructo AtGTr2,

donde se utilizó la enzima NotI que linealiza el plasmidio, la enzima HindIII que libera un fragmento de 593 pb, y la enzima PvuII que libera un fragmento de 1480 y otro de 950pb aproximadamente. Los resultados concuerdan con el patrón esperado para estas construcciones.



**Figura 13. Patrón de restricción de constructos AtGTr1 y AtGTr2. (A)** Constructo generado con el gen AtGTr1 y el vector GPD426myc. La foto muestra un gel de 1% de agarosa con el patrón de restricción del constructo generado al tratarlo con las siguientes enzimas:(1) plasmidio sin tratar, (2)NotI, (3) BamHI, (4) SacI. **(B)** Constructo generado con el gen AtGTr2 y el vector GPD426myc. La foto muestra un gel de 1% de agarosa con el patrón de restricción del constructo generado al tratarlo con las siguientes enzimas: (1) HindIII, (2) NotI, (3)PvuII, (4) BamHI, (5) plasmidio sin tratar. Las digestiones se realizaron de acuerdo a lo indicado para cada enzima y durante 3 horas. El estándar de peso molecular de ADN utilizado fue 1kb ladder de Fermentas.

### **5.3.2 Análisis de acumulación de las proteínas AtGTr1-myc y AtGTr2-myc en membranas de levaduras silvestres.**

Las secuencias de AtGTr1 y AtGTr2 permiten predecir proteínas altamente hidrofóbicas, por lo que es muy probable que estas proteínas se encuentren inmersas en algunos tipos de membrana de la levadura, tales como retículo endoplasmático, aparato de Golgi, vacuola o membrana plasmática. Por ello, para detectar la expresión de estas proteínas se prepararon fracciones microsomales de levaduras transformadas con los plasmidios que contenían los genes AtGTr1, AtGTr2 y con el plasmidio GPD426 myc vacío, el que fue utilizado como control. Luego de crecer las levaduras, estas se homogenizaron con bolitas de vidrio por medio de agitación vigorosa alternada con períodos en hielo, en presencia de inhibidores de proteasas. Posteriormente los homogenizados fueron sometidos a centrifugación diferencial para obtener fracciones microsomales para cada una de las cepas transformadas y el control.

Para determinar la acumulación de las proteínas AtGTr1 y AtGTr2 en las fracciones microsomales se usó la técnica de Western Blot utilizando un anticuerpo comercial dirigido contra el epítopo myc, incorporado en el extremo carboxilo terminal de las proteínas.

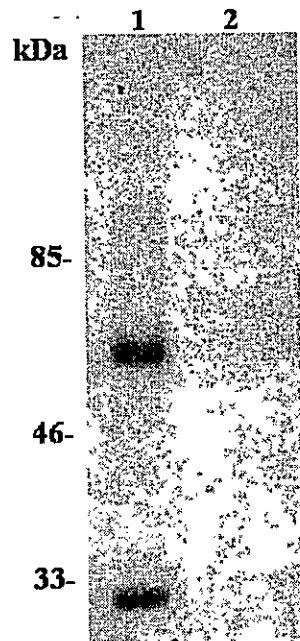


Figura 14. Acumulación de proteína AtGTr2 en *S. cerevisiae*. Fracciones de membrana fueron preparadas de levaduras transformadas con AtGTr2-myc y con el vector GPD426myc. Se cargaron 30µg de proteína en cada carril junto a estándar de peso molecular. Se utilizó el anticuerpo anti-myc. En el carril 1 se cargo la muestra de levadura transformada con AtGTr2-myc, en el carril 2 muestra de proteínas de levaduras transformadas con vector vacío.

En la Figura 14 (carril 1) se aprecian dos bandas reconocidas por el anticuerpo anti-myc, una banda de aproximadamente 30kDa, valor que se encuentra en el rango esperado para el peso molecular de la proteína AtGTr2, y una segunda banda que tiene un peso molecular que corresponde al doble de la proteína de menor peso molecular detectada por el anticuerpo. Estas bandas no se detectan en la fracción microsomal obtenida desde levaduras transformadas con el vector vacío (carril 2). El tamaño predicho para la proteína AtGTr2 es de 33,6 kDa, sin embargo la movilidad electroforética es mayor. Esta diferencia ha sido descrita anteriormente para otros TNA y atribuida a la alta hidrofobicidad que poseen éstos, lo que hace que su movilidad electroforética en un gel SDS-PAGE aumente (Berninsone y col. 1997, Norambuena y col 2002). Considerando que el peso molecular de la banda superior es aproximadamente el doble de la proteína esperada es posible que esta corresponda a un producto de dimerización del gen AtGTr2 que es resistente a las condiciones de denaturación del gel SDS-PAGE.

No fue posible detectar AtGTr1 mediante ensayos de Western blot a pesar de que se hicieron múltiples preparaciones a partir de distintas levaduras transformantes.

En conclusión, se puede afirmar que se obtuvieron levaduras que expresan y acumulan a la proteína AtGTr2.

#### **5.4. Análisis de actividad bioquímica de la proteína AtGTr2 en levaduras.**

##### **5.4.1. Análisis de actividad bioquímica de la proteína AtGTr2 en levaduras silvestres**

###### **5.4.1.1. Capacidad de transporte de GDP-fucosa de AtGTr2**

Para determinar si la proteína AtGTr2 corresponde a un TNA que utiliza GDP-fucosa como sustrato. Se realizó un ensayo de transporte con este sustrato utilizando vesículas obtenidas de levaduras silvestres que expresan AtGTr2. El ensayo fue realizado utilizando distintos tiempos de incubación, y como se observa en la Figura 15 la acumulación de GDP-fucosa es dependiente del tiempo de incubación. Este comportamiento fue similar tanto para las levaduras que expresan AtGTr2-myc como para la cepa control. Pero es importante señalar que hay más transporte en las fracciones provenientes de levaduras que expresan AtGTr2. El análisis de los datos por la prueba de Student nos dice que las diferencias observadas en la acumulación de GDP-fucosa entre levaduras que expresan AtGTr2-myc y levaduras control son estadísticamente significativas para los experimentos realizados a 3 y 10 min., no así para el experimento realizado a 1,5 min. Sin embargo, basándonos en la experiencia previa de nuestro laboratorio y en estudios publicados por otros laboratorios (Norambuena y col. 2002; Berninsone y col. 2001) la actividad de AtGTr2-myc utilizando GDP-fucosa como sustrato fue menor a la esperada para la expresión heteróloga en levadura de un TNA, además, esta no logra una gran diferenciación con el control debido al transporte endógeno de la levadura.

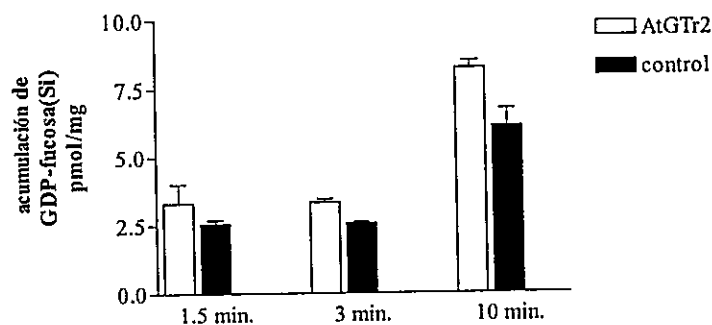


Figura 15. Ensayo de transporte de GDP-fucosa en levaduras silvestres que expresan AtGTr2. Vesículas de Golgi provenientes de levaduras silvestres que expresan AtGTr2 (barra blanca) y de levaduras transformadas con el vector vacío (barra negra), fueron incubadas a 30°C durante 1,5; 3 y 10 min. en presencia de 10µM de GDP-fucosa.

#### 5.4.1.2. Capacidad de transporte de UDP-galactosa y UDP-glucosa de AtGTr2

Al no detectar un gran incremento en el transporte de GDP-fucosa decidimos analizar otros sustratos considerando la posibilidad de que este transportador utilice otros nucleótidos azúcar, para esto se realizaron ensayos de transporte utilizando UDP-galactosa y UDP-glucosa como sustrato. Los resultados (Figura 16) muestran que AtGTr2 no tiene una actividad de transporte para ninguno de los sustratos utilizados. La actividad para el caso de UDP-glucosa es 48 veces mayor que cuando se usa UDP-galactosa, esto debido a una actividad de transporte endógena presente en la levadura (Castro O. y col. 1999).

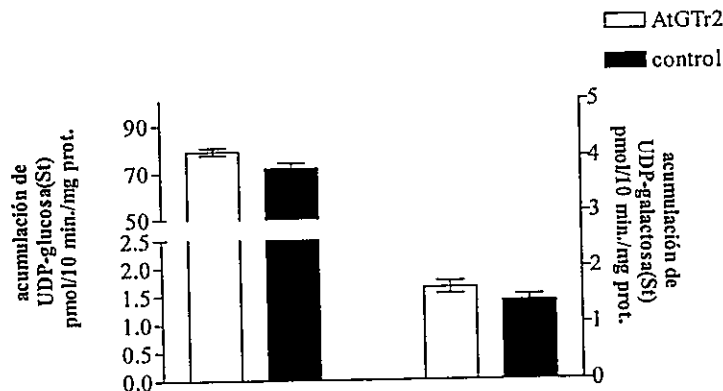


Figura 16. Transporte de UDP-glucosa y UDP-galactosa en vesículas que expresan AtGTr2. Vesículas de levaduras que expresan AtGTr2 y de levaduras transformadas con el vector vacío fueron incubadas a 30°C por 3 min. en presencia



#### 5.4.2. Análisis de actividad de AtGTr2 en levadura mutante *vrg4*

Con el fin de disminuir la actividad basal de transporte de GDP-fucosa se transformó la mutante para el transportador VRG4p con el constructo de AtGTr2 y con el plasmido GPD 426 myc vacío para usarlo como control. Se prepararon fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi, en las que se detectó la acumulación de la proteína por medio de Western blot, utilizando el anticuerpo anti-myc. En el carril 1 de la Figura 17 se aprecia una banda de aproximadamente 30kDa correspondiente al monómero de la proteína AtGTr2, mientras que en el carril 2, correspondiente a levaduras mutantes control, el anticuerpo no es capaz de reconocer ninguna proteína. Luego estas vesículas fueron utilizadas para realizar un ensayo de transporte de GDP-fucosa.

En la grafica de la Figura 17 se puede observar que la acumulación de GDP-fucosa en levaduras mutantes *vrg4* que expresan AtGTr2 es 53,88% superior a lo observado en el control. Al hacer un análisis de los datos encontramos las diferencias observadas son estadísticamente significativas.

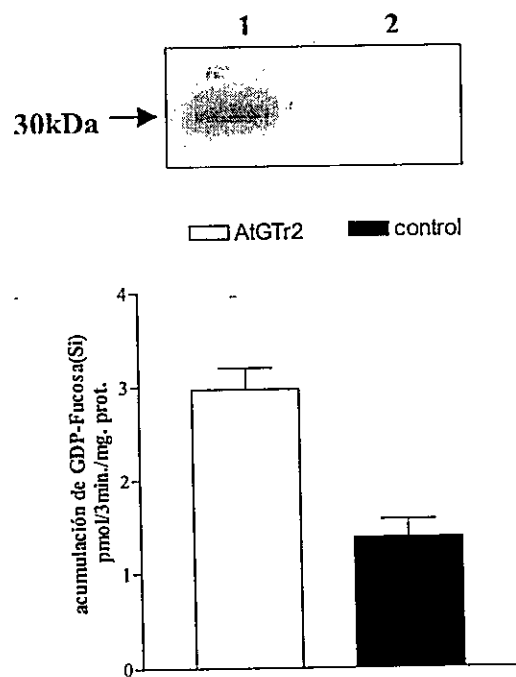


Figura 17. Transporte de GDP-fucosa en vesículas de levaduras mutantes *vrg4* transformadas con AtGTr2. Vesículas de levaduras mutante *vrg4* fueron transformadas con AtGTr2 y con el vector GPD426myc vacío. Se cargaron 40  $\mu$ g de proteínas en cada carril. Se utilizó el anticuerpo anti-myc. El carril 1 fue cargado con vesículas AtGTr2 y el carril 2 con vesículas control. Luego fracciones de estas vesículas fueron incubadas a 30°C por 3min. en presencia de 10uM de GDP-fucosa.

Como conclusión se puede decir que en las levaduras AtGTr2 son capaces de acumular mayor proporción de GDP-fucosa que el control, lo que sumado a los resultados anteriores (Fig. 15) nos lleva a proponer que AtGTr2 es capaz de transportar GDP-fucosa. La baja actividad de transporte de GDP-fucosa nos llevo a explorar la posibilidad de que AtGTr2 utilice otro GDP-azúcar como sustrato.

### 5.5. Análisis de reversión de fenotipo mutante de levaduras mutante *vrg4* mediante complementación con AtGTr2

Para analizar de una manera fisiológica si la proteína AtGTr2 transporta NDP-Azúcares se hizo un ensayo mediante complementación de la mutante *vrg4*.

La levadura mutante *vrg4* es sensible al antibiótico higromicina B y resistente a vanadato (Dean N. 1995). Esta característica fue utilizada para medir la capacidad de AtGTr2 de complementar la mutante *vrg4* es decir la deficiencia en el transporte de GDP-manosa. La mutante fue transformada con AtGTr2 para determinar si la actividad de la proteína era capaz de complementar, y así revertir el fenotipo mutante.

El experimento se realizó transformando la mutante *vrg4* con distintos constructos, que luego fueron seleccionados e incubados en placas en presencia de 20µg de higromicina B junto a levaduras silvestres y mutantes *vrg4* sin transformar.

Los resultados muestran que solo la levadura silvestre y la mutante *vrg4* transformada con el constructo PRHL que contiene el gen VRG4 con el promotor endógeno lograron crecer en presencia de higromicina B. Esto nos sugiere que la proteína AtGTr2 no fue capaz de transportar GDP-manosa para suplir la carencia de este sustrato en la levadura mutante.

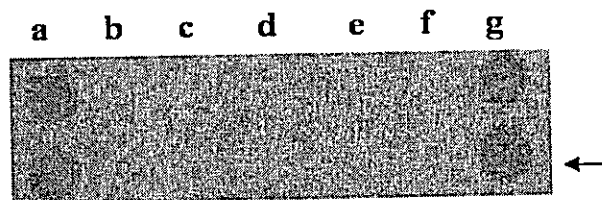


Figura 18. Ensayo de sensibilidad a higromicina B en levadura mutante *Vrg4*. Levaduras silvestre(a), levadura mutante *vrg4*(b) y levaduras mutantes transformadas con el vector GPD426myc vacío(c), con AtGTr2(d y e), NTPasa de levadura(f) y con el gen VRG4 de levadura(g) fueron incubadas a 30°C por 3 días en medio YPD sólido con 20µg de Higromicina B.

## 6. Discusión

### 6.1 Implicancias de transporte de GDP-fucosa en levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Los resultados presentados en esta tesis indican que en fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi preparadas a partir de levadura *S. cerevisiae* existe un sistema de transporte de GDP-fucosa. Estos resultados también sugieren que la proteína responsable de transportar este nucleótido azúcar en vesículas de Golgi de levaduras es el transportador de GDP-manosa de levadura VRG4p, ya que de manera similar a lo que ocurre con GDP-manosa, el transporte de GDP-fucosa aparece disminuido en una levadura mutante en el gen VRG4. Estos resultados fueron reafirmados al analizar por HPLC el contenido de GDP-fucosa en las vesículas (Figura 9), donde se observó una disminución de la incorporación de GDP-fucosa a las vesículas provenientes de levaduras mutantes en comparación con vesículas de levaduras silvestres.

Existen otros casos donde un transportador de nucleótidos azúcar es capaz de transportar más de un sustrato (Hong y Col. 2000; Berninsone y col. 2001). Sin embargo, resulta especialmente interesante el hecho que VRG4p sea capaz de transportar GDP-fucosa si se considera que en *S. cerevisiae* no se utiliza este sustrato en glicosilación. Esta situación también se observa en *Leishmania donovani* donde el transportador de GDP-manosa, LPG2, además es capaz de transportar GDP-fucosa y GDP-arabinosa, nucleótidos azúcar que no son utilizados por el protozoo.

La evidencia de que VRG4p puede transportar GDP-fucosa nos indica que la capacidad de los TNAs de transportar nucleótidos azúcar *in vitro* puede ser distinta a la actividad que presentan *in vivo*. Los estudios *in vitro* nos permiten exponer el TNA a numerosos sustratos, algunos de los cuáles posiblemente no se encontraran en el entorno biológico en el cuál se inserta el TNA. Este puede ser el caso de VRG4p, el que *in vivo* solo esta expuesto a GDP-manosa y no a GDP-fucosa. De esta forma, la especificidad de sustrato del TNA determinada *in vitro* es un antecedente que quizás no define cual o cuáles son los verdaderos sustratos *in vivo*. Sin embargo, puede constituir información relevante para estudios de la relación entre la estructura y

función de la proteína. Otro aspecto que se debe considerar es la afinidad o  $K_m$  que tenga el TNA hacia distintos sustratos, puesto que si varios NDP-azúcares que sean transportados *in vitro* están presentes en la célula, la selectividad por uno u otro sustrato estará dada por estos parámetros.

Desde el punto de vista de una potencial aplicación biotecnológica, la detección de una actividad de transporte de GDP-fucosa en la levadura resulta de gran interés para la expresión de glicoproteínas en este organismo. *Saccharomyces cerevisiae* ha sido ampliamente usada para producir proteínas recombinantes, sin embargo, uno de los principales inconvenientes es obtener proteínas glicosiladas con oligosacáridos complejos ya que la levadura no presenta los sustratos, las glicosiltransferasas y los transportadores de nucleótidos azúcar requeridos para la síntesis de oligosacáridos complejos. Varios laboratorios han tratado de resolver este problema introduciendo genes que pueden suplir las deficiencias que presenta la levadura. Por ejemplo, hace algunos años se logró obtener oligosacáridos galactosilados en *S. cerevisiae* gracias a la expresión conjunta de un transportador de UDP-galactosa de humano y una galactosiltransferasa de *S. pombe* (Kainuma M. y col. 1999). La incorporación de fucosa en glicoproteínas es factor importante en la biosíntesis de moléculas señalizadoras del sistema inmune, por lo tanto, con el fin de tener levaduras que puedan fucosilar glicoproteínas se han modificado las vías del metabolismo de GDP-manosa a través de la expresión funcional de enzimas de *E. coli* que sintetizan GDP-fucosa (Mattila P. y col. 2000; Nakayama y col 2003). De esta forma es posible generar GDP-fucosa en el citosol de la levadura. La fucosilación de glicoproteínas ocurre en el lumen del organelo, por lo tanto los resultados presentados en esta tesis sugieren que no sería necesario transformar la levadura con un TNA de GDP-fucosa puesto ya existiría la actividad endógena y solo sería necesario incorporar la fucosiltransferasa necesaria para realizar la transferencia del azúcar a la glicoproteína. De esta forma, la demostración de existencia de transporte de GDP-fucosa al lumen del aparato de Golgi de levaduras es un gran avance para obtener proteínas recombinantes que requieren de algún grado de fucosilación.

## 6.2 ¿Son las proteínas AtGTrs transportadores de nucleótidos azúcar?

AtGTr1 y AtGTr2 fueron seleccionados sobre la base a criterios comunes que identifican a los TNAs descritos hasta la fecha. Estas son: un PM alrededor a 35 kDa, alta hidrofobicidad de la proteína y cierto grado de similitud a TNA ya descritos. En este caso nos enfocamos en genes homólogos al transportador de GDP-fucosa de humano, específico para ese sustrato y el único clonado al momento de comenzar este trabajo. Además, según datos de experimentos de affymetrix disponibles públicamente, tanto AtGTr1 como AtGTr2 se expresan en *Arabidopsis thaliana*, por lo tanto no se trata de pseudogenes sino que de genes que se transcriben en la planta.

A pesar de la concordancia de criterios e incluso de la homología que un gen presente con algún TNA no podemos estar seguros con respecto a su función. Esto debido a que existe una familia de transportadores de triosa fosfato, que también cumplen con los criterios utilizados en la búsqueda de TNAs. Estas proteínas están muy relacionadas con los TNAs, incluso varios de los TNAs hoy conocidos, en un principio estaban anotados en las bases de datos de genomas como transportadores de triosas fosfato (Knappe, S. y col. 2003). Otro punto a considerar es que hasta la fecha se desconoce algún motivo o dominio en la secuencia de TNAs que se relacione con su especificidad y que nos revele cual puede ser el sustrato utilizado por los AtGTrs. La excepción a esta regla son los transportadores de GDP-manosa (y posiblemente los de GDP-fucosa) que poseen el dominio GXLNK que daría especificidad en el reconocimiento de nucleótidos de guanina. De esta forma se ha planteado que la homología entre las secuencias primarias de los TNAs no es un indicador de su especificidad de sustrato (Berninson P. y Hirschberg C. 2000). Con estos antecedentes se hace indispensable un análisis bioquímico de la actividad de las proteínas AtGTrs para determinar su posible función en la planta.

Con el fin de determinar la capacidad de transportar nucleótidos azúcar las proteínas AtGTrs fueron expresadas en levadura, un organismo que ha sido ampliamente utilizado con estos fines. Para de monitorear la expresión de las proteínas se introdujo una etiqueta conteniendo los epitopes Myc-His, de forma de poder detectar la

acumulación de las proteínas en la levadura por medio de anticuerpos específicos contra estos epítopes. La acumulación de AtGTr2 se observó de acuerdo a lo esperado en las levaduras silvestres, sin embargo, la proteína AtGTr1 no fue posible visualizarla, a pesar de reiterados esfuerzos orientados a determinar su expresión. Las razones de esta falta de expresión son desconocidas, pero una posibilidad es que la proteína sea inestable en la levadura.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que AtGTr2 es capaz de utilizar GDP-fucosa como sustrato, ya que, vesículas de Golgi provenientes de levaduras que expresan esta proteína presentan un mayor transporte de GDP-fucosa que vesículas de levaduras control. Sin embargo, esta actividad de transporte se ve enmascarada por el transporte endógeno de la levadura producto del transportador VRG4p. Con el fin de obtener mayor certeza sobre la capacidad de transportar GDP-fucosa de AtGTr2, este gen se introdujo en levaduras mutantes en el transportador VRG4p, que presentan una disminución en el transporte de GDP-fucosa. Se preparó fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi de levaduras mutantes transformadas, donde se detectó la acumulación de la proteína AtGTr2 utilizando el anticuerpo anti-myc. Al analizar la capacidad de transportar GDP-fucosa en vesículas de levaduras mutantes que expresan AtGTr2 se observó que estas son capaces de transportar aproximadamente 50% más GDP-fucosa que vesículas preparadas a partir de levaduras mutantes control. Estos resultados en su conjunto sugieren que la proteína AtGTr2 sería capaz de transportar GDP-fucosa.

Adicionalmente realizamos experimentos orientados a determinar si AtGTr2 tiene la capacidad de transportar GDP-manosa. Para ello intentamos suplir la deficiencia en el transporte de GDP-manosa en la levadura, realizando ensayos de complementación al crecer las levaduras en presencia de higromicina B, una droga en la cual no crece la mutante pero si lo hace la levadura silvestre. Los resultados indican que AtGTr2 no sería un transportador de GDP-manosa, pues no fue capaz de revertir el fenotipo mutante de la levadura.

Finalmente los resultados sugieren que AtGTr2 es una proteína de *A. thaliana* que posee actividad transportadora de GDP-fucosa. Sin embargo, es necesario realizar

experimentos adicionales, para precisar de mejor forma la función de esta proteína. Además, es necesario considerar que *in vivo* el transporte de nucleótidos azúcar no funciona como un proceso aislado y depende de varios factores que pueden alterar la actividad de transporte que se registra, como la acción de glicosiltransferasas, que al utilizar nucleótidos azúcar como sustrato, pueden de alguna forma estimular el transporte a través de la membrana del aparato de Golgi. Estos factores pueden influir de tal forma que cuando se realiza un ensayo de transporte en vesículas que no contienen la maquinaria proteica necesaria para utilizar el sustrato transportado, la actividad de transporte observada puede ser menor a la que presente la proteína *in vivo*. Para analizar la capacidad intrínseca de estas proteínas de transportar nucleótidos azúcar, una posibilidad es la reconstitución de TNAs en liposomas, sin embargo, esta metodología tiene múltiples inconvenientes, como el bajo rendimiento que se han obtenido al tratar de purificar TNAs y principalmente el hecho de no poder controlar el sentido en que se orientan estas proteínas al momento de reconstituirse en un liposoma (Segawa H. y col. 2004). Esto otorga vital importancia al desarrollo de metodologías que nos permitan estudiar la actividad y función de estas proteínas *in vivo*.

### 6.3 Rol biológico de AtGTr2.

Los transportadores de nucleótidos azúcar cumplen un papel importante en la síntesis de oligosacáridos, glicoproteínas y glicolípidos. Estas proteínas suministran sustratos a las glicosiltransferasas ubicadas en el aparato de Golgi y se cree que tienen una función reguladora ya que de ellos depende la disponibilidad de sustratos para la síntesis de polisacáridos. Es importante destacar que mutaciones en TNAs pueden causar graves problemas en organismos de todas las especies, llegando incluso a ser letales (Dean y col. 1997; Berninsone y col 2001; Hidalgo y col. 2003)

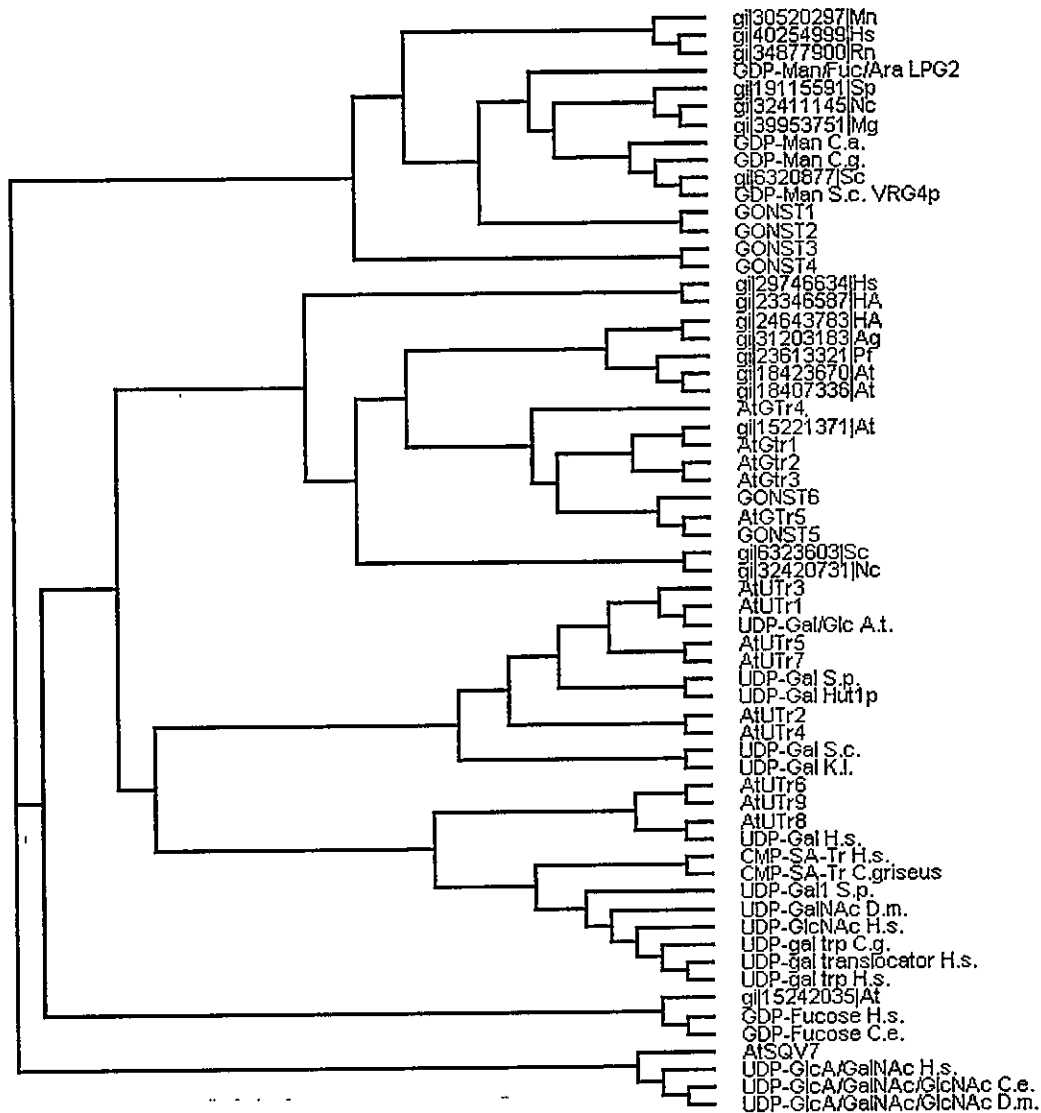
Nuestros resultados indican que AtGTr2 posee actividad de transporte de GDP-fucosa, sin embargo al mirar el árbol filogenético generado con la información que existe actualmente (Figura 19) notamos que AtGTr2 se encuentra alejado de los transportadores de GDP-fucosa conocidos al día de hoy. Esta distribución filogenética de TNAs ha variado sustancialmente respecto al momento en que se comenzó este

trabajo, puesto que AtGTr2 se agrupaba junto a los transportadores de GDP-fucosa. Este cambio se debe probablemente a la gran cantidad de información que se ha obtenido gracias a la secuenciación de genomas de nuevos organismos. Esta nueva información sugiere que AtGTr2 no sería un transportador de GDP-fucosa. Si volvemos a analizar el árbol filogenético notaremos que AtGTr2 forma parte de un grupo de genes similares a TNAs. En este grupo también encontramos otros genes clasificados como AtGTr, entre ellos AtGTr5, también conocido como GONST5 por su homología con el transportador de GDP-manosa de *A. thaliana* GONST1 (Handford M. y col. 2004). Experimentos del laboratorio del Dr. Dupree del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge indican que GONST5 se acumula en el aparato de Golgi (comunicación personal P. Dupree), lo que nos sugiere que este grupo de proteínas podría estar realizando alguna función específica en el aparato de Golgi. Todos estos antecedentes sugieren que AtGTr2 puede estar formando parte de un grupo de TNAs que serían responsables del transporte de nucleótidos azúcar requeridos en el lumen del aparato de Golgi de las células vegetales.

Los TNAs con capacidad de utilizar múltiples nucleótidos azúcar descritos hasta el momento muestran especificidad por la porción nucleotídica, es decir, sólo transportan GDP-azúcares o UDP-azúcares pero nunca una mezcla de ambos (Hong y Col. 2000; Berninsone y col. 2001). Esto sugiere que AtGTr2 podría ser un transportador de un GDP-azúcar debido a su capacidad de transportar GDP-fucosa. Un importante GDP-azúcar para el cual no se ha descrito ningún transportador es GDP-glucosa. Este nucleótido azúcar, junto con GDP-manosa, es utilizado para formar Glucomanano, el cual es una de las principales hemicelulosas que se encuentra en la matriz de la pared celular vegetal. La síntesis de glucomananos esta regulada por la disponibilidad de GDP-glucosa y GDP-manosa que tenga la glicosiltransferasa encargada de la síntesis de esta hemicelulosa. Por lo tanto, las proporciones de las cantidades en que estos dos sustratos están disponibles para las transferasas, depende del mecanismo de transporte que facilita y regula la entrada de estos compuestos al sistema endomembranoso donde la transferasa esta localizada, posiblemente el aparato de Golgi (Piro G. y col. 1993). Es posible que AtGTr2 sea el mecanismo de transporte encargado de regular la



disponibilidad de GDP-glucosa del mismo modo como GONST1 podría jugar un papel importante en el suministro de GDP-manosa. Esto plantea interesantes interrogantes que pueden ser resueltas en futuros trabajos.



**Figura 19.** Árbol filogenético de TNAs y genes similares a TNAs. El alineamiento entre las secuencias fue hecho con el programa ClustalX. El árbol filogenético se obtuvo utilizando el program Tree View. Las secuencias utilizadas se obtuvieron desde Genebank y corresponden a las siguientes entradas : gi|30520297, gi|40254999, gi|34877900, gi|1041825, gi|19115591, gi|32411145, gi|39953751, gi|14971021, gi|14010202, gi|6320877, gi|6321213, gi|30678967, gi|29329819, gi|29329821, gi|29329823, gi|29746634, gi|23346587, gi|24643783, gi|31203183, gi|23613321, gi|18423670, gi|18407336, gi|15238995, gi|15221371, gi|15221371, gi|30681126, gi|30682270, gi|18411611, gi|29329825, gi|6323603, gi|32420731, gi|18394108, gi|18395434, gi|22651763, gi|42565652, gi|15238511, gi|19112043, gi|6325012, gi|42567047, gi|15222026, gi|6320833, gi|6016590, gi|18411150, gi|30689311, gi|18422134, gi|18087849, gi|5453621, gi|2499225, gi|19075541, gi|3218521, gi|6912668, gi|12407833, gi|1526438, gi|2136345, gi|15242035, gi|13940506, gi|13940504, gi|18417838, gi|14028875, gi|17535737, gi|17647441

## 7. Bibliografía

Abeijon, C., Orlean, P., Robbins, P.W. y Hirschberg, C.B. (1989) Topography of glycosylation in yeast: characterization of GDPmannose transport y lumenal guanosine diphosphatase activities in Golgi-like vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86** : 6935-6939.

Berninsone, P., Hwang, H.Y., Zemtseva, I., Horvitz, H.R. y Hirschberg, C.B. (2001) SQV-7, a protein involved in *Caenorhabditis elegans* epithelial invagination y early embryogenesis, transports UDP-glucuronic acid, UDP-N- acetylgalactosamine, y UDP-galactose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98** : 3738-3743.

Bakker H., Routier F., Oelmann S., Jordi W., Lommen A., Gerardy-Schahn., Bosch D.(2005) Molecular cloning of two *Arabidopsis* UDP-galactose transporter by complementation of a deficient Chinese hamster ovary cell line. *Glycobiology* **15**: 193-201.

Berninsone P. y Hirschberg C. (2000) Nucleotide sugar transporters of the Golgi Apparatus. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 542-547.

Berninsone, P., Eckhardt, M., Gerardy-Schahn, R. y Hirschberg, C.B. (1997) Functional expression of the murine Golgi CMP-sialic acid transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **272** : 12616-12619.

Bollag, D.M. y Edelstein, S.J. (1991) *Protein methods*. Wiley-Liss, New York.

Castro O., Yun Chen L., Parodi A. y Abeijón C.(1999). Uridine Diphosphate-Glucose Transport into the Endoplasmic Reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*: In Vivo and In Vitro Evidence. *Molecular Biology of the Cell* **10**:1019-1030.

Dean N., Zhang Y., y Poster J.(1997) The VRG4 Gene Is Required for Gdp-mannose Transport into the Lumen of the Golgi in the Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**: 31908-31914.

Dean N. (1995). Yeast glycosylation mutants are sensitive to amonoglycosides. *Cell Biology*. **92**:1287-1291.

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

Hidalgo A, Ma S, Peired A., Weiss L., Cunningham-Rundles C., Frenette P. (2003) Insights into leukocyte adhesion deficiency type 2 from a novel mutation in the GDP-fucose transporter gene. *Blood* **101**: 1705-1712.

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

Hong K., Ma D., Beverley S. y Turco S.(2000) The *Leishmania* GDP-Mannose Transporter Is an Autonomous, Multi-specific, Hexameric Complex of LPG2 Subunits. *Biochemistry.* **39**: 2013-2022.

Kainuma M., Ishida N., Yoko-o T., Yoshioka S., Takeuchi M., Kawakita M y Jigami Y. (1999). Coexpression of  $\alpha$ 1,2 galactosyltransferase and UDP-galactose transporter efficiently galactosylates *N*-and *O*-glycans in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology* **9**:133-141.

Knappe S., Flügge U. y Fischer K. (2003). Analysis of the Plastidic *Phosphate translocator* Gene Family in Arabidopsis and Identification of New *phosphate translocator*-Homologous Transporters, Classified by Putative Substrate-Binding Site. *Plant Physiol.* **131**:1178-1190.

Lübke T., Marquardt T., Etzioni A., Hartmann E., von Figura K. y Körner C.(2001) Complementation cloning identifies GDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. *Nature Genetics.* **28**: 73-76.

Lühn K., Wild M., Eckhardt M., Gerardy-Schahn R. y Vestweber D. (2001). The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter. *Nature Genetics.* **28**: 69-72.

Mattila P., Rabinä J., Hortling S., Helin J. y Renkonen R. (2000). Functional expression of *Escherichia coli* enzymes synthesizing GDP-L-fucose from inherent GDP-D-mannose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology.* **10**:1041-1047.

Muraoka M, Kawakita M, Ishida N.(2001) Molecular characterization of human UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine transporter, a novel nucleotide sugar transporter with dual substrate specificity. *FEBS Lett.* **495**:87-93.

Nakayama K., Maeda Y., Jigami Y(2003) Interaction of GDP-4-keto-6-deoxymannose-3,5-epimerase-4-reductase with GDP-mannose-4,6-dehydratase stabilizes the enzyme activity for formation of GDP-fucose from GDP-mannose. *Glycobiology* **13**: 673-680.

Norambuena L., Marchant L., Berninsone P., Hirschberg C., Silva H. y Orellana A. (2002). Transport of UDP-galactose in plants. Identification and functional characterization of AtUTr1, an *Arabidopsis thaliana* UDP-galactos/UDP-glucose transporter. *J. Biol. Chem.* **277**: 32923- 32929.

Orellana A. y Mohnen D. (1999). Enzymatic Síntesis and Purification of [<sup>3</sup>H]Uridine Diphosphate Galacturonic Acid for Use in Studyng Golgi-localized Transporters. *Analytical Biochemistry.* **272**: 24-231.

Perez, M. y Hirschberg, C.B. (1987) Transport of sugar nucleotides into the lumen of vesicles derived from rat liver rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Methods Enzymol* **138**: 709-715.

Piro G., Zuppa A., Dalessandro G. y Northcote D.(1993).Glucomannan synthesis in pea epicotyls: the mannose and glucose transferases. *Planta.* **190**: 206-220.

Segawa H., Soares R.P., Kawakita M., Beverley S.M., Turco S.J. (2004). Reconstitution of GDP-mannose transport activity with purified *Leishmania* LPG2 protein in liposomes. *J. Biol. Chem.* **280**: 2028-2035.

Shen S., Cherétien P., Bastien L.ySlilaty S. (1991) Primary séquense of the Glucanase Gene from *Oerskovia xanthineolytica*. *J. Biol. Chem.* **266**:1058-1063.

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