

UCH-FC
Biotecnología
S 456
C.1



Universidad de Chile

FACULTAD DE CIENCIAS

Director de Memoria de Título.
Dr. Ariel Orellana López.
Departamento de Biología.
Facultad de Ciencias.
Universidad de Chile.

“Expresión y caracterización del transportador AtSQV7 de
Arabidopsis thaliana, homólogo al gen SQV-7 de
Caenorhabditis elegans”



Memoria para optar al título profesional
de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Marcelo Patricio Segura Lepe.
SANTIAGO DE CHILE, 2003



**“EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR
AtSQV de *Arabidopsis thaliana*, homólogo al gen SQV-7 de
Caenorhabditis elegans”**

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

MARCELO PATRICIO SEGURA LEPE

Director de Memoria de Título
Dr. Ariel Orellana López

Firma manuscrita en azul del Dr. Ariel Orellana López.

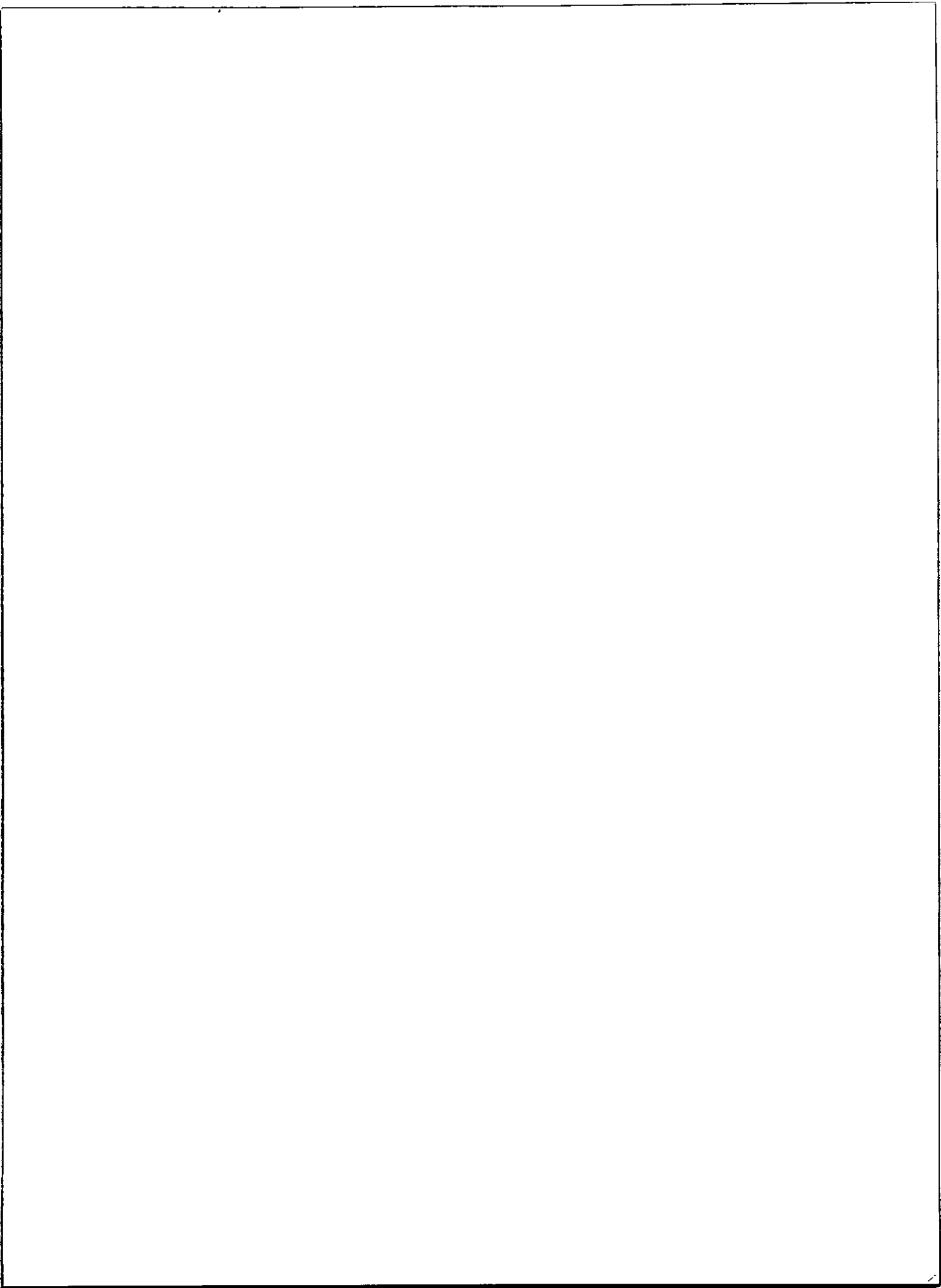
Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. Victoria Guixé Leguía
Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul de la Dra. Victoria Guixé Leguía.

Dr. Germán Hermosilla Díaz

Firma manuscrita en azul del Dr. Germán Hermosilla Díaz.



INDICE GENERAL

Página

Indice general

Indice de figuras y tablas

Lista de abreviaturas

Resumen

Summary

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	5
3. OBJETIVOS	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS	6
4.1. Material Biológico	6
4.2. Sustratos radioactivos	6
4.3. Reactivos	6
4.4. Medios de Cultivos	6
4.5. Clonamiento de de los genes AtSQV7	7
4.6. Transformación de <i>S.cerevisiae</i> competentes, con los genes AtSQV7	8
4.6.1. Obtención de levaduras competentes	8
4.6.2. Transformación de <i>S.cerevisiae</i>	8
4.7. Medición de proteínas	8
4.8. Electroforesis en geles desnaturalizantes (SDS-PAGE)	8
4.9. Análisis de proteínas totales de levaduras transformadas	9
4.10. Obtención de fracciones microsomales	9
4.11. Detección de las proteínas AtSQV7	10
4.12. Determinación de los tamaños de las proteínas AtSQV7	10
4.13. Preparación de fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi de <i>S. cerevisiae</i> .	11
4.13.1. Integridad de vesículas	12
4.14. Experimentos de Transporte	12

4.14.1. Determinación del volumen interno de las vesículas del Aparato de Golgi de <i>S. Cerevisiae</i>	14
4.14.2. Permeabilización de vesículas con Triton X-100	15
4.15. Análisis del fenotipo de levaduras que acumulan la proteína AtSQV7c mediante citometría de flujo	15
5. RESULTADOS	16
5.1. Identificación de genes homólogos al transportador de nucleótidos azúcar SQV-7.	16
5.2. Expresión heteróloga de AtSQV7c y AtSQV7I en la levadura <i>S.cerevisiae</i> .	17
5.2.1. Clonamiento de los genes AtSQV7 en vectores de expresión en levaduras	17
5.2.2. Obtención de levaduras <i>S.cerevisiae</i> transformadas con las secuencias AtSQV7.	19
5.2.3. Caracterización de las levaduras transformadas.	19
5.2.4. Análisis de la expresión de las proteínas AtSQV7I y AtSQV7c en fracciones de membrana de levadura.	21
5.3. Análisis de la función bioquímica de las proteínas AtSQV7	23
5.3.1. Preparación de vesículas de levaduras transformantes para los genes AtSQV7c y AtSQV7I.	23
5.3.1.1. Rompimiento de levaduras por método enzimático.	24
5.3.1.2. Medición de Integridad de vesículas.	25
5.3.1.3. Mediciones del volumen de vesículas y del espacio intervesicular	26
5.3.2. Experimentos de transporte nucleótidos azúcar en vesículas aisladas desde levaduras que expresan AtSQV7c y AtSQV7I.	27
5.3.2.1. Especificidad de vesículas en el transporte de distintos nucleótidos azúcar.	27
5.3.2.2. Transporte a menor concentración de UDP-Glc.	28
5.3.2.3. Ensayo de competencia del transporte de UDP-glucosa con UDP-Ácido glucurónico.	29
5.3.2.4. Efecto de la permeabilización de la membrana sobre la actividad de transporte.	30
5.3.2.5. Curso temporal de la actividad de transporte de AtSQV7c.	30
5.3.2.5.1. Transferencia a aceptores endógenos.	31
5.4. Caracterización fenotípica de levaduras AtSQV7c.	33

6. DISCUSIÓN	36
6.1. Transporte de nucleótidos azúcar en las proteínas AtSQV7	36
6.1.1. Influencia del extremo amino en la actividad de transporte de las proteínas AtSQV7	37
6.2. Evaluación de la estrategia experimental	38
6.2.1. Validez de los ensayos de transporte	38
6.2.2. Limitaciones del sistema experimental	39
6.2.3 Presencia del epítoto myc en el extremo carboxilo de las proteínas AtSQV7	39
6.3. Existencia de las dos formas del gen AtSQV7 en <i>A.thaliana</i>	39
6.4. Análisis bioinformático de las proteínas AtSQV7	40
6.4.1. Cladograma de AtSQV7I y los TNAs ya descritos	40
6.4.2. Análisis de proteínas similares a AtSQV7 en otras especies	42
6.5. Fenotipo de levaduras AtSQV7	43
6.6. Rol biológico de AtSQV7	44
7. BIBLIOGRAFÍA	46
8. AGRADECIMIENTOS	51

Índice de figuras y tablas

	Página
Figura 1. Modelo propuesto para la síntesis de polisacáridos en el aparato de Golgi.	2
Figura 2. Esquema general del clonamiento de los genes AtSQV7.	7
Figura 3. Alineamiento de secuencias AtSQV7 de <i>A.thaliana</i> y SQV-7 de <i>C.elegans</i> .	16
Figura 4. Diagrama ilustrativo de la disposición de los genes AtSQV7I y AtSQV7c en el genoma de <i>A.thaliana</i> .	17
Figura 5. Modelos topológicos de las proteínas AtSQV7.	18
Figura 6. Curva de crecimiento de levaduras Control y AtSQV7c.	20
Figura 7. Patrón electroforético de proteínas totales de levaduras Control y AtSQV7c.	21
Figura 8. Expresión de proteínas AtSQV7 en <i>S.cerevisiae</i> .	22
Figura 9. Transporte de nucleótidos azúcar en vesículas aisladas de AtSQV7c y AtSQV7I.	28
Figura 10. Efecto de la concentración en el transporte de UDP-Glc.	29
Figura 11. Competencia del transporte de UDP-Glc con UDP-ácido glucurónico.	30
Figura 12. Susceptibilidad del transporte UDP-Glc en presencia de detergente	31
Figura 13. Histogramas de mediciones citométricas de las cepas Control y AtSQV7c.	34
Figura 14. Diferencias de tamaño entre levaduras Control y AtSQV7c.	35
Figura 15. Cladograma de los transportadores de nucleótidos azúcar probados experimentalmente.	42
Tabla 1. Métodos enzimáticos de ruptura de la pared de levaduras.	24
Tabla 2. Valores de integridad de vesículas.	25
Tabla 3 Volumen vesicular.	26
Tabla 4 Cinética de incorporación de UDP-Glc en vesículas de levaduras	32

Lista de abreviaturas

TNA : Transportador de Nucleótidos Azúcar

NDP : Nucleótido difosfato

NMP : Nucleótido Monofosfato

UDP : Uridina difosfato

ADNc : ADN complementario

Glc : Glucosa

Gal : Galactosa

GlcA : Ácido Glucurónico

aa : Aminoácidos

bp : Pares de bases

PCA : Ácido perclórico

PEG : Polietilenglicol

DMSO : Dimetilsulfóxido

PCR : Reacción en cadena de la polimerasa.

min : minutos

PM : Peso Molecular

DO₆₀₀ : Densidad óptica a 600 nm

EST : Expressed sequence tag (etiqueta de secuencia expresada)

Resumen

Todas las células vegetales están rodeadas por una pared que se forma tras la división celular y que posee polisacáridos de tipo hemicelulósicos y pécticos. La síntesis de estos compuestos ocurre en el lumen del aparato de Golgi, mediante la acción de una gran variedad de glicosiltransferasas que, a partir de nucleótidos azúcar, ensamblan los distintos polisacáridos. Sin embargo, varios de estos nucleótidos azúcar son sintetizados en el citoplasma de la célula. Esta situación plantea un problema de compartimentalización que se solucionaría con la presencia de transportadores de nucleótidos-azúcar (TNA) en la membrana del aparato de Golgi. Se han descrito TNAs relacionados a procesos de glicosilación en varios organismos eucariontes. Entre éstos se encuentra SQV-7 de *C.elegans*, el que tiene capacidad de transportar UDP-GlcA, UDP-Gal y UDP-GalNac (Beminsone y cols, 2001). Dado que un ortólogo a SQV-7 en plantas podría estar involucrado en la biosíntesis de polisacáridos de la pared, la secuencia de SQV-7 fue usada en nuestro laboratorio para la búsqueda de TNAs de *Arabidopsis thaliana*. Como resultado, se encontraron dos posibles proteínas denominadas AtSQV7I y AtSQV7c. Con el fin de realizar un análisis de la actividad en estas proteínas, sus respectivas secuencias nucleotídicas fueron clonadas en vectores para expresión en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En este trabajo se obtuvieron levaduras que acumulan las proteínas AtSQV7c y AtSQV7I, según se mostró mediante detección con anticuerpos en fracciones subcelulares de las levaduras transformadas. A partir de estas levaduras, se aislaron vesículas en las que se evaluó la capacidad de transporte de distintos nucleótidos azúcar. Los resultados indican que AtSQV7c transporta UDP-Glc y UDP-Gal, pero no UDP-GlcA el que resulta esencial para la biosíntesis de pectinas. AtSQV7I tiene características similares; más aún, los respectivos genes corresponden a un mismo locus cromosómico en *A.thaliana*. Se discute la posibilidad de que ambos actúen en la planta.

Como aproximación a la función biológica del transportador AtSQV7c, se investigaron posibles alteraciones en la morfología de las levaduras que expresan este transportador. Mediante citometría de flujo, se encontraron diferencias en el tamaño, pero no en la rugosidad de las levaduras transformadas con AtSQV7c. Estas diferencias fueron confirmadas por microscopía óptica de transmisión. La presencia en las levaduras de una pared formada mayoritariamente por glucanos (Klis y cols, 2002),

sugiere que el cambio de tamaño se atribuye a modificaciones en los polisacáridos que la forman. Estas modificaciones probablemente sean consecuencia de la actividad de AtSQV7c en las levaduras transformadas y no sólo un efecto pleiotrópico derivado de la expresión de la proteína, puesto que los patrones de proteínas totales de levaduras control y de las que expresan las proteínas AtSQV7, no difieren significativamente entre sí. Esto constituye un antecedente de que, análogamente a lo observado en levadura, AtSQV7c o AtSQV7I podrían participar en el mecanismo de biosíntesis de componentes de la pared en *Arabidopsis thaliana*.

Summary

Plant cells are surrounded by a wall that forms shortly after cell division and that is characterized by the presence of hemicellulosic and pectic polysaccharides. Synthesis of these compounds occurs inside the Golgi apparatus, through the action of a great variety of glycosyltransferases, which assemble a number of different polysaccharides, inside the lumen of this organelle. However several sugar nucleotides are synthesized in the cell cytoplasm. Therefore this situation raises a compartmentalization, which could be solved by the presence of nucleotide sugar transporters (NST) spanned in the Golgi apparatus membrane. Several NST have been described in eukaryotic organisms and consequently, these appear as linked to glycosilation processes. The SQV-7 gene from *C.elegans* is a NST that transport UDP-GlcA, UDP-Gal y UDP-GalNac (Berninsone and cols, 2001). Since a plant ortholog of this protein could be involved in the wall polysaccharide biosynthesis, the sequence of SQV-7 was used, in our laboratory for searching putative NSTs of *Arabidopsis thaliana*. Two protein sequences were found and named AtSQV7I and AtSQV7c. In order to analyze the NSTactivity of AtSQV7I y AtSQV7c, the nucleotide sequences of both proteins were cloned in vectors for expression in the yeast *S.cerevisiae*. In this work, yeasts acumulating proteins AtSQV7I y AtSQV7c were got, as shown through antibody detection in subcellular fractions. Starting from this yeasts, vesicles were isolated for assesing the ability of these proteins for transporting nucleotide sugars. Results indicate that AtSQV7c transports UDP-Glc and UDP-Gal, but not UDP-GlcA. AtSQV7I share similar features. Indeed both genes are located in the same chromosomal loci in *A.thaliana*. The possibility that both have a role in plant is discussed.

As an approach for addressing the biological function of the AtSQV7c transporter, morphological alterations in yeasts that express this transporter, were surveyed. By means of flow citometry, differences were found in size, but not in the rugosity of yeasts transformed with AtSQV7c. These differences were confirmed by transmission optical microscopy. The presence of a wall in yeasts, which is made up with glucans in a great extent (Klis and cols, 2002), suggests that size change may be attributed to modifications in the polysaccharides that form it. These modifications are, probably, the consequence of AtSQV7c activity in transformed yeasts, and not only an unspecific effect derived from protein overexpression, because the patterns of total proteins, from

control and AtSQV7c yeast, don't differ significantly between them. This evidence indicates that, analogously to that observed in yeasts, AtSQV7c or AtSQV7I could participate in the biosynthetic mechanism of wall components of *Arabidopsis thaliana*.

5. Resultados

5.1. Identificación de genes ortólogos al transportador de nucleótidos azúcar SQV-7 en *Arabidopsis thaliana*

La estrategia general del laboratorio para identificar TNAs de *A.thaliana* ha sido buscar en su genoma secuencias homólogas a otras previamente descritas. De igual forma se realizó la búsqueda mediante TBLASTN, de genes que codifican proteínas de *A.thaliana* con alta similitud a SQV-7, un TNA de *C.elegans* que transporta específicamente UDP-Gal, UDP-GlcA y UDP-GalNac (Berninsone y cols, 2001). Este análisis permitió identificar una secuencia de 888 pb que se denominó **AtSQV7**, cuya respectiva proteína codificada esta secuencia posee una identidad aminoacídica de 27% y una similitud de 45% con la proteína SQV7 de *C.elegans*. Estos valores son similares a los encontrados en otros trabajos de identificación de TNA mediante el criterio de homología (Hirschberg y cols, 1998; Norambuena y cols, 2002).

AtSqv7L	1	MEVQAEIPEPTSSISLVAAVSYGIIASMAVVFINKAVIMQY--PHSMTVLTLOQLATSLLIH
AtSqv7c	1	-----VVFINKAVIMQY--PHSMTVLTLOQLATSLLIH
Sqv7	1	--TSTVQSPLYSRVFSAVFYGVLSVLIIVFNKHILLETNYKRFSPFVGVGQMMATILITVF
AtSqv7L	59	FGRRMGYTRAKGIDMATAKKLLPVSIFYNANVAFALASLKGVNIPMYIAIKRLTPLAVLI
AtSqv7c	32	FGRRMGYTRAKGIDMATAKKLLPVSIFYNANVAFALASLKGVNIPMYIAIKRLTPLAVLI
Sqv7	59	FARMFRIVQPPSILDSSEIPRRIIPPEPLVFFNHLISGLSGTQMDINIPMETVLRRFSLMTYI
AtSqv7L	119	SGVLFQKPKPTTQVALSVLLTAAGCVIAALGDFSPDFLFGYGLALTSVFFQTMYLVLVEKS
AtSqv7c	92	SGVLFQKPKPTTQVALSVLLTAAGCVIAALGDFSPDFLFGYGLALTSVFFQTMYLVLVEKS
Sqv7	119	LEFYILNVKASKAVKHSVGLMIRGCSFIAAIVYDLSFDALGYTVIFINNICTAALGVYTKQK
AtSqv7L	179	GAEDGLSSIEIMFYNSFLSLPFLSILTIIVTGEFPNSLSLLAKCSYLPFLVILILSLVMG
AtSqv7c	152	GAEDGLSSIEIMFYNSFLSLPFLSILTIIVTGEFPNSLSLLAKCSYLPFLVILILSLVMG
Sqv7	179	LDAKDLGKYGIMFYNSCLFMLLPALCVVQYTCGLDRIVSFMLSDSMTSSVWTCFILLSCICG
AtSqv7L	239	IVLNFTMFLCTIVNSALTTTIVGVKGVGSTTLGFVLLGGVEVHALNVSGLVVNTAGGVW
AtSqv7c	212	IVLNFTMFLCTIVNSALTTTIVGVKGVGSTTLGFVLLGGVEVHALNVSGLVVNTAGGVW
Sqv7	239	FVLMKSTIVLCTIHHNSALTTTICVCPHKNIFVTVYGMFSSCDYVFWANFVICHNVSVFCSIL
AtSqv7L	299	YSYAKYRQK---KAKPAKLMSDLEAHKK--
AtSqv7c	272	YSYAKYRQK---KAKPAKLMSDLEAHKK--
Sqv7	299	VIVVTRRSKSTTISYKPLPYTMPHIVHKPRN

Figura 3. Alineamiento de secuencias de proteínas AtSQV7I, AtSQV7c de *A.thaliana* y SQV7 de *C.elegans*, según el algoritmo ClustalW. La proteína AtSQV7c tiene un 27% de identidad y un de 45% similitud respecto a SQV7 de *C.elegans*. La proteína AtSQV7I tiene un 28% de identidad y un de 46% similitud respecto a SQV7 de *C.elegans*. Los aac. idénticos entre secuencias se muestran en negro y los similares en gris.

En forma posterior, una revisión de las bases de datos permitió encontrar un EST cuya secuencia es idéntica a la de AtSQV7 y que codifica una proteína con un segmento adicional de 27 aminoácidos en su extremo amino (figura 3). Se adoptaron los nombres de AtSQV7I y AtSQV7c para referirse a las secuencias más larga y a la más corta, respectivamente. El análisis de la secuencia genómica de *A.thaliana* muestra que AtSQV7I coincide en ubicación cromosomal y secuencia con AtSQV7c, excepto por la presencia de un exón, no predicho anteriormente, en el extremo 5' de la secuencia de AtSQV7I (figura 4). La homología de esta nueva secuencia respecto a SQV-7 no muestra grandes alteraciones (28% de identidad, 46% de similitud). En cuanto al tamaño en aminoácidos, AtSQV7I posee 323 aa y AtSQV7c 296 aa, valores que se encuentran dentro de lo observado en otros TNAs. El perfil de hidrofobicidad (figura 5A), muestra la marcada composición de aminoácidos hidrofóbicos en ambas proteínas. Concordante con esto, distintos programas de predicción mostraron que AtSQV7I y AtSQV7c tendrían múltiples segmentos transmembrana, siendo de especial interés el segmento transmembrana adicional del extremo amino de AtSQV7I dado por sus 27aa iniciales (Figura 5B).

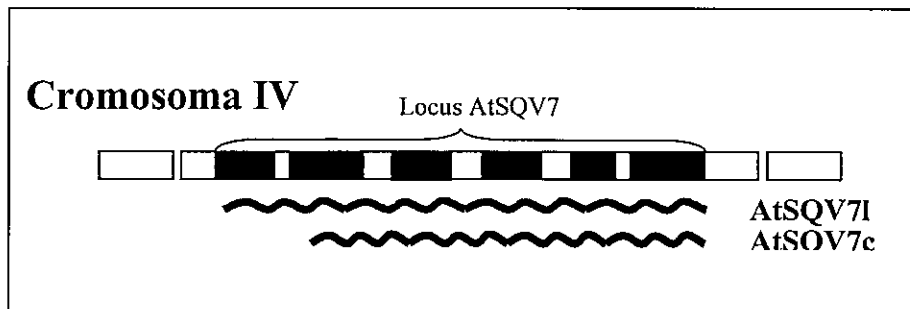


Figura 4. Diagrama ilustrativo de la disposición de los genes AtSQV7I y AtSQV7c en el genoma de *A.thaliana*. Un fragmento del cromosoma 4 de *A.thaliana* muestra los exones (en negro) que forman el gen AtSQV7. Ambas formas del gen proceden de un mismo ARN mensajero, que fue clonado con o sin el primer exón dando lugar a AtSQV7c o AtSQV7I, respectivamente.

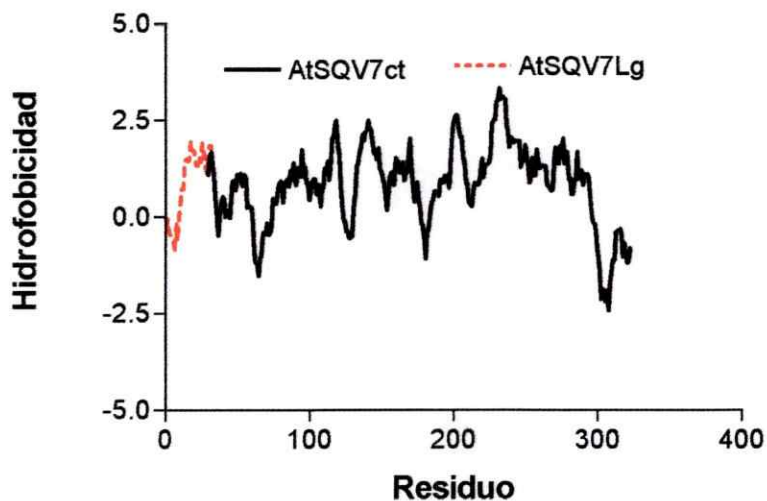
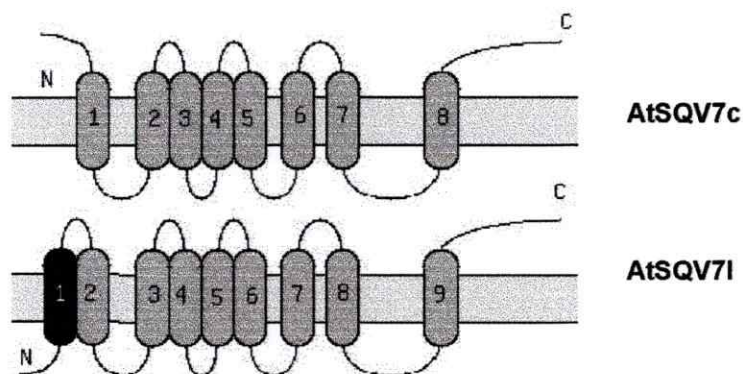
A**B**

Figura 5. Modelos topológicos de las proteínas AtSQV7. (A) Perfil Hidrofóbico según escala y algoritmo Kyte Doolittle con una ventana de 11 aminoácidos. Las línea sólida de AtSQV7c se superpone a la línea punteada de AtSQV7I, a partir del aminoácido 27, producto de la identidad de ambas secuencias **(B)** Predicción de segmentos transmembrana. Si bien distintos programas difieren en el número de segmentos, todos concuerdan en la existencia de un segmento adicional en AtSQV7I, lo que le conferiría a la proteína una orientación citoplásmica en el extremo amino, opuesta a la del extremo amino de AtSQV7c. Las predicciones y esquemas mostrados se realizaron con el programa TopPred2, de acuerdo a las secuencias proteicas de AtSQV7c y AtSQV7I.

5.2. Expresión heteróloga de AtSQV7c y AtSQV7I en la levadura *S.cerevisiae*

5.2.1. Clonamiento de los genes AtSQV7 en vectores de expresión en levaduras

Las secuencias de los genes AtSQV7, identificadas en 5.1, fueron adaptadas mediante PCR con partidores específicos (Figura 2), que contenían sitios de restricción para facilitar su clonamiento en el vector pGPD426myc (BAMHI en el partidor 5' , NOT en el partidor 3'). El partidor 3', común para AtSQV7I y AtSQV7c, elimina los codones de término de la traducción, permitiendo la fusión a cada marco de lectura del epítotope *myc*, presente en el vector p426GPDmyc. Este epítotope es utilizado para la identificación de la proteína, ya que existen anticuerpos comerciales para su detección, lo que evita la necesidad de desarrollar anticuerpos específicos anti AtSQV7. El vector posee además la secuencia del marcador de selección URA, un gen que confiere a levaduras la capacidad de crecer en medios carentes de uracilo.

5.2.2. Obtención de levaduras *S.cerevisiae* transformadas con las secuencias AtSQV7

La cepa de levadura utilizada como huésped para las transformaciones fue *S.cerevisiae* RSY255C que no posee el gen URA. A continuación se realizaron, separadamente, transformaciones de la cepa RSY255C con los plásmidos p426GPD-AtSQV7I.myc, p426GPD-AtSQV7c.myc y pGPD426.myc. La levadura transformada con este último vector es la levadura control con la que se evaluarán posibles cambios en debidos a la presencia del vector y no relacionados con la presencia de las proteínas AtSQV7 en la cepa RSY255C. En adelante se referirá a esta levadura como 'control'. Se aislaron transformantes mediante selección de colonias de levadura en placas de medio mínimo que no contiene uracilo. Estos transformantes han incorporado el plasmidio que expresa el gen URA en nivel suficiente para complementar la deficiencia de la cepa huésped RSY255C.

5.2.3. Caracterización de la levaduras transformadas

Tras los primeros cultivos, las levaduras transformadas con AtSQV7c mostraron una menor velocidad en el crecimiento respecto a las levaduras control. Este fenómeno podría ser una consecuencia de la sobreexpresión de una proteína, sin embargo, no se observó lo mismo al transformar las levaduras con AtUTR1, un TNA ya caracterizado en el laboratorio (comunicación personal, Lorena Norambuena). Para confirmar y describir más claramente las diferencias observadas en el cultivo, se realizó una curva de crecimiento a partir de cultivos con la misma DO_{600} inicial (figura 6)

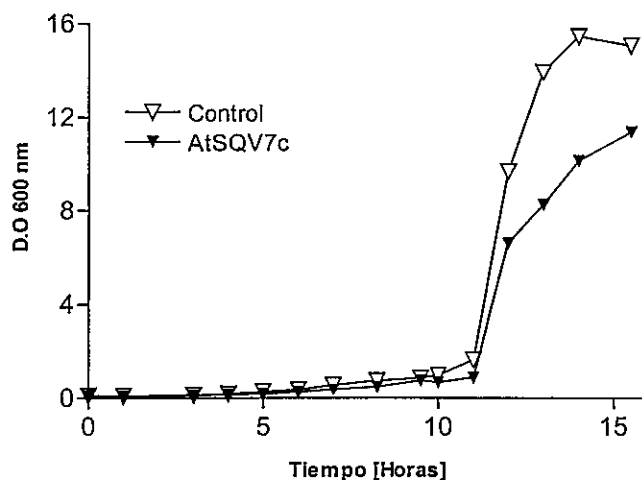


Figura 6. Curva de crecimiento de levaduras Control y AtSQV7c. Se prepararon preinóculos en SCM-URA de las levaduras control, transformadas con pGPD426.myc (triángulos blancos) o levaduras AtSQV7c transformadas con pGPD426.AtSQV7c.myc (triángulos negros). El crecimiento se realizó a partir de igual DO_{600} inicial, a 30 °C y en SCM-URA. Para monitorear el crecimiento, alícuotas del cultivo fueron medidas por absorbancia a 600nm según se indica en el eje de ordenadas.

En la figura 6 se observa que las levaduras control alcanzan niveles mayores de densidad óptica, incluso desde tiempos tempranos en el cultivo, lo que sugiere que el número de células generadas en esta cepa es mayor. Por otra parte, se aprecia una disminución de la tasa de crecimiento y una reducción de la duración de la fase de crecimiento logarítmico de las colonias de levaduras AtSQV7c, aún cuando esta parte de la curva de crecimiento no se encuentra muy bien definida

Para evaluar la influencia de la sobreexpresión de una proteína heteróloga sobre las proteínas propias de la levadura, se realizó una electroforesis de proteínas totales.

La figura 7 muestra que no existe una alteración importante en el perfil de proteínas de las levaduras por efecto de la transformación con AtSQV7c o AtSQV7I respecto al Control, sugierendo que el cambio producido en la levadura que expresa AtSQV7c no esta relacionada a un desbalance en la síntesis de proteínas.

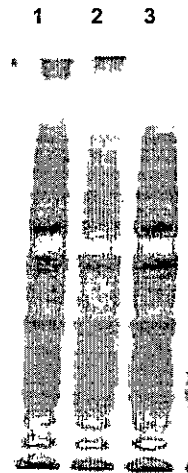


Figura 7. Patrón electroforético de proteínas totales de levaduras: Cultivos de levaduras AtSQV7I, AtSQV7c y Control fueron homogenizadas y centrifugados. Los sobrenadantes fueron mezclados con buffer desnaturalizante, y luego se cargaron 30µg en un gel de poliacrilamida al 10%, SDS PAGE. Carriles 1. AtSQV7I. 2 AtSQV7c 3.Control

5.2.4. Análisis de la expresión de las proteínas AtSQV7I y AtSQV7c en fracciones de membrana de levadura.

Las secuencias aminoácidas de AtSQV7I y AtSQV7c son altamente hidrofóbicas y de poseer actividad TNA, éstas debieran ser proteínas de membrana. Esto sugiere que las proteínas AtSQV7I y AtSQV7c se encuentran integradas en alguna estructura membranosa de las levaduras, probablemente a retículo endoplásmico, aparato de Golgi, membrana plasmática o vacuola. Para obtener fracciones de membrana de las levaduras (microsomos), se cultivaron distintas colonias transformadas con AtSQV7I y AtSQV7c. Posteriormente las levaduras se homogenizaron en un molino con bolas de vidrio (Bead Beater™) en presencia de inhibidores de proteasas. Luego fueron sometidas a fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial como se describe en materiales y métodos. Se prepararon fracciones microsomales ricas en membranas para cada tipo de transformante y para el control.

La acumulación de las distintas proteínas AtSQV7 en las fracciones microsomales se determinó mediante western blot con el anticuerpo comercial contra el epítoto

myc que consta de diez aac. Éste se encontraría presente en el extremo carboxilo de las proteínas AtSQV7, de acuerdo al diseño de los vectores de expresión (Figura 2).

En resultados iniciales (no mostrados) observamos que fracciones de levaduras AtSQV7c exhiben múltiples bandas, donde la menor de ellas corresponde al tamaño esperado para el monómero de la proteína (32 Kda). Esta multiplicidad de bandas en electroforesis de proteínas de membrana ha sido atribuido a la agregación inespecífica tras la preparación de muestras a 100°C (Gao y Dean,2000; Segawa y cols, 2002; Maize Genome Database). Para evitar esta agregación de las proteínas, las muestras se incubaron a 60 °C por 15 minutos en el buffer de carga para SDS-PAGE (Figura 8B).

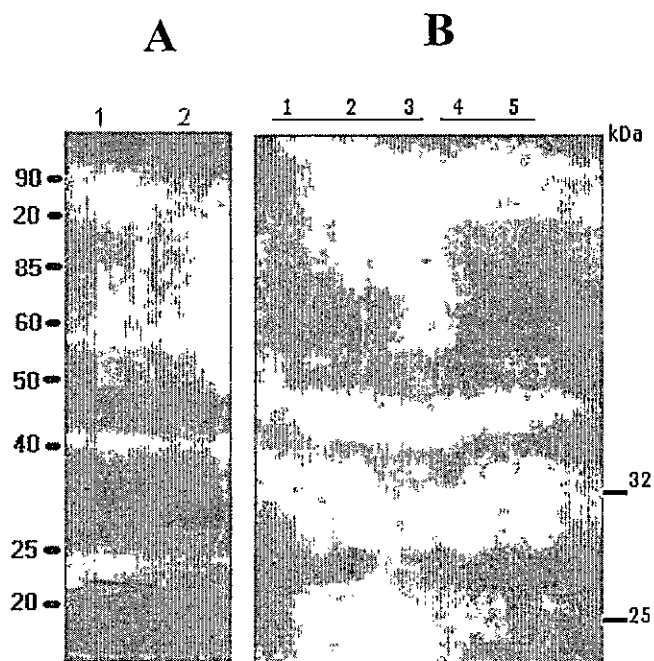


Figura 8. Expresión de proteínas AtSQV7 en *S.cerevisiae*. Cepas de levadura transformadas con pGPD426(AtSQV7c)myc, pGPD426(AtSQV7I)myc o pGPD426myc(vacío) fueron cultivadas en medio mínimo sin uracilo y cosechadas en fase logarítmica. Las levaduras fueron homogenizadas en un molino de bolas de vidrio y posteriormente sometidas a centrifugaciones hasta 100.000g. Cada pellet rescatado (fracción microsomal) se resuspendió en buffer de membranas y su concentración de proteínas medida por método BCA. **A.** Inmunodetección de las proteínas AtSQV7I (carril 1) y AtSQV7c (carril 2) en preparaciones de cada cepa, preparadas a 100 °C. **B** Proteínas de levaduras transformadas con el vector vacío (carriles 1 y 4) y AtSQV7c (carriles 2, 3 y 5), preparadas por calentamiento en buffer de carga desnaturalizante a 60°C por 15 minutos (carriles 2,3), o a 100°C por 10 minutos (carriles 4 y 5). Para todos los casos se cargaron 30µg de cada muestra en geles SDS 10% junto con estándares de peso molecular.

En la Figura 8B (carril 2 o 3) se observa que la proteína AtSQV7c aparece como una banda única. Al realizar el mismo análisis con fracciones de levaduras AtSQV7I y AtSQV7c en paralelo (figura 8A), se observa que la proteína AtSQV7I es de mayor tamaño. Al medir la migración relativa de ambas proteínas, se determinaron sus pesos experimentales, incluyendo al epítipo myc. La proteína AtSQV7I.Myc tiene una masa de 33kDa y la proteína AtSQV7c.Myc 29kDa. Los tamaños predichos son de 35.8 kDa para AtSQV7I.Myc y de 33 kDa para AtSQV7c.Myc. Anteriormente en el caso de proteínas de membrana se ha observado una masa molecular aparente menor que la deducida de la secuencia aminoacídica (Berninsone y cols, 1997). En el carril correspondiente a la cepa Control (figura 8B, carril 1 y 4) no se detectan bandas por lo tanto el anticuerpo contra el epítipo myc reaccionó de manera específica con las proteínas etiquetadas con Myc. En conclusion estos experimentos muestran que se obtuvieron cepas de levadura que acumulan las proteínas AtSQV7I.myc o AtSQV7c.myc en fracciones de membranas.

5.3. Análisis de la función bioquímica de las proteínas AtSQV7

5.3.1. Preparación de vesículas de levaduras transformantes para los genes AtSQV7c y AtSQV7I

Para evaluar la capacidad de las proteínas AtSQV7I y AtSQV7c de transportar nucleótidos azúcar, es necesario disponer de un sistema experimental que permita integrar estas proteínas en membranas lipídicas que separen compartimentos aislados entre sí. Se demostró en 5.2.4 que las proteínas AtSQV7I y AtSQV7c se encuentran en las fracciones membranosas de las levaduras transformadas. Para determinar la capacidad de estas proteínas de transportar nucleótidos azúcar se purificaron fracciones ricas en membranas en condiciones que permitieran la obtención de vesículas selladas. Se cultivaron levaduras en medio SCM-URA, las que luego debieron romperse bajo condiciones controladas. Inicialmente se utilizó un procedimiento mecánico con bolas de vidrio. Aún cuando éste es fácil de realizar no resultó adecuado por su excesiva abrasividad, que no preservó la integridad de

las membranas (datos no mostrados). Se utilizó entonces un procedimiento enzimático.

5.3.1.1. Rompimiento de levaduras por método enzimático.

Se utilizó la enzima endoglucanasa β 1-3 para obtener esferoplastos debido a que la levadura *S.cerevisae* posee una pared celular con gran cantidad de este polisacárido. Una vez obtenidas las suspensiones de esferoplastos, las levaduras son lisadas por cambio en la osmolaridad del medio, logrado a través de la adición de agua. La ruptura de los esferoplastos por el fuerte cambio de presión osmótica, ocasiona una disminución en la turbidez de la suspensión, la que se puede medir por cambios en la absorbancia a 600 nm. Para determinar el tiempo de digestión enzimática de los cultivos de levaduras que permitiera obtener la mayor cantidad posible esferoplastos, se monitoreó la formación de esferoplastos de las levaduras AtSQV7c y control mediante una preparación comercial de endoglucanasa denominada Zymoliasa100T. Como se muestra en la tabla 1, las incubaciones entre 40 y 90 minutos con esta enzima produjeron una disminución de 4 a 6 veces en la DO₆₀₀ de la suspensión de esferoplastos. Las alícuotas del cultivo tratadas de esta forma se volvían transparentes tras la adición de agua, lo que indica un alto nivel de formación de esferoplastos.

Preparación	DO ₆₀₀ Inicial	DO ₆₀₀ Final	Tiempo de Incubación (min)	
Control	1	0,645	0,086	40
	2	0,661	0,077	35
	3	0,745	0,077	60
AtSQV7c	1	0,467	0,036	40
	2	0,822	0,178	35
	3	0,550	0,067	60

Tabla 1. Método enzimático de ruptura de la pared de levaduras. Se muestran tres ensayos independientes 1, 2 y 3. Cada valor corresponde a la DO₆₀₀ de una alícuota de la levadura correspondiente luego de ser sometida a choque osmótico con agua para determinar el grado de formación de esferoplastos debido al tratamiento con Zymoliasa 100T en los tiempos indicados. Se puede apreciar la variabilidad del procedimiento, por lo que siempre se verifico una caída en la DO₆₀₀ de al menos tres veces respecto al inicio, y además tiempos de digestión nunca superiores a 2 horas (para evitar alteraciones de la levadura en respuesta a la lisis, especialmente liberación de proteasas).

5.3.1.2. Medición de Integridad de Vesículas

Los esferoplastos obtenidos en 5.3.1.1. fueron homogenizados y luego se separaron los distintos organelos por medio de fraccionamiento subcelular, utilizando el método descrito por Berninsone y cols (ver detalles en Materiales y Métodos). De acuerdo a estudios de otros TNAs expresados en levadura, se seleccionó una fracción rica en membranas del aparato de Golgi (Roy y cols,1998; Ishida y cols,1999; Roy y cols,2000). Para determinar la cantidad de vesículas selladas en esta fracción se empleó un método basado en la actividad de la enzima GDPasa, endógena de la levadura *S.cerevisiae*, la que hidroliza GDP en GMP y Pi (Yanagisawa y Resnick, 1990). A nivel subcelular, GDPasa se encuentra en la membrana del aparato de Golgi, con su sitio activo orientado hacia el lumen del organelo (Abeijon y cols, 1989). Al incubar la fracción enriquecida con vesículas de Golgi de levadura con GDP, éste estará disponible para la enzima sólo si las vesículas están rotas, por lo tanto la cantidad de fosfato liberado puede ser utilizado como indicador de la población de vesículas rotas. La permeabilización de las vesículas con un detergente (Triton X-100), da cuenta en liberación de fosfato de la población total de vesículas. Por lo tanto, la razón entre ambas situaciones representa la población de vesículas intactas. El parámetro obtenido por este método se conoce por el nombre de latencia. La tabla 2 muestra valores habituales de integridad. (Tabla 2)

Integridad en distintas preparaciones de vesículas	
Control (% latente)	AtSQV7 (% latente)
89	91
89	84
78	82
92	90

Tabla 2. Valores de integridad de vesículas en cuatro preparaciones distintas. Detalles sobre los cálculos en Materiales y Métodos.

5.3.1.3. Mediciones del volumen de vesículas y del espacio intervesicular

Las vesículas latentes obtenidas se usaron para la evaluación de la actividad de transporte de nucleótidos azúcar por parte de las proteínas AtSQV7. Estos últimos se realizaron a través del ensayo de transporte descrito por Perez y Hirschberg (1987), en el que preparaciones de vesículas se incubaron con nucleótidos azúcar. Las vesículas y la solución de incubación con el sustrato remanente no transportado, fueron separadas mediante centrifugación. En el sedimento obtenido, las vesículas aglomeradas dejan espacio entre ellas. Se ha descrito que parte del sustrato con que se realiza el ensayo de transporte puede quedar atrapado en este espacio extravésicular, resultando así una sobreestimación del nivel de transporte obtenido (Perez y Hirschberg, 1987). Para determinar la importancia de este factor en nuestros experimentos, se determinó el volumen de las vesículas y del espacio extravésicular en el sedimento que se forma después de centrifugar la muestra en la que se realiza el ensayo de transporte. De esta forma es posible estimar la cantidad de sustrato que queda atrapado en el sedimento. Los resultados de la Tabla 3 muestran que el volumen exterior es bastante menor que el volumen total (2% y 5% de este último para vesículas control y AtSQV7c, respectivamente). Por lo tanto, en las condiciones del ensayo de transporte, la sobreestimación de los valores de transporte por efecto de atrapamiento inespecífico de sustrato en el espacio extravésicular es poco significativa.

Volumen de Vesículas AtSQV7c y Control			
	V_r [nl/mg prot]	V_e [nl/mg prot]	V_i [nl/mg prot]
Control	225,5 ± 24	4,4 ± 1,6	221 ± 24
AtSQV7c	254,5 ± 27	3,4 ± 0,4	251 ± 27

Tabla 3 Determinación del Volumen Extravesicular. El volumen total (V_t) se determina mediante deoxiglucosa radiomarcada que difunde al interior de las vesículas. El volumen externo, intervesicular (V_e) se determina con acetato radiomarcado que solo permanece en el exterior. Puede observarse que gran parte del volumen total existente corresponde al interno

5.3.2. Experimentos de transporte de nucleótidos azúcar en vesículas aisladas desde levaduras que expresan AtSQV7c y AtSQV7I.

5.3.2.1. Especificidad de vesículas en el transporte de distintos nucleótidos azúcar

Entre los TNAs reportados, algunos son capaces de transportar un único sustrato, mientras que otros pueden transportar un amplio rango de nucleótidos azúcar (Hong y cols, 2000). Medimos el transporte de UDP-ácido glucurónico, UDP-galactosa y además UDP-Glc, aún cuando este nucleótido azúcar no es transportado por SQV7 de *C.elegans* (Berninsone y cols, 2001), se incorporó al análisis por su importancia biológica como precursor de la biosíntesis de casi todos los demás nucleótidos azúcar (Reiter y Vanzin, 2001).

Al medir el transporte de UDP-Gal (Figura 9) se encontró que las vesículas obtenidas desde levaduras que expresan AtSQV7c acumularon 1,8 veces más sustrato que vesículas control. En el caso de AtSQV7I, aún cuando los valores de transporte de UDP-Gal son menores, también existe una razón de transporte cercana al doble respecto al control. La acumulación de UDP-ácido glucurónico debida a AtSQV7I o AtSQV7c fue similar respecto al control (Figura 9A). De manera interesante, vesículas que expresan ya sea la proteína AtSQV7c o AtSQV7I mostraron una acumulación considerable de UDP-Glc. Las vesículas que expresan AtSQV7c incorporaron UDP-Glc 1,7 veces respecto al control mientras que las vesículas que expresan AtSQV7I incorporaron UDP-Glc 2,6 veces respecto al control. Los ensayos de transporte realizados sugieren que AtSQV7c y AtSQV7I transportan UDP-Glc, UDP-Gal y que UDP-acido glucurónico no es transportado por ninguno de estas proteínas.

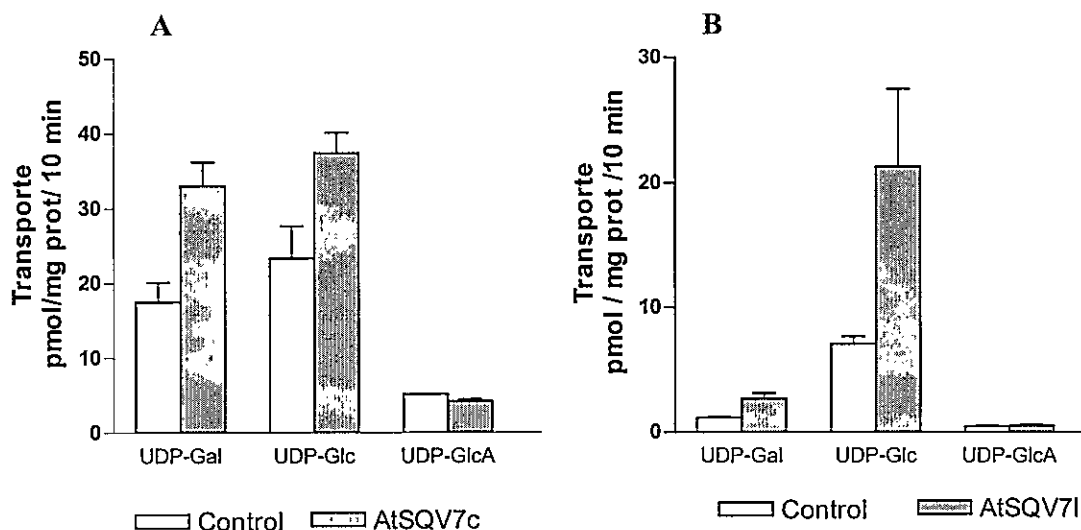


Figura 9. Transporte de nucleótidos azúcar en vesículas aisladas desde AtSQV7c y AtSQV7I. Vesículas de levaduras transformadas con pGPD426.myc (barras blancas), pGPD426.AtSQV7c.myc o pGPD426.AtSQV7I.myc (barras negras) y con al menos un 70% de latencia, fueron incubadas con una concentración 10 μ M de los distintos nucleótidos azúcar radiomarcados (eje de abscisas) a 30°C por 10 min. La reacción se detuvo por dilución con buffer frío. Las vesículas fueron separadas desde la suspensión por ultracentrifugación, lavadas y sometidas a choque osmótico. Luego se realizó una precipitación en PCA 4%, para la separación del contenido soluble y los aceptores endógenos presentes en las vesículas lisadas. El sobrenadante conteniendo el nucleótido azúcar fue analizado en un contador de centelleo. Las cpm obtenidas en cada caso, normalizadas por la cantidad de proteína utilizada (habitualmente 1mg) se transformaron en picomoles de acuerdo a la actividad específica del nucleótido azúcar marcado (eje de ordenadas). Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3). Se utilizó UDP-Gal [Galactosa-1-³H(N)] ; UDP-[³H]glucosa (glucosa-2-[³H]) ; UDP-ácido glucurónico (uridina-5.6-[³H])

5.3.2.2. Transporte a menor concentración de UDP-Glc.

Para tener mayor información respecto a la sensibilidad del transporte de UDP-Glc observado por parte de las proteínas AtSQV7, se realizó un experimento de transporte en presencia de una concentración de UDP-Glc diez veces menor. Las vesículas que expresan AtSQV7c incorporaron UDP-Glc 4 veces respecto al control mientras que las vesículas que expresan AtSQV7I incorporaron UDP-Glc 2 veces respecto al control (Figura 10), por lo que a concentraciones de 1 μ M, AtSQV7c y AtSQV7I conservan su capacidad de transporte de UDP-Glc. Este experimento además confirma la presencia de una actividad endógena de transporte de UDP-Glc en las vesículas de levadura.

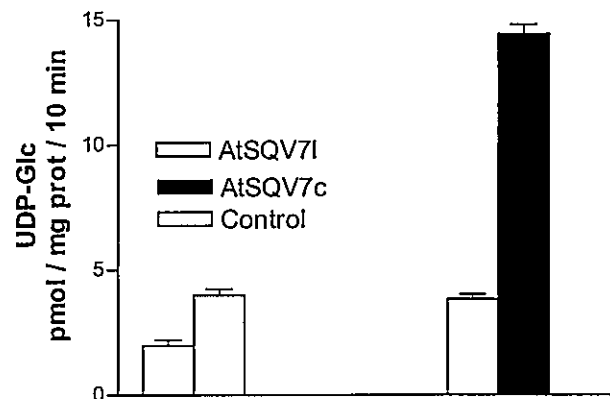


Figura 10. Efecto de la concentración en el transporte de UDP-Glc. Las vesículas de las distintas levaduras señaladas en la figura fueron incubadas con UDP-Glc $1\mu\text{M}$ por 10 minutos. Los valores de cada muestra corresponden a un ensayo realizado por triplicado y el error a la desviación estándar

5.3.2.3. Ensayo de competencia del transporte de UDP-glucosa con UDP-Ácido glucurónico.

Nos llamó la atención que si bien SQV7 de *C.elegans* transporta UDP-ácido glucurónico, nuestros experimentos indicaran que las proteínas AtSQV7 no transportaran este nucleótido azúcar (figura 9). Como además las levaduras controles tampoco transportan UDP-ácido glucurónico se descarta un posible enmascaramiento por actividad endógena, como en el caso del transporte de UDP-Glc. Dado el especial interés del laboratorio por encontrar un TNA con especificidad por UDP-ácido glucurónico, se evaluó la capacidad de UDP-ácido glucurónico de competir con el transporte de UDP-Glc al interior de vesículas de AtSQV7c y AtSQV7I. El resultado muestra que para AtSQV7I, al realizar el ensayo en presencia de una cantidad molar de UDP-ácido glucurónico 10 veces superior, no se aprecia una disminución en el transporte de UDP-Glc (Figura 11), mientras que en el caso de AtSQV7c se observa una disminución leve. Por lo tanto, en las condiciones utilizadas, UDP-ácido glucurónico no compite significativamente con el transporte de UDP-Glc al interior de las vesículas que expresan las proteínas AtSQV7I y AtSQV7c.

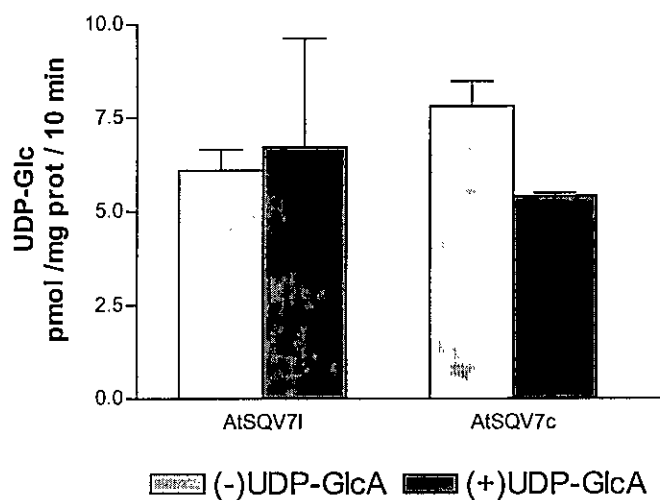


Figura 11. Competencia del transporte de UDP-Glc con UDP-ácido glucurónico. Vesículas AtSQV7I y AtSQV7c fueron incubadas por 10 minutos con una mezcla de UDP-GlcA 10 μ M y UDP- 3 H]Glc 1 μ M. Los valores de cada muestra corresponden a un ensayo realizado por triplicado y las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3).

5.3.2.4. Efecto de la permeabilización de la membrana sobre la actividad de transporte

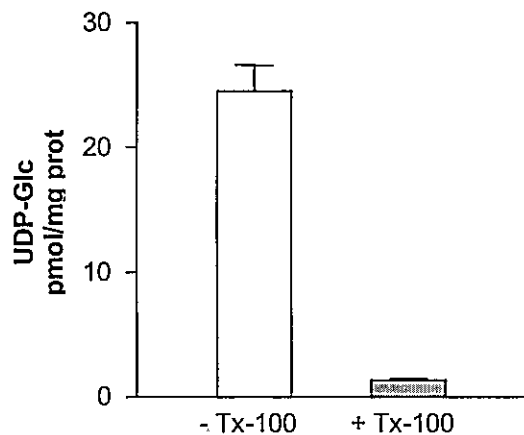
Con el fin de aportar mayor evidencia de que los ensayos de transporte realizados hasta ahora corresponden a un proceso de incorporación de sustratos hacia el interior de las vesículas intactas aisladas de levaduras, analizamos el efecto sobre el ensayo de transporte cuando se perturba la integridad de las vesículas utilizadas. Para ello se sometieron vesículas de AtSQV7c a una concentración de 1% del detergente Triton X-100 por 20 minutos antes del inicio del ensayo de transporte con UDP-Glc, por 10 minutos. Esto produjo una fuerte caída en la cantidad de UDP-Glc incorporada con respecto a lo observado en vesículas no tratadas (Figura 12, sgte página). Esta sensibilidad observada apoya la idea de que en las preparaciones de vesículas usadas durante los ensayos de transporte, efectivamente ocurre acumulación de sustrato al interior de una estructura cerrada, lábil al tratamiento con detergente en baja concentración.

5.3.2.5. Curso Temporal de la Actividad de Transporte de AtSQV7c

Como parte de la caracterización funcional del transporte de nucleótidos azúcar en preparaciones de vesículas de levadura, se midió la actividad de transporte a distintos tiempos de incubación con UDP-Glc. Los resultados presentados en la tabla 4 muestran que a tiempos de 3 y 6 minutos, hay una gran diferencia en la

cantidad de sustrato soluble en las vesículas, cuando se comparan vesículas control con aquellas que expresan AtSQV7c.

Figura 12. Susceptibilidad del transporte UDP-Glc en presencia de detergente. Vesículas AtSQV7c preincubadas por 20 minutos a 30°C sin Triton X-100 (barra blanca) o con Triton X-100 al 1% (barra negra) fueron usadas para un experimentos de transporte de 10 minutos a 30°C con UDP-[³H]Glc. Las barras de error corresponden a desviación estándar (n=3).



Experimentos con incubaciones de 10 minutos mostraron un fuerte incremento en la cantidades de sustrato incorporado en ambos tipos de vesículas. Estas cantidades nunca se igualaron. Este resultado muestra que a tiempos menores de incubación, la actividad de transporte de AtSQV7c se visualiza más claramente. Por otra parte, en las vesículas control se observa un aumento de la incorporación de UDP-Glc en el tiempo, lo que reafirma la presencia de una actividad endógena de transporte para este nucleótido azúcar en las vesículas de la levadura *S.cerevisiae*, como se había observado en los experimentos de transporte con baja concentración de UDP-Glc (Figura 10).

5.3.2.5.1. Transferencia a aceptores endógenos

A partir de los datos presentados en la tabla 4 se puede observar que la incorporación de UDP-Glc aumenta marcadamente a los 10 minutos de incubación, tanto para vesículas que expresan AtSQV7c como para vesículas control. ¿Cuál es la razón de este fuerte cambio? De acuerdo al modelo de síntesis de polisacáridos en el aparato de Golgi (figura 1), existe un acoplamiento funcional entre transportadores y transferasas. Este acoplamiento favorecería un mayor flujo de sustrato hacia el interior de este organelo por desplazamiento del equilibrio de las reacciones conjuntas hacia la transferencia. Quisimos explorar la posibilidad de que

en la levadura *S.cerevisiae* exista un mecanismo análogo al del modelo descrito, y para lograrlo buscamos aceptores de la levadura, que pudieran actuar en conjunto con la actividad endógena propuesta para el transporte de UDP-Glc. Para esto, aprovechamos el sistema de vesículas usado hasta ahora. En este, además de poder medir la cantidad de sustratos que permanecen solubles dentro de las vesículas, es posible medir la cantidad del sustrato asociado a componentes de las vesículas, insolubles en PCA 4%.

Transporte de UDP-[³ H]Glc						
Tiempo Min	Soluble Intravesicular pmol/mgprot		Transferencia pmol/mgprot		Totales pmol/mgprot	
	Control	AtSQV7c	Control	AtSQV7c	Control	AtSQV7c
3	1,8 ± 0,2	14,1 ± 0,6	0,5 ± 0.11	1,1 ± 0.20	2,3 ± 0.65	15,2 ± 0.23
6	2,5 ± 0,2	11,0 ± 0,4	0,9 ± 0.05	8,3 ± 1.95	3,4 ± 0.46	19,3 ± 1.95
10	21,2 ± 5,2	36,4 ± 6,2	23,0 ± 2.87	39,9 ± 2.18	44,2 ± 8.14	76,3 ± 3.60

Tabla 4. Cinética de incorporación de UDP-Glc 10 µM en vesículas de levaduras. Vesículas de las cepas AtSQV7c y control se utilizaron para ensayos de transporte en los que tras separar por precipitación con PCA 4% se midió el contenido radioactivo de la fracción soluble y de la fracción insoluble, previamente disuelta en NaOH. Las cepas, el ensayo de transporte y la cuantificación de radiomarca son descritos en la figura 9.

La transferencia de azúcares a aceptores endógenos (Tabla 4, columna 'Transferencia') se midió en las vesículas de levaduras AtSQV7c y control utilizadas en los experimentos del curso temporal de transporte. Ambos tipos de vesículas, las control y las que expresan AtSQV7c, muestran acumulación de marca radioactiva en componentes insolubles en PCA 4% (ver materiales y métodos). Esta acumulación presenta dos características importantes: (1) Aumenta con el tiempo de incubación, para ambos tipos de vesículas. (2) Alcanza niveles mayores en las vesículas AtSQV7c, para todos los tiempos ensayados. Esta evidencia sugiere que el nivel de incorporación de sustrato marcado en componentes insolubles de las vesículas de levaduras, depende directamente del nivel de transporte del nucleótido azúcar, el que se modificaría con el aumento de la actividad de transporte. Los

resultados sugieren que esta última situación es la que ocurriría en las vesículas que expresan AtSQV7c.

5.4. Caracterización fenotípica de levaduras AtSQV7c

El hecho de que la cantidad de componentes insolubles de las vesículas de levadura sean alterados por la presencia de AtSQV7c, sugiere que la actividad del sistema de transferencia de UDP-Glc en las vesículas de la levadura *S.cerevisiae*, no depende de una vía específica de entrada del sustrato a las vesículas. Por otra parte esto sugiere que en las levaduras que expresan AtSQV7c, los mecanismos de transferencia de UDP-Glc a aceptores endógenos y el transportador AtSQV7c se encuentran localizados en un mismo compartimento. En eucariontes los organelos de la ruta secretoria son importantes sitios de síntesis de macromoléculas a partir nucleótidos azúcar como UDP-Glc, por lo que la transferencia observada probablemente ocurre en el aparato de Golgi aunque no podemos descartar el retículo endoplásmico. Surgió entonces la interrogante acerca del efecto de la expresión de AtSQV7c en la levadura *S.cerevisiae*, particularmente sobre su metabolismo de polisacáridos de la pared. Las levaduras, al igual que las células vegetales, sintetizan polisacáridos formados de glucosa destinados a la pared, aunque de una menor variedad y complejidad, como por ejemplo polisacáridos de glucosa β 1-3 y β 1-6 (Smits y cols, 2001; Klis y cols, 2002).

Para evaluar los posibles cambios que ocurren en la pared de las levaduras, analizamos el tamaño y la rugosidad de superficie de las levaduras que expresan AtSQV7c, y de levaduras control. El estudio se realizó mediante citometría de flujo, una técnica basada en el análisis de la luz dispersada a partir de un rayo que incide sobre la superficie de una célula: la fracción de luz dispersada lateralmente (Side Scatter) está relacionado con la textura o topología de la superficie celular, mientras que la luz que es dispersada en la misma dirección del rayo incidente, hacia delante, (Forward Scatter) es indicativa del tamaño celular. Los histogramas de tamaño muestran una diferencia importante entre las dos poblaciones celulares (Figura 13). Los histogramas de rugosidad muestran un desplazamiento de la población AtSQV7c respecto a la control, sin embargo, la magnitud de este cambio no es

suficiente para asegurar que existe un cambio real en la rugosidad de levaduras que expresan AtSQV7c y podría estar influido por otros factores como el tamaño celular.

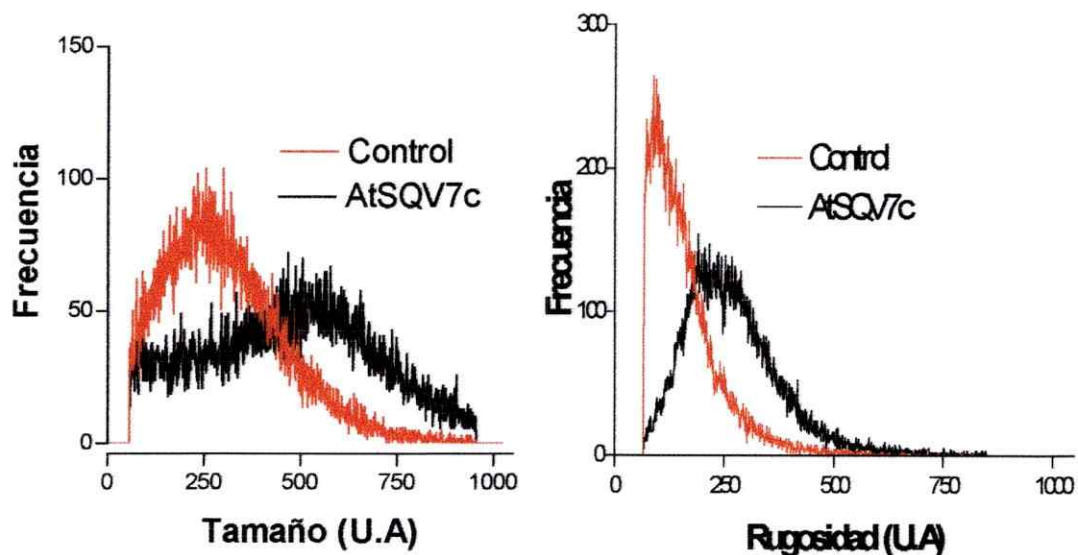


Figura 13. Histogramas de mediciones citométricas de las cepas Control y AtSQV7c (descritas en figura 8). Cultivos de las distintas cepas se crecieron en medio mínimo por dos o tres días, para luego ser analizadas en un citómetro de flujo. Se registraron los parámetros rugosidad y tamaño de las células. La línea negra corresponde a las células AtSQV7c y la línea roja corresponde a las células control.

Mediante microscopía óptica, fue posible confirmar que las levaduras AtSQV7c son de mayor tamaño que las control (Figura 14, sgte página). Las observaciones de las levaduras que expresan AtSQV7c sugieren que la presencia de esta proteína en algún compartimiento intracelular modifica la pared de la levadura *S.cerevisiae*, probablemente por efecto sobre el metabolismo para la síntesis de polisacáridos y quizás otras moléculas.

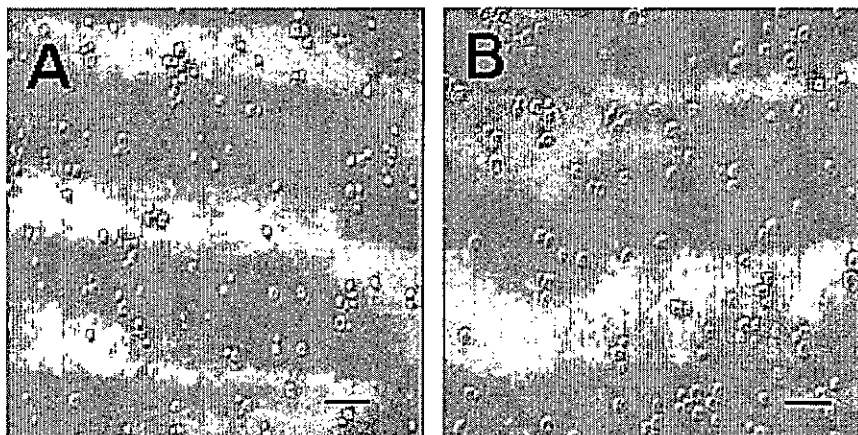


Figura 14. Diferencias de tamaño entre levaduras Control (A) y AtSQV7 (B), crecidas tres días y observadas por microscopía DIC (200X). Ambas cepas de levaduras fueron crecidas por tres días a 30°C en SCM-URA. La barra corresponde a 25µm

6. Discusión

En este trabajo se ha presentado evidencia de la capacidad de las proteínas de *Arabidopsis thaliana*, AtSQV7l y AtSQV7c, de transportar nucleótidos azúcar. Estos genes fueron identificados por homología a la secuencia proteica del TNA de *C.elegans*, SQV7 y sus productos proteicos fueron evaluados funcionalmente en vesículas extraídas de levaduras transformadas con estos genes.

6.1 Transporte de Nucleótidos Azúcar en las proteínas AtSQV7

Los ensayos de transporte consideraron tres distintos nucleótidos azúcar: UDP-GlcA, UDP-Gal y UDP-Glc. Las mediciones de transporte indicaron que ninguna de las proteínas AtSQV7 pudo transportar UDP-GlcA. Al realizar ensayos de competencia en que UDP-GlcA se encuentra en cantidad 10 veces mayor que otro sustrato, sólo el transporte de UDP-GlcA en AtSQV7c parece verse afectado, aunque de manera leve si se considera la gran cantidad de UDP-GlcA presente en el medio (10 μ M), por lo que son necesarios experimentos adicionales para confirmar esta tendencia. Cuando UDP-Gal fue utilizado como sustrato, AtSQV7c y AtSQV7l mostraron niveles de transporte cercanos al doble del observado en los controles. Es particularmente necesario confirmar el transporte de UDP-Gal por parte de AtSQV7l, dado el bajo nivel de actividad observada con este transportador. Aún cuando UDP-Glc no es un sustrato para SQV7, los experimentos realizados muestran que tanto AtSQV7l como AtSQV7c transportan este nucleótido azúcar. Hasta el momento se ha reportado sólo un transportador de UDP-Glc, AtUTR1, el que además transporta UDP-Gal (Norambuena y cols, 2002). La comparación de actividades muestra que sólo el transporte de UDP-Gal es común entre SQV7 de *C.elegans* y las proteínas AtSQV7 de *A.thaliana*. Sin embargo uno de los sustratos de SQV7, UDP-GalNac no fue probado en este trabajo, ya que no fue posible obtener el sustrato radioactivo. A pesar de que la homología con SQV7 es inferior al 50%, resulta interesante que AtSQV7 presente actividad TNA, lo que indica que el alineamiento fue capaz de seleccionar de la base de datos TAIR una secuencia con este tipo de actividad. Sin embargo, establecer la relación entre las zonas homólogas de ambas proteínas y su función no es una tarea simple, ya que junto con las diferencias de actividad señaladas existe poca información de la relación

estructura/función para SQV7. Al respecto, dos mutaciones puntuales de la proteína SQV7 (G95D y L151P), causan una disminución de la capacidad de transporte (Berninsone y cols, 2001), pero estas mutaciones no están claramente conservadas en las proteínas AtSQV7 (A95 y F151). El avance en la comprensión de la base estructural del transporte de nucleótidos azúcar por AtSQV7 requiere información de la relevancia a nivel funcional de aquellas zonas de esta proteína que den cuenta de la homología con SQV7 o con algún TNA de especificidad similar a AtSQV7. Para esto podría evaluarse el efecto de mutaciones puntuales y deleciones de estas zonas sobre la capacidad de transporte de las proteínas AtSQV7.

6.1.1. Influencia del extremo amino en la actividad de transporte de las proteínas AtSQV7

La diferencia en las secuencias aminoacídicas de las proteínas AtSQV7 se traduce en diferencias estructurales relevantes. Específicamente, en la presencia de un segmento transmembrana adicional en el extremo amino según muestran los análisis de los perfiles hidrofóbicos de AtSQV7I y AtSQV7c, así como distintos programas de predicción de topología de estas proteínas. Dado que ambas proteínas AtSQV7 presentan una actividad de transporte similar, parece improbable que la región del primer segmento transmembrana de AtSQV7I sea esencial para la formación del sitio activo o que forme parte de la estructura terciaria involucrada en el transporte de UDP-Glc, UDP-Gal o UDP-GlcA. ¿Existe evidencia de que diferencias como las encontradas entre AtSQV7I y AtSQV7c puedan ser relevantes? Gao y Dean (2000) encontraron que en Vrg4, el transportador de GDP-Man de *S.cerevisiae*, la deleción del primer segmento transmembrana en el extremo amino reduce la actividad de la proteína. Aoki y cols (2001, 2003) generaron transportadores quiméricos funcionales obtenidos a partir de combinaciones de hélices de los transportadores de CMP-SA y de UDP-Gal humanos (hCST, hUGT1 respectivamente) que tienen un 43% de identidad entre sí. Sus resultados muestran que hUGT1 es más sensible al reemplazo de porciones terminales de la proteína, entre ellas el primer segmento transmembrana. En cambio, hCST es afectado por reemplazos de hélices interiores. De manera interesante, la fusión de las hélices críticas para cada actividad les permitió generar un transportador bifuncional. Esta

variedad en el comportamiento de los TNA frente a la pérdida de fragmentos del extremo amino terminal sugiere una cierta plasticidad estructural de los TNAs. Esto sustenta la similitud funcional observada entre AtSQV7I y AtSQV7c pese a la diferencia de un putativo dominio transmembrana entre ambas proteínas. No obstante, no es descartable que el transporte de otros nucleótidos azúcar o la interacción con otros componentes celulares dependan positivamente del extremo amino de esta proteína.

6.2. Evaluación de la estrategia experimental.

6.2.1. Validez de los ensayos de transporte

Distintas evidencias mostraron que el sistema experimental basado en vesículas, efectivamente tiene la capacidad de medir transporte:

La permeabilización con detergente confirma la dependencia de la medición y la necesidad de la estructura cerrada de las vesículas (figura 9). La baja proporción de volumen intervesicular descarta que, como consecuencia de la recuperación de las vesículas por centrifugación durante el ensayo de transporte, se acumule sustrato en el espacio intervesicular (tabla 3). A nivel funcional, se verificó la dependencia de las mediciones de la cantidad de sustrato radioactivo detectado con la concentración de nucleótido azúcar presente en el ensayo (figura 11) y con el tiempo de incubación (tabla 5), evidencias que apoyan la intervención de una proteína (o varias) en el ensayo de transporte en vesículas.

Respecto a la calidad de los datos obtenidos, se observó una fuerte variabilidad entre los valores absolutos de transporte entre distintos ensayos. Esto es particularmente claro en el caso de las levaduras control. No obstante esta variabilidad, la razón de transporte se mostró mas estable entre experimentos, no observándose nunca resultados contradictorios en un ensayo de transporte en particular. Debido a esto, se adoptó la razón de mediciones de transporte relativas al control como indicador de la actividad de las vesículas AtSQV7c o AtSQV7I.

6.2.1. Limitaciones del sistema experimental

La evaluación de transporte entre AtSQV7I y AtSQV7c fue sólo de tipo cualitativa, debido a la variabilidad proveniente de dos fuentes principales: Se observaron diferencias en la expresión de proteínas entre las distintas transformaciones de levaduras. Estas diferencias pueden ser reflejo de la variabilidad en los niveles de transcripción y traducción o de la estabilidad de mensajeros y proteínas. Una alternativa para futuras correcciones es la normalización de los resultados de transporte de acuerdo al nivel de expresión específica de cada levadura transformada, por ejemplo mediante densitometría de los western blots. Por otra parte se observaron diferencias en la magnitud del transporte entre distintas preparaciones de vesículas, lo que limitó el alcance de las comparaciones que se puedan establecer entre experimentos. Esta variabilidad junto con la gran cantidad de proteína requerida para cada ensayo, condicionaron el diseño de los experimentos. No fue posible disminuir la variabilidad entre preparaciones de vesículas como para determinar parámetros bioquímicos cinéticos de las proteínas AtSQV7. En conclusión, es necesaria una mayor caracterización de los puntos críticos de los protocolos empleados, en especial el cultivo de las levaduras, y la distribución de organelos dentro de la preparación de vesículas.

6.2.3 Presencia del epítipo myc en el extremo carboxilo de las proteínas AtSQV7

Todos los experimentos descritos en este trabajo se han realizado con vectores que permiten la producción de las proteínas AtSQV7 unidas por su extremo carboxilo al epítipo, para así poder determinar su acumulación en la cepa RSY255. No se tiene ninguna información respecto al posible efecto de esta alteración de la secuencia aminoacídica sobre la funcionalidad de los transportadores AtSQV7, por lo que es una tarea futura evaluar transporte de nucleótidos azúcar en levaduras transformadas con versiones del gen de AtSQV7I y AtSQV7c que no se encuentren fusionadas al epítipo myc.

6.3. Existencia de las dos formas del gen AtSQV7 en *A.thaliana*

Los genes que codifican las proteínas AtSQV7I y AtSQV7c son idénticos entre sí, excepto por la presencia de un fragmento adicional en el extremo 5' de AtSQV7I .

Dado el análisis del cromosoma de *A.thaliana* que muestra que ambos genes comparten un mismo locus y que la diferencia de las secuencias entre ambos genes proviene sólo de la presencia de un exón adicional en el caso de AtSQV7I, se planteó la pregunta acerca de la existencia de las dos formas de las proteínas en *A.thaliana* y por lo tanto de la existencia de sus respectivos ARNm. Este trabajo se inició con la secuencia de AtSQV7c, predicha mediante programas computacionales a partir de la secuencia genómica de *A.thaliana*, siendo en ese momento la única publicada en las bases de datos con homología significativa a SQV7 de *C.elegans*. Más adelante, y tras la secuenciación del conjunto total de ADNc de *A.thaliana* (Seki y cols, 2002), fue encontrada la secuencia que hemos llamado AtSQV7I. Ante esta situación, aparece la posibilidad de que la secuencia de AtSQV7c se haya clonado a partir del ADNc de AtSQV7I. Esta idea es apoyada por el hecho de que hasta ahora se han detectado EST sólo de AtSQV7I. Por otra parte los tamaños de las proteínas expresadas en levadura conservan una diferencia apreciable en un gel SDS (figura 6A) indicando que la diferencia de secuencias no ocurre solamente en los mensajeros sino que se conservaría tras la traducción. Esto sugiere que el ARNm de AtSQV7c no corresponde a una modificación postranscripcional del ARNm de AtSQV7I. La evidencia disponible, apunta a que sólo AtSQV7I se expresaría en *A.thaliana*.

6.4. Análisis bioinformático de las proteínas AtSQV7

6.4.1. Cladograma de AtSQV7I y los TNAs ya descritos

Para intentar encontrar algún fundamento estructural a las características de transporte observadas en las proteínas AtSQV7, se construyó un árbol con todas las secuencias de proteínas para las que existe alguna evidencia experimental de su actividad TNA. La figura 15 confirma que AtSQV7I es cercano a un grupo de transportadores, entre los que se encuentra SQV7 de *C.elegans* y que se caracterizan por transportar al menos dos nucleótidos azúcar, uno de los cuales es UDP-GlcA (Selva y cols, 2001; Muraoka y cols, 2001; Segawa y cols, 2002). Sin embargo, a diferencia de AtSQV7I ninguno de estos TNA transporta UDP-Glc. En conclusión, a pesar de que la rama más cercana a AtSQV7 dentro del árbol es la del

grupo de transportadores de UDP-GlcA, la evidencia experimental muestra que AtSQV7 no es capaz de transportar este nucleótido azúcar, lo que sugiere que las similitudes entre en la secuencia aminoacídica de AtSQV7 y las de este grupo de proteínas, no están relacionadas con el transporte específico de UDP-GlcA.

La baja relación entre la secuencia y la especificidad de los TNA podría deberse a dos razones. Primero, es posible que la especificidad en la actividad de estas moléculas resida en una parte pequeña de los TNA y que gran parte de la secuencia de la proteína está destinada a otras funciones relacionadas, por ejemplo con la interacción con otros componentes propios del contexto celular en que se expresan los distintos TNAs. Estas funciones alternativas podrían sesgar la composición de aminoácidos hacia un cierto patrón con su propio grado de conservación entre distintas proteínas. Siendo así, la presencia de estas otras funciones codificadas en la secuencia de los TNAs podrían potencialmente distorsionar la comparación o búsqueda de TNAs mediante los algoritmos de alineamiento de secuencias como BLAST o ClustalW. Una segunda razón para la incertidumbre secuencia-función podría estar dada por motivos estructurales. Dado que los TNAs son proteínas integrales de membrana es probable que los requerimientos no sean tan estrictos en cuanto a su composición aminoacídica, siendo necesaria sólo las características más generales de un cierto tamaño y distribución específica de zonas hidrofóbicas e hidrofílicas dentro de la secuencia, para así conseguir una apropiada inserción en la bicapa lipídica. Al respecto, casi todos los TNAs descritos tienen secuencias alrededor de 350 aminoácidos y un número similar de fragmentos de transmembrana (Berninsone y Hirschberg, 1998).

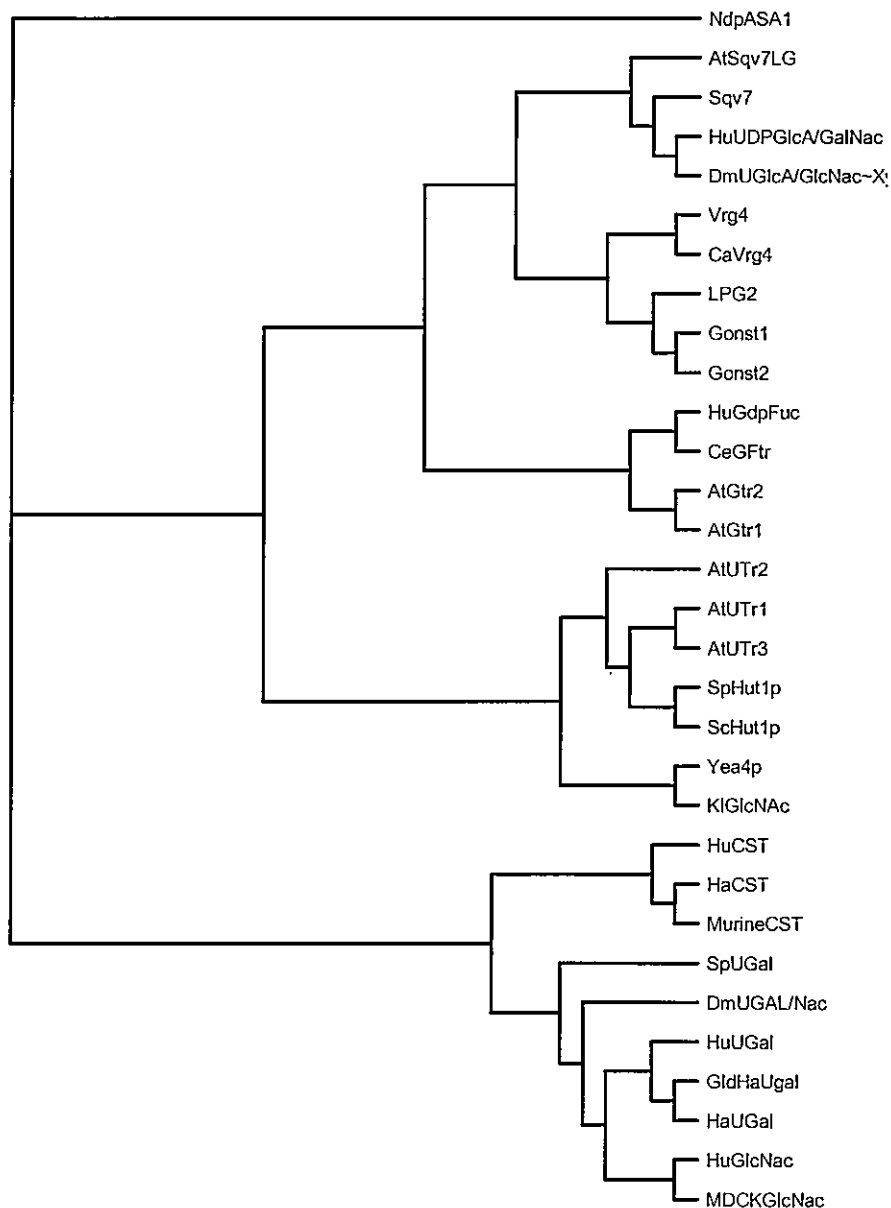


Figura 15. Cladograma de los TNA probados experimentalmente hasta la fecha y NdpASA1, una enzima no relacionada con los TNA. Las secuencias fueron alineadas mediante ClustalX y el cladograma se generó mediante TreeView. Las secuencias fueron obtenidas desde el Genebank.

6.4.2. Análisis de proteínas similares a AtSQV7I en otras especies

El análisis de homólogos a las proteínas AtSQV7 dentro del conjunto total de secuencias de la base de datos Genebank, muestra la presencia de gran cantidad de proteínas similares en otras especies (*A. Gambiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster*,

Humano, levaduras), y que no corresponden a las ya descritas como TNA. En general estas proteínas desconocidas cumplen con las características de tamaño y alta composición de aminoácidos hidrofóbicos hasta ahora observados. Varias de ellas presentan mayor similitud a AtSQV7 que otros TNA caracterizados. Si estas proteínas son efectivamente transportadores, entonces cada especie poseería un amplio repertorio de estas proteínas. Esta amplia distribución y representación entre los eucariontes desde las levaduras, sugiere que los mecanismos de síntesis de polisacáridos y oligosacáridos dentro de este grupo de organismos se encuentra bastante conservado. En efecto, aún cuando el transporte de nucleótidos azúcar es sólo una de las actividades consideradas necesarias para el modelo de biosíntesis de polisacáridos (Figura 1), su presencia en la célula supone la presencia de membranas, compartimentos subcelulares, entre los cuales movilizar estos nucleótidos azúcar y enzimas compartimentalizadas dentro de la célula que utilicen estos nucleótidos azúcar. La posible conservación de mecanismos se ve reforzada por la ausencia de homólogos a AtSQV7I en los genomas de procariontes, lo que sugiere que los TNA no tendrían relación por ejemplo con alguno de los transportadores de la membrana plasmática de estos microorganismos.

6.5 Fenotipo de levaduras AtSQV7c

Durante la realización de todos los ensayos de transporte de UDP-Glc y UDP-Gal observamos una actividad endógena de transporte en las vesículas control. Para el caso de UDP-Glc se buscaron condiciones de tiempo que permitieran minimizar la interferencia por esta actividad endógena. Se han descrito actividades TNA endógenas de *S.cerevisiae* para UDP-Glc en el retículo endoplásmico (Castro y cols, 1999) y para UDP-Gal (Roy y cols, 1998) en el aparato de Golgi. Sin embargo la función de estas actividades en *S.cerevisiae* no es clara, por lo que se estudió la existencia en las vesículas de posibles aceptores para estos sustratos que presentan mayor nivel de actividad endógena. En los ensayos de transporte es posible detectar marca radioactiva asociada a los componentes insoluble de las vesículas (Tabla 5, columna Transferencia), además de la marca radioactiva soluble, proveniente de la UDP-Glc dentro de las vesículas. Dado que la UDP-Glc usada en estos ensayos se encontraba marcada precisamente en el grupo azúcar, el que puede ser donado, es probable que la marca radioactiva detectada en los

componentes insolubles de las vesículas provenga de azúcares transferidos a uno o varios aceptores endógenos. La determinación de azúcar transferido en experimentos *in vitro* sugieren que la transferencia en membranas de la ruta secretoria de *S.cerevisiae* no depende de la ruta por la que UDP-Glc ingresa a las vesículas.

Debido a la alteración del nivel de transporte y transferencia de *S.cerevisiae* mediante la introducción de AtSQV7, nos pareció interesante estudiar el efecto de este transportador de nucleótidos azúcar en *S.cerevisiae*, cuyo metabolismo de azúcares podría ser más simple que el de *A.thaliana*. Especialmente, buscamos cambios debidos a la alteración de la pared de esta levadura ya que ésta se encuentra formada por polisacáridos mas simples en su estructura y composición que los polisacáridos de origen vegetal. *S.cerevisiae* presenta en su pared quitina, mananos, glucano β 1-3 y glucano β 1-6 (Smits y cols, 2001). El cambio de tamaño en las levaduras que expresan AtSQV7c observado mediante de citometría y microscopía podría ser reflejo de una alteración específica de la capacidad de síntesis de alguno de estos polisacáridos, probablemente aquellos formados de unidades de glucosa. Se descartó que este cambio se debiera a la sobreexpresión de proteínas como muestra el patrón de proteínas totales de AtSQV7c (figura 7). Existe evidencia de la relación que existe entre las características de la pared de las levaduras respecto a sus polisacáridos y alteraciones en el tamaño, morfología e incluso viabilidad de las levaduras, la que se ve comprometida en medios hipotónicos (Smits y cols, 2001; Giaver y cols, 2002). Esta alteración de la pared de las levaduras por la presencia de AtSQV7c podría confirmarse, por ejemplo mediante análisis de polisacáridos de pared mediante tinciones o análisis químico. Este experimento sugiere que los cambios en los niveles de nucleótidos azúcar al interior de la ruta secretoria de levaduras pueden modular la síntesis de polisacáridos.

6.6. Rol biológico de AtSQV7

En la célula existen diversos procesos que requieren el uso de nucleótidos azúcar, siendo los más importantes la glicosilación de proteínas y lípidos así como la síntesis de polisacáridos de pared, matriz extracelular o de secreción en el aparato de Golgi y el retículo Endoplasmático. También intervienen en la formación de

almidón en el amiloplasto. Todos estos procesos tienen en común la necesidad de transferencia de moléculas de azúcar (o derivados) hacia cadenas laterales de aminoácidos, lípidos u otros azúcares. Como acercamiento a la función *in vivo* de AtSQV7, parece adecuado considerar su capacidad de transportar UDP-Glc y UDP-Gal. La formación del árbol de glicosilación involucra UDP-Glc para el control del correcto plegamiento de las proteínas en el retículo (Parodi, 2000). Por su parte, la síntesis de almidón en el amiloplasto ocurre a partir de ADP-Glc y no UDP-Glc (Gruissem, Buchanan y Jones, 2000). Si es que como se ha propuesto, existe un mecanismo conservado para la síntesis de polisacáridos en los eucariontes, es esperable que al igual que lo observado en levadura, el transporte de UDP-Glc por parte de AtSQV7 tenga un rol importante en la síntesis de polisacáridos que presentan glucosa en su estructura como por ejemplo el xiloglucano. De igual forma AtSQV7 podría contribuir a la síntesis de polisacáridos basados en galactosa tales como ramnogalacturonanos I y II. Aparte del trabajo realizado en esta tesis, en el laboratorio se trabaja en el análisis de mutantes de *A.thaliana* para el gen de AtSQV7 y otros posibles transportadores. Los resultados iniciales sin embargo no han sido claros pues estas plantas no presentan fenotipos morfológicos evidentes (tamaño, desarrollo, coloración u otro similar alterados). Esta aparente estabilidad de la fisiología de *A.thaliana* posiblemente se deba a la redundancia génica de este organismo o a mecanismos compensatorios de las estructuras responsables de la síntesis de polisacáridos. Sin embargo en otras especies superiores, incluido el ser humano, la deficiencia de un TNA causa serios defectos en el desarrollo, los que se encuentran relacionados con anomalías en polisacáridos de la matriz extracelular en humanos (Lühn y cols, 2001), *D.melanogaster* (Goto y cols,2001) y *C.elegans* (Hwang y Horvitz, 2002). Estudios posteriores de la composición de los polisacáridos de la pared de los mutantes AtSQV7 o de su perfil de expresión de metabolitos podrían arrojar información a un nivel más fino acerca del rol específico de este gen en *A.thaliana*.

7. Bibliografía

- Abeijon, C., Orlean, P., Robbins, P.W. y Hirschberg, C.B. (1989) Topography of glycosylation in yeast: characterization of GDPmannose transport y luminal guanosine diphosphatase activities in Golgi-like vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 6935-6939.
- Abeijon, C., Yanagisawa, K., Mandon, E.C., Hausler, A., Moremen, K., Hirschberg, C.B. y Robbins, P.W. (1993) Guanosine diphosphatase is required for protein y sphingolipid glycosylation in the Golgi lumen of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 122, 307-323.
- Aoki, K., Ishida, N. y Kawakita, M. (2001) Substrate recognition by UDP-galactose y CMP-sialic acid transporters. Different sets of transmembrane helices are utilized for the specific recognition of UDP-galactose y CMP-sialic acid. *J Biol Chem*, 276, 21555-21561.
- Aoki, K., Ishida, N. y Kawakita, M. (2003) Substrate Recognition by Nucleotide Sugar Transporters: further characterization of substrate recognition regions by analyses of udp-galactose/cmp-sialic acid transporter chimeras y biochemical analysis of the substrate specificity of parental and chimeric transporters. *J Biol Chem*, 278, 22887-22893.
- Baldwin, T.C., Handford, M.G., Yuseff, M.I., Orellana, A. y Dupree, P. (2001) Identification y characterization of GONST1, a golgi-localized GDP-mannose transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13, 2283-2295.
- Berninsone, P. y Hirschberg, C.B. (1998) Nucleotide sugars, nucleotide sulfate, y ATP transporters of the endoplasmic reticulum y Golgi apparatus. *Ann N Y Acad Sci*, 842, 91-99.
- 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.
- 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.
- Bollag, D.M. y Edelstein, S.J. (1991) *Protein methods*. Wiley-Liss, New York.
- Brett, C.T. y Waldron, K. (1996) *Physiology y biochemistry of plant cell walls*. Chapman & Hall, London ; New York.
- Cabib, E., Roh, D.H., Schmidt, M., Crotti, L.B. y Varma, A. (2001) The yeast cell wall y septum as paradigms of cell growth y morphogenesis. *J Biol Chem*, 276, 19679-19682.

Castro, O., Chen, L.Y., Parodi, A.J. y Abeijon, C. (1999) Uridine diphosphate-glucose transport into the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*: in vivo y in vitro evidence. *Mol Biol Cell*, 10, 1019-1030.

Coninck, S.W. y Wattiaux, R. (1969) Nucleoside diphosphatase in purified preparations of rat liver lysosomes. *FEBS Lett*, 5, 355-359.

Coutinho, P.M. y Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-Active Enzymes server [en línea] <<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>> [consulta 10 octubre 2003]

Dean, N., Zhang, Y.B. and Poster, J.B. (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.

Driouich, A., Faye, L. y Staehelin, L.A. (1993) The plant Golgi apparatus: a factory for complex polysaccharides y glycoproteins. *Trends Biochem Sci*, 18, 210-214.

Fredrikson, K. y Larsson, C. (1992) Activators y inhibitors of the plant plasma membrane 1,3-beta-glucan synthase. *Biochem Soc Trans*, 20, 710-713.

Gao, X.D. and Dean, N. (2000) Distinct protein domains of the yeast Golgi GDP-mannose transporter mediate oligomer assembly and export from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 275, 17718-17727.

Gao, X.D., Nishikawa, A. y Dean, N. (2001) Identification of a conserved motif in the yeast golgi GDP-mannose transporter required for binding to nucleotide sugar. *J Biol Chem*, 276, 4424-4432.

Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.Y., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzeler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W. and Johnston, M. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418, 387-391.

Goto, S., Taniguchi, M., Muraoka, M., Toyoda, H., Sado, Y., Kawakita, M. and Hayashi, S. (2001) UDP-sugar transporter implicated in glycosylation and processing of Notch. *Nat Cell Biol*, 3, 816-822.

Gruissem, W., Buchanan, B.B. y Jones, R.L. (2000) *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Md.

Guthrie, C. y G.R. Fink (ed.) 1990. *Methods in enzymology*. vol. 194. *Guide to yeast genetics y molecular biology*. Academic Press, New York, N.Y.

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

Hong, K., Ma, D., Beverley, S.M. y Turco, S.J. (2000) The *Leishmania* GDP-mannose transporter is an autonomous, multi-specific, hexameric complex of LPG2 subunits. *Biochemistry*, 39, 2013-2022.

Hwang, H.Y. and Horvitz, H.R. (2002) The SQV-1 UDP-glucuronic acid decarboxylase and the SQV-7 nucleotide-sugar transporter may act in the Golgi apparatus to affect *Caenorhabditis elegans* vulval morphogenesis and embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14218-14223.

Ishida, N., Yoshioka, S., Chiba, Y., Takeuchi, M. and Kawakita, M. (1999) Molecular cloning and functional expression of the human Golgi UDP-N-acetylglucosamine transporter. *J Biochem (Tokyo)*, 126, 68-77.

Keegstra, K. y Raikhel, N. (2001) Plant glycosyltransferases. *Curr Opin Plant Biol*, 4, 219-224.

Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K. y Brul, S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 239-256.

Maize Genome Database [en línea]

<<http://www.agron.missouri.edu/mnl/58/1811eto.html>> [consulta: 14 Octubre 2003]

Muraoka, M., Kawakita, M. and 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.

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

Norambuena, L., Marchant, L., Berninsone, P., Hirschberg, C.B., 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 synthesis and purification of [(3)H]uridine diphosphate galacturonic acid for use in studying Golgi-localized transporters. *Anal Biochem*, 272, 224-231.

Orellana, A., Neckelmann, G. y Norambuena, L. (1997) Topography and Function of Golgi Uridine-5[prime]-Diphosphatase from Pea Stems. *Plant Physiol*, 114, 99-107.

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

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.

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.

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

Roy, S.K., Chiba, Y., Takeuchi, M. and Jigami, Y. (2000) Characterization of Yeast Yea4p, a uridine diphosphate-N-acetylglucosamine transporter localized in the endoplasmic reticulum and required for chitin synthesis. *J Biol Chem*, 275, 13580-13587.

Roy, S.K., Yoko-o, T, Ikenaga, H. y Jigami, Y. (1998) Functional evidence for UDP-galactose transporter in *Saccharomyces cerevisiae* through the in vivo galactosylation and in vitro transport assay. *J Biol Chem*, 273, 2583-2590.

Segawa, H., Kawakita, M. and Ishida, N. (2002) Human and *Drosophila* UDP-galactose transporters transport UDP-N-acetylgalactosamine in addition to UDP-galactose. *Eur J Biochem*, 269, 128-138.

Seki, M., Narusaka, M., Kamiya, A., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T., Nakajima, M., Enju, A., Akiyama, K., Oono, Y., Muramatsu, M., Hayashizaki, Y., Kawai, J., Carninci, P., Itoh, M., Ishii, Y., Arakawa, T., Shibata, K., Shinagawa, A. y Shinozaki, K. (2002) Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science*, 296, 141-145.

Selva, E.M., Hong, K., Baeg, G.H., Beverley, S.M., Turco, S.J., Perrimon, N. and Hacker, U. (2001) Dual role of the fringe connection gene in both heparan sulphate and fringe-dependent signalling events. *Nat Cell Biol*, 3, 809-815.

Smits, G.J., van den Ende, H. and Klis, F.M. (2001) Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology*, 147, 781-794.

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

White, A.R., Xin, Y. and Pezeshk, V. (1993) Xyloglucan glucosyltransferase in Golgi membranes from *Pisum sativum* (pea). *Biochem J*, 294 (Pt 1), 231-238.

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.

Yanagisawa, K., Resnick, D., Abeijon, C., Robbins, P.W. y Hirschberg, C.B. (1990) A guanosine diphosphatase enriched in Golgi vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization. *J Biol Chem*, 265, 19351-19355.

YEASTMAKER™ Yeast Transformation System 2 Manual Clontech Publicado 27 Marzo 2001 Catalog#: K1606-1

Zhang GF, Staehelin LA (1992). Functional compartmentation of the golgi apparatus of plant cells: immunocytochemical analysis of high-pressure frozen- and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. *Plant Physiol* 99: 1070-1083

8. Agradecimientos

No quiero finalizar sin antes recordar a todas las personas que directa o indirectamente colaboraron en la realización de este trabajo.

En primer lugar y muy especialmente a mis padres, me han dado su apoyo durante todos los años que ha significado la realización de mi carrera.

En el laboratorio a Ariel, mi director de tesis , así como a los integrantes del equipo "AO" : Entre ellos Lorenas Marchant y Norambuena, Francisca, Armando, Ricardo, Roberto (por la foto), los vecinos Chino, Andrea, Dani, y a la profesora Cardemil . A ellos y seguro algunos que dejo por allí, mis agradecimientos por los momentos importantes para mí formación que viví en su compañía así como por las gratas situaciones dentro de las jornadas de trabajo.

Finalmente quiero recordar a mis amigos de biotecnología con quienes compartí desde gran parte de mi carrera y hasta hoy . A Anifa que junto con su familia siempre me han entregado cariño, calidez y consejo.