

UCH-FC
Biotecnología
AS26
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**Análisis del patrón de expresión, mediante técnicas
moleculares, de GONST3 y GONST4,
transportadores de nucleótidos-azúcar de
Arabidopsis thaliana.**

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

Diego Ignacio Ampuero Jadue

Director del Seminario de Título: **Michael Handford, PhD**

Co-directora del Seminario de Título: **Lorena Norambuena, PhD**

Mayo de 2010
Santiago, Chile.



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Diego Ignacio Ampuero Jadue

“Análisis del patrón de expresión, mediante técnicas moleculares, de GONST3 y GONST4, transportadores de nucleótidos-azúcar de *Arabidopsis thaliana*”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Michael Handford
Director Seminario de Título

Dra. Lorena Norambuena
Co-Director



Comisión de Evaluación

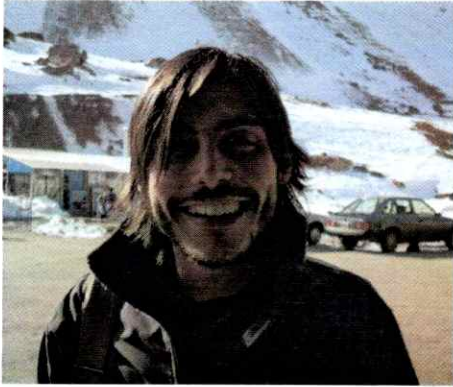
RICARDO CASERA (SUBROGANTE)

Dra. Ana Preller
Presidenta Comisión

Dra. Claudia Stange
Evaluador

Santiago de Chile, Mayo de 2010

Biografía



Nací un 29 de abril de 1986 en Santiago, producto de un 'chiripazo' como en muchas familias de este país. Menor de tres hermanos, crecí como todo 'conchito', regalón y sobre estimulado, en una gran familia aclanada con muchos tíos y primos donde los cumpleaños y convivencias eran pan de cada día. Mi educación partió en un colegio muy poco conocido llamado Renacimiento (no sé si aún existe) donde estuve sólo hasta kínder, ahí aprendí lo suficiente para adaptarme en mi próximo colegio, Saint Gaspar College, donde estuve hasta octavo básico. Muy característico de los colegios católicos, inculcando valores y lleno de actividades, viví grandes años de mi vida. Posteriormente, las vueltas de la vida me llevaron a convertirme en un 'pitutano'. Estuve en el Instituto Nacional toda mi educación media, donde pude aprender la otra cara de la moneda, salir de la burbuja, desarrollarme aún más como persona y valorar otras cosas de la vida. Compartí con gente muy variada, con experiencias de vida distintas, todos en un entorno competitivo, que por seguro trajo buenas consecuencias para cada uno de mis ex compañeros. A pesar de salir con buen rendimiento, las notas acumuladas en la media me jugaron una mala pasada y no pude ingresar a la U de inmediato. Gracias a eso terminé estudiando un año en el Preu Gustavo Molina (estilo colegio) donde conocí gente muy valiosa, gente que jamás pensé que perduraría en mi vida. Luego ese año de entrenamiento PSU valió la pena y terminé estudiando esta carrera que me tiene en este momento defendiendo mi título. La etapa vivida en la U, como todas las etapas de la vida, trajo consigo nuevas amistades y grandes experiencias, no sólo fueron noches de largo estudio si no también carretes por montones. Mi formación como Biotecnólogo me condujo al Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, bajo la tutela del Dr. Mike. Otra gran experiencia en mi vida, enriquecedora por completo con excelentes nuevos amigos. Actualmente sigo estudiando, me quedé en el lab haciendo el Magister en Ciencias Biológicas, así que próximamente tendré que escribir otra tesis, tesis que permitirá continuar con esta historia.....



Listado de figuras

Figura 1. Esquema de la estructura de la pared celular de plantas.	04
Figura 2. Modelos de síntesis de polisacáridos no celulósicos en el aparato de Golgi.	08
Figura 3. Montaje del sembrado de plantas de <i>Arabidopsis</i> para cultivo hidropónico.	19
Figura 4. Esquema de los pasos en la generación de los vectores G3Pr::GUS y G4Pr::GUS.	23
Figura 5. Verificación por PCR de las colonias de <i>E. coli</i> transformadas con pCR8-G4Pr.	31
Figura 6. Verificación por PCR de las colonias de <i>E. coli</i> transformadas con pGWB3-G4Pr-GUS.	32
Figura 7. Verificación por PCR de las colonias de <i>Agrobacterium</i> transformadas con pGWB3-G4Pr-GUS.	32
Figura 8. Verificación por PCR de las colonias de <i>Agrobacterium</i> transformadas con pGWB3-G3Pr-GUS.	33
Figura 9. Transformación estable de <i>Arabidopsis</i> con el vector pGWB3-G4Pr-GUS.	34
Figura 10. Verificación por PCR de las líneas de <i>A. thaliana</i> transformadas con pGWB3-G3Pr-GUS y pGWB3-G4Pr-GUS.	35
Figura 11. Altura de las líneas de <i>Arabidopsis</i> transformantes de G3Pr::GUS y G4Pr::GUS versus planta silvestre.	37
Figura 12. Imagen representativa de una planta de <i>Arabidopsis</i> .	40
Figura 13. Imágenes representativas del ensayo GUS de tres líneas independientes de <i>Arabidopsis</i> , transformadas con G3Pr::GUS y G4Pr::GUS, en cotiledones y plantas de dos y tres semanas de desarrollo.	41
Figura 14. Imágenes representativas del ensayo GUS de hojas caulinares, tallos y raíces de tres líneas independientes de <i>Arabidopsis</i> transformadas con G3Pr::GUS y G4Pr::GUS.	42
Figura 15. Imágenes representativas del ensayo GUS de hojas senescentes, silicuas y flores de tres líneas independientes de <i>Arabidopsis</i> transformadas con G3Pr::GUS y G4Pr::GUS.	43
Figura 16. Pictografía fluorescente electrónica comparativa entre GONST3 (At1g76340) y GONST4 (At5g19980).	46
Figura 17. Motivos regulatorios encontrados <i>in silico</i> en la secuencia del promotor de GONST3.	48
Figura 18. Motivos regulatorios encontrados <i>in silico</i> en la secuencia del promotor de GONST4.	49

Abreviaturas

ABA	Acido abscísico
ADN	Acido desoxirribonucleico
AGI ID	<i>Arabidopsis</i> genome initiative identifier (Iniciativa de identificación del genoma de <i>Arabidopsis</i>)
AGP	Proteína arabinogalactano
°C	Grado Centígrado
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
Cm^r	Resistencia a cloranfenicol
CSL	Cellulose synthase like (Tipo celulosa sintasa)
dNTP	Desoxirribonucleótido Tri-fosfato
DTPA	Acido dietilen triamino penta acético
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
G3Pr::GUS	pGWB3-G3Pr-GUS
G4Pr::GUS	pGWB3-G4Pr-GUS
GAPA	Gliceraldehido 3-fosfato Deshidrogenasa Subunidad A
GDP	Guanosín difosfato
GFP	Green fluorescent protein (Proteína fluorescente verde)
GONST	Transportador nucleótido-azúcar localizado en Golgi
GRP	Proteínas ricas en glicina
HPLC	High pressure liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta presión)
HPRP	Proteínas ricas en hidroxiprolina
Hpt	Higromicina fosfotransferasa (Gen de resistencia a higromicina)
kb	Kilo base
LB	Medio Luria Bertani
LPG	Lipofosfoglicano
M	Molar
MALDI-ToF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight (desorción/ionización láser asistida por matriz- Tiempo de luz)
µg	Micro Gramo
µl	Micro Litro
µM	Micro Molar
mM	Mili Molar
MS	Medio Murashigue & Skoog
MS-GC	Gas chromatography-mass spectrometry
NDP	Nucleótido difosfato
NMP	Nucleótido monofosfato
MUG	4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide Trihydrate
NPTII	Neomicina fosfotransferasa (Gen de resistencia a kanamicina)
pb	Par de Bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PRP	Proteínas ricas en prolina
RGI o RGII	Ramnogalacturonano I o II
SDS	Dodecilsulfato sódico
TAE	Tris-acetato EDTA
TNA	Transportador de nucleótido-azúcar
T-Nos	Terminador de nopalina sintasa
UDP	Uridina difosfato
X-Gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-ácido glucurónico, sal ciclohexil amonio

Resumen

La pared celular vegetal es una estructura molecular compleja que rodea a la célula y que le otorga forma, rigidez y flexibilidad entre otras funciones fisiológicas. Está compuesta principalmente por proteínas, sustancias aromáticas y polisacáridos como la celulosa, las hemicelulosas y las pectinas. Polisacáridos no-celulósicos *L*-fucosilados como el ramnogalacturonano II (que es también *L*-galactosilado) y el xiloglucano además de glicoproteínas N-glicanos y proteínas arabinogalactano son glicosilados en el aparato de Golgi. La incorporación de los sustratos (GDP-*L*-Galactosa y GDP-*L*-Fucosa) desde el citoplasma hacia el interior del organelo, para su posterior uso en la síntesis de las cadenas laterales de estas macromoléculas, es llevada a cabo por transportadores de nucleótido-azúcar (TNAs).

En *Arabidopsis thaliana*, por genética reversa se ha identificado una familia putativa de TNAs llamada GONST. Trabajos realizados en el laboratorio del Dr. Handford (2006-2010) han revelado que GONST3 es un transportador de GDP-*L*-Gal, mientras que GONST4 transporta GDP-*L*-Fuc y GDP-*L*-Gal.

En el marco de la caracterización de GONST3 y GONST4 se está estudiando principalmente la especificidad de sustrato y luego el papel *in vivo* de estos TNAs mediante el análisis de plantas con menores niveles de expresión de *GONST3* o *GONST4*. Para enfocar estos últimos estudios, se hace necesario analizar el patrón detallado de expresión de ambos TNAs, con el fin de focalizar los análisis posteriores de la composición de macromoléculas *L*-fucosiladas y/o *L*-galactosiladas en aquellos órganos de *Arabidopsis* que presenten diferencias en la expresión de los TNAs.

La estrategia utilizada en este Seminario consistió en la construcción de dos vectores reporteros G3Pr::GUS y G4Pr::GUS, que expresan la proteína β -glucuronidasa bajo la regulación de los promotores de *GONST3* y *GONST4*, respectivamente. Posteriormente, se obtuvieron 5 líneas de *Arabidopsis* transformadas con G3Pr::GUS y 10 con G4Pr::GUS. Luego, se realizó el ensayo histoquímico GUS de tres líneas transformantes para cada TNA mostrando una expresión ubicua a lo largo del desarrollo de la planta. La mayor tinción se registró en hojas caulinares, raíces y tallos, mientras que los menores niveles se obtuvieron en hojas senescentes, semillas y pétalos. Las principales diferencias se reportaron en cotiledones y estigmas de las líneas G4Pr::GUS, las que no presentaron tinción a diferencia de G3Pr::GUS.

Finalmente, análisis *in silico* utilizando las bases de datos de Affymetrix mostraron resultados semejantes a los obtenidos por los ensayos histoquímicos. Además, se identificaron elementos *cis*-regulatorios en los promotores de ambos TNAs, incluyendo algunos relacionados directa o indirectamente con la síntesis de la pared celular, como por ejemplo elementos de respuesta a elicitores, meristema y golpe térmico, entre otros.

Abstract

The plant cell wall is a complex molecular structure which surrounds the cell and confers shape, rigidity and flexibility among other physiological functions. It is mainly composed of proteins, aromatic molecules and polysaccharides such as cellulose, hemicelluloses and pectins. *L*-fucosylated non-cellulosic polysaccharides such as rhamnogalacturonan II (which is also *L*-galactosylated) and xyloglucan, as well as N-linked glycoproteins and arabinogalactan proteins are glycosylated inside the Golgi apparatus. The import of the substrates (GDP-*L*-Gal and GDP-*L*-Fuc) into this organelle from the cytoplasm, for subsequent use in the synthesis of the sidechains of these macromolecules, is carried out by nucleotide-sugar transporters (NSTs).

By reverse genetics, a putative family of NSTs called GONST has been identified in *Arabidopsis thaliana*. In the laboratory of Dr. Handford (2006-2010), recent research has shown that GONST3 is a GDP-*L*-Gal transporter, whilst GONST4 transports GDP-*L*-Fuc and GDP-*L*-Gal.

In the characterization of GONST3 and GONST4, the substrate specificity and subsequently the role *in vivo* of these NSTs, using plants with lower GONST3 and GONST4 expression levels, are being studied. To focus this latter aim, it is necessary to analyse in detail the expression pattern of both NSTs, in order to direct the subsequent studies of *L*-fucosylated and/or *L*-galactosylated macromolecules in those *Arabidopsis* organs that present different expression patterns of these NSTs.

The strategy used in this Seminar consisted in the construction of two reporter vectors G3Pr::GUS and G4Pr::GUS, which express the protein β -glucuronidase under the

1. Introducción

1.1 La pared celular vegetal

La pared celular es una estructura molecular compleja y dinámica que rodea a la célula entregando forma, rigidez y flexibilidad a ésta. Se encuentra localizada fuera de la membrana plasmática dando soporte frente a estrés mecánico y protección a la célula, actuando como la primera barrera de defensa contra organismos patógenos. Al igual que toda la célula, es un componente dinámico y su estructura y composición se modifican frente a variaciones del entorno y a lo largo del desarrollo celular. Además de controlar el desarrollo y diferenciación celular, es parte de la señalización hormonal y de respuesta a ataques de patógenos (Carpita y McCann, 2000; Handford, 2006).

1.1.1 Composición de la pared

La pared celular vegetal está compuesta principalmente por tres tipos de macromoléculas; proteínas, compuestos aromáticos y polisacáridos. Los polisacáridos estructurales son los componentes más abundantes de la pared celular de plantas, organizados en redes macromoleculares entrecruzadas de pectinas, celulosa y hemicelulosas (Sticklen, 2008) (figura 1). La celulosa constituye el principal polisacárido de la pared. Está formada de cadenas lineales de *D*-glucosa unidas por enlaces glucosídicos $\beta(1\rightarrow4)$, y su síntesis es llevada a cabo por las celulosas sintasas en la membrana plasmática. Las cadenas lineales se entrecruzan para formar microfibrillas de celulosa unidas por puentes de hidrógeno (McNeil y col, 1984). Estas microfibrillas son depositadas en mayor cantidad en la pared primaria, las que otorgan estructura y rigidez a la pared generando una matriz de anclaje para otras moléculas (Lerouxel y col, 2006).

Por otro lado, se encuentran los polisacáridos no celulósicos que son sintetizados en el aparato de Golgi. El primer grupo de éstos son las hemicelulosas (figura 1); xiloglucano ($\beta(1\rightarrow4)$ D-glucosa con ramificaciones de α -D-xilosa, D-galactosa y L-fucosa), (gluco)mananos ($\beta(1\rightarrow4)$ D-manosa o glucosa con ramificaciones variables) y glucoarabinoxilano ($\beta(1\rightarrow4)$ D-xilano con ramificaciones de α -D-glucosa y α -L-arabinosa). Estos polisacáridos son parte de la matriz de la pared primaria, aportando rigidez a ésta al entrelazar las microfibrillas de celulosa (Lerouxel y col, 2006; Reiter, 2002). El segundo grupo de polisacáridos no celulósicos son las pectinas (figura 1), polisacáridos altamente heterogéneos, ubicados en la lámina media, otorgan porosidad y carga a la pared frente a variaciones de pH y también regulan adhesión celular. Dentro de este grupo se encuentran los homogalacturonanos, el ramnogalacturonano I (RGI) y RGII. Tanto el xilogalacturonano y RGII pertenecen al grupo de las pectinas que se caracterizan por tener una cadena central formada por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ D-ácido galacturónico decorados con una gran cantidad de cadenas laterales de distintos azúcares, haciendo estas moléculas muy hidrofílicas (Carpita, 1996, 2000; Handford 2006), sobre todo el RGII que es el polisacárido con la mayor diversidad de azúcares (12 tipos), incluyendo decoraciones de L-fucosa, L-galactosa, entre otros (O'Neill y col, 2004).

También es posible encontrar proteínas (figura 1) dentro de la matriz de la pared celular vegetal. En *Arabidopsis thaliana* se han descrito por estudios de proteómica unas 400 proteínas de pared (Jamet y col, 2008), entre las que se encuentran principalmente, extensinas; proteínas insolubles ricas en hidroxiprolina (HPRP) con numerosos motivos repetidos de ser-hyp_n, separados por regiones ricas en tyr, lys, his y val; proteínas ricas en prolina (PRP) y ricas en glicina (GRP), las que se encuentran

presentando un fenotipo en raíces sensible a sales, generando problemas en la biosíntesis de la pared del meristema apical de raíces (Schaeuwen y col, 2008).

1.1.2 Síntesis de los polisacáridos

La síntesis de la celulosa ocurre en la membrana plasmática por acción de la celulosa sintasa. Esta proteína forma complejos llamados rosetas; cada roseta está compuesta de seis unidades y cada unidad a su vez está formada por seis celulosas sintetas, generando un total de 36 proteínas por roseta. Este complejo varía en su composición según la especie, encontrando por ejemplo en *Arabidopsis* una familia de 10 celulosas sintetas involucradas en la formación de las rosetas (Lerouxel y col, 2006). Las proteínas del complejo son formadas en el retículo, modificadas por glicosilaciones en el aparato de Golgi y destinadas a la membrana plasmática, donde finalmente transfieren glucosas a la cadena naciente de celulosa (Gibeaut y Carpita, 1994).

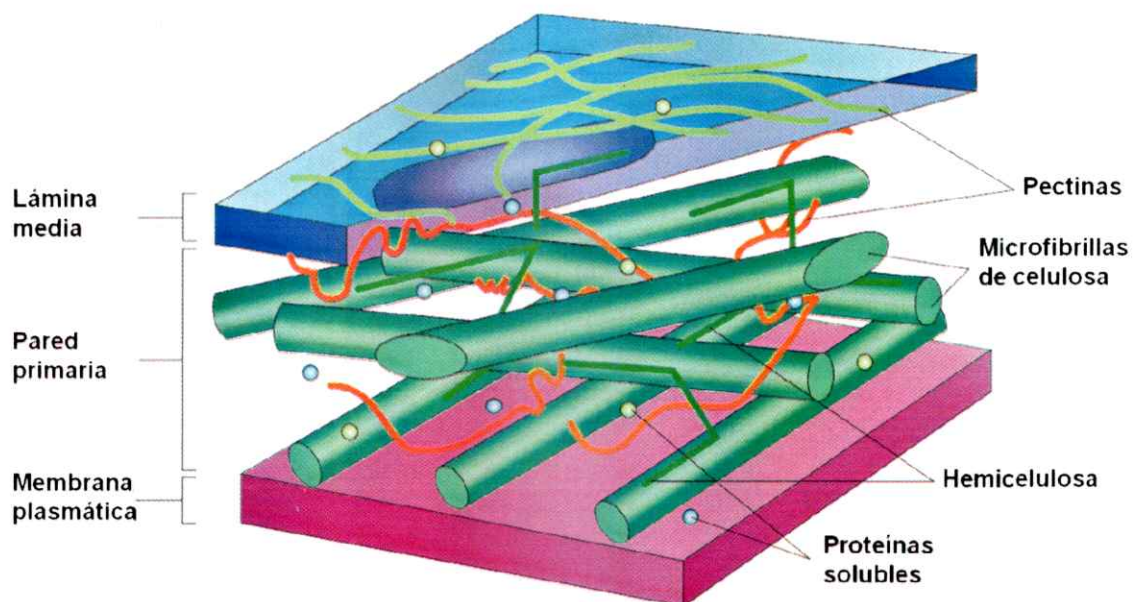


Figura 1. Esquema de la estructura de la pared celular de plantas. Las barras verdes representan las microfibrillas de celulosa entrecruzadas con cadenas de hemicelulosa y pectina que le otorgan rigidez a la pared. Extraído y traducido al español de Sticklen, 2008.

Por otro lado, los polisacáridos no celulósicos (pectinas y hemicelulosas) son sintetizados en el aparato de Golgi (Reyes y Orellana, 2008; Handford, 2006). Las enzimas involucradas en la biosíntesis de los polisacáridos de la pared y glicoproteínas están localizadas en la vía secretoria. Estas enzimas son las glicosiltransferasas que catalizan la transferencia de azúcares desde moléculas activadas a polisacáridos aceptores específicos (figura 2), formando enlaces glicosídicos (Bowles y col, 2005). En su mayoría son proteínas de membrana tipo II, las que poseen un único segmento que atraviesa la membrana y funciona como una única secuencia ancla. Una pequeña porción N-terminal es citosólica, mientras que el dominio catalítico C-terminal se localiza hacia el lumen de Golgi, decorando los distintos polisacáridos no-celulósicos y glicoproteínas de la célula (Keegstra y Raikhel, 2001). Hasta la fecha los esfuerzos se han concentrado en la identificación y caracterización de estas proteínas en distintos organismos, además de la creación de una base de datos (CAZy; http://www.cazy.org/fam/acc_GT.html) para su clasificación, contando con 92 familias identificadas (Henrissat y col, 2001).

Además, se ha caracterizado otro tipo de glicosiltransferasa llamada tipo celulosa sintasa o CSL (cellulose synthase like; figura 2). Estas proteínas poseen múltiples dominios transmembrana, pero a diferencia de las celulosas sintasas, se localizan en el aparato de Golgi y carecen de un dominio N-terminal de dedos de Zn. Su función radica en la síntesis de las cadenas principales de algunos polisacáridos hemicelulósicos, por ejemplo, xiloglucanos y glucomananos, ya que al igual que la celulosa, ambos polisacáridos poseen enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ (Zeng y Keegstra, 2008; Dhugga, 2001).

Como se mencionó anteriormente, los sustratos para la síntesis de los polisacáridos de la pared celular son azúcares activados por la adición de un nucleósido mono- o difosfato formando un nucleótido-azúcar, los que son sintetizados en el citoplasma y deben ser importados al lumen de Golgi. A diferencia de las CSL, las glicosiltransferasas del tipo II no son capaces de internalizar estos azúcares, por lo que necesitan de algún transportador capaz de ingresar los nucleótidos-azúcar desde el citosol hacia el interior del organelo.

1.2 Transportadores de nucleótido-azúcar (TNAs)

La incorporación de los nucleótidos-azúcar al lumen del aparato de Golgi está dirigida por los TNAs. Estos transportadores actúan por contratrásporte, transfiriendo hacia el lumen de Golgi los nucleótidos difosfato-azúcar (NDP-azúcar) acoplado a la salida de nucleótidos monofosfatos (figura 2; NMP; Reyes y Orellana. 2008; Caffaro y col, 2006).

Estructuralmente los TNAs son proteínas altamente hidrofóbicas. Análisis de los perfiles de hidrofobicidad *in silico*, muestran que tendrían de 6 a 10 dominios transmembrana. Además son proteínas de un tamaño de 300 a 350 aminoácidos y se infiere que los dominios N-terminal y C-terminal estarían ubicados hacia el mismo lado de la membrana (Reyes y Orellana 2008; Handford y col, 2004; Berninsone y col, 2000).

Estos TNAs han sido identificados en una serie de organismos como; *Leishmania donovani*; LPG2 (Hong y col, 1999), *Saccharomyces cerevisiae*; VRG4 (Poster y Dean, 1996; Dean y col, 1997), *Candida glabrata*; CaVRG4 (Nishikawa y col, 2002-A; Nishikawa y col, 2002-B), *Cryptococcus neoformans*; GMT1 y GMT2 (Cottrell y col, 2007), *Caenorhabditis elegans*; SQV-7 (Berninsone y col, 2001), *Drosophila*

melanogaster; *UST74C* (Goto y col, 2001) y en humanos (Muraoka y col. 2001), entre otros. Frecuentemente, mutaciones en estos TNAs causan carencias o alteraciones en la glicosilación de macromoléculas sintetizadas en el aparato de Golgi. Por ejemplo, una cepa mutante de *L. donovani* para el gen *LPG2* (*lpg2*) mostró carencia del glicolípido de superficie para virulencia lipofosfoglicano (LPG). Por ensayos de complementación, el lipofosfoglicano fue restituido en cepas complementadas y por ensayos bioquímicos de incorporación en vesículas se observó que este transportador era capaz de transportar GDP-Man, GDP-Ara y GDP-Fuc (Hong y col, 1999). En el caso de *S. cerevisiae* se identificó una cepa mutante para el gen esencial *VRG4* (*vrg4-2*). Mutaciones en este gen conducen a un deterioro en la manosilación, afectando glicosilaciones de proteínas y de esfingolípidos. Los ensayos de incorporación mostraron que *VRG4* fue capaz de transportar GDP-Man al interior de Golgi (Dean y col, 1997)

Por estudios genómicos se han identificado secuencias homólogas en plantas potencialmente involucradas en la síntesis de la pared celular, y así se han encontrado unos 15-20 TNAs supuestos en *Arabidopsis* (Reyes y Orellana, 2008). Estos incluyen *AtUTr1*, un transportador de UDP-glucosa/UDP-galactosa (Norambuena y col, 2002; Reyes y col, 2006), *AtUTr2* y *AtNST-KT1K* transportadores de UDP-galactosa (Norambuena y col, 2005; Rollwitz y col, 2006) y *GONST1* que es un transportador de GDP-manosa (Baldwin y col, 2001).

1.2.1 Familia GONST

El transportador *GONST1* pertenece a una familia de TNAs llamada GONST, por su sigla en inglés Golgi-localized Nucleotide-Sugar Transporter (Baldwin y col, 2001).

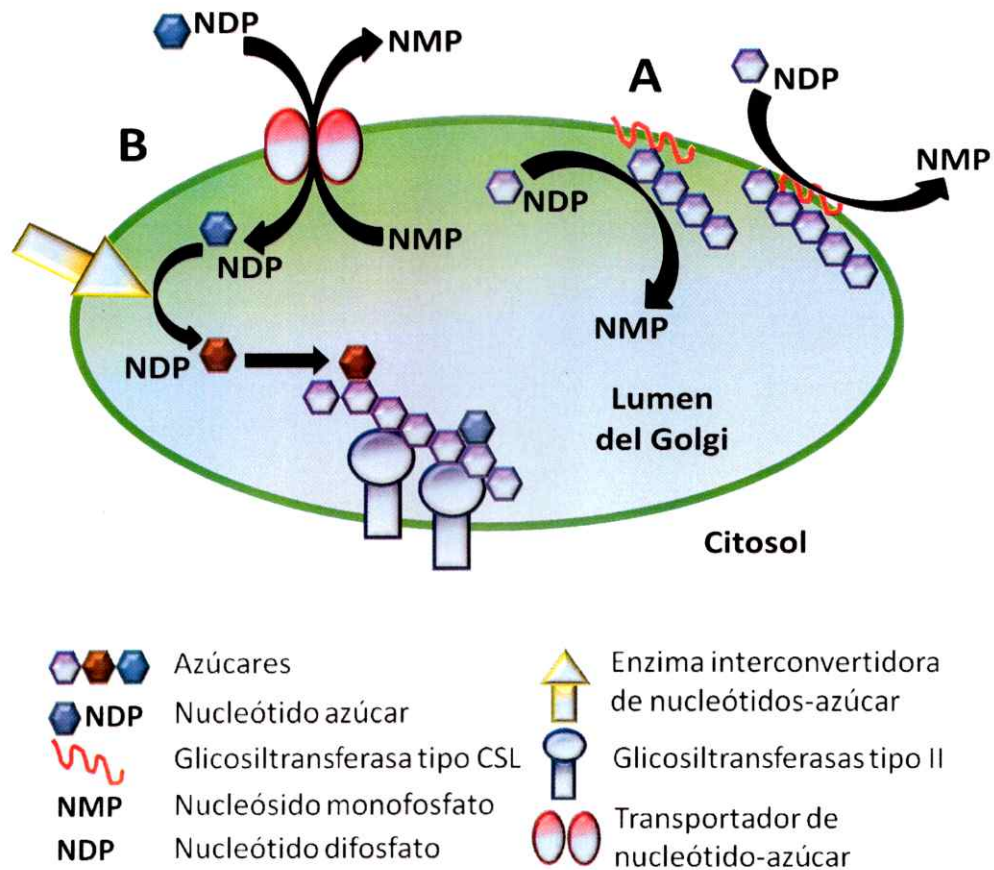


Figura 2. Modelos de síntesis de polisacáridos no celulósicos en el aparato de Golgi. A. Modelo [1] muestra la síntesis de polisacáridos lineales por acción de las proteínas CSL. **B.** Modelo [2] donde se esquematiza la incorporación de nucleótido-azúcar vía TNA y posterior decoración de cadenas laterales por acción de glicosiltransferasa tipo II. Extraído y adaptado de Handford y col, 2006.

Análisis *in silico* de homología de secuencia entre GONST1 y los transportadores caracterizados previamente de GDP-Man, *LPG2* (Hong y col, 1999) y *VRG4* (Dean y col, 1997), mostraron un 27% y 25% de identidad aminoacídica, respectivamente. También se observó que GONST1 poseía sitios de N-glicosilación, característicos de los transportadores de GDP-Man (Wang y Bahl, 1981) y entre 8 a 10 dominios transmembrana. Además, la cepa mutante *vrg4-2* de *S. cerevisiae* sensible a higromicina y con bajos niveles de manosilación de quitinasa extracelular resultó ser

complementada por GONST1, mostrando restitución en los dos fenotipos de la mutante. Adicionalmente, ensayos de transporte revelaron que GONST1 es un transportador de GDP-manosa (Baldwin y col, 2001).

La familia GONST de Arabidopsis está constituida por 5 miembros enumerados del 1 al 5. GONST1 junto con GONST2, 3, 4 y 5 han sido identificados por genética reversa mostrando mayor identidad GONST1 con GONST2 (61%) y GONST3 con GONST4 (35%) (Handford y col, 2004). Todos los transportadores putativos de la familia GONST presentan en su secuencia el dominio conservado de unión a GDP-azúcares, GX(LV)NK cercano al extremo carboxilo terminal (Gao y col, 2001). Análisis de localización en hojas de tabaco transformadas transitoriamente con GONST1, 4 y 5 fusionados a GFP mostraron que estos TNAs putativos se encontrarían en el aparato de Golgi y análisis de complementación con *vrg4-2*, mostraron que las cinco proteínas son capaces de revertir la sensibilidad a higromicina, indicando que son capaces de transportar GDP-manosa (Handford y col, 2004).

Debido a la alta homología de secuencia entre GONST1 y 2, además que ambas proteínas son las únicas que complementan los fenotipos de la mutante del transportador de GDP-manosa *vrg4-2* (la carencia de manosilación de quitinasa y la sensibilidad a higromicina), se sugiere que GONST2 sería un transportador de GDP-manosa. Sin embargo, los otros transportadores (GONST3-5), además de GDP-manosa podrían transportar otros GDP-azúcares, incluyendo GDP-L-fucosa y GDP-L-galactosa, los cuales son requeridos para la ramificación de diversos polisacáridos y glicoproteínas en varias especies vegetales incluyendo Arabidopsis.

Hasta la fecha, la caracterización de GONST3 y 4 ha mostrado que ambos se localizan en el aparato de Golgi (Handford y col, 2004; Ampuero y Handford, datos no publicados) y que en ensayos de transporte GONST3 es capaz de transportar GDP-*L*-fucosa mientras que GONST4 transporta GDP-*L*-galactosa y GDP-*L*-fucosa (Huichalaf, Ampuero y Handford, datos no publicados). La *L*-galactosa se encuentra sólo en el RGII, mientras que la *L*-fucosa además es posible encontrarla en el xiloglucano y proteínas como las AGP y N-glicanos (sección 1.1.1).

1.3 Análisis del patrón de expresión de GONST3 y GONST4

En el marco de la caracterización de GONST3 y GONST4, en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal se ha estudiado principalmente la especificidad de sustrato y el papel *in vivo* de estos TNAs. Se han realizado varias construcciones de vectores que han permitido determinar la localización subcelular por fusión TNA-GFP, además de determinar la especificidad de sustrato por medio de ensayos de incorporación utilizando sustratos radioactivos y su papel *in vivo* al generar líneas de Arabidopsis con menores niveles de expresión de GONST3 y 4, entre otros experimentos.

En la determinación del papel *in vivo* es posible hipotetizar que se encontrarían alteraciones en la composición de los polisacáridos y/o glicoproteínas de la pared celular en plantas con la expresión de GONST3 o GONST4 disminuidas. Dependiendo de la identidad de las macromoléculas, éstas pueden ser estudiadas por medio de técnicas como HPLC, MALDI-ToF (xiloglucano) y para casos más específicos como el RGII, por MS-GC.

Previo a los análisis de las variaciones en la composición de los distintos polisacáridos y/o glicoproteínas de la pared celular de Arabidopsis, es importante estudiar el patrón

de expresión de GONST3 y GONST4 en plantas silvestres. Los resultados entregados por el análisis del patrón de expresión, permitirán identificar los órganos de la planta que presenten las mayores variaciones en la expresión de estos TNAs y consecuentemente dirigir el estudio de la composición de los polisacáridos de la pared en las líneas con los menores niveles de expresión de GONST3 y GONST4, determinando finalmente el papel *in vivo* de estos transportadores.

En la literatura se han reportado una serie de evidencias experimentales sobre variaciones en la composición de la pared celular de *Arabidopsis*, ya sea a nivel de tejido, desarrollo o ambiente en el cual se encuentra la planta. Por ejemplo, por medio de anticuerpos específicos se ha observado en raíces, que el RGI se encuentra solamente localizado en células corticales y epidermales en la pared de zonas maduras de raíz, mientras que terminaciones α -fucosil de xiloglucano se localizan en todos los tipos celulares de este órgano (Freshour y col, 1996), mostrando distribuciones distintas de polisacáridos en un mismo órgano. Además, mutaciones que alteran la composición de la pared celular generan enanismo en la línea mutante de *Arabidopsis* carente de fucosa *mur1*, o reducción en la tasa de crecimiento y vigor de la planta en las mutantes *mur9* y *mur10*, ambas con disminución en la concentración de fucosa y xilosa de la pared celular vegetal de las hojas (Reiter y col, 1997).

También se ha caracterizado una fucosiltransferasa tipo II (AtFUT1), ubicada en el aparato de Golgi que adiciona residuos de fucosa al xiloglucano (Perrin y col, 1999). Una mutante puntual de esta proteína (*mur2-1*), presentó menos del 2% de fucosa en el xiloglucano de tejidos como hojas, tallos, flores y raíces (Vanzin y col, 2002) mientras que una mutación insercional de este mismo gen no presentó ningún residuo de fucosa en hojas y raíces (Perrin, 2003). Se han identificado otros nueve genes en

Arabidopsis (AtFUT2-10) que presentan entre un 47% y 62% de identidad de secuencia con AtFUT1. Líneas que sobreexpresan AtFUT4 y 5 muestran mayores niveles de fucosa en hojas, pero a la vez con menores niveles de xilosa, arabinosa y galactosa que las plantas silvestres (Sañria y col, 2001). Por último, se observó que la carencia de *L*-fucosa en el xiloglucano de *mur1* es reemplazada en un tercio por *L*-galactosa, al igual que en el 5% de los *N*-glicanos de esta línea (Rayon y col, 1999), sin afectar la actividad del polisacárido ni la proteína. Estos ensayos demuestran que *L*-fucosa está presente en diversos órganos de la planta y que se puede alterar el patrón de fucosilación de polisacáridos y glicoproteínas mediante cambios en la expresión de proteínas involucradas en la síntesis y uso de GDP-*L*-fucosa.

Para centrar y focalizar el estudio en aquellos órganos que podrían presentar variaciones en la composición de la pared celular vegetal en plantas mutantes, primero es necesario estudiar el patrón de expresión de los TNAs en plantas silvestres. Una manera es mediante RT-PCR, que resulta ser engorroso y poco sensible, especialmente si se quiere realizar con diferentes tejidos o en distintos estadios de desarrollo. Una manera alternativa más precisa, desarrollada en este seminario de título, es mediante la fusión del promotor del gen de interés al gen reportero β -*glucuronidasa*, para luego transformar plantas de Arabidopsis establemente y visualizar la expresión mediante ensayos histoquímicos (GUS).

1.3.1 Ensayo GUS

Actualmente el uso de sistemas reporteros es una herramienta fundamental para el estudio de los organismos vivos y en particular de la expresión génica. Uno de estos es el sistema reportero GUS el cual es ampliamente utilizado en investigación vegetal. La

enzima β -glucuronidasa (GUS) cataliza la hidrólisis de una serie de glucurónidos, los que provienen de la conjugación del ácido D-glucurónico por medio de un enlace β -O-glicosídico a cualquier aglucón. Estos sustratos provienen naturalmente de la vía de detoxificación de vertebrados. Existe una serie de moléculas que no pueden ser metabolizadas para la obtención de energía, entre los que se encuentran hormonas, bilirrubina, antibióticos, entre otros, consecuentemente el ácido glucurónico obstruye a la molécula por un enlace glucosídico resultando en un glucurónido, el que posee mucha más solubilidad y puede ser excretado por el hígado (Jefferson, 1989).

La β -glucuronidasa es una hidrolasa ácida que cataliza el clivaje de una variedad de β -glucurónidos. Fue aislada de *Escherichia coli* K12 y el gen (*uidA*) ha sido secuenciado, el tamaño alcanza a 1809 pb y el producto génico posee un peso molecular predicho de 68 kDa para el homotetrámero (Jefferson y col, 1986).

Existen otros sistemas reporteros utilizados en estudios de expresión en plantas, pero presentan desventajas en comparación al sistema GUS. Entre estos sistemas se encuentran el uso de genes como la β -galactosidasa de *E. coli*, nopalinas y opinas sintasas del plásmido Ti de *Agrobacterium*, la cloramfenicol acetil transferasa (CAT), neomicina fosfotransferasa (NPTII) de origen bacteriano y la proteína fluorescente verde (GFP). Todos estos sistemas presentan alguna dificultad o desventaja, como un alto costo de los ensayos, problemas para ser llevados a cabo, complicando los experimentos, imposibilidad de fusiones amino terminales o problemas de detección de los niveles de expresión de estos genes (Jefferson y col, 1987). De manera contraria, se presentan una serie de ventajas a favor del ensayo GUS tales como la robustez de la enzima, la simplicidad del ensayo, la gran disponibilidad de sustratos y la ausencia de actividad GUS endógena en muchos organismos, incluyendo *Arabidopsis*.

Todas las características antes mencionadas hacen de este ensayo una gran herramienta molecular para analizar el patrón de expresión de *GONST3* y *4*. Hay reportes en la utilización de esta técnica para caracterizar el patrón de expresión de TNAs en *Arabidopsis* como; AtNST-KT1 transportador de UDP-galactosa (Rollwitz y col, 2006) y para el transportador de GDP-manosa, *GONST1* (Baldwin y col, 2001).

Por lo tanto, para centrar la investigación futura de las mutantes con menores niveles de expresión de *GONST3* y *GONST4*, en aquellos órganos de *Arabidopsis* que muestren mayores variaciones de expresión de dichos TNAs, se propone en este seminario de título estudiar el patrón de expresión de *GONST3* y *GONST4* mediante el ensayo histoquímico GUS, lo que a su vez permitirá predecir dónde podrían ser observadas variaciones en la composición de la pared celular en las líneas con menores niveles de expresión.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Determinar el patrón de expresión de GONST3 y GONST4, transportadores de nucleótido-azúcar en *Arabidopsis thaliana*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Generar vectores que posean el gen reportero GUS fusionado a los promotores de GONST3 y GONST4.

- Generar la construcción pGWB3-G4Pr-GUS mediante metodología Gateway®.
- Verificar mediante PCR, la construcción pGWB3-G3Pr-GUS desarrollada previamente por Alastair Skeffington.

2. Obtener líneas de *Arabidopsis thaliana* transformadas establemente con pGWB3-G3Pr-GUS y pGWB3-G4Pr-GUS.

- Transformación de plantas de *Arabidopsis* mediante inmersión floral utilizando *Agrobacterium tumefaciens* portadora de las construcciones realizadas.
- Selección de las líneas transformantes y verificación por PCR
- Cálculo de la tasa de transformación y obtención de líneas de la segunda generación de transformantes.

3. Análisis del patrón de expresión de GONST3 y GONST4 durante el desarrollo de las líneas transformantes de *Arabidopsis* mediante ensayo GUS.

4. Análisis *in silico* del patrón de expresión de GONST3 y GONST4.

- Análisis bioinformático del patrón de expresión de GONST3 y GONST4 mediante *Affymetrix*.
- Análisis de la secuencia de los promotores de GONST3 y GONST4 mediante herramientas bioinformáticas.

3. Materiales y Métodos

3.1 Trabajo con bacterias

3.1.1 Crecimiento bacteriano

Se usaron las bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 α y *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 las que fueron cultivadas a 37 °C y 28 °C durante 1 y 2 días respectivamente, con agitación en medio LB (1% triptona, 1% NaCl y 0,5% extracto de levadura). Para el crecimiento en medio sólido, se agregó además 1,5% agar al medio LB.

Los antibióticos utilizados para *E. coli* fueron; espectinomicina 100 μ g/ml para las cepas transformadas con el vector de entrada pCR8 y kanamicina 50 μ g/ml para las cepas transformadas con el vector de destinación pGWB3.

Por otro lado, los antibióticos utilizados para la selección de *Agrobacterium* transformada con pGWB3 fueron; gentamicina 50 μ g/ml, resistencia otorgada por el plásmido Ti, rifampicina 10 μ g/ml, resistencia cromosomal y kanamicina 50 μ g/ml resistencia dada por el plásmido pGWB3.

3.1.2 Obtención de células quimiocompetentes de *E. coli*

Para la generación de células de *E. coli* DH5 α quimiocompetentes, se dejó crecer 5 ml de un cultivo de noche con 0,9 μ l de ácido nalidíxico 100 μ g/ml. Luego, se diluyó 1 ml del pre-inóculo en 100 ml de LB con 30 μ l de ácido nalidíxico y se cultivó hasta alcanzar una D.O₆₀₀ de 0,3-0,4 (3 hr aprox.). Alcanzada la densidad óptica, las células fueron centrifugadas por 10 min a 1600 g y 4 °C. Después, el sedimento se resuspendió suavemente en 10 ml de CaCl₂ 0,1 M, para volver a centrifugar durante 5 min a 1100 g y 4 °C. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en 10 ml de CaCl₂ 0,1 M e incubadas en hielo por 30 min. Finalmente se centrifugó por 5 min a

1100 g y 4 °C resuspendiendo el sedimento en 2 ml de CaCl₂ 0,1 M y 600 µl de glicerol estéril. Las células fueron almacenadas a -80 °C en alícuotas de 200 µl.

3.1.3 Transformación de *E. coli* por golpe térmico

A una alícuota de 200 µl de *E. coli* DH5α quimiocompetente (sección 3.1.2) descongelada en hielo, se le adicionó 50-150 ng de la construcción de ADN deseada, incubando en hielo por 10 min. Luego, se incubó a 42 °C durante 1 min para volver a hielo. Posteriormente, 1 ml de LB fue agregado a las células, incubando durante 1 hr a 37 °C y se sembraron en LB-agar suplementado con el antibiótico de selección correspondiente.

3.1.4 Obtención de células quimiocompetentes de *A. tumefaciens*

Para la generación de células de *Agrobacterium* GV3101 quimiocompetentes, se dejó crecer 5 ml de un cultivo durante toda la noche (sección 3.1.1) con gentamicina 25 µg/ml y rifampicina 10 µg/ml. Posteriormente, las células fueron diluidas 1:100 en LB y se incubaron a 28 °C hasta alcanzar una D.O₆₀₀ de 0,4-0,5 (4 hr aprox.). Alcanzada la densidad óptica, las células fueron incubadas durante 10 min en hielo y luego fueron centrifugadas a 3000 g por 20 min a 4 °C. Finalmente, se resuspendieron las células en 1 ml de CaCl₂ 20 mM y se guardaron alícuotas de 100 µl a -80 °C.

3.1.5 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* por golpe térmico

A una alícuota de 200 µl de *Agrobacterium* GV3101 quimiocompetente descongelada en hielo, se le adicionó 50-150 ng de la construcción de ADN deseada y luego se incubó por 5 min en nitrógeno líquido. Después se agregó 1 ml de LB y se incubó toda

una noche a 28 °C. Finalmente, se sembraron las células en LB-agar suplementado con el antibiótico de selección correspondiente.

3.2 Trabajo con plantas

3.2.1 Esterilización y sembrado de semillas

Para el desarrollo de este seminario de título, se sembraron semillas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) silvestres y de líneas transformantes. La esterilización de semillas se llevó a cabo agregando Triton X-100 0,1% por 30 min, luego Triton X-100 en etanol 70% por 5 min, seguido por Triton X-100 0,1% con cloro 1,5% por 10 min. Finalmente, se lavaron las semillas con agua destilada estéril 4 veces, siempre en agitación constante y se dejaron estratificar en agua durante una noche a 4 °C.

Posteriormente, las semillas fueron sembradas *in vitro* en placas MS (medio basal Murashigue & Skoog 4,43 g/l, sacarosa 3%, mioinositol 60 mg/l, agar 0,6%, pH 5,7) (Murashige y Skoog, 1962) con higromicina 25 µg/ml para aquellas transformadas con pGWB3-G3Pr-GUS o pGWB3-G4Pr-GUS.

3.2.2 Sembrado y cultivo de plantas

Después de una semana de desarrollo de las plántulas de *Arabidopsis* en cultivo *in vitro* (sección 3.2.1), éstas fueron trasladadas a un sistema de cultivo en medio hidropónico. El medio de cultivo hidropónico consistió en una solución nutritiva 100X a pH 5,0, la que contenía; KNO₃ 125 mM, Ca(NO₃)₂ 150 mM, MgSO₄ 75 mM, KH₂PO₄ 50 mM, KCl 5 mM, H₃BO₃ 5 mM, MnSO₄ 1 mM, ZnSO₄ 200 µM, CuSO₄ 150 µM, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 7,5 µM, Na₂SiO₃ 10 mM y Sprint 330 7,7 mM (Fe quelado en DTPA; ácido dietilen triamino penta acético). Para preparar 5 L de este medio, primero se disolvieron en 3 L todas las sales en forma secuencial y en constante agitación, con excepción de Ca(NO₃)₂ y Na₂SiO₃. La primera debió ser disuelta previamente y una vez

agregada a la solución se llevó a pH 5 con KOH 10 M. Una vez ajustado el pH, se agregó Na_2SiO_3 y se alcanzó un volumen final de 5 L.

El soporte donde crecieron las plantas consistió en cajas de plástico de 17x13x9 cm las que debieron ser forradas con papel aluminio para evitar la entrada de luz hacia el medio hidropónico. A cada tapa de las cajas se le hizo 6 agujeros donde se instalaron bujes de 1,5 pulgadas de diámetro. Cada buje a su vez contenía lana de roca (Grodan®, Master), que sirvió de soporte directo para las plantas. Luego de traspasar las plántulas al sistema hidropónico, estas fueron cubiertas durante 2 semanas con plástico alusa para mantener condiciones de alta humedad (figura 3).

Las condiciones de crecimiento durante todo el desarrollo fueron en cámaras de cultivo a 22 °C con un fotoperíodo de 16 h luz (5500 - 8000 Lux).



Figura 3. Montaje del sembrado de plantas de *Arabidopsis* para cultivo hidropónico.

3.2.3 Transformación estable de *Arabidopsis thaliana*

Para la transformación estable de *Arabidopsis*, se utilizó la técnica de inmersión floral (Clough y Bent, 1998). Se dejó crecer *Agrobacterium* hasta la fase estacionaria ($D.O_{600} = 2$) (sección 3.1.1). Luego las bacterias fueron centrifugadas a 5500 g por 15 min y después el sedimento fue resuspendido en medio de inmersión floral (MS 0,5 X, sacarosa 5%, silwet L-77 0,05% en agua destilada) hasta alcanzar una $D.O_{600} = 0,8$.

Las plantas de *Arabidopsis* tipo silvestre (sección 3.2.2) fueron retiradas individualmente con su buje desde el medio hidropónico y posteriormente sumergidas

en la suspensión de *Agrobacterium* durante aproximadamente 5 seg, después de haberlas agitado generosamente. Luego, las plantas fueron tapadas para mantener la humedad y en oscuridad durante una noche en forma horizontal. Por último, las plantas fueron devueltas al sistema de cultivo hidropónico en forma vertical hasta la obtención de silicuas café y secas para la cosecha de las semillas transformadas.

3.3 Extracciones de ADN

3.3.1 Purificación de ADN plasmidial

Para la extracción de ADN plasmidial desde colonias de *E. coli*, se dejó crecer durante toda la noche un cultivo de 5 mL con el antibiótico de selección correspondiente. Posteriormente, se procedió a extraer el ADN plasmidial usando el kit comercial AxyPrep™ plasmid miniprep de Axygen Biosciences, según especificaciones del fabricante. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C.

3.3.2 Purificación de ADN genómico desde plantas

Para la verificación de plantas transformantes de *Arabidopsis* mediante PCR se utilizó el protocolo descrito por Kang y Yang (2004). Se molió aproximadamente 0,5 cm² de hojas en 200 µl de buffer de extracción compuesto de; 500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7,5 y 50 mM EDTA pH 7,5, hasta no observar restos de fragmentos de hoja. Luego se agregaron 20 µl de SDS 20%, se agitó vigorosamente por 30 seg. y se incubó a 65 °C por 10 min. Después se agregaron 250 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente por 30 seg. Finalmente, se centrifugó a 10.000 g durante 3 min y el sobrenadante fue diluído 6 veces en agua nanopura, de lo cual se ocupó 1 µl como molde para la reacción de PCR (sección 3.6). Las muestras de ADN obtenidas fueron almacenadas a -20 °C.

3.4 Vectores

3.4.1 Construcción y verificación de pGWB3-G3Pr-GUS (G3Pr::GUS) y pGWB3-G4Pr-GUS (G4Pr::GUS)

Los pasos iniciales de la clonación de los promotores de GONST3 y GONST4 fueron realizados por Alastair Skeffington (2007). Se amplificaron desde ADN genómico los promotores de GONST3 (2001 pb) y GONST4 (1196 pb). Estos productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa con bromuro de etidio (sección 3.6) y las bandas de tamaño esperado fueron extraídas desde el gel bajo luz UV para purificar el ADN con el kit Invisorb Spin DNA Extraction (Invitex®). Luego, los amplificados fueron clonados en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO® (Invitrogen). Este vector tiene la ventaja de poder clonar rápida y eficientemente productos de PCR amplificados con Taq polimerasa, dado que esta enzima deja una adenina terminal en todos sus productos, mientras que el vector posee una timina terminal en el sitio de clonamiento, ocurriendo por lo tanto, una clonación por apareamiento de bases. Además, también posee sitios de recombinación *attL1* y *attL2* que permiten la inserción del gen en un vector de destinación por tecnología Gateway® (figura 4).

Una vez clonados los promotores en pCR8, se procedió a transformar *E. coli* (sección 3.1.3). Los clones positivos fueron analizados mediante ensayos de PCR (sección 3.6), con digestiones enzimáticas (sección 3.5) y finalmente por secuenciación (sección 3.9) para confirmar la fidelidad y dirección del inserto en pCR8. Las construcciones obtenidas fueron denominadas pCR8-G3Pr y pCR8-G4Pr. En este seminario de título, se procedió a utilizar ambas construcciones de entrada en los siguientes pasos.

Por separado, se realizó una recombinación entre el vector de entrada pCR8-G3Pr o pCR8-G4Pr y el vector de destinación pGWB3 (Nakagawa y col, 2007). Este vector de destinación se caracteriza por poseer los sitios *attR1* y *attR2* que recombinan con los sitios *attL1* y *attL2* de pCR8 generando una inserción fácil y rápida de los promotores río arriba del gen de la β -glucuronidasa (GUS). La recombinación se llevó a cabo según indicaciones del fabricante usando LR clonasa® (Invitrogen) (figura 4). Posteriormente, se utilizó 6 μ l de la reacción de recombinación para transformar *E. coli* (sección 3.1.3). A los clones que crecieron, se les realizaron ensayos de PCR (sección 3.6) y digestiones enzimáticas (sección 3.5) para confirmar una correcta inserción de los promotores. Los clones positivos fueron denominadas pGWB3-G3Pr-GUS (G3Pr::GUS) y pGWB3-G4Pr-GUS (G4Pr::GUS), los cuales fueron utilizados para la transformación de *Agrobacterium* (sección 3.1.5) y luego *Arabidopsis* (sección 3.2.3).

3.5 Digestiones enzimáticas

El sentido del promotor de GONST3 en pCR8-G3Pr fue analizado por Alastair Skeffington tras realizar una digestión doble con 2 U de *HpaI* y *SpeI* (10 U/ μ l, Fermentas®), mientras que para la verificación del sentido del promotor en pGWB3-G3Pr se realizó una digestión con 4 U de *HindIII* (10 U/ μ l, Fermentas®), ambas reacciones con buffer Tango 1X (10 μ l, 37 °C, 1 hr).

Para la verificación del sentido del promotor de GONST4 en el vector pCR8-G4Pr, se realizó una digestión simple con 4 U de *SpeI* (10 U/ μ l, Fermentas®) y además una digestión doble con 4 U de *SpeI* y 4 U de *HpaI* (10 U/ μ l, Fermentas®), ambas reacciones en buffer Tango 1X (20 μ l, 37 °C, 1 hr).

Para la verificación del sentido de GONST4 promotor en el vector pGWB3-G4Pr, se realizó una digestión simple con 10 U de *XhoI* (5 U/μl, New England Biolabs®). En la digestión doble se usaron 5 U de las enzimas *XhoI* y *SnaBI* (5 U/μl, New England Biolabs®). Ambas reacciones fueron realizadas con buffer NEB4 1X (38 μl, 37 °C, 2 hr).

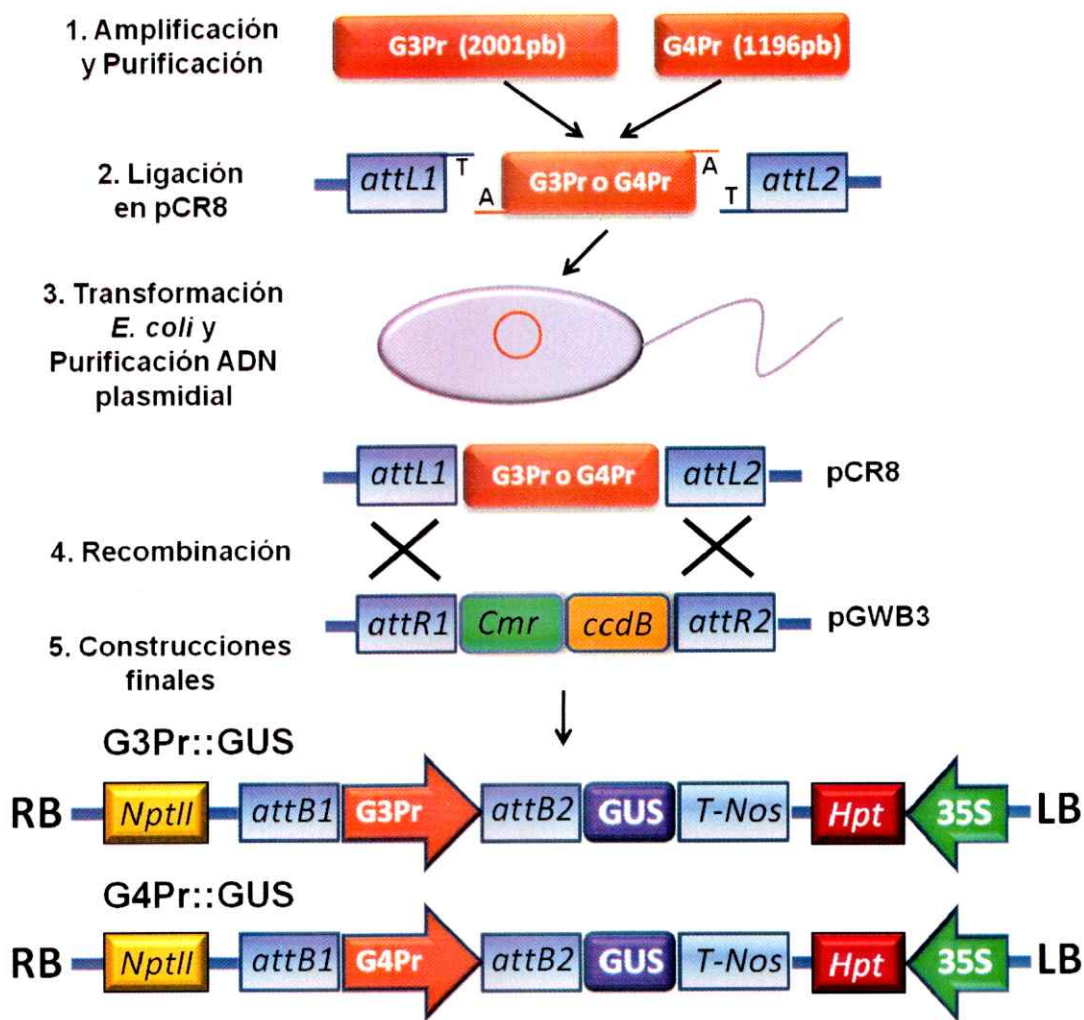


Figura 4. Esquema de los pasos en la generación de los vectores G3Pr::GUS y G4Pr::GUS. 1 Amplificación de G3Pr o G4Pr (GONST3 o GONST4 Promotor) a partir de ADN genómico. 2 Ligación en el vector de entrada. 3 Transformación de *E. coli*. 4 Recombinación de pCR8 y pGWB3 entre los sitios *attL* y *attR*. El vector de destino posee un gen que confiere resistencia a cloranfenicol (*Cm^r*) y una topoisomerasa bacteriana (*ccdB*). 5 Se muestran los vectores G3Pr::GUS y G4Pr::GUS que poseen el gen de resistencia a kanamicina (*NptII*) e higromicina (*Hpt*), terminador de nopalina sintasa (*T-Nos*) y el gen reportero GUS.

3.6 Programas de PCR y partidores utilizados

Para las distintas reacciones de PCR, se usaron los partidores que se muestran en la Tabla I y los programas de PCR que se muestran en la Tabla II.

Todas las reacciones de amplificaciones a partir de ADN plasmidial utilizaron la misma mezcla de PCR. Para una reacción, se usó 1 U Paq5000™ DNA polimerasa (Stratagene®), buffer 1X suministrado con MgCl₂ 2 mM, partidores 0,5 µM cada uno, dNTPs 0,2 mM y como templado lo que corresponde a repicar una colonia, todo en un volumen final de 20 µl.

Por otro lado, todas las reacciones de amplificaciones a partir de ADN genómico de plantas de Arabidopsis transformadas con G3Pr::GUS y G4Pr::GUS utilizaron otra mezcla de PCR. Para una reacción, se usó 1 U BioIase™ DNA polimerasa (Bioline®), buffer 1X, MgCl₂ 3 mM, partidores 0,5 µM cada uno, dNTPs 0,2 mM y 100 ng de templado, todo en un volumen final de 20 µl.

La visualización del ADN se realizó por medio de geles de agarosa 1% en TAE 1X (Tris-base 40 mM, ácido acético glacial 19 mM y EDTA 1 mM pH 8), con bromuro de etidio 0,5 µg/ml. Las muestras fueron mezcladas con 2 µl de buffer de carga (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol FF, 30% ficol) y se corrieron a 100 V. Como marcador de peso molecular se usó Gene Ruler™ (Fermentas®) de 100 a 1.000 pb y de 0,25 a 10 kb.

Tabla I. Partidores utilizados en este seminario de título.

Partidor	Secuencia (5'- 3')	Descripción
GAPA-F	GGTAGGATCGGGAGGAAG	Hibrida con una región 5' interna de <i>gapa</i> y junto con GAPA-R amplifican para una región menor a 400 pb
GAPA-R	CTGGTGCCAAGAAGGTTATC	Hibrida con una región 3' interna de <i>gapa</i> y junto con GAPA-F amplifican para una región menor a 400 pb
GUS 5'	CCGATGTCACGCCGTATG	Hibrida con región 5' interna de <i>GUS</i> a 363 pb del codón de inicio. Junto con GUS 3' amplifican una región de 318 pb
GUS 3'	TGTTGATCCGCATCACGC	Hibrida con una región 3' interna de <i>GUS</i> a 664 pb del codón de inicio. Con GUS 5' amplifican una región de 318 pb
G4Pr 5'	CACCGATTGAAACAAATTATCGAAG	Con G4Pr 3' amplifica el promotor de G4 (1196 pb) y con GUS 3' amplifican una región de G4:GUS de 1931 pb.
G4Pr 3'	GGTTTTTGGTGGAGGTTTTTGGG	Junto con G4Pr 5' amplifican la región promotora de G4 y la región 5' UTR (1196 pb)
G3Pr 5'	CACCTGTTGCAACTTGCATTTGCCAAG	Junto con G3Pr 3' amplifican la región promotora de G3 (2001 pb)
G3Pr 3'	GAAAGCACAGACGAAAGATCGG	Junto con G3Pr 5' amplifican la región promotora de G3 y la región 5' UTR (2001 pb)
G3PrintF	ATGACCAACATGAAAGTATAGTG	Hibrida con una región interna del promotor de G3 a 1406 pb del codón de inicio del ORF
G4PrintF	GCTGGTGGCTAATAAGCCGTTGGAA	Hibrida con una región interna del promotor de G4 a 949 pb del codón de inicio del ORF.

Tabla II. Programas de PCR utilizados para el desarrollo de este seminario de título.

Mike2: Programa de PCR usado para la amplificación del promotor de GONST4 a partir de colonias de *E. coli* transformadas con pCR8-G4Pr, utilizando los partidores G4Pr5' y G4Pr3'.

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

Mike6: Programa de PCR usado para 1) la amplificación del promotor de GONST4 a partir de colonias de *E. coli* y *Agrobacterium* transformadas con pGWB3-G4Pr-GUS, utilizando los partidores G4Pr5' y GUS3'. 2) La amplificación del promotor de GONST3 a partir de colonias de *Agrobacterium* transformadas con pGWB3-G3Pr-GUS, utilizando los partidores G3Pr5' y G3Pr3'. 3) La amplificación de un fragmento interno del gen *gus* desde ADN genómico de plantas de líneas de *Arabidopsis* transformadas con G3Pr::GUS y G4Pr::GUS, utilizando los partidores GUS5' y GUS3'.

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

Mike11: Programa de PCR usado para la amplificación del gen de expresión constitutiva *gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa (gapa)* desde ADN genómico de plantas de líneas de *Arabidopsis* transformadas con G3Pr::GUS y G4Pr::GUS, utilizando los partidores GAPA-F y GAPA-R.

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

3.7 Ensayo tinción GUS

El ensayo GUS se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Jefferson (1987). El análisis histoquímico de las líneas se realizó usando X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-ácidoglucurónico, sal ciclohexil amonio) como sustrato. X-Gluc (Fermentas®, 1 mg/ml) fue disuelto en dimetilformamida a 100 µg/ml, y luego se agregó NaHPO₄ 100 mM (pH 7,2), EDTA 10 mM (pH 8), Triton X-100 0,1%, ferrocianuro de potasio 2 mM y ferricianida de potasio 2 mM. Esta solución fue almacenada en oscuridad a -20°C.

Se colectaron las muestras de *Arabidopsis* a analizar, las que se depositaron en placas de 6 o 24 pocillos, dependiendo del tamaño de la muestra. Luego, se agregó suficiente solución de X-Gluc para cubrir cada muestra y se las sometieron a vacío por 1 hr y después por dos días a 37 °C, siempre en oscuridad. Finalmente, se reemplazó la solución de X-Gluc por etanol 70% tantas veces como fuese necesario para retirar el exceso de X-Gluc y la clorofila. Las muestras fueron observadas bajo una lupa (Olympus MVX10), fotografiadas y almacenadas a 4 °C en etanol 70%.

Transcurrida la primera semana de desarrollo, los análisis se realizaron a 15 plántulas por línea. Desde la segunda hasta la cuarta semana se analizaron 3 plantas completas por línea y en las semanas 6, 8 y 10 los ensayos fueron realizados por duplicado a distintos órganos de la planta por separado; hojas caulinares, hojas rosetas, silicuas, flores, raíces y tallos.

3.8 Herramientas bioinformáticas

3.8.1 Análisis *in silico* del patrón de expresión de GONST3 y GONST4.

El análisis de expresión génica se llevó a cabo utilizando como herramienta la página web <http://www.bar.utoronto.ca/> desarrollada por Winter y col (2007). Esta página proporciona pictografías fluorescentes electrónicas consistentes en la representación gráfica de base de datos de *Affymetrix* para 22.000 genes de *Arabidopsis* estandarizado con el GenChip ATH1 (sección 4.4.1), incluyendo GONST3 y GONST4. Esta herramienta permite ver de forma clara y rápida cómo varía la expresión génica de un gen de forma relativa, absoluta o comparativa entre dos genes bajo distintas condiciones de desarrollo.

3.8.2 Análisis *in silico* de la secuencia de promotores de GONST3 y 4

Como aproximación *in silico* en la identificación de cajas regulatorias en la secuencia de los promotores de GONST3 y 4 se utilizaron los programas PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) y PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). PLACE (Higo y col., 1999) y PlantCARE (Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements, Rombauts y col., 1999) corresponden a bases de datos de motivos de secuencias nucleotídicas descritas en la literatura, actuando en cis y regulando elementos de ADN, que entregan información relevante sobre la regulación génica de los genes de interés en plantas, complementando la información obtenida por microarreglos (sección 3.8.1).

3.9 Secuenciación

Secuenciaci3nes de las colonias pCR8-G3Pr-3.2 y pCR8-G4Pr-D fueron realizadas en el laboratorio de Genética del Dr. Víctor Cifuentes, de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, laboratorio provisto del equipo de secuenciación *Applied Biosystems*, modelo 3100-*Avant* Genetic Analyzer. Los partidores utilizados para la colonia de GONST3 fueron G3Pr5', G3Pr3' y G3PrintF, mientras que para GONST4, se usaron los partidores G4Pr5', G4Pr3' y G4PrintF (Tabla I).

4. Resultados

4.1 Construcción de vectores para analizar el patrón de expresión de GONST3 y GONST4 en *A. thaliana*.

4.1.1 Identificación de la secuencia promotora de GONST3 y 4.

En primera instancia, se identificó la región promotora de GONST3 (At1g76340) y 4 (At5g19980) utilizando como herramienta Seqviewer (<http://www.arabidopsis.org/>). De esta manera se identificó una secuencia río arriba de la región 5' codificante de 2001 pb para el promotor de GONST3 y 1119 pb para el de GONST4. En el primer caso, se seleccionaron 2001 pb por estar dentro del tamaño promedio de promotores para *Arabidopsis* reportado en la literatura (Baldwin y col 2001, Rollwitz y col 2006, Waller y col 2009), mientras que para GONST4 se seleccionó una secuencia de menor tamaño por encontrarse sobrelapado con la región 3' del gen río arriba a GONST4 en el genoma.

4.1.2 Clonación de los promotores en pCR8.

La clonación de los promotores de GONST3 y GONST4 mencionados en el punto anterior, en el vector de entrada pCR8 se llevó a cabo por Alastair Skeffington (Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular, Facultad de Ciencias, 2007), quien amplificó la región promotora de cada TNA desde ADN genómico de *Arabidopsis*. Luego este amplificado, fue clonado en el vector pCR8 y se transformó *E. coli* (sección 3.1.3) obteniendo colonias positivas para cada construcción, denominadas pCR8-G3Pr-3.2, pCR8-G3Pr-3.8, pCR8-G4Pr-D y pCR8-G4Pr-E. Posteriormente, y como punto de partida de este seminario de título, se secuenciaron los ADN plasmidiales de las colonias pCR8-G3Pr-3.2 y pCR8-G4Pr-D en el laboratorio de Genética de la

Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (sección 3.9). Para esto se utilizaron partidores diseñados específicamente para amplificar la región promotora de GONST3 y GONST4 (G3Pr 5' y 3'; G4Pr 5'y 3', Tabla I). Al analizar los resultados de la secuenciación, se encontró un número muy reducido de mutaciones por sustitución respecto a los promotores de GONST3 y GONST4 descritos en la base de datos. En el caso de GONST3 esta fue la sustitución de una timina por una citocina en el nucleótido 1486, mientras que en GONST4 ocurrieron 6 sustituciones; T/A, 256; G/A, 265; A/G, 447; T/A, 668; A/T, 705 y G/A, 994. A pesar de la existencia de las mutaciones se continuó con la construcción de G3Pr::GUS y G4Pr::GUS. Los detalles del análisis de la secuencia de los promotores pueden ser vistos en la sección 4.4.2.

4.1.3 Obtención de la construcción pGWB3-GONST4-GUS (G4Pr::GUS)

Para confirmar la presencia del promotor de GONST4 en las colonias de *E. coli* transformadas con pCR8-G4Pr, se realizó una reacción de PCR de ADN plasmidial. Se amplificó el promotor de GONST4 (1196 pb), obteniendo ambas colonias positivas (pCR8-G4Pr-D y E, datos no mostrados). Además se realizaron digestiones enzimáticas con las enzimas *SpeI* y *HpaI* (sección 3.5) para determinar la direccionalidad del inserto, resultando ambas colonias estar en sentido respecto a los sitios *attL1* y *attL2* para su posterior recombinación con pGWB3 (figura 5).

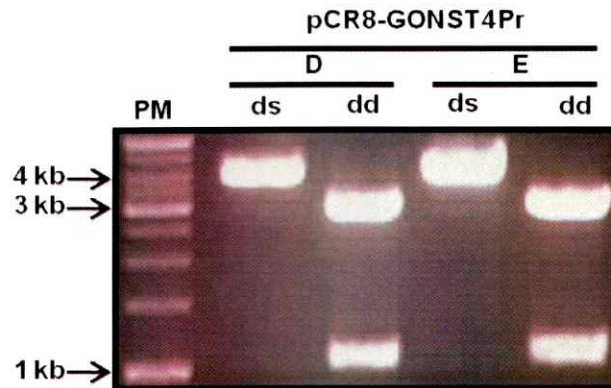


Figura 5. Digestión enzimática del ADN plasmidial de las colonias de *E. coli* transformadas con pCR8-G4Pr. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio muestra una digestión simple (ds) con *SpeI* para cada colonia (pCR8-G4Pr-D y pCR8-G4Pr-E), obteniendo un fragmento cercano a los 4 kb. La digestión doble (dd) se realizó con las enzimas *HpaI* y *SpeI* obteniendo un fragmento cercano a 3 kb y otro de 1 kb, mostrando que ambas colonias tienen el promotor del gen GONST4 en sentido. PM, marcador de peso molecular.

Posteriormente, el ADN plasmidial de la colonia pCR8-G4Pr-D (sección 4.1.2) fue recombinado con el plasmidio pGWB3 (Nakagawa y col, 2007), dando origen a la construcción pGWB3-G4Pr-GUS (G4Pr::GUS, para abreviar). Esta construcción fue transformada en células de *E. coli* y se realizó un PCR de ADN plasmidial para identificar los clones positivos. La figura 6 muestra que se encontraron dos clones positivos (pGWB3-G4Pr-D1 y D4) por PCR al utilizar los partidores G4Pr5' y GUS3' que amplifican todo el promotor de GONST4 más un fragmento del gen *GUS* generando una banda de 1931 pb. Además, esta reacción muestra que el promotor está en sentido en ambas colonias, río arriba del gen de la β -glucuronidasa. Además, se realizaron digestiones con las enzimas *XhoI* y *SnaBI* (sección 3.5) para confirmar la direccionalidad del inserto, resultando ambas colonias estar en sentido (datos no mostrados).

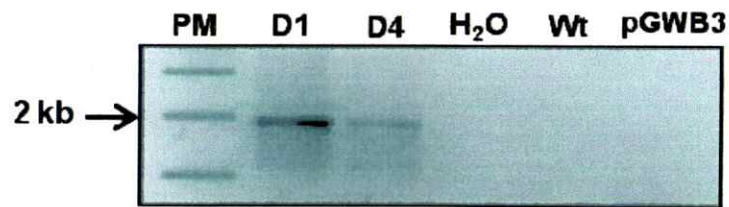


Figura 6. Verificación por PCR de las colonias de *E. coli* transformadas con pGWB3-G4Pr-GUS. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio muestra un amplificado de un fragmento de 2 kb del promotor de GONST4 más un fragmento de GUS para 2 colonias de *E. coli* (D1 y D4). La reacción de PCR de ADN plasmidial se llevó a cabo usando los partidores G4Pr 5' y GUS 3'. Como controles negativos se usaron agua, ADN genómico de *Arabidopsis silvestre* (Wt) y el vector vacío pGWB3. PM, marcador de peso molecular.

Finalmente, se realizó una extracción de ADN plasmidial (sección 3.3.1) de la colonia de *E. coli* pGWB3-G4Pr-D4 que se usó para transformar *Agrobacterium* (sección 3.1.5) y se hizo una reacción de PCR igual a la del paso anterior para verificar aquellas colonias transformadas. En la figura 7 se muestra un gel con la banda esperada (1931 pb), mostrando que ambos clones de *Agrobacterium* efectivamente poseen la construcción pGWB3-G4Pr-GUS.

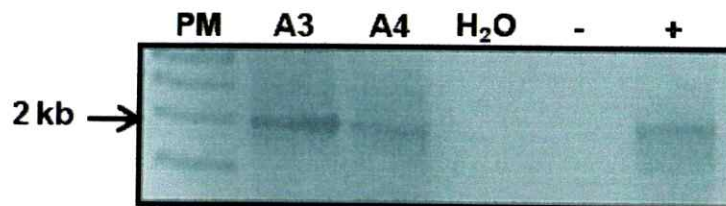


Figura 7. Verificación por PCR de las colonias de *Agrobacterium* transformadas con pGWB3-G4Pr-GUS. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio muestra un amplificado de un fragmento de 2 kb del promotor de GONST4 más un fragmento de GUS para 2 colonias de *Agrobacterium* (A3 y A4). La reacción de PCR se llevó a cabo usando los partidores G4Pr 5' y GUS 3'. Como controles negativos, se usaron agua y (-) ADN de *Arabidopsis silvestre* y como control positivo (+) ADN plasmidial de la colonia D4. PM, marcador de peso molecular.

4.1.4 Obtención de la construcción pGWB3-GONST3-GUS (G3Pr::GUS)

Por trabajos realizados anteriormente por Alastair Skeffington a cargo del Dr. Michael Handford (Laboratorio de Biología Vegetal Molecular, de la Facultad de Ciencias) se

realizaron los mismos pasos para la obtención de pGWB3-GONST3-GUS (G3Pr::GUS) que los mostrados en el punto 4.1.3.

En este seminario, se realizó una reacción de PCR para confirmar si los clones de *Agrobacterium* obtenidos por Alastair portaban la construcción. Se observa una banda de 2001 pb correspondiente al amplificado del promotor de GONST3, mostrando que ambos clones efectivamente fueron transformados con pGWB3-G3Pr-GUS (figura 8).

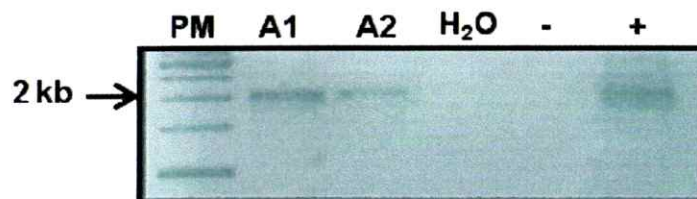


Figura 8. Verificación por PCR de las colonias de *Agrobacterium* transformadas con pGWB3-G3Pr-GUS. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio muestra un amplificado de un fragmento de 2 kb del promotor de GONST3 para 2 colonias de *Agrobacterium* (A1 y A2). La reacción de PCR se llevó a cabo usando los partidores G3Pr 5' y G3Pr 3'. Como controles negativos, se uso agua y (-) el vector pGWB3 vacío y como control positivo (+) ADN de *Arabidopsis silvestre*. PM, marcador de peso molecular.

4.2 Generación y Selección de *Arabidopsis* Transformadas con pGWB3-G3Pr-GUS y pGWB3-G4Pr-GUS.

4.2.1 Transformación estable de *A. thaliana* con las construcciones pGWB3-G3Pr-GUS y pGWB3-G4Pr-GUS

Una vez obtenidas las colonias de *A. tumefaciens* portadores de pGWB3-G3Pr-GUS y pGWB3-G4Pr-GUS, se procedió a transformar establemente plantas de *A. thaliana* por inmersión floral (sección 3.2.3). Las semillas obtenidas fueron sembradas en placas con medio MS suplementado con higromicina, obteniendo la primera generación de transformantes (T1). Como se observa en la Tabla III se obtuvo una tasa de transformación de 0,45% para GONST3 y 1% para GONST4.

En la figura 9, se observan plántulas de mayor tamaño que fueron seleccionadas como transformantes (T1). Luego de una semana de desarrollo en placa, estas plántulas se trasladaron a un sistema de cultivo en medio hidropónico (sección 3.2.2) hasta florecer y obtener semillas de la siguiente generación (T2).

Tabla III. Tasa de transformación para *A. thaliana* transformada con pGWB3-G3Pr-GUS y pGWB3-G4Pr-GUS.

	GONST3	GONST4
Resistentes a higromicina	5	10
Total semillas sembradas	1100	1000
Tasa de transformación	0,45%	1%



Figura 9. Transformación estable de *Arabidopsis* con el vector pGWB3-G4Pr-GUS. Plántulas obtenidas luego de una semana después de sembrar las semillas en placa MS con higromicina (25 µg/ml) como antibiótico de selección. Las semillas provienen de plantas transformadas por inmersión floral. La flecha señala una de las 11 plántulas resistentes (T1) obtenidas para GONST4.

4.2.2 Verificación por PCR de las líneas transformantes.

Para confirmar que las plantas seleccionadas como resistentes a higromicina fuesen transformantes, se realizó una extracción de ADN y luego una reacción de PCR amplificando un fragmento interno (330 pb) del gen de la β -glucuronidasa el cual no está presente en plantas silvestres.

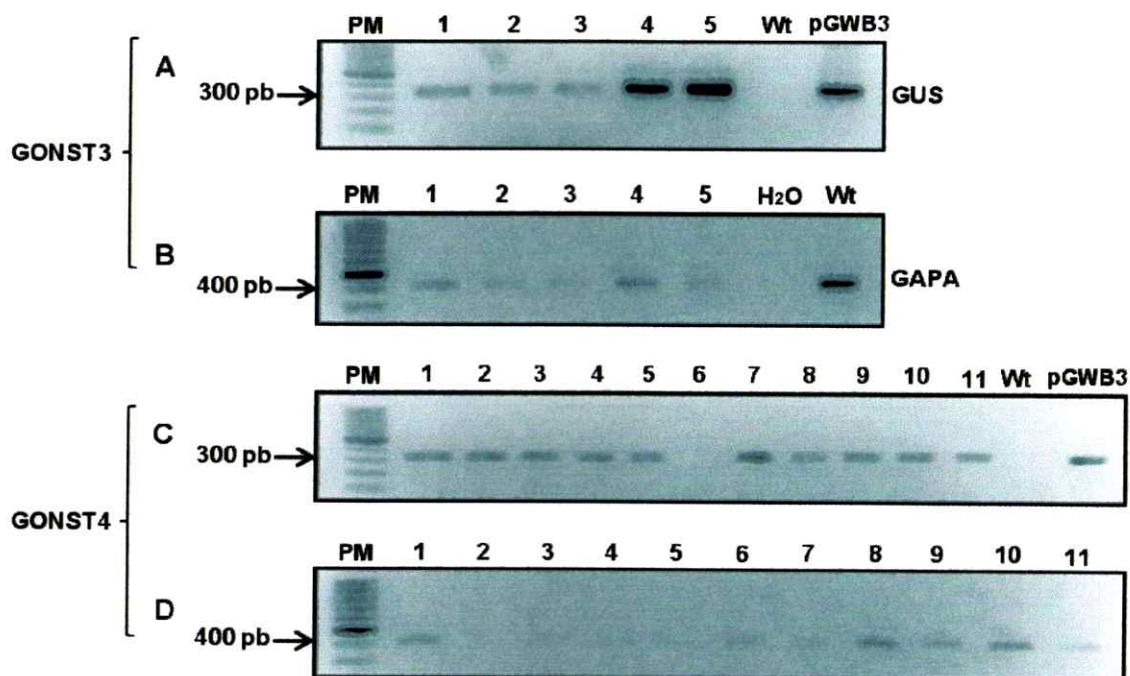


Figura 10. Verificación por PCR de las líneas de *A. thaliana* transformadas con pGWB3-G3Pr-GUS y pGWB3-G4Pr-GUS. Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio muestran la amplificación de un fragmento interno (300 pb) del gen de la β -glucuronidasa (GUS) para; **A.** 5 líneas transformantes de GONST3 (G3Pr::GUS) y para; **C.** 10 de 11 líneas de GONST4 (G4Pr::GUS). Controles negativos (-) para estos dos geles corresponden a ADN silvestre y controles positivos (+) al vector vacío pGWB3. Como control de calidad del ADN se amplificó un fragmento interno del gen endógeno GAPA (**B** y **D**). Se utilizó ADN silvestre de *Arabidopsis* como control positivo (+) y agua como control negativo (-) para los geles de GAPA. PM, marcador de peso molecular.

Los geles de la figura 10 muestran que las 5 líneas transformadas con G3Pr::GUS resistentes a higromicina resultaron ser transgénicas, mientras que para las transformadas con G4Pr::GUS, 10 de las 11 líneas fueron positivas. Además, se amplificó el gen GAPA como control de la calidad del ADN extraído, descartando la posibilidad que la línea 6 de las plantas transformadas con G4Pr::GUS no haya amplificado por haber tenido un ADN de mala calidad.

4.3 Análisis del patrón de expresión de GONST3 y GONST4 mediante el gen reportero GUS.

4.3.1 Evaluación morfológica de las líneas transformantes durante su desarrollo

De las plantas transformantes T1, se obtuvieron las semillas T2, las que fueron sembradas en varias oportunidades en placa MS con y sin antibiótico, sin observar germinación en ninguna de ellas. Por lo tanto, se procedió a sembrar las semillas directamente sobre un sistema de crecimiento en medio hidropónico (sección 3.2.2), obteniendo las plantas T2. Del total de plantas germinadas, por segregación mendeliana sólo un 25% no debiera ser transformantes. Por consiguiente, la selección de las plantas transgénicas se determinó tras realizar el ensayo GUS, seleccionando aquellas que presentaran tinción azulada, debido a la capacidad de acumular la proteína β -glucuronidasa regulada por la expresión de los promotores de GONST3 y GONST4.

Se realizaron evaluaciones morfológicas de tres líneas T2 para cada construcción con el fin de determinar si la inserción de este transgén en el genoma de *Arabidopsis* interfiere en el desarrollo normal de las plantas. Una de las evaluaciones realizadas consistió en la medición de la altura promedio de cada línea (Figura 11). Transcurrida una semana de desarrollo se observó la aparición de los cotiledones. Luego de dos y tres semanas de desarrollo las hojas se incrementaron en número y tamaño, mientras que a las cuatro semanas, se observó elongación del tallo en líneas transformadas con G4Pr::GUS y no en las transformadas con G3Pr::GUS (datos no mostrados), presentando estas últimas un retardo en la elongación a lo largo de su desarrollo.

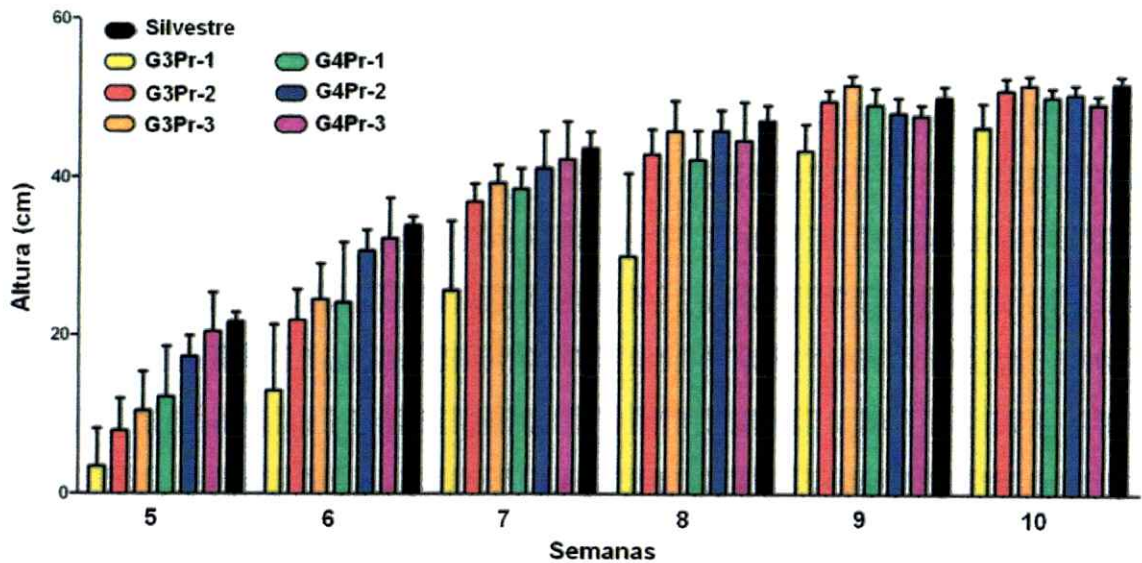


Figura 11. Altura de las líneas de Arabidopsis transformantes de G3Pr::GUS y G4Pr::GUS versus planta silvestre. Registro de la altura durante el desarrollo de cada línea transgénica analizada por ensayo GUS. Datos promedios de 18 plantas para cada línea a las 5 y 6 semanas de desarrollo; 12 plantas para las líneas transgénicas a las 7 y 8 semanas; 6 plantas de las líneas a las 9 y 10 semanas.

En plantas de cuatro semanas aparecieron las primeras flores en líneas transformadas con G4Pr::GUS aumentando en número en plantas de cinco semanas, desarrollo no observado en plantas de las líneas de GONST3. En las mismas líneas, aparecieron en plantas de seis semanas las primeras silicuas y desde las ocho semanas todas las líneas tenían silicuas. Finalmente, desde las nueve semanas de desarrollo se observó una normalización en la altura de todas las líneas, además de la presencia de rasgos de senescencia, esperables en esta etapa.

Con estos análisis morfológicos se observó un desarrollo normal en las líneas transformantes de Arabidopsis, exceptuando el retardo en la elongación al inicio del desarrollo en las líneas G3Pr-1 y G3Pr-2. Esto sugiere que la inserción del transgén en el genoma de las líneas transformantes de G3Pr::GUS y G4Pr::GUS, no estaría

alterando ningún proceso que perturbe el desarrollo normal de las plantas crecidas en medio hidropónico comparado con lo reportado en la literatura para plantas silvestres de *Arabidopsis* cultivadas en este medio (Gibeaut y col, 1997).

4.3.2 Ensayo GUS en las líneas transgénicas de G3Pr::GUS y G4Pr::GUS

Para el estudio del patrón de expresión de los TNAs GONST3 y GONST4, se analizaron tres líneas transgénicas independientes de la generación T2, para cada transportador (G3Pr-1, G3Pr-2, G3Pr-3, G4Pr-1, G4Pr-2 y G4Pr-3). Las líneas fueron sometidas al ensayo GUS (sección 3.7) luego de 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 semanas de desarrollo.

En este ensayo las plántulas o tejidos de plantas adultas fueron sumergidas en una solución con X-Gluc, sustrato que es hidrolizado por acción de la enzima β -glucuronidasa cambiando de incoloro (ácido glucurónico) a un precipitado azul intenso (cloro-bromo-índigo). Este cambio de color puede ser visualizado fácilmente, permitiendo realizar análisis cualitativos de la expresión de genes como los que se muestran a continuación.

La figura 12 muestra una planta de *Arabidopsis* para facilitar la identificación de sus distintos órganos, mientras que las figuras 13, 14 y 15 muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos para el ensayo GUS de tres líneas independientes de G3Pr::GUS y G4Pr::GUS. Transcurrida una semana de desarrollo fue posible observar una de las grandes diferencias en el patrón de expresión entre estos dos transportadores. La tinción sólo se vio en cotiledones de las líneas de G3Pr::GUS y no en las de G4Pr::GUS (figura 13, A), mientras que sí se observó

coloración en el resto de los tejidos como el meristema apical e hipocotilo. Plántulas de dos semanas presentaron coloración en todos los órganos de G4Pr::GUS, mientras que para G3Pr::GUS la intensidad de tinción en hojas fue menor (figura 13, B). En plantas de tres semanas la coloración de las plantas fue homogénea, observando coloración en todos los tejidos de ambas líneas (figura 13, C), patrón que se repitió en plantas de cuatro semanas (datos no mostrados).

De manera homóloga se hicieron ensayos en períodos de desarrollo más tardíos; 6, 8 y 10 semanas. Para un mejor manejo de las plantas y visualización de los resultados, se realizaron ensayos a cada órgano por separado; hojas caulinares, hojas rosetas, tallos, raíces, flores y silicuas (figuras 14 y 15). Cabe destacar que se incubó cada órgano en la solución de tinción por el mismo tiempo, manteniendo las condiciones experimentales en todos los tejidos analizados

En la figura 14 se muestran las hojas caulinares, raíces y tallos, que presentaron los mayores niveles de expresión a lo largo del desarrollo. Los ensayos de expresión de GUS en los tallos fueron realizados para zonas apicales, basales y centrales mostrando siempre la misma tinción homogénea a lo largo del tejido (datos no mostrados). Además, en el caso de las raíces, las puntas mostraron una mayor coloración que el resto del órgano (figura 14, C).

La tinción de las hojas senescentes se vio claramente disminuida en relación a cualquier otro órgano adulto, pero aún así es posible diferenciarlo de las hojas de plantas no transformadas (figura 15, A). Las silicuas mostraron una mayor tinción en las primeras fases de su desarrollo cuando aún se encuentran inmaduras (semana 6), posteriormente en estadios maduros donde son observadas las semillas (semana 8), la

coloración se mantiene a lo largo de toda la vaina, pero con menor intensidad (figura 15, B). En las semillas no se observó coloración. Finalmente, la flor fue el órgano que mostró los resultados más variados. En ninguna de las plantas transformantes de GONST3 y GONST4 se observó tinción en pétalos y en el caso de G4Pr::GUS tampoco en el estigma. Los otros tejidos sí mostraron tinción tanto en plantas transformadas con G3Pr::GUS como para G4Pr::GUS.

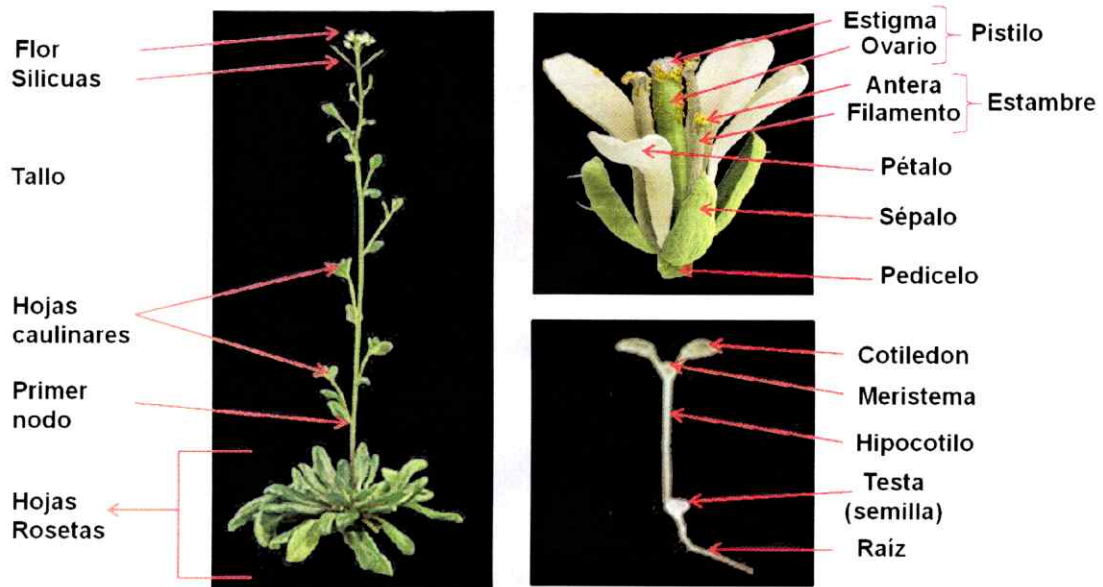


Figura 12. Imagen representativa de una planta de Arabidopsis. Izquierda; planta de Arabidopsis completa de 6 semanas de desarrollo, donde se señalan los distintos órganos de la planta. Derecha superior; esquema detallado de los distintos tejidos de una flor. Derecha inferior; imagen de una plántula de Arabidopsis de una semana de desarrollo (extraída de página web, revisar sección Referencias).

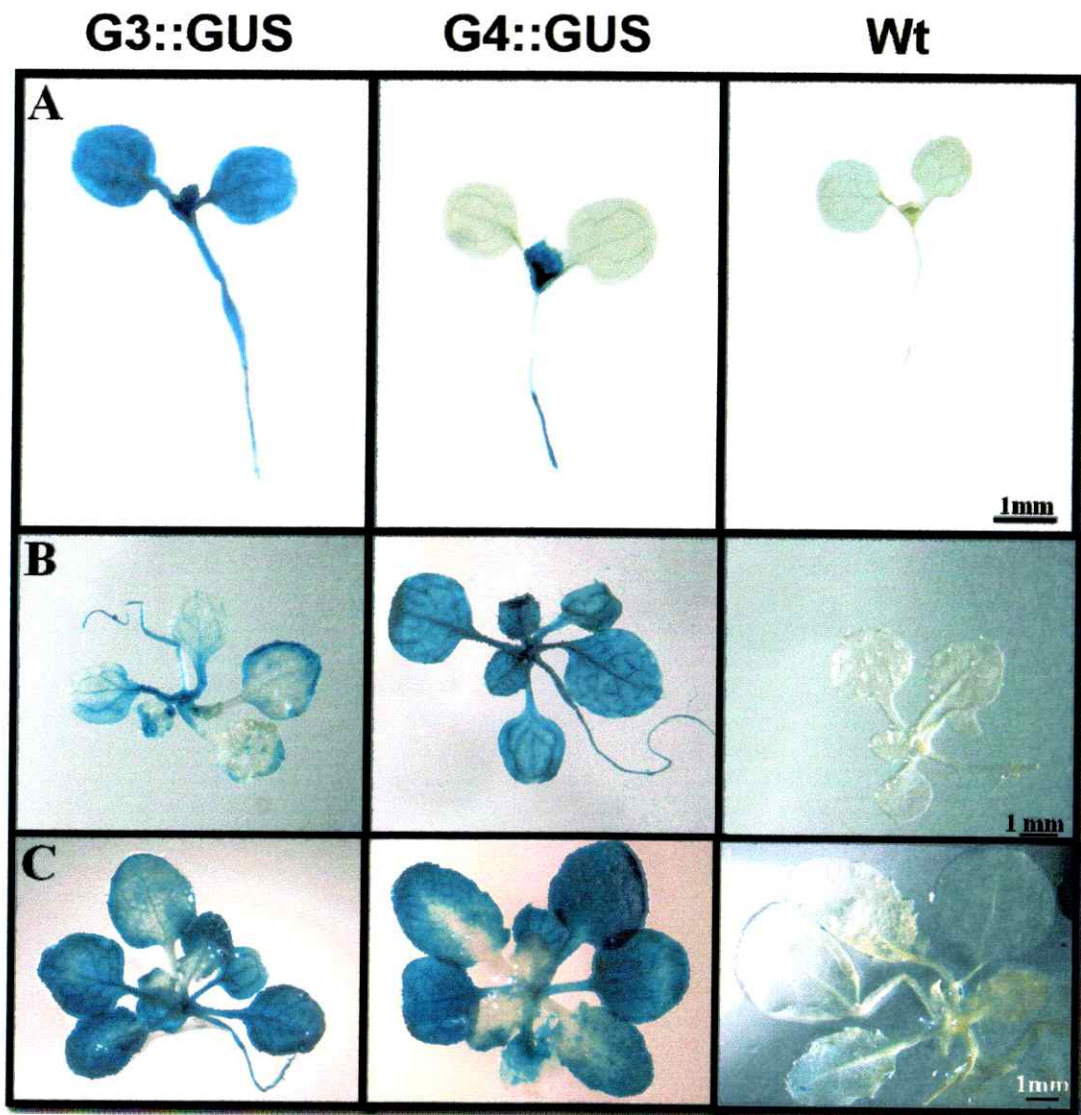


Figura 13. Imágenes representativas del ensayo GUS de tres líneas independientes de *Arabidopsis*, transformadas con G3Pr::GUS y G4Pr::GUS, en cotiledones y plantas de dos y tres semanas de desarrollo. A) se muestran plantas de una semana de desarrollo, donde no se observa tinción en cotiledones de plantas transformadas con G4Pr::GUS. B) y C) se muestran plantas de 2 y 3 semanas de desarrollo respectivamente. Wt: planta silvestre.

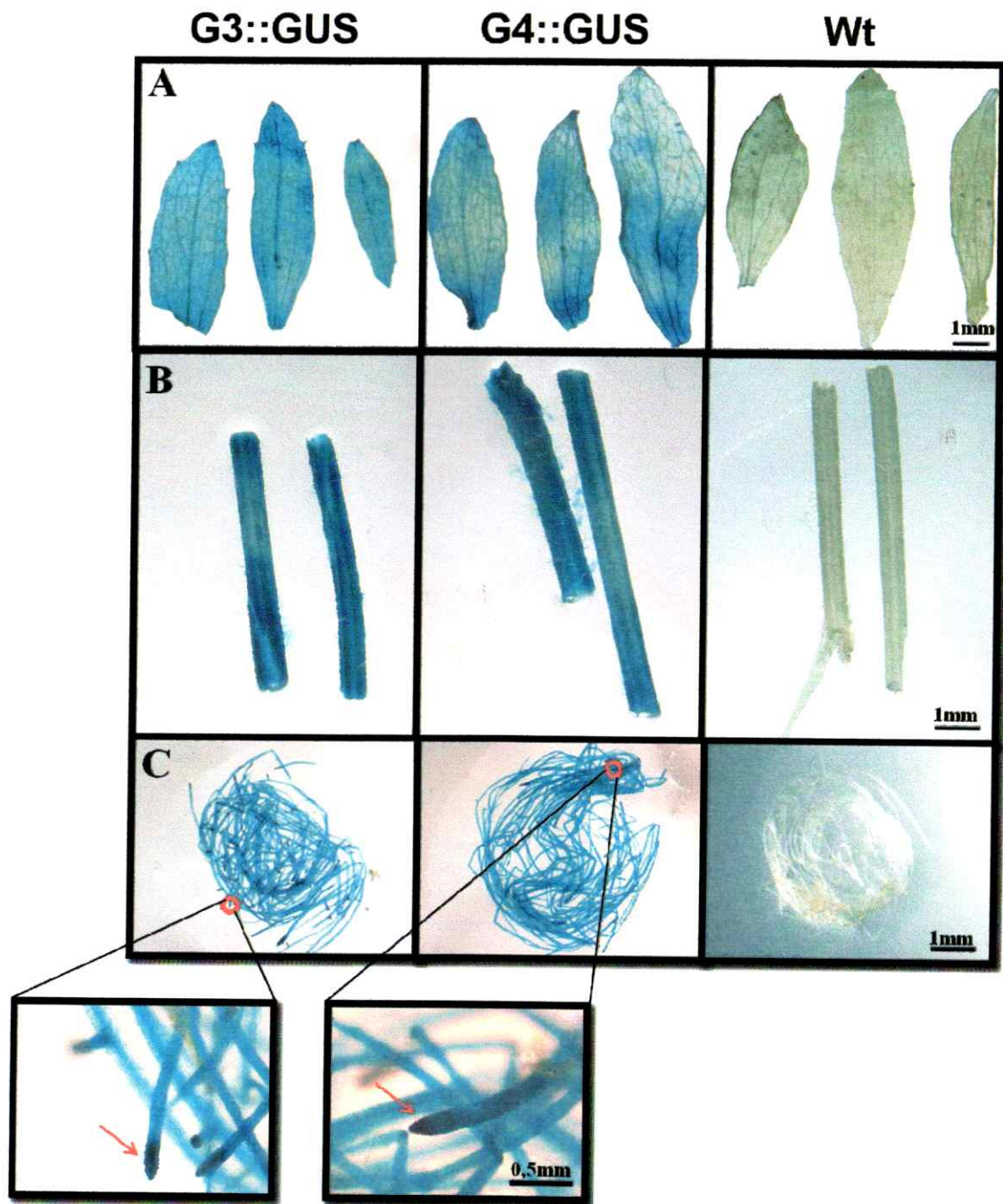


Figura 14. Imágenes representativas del ensayo GUS de hojas caulinares, tallos y raíces de tres líneas independientes de *Arabidopsis* transformadas con G3Pr::GUS y G4Pr::GUS. Organos de plantas de 8 semanas de desarrollo; A) se muestran hojas caulinares. B) se muestran tallos y en C) las raíces. Flechas rojas indican puntas de raíces. Wt: planta silvestre.

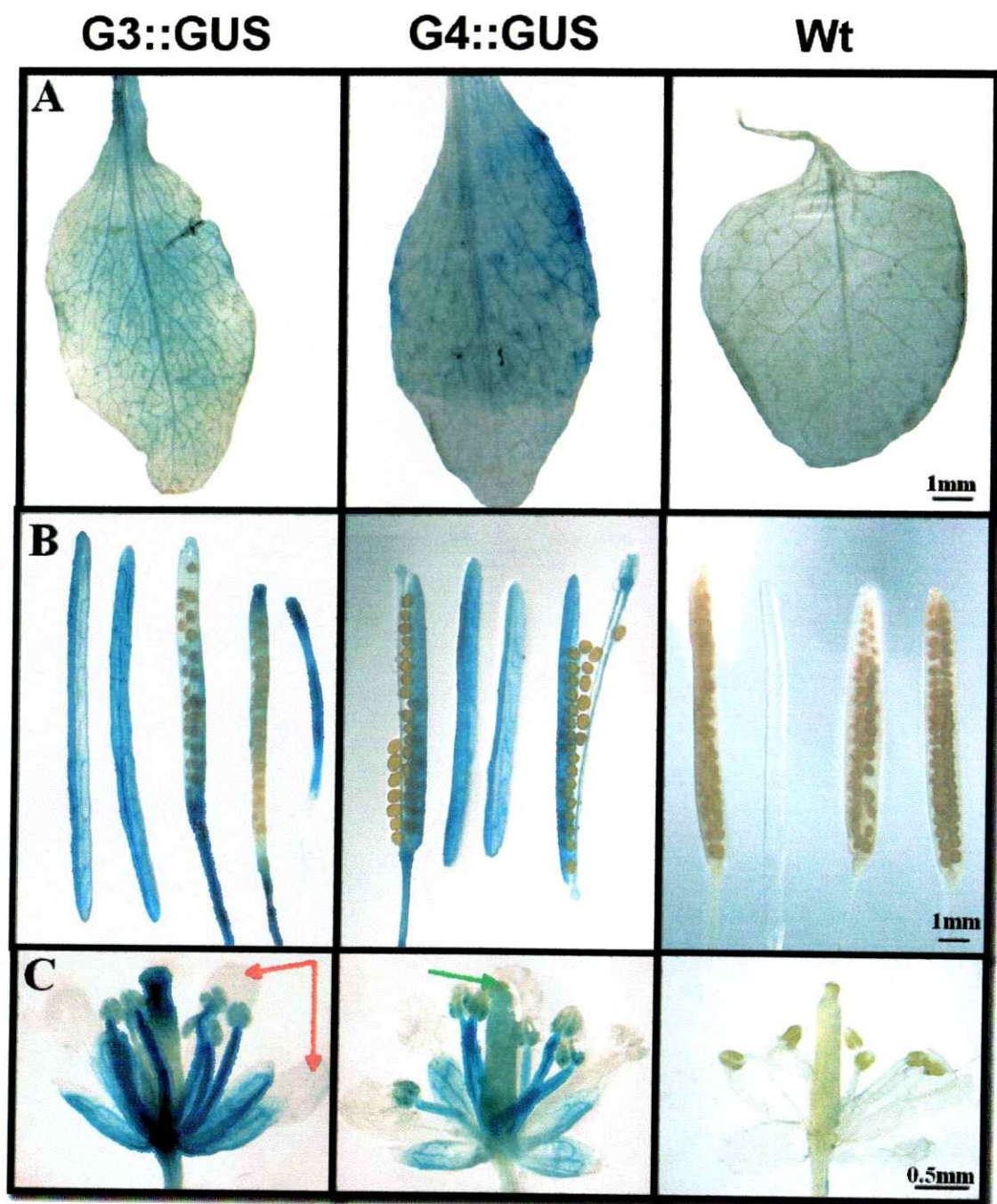


Figura 15. Imágenes representativas del ensayo GUS de hojas senescentes, silicuas y flores de tres líneas independientes de *Arabidopsis* transformadas con G3Pr::GUS y G4Pr::GUS. Organos de plantas de 8 semanas de desarrollo; A) hojas senescentes; B) silicuas en distintas etapas de desarrollo recolectada de plantas de 8 semanas y en C) las flores. Flechas rojas señalan los pétalos y flecha verde el estigma. Wt: planta silvestre.

4.4 Analisis *in silico* del patrón de expresión de GONST3 y GONST4.

4.4.1 Análisis bioinformático del patrón de expresión de GONST3 y GONST4 mediante *Affymetrix*.

Hoy en día existen una serie de técnicas que entregan muchos datos de secuencias, expresión y estructura, llamadas en inglés "High-throughput techniques". Una de estas técnicas ampliamente usada son los microarreglos, los que entregan información de los niveles de expresión relativa para miles de genes simultáneamente bajo condiciones determinadas.

Para facilitar la interpretación de los datos de microarreglos de Arabidopsis, Winter y col (2007) desarrollaron una herramienta llamada "*Electronic Fluorescent Pictograph*" (eFP – Browser), disponible en <http://www.bar.utoronto.ca/>. Esta herramienta fue creada para explorar datos de microarreglos de Arabidopsis que permitan visualizar intuitivamente los datos de expresión génica de más de 22.000 genes de este organismo, representados en el GeneChip ATH1 de *Affymetrix*. Aunque este chip no representa el transcriptoma/genoma completo de Arabidopsis (el cual posee unos 25.000 genes), cabe destacar que tanto GONST3 como GONST4 están representadas en el GeneChip ATH1.

Sólo se necesita el AGI ID (*Arabidopsis Genome Initiative Identifier*) para poder usar esta herramienta bioinformática. Como se mostró en la sección 4.1.1 el AGI ID para GONST3 es At1g76340 y para GONST4 At5g19980. En el pictógrafo, los órganos y tejidos de las plantas son coloreados de acuerdo a los niveles de expresión de cada gen de interés bajo un tratamiento particular.

Primero se realizó un análisis en modo absoluto para cada gen. Consiste en la expresión para cada órgano o tejido directamente comparada con la más alta señal registrada para el gen seleccionado, señalando de este modo los bajos niveles de expresión con coloración amarilla y altos niveles de expresión en rojo (datos no mostrados). Para GONST3 los 5 mayores niveles de expresión fueron registrados en raíz, hipocotilo, semilla embebida en agua durante 24h, primer nodo (parte de tallo, parte del brote lateral y la base de la primera hoja caulinar, figura 12) y carpelos en primeras etapas de desarrollo de la flor, mientras que los 5 niveles más bajos de expresión se registraron en polen maduro, estambres y sépalos de flores maduras, semilla seca y por último hojas senescentes.

En el caso de GONST4 los 5 mayores niveles de expresión se dieron en la zona distal de hojas rosetas de mayor tamaño, raíz, primer nodo, en zona proximal de hojas rosetas de mayor tamaño y en pedicelos de flores maduras. Por otro lado los 5 menores niveles de expresión registrados para GONST4 se observaron en semillas, estambres de flores maduras, polen maduro, pétalos de flores maduras y en hojas rosetas vegetativas.

Para un análisis comparativo (figura 16), el color apropiado para cada órgano o tejido está determinado evaluando la razón del promedio de la expresión de GONST4 versus GONST3 desde el máximo positivo o negativo y lo convierte en un lugar equivalente dentro de una escala de colores; de amarillo a rojo para números positivos (mayor expresión de GONST4) y amarillo a azul (mayor expresión de GONST3) para los negativos.

En la figura 16 se muestra la pictografía fluorescente electrónica comparativa entre ambos genes. Como se puede observar hay una mayor coloración roja en sépalos de flores maduras indicando que existe mayor expresión de GONST4 en este órgano, mientras que en semillas existe una mayor expresión de GONST3 debido a la coloración azulada presente en este órgano. Al igual que para la expresión absoluta de cada gen, se seleccionaron los 10 tejidos con los mayores niveles de expresión génica comparativamente de GONST3 y GONST4, datos representados numéricamente que pueden ser extraídos de la misma página web y que han sido resumidos en la Tabla IV.

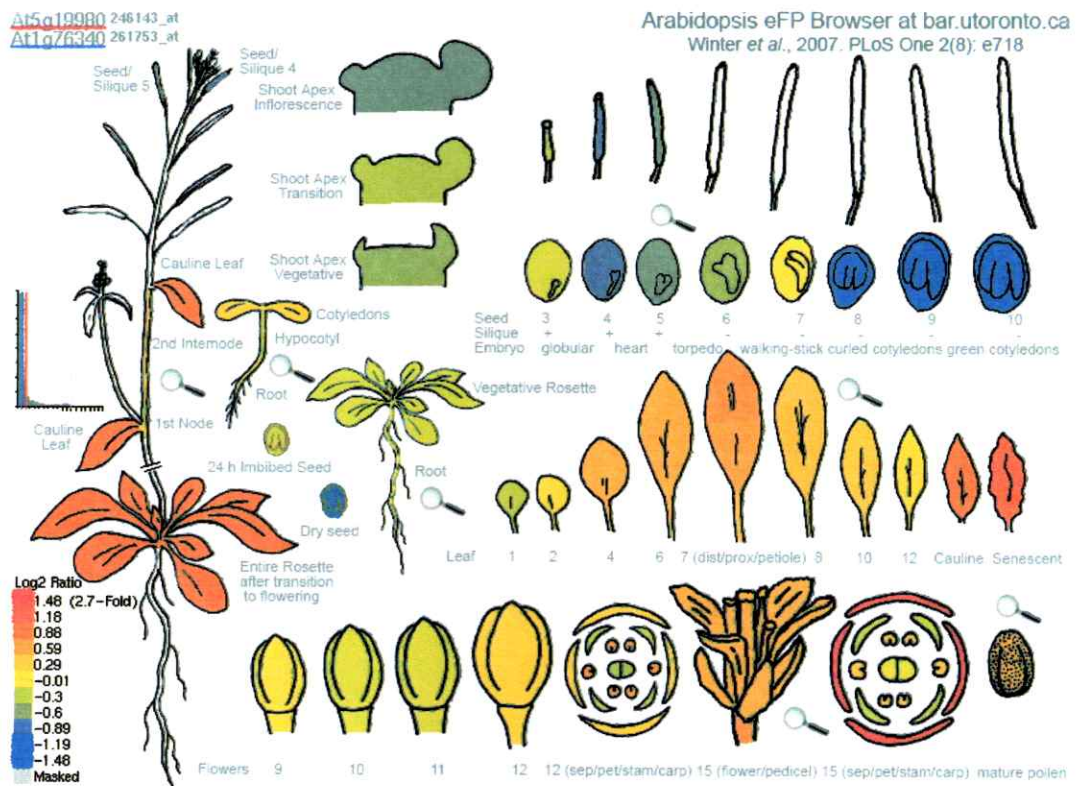


Figura 16. Pictografía fluorescente electrónica comparativa entre GONST4 (At5g19980) y GONST3 (At1g76340). En la figura se muestran los órganos o tejidos de Arabidopsis coloreados en una escala de azul a rojo que representan las variaciones en la expresión de GONST4 comparativamente con las de GONST3 realizadas bajo las mismas condiciones. Mientras la coloración sea más cercana a rojo los niveles de expresión de GONST4 son mayores a los de GONST3 y de forma opuesta si la coloración es más cercana al azul los niveles de GONST3 son mayores a los de GONST4.

Tabla IV. Tejidos u órganos de Arabidopsis con mayores niveles de expresión génica comparativamente entre GONST3 y GONST4. La primera columna muestra los nombres de los tejidos seleccionados. La segunda columna (razón log2) muestra los valores obtenidos de expresión para cada tejido, representados según la escala de la figura 16. La tercera columna (cambio comparativo) representa el valor de veces que se expresa GONST4 en dicho tejido en relación a GONST3.

GONST4			(G4/G3)	GONST3		
Tejido	Razón Log2	Cambio comparativo	Tejido	Razón Log2	Cambio comparativo	
Estadio floral 15, Sépalos	1,48	2,8	Semillas estadio 10 c/s Silicuas	-1,97	0,25	
Hojas Senescentes	1,08	2,11	Semilla seca	-1,76	0,29	
Roseta completa después de la transición a la floración	0,91	1,88	Semillas estadio 9 c/s Silicuas	-1,38	0,38	
Hoja caulinar	0,87	1,82	Semillas estadio 8 c/s Silicuas	-1,05	0,48	
Estadio floral 12, Estambres	0,71	1,64	Semillas estadio 4 c/s Silicuas	-0,86	0,55	
Estadio floral 15, Pedicelos	0,69	1,62	Apice del brote, inflorescencia	-0,68	0,62	
Hoja 7, Mitad Distal	0,65	1,57	Semillas estadio 5 c/s Silicuas	-0,66	0,63	
Hoja 7, Mitad Proximal	0,55	1,46	Apice del brote, Vegetativo	-0,52	0,7	
Polen maduro	0,55	1,46	Semillas estadio 6 c/s Silicuas	-0,46	0,72	
Hoja roseta 6	0,47	1,38	Estadio floral 12 Carpelos	-0,38	0,77	

4.4.2 Análisis de la secuencia de los promotores de GONST3 y 4 mediante herramientas bioinformáticas.

Para complementar el análisis del patrón de expresión de GONST3 y GONST4, además de comparar con la base de datos de Affymetrix, es posible mediante herramientas bioinformáticas identificar en la secuencia de los promotores de estos TNAs, posibles elementos regulatorios que permitan relacionar la expresión con los motivos encontrados en las bases de datos.



Figura 17. Motivos regulatorios encontrados *in silico* en la secuencia del promotor de GONST3. En la figura se muestran los motivos regulatorios encontrados en la secuencia promotora de GONST3 identificados por colores en sus respectivas cajas. En rojo las cajas de respuesta a luz, azul: elicitores, naranja: ciclo circadiano, verde: ácido abscísico, amarillo: meristema y rosado: endosperma. Las letras en rojo representan la región 5'UTR, las letras resaltadas en amarillo muestran el codón de inicio (ATG), la letra blanca resaltada en cuadro azul muestra la base mutada; T/C (1486). Los guiones cerca del ATG corresponden a bases del promotor que no fueron clonados en pGWB3-G3Pr-GUS.

GATTGAAACAAATTATCGAAGACAGAGATCTCTAGTAAGGAGATGAGA **GAAAAA** GGAGAGAGATTAGTTTTC
 GTCGATCAGAATCTCAGAAACCCTCACGCGAAGCATTATATGATATCACCTAAATTAATAAAAAGGAAATTA
 CTCACAATAGAAATATTTTTTACTTTTTGCTTGT **TTAACCTT**CTAGTTGTTAGAGTCCTTCCTCG
 AGTCTACGTTTTCTCAGGCTTACTCTAGCTGGTGGC **ATAAAGC** **TTGGA**ACCATCTTAGAGATAAAACGTT
 CTGCTTGTAGTAATTTAAGTT **CACCTTATC**AGTAAGAAGAGAGTTGTCGAGGGAGATAGTTGAAACTTTG
 AAACATTCGGATTATAACTTCTTCTTTTTCGTTTTAAATCTTACTTTAATACACATCATAAACATGTTTTATT
 ACTAGATC **AAGATTT**GAATAACATTTTAGTGTAGTTGATGCATGATGCTCAACRAACATGTTTCAACATCAA
 CGACTTT **ATTGGTGA**ATAAAAACAAAGTATTACAATTTGTATAGCTTTTTTTTTATACAAAACACAAAAGAT
 TATCAAAAGTGTACAAAAGTTTTACTCTCACTTTTTATTGTAAGGTTTTCTCGTACCGTTCTTTTTTACAGC
 TTTATAATAT **CGAAATA**CGTACACCTAAATTTTTATACGACTT **TTGTAA** **CAATCAGATC**CGTTAATC
 TAAATTTGTACAGCTTTGTGTTGTACAGCCAGATGACAACAATTTAGATTATTATGTTTATTAAAGCGT
 TGGTTCAGCACATATCGTTAATCTAAAAGAGAGTGAATCTCAACAATGACTACATGCAATCTCAATTTATTGC
 TTAATTAGTGC **TTGAC**AGTTTATGTCCAAAATACACAATAATTTCTCTACAAAACAACAAAATTCTCTAC
 ATACACACAGACAAAATCAATATGTTTAATATTCTCCATTAAT **GTGA** **TTGACC**AAATTAACACCACAAT
 TAACTCAAAGTACTAAAAGATTACTAACAAAATTTGCC **GTAC** **GATAAG**CACTGACGAGAGAAGTCGTC
 GCCTTCCTCTAATTAGTCTCTGAATAATCCGATCCAGATCCCAAATCCTCTCTTCTTCATCTTCACCGATCTG
 GATCTCCCAAAAACCTCCACCAAAAACC-----**ATG**

 Luz	 Elicitor	 Circadiano
 Baja t°	 Heat Shock	

Figura 18. Motivos regulatorios encontrados *in silico* en la secuencia del promotor de GONST4. En la figura se muestran los motivos regulatorios encontrados en la secuencia promotora de GONST4 identificados por colores en sus respectivas cajas. En rojo las cajas de respuesta a luz, azul: elicidores, naranja: ciclo circadiano, verde: frío y en amarillo: proteínas heat shock. Las letras en rojo representa la región 5'UTR, las letras resaltadas en amarillo muestran el codón de inicio (ATG) y los guiones corresponden a bases del promotor que no fueron clonados en pGWB3-G4Pr-GUS. Las letras blancas resaltadas en cuadros azules muestran las bases que están mutadas; T/A, 256; G/A, 265; A/G, 447; T/A, 668; A/T, 705 y G/A, 994 (sección 4.1.2).

Se utilizaron las bases de datos de PLACE y PlantCARE encontradas en la red (sección 3.8.2) las que entregaron motivos de secuencias nucleotídicas en plantas, que regulan elementos de ADN que actúan en *cis*. Ambas bases de datos mostraron posibles elementos regulatorios en los promotores de GONST3 y GONST4. PLACE encontró 486 posibles motivos regulatorios en el promotor de GONST3 y 258 de

GONST4. Por su parte PlantCARE encontró 125 posibles motivos regulatorios en el promotor de GONST3 y 105 de GONST4. Para un análisis más detallado se seleccionaron aquellos motivos que se repitieron entre las dos bases de datos, y se descartaron aquellos motivos que fueran menores a 4 bases nucleotídicas debido a la redundancia e inespecificidad de estas secuencias, resultando en el diagrama que se muestra en las figuras 17 y 18.

Para GONST3 (figura 17) se encontraron 6 tipos de cajas regulatorias, incluyendo elementos de respuesta a luz (GT-1; Villain y col, 1996), elementos de respuesta a deshidratación regulados por ácido abscísico (MYC y MYB; Abe y col, 1997), elementos de respuesta a meristema (PLantCARE CAT-box; Chaubet y col, 1996) o luz (PLACE phyA; Hudson y Quail, 2003) dependiendo del programa que arrojó el elemento regulatorio, motivos para ciclo circadiano (Elementos cis para el gen *Lhc* [tomate]; Piechulla y col, 1998), elementos que actúan en cis para genes que regulan endosperma (GCN4; Washida y col, 1999) y finalmente motivos de respuesta a elicitores (W-box; Laloí y col, 2004), que corresponden a moléculas capaces de desencadenar la respuesta de hipersensibilidad en plantas, como por ejemplo moléculas de la pared celular de bacterias; polisacáridos, proteínas, lípidos.

Por otro lado, algunos de los motivos encontrados en GONST3 se repitieron en el análisis de la secuencia de GONST4, entre los que se observan los elementos regulatorios de respuesta a luz, elicitores y ciclo circadiano, pero además apareció un nuevo motivo de respuesta a frío (LTR; Dunn y col, 1998 [figura 18, verde]).

Finalmente, posterior a la secuenciación (sección 3.9), se encontraron mutaciones por sustitución en los promotores de GONST3 y GONST4. En el caso de GONST3

consistía en la sustitución de una timina por una citocina en el nucleótido 1486, mutación que no produjo consecuencias en la identificación de elementos regulatorios, mientras que en GONST4 ocurrieron 6 sustituciones; T/A, 256; G/A, 265; A/G, 447; T/A, 668; A/T, 705 y G/A, 994. De las seis sustituciones encontradas en la secuencia clonada para GONST4, sólo una (G/A; 265) condujo a la aparición de un nuevo elemento regulatorio para proteína heat shock (HSE; Haralampidis y col, 2002), elemento no encontrado en la región promotora de plantas silvestres de GONST3, pero sí en las de GONST4 (figura 18, caja amarilla).

5. Discusión

Aproximaciones bioinformáticas y resultados no publicados realizados en el Laboratorio de Biología Vegetal Molecular (2006-2010) revelan que la actividad de los TNAs consiste en el transporte, hacia el lumen del aparato de Golgi, de GDP-*L*-fucosa y GDP-*L*-galactosa para GONST4 y GDP-*L*-fucosa para GONST3. Como se mencionó en la introducción (sección 1.1.1), se ha observado que el xiloglucano, el RGII y proteínas como las AGPs y N-glicanos se encontrarían glicosiladas con estos *L*-azúcares. Debido a esto, se hace necesario estudiar el papel *in vivo* en aquellas líneas mutantes con menores niveles de expresión de GONST3 y GONST4, analizando las variaciones en la composición de estos azúcares en los distintos polisacáridos y proteínas de la pared. Como un análisis previo que permita dirigir la investigación hacia los órganos de interés, se estudió en este seminario de título el patrón de expresión de GONST3 y GONST4 mediante el uso del ensayo histoquímico GUS.

5.1 Generación de líneas transformantes G3Pr::GUS y G4Pr::GUS

Se generaron las construcciones con el vector binario pGWB3 (sección 3.4.1), G3Pr::GUS y G4Pr::GUS, las que poseen respectivamente la secuencia promotora de cada TNA fusionado al gen reportero de la β -glucuronidasa, proteína que desencadena una reacción colorimétrica cambiando el sustrato X-gluc de incoloro a azul intenso en aquellos órganos de la planta donde se estén expresando estos TNAs. Este es un método que ha sido ampliamente utilizado para el análisis de expresión a nivel de tejido o en todos los órganos de la planta (Rollwitz y col, 2006; Baldwin y col, 2001).

Generadas las construcciones se procedió a la transformación estable de plantas de *Arabidopsis*, por inmersión floral. Aquellas plantas transformadas se seleccionaron

utilizando antibiótico en el medio de sembrado de las semillas, obteniendo la primera generación transgénica (T1) de GONST3 con 5 líneas y 10 para GONST4, las que fueron confirmadas por PCR (figura 10). La tasa de transformación concuerda con lo reportado en la literatura (Clough y Bent, 1998; ~1%) obteniendo un 0,45% para GONST3 y 1% para GONST4 (Tabla III, sección 4.2.1). En el caso particular de GONST4 fueron seleccionadas en un principio 11 líneas de las cuales 10 resultaron ser positivas por PCR (figura 10). El hecho de que una de las 11 plantas no resultó ser transformante puede deberse a una distribución no homogénea de la higromicina en el medio de germinación de las semillas, lo que condujo al desarrollo de esta línea silvestre en una zona de escasa concentración. También ha sido observada la posibilidad de una sobrevivencia natural de plantas (Lawand y col, 2002) o si no, la posibilidad de estar frente a una planta quimera, la cual presente resistencia a higromicina sólo en su parte radicular y no en la zona aérea (Schmulling y Schell, 1993).

Con el fin de obtener un mayor número de plantas transformantes para analizar, se procedió a la obtención de la segunda generación de transformantes (T2), sin embargo no fue posible observar plantas resistentes al medio de selección por lo que se decidió sembrar en un medio carente de antibiótico. Existen dos posibles razones por las cuales no hubo germinación de semillas T2 en medio de selección. Una posibilidad es que el gen de resistencia a higromicina (*Hpt*) se haya silenciado en plantas transformadas explicando la posterior expresión de GUS pero la incapacidad de crecer en agente de selección (Domínguez y col, 2002). Alternativamente, que el período de madurez de las semillas no haya sido el óptimo cuando fueron recolectadas perjudicando su germinación en medios de selección.

5.2 Análisis del patrón de expresión mediante ensayo GUS

Una vez generadas las construcciones y obtenidas las plantas transformantes de las líneas G3Pr::GUS y G4Pr::GUS se continuó con el objetivo general de este seminario de título que corresponde al análisis del patrón de expresión de GONST3 y GONST4. Como análisis previo de las líneas transgénicas, se realizó un estudio morfológico de las distintas líneas para determinar si el transgén incidía en el desarrollo normal de las plantas. Como se muestra en la figura 11, sólo las plantas de las líneas G3Pr-1 y G3Pr-2 presentaron un retardo en el crecimiento durante las primeras 5 semanas de desarrollo, alcanzando el tamaño promedio de todas las líneas durante las últimas semanas (sección 4.3.1). Las imágenes de las figuras 13, 14 y 15 son representativas de todas las líneas analizadas, sin mostrar diferencias en el patrón de expresión entre las distintas líneas de un mismo TNA.

Además como es esperable por segregación mendeliana, sólo un cuarto de las plantas debían ser silvestres, mientras que un 50% heterocigotas y el 25% restante homocigotas por el transgén. Ya que la generación T2 no fue sembrada con antibiótico, la selección de las plantas transformantes se determinó tras realizar el ensayo GUS, observando plantas silvestres (sin coloración azulada) sólo en un cuarto de las plantas analizadas (datos no mostrados), indicando que el 75% restante podrían corresponder a plantas heterocigotas u homocigotas analizadas de forma azarosa.

En plantas de tabaco existe una diferencia en la expresión de la proteína de la β -glucuronidasa entre líneas heterocigotas y homocigotas, donde estas últimas se expresarían 0,5 veces más en algunas de las líneas analizadas (Beaujean y col, 1998). Sin embargo, cabe destacar que en las líneas de Arabidopsis estudiadas no fue posible

distinguir diferencias en la expresión de GUS entre distintas líneas de un mismo TNA, en cambio sí se observaron diferencias en la expresión de GUS entre los distintos órganos de una misma planta, cumpliendo con el objetivo general de este seminario de título.

Tres líneas por cada TNA fueron sometidas al ensayo GUS. Los resultados presentados (sección 4.3.2) mostraron principalmente una expresión ubicua en la planta a largo de todo su desarrollo para ambos transportadores (figuras 13, 14 y 15).

Los órganos que exhibieron una mayor coloración a lo largo del desarrollo fueron las raíces, tallos y hojas caulinares (figura 13). En raíces la mayor tinción se registró en las puntas, mientras que en tallos la coloración fue homogénea entre las distintas zonas: apical, media y basal a pesar de tener una composición celular variable a lo largo de este.

Los menores niveles de coloración registrados se observaron en hojas senescentes, mientras que en pétalos y semillas no se distinguió tinción (figuras 14 y 15). En el caso de las semillas es necesaria una preparación previa del órgano para un análisis más exhaustivo al interior de estas.

Las principales diferencias entre los patrones de expresión de ambos TNAs se presentaron en flores y cotiledones, ambos con expresión sólo en líneas de GONST3.

Una explicación a la carencia de tinción azulada en estigma y cotiledones de las líneas de GONST4 puede deberse a una posible escasez de la *L*-galactosilación de RGII en estos órganos o la ausencia completa de este polisacárido, el que puede encontrarse reemplazado por otro tipo de pectinas que suplan su acción en la pared como el RGI o el homogalacturonano. Además, la carencia de tinción en pétalos indica que GONST3

y GONST4 pudiesen no estar expresándose en este órgano. Esto podría implicar que no existen polisacáridos ni glicoproteínas ramificados con *L*-fucosa o *L*-galactosa en esta parte de la flor. Sin embargo, se ha detectado *L*-fucosilación de xiloglucano en los pétalos de *Arabidopsis*, descartando esta posibilidad (Bonin y col, 2003). Alternativamente, otro transportador sería el encargado de incorporar GDP-*L*-fucosa y GDP-*L*-galactosa al interior del Golgi para la síntesis de glicoconjugados de la pared celular de pétalos, función que podría ser desempeñada por algún otro transportador de la misma (GONST) o de otra familia. Se ha observado en microanálisis de pared celular de distintos órganos de *Arabidopsis* (hojas rosetas, hojas caulinares, pecíolo, raíz, silicua y tallo), que en pétalos el xiloglucano posee los menores niveles de fucosilaciones de todos los órganos investigados, apoyando la hipótesis que otro TNA sea responsable de la importación de GDP-*L*-fucosa en este órgano (Obel y col, 2009).

Las puntas de las raíces se encuentran divididas en tres secciones de desarrollo, una región de división celular meristemática ubicada en la zona apical de la raíz, otra región de elongación donde las células se encuentran en constante crecimiento y finalmente una región de maduración donde las células se diferencian a los distintos tipos celulares de la raíz (Benfey y Schiefelbein, 2004). En la zona meristemática la actividad mitótica de estas células es alta, dirigiendo un aumento en la síntesis de pared celular. Por lo tanto, en un área pequeña como es la punta de la raíz, la acumulación de muchas células meristemáticas de pequeño tamaño conllevan un aumento en la coloración (figura 14), debido a la alta actividad de estos transportadores para la síntesis de los polisacáridos de la pared, coloración que se ve disminuida en el resto de la raíz donde las células se encuentran elongadas, alcanzando tamaños superiores que conducen a un efecto de dilución de la tinción. Investigaciones realizadas por Obel

y col (2009) apoyan esta hipótesis tras observar por análisis *in situ* mediante OLIMP (Oligosaccharide mass profiling) una mayor abundancia de xilogucano fucosilado en raíces que en el resto de los órganos de Arabidopsis, lo cual se relaciona con lo obtenido por Freshour y col (2003) donde por medio del uso de un anticuerpo vieron que existe un aumento de xilogucano fucosilado en células epidermales con respecto a células internas de la raíz (cortex).

Por último, la falta de tinción en cotiledones de las líneas de GONST4 podría ser explicada por una menor cantidad de polisacáridos y proteínas *L*-fucosiladas o *L*-galactosiladas, como también por la posibilidad que la actividad de este transportador se vea suplida por otro TNA.

En resumen, y como se puede apreciar, la interpretación de los resultados obtenidos se ve dificultado por la escasa información disponible sobre la composición de la pared celular en los distintos órganos de Arabidopsis, excepto en el caso de la *L*-fucosilación del xilogucano. Esto se debe principalmente a la dificultad en el estudio y análisis de las otras moléculas involucradas, como son el RGII y las glicoproteínas (N-glicanos y AGP), moléculas complejas estructuralmente y difíciles de purificar, especialmente la pectina que además de ser *L*-fucosilada es el único polisacárido *L*-galactosilado en la pared de Arabidopsis. Sin embargo, los resultados obtenidos de la expresión génica concuerdan con los ensayos bioquímicos de la pared celular (es decir que la expresión de ambos transportadores de GDP-*L*-fucosa es esencialmente ubicua y que *L*-fucosa está presente en la mayoría de la planta, Obel y col, 2009), y ayudarán a enfocar el análisis fenotípico de mutantes con menores niveles de expresión de GONST3 o GONST4 (ver Proyecciones).

5.3 Análisis *in silico*

5.3.1 Affymetrix

Mediante el uso de la base de datos de Affymetrix de Arabidopsis se realizaron análisis absolutos y comparativos para GONST3 y GONST4 (sección 4.4.1). Los principales resultados indicaron que la expresión de ambos TNAs es ubicua a lo largo de la planta al igual que los resultados obtenidos mediante ensayo GUS. En general, todos los órganos y tejidos de Arabidopsis presentaron una expresión similar de ambos TNAs, incluyendo cotiledones y pétalos. Resultados distintos a los obtenidos mediante GUS, técnica que arrojó falta de tinción en pétalos de ambas líneas y en cotiledones de GONST4.

A pesar de que la expresión de ambos TNAs es muy similar es posible encontrar algunas diferencias entre estos transportadores. Análisis en detalle por Affymetrix indican una mayor expresión en hipocotilo y semilla para GONST3, mientras que para GONST4 se registraron en la zona distal de hoja de la roseta y en el primer nodo del tallo. Los menores niveles de GONST3 fueron observados en sépalos y para GONST4 en semillas. Mediante ensayo GUS, análisis comparativos entre ambos TNAs mostraron ser poco precisos al momento de relacionar cuantitativamente la expresión entre GONST3 y GONST4, sistema que puede ser implementado utilizando un sustrato fluorescente para la enzima β -glucuronidasa como es el MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide Trihydrate), sustrato que tiene la facultad de ser cuantificado con gran precisión mediante absorbancia.

Finalmente una diferencia notoria se presentó entre los dos sistemas de análisis utilizados. Mediante Affymetrix los niveles de expresión de GONST4 en estigma fueron

mayores a los de GONST3, resultado que difiere con lo observado por GUS, metodología que no mostró tinción en este tejido en líneas de GONST4.

Las diferencias mencionadas entre ambos sistemas no indican que una u otra de las metodologías utilizadas sea la más correcta al evaluar los niveles de expresión de ambos transportadores. En el caso del sistema GUS se mide la actividad del promotor en términos de la expresión de un gen a nivel post-traducciona, a diferencia de la base de datos de Affymetrix en la cual los análisis son a nivel transcripcional. Por último, es importante recalcar que las condiciones de cultivo implementadas por cada sistema difieren notablemente, por ejemplo el medio de cultivo utilizado en el laboratorio (hidropónico) es diferente al empleado en los ensayos que sustentan Affymetrix (cultivo en tierra). Sin embargo, los resultados obtenidos en este seminario de título son confiables debido a la cantidad de plantas analizadas por línea de estudio para cada transportador, las que presentaron el mismo patrón de expresión, validando los resultados presentados.

5.3.2 Secuencia de Promotores

Complementando los resultados obtenidos por GUS y la base de datos de Affymetrix es posible obtener información sobre secuencias nucleotídicas que regulan elementos de DNA en *cis* (sección 4.4.2). Estos elementos regulatorios fueron recopilados a partir de las bases de datos encontradas en internet; PLACE y PlantCARE (sección 3.8.2).

Ambos programas arrojaron una cantidad de datos variables para cada transportador. En el caso de GONST3, PLACE mostró 486 posibles motivos regulatorios contra 125 identificados por PlantCARE, mientras que para GONST4 PLACE arrojó 258 motivos frente a los 105 presentados por PlantCARE. A pesar de que ambos programas

poseen un número similar de datos (PLACE; 469 y PlantCARE; 435), se sugiere que la diferencia en la cantidad de resultados entregados se encuentra en sus algoritmos y/o en sus actualizaciones (PLACE [2007] y PlantCARE [2002]). Posibles elementos regulatorios en común fueron entregados por ambos programas, encontrando entre ellos motivos de respuesta a luz, elicitores y ciclo circadiano. También fue posible distinguir motivos sólo presentes en GONST3; ABA, meristema y endosperma o en GONST4; respuesta a frío. Todos, directa o indirectamente pueden estar relacionados con la expresión de los TNAs y por consecuencia con la síntesis de la pared celular. Por ejemplo, un motivo de respuesta a luz ha sido estudiado en genes de fotosíntesis y genes ribosomales de hojas y raíces de Arabidopsis, donde se ha observado que este elemento regulatorio actuaría como activador en hojas y como inhibidor en raíces (GT-1, Villain y col, 1996). Se sabe que a partir de la fotosíntesis se fija el carbono que servirá de sustrato para todas las moléculas necesarias en las distintas rutas metabólicas incluyendo la síntesis de la pared celular. De manera homóloga, se puede explicar la presencia de elementos regulatorios a elicitores. El ataque por patógeno a las plantas desencadena una reacción de hipersensibilidad que conduce a la síntesis de moléculas para la restitución de la pared celular vegetal dañada por el patógeno. En Arabidopsis se han identificado factores de transcripción específicos de plantas (WRKY) implicados en la respuesta a elicitores, que además tendrían acción frente a daños oxidativos (Laloi y col, 2004).

La presencia de un motivo particular en alguno de los TNAs no implica una diferencia en el patrón de expresión anatómica entre ellos, sino que sugiere la posibilidad de que cada transportador se vea regulado por diferentes condiciones bióticas y abióticas. Estrés por sequía o altas concentraciones de sales promueve la síntesis de ABA,

hormona que a su vez induciría la transcripción de los factores de transcripción rd22BP1 y ATMYB2, factores que son capaces de unirse a elementos regulatorios de *rd22* (gen en respuesta a deshidratación), llamados MYC y MYB (Abe y col, 1997) presentes en muchos promotores, incluyendo al de *GONST3*. La pared celular primaria de dicotiledóneas contiene un 65% de agua retenida principalmente por las pectinas y hemicelulosas (Carpita y McCann, 2000). Como consecuencia de un estrés por sequía es necesaria la alteración de la composición de la pared hacia aquellos polisacáridos capaces de albergar o impedir la pérdida de agua, regulando en algún punto la expresión de los TNAs.

Finalmente, la mutación encontrada en la secuencia promotora de *GONST4* (G/A; 265) condujo a la aparición de un segundo motivo regulatorio de respuesta a heat shock, motivo que se encuentra asociado a elementos de respuesta a estrés. Esta clase de motivo no fue encontrado en el promotor de *GONST3*, pero si en el promotor de *GONST4*. Debido a que la respuesta heat shock es universal, se sugiere que la presencia de HSE (heat shock promoter element) podría ser reconocido por algún HSF (heat shock factor) en momentos en que las plantas se encuentren sometidas a estrés, variando la expresión de *GONST4* en algunos de los órganos de *Arabidopsis* (Haralampidis y col, 2002).

6. Conclusiones

- Se obtuvo la construcción G4Pr::GUS mediante tecnología Gateway, compuesto por el promotor de GONST4 fusionado al gen de la proteína GUS. La construcción G3Pr::GUS fue verificada mediante PCR.
- Se obtuvieron 5 líneas transgénicas de *Arabidopsis* transformadas con G3Pr::GUS y 10 líneas G4Pr::GUS capaces de expresar la proteína β -glucuronidasa. También fue posible obtener líneas de la segunda generación transformante las que fueron utilizadas en el ensayo GUS.
- Análisis del patrón de expresión de GONST3 y GONST4, mediante ensayo GUS, mostraron expresión esencialmente ubicua a lo largo de todo el desarrollo de la planta.
- Los mayores niveles de expresión se registraron en hojas caulinares, raíces y tallos, mientras que los menores niveles se observaron en hojas senescentes, semillas y pétalos de ambas líneas.
- Las principales diferencias en la expresión entre GONST3 y GONST4 se registraron en cotiledones y estigma, donde líneas de GONST4 no mostraron tinción en estos tejidos a diferencia de las de GONST3.
- Análisis *in silico* usando la base de datos de Affymetrix para *Arabidopsis*, mostraron resultados semejantes a los observados en el patrón de expresión de GUS, sobre todo en aquellos tejidos que presentan mayor expresión en ambos transportadores como son las hojas y raíces. Principales diferencias se registraron en semillas donde la expresión de GONST3 es alta y en pétalos donde ambos TNAs se expresan en menor relación al total de los tejidos analizados, resultados diferentes a los observados mediante GUS.

- La identificación de secuencias nucleotídicas que regulan elementos de ADN que actúan en *cis* en los promotores de GONST3 y GONST4, reveló la existencia de una variedad de posibles motivos relacionados directa o indirectamente con la síntesis de la pared celular, entre los que se encuentran elementos regulatorios de respuesta a luz, ciclo circadiano, elicitores, endosperma, meristema, entre otros.

7. Proyecciones

- Para un análisis más detallado del patrón de expresión de GONST3 y GONST4, se proponen realizar análisis cuantitativos de la expresión de ambos TNAs mediante el uso de MUG, sustrato fluorescente que puede ser cuantificado mediante absorbancia.
- Se pretende cuantificar la expresión de las líneas G3Pr::GUS y G4Pr::GUS bajo condiciones de estrés, como sequía, variaciones de exposición a la luz o suplementado con hormonas como ABA, las que permitirán dilucidar las variaciones de expresión en los distintos órganos de la planta frente a condiciones de estrés.
- Sería interesante analizar diferencias en la expresión de GONST3 y 4 en distintas líneas mutantes reportadas en la literatura como son *mur1* y *mur2*. Se ha observado que *mur1* (Reiter y col, 1997) con un fenotipo enano, carece de residuos de *L*-fucosa en xiloglucano, RGII (O'Neill y col, 2004), N-glicanos (Rayon y col, 1999) y en un tercio de estas moléculas es posible encontrar sustituciones de *L*-fucosa por *L*-galactosa. La mutante *mur2* (Vanzin y col, 2002) por su parte sólo posee una reducción de residuos de *L*-fucosa en xiloglucano en un 98%.

Todos los estudios planteados permitirán dirigir el análisis de la pared celular en plantas silvestres y en líneas con menores niveles de expresión de *GONST3* y *GONST4*, hacia aquellos órganos que reportaron las mayores diferencias en la expresión de estos TNAs, esperando encontrar desigualdades en la composición de los polisacáridos *L*-galactosilados y/o *L*-fucosilados. Por ejemplo, en líneas con menores niveles de expresión de *GONST3*, es muy probable que los cotiledones de estas plantas mostraran carencias en la *L*-fucosilación de los glicoconjugados ya que en plantas silvestres, solamente *GONST3* (y no *GONST4*) se expresa en este órgano.

8. Congresos

- Miranda J., **Ampuero D.**, Huichalaf M., Handford M. (2009). *Functional and Physiological Characterization of GONST3 and 4, Nucleotide-Sugar Transporters of Arabidopsis thaliana*. 9th International Plant Molecular Biology (IPMB) Congress, Renaissance St. Louis Grand Hotel and Suites, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos, 25 al 31 de octubre. (Poster Session)
- **Ampuero D.**, Aguayo F., Handford M. (2009). *Metabolismo de carbohidratos en Plantas*. 60° Congreso Agronómico de Chile, Hotel Casino de Talca, Talca, Chile, 27 al 30 de Octubre. (Poster session)
- Huichalaf M., Miranda J., **Ampuero D.**, Handford M. (2009). *Functional analysis of GONST3 and 4, nucleotide-sugar transporters of Arabidopsis thaliana*. Cuarta Reunión de Biología Vegetal, Centro de convenciones Hotel de la Bahía, La Serena, Chile, 14 al 16 de Octubre. (Poster Session)
- Miranda J., **Ampuero D.**, Huichalaf M., Handford M. (2009). *GONST4, el primer transportador de nucleótido-azúcar de Arabidopsis thaliana capaz de importar GDP-L-fucosa y GDP-L-galactosa*. XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, Hotel Termas de Chillán, Chillán, Chile, 22 al 25 de septiembre. (Oral presentation).
- **Ampuero D.**, Miranda J., Huichalaf M., Handford M. (2009). *Estudio funcional de GONST3, un transportador de nucleótido-azúcar de Arabidopsis thaliana*. XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, Hotel Termas de Chillán, Chile, 22 al 25 de septiembre. (Poster Session)
- Handford M., Miranda J., **Ampuero D.**, Huichalaf M., Febres S. (2009). *Functional analysis of GONST3 and 4, nucleotide-sugar transporters of Arabidopsis thaliana*. 20th International Conference on Arabidopsis Research, Edinburgo, Escocia, Reino Unido, 30 de junio al 4 de julio. (Poster Session)
- Miranda J., **Ampuero D.**, Huichalaf M., Febres S. and Handford M. (2009). *Biochemical and functional analysis of GONST3 and 4, nucleotide-sugar transporters of Arabidopsis thaliana*. XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad Brasileira de Bioquímica y Biología Molecular (SBBq), Hotel Monte Real Resort, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 16 al 19 de mayo. (Oral presentation and Poster Session)
- Febres S., Miranda J., Rámila C., **Ampuero D.**, Handford M. (2008). *Biochemical and functional analysis of GONST3 and 4, nucleotide-sugar transporters of Arabidopsis thaliana*. Tercera Reunión de Biología Vegetal, Centro de Conferencias "Paso Pehuenche", Universidad de Talca. San Clemente, Talca, Chile, 24 al 25 de Octubre. (Poster Session)

9. Referencias

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K.** 1997. Role of Arabidopsis MYC and MYB Homologs in Drought and Abscisic Acid-Regulated Gene Expression. *Plant Cell*. **9**:1859-1868.
- Baldwin T, Handford M, Yuseff M, Orellana A, Dupree P.** 2001. Identification and Characterization of GONST1, a Golgi-Localized GDP-Mannose Transporter in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **13**:2283-2295.
- Beaujean A, Sangwan R, Hodges M, Sangwan-Norreel B.** 1998. Effect of ploidy and homozygosity on transgene expression in primary tobacco transformants and their androgenetic progenies. *Mol Gen Genet*. **260**:362-371.
- Benfey P, Schiefelbein J.** 1994. Getting to the root of plant development: the genetics of *Arabidopsis* root formation. *Trends Gen*. **10**:84-88.
- Berninsone P, Hirschberg C.** 2000. Nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus. *Curr opi struct bio*. **10**:542-547.
- Berninsone P, Hwang HY, Zemtseva I, Horvitz HR, Hirschberg CB.** 2001. SQV-7, a protein involved in *Caenorhabditis elegans* epithelial invagination and early embryogenesis, transports UDP-glucuronic acid, UDP-N-acetylgalactosamine, and UDP-galactose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **27**:3738-43.
- Bonin C, Freshour G, Hahn M, Vanzin G, Reiter W.** 2003. The *GMD1* and *GMD2* genes of *Arabidopsis* encode isoforms of GDP-D-mannose 4,6-dehydratase with cell type-specific expression patterns. *Plant Physiol*. **2**:883-92.
- Bowles D, Isayenkova J, Lim E, Poppenberger B.** 2005. Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr Opi Plant Biol*. **8**:254-263.
- Caffaro C, Hirschberg C, Berninsone P.** 2006. Independent and simultaneous translocation of two substrates by a nucleotide sugar transporter. *PNAS* **103**:16176-16681.
- Carpita N.** 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**:445-76.
- Carpita N, McCann M.** 2000. The cell wall. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. capítulo 2. Editado por Buchanan B. p 52-108. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.

Chaubet N, Flénet M, Clément B, Brignon P, Gigot C. 1996. Identification of cis-elements regulating the expression of an *Arabidopsis* histone H4 gene. *Plant J.* **10**:425-35.

Clough S, Bent A. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal.* **16**:735-743.

Cottrell T, Griffith C, Liu H, Nenninger A, Doering T. 2007. The Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans* Expresses Two Functional GDP-Mannose Transporters with Distinct Expression Patterns and Roles in Capsule Synthesis. *Eukaryotic Cell.* **6**: 776-785.

Dean N, Zhang Y, Poster J. 1997. The VRG4 gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the Golgi in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **12**:31908-14.

Dhugga K. 2001. Building the wall: genes and enzyme complexes for polysaccharide synthases. *Curr Opi Plant Biol.* **4**:488-93.

Domínguez A, Fagoaga C, Navarro L, Moreno P, Peña L. 2002. Regeneration of transgenic citrus plants under non selective conditions results in high-frequency recovery of plants with silenced transgenes. *Mol Genet Genom* **267**:544-556.

Dunn M, White A, Vural S, Hughes M. 1998. Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (*btf4.9*) from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol Biol.* **38**:551-564.

Freshour C, Clay R, Fuller M, Albersheim P, Darvill A, Hahn M. 1996. Developmental and Tissue-Specific Structural Alterations of the Cell-Wall Polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* Roots. *Plant Physiol.* **110**:1413-1429.

Freshour G, Bonin C, Reiter W, Albersheim P, Darvill A, Hahn M. 2003. Distribution of Fucose-Containing Xyloglucans in Cell Walls of the *mur1* Mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physio.* **131**:1602-1612.

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

Gibeaut D, Carpita N. 1994. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *FASEB Jour.* **8**:904-915.

Gibeaut D, Hulett J, Cramer G, Seemann J. 1997. Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiol.* **115**: 317–319.

Goto S, Taniguchi M, Muraoka M, Toyoda H, Sao Y, Kawakita M, Hayashi S. 2001. UDP-sugar transporter implicated in glycosylation and processing of Notch. *Nat Cell Biol.* **3**:816-22.

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

Handford M. 2006. Biosynthesis of Plant Cell Walls. *Cien Inv Agr* **33**:179-196.

Haralampidis K, Milioni D, Rigas S, Hatzopoulos P. 2002. Combinatorial Interaction of Cis Elements Specifies the Expression of the *Arabidopsis AtHsp90-1* Gene. *Plant Physio.* **129**:1138-1149

Henrissat B, Cautinho P, Davies G. 2001. A census of carbohydrate active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* **47**:55-57.

Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleid Acid Research.* **27**:297-300.

Hudson M, Quail P. 2003. Identification of Promoter Motifs Involved in the Network of Phytochrome A-Regulated Gene Expression by Combined Analysis of Genomic Sequence and Microarray Data. *Plant Physio.* **133**:1605-1616.

Hong K, Ma D, Beverley S, Turco S. 1999. The Leishmania GDP-mannose transporter is an autonomous, multi-specific, hexameric complex of LPG2 subunits. *Biochemistry.* **29**: 2013-22.

Jamet E, Canut H, Boudart G, Pont-Lezica R. 2006. Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *TRENDS in Plant Science.* **11**: 33-39.

Jamet E, Albenne C, Boudart G, Irshad M, Canut H, Pont-Lezica R. 2008. Recent advances in plant cell wall proteomics. *Proteomics* **8**:893–908.

Jefferson R, Burgess S, Hirsh D. 1986. Beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**:8447-8451.

Jefferson R, Kavanagh T, Bevan M. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**:3901-3907.

Kang T, Yang M. 2004. Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic plants. *BMC Biotech* **4**:20-32.

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

Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y, Reichheld J. 2004. The *Arabidopsis* Cytosolic Thioredoxin *h5* Gene Induction by Oxidative Stress and Its W-Box-Mediated Response to Pathogen Elicitor. *Plant Physio.* **134**:1006-1016.

Lawand S., Dorne A., Long D., Coupland G., Mache R. and Carol P. 2002. *Arabidopsis* A BOUT DE SOUFFLE, Which Is Homologous with Mammalian Carnitine Acyl Carrier, Is Required for Postembryonic Growth in the Light. *The Plant Cell.* **14**:2161-217.

Lerouxel O, Cavalier D, Liepman A, Keegstra K. 2006. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. *Curr Op Plant Biol.* **9**:621-630.

McNeil M, Darvill A, Fry S, Ibersheim P. 1984. Structure and Function of the Primary cell walls of Plants. *Ann. Rev. Biochem.* **53**:625-63.

Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Phys Plant* **15**:473-497.

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.* **20**:87-93.

Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jimbo T, Kimura T. 2007. Development of Series of Gateway Binary Vectors, pGWBs, for Realizing Efficient Construction of Fusion Genes for Plant Transformation. *J Bios and Bioeng* **104**:34-41.

Nishikawa A, Mendez B, Jigami Y, Dean N. 2002-A. Identification of a *Candida glabrata* homologue of the *S. cerevisiae* VRG4 gene, encoding the Golgi GDP-mannose transporter. *Yeast.* **19**: 691-698.

Nishikawa A, Poster J, Jigami Y, Dean N. 2002-B. Molecular and Phenotypic Analysis of CaVRG4, Encoding an Essential Golgi Apparatus GDP-Mannose Transporter. *J. Bacteriol.* **184**: 29-42.

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

Norambuena L, Nilo R, Handford M, Reyes F, Marchant L, Meisel L, Orellana A. 2005. AtUTr2 is an *Arabidopsis thaliana* nucleotide sugar transporter located in the Golgi apparatus capable of transporting UDP-galactose. *Planta* **222**:521-529.

Obel N, Erben V, Schwarz T, Kühnel S, Fodor A, Pauly M. 2009. Microanalysis of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Mol Plant.* **2**:922-932.

O'Neill M., Ishii T., Albersheim P., and Darvill A.G. 2004. Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **55**:109-139.

Perrin R, DeRocher A, Bar-Peled M, Zeng W, Norambuena L, Orellana A, Raikhel N, Keegstra K. 1999. Xyloglucan Fucosyltransferase, an Enzyme Involved in Plant Cell Wall Biosynthesis. *Science* **284**:1976-1979.

Perrin R, Jia Z, Wagner T, O'Neill M, Sarria R, York W, Raikhel N, Keegstra K. 2003. Analysis of Xyloglucan Fucosylation in *Arabidopsis*1. *Plant Physio*, **132**:768-778.

Piechulla B, Merforth N, Rudolph B. 1998. Identification of tomato *Lhc* promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Mol Biol.* **38**:655-662.

Poster J, Dean N. 1996. The yeast VRG4 gene is required for normal Golgi functions and defines a new family of related genes. *J Biol Chem.* **16**:3837-45.

Rayon C, Cabanes-Machetau M, Loutelier-Bourhis C, Salliot-Marie I, Lemoine J, reiter W, Lerouge P, Faye L. 1999. Characterization of *N*-glycans from *Arabidopsis*. Application to fucose-deficient mutant. *Plant Phy.* **119**:725-733.

Reiter W, Chapple C, Somerville C. 1997. Mutant of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. *Plant Jou.* **12**:335-345.

Reiter W. 2002. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* **5**:536-542.

Reyes F, Marchant L, Norambuena L, Nilo R, Silva H, Orellana A. 2006. AtUTr1, a UDP-glucose/UDP-galactose Transporter from *Arabidopsis thaliana*, Is Located in the

Endoplasmic Reticulum and Up-regulated by the Unfolded Protein Response. *J. Biol Chem.* **281**: 9145–9151.

Reyes F, Orellana A. 2008. Golgi transporters: opening the gate to cell wall polysaccharide biosynthesis. *Curr. Op. Plant Biol.* **11**:244-251.

Ringlia C, Keller B, Ryserb U. 2001. Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **58**:1430–1441.

Rollwitz I, Santaella M, Hille D, Flügge U, Fischer K. 2006. Characterization of AtNST-KT1, a novel UDP-galactose transporter from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS.* **580**:4246-4251.

Rombauts S, Déhais P, Montagu M, Rouzé P. 1999. PlantCARE, a plant *cis*-acting regulatory element database. *Nucleic Acid Research.* **27**:295-296.

Sarria, Wagner T, O'Neill M, Faik A, Wilkerson C, Keegstra K, Raikhel N. 2001. Characterization of a Family of *Arabidopsis* Genes Related to Xyloglucan Fucosyltransferase1. *Plant Physio.* **127**:1595-1606.

Schaewen A, Frank J, Koiwa H. 2008. Role of complex *N*-glycans in plant stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior.* **3**:871-873.

Schmulling T, Schell J. 1993. Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras. *Plant Mol. Biol.* **21**:705-708.

Schultz C, Ferguson K, Lahnstein J, Bacic A. 2004. Post-translational Modifications of Arabinogalactan-peptides of *Arabidopsis thaliana*. *Jou Biol Chem.* **279**:45503–45511.

Showalter A. 1993. Structure and Function of Plant Cell Wall Proteins. *Plant Cell.* **5**:9-23.

Sticklen M. 2008. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nat Rev Gen.* **9**:433-443.

Thijs G, Marchal K, Lescot M, Rombauts S, De Moor B, Rouzé P, Moreau Y. 2002. A Gibbs sampling method to detect overrepresented motifs in the upstream regions of coexpressed genes. *J Comput Biol.* **9**:447-64.

Vanzin G, Madson M, Carpita N, Raikhel N, Keegstra K, Reiter W. 2002. The *mur2* mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**:3340-3345.

Villain P, Mache R, Zhou D. 1996. The Mechanism of GT Element-mediated Cell Type-specific Transcriptional Control. *JBC*. **271**:32593–32598.

Wagh P, Bahl O. 1981. Sugar residues on proteins. *Crit Rev Biochem*. **10**:307–377.

Waller J, Dhanoa P, Schumann U, Mullen R, Snedden W. 2009. Subcellular and tissue localization of NAD kinases from *Arabidopsis*: compartmentalization of de novo NADP biosynthesis. *Planta*. **2**:305-317.

Washida H, Wu C, Suzuki A, Yamanouchi U, Akihama T, Harada K, Takaiwa F. 1999. Identification of *cis*-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene *GluB-1*. *Plant Mol Biol*. **40**:1-12.

Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ. 2007. An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE*. **8**:718.

Zeng W, Keegstra K. 2008. AtCSLD2 is an integral Golgi membrane protein with its N-terminus facing the cytosol. *Planta*. **5**:823–838.

Páginas web (fecha última revisión; 13 de marzo de 2010):

- **Figura 12:** www.biologie.uni-ulm.de/bio2/anita/Archaea.htm
- **Figura 12:** <http://biology.ucsd.edu/classes/bicd123.SP07/>