

UCH-FC
Biotecnología
V494
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA INSERCIONAL DE
Arabidopsis thaliana EN EL GEN QUE CODIFICA PARA AtUTr2,
UN TRANSPORTADOR DE NUCLEÓTIDOS-AZÚCAR”**

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

por

Alexander Vergara Robles



Director de Seminario de Título: Dr. Ariel Orellana López

Diciembre, 2008
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

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.:

ALEXANDER VERGARA ROBLES

**“CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA INSERCIONAL DE
Arabidopsis thaliana EN EL GEN QUE CODIFICA PARA AtUTr2,
UN TRANSPORTADOR DE NUCLEÓTIDOS-AZÚCAR ”**

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

Dr. Ariel Orellana López
Director Seminario de Título

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'A. Orellana', written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación

Dr. Michael Handford
Presidente Comisión

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Michael Handford', written over a horizontal line.

Dr. Ricardo Cabrera
Corrector

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ricardo Cabrera', written over a horizontal line.



Santiago de Chile, Diciembre de 2008



Glaciar Grey-Torres del Paine, verano 2005.



Alexander Vergara Robles nació en la madrugada del 6 de abril de 1979 en Santiago de Chile. Hijo de Carlos Vergara Bozo, profesor de mecánica y de Jeny Robles Muñoz, enfermera universitaria. Toda su infancia vivió en un humilde barrio del sector norte de Santiago, en la actual comuna de Huechuraba, donde disfrutó del cariño de sus cuatro abuelos, pues ambas familias vivían en la misma cuadra. Nunca jugó fútbol cuando niño, pues era muy tímido, pero se divertía jugando con robots y figuras de juguete con mucha imaginación. Estudió la mayor parte de su enseñanza básica en el Liceo Leonardo Murialdo, donde se destacó por sus habilidades para escribir cuentos fantásticos e historietas siendo muy pequeño. Luego, estudió en el Liceo Juan Bosco-Salesianos Alameda, donde desarrolló su enseñanza media y se enamoró de la Biología, destacándose por su gran espíritu científico. En 1997 entró a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, fértil formadora de científicos chilenos con un gran nivel de excelencia académica, formando parte de la tercera generación de estudiantes que decidieron optar por esta carrera “nueva”.

Alexander ha decidido defender su memoria de título, pese a considerarlo por años un trabajo inconcluso. Hoy, nuevos desafíos le prepara el futuro y espera siempre tener la suerte de estar cerca de la investigación científica.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres y a ti Vany, por todo el apoyo y la compañía que me han dado.



Well C3PO, I'm free.....

and I'm going awayin a starship.

I'm sorry I wasn't able to finish you, C3PO.....

give you coverings and all.

I'm going to miss working on you.

Anakin Skywalker.

AGRADECIMIENTOS



Quiero agradecer a Ariel Orellana, mi tutor, por toda la libertad que me ha permitido en mi trabajo, por sus consejos y apoyo entregado. También quiero dar gracias a mi familia y especialmente a mis padres, por todo el apoyo que me han dado en mi educación. Además a Maribel Donoso por la compañía y acicate en la realización y finalización de este trabajo. A todos los miembros del *Centro de Biotecnología Vegetal* de la Universidad Andrés Bello y a los antiguos miembros del *Laboratorio de Genética Molecular Vegetal* de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, en especial a Lorena Marchant, Lorena Norambuena y a Viviana Ordenes por su siempre abierta disposición a entregar ayuda, comentarios y guía. Quiero agradecer al Dr. Markus Pauly del *Instituto Max Planck for Molecular Plant Physiology* y a los miembros de su grupo, por su buena disposición y ayuda con los experimentos de análisis de azúcares de pared celular. Agradezco a Bjorn Usadel y Dirk Steinhauser de la *CSB database*, por entregar sus datos de correlación de expresión y por sus comentarios. Por último, no puedo dejar de agradecer a todos los miembros del club social y deportivo OPA, con quienes pude siempre compartir ideas y conversaciones de ciencia durante el desarrollo de este trabajo.

FINANCIAMIENTO

FONDECYT.

Nº Proyecto: 1030551

ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE DETERMINAN EL TAMAÑO Y COMPLEJIDAD ESTRUCTURAL DE XILOGLUCANO.

FONDECYT-INCENTIVO A LA COOPERACION INTERNACIONAL.

Nº Proyecto: 7030053

ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE DETERMINAN EL TAMAÑO Y COMPLEJIDAD ESTRUCTURAL DEL XILOGLUCANO.

Investigador extranjero de contraparte: Dr. Markus Pauly, *Max Planck Institute for Molecular Plant Physiology.*



ÍNDICE



	Página
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
FINANCIAMIENTO.....	iv
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
1. El problema de estudio.....	3
2. Hipótesis.....	11
3. Objetivo general.....	11
4. Objetivos específicos.....	11
MATERIALES.....	12
1. Material Biológico.....	12
2. Partidores.....	13
3. Anticuerpos.....	14
4. Reactivos.....	14
MÉTODOS.....	16



1. Técnicas de Biología Molecular.....	16
1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	16
1.2 Preparación de DNA genómico.....	16
1.3 Identificación de plantas homocigotas.....	17
1.4 Experimentos de <i>Southern blot</i>	17
1.5 Obtención de sondas radioactivas	19
1.6 Análisis de expresión mediante <i>Northern blot</i>	20
2. Inmunofluorescencia en tejido completo.....	21
2.1 Incubación con anticuerpos.....	21
2.2 Microscopía de epifluorescencia.....	21
3. Análisis de azúcares de pared celular.....	21
3.1 Obtención de material de pared celular.....	21
3.2 Análisis de azúcares totales utilizando GC-MS.....	22
3.3 Análisis de xiloglucano utilizando espectrometría de masa.....	22
4. Análisis bioinformáticos.	23
4.1 Análisis de la región promotora.....	23
4.2 Análisis de redes de correlación de expresión.....	23
RESULTADOS.....	25
1. Análisis de expresión de <i>AtUTr2</i> en plantas silvestres.....	25
2. Verificación por PCR de la inserción de T-DNA.....	31
3. Análisis de expresión de <i>AtUTr2</i> en la línea insercional.....	34
4. Análisis fenotípicos.....	38
5. Análisis de pared celular.....	42

5.1 Análisis mediante inmunofluorescencia en raíces completas.....	42
5.2 Análisis de azúcares totales en muestras de pared celular.....	44
5.3 Análisis de xiloglucano.....	45
6. Análisis Bioinformáticos.....	50
6.1 Análisis de la región promotora.....	50
6.2 Análisis de redes de correlación de expresión.....	54
DISCUSIÓN.....	59
CONCLUSIONES.....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	71



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores para la verificación de la inserción.....	13
Tabla 2. Partidores utilizados para sintetizar sonda radioactiva.....	13
Tabla 3. Lista de genes involucrados en la biosíntesis de la pared celular.....	57
Tabla suplementaria 1. Datos normalizados de expresión de la familia AtUTr.....	70





ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo propuesto para la biosíntesis de hemicelulosas y pectinas en el aparato de Golgi de células vegetales.....	7
Figura 2. <i>AtUTr2</i> se expresa preferentemente en hojas senescentes y en la epidermis radicular.....	28
Figura 3. <i>AtUTr2</i> aumenta su expresión ante condiciones de estrés.....	29
Figura 4. Perfiles de expresión normalizados de los genes de la familia <i>AtUTr</i>	30
Figura 5. Verificación por PCR de la inserción de T-DNA en plantas homocigotas.....	33
Figura 6. Caracterización de una sonda radioactiva contra <i>AtUTr2</i> mediante <i>Southern blot</i>	35
Figura 7. Análisis de la expresión del gen que codifica para <i>AtUTr2</i> mediante <i>Northern blot</i>	37
Figura 8. Análisis del largo del hipocotilo de plantas crecidas 7 días ante distintas condiciones.....	40
Figura 9. Distribución de frecuencia del número de raíces laterales en plantas etioladas crecidas en cultivo de tejidos.....	41
Figura 10. Distribución de frecuencia del número de raíces laterales en plantas crecidas en cultivo de tejidos en presencia de luz.....	41
Figura 11. Inmunofluorescencias de raíces incubadas con los anticuerpos monoclonales LM5 y LM6.	43
Figura 12. Análisis de azúcares totales mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masa GC-MS.....	47
Figura 13. Es posible realizar análisis de composición relativa de los oligosacáridos de xiloglucano que se obtienen después de fragmentarlo enzimáticamente con una endoglucanasa.....	48
Figura 14. Análisis de la estructura del xiloglucano mediante espectrometría de masa MALDI-TOF.....	49

Figura 15. Análisis de elementos en Cis regulatorios en la región río arriba del inicio de la traducción del gen *AtUTr2*..... 53

Figura 16. Redes de coexpresión obtenidas al utilizar datos de expresión condicional.....58



ABREVIATURAS

bp: Pares de bases nucleotídicas

cDNA: Secuencia de DNA complementaria a un RNA mensajero

CDS: Secuencia de DNA codificante

Col-0: Ecotipo de *Arabidopsis thaliana* Columbia-0

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetra-acético

GC-MS: Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa

HG: Homogalacturonano

kDa: Kilodalton

kb: Kilobases

MALDI: Sigla en inglés de “Matrix Assisted Laser Desorption Ionization”

MS : Medio basal de crecimiento Murashige and Skoog

PBS: Tampón fosfato salino

p/v: Porcentaje peso/volumen

p/p: Porcentaje peso/peso

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PM: Peso molecular

RG: Ramnogalacturonano

RNA: Ácido ribonucleico

RNAr: RNA ribosomal

Sac: Sacarosa

SDS: Sodio-dodecilsulfato

T-DNA: Elemento insercional de DNA transferido por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* al genoma nuclear de las plantas que infecta.

TE: Tampón Tris-EDTA

TAIR: Siglas del inglés de "*The Arabidopsis Information Resource* "

TNA: Transportador de nucleótidos azúcar

UPR: Siglas del inglés de "*Unfolded Protein Response* "

UV: Luz ultravioleta

Wt: Abreviación de la palabra en inglés "*Wild type* " (tipo silvestre)

XEG: Xiloglucano endo- β -(1,4)-glucanasa

5'UTR: Secuencia no traducida del extremo 5'

3'UTR: Secuencia no traducida del extremo 3'

RESUMEN

La pared celular vegetal es una compleja matriz extracelular constituida por una entrecruzada red de polisacáridos y glicoproteínas con importantes funciones celulares. Dentro de los principales polímeros de azúcar que la constituyen, además de la celulosa que es sintetizada en la membrana plasmática, destacan aquellos sintetizados en el aparato de Golgi denominados hemicelulosas y pectinas. Éstos son sintetizados por glicosiltransferasas que utilizan como sustrato nucleótidos azúcar que son metabolizados en el citoplasma, pero que poseen su sitio activo orientado hacia el lumen del Golgi. Debido a esto, se ha postulado la participación de transportadores de nucleótidos azúcar localizados en el Golgi, encargados de resolver este problema de accesibilidad de sustrato en la biosíntesis de productos glicoconjugados en la ruta secretoria.

En este trabajo presentamos la caracterización molecular y fenotípica de una línea de *Arabidopsis thaliana* que posee una inserción de T-DNA en la región 5' no traducida del transcrito de *AtUTr2*, un transportador nucleótidos azúcar localizado subcelularmente en el aparato de Golgi.

Análisis de expresión génica mediante *Northern blot* indican que en la línea insercional existen alteraciones en la expresión de *AtUTr2*, observándose un mayor tamaño molecular del transcrito y una mayor abundancia de éste. Análisis fenotípicos realizados sobre plantas crecidas en placas y en cultivo de tejidos no muestran diferencias significativas entre la línea insercional y plantas silvestres control a nivel macroscópico.

Utilizando espectrometría de masa acoplado a un cromatógrafo de gases, se realizó el análisis de azúcares totales en la pared celular de la línea insercional. Experimentos realizados sobre plantas crecidas en cultivo de tejidos indican que existen diferencias en la línea insercional. Cuando se analizó tanto en plantas crecidas en cultivo de tejidos como en placas, la composición relativa de oligosacáridos de xiloglucano, se encontró pequeños cambios en la línea insercional. Cambios que resultaron ser reproducibles y estadísticamente significativos.

Con el fin de analizar la expresión de *AtUTr2*, analizamos datos de expresión provenientes de experimentos públicos de microarreglos. Allí, se observa que los niveles de transcrito de *AtUTr2* cambian drásticamente ante distintas condiciones de crecimiento y que responden a tratamientos de estrés, resultados que son consistentes con la presencia de elementos en *Cis* de respuesta a estrés que se encuentran en la región promotora del gen *AtUTr2*.

Adicionalmente realizamos análisis de correlación de la expresión de *AtUTr2* con genes involucrados en el metabolismo de la pared celular, por medio de la construcción de redes de coexpresión. Allí, observamos tanto en raíces como en tejidos aéreos de plantas sometidas a estrés, que el perfil de expresión de *AtUTr2* posee altos niveles de correlación con genes involucrados en el metabolismo de la pared celular.

Nuestros resultados indican que la transcripción de *AtUTr2* está muy regulada y que ante escenarios metabólicos de respuesta a estrés hay una relación funcional entre *AtUTr2* y otras proteínas involucradas en el metabolismo de la pared celular.

ABSTRACT

The plant cell wall is an extracellular matrix composed of a complex network of different glycoproteins and polysaccharides that is involved in essential cell processes. These polysaccharides can be broadly classified as cellulose, hemicelluloses and pectins. While cellulose biosynthesis takes place at the plasma membrane, the biosynthesis of hemicelluloses and pectins occurs inside the Golgi lumen by the action of glycosyltransferases that incorporate sugars into acceptor carbohydrates. These enzymes have their catalytic sites facing the lumen of these organelles.

Nucleotide sugar transporters are multiple transmembrane domain proteins located in the secretory pathway that can play a critical role providing the substrates for the glycosyltransferases. By this reason, it has been postulated a possible role of the nucleotide sugar transporters in the synthesis of glycoconjugates in the Golgi apparatus.

In this work, we show the phenotypic and molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* line with a T-DNA insertional element in the 5' untranslated region of the *AtUTr2* transcript, a Golgi localized nucleotide sugar transporter.

Northern blot analysis indicates that, in the analyzed insertional line, the *AtUTr2* transcript is most abundant and bigger than in wild type plants. Phenotypic analysis in plates and in tissue culture plants do not show statistically significant changes between the insertional line and control plants.

Using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), we analyzed the total sugar composition in cell wall material. In tissue culture growth plants we can find

changes in the insertional line. In addition, we analyzed the xyloglucan oligosaccharides composition in plates and tissue culture growth plants, finding reproducible and statistically significant changes in the insertional line plants.

Using normalized public microarray data we analyzed the *AtUTr2* expression profile. Here, we can see changes in the *AtUTr2* transcript levels by different growth conditions and response to stress, results consistent with the stress response Cis elements present in the promotor region of the gene.

We analyzed the linear correlation between the *AtUTr2* expression profile with cell wall metabolism involved genes and constructed coexpression networks. We find that in roots and shoot tissues of plants grown in stress conditions the *AtUTr2* expression profile has high correlation levels with profiles of cell wall metabolism involved genes.

The results suggested that the *AtUTr2* expression levels are very controlled and that in stress conditions there is a functional relation between proteins involved in cell wall metabolism and *AtUTr2*.

INTRODUCCIÓN

La pared celular vegetal.

Todas las células vegetales poseen una matriz extracelular denominada pared celular, la cual es esencial para muchos procesos fisiológicos y de desarrollo de la planta. Esta estructura entrega resistencia mecánica en los tejidos vegetales, regulando el crecimiento, el volumen y la morfología celular. Además, está involucrada en fenómenos de comunicación entre células y constituye una barrera de protección frente al ataque de patógenos (Carpita y col., 1993).

La pared celular es una estructura compleja formada por polímeros de azúcar que junto a glicoproteínas conforman una entrecruzada red. Si bien la composición de esta matriz extracelular varía según los distintos tejidos, se ha clasificado en dos tipos: la pared celular primaria y secundaria.

La pared celular primaria se forma durante el crecimiento de todas las células vegetales. Es una estructura no especializada y está compuesta en un 90% por polisacáridos y en un 10% por proteínas. El 70% de los polisacáridos son hemicelulosas y pectinas y el 30% restante corresponde a fibras de celulosa. La pared secundaria se forma una vez que el crecimiento celular ha cesado y sólo la poseen algunos tipos celulares. Se caracteriza por poseer un mayor contenido de celulosa, menor cantidad de pectinas, hemicelulosas y por poseer lignina (Carpita y col., 1993; Somerville y col., 2004).

La hemicelulosa más abundante en la pared primaria de dicotiledóneas es el xiloglucano, el cual está formado por una cadena lineal de glucosas (1→4-β-D-glucosa) a la cual se unen de manera periódica residuos de xilosa, xilosa-galactosa o xilosa-galactosa-fucosa. Este polímero, interactúa con las fibras de celulosa y debido a que es susceptible a degradación enzimática, participa activamente en la extensión de la pared celular (Scheible y col., 2004; Vincken y col., 1997).

Las pectinas son polímeros ricos en azúcares cargados como el ácido galacturónico y en azúcares neutros como ramnosa, arabinosa y galactosa. Son los polisacáridos más solubles presentes en la matriz extracelular y forman un gel altamente hidratado, en el cual los grupos carboxilos de las pectinas vecinas están unidos por iones Ca^{+2} . Una de las pectinas más abundantes en la pared primaria es el homogalacturonano (HG), un homopolímero de (1→4)-α-D-ácido galacturónico que al tener complejas sustituciones laterales de galactosa y arabinosa es denominado ramnogalacturonano I (RGI) (Scheible y col., 2004).

1. El problema de estudio:

La biosíntesis de elementos no celulósicos de la pared celular.

A diferencia de la celulosa, que es sintetizada en la membrana plasmática, las hemicelulosas y pectinas son sintetizadas en el lumen del aparato de Golgi. Desde allí son exportadas en vesículas por la ruta exocítica hacia la membrana plasmática, con la cual se fusionan y vacían su contenido al medio extracelular (Carpita y col., 1993; Dupree y col., 1998). Las enzimas responsables de sintetizar las hemicelulosas y pectinas son glicosiltransferasas que utilizan como sustrato nucleótidos azúcar (Bonin y col., 1997; Dormann y col., 1998; Keegstra y col., 2001) y en base a su secuencia génica, se ha identificado en *Arabidopsis thaliana* alrededor de 415 posibles genes que codifican para estas enzimas (Egelund y col., 2004). Sin embargo, una completa disección funcional de todos estos genes y respectivos productos proteicos es aún necesaria, pues se desconoce en qué procesos metabólicos exactamente están involucrados la mayoría de estas proteínas. Justamente uno de los más grandes desafíos de la era post-genómica es lograr describir cada gen a nivel funcional y el trabajo que se desarrolle en *Arabidopsis thaliana*, la primera planta en tener su genoma completamente secuenciado, se espera sea iluminador de las futuras abstracciones de la biología vegetal en genómica funcional.

La primera celulosa sintasa en ser caracterizada y subsecuentemente clonada en *Arabidopsis thaliana* es la Cesa; plantas mutantes en este gen presentan alteraciones en la composición de celulosa (Arioli y col., 1998; Girke y col., 2004; Somerville y col., 2004). Las llamadas Csl o proteínas parecidas a la celulosa sintasa (del inglés; Cellulose

synthase-like), son glicosiltransferasas que se ha demostrado pueden estar asociadas a elementos de la ruta secretoria y efectivamente, ser capaces de sintetizar polisacáridos no celulósicos (Arioli y col., 1998; Dhugga y col., 2004; Liepman y col., 2007). Otros buenos ejemplos de glicosiltransferasas involucradas en el metabolismo de elementos no celulósicos de la pared celular son la xiloglucano fucosiltransferasa AtFUT1 (Perrin y col., 1999; Perrin y col., 2003), la xiloglucano xilosiltransferasa XT1 (Faik y col., 2002) y la xiloglucano galactosiltransferasa MUR3 (Madson y col., 2003), pues plantas mutantes en estas proteínas presentan alteraciones en xiloglucano. Además, también hay glicosiltransferasas que también han sido relacionadas con el metabolismo de pectinas, tales como QUASIMODO1 (QUA1) y GAUT1 (Bouton y col., 2002; Orfila y col., 2005; Somerville y col., 2004; Sterling y col., 2006).

Las enzimas responsables de la biosíntesis de los elementos no celulósicos de la pared celular, como hemicelulosas y pectinas, son ^{las} glicosiltransferasas, localizadas subcelularmente en el aparato de Golgi, proteínas de sólo un dominio transmembrana y que poseen su sitio catalítico orientado hacia el lumen de las cisternas del Golgi (Keegstra y col., 2001). Estas enzimas utilizan como sustrato nucleótidos azúcar, metabolitos que son sintetizados en el citosol (Bonin y col., 1997; Dormann y col., 1998; Keegstra y col., 2001). Sin embargo; ¿Cómo el sitio catalítico de las glicosiltransferasas tiene acceso a los nucleótidos azúcar si estos son sintetizados en el citoplasma? En fracciones de membranas de células vegetales enriquecidas en vesículas de Golgi, se ha logrado determinar actividad transportadora de UDP-glucosa, UDP-ácido glucurónico, UDP-ácido galacturónico, UDP-galactosa y GDP-fucosa (Munoz y col., 1996; Neckelmann y col., 1998; Wulff y col., 2000). Estos resultados apoyan un modelo de

biosíntesis, en el cual los sitios catalíticos de las glicosiltransferasas tienen acceso a los nucleótidos azúcar gracias a la acción de transportadores de nucleótidos azúcar (TNAs) localizados en la membrana del Golgi. Estas proteínas altamente hidrofóbicas transportan los nucleótidos azúcar desde el citosol al lumen del organelo, donde las glicosiltransferasas los utilizan como sustrato para la formación de productos glicosilados **(Figura 1)**.

En sistemas animales y levaduras, la delección de TNAs ha demostrado tener una gran importancia en el metabolismo de estos organismos, siendo en muchos casos letales las mutaciones sobre estos genes (Dean y col., 1997; Freeze, 2001; Hirschberg, 2001; Lubke y col., 2001). En *Arabidopsis*, gracias al análisis de identidad de secuencias, se ha logrado identificar varios putativos TNAs, lo que ha llevado a plantear la pregunta de cual es el rol de estas proteínas en el metabolismo de las plantas. Recientemente, se han caracterizado TNAs localizados subcelularmente en la ruta secretoria, algunos se encuentran localizados en el Golgi y otros en el retículo endoplásmico (Bakker y col., 2005; Baldwin y col., 2001; Handford y col., 2004; Norambuena y col., 2002; Norambuena y col., 2005; Reyes y col., 2006; Rollwitz y col., 2006). GONST1 es un TNA que ha sido localizado subcelularmente en el aparato de Golgi y que ha sido caracterizado como un transportador de GDP-manosa (Baldwin y col., 2001; Handford y col., 2004). Los transportadores de UDP-galactosa, UDP-GalT1 y UDP-GalT2 fueron identificados mediante su clonamiento en una línea celular de ovarios de hámster deficiente en el transporte de UDP-galactosa. La expresión heteróloga en levaduras de estos genes permitió su caracterización bioquímica e indica que estas proteínas actúan como transportadores de UDP-galactosa (Bakker y col., 2005). Otro TNA

caracterizado en *Arabidopsis* es el AtNST-KT1, un transportador de UDP-galactosa localizado en el Golgi. El primer TNA de *Arabidopsis* en ser reconstituido en liposomas para su caracterización bioquímica (Rollwitz y col., 2006). En nuestro laboratorio hemos identificado y clonado dos genes homólogos a transportadores de UDP-azúcar de células animales que han sido denominados *AtUTr1* y *AtUTr2*. Mediante experimentos de expresión heteróloga en levadura, se ha demostrado que la proteína *AtUTr1* posee actividad transportadora de UDP-galactosa y UDP-glucosa y que esta localizada subcelularmente en el retículo endoplásmico (Norambuena y col., 2002; Reyes y col., 2006). *AtUTr2* en cambio, posee únicamente actividad transportadora de UDP-galactosa. Experimentos donde se expresó *AtUTr2* en hojas de tabaco y luego se realizó ensayos de transporte, indican que esta proteína transporta UDP-galactosa y no transporta UDP-N-acetil glucosamina, UDP-xilosa, UDP-acido glucorónico, GDP-fucosa, GDP-manosa ni UDP-glucosa. Además, experimentos de localización subcelular realizados mediante expresión transiente en tabaco de una proteína quimera entre *AtUTr2* y la proteína fluorescente verde (GFP), indican que *AtUTr2* se encuentra subcelularmente localizada en el aparato de Golgi (Norambuena y col., 2005). La UDP-galactosa es sustrato de la biosíntesis de glicoproteínas como los arabinogalactanos, que han sido asociados a la regulación de la expansión celular. Además, también es sustrato de la biosíntesis de varios polímeros de azúcar no celulósicos sintetizados en Golgi. Tales como las hemicelulosas xiloglucano, los mananos ramificados con residuos de galactosa denominados galactomananos y las pectinas llamadas ramnogalacturonanos. Todos estos datos, sugieren que *AtUTr2* puede tener una participación en la biosíntesis de alguno de estos productos galactosilados que son sintetizados en el Golgi.

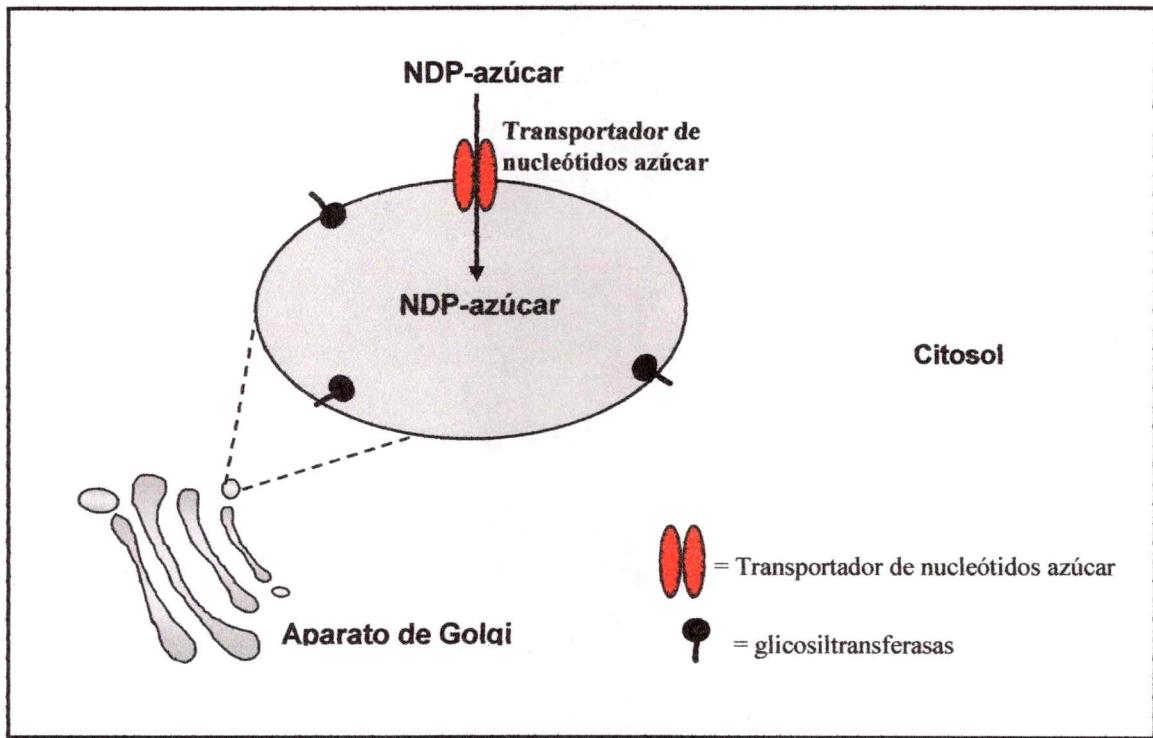


Figura 1. Modelo propuesto para la biosíntesis de hemicelulosas y pectinas en el aparato de Golgi de células vegetales. Los nucleótidos azúcar (NDP-azúcar) son sintetizados en el citoplasma y transportados hacia el lumen del aparato de Golgi mediante transportadores de nucleótidos azúcar (TNA). Allí, pueden ser utilizados por las glicosiltransferasas, que transfieren azúcares a cadenas de polisacáridos en elongación.

¿Cuál es el rol biológico de AtUTr2?:

Gracias a las evidencias experimentales y a los análisis de secuencia mencionados anteriormente, sabemos que AtUTr2 es un transportador de nucleótidos azúcar, localizado en el Golgi y que es capaz de transportar UDP-galactosa (Norambuena y col., 2005). Sin embargo, los antecedentes acumulados hasta la fecha no entregan evidencias directas sobre su papel en la biosíntesis de la pared celular. Las evidencias sugieren que la función de AtUTr2 corresponde a un transportador de nucleótidos azúcar, probablemente implicado en la biosíntesis de algún producto glicosilado con residuos de galactosa en el aparato de Golgi, pero ¿En qué proceso o procesos metabólicos AtUTr2 realmente participa? ¿Cómo podríamos analizar la posible participación de AtUTr2 en la biosíntesis de elementos no celulósicos de la pared celular?

Utilización de líneas insercionales de *Arabidopsis thaliana*.

Una estrategia experimental para analizar la función de una proteína es analizar los efectos generados al alterar la expresión del gen que la codifica. Así, plantas que sean mutantes o que sobre expresen el transcrito de *AtUTr2* podrían ayudarnos a encontrar evidencias que relacionen a esta proteína en cierto proceso o procesos metabólicos, pues uno espera que los procesos en que AtUTr2 participa sean alterados si los niveles de transcrito y subsecuentemente los de proteína de este TNA son afectados.

Arabidopsis thaliana es una planta dicotiledónea ideal para estudios genéticos, pues posee un ciclo de vida corto, es diploide y tiene su genoma completamente secuenciado (Initiative, 2000). Además, existen bancos de mutantes insercionales de estas plantas, que son generadas a gran escala por grandes consorcios de investigación y

que se encuentran disponibles para toda la comunidad científica. Las mutantes insercionales son plantas que poseen en su genoma un segmento de DNA foráneo, que dependiendo del lugar de la inserción pueden interrumpir o alterar la transcripción normal de un gen. Los elementos insercionales más utilizados son transposones y el T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* (Krysan y col., 1999). En bancos de líneas de *Arabidopsis* que generan masivamente plantas con inserciones de T-DNA en su genoma, se ha identificado el sitio del lugar donde se encuentra cada inserción, lo que permite la rápida identificación de una línea de particular interés para su posterior caracterización en el laboratorio.

Varios de los genes cuyos productos proteicos participan en la biosíntesis de polisacáridos de la pared celular se han identificado al analizar plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana*. Algunas de estas plantas presentan alteraciones en el crecimiento, en la elongación del hipocotilo, defectos de la morfología de las raíces, fragilidad del hipocotilo, o efectos morfológicos en las células de algunos tejidos (Arioli y col., 1998; Bouton y col., 2002; Reiter y col., 1997; Taylor y col., 1999). Sin embargo, muchas plantas mutantes en genes involucrados en el metabolismo de la pared celular no presentan diferencias morfológicas macroscópicas evidentes en comparación con plantas silvestres, aunque muestran alteraciones en la composición de azúcares de la pared celular (Assaad y col., 2004; Usadel y col., 2004).

En este trabajo queremos dilucidar la posible participación de AtUTr2 en el proceso de biosíntesis de polisacáridos no celulósicos de pared celular. Nuestra estrategia será estudiar los efectos generados al alterar la expresión del gen que codifica esta proteína, pues líneas de *Arabidopsis* que sean mutantes o que sobre expresen el

transcrito de *AtUTr2* serán una útil herramienta para analizar la participación de esta proteína en la biosíntesis de polisacáridos y glicoproteínas. Lo que hemos hecho es abordar el problema desde una perspectiva genómica funcional. Esperamos que una línea de *Arabidopsis* con alteraciones en los niveles de transcrito de *AtUTr2*, nos permita inferir información de la función de la proteína.

Después que el genoma de *Arabidopsis thaliana* fue completamente secuenciado el año 2000, ha existido un aumento explosivo de la información pública de las secuencias de sus genes y de datos de expresión. Hoy en día, es posible realizar análisis bioinformáticos y acceder a múltiples herramientas en bases de datos con mucha facilidad. Tenemos acceso a las secuencias de los genes, sus regiones traducidas y no traducidas predichas y a sus regiones promotoras. Además, contamos con información de los inicios de transcripción de cada gen e incluso podemos acceder a bases de datos que nos entregan datos de expresión masivos ya procesados y analizados (Steinhauser y col., 2004; Swarbreck y col., 2008). Debido a esto, en este trabajo hemos analizado la información disponible para *AtUTr2* utilizando estas herramientas.

En este trabajo, presentamos la caracterización molecular y fenotípica de una línea de *Arabidopsis thaliana* que posee una inserción de T-DNA en la región 5'UTR del transcrito de *AtUTr2* en ambas copias del gen: la línea insercional *AtUTr2.1*. Además, debido a la gran disponibilidad de datos públicos de expresión en *Arabidopsis* y de análisis de secuencia de sus genes, analizamos la región promotora del gen *AtUTr2* y su grado de coexpresión con otros genes involucrados en el metabolismo de la pared celular y con los cuales puede estar sometido a un control transcripcional común.

2. Hipótesis

El transportador de nucleótidos azúcar AtUTr2 participa en procesos de biosíntesis de elementos no celulósicos de la pared celular.

3. Objetivo General

Caracterizar una línea de *Arabidopsis thaliana* que posee un elemento insercional de T-DNA en la región río arriba del inicio de la traducción del gen que codifica para AtUTr2, un transportador de nucleótidos azúcar localizado en el aparato de Golgi.

4. Objetivos específicos

1. Determinar si en la línea insercional *AtUTr2.1* existen alteraciones en los niveles de transcrito.
2. Analizar posibles fenotipos presentes en las plantas *AtUTr2.1*.
3. Analizar en las plantas *AtUTr2.1* posibles efectos sobre la composición de la pared celular.
4. Realizar un análisis bioinformático de la región promotora y de los perfiles de expresión del *AtUTr2*.

MATERIALES

1. Material Biológico.

Plantas y condiciones de crecimiento

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres del ecotipo Columbia (Col-0). Las líneas insercionales de T-DNA caracterizadas fueron facilitadas por el Instituto Torrey Mesa de la empresa biotecnológica *Syngenta* bajo un acuerdo de transferencia de material (<http://www.tmri.org>).

Con el propósito de obtener plantas adultas para la mantención de líneas insercionales y la recolección de tejidos adultos desde plantas crecidas en tierra, las plantas fueron sembradas en una mezcla 2:1 de tierra de hoja:vermiculita y crecidas en una cámara climatizada a 23°C con un régimen de luz/oscuridad de 16/8 horas.

Para la preparación de RNA, análisis fenotípicos y preparación de muestras para técnicas microscópicas, las plantas fueron crecidas en condiciones estériles en medio basal Murashige and Skoog pH 5,8 con sacarosa 1-2% p/v dependiendo del experimento.

Para esterilizar las semillas, se trataron por 5 minutos con una solución de hipoclorito de sodio 5% v/v y luego con Etanol 70% v/v con agitación constante. Posteriormente se lavaron 5 veces con 1 ml de agua estéril. Para sincronizar la germinación, antes de transferir las semillas a la cámara de cultivo de tejido, se dejan 48 horas a 4°C en oscuridad.

2. Partidores.

Tabla 1.

Partidores para la verificación de la inserción.

Partidor	Secuencia
Partidor borde izquierdo del T-DNA	5' TAGCATCTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC 3'
Partidores que flanquean la inserción de T-DNA; directo e inverso respectivamente	5' GCCACGCTGGTAATGCAAATT 3' 5' CTTTGAGGAGAGATTCAAAGGA 3'

Tabla 2.

Partidores utilizados para sintetizar sonda radioactiva amplificando las secuencia codificante (CDS) de *AtUTr2* de 1086 bp clonada en vector GPD426-*AtUTr2*myc. La secuencia CDS de *AtUTr2* esta clonada en los sitios 5'*Bam*HI y 3'*Not*I.

Partidor	Secuencia
Extremo 5' <i>Bam</i> HI	5' TTCTAATGTGTAGAGTCAGTGACACACTT 3'
Extremo 3' <i>Not</i> I	5' AACTGGAGGATCTTAGATAGAATCAGGTT 3'

3. Anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados en esta tesis fueron facilitados por el Dr. Paul Knox, del Centre for Plant Sciences, University of Leeds, England.

Anticuerpos anti-pectinas

- LM5: Anticuerpo monoclonal que reconoce 4 residuos de galactosa en cadenas de (1→4)-β-D-galactosa de ramnogalacturonano I (Willats y col., 2001).
- LM6: Anticuerpo monoclonal que reconoce 5 arabinosas en cadenas de (1→5)-α-L-arabinanosa de ramnogalacturonano I. (Willats y col., 2001)

Anticuerpo secundario

- Anticuerpo anti-rata acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC).

4. Reactivos.

- De Amersham-Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia) se obtuvieron las columnas Sephadex G-50 y la membrana hybond-N+.
- De BioLabs (New England, USA) se obtuvieron enzimas de restricción, DNA ligasa y marcadores de peso molecular para RNA.
- De Fermentas (Vilnius, Lithuania) se obtuvieron enzimas de restricción, DNA polimerasa, el Hexalabel DNA kit y el marcador de PM de DNA de 1 kb.
- De Gibco (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) se obtuvo el sistema de purificación de productos de PCR "CONCERT", el sistema de transcripción reversa y agarosa para la preparación de geles de electroforesis.
- De Merck se obtuvieron los solventes de grado analítico y las sales.

- De Perkin Elmer Life Science (Boston, USA) se obtuvo el α -³²P-dCTP.
- De PhytoTechnology (Kansas, USA) se obtuvo el medio basal Murashige and Skoog (MS) y el agar para la preparación de placas de crecimiento de plantas.
- De Promega (Madison, WI, USA), se obtuvo el marcador de PM de DNA de 50 pb.
- De Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) se obtuvieron los reactivos químicos generales.

MÉTODOS

1. Técnicas de Biología Molecular.

1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para todas las reacciones de PCR se utilizó DNA polimerasa Taq Fermentas, su tampón correspondiente, mezcla de nucleótidos 0,2 mM, Cloruro de Magnesio 1,5 mM, y 12 pmoles de cada partidor. En las amplificaciones desde DNA genómico se realizaron reacciones de 40 ciclos, siendo las temperaturas de apareamiento diferentes para cada par de partidores: primer directo/partidor borde izquierdo T-DNA 50 °C; partidor inverso/partidor borde izquierdo T-DNA 55 °C. Las condiciones de extensión fueron 1,5 minutos a 72 °C.

1.2 Preparación de DNA genómico

Para los experimentos de PCR, en un tubo de 1,5 ml se congelaron con Nitrógeno líquido 100 mg de tejido y se molió hasta pulverizarlo. Se agregó 0,55 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 0,01 M pH 9,0, LiCl 0,4 M, EDTA 25 mM, SDS 1% v/v) y 0,55 ml de Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (25/24/1) y se agitó en vortex durante 20 segundos. Luego, se dejó en hielo por un par de minutos y se centrifugó a 12.000g por 5 minutos. Para realizar una segunda extracción, se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo con 0,55 ml de Isopropanol, mezclando cuidadosamente por inversión. Luego, se precipitó a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó por 10 minutos a 12.000g. El precipitado fue lavado con Etanol 80% y secado por 30

minutos a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en 100µl de tampón TE (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM) con RNAsa A (20 µg/ml) y se incubó a 37°C por 30 minutos.

1.3 Identificación de plantas homocigotas

La confirmación de la presencia de la inserción en la línea *AtUTr2.1* se realizó mediante PCR utilizando partidores del gen cercanos al sitio de inserción y utilizando un partidor del borde izquierdo del T-DNA (ver Figura 5). Con este partidor, (partidor c) y uno de los partidores del gen (partidor a o b, según la orientación de la inserción) es posible amplificar una banda utilizando DNA genómico de la planta sólo si la inserción está en el sitio predicho. Adicionalmente esta técnica permite identificar molecularmente si las plantas son homocigotas o heterocigotas para la inserción. Utilizando uno de los partidores del gen (a o b) y el partidor del T-DNA (c) se amplifica una banda al utilizar DNA genómico de la planta mutante, sea esta heterocigota u homocigota. Sin embargo, al utilizar ambos partidores del gen (a y b) sólo se amplificaría una banda desde el DNA genómico de plantas heterocigotas, ya que poseen una de las copias del gen en estado silvestre. En las plantas *AtUTr2.1* no se obtendría el amplificado al utilizar los partidores a y b pues la inserción de T-DNA es demasiado extensa como para ser amplificada por PCR.

1.4 Experimentos de Southern blot

El DNA genómico para la realización de este experimento se obtuvo utilizando hojas de rosetas de plantas adultas, utilizando el protocolo de extracción que permite tanto la extracción de RNA como DNA genómico (Das y col., 1990). Con este protocolo

se obtiene una abundante cantidad de DNA genómico sin degradación, óptimo para experimentos de *Southern blot*. 4 µg de DNA genómico fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI, EcoRI, HindIII, PstI y XbaI por toda la noche. Los fragmentos obtenidos fueron separados en un gel de agarosa 1%. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se incubó por 8 minutos en HCl 0,25N. Luego el gel se incubó por 30 minutos en solución denaturante (NaOH 0,4M, NaCl 0,8M), y por 45 minutos en solución neutralizante (Tris base 0,5M, NaCl 1,5M). El DNA fue transferido a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-N+, Amersham) mediante capilaridad, en una solución SSC 10X (SSC 1X: Cloruro de Sodio 0,15 M, Citrato de Sodio 0,015M, pH 7,0) por 12 horas. Luego de la transferencia el DNA se fijó a la membrana exponiéndola por 2 minutos a luz ultravioleta (Crosslinker model CL-1000, UVP). La prehibridación fue realizada a 65 °C por 3 horas en tampón de prehibridación SSC 5X, Fosfato de Sodio 0,05M pH 6,8, Denhardt's 5X (Denhardt's 1X: Polivinilpirrolidona 0,02% v/v, Albúmina de suero bovino 0,02% v/v, Ficoll 0,02% v/v), EDTA 1mM pH 8,0, DNA de espermio de salmón 10 µg/ml y SDS 1% v/v. Luego las membranas fueron hibridadas a 65 °C por 16 horas en un tampón de hibridación (igual al de prehibridación pero con SDS 0,1%) con la sonda purificada y a una concentración entre 1 - 3 millones de cpm/ml. En todos los casos las membranas fueron lavadas a 65 °C en forma consecutiva con SSC 5X, SDS 0,1% por 15 minutos, en SSC 2X, SDS 0,1% por 30 minutos y en SSC 0,1X, SDS 0,1% por 30 minutos. Las membranas fueron expuestas en una pantalla "Phosphor Screen" y analizadas en un equipo "Molecular Imager FX" (Bio-Rad, California, USA).

1.5 Obtención de sondas radioactivas

Para sintetizar las sondas radioactivas se utilizó la técnica de marcaje por PCR. En un volumen de reacción de 20 μ l se utilizaron 100 pg de vector como templado y los partidores respectivos a una concentración final de 250 nM. Además la reacción contiene 3,3 μ l de una mezcla de dNTP (sin dCTP) 10 μ M, 5 μ l de α -³²P-dCTP 3,3 μ M, MgCl₂ 2,5 mM, 1 μ l de Taq polimerasa y su tampón de reacción. Se emplearon 30 ciclos de amplificación con una temperatura de apareamiento de 50°C y un tiempo de extensión de 1,5 minutos. Posteriormente la sonda amplificada fue purificada mediante una columna Sephadex G-50 (Amersham) y la radioactividad fue cuantificada en un contador de centelleo beta BECKMAN.

Para la confección de sonda radioactiva contra AtUTr2:

Templado: vector GPD426-AtUTr2myc con la secuencia CDS de *AtUTr2* en los sitios 5'*Bam*HI y 3'*Not*I (Norambuena y col., 2004). Los Partidores utilizados para amplificar la sonda se detallan en la Tabla 2.0 y amplifican el CDS completo de *AtUTr2* de 1086 bp.

Para confección de sonda contra RNA18S:

Templado: vector H8B10T7-*Bluescript SK*, que contiene el EST del RNA ribosomal 18S de *Arabidopsis thaliana*, que fue donado gentilmente por Dra. Loreto Holuigue, Pontificia Universidad Católica de Chile. Partidores utilizados: SK y KS del vector *pBluescript SK*.

1.6 Análisis de expresión mediante *Northern blot*

A partir de 10-12 gramos de tejido se obtuvo una preparación de RNA total utilizando el mismo protocolo que en la preparación de DNA genómico para *Southern blot* (Das y col., 1990). Para todos los experimentos de *Northern blot* se utilizaron 40 µg de RNA, los cuales fueron fraccionados en un gel de agarosa al 1,5% en condiciones denaturantes (Formaldehído 1,1% v/v, tampón MOPS 1X (MOPS 10X: 0,2M, Acetato de Sodio 0,05M, Na₂EDTA 0,01M)). Antes de cargar las muestras en el gel, fueron denaturadas con 3 volúmenes de buffer de denaturación (Formaldehído 8 % v/v, Formamida 65 % v/v en tampón MOPS). Luego, se incubaron a 70°C por 10 minutos y se les agregó 5 µl de una solución 1:1 (Azul de Bromofenol al 1% p/v, EDTA 1 mM, Glicerol 50% v/v: Bromuro de Etidio 0.1 mg/ml). Las membranas fueron lavadas a 65°C en forma consecutiva por 15 minutos en SSC 5X, SDS 0,1%, por 30 minutos en SSC 2X, SDS 0,1%, y por 30 minutos en SSC 0,1X, SDS 0,1%.

Las membranas fueron expuestas en una pantalla "*Phosphor Screen*" y analizadas en un equipo "*Molecular Imager FX*" (Bio-Rad, California, USA). Para retirar la marca radioactiva de las membranas éstas fueron hervidas por 10 minutos en solución SSC 0,1X, SDS 0,1%. Así, las membranas pudieron ser utilizadas con más de una sonda radioactiva.

2. Inmunofluorescencia en tejido completo.

2.1 Incubación con anticuerpos

Para la realización de las inmunofluorescencias de tejido completo, se utilizaron plantas crecidas dos semanas en medio basal Murashige and Skoog, pH 5,8, sacarosa 1% p/v. Luego, utilizando el protocolo descrito por Willats y col. 2001, el tejido fue fijado en Paraformaldehído 4% p/v en PIPES 50mM, EGTA 5mM, pH 6,9 por toda la noche a 4°C y posteriormente se lavó 3 veces con PBS. Se incubó con el anticuerpo primario diluido 10 veces toda la noche a 4°C en leche/PBS 3%. Luego, se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario diluido 100 veces por 1 hora a temperatura ambiente, se lavó con PBS y se montó la muestra en un portaobjetos.

2.2 Microscopía de epifluorescencia

Una vez montadas las muestras en portaobjetos fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX70 con una cámara digital SONY CXC-390 3CCD adosada. Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas con el filtro UN3001 (Ex488/Em535) y procesadas con el programa Photoshop 7.0.

3. Análisis de azúcares de pared celular.

3.1 Obtención de material de pared celular

Los tejidos fueron congelados con Nitrógeno líquido y molidos en mortero. Luego, el polvo resultante fue resuspendido en Etanol 80% y se homogenizó por 1 minuto con un Polytron Blender. El homogenizado se centrifugó a 6.000g por 10 minutos y el residuo insoluble se lavó con Etanol 80% y luego con Etanol 100%. Este

material fue luego agitado por 1 hora con Metanol/Cloroformo (1:1) y nuevamente centrifugado, a 6.000g por 10 minutos. El residuo insoluble obtenido se lavó dos veces con Acetona y se dejó secar a temperatura ambiente, obteniéndose luego de esto un pellet de polisacáridos insolubles en alcohol.

3.2 Análisis de azúcares totales utilizando GC-MS.

Se analizaron plantas etioladas crecidas en placas por 4 días, plantas crecidas en cultivo líquido de tejidos y hojas de roseta de plantas crecidas en tierra por 3,5 semanas. Al igual que en el punto anterior, los tejidos fueron molidos en nitrógeno líquido y resuspendidos en Etanol 70%. El material insoluble en alcohol se lavó consecutivamente dos veces con Cloroformo: Metanol 1:1 y Acetona. Utilizando entre 2-4 mg de este material, se realizó consecutivamente una hidrólisis, una reducción y una acetilación de los azúcares para obtener los derivados alditol acetatos de éstos. Los alditol acetatos volátiles fueron analizados mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masa (GC-MS). Utilizando inositol como estándar interno, se obtuvo el porcentaje mol de galactosa, arabinosa, xilosa, ramnosa, fucosa y manosa.

3.3 Análisis de xiloglucano utilizando espectrometría de masa

El xiloglucano es la hemicelulosa más abundante en la pared celular primaria de *Arabidopsis*. Este, está constituido por una cadena lineal de glucosas a la cual se unen de manera periódica y específica residuos de xilosa, xilosa-galactosa o xilosa-galactosa-fucosa. Al digerirlo con una endo- β -glucanasa, enzima que corta sólo aquellos enlaces glicosídicos donde la glucosa no está sustituida, los fragmentos resultantes pueden ser analizados mediante espectrometría de masa (Lerouxel y col., 2002) (**Figura 13**).

Los tejidos analizados fueron molidos en Nitrógeno líquido y resuspendidos en Etanol 70%. El material insoluble en alcohol fue lavado consecutivamente dos veces con Cloroformo: Metanol 1:1 y Acetona. Posteriormente el material obtenido fue digerido con 0,2 U de una xiloglucano endoglucanasa (XEG) a 37°C y los oligosacáridos liberados por la digestión fueron analizados por espectrometría de masa MALDI-TOF, determinándose la abundancia relativa de cada uno de ellos (Lerouxel y col., 2002).

4. Análisis bioinformáticos.

4.1 Análisis de la región promotora

Para este análisis, desde la base de datos TAIR (Swarbreck y col., 2008) (*Arabidopsis information Resource*, <http://www.arabidopsis.org>) seleccionamos arbitrariamente 1kb de la región río arriba del primer codón codificante del gen *AtUTr2*. En dicha región, analizamos la presencia de motivos regulatorios que hayan sido publicados en algún organismo vegetal, para lo cual utilizamos la base de datos PLACE (Higo y col., 1999) y PlantPag <http://plantpag.mpimp-golm.mpg.de/>.

4.2 Análisis de redes de correlación de expresión

Desde la *Comprehensive Systems Biology Database* del Instituto Max Planck of Molecular Plant Physiology (Steinhauser y col., 2004), se obtuvieron resultados de correlación lineal entre perfiles de expresión génica derivados del consorcio multinacional *AtGenExpress*. Este proyecto tiene por objetivo dilucidar el transcriptoma de *Arabidopsis* utilizando los chips de microarreglos de genoma completo ATH1 de *Affymetrix*TM. Las correlaciones lineales de *Spearman* obtenidas entre los distintos perfiles de expresión analizados fueron transformadas en una métrica de distancia ($d=1-$

correlación). Básicamente las correlaciones de *Spearman* permiten obtener una medición del grado de asociación entre dos variables (perfiles de expresión) y sus valores toman valores entre 0 y 1 en el caso de tratarse de correlaciones positivas. Un valor de correlación de 0 indica que no hay correlación. Un valor de 1 indica que la correlación es máxima. En este trabajo, utilizamos las correlaciones positivas. Los datos fueron representados como redes sin dirección. En cada red se representa aquellos valores de correlación con un P value $< 10^{-2}$. Los resultados fueron graficados utilizando el programa *Pajek*.

RESULTADOS

1. Análisis de expresión de *AtUTr2* en plantas silvestres.

AtUTr2 es una proteína que pertenece a una familia de transportadores de nucleótidos azúcar de *Arabidopsis thaliana*, homólogos a transportadores de UDP-azúcar presentes en humanos (Norambuena y col., 2002). Con el objetivo de analizar los perfiles de expresión de *AtUTr2*, analizamos datos de expresión provenientes de experimentos de microarreglos. Los datos analizados en este trabajo provienen del proyecto multinacional de transcriptómica de *Arabidopsis AtGenExpress* y han sido normalizados con el objeto de comparar los distintos perfiles de expresión entre sí y facilitar su análisis. Se trata de experimentos realizados con los chips ATH1 *Affymetrix*TM, los que fueron diseñados para detectar el comportamiento del transcriptoma completo de *Arabidopsis*. Cuando se analiza este tipo de datos, es posible utilizar distintos métodos de análisis y visualización. Muchas veces una buena visualización genera mayor entendimiento que muchos datos crudos. Cuando analizamos los niveles de expresión de *AtUTr2* a través de distintos estados de desarrollo de la planta completa, raíces y hojas utilizando la plataforma de microarreglos ATH1 *Affymetrix*TM, se observa que los niveles de transcrito de *AtUTr2* son mucho más altos en hojas senescentes que en el resto de los estadios de hojas disponibles. *AtUTr2* se expresa de manera basal prácticamente en todos los tejidos y estadios analizados. Sin embargo, en hojas senescentes la expresión de *AtUTr2* aumenta abruptamente (**Figura 2**). Hoy, en *Arabidopsis* y gracias a los grandes proyectos de investigación en transcriptómica, la

revolución de los datos públicos de microarreglos es tal que es posible acceder a los niveles de expresión de un gen determinado a través de 15 diferentes zonas de la raíz que corresponden a distintos tipos celulares en tres distintos estadios progresivos del desarrollo (Birbaum y col., 2003). Sabemos que *AtUTr2* se expresa en raíces (Norambuena y col., 2005). Sin embargo, inicialmente desconocíamos si *AtUTr2* se expresa diferencialmente o constitutivamente en las distintas capas celulares de la raíz y cómo se comporta su expresión a lo largo del desarrollo de esta estructura. Al analizar la expresión de *AtUTr2* en raíces más profundamente, observamos que *AtUTr2* se expresa de manera bastante similar a lo largo del desarrollo de la raíz en las distintas capas celulares. Además, podemos ver que mayoritariamente se expresa en la epidermis de la raíz. **(Figura 2-B).**

Dentro de los datos de expresión generados por el consorcio multinacional *AtGenExpress*, existen experimentos donde las plantas han sido sometidas a distintas condiciones de estrés y crecimiento. Allí, podemos observar que los niveles de transcrito de *AtUTr2* cambian drásticamente ante ciertas condiciones de crecimiento en particular **(figura 3-A)**. Interesantemente observamos importantes aumentos en el nivel de expresión de *AtUTr2* cuando los datos provienen desde plantas que han sido tratadas con cicloheximida, un conocido inhibidor de la síntesis proteica **(figura 3-B)**. Además, se observan altos niveles de expresión y cambios temporales en la respuesta, cuando las plantas son tratadas con baja temperatura y luz ultravioleta **(figura 3-A y figura 4)**. Estos resultados, son consistentes con la presencia de posibles elementos en Cis de respuesta a estrés que se encuentran en la región promotora del gen que codifica para *AtUTr2* y evidencian que los niveles de transcritos de esta proteína, así como los de los

otros miembros de su familia génica, se encuentran bajo un fino control transcripcional. Por ejemplo, en raíces, la expresión de *AtUTr2* aumenta en tratamientos de estrés por frío y decrece ante tratamientos de alta temperatura, algo completamente opuesto a lo que ocurre con los niveles de expresión de *AtUTr1* y *AtUTr3*, dos genes muy correlacionados en su perfiles de expresión y que en raíces aumentan su expresión cuando las plantas son tratadas a alta temperatura. Estos genes además disminuyen su expresión ante condiciones de crecimiento de estrés por frío (**Figura 4**).

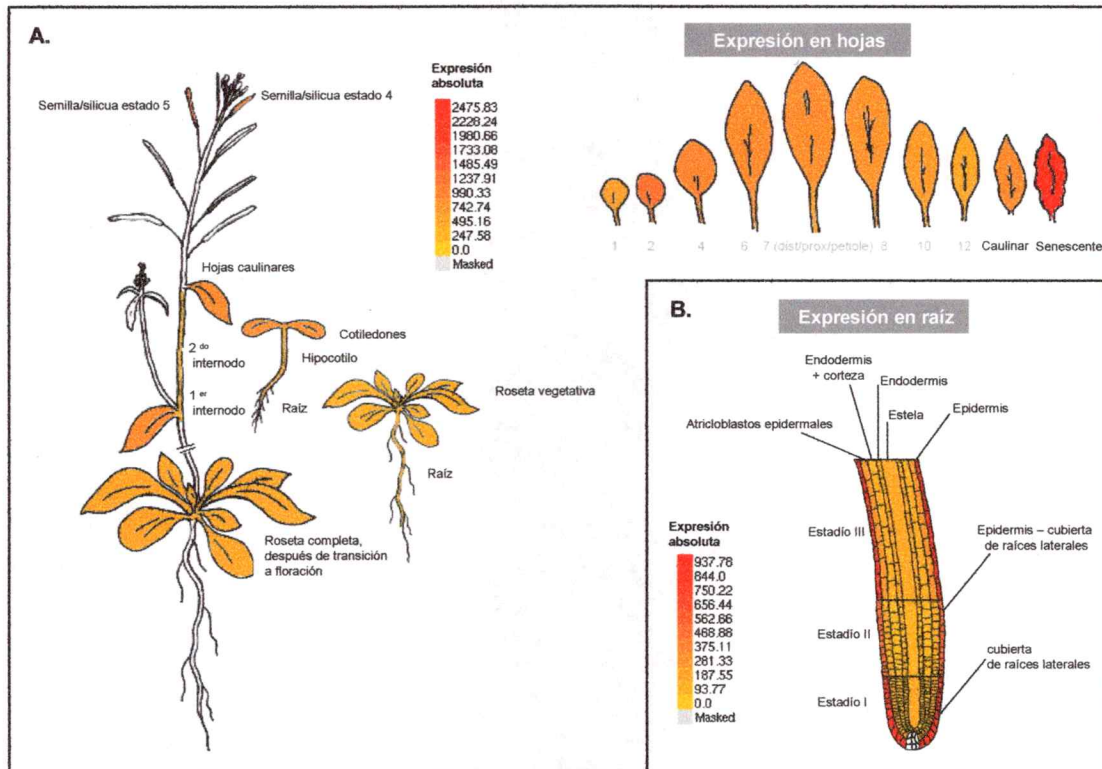


Figura 2. *AtUTr2* se expresa preferentemente en hojas senescentes y en la epidermis radicular. Hoy en *Arabidopsis thaliana* hay muchos datos públicos de expresión disponibles en bases de datos con distintas formas de visualización y análisis. La visualización utilizada con los datos, el eFP Browser, fue implementada recientemente y permite observar los distintos niveles de expresión de algún gen con distintos colores (Winter y col., 2007). (A) Representación visual de los niveles de expresión de *AtUTr2* a través de distintos estados de desarrollo y tejidos. Los datos provienen de perfiles de expresión de microarreglos normalizados por el método *RMA* y fueron generados por el consorcio multinacional *AtGenExpress*, los que incluyen como mínimo una réplica por experimento. En la figura podemos observar que *AtUTr2* se expresa en hojas y en raíces, con altos niveles de expresión en hojas senescentes en comparación con otros tipos de hojas (en rojo). (B) Representación visual de los niveles de expresión de *AtUTr2* en raíz de plantas de 6 días ecotipo Columbia-0 crecidas en placas MS 4,5% de sacarosa. Distintos tipos celulares de la raíz fueron separados y analizados mediante microarreglos. Los datos de expresión en triplicados fueron normalizados por el método *GCOS*. Los datos fueron generados por (Birbaum y col., 2003), donde 15 diferentes zonas de la raíz que corresponden a distintos tipos celulares en tres distintos estadios progresivos del desarrollo radicular fueron definidos y analizados en chips ATH1 *Affymetrix*TM. En la figura se observa que *AtUTr2* se expresa mayoritariamente en la epidermis de la raíz (en rojo).

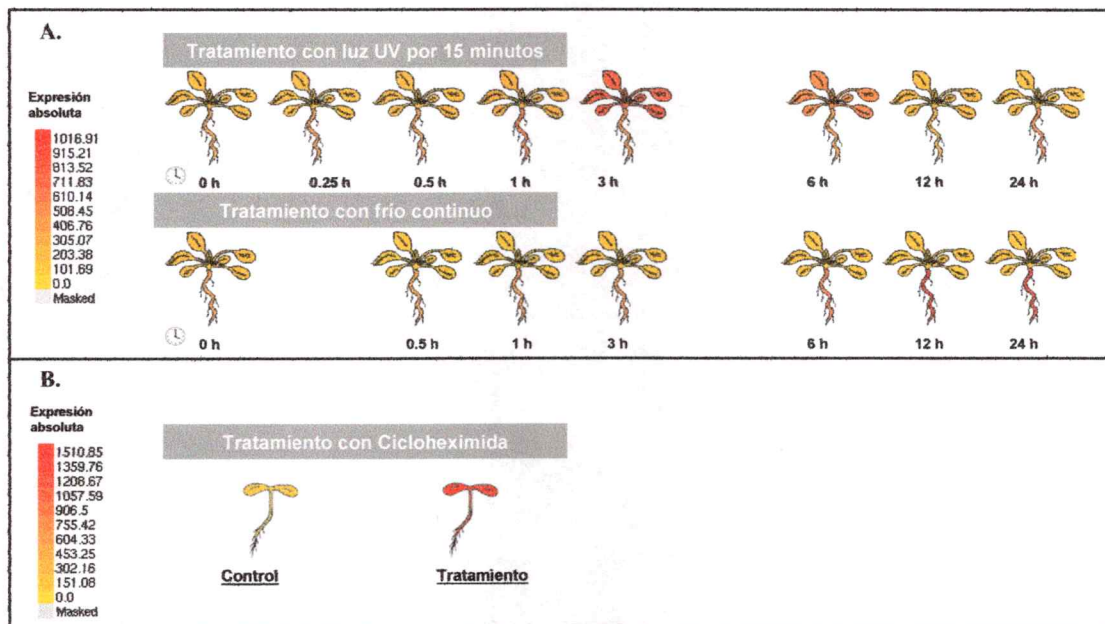


Figura 3. *AtUTr2* aumenta su expresión ante condiciones estrés. Los datos de expresión representados provienen de perfiles de expresión de microarreglos ATH1 *Affymetrix*TM normalizados por el método *GCOS* que fueron generados por el consorcio multinacional *AtGenExpress* e incluyen como mínimo una réplica por experimento. (A) Representación gráfica de los niveles de expresión de *AtUTr2* a distintos tiempos de respuesta a un tratamiento con luz UV por 15 minutos y a estrés por frío continuo a 4°C. *AtUTr2* aumenta su expresión significativamente en respuesta a luz UV a las 3 horas del tratamiento tanto en hojas como en raíces. Además, aumenta su expresión en respuesta a tratamientos con frío de forma muy notoria a las 12 horas del tratamiento, pero el aumento es sólo en raíces. (B) Representación gráfica de los niveles de expresión de *AtUTr2* en *Arabidopsis* en respuesta a tratamientos con cicloheximida 10 µM por 3 horas. *AtUTr2* aumenta su expresión significativamente en respuesta al inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida tanto en hojas como en raíces.

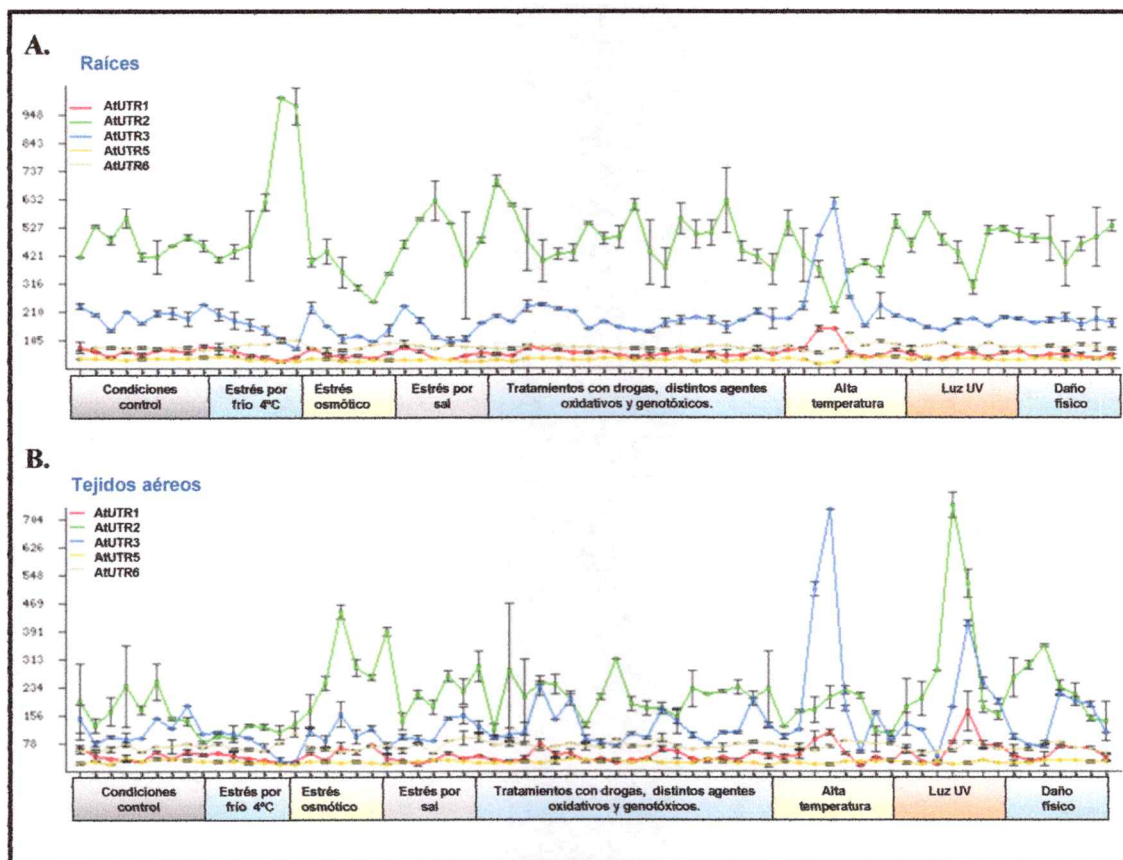


Figura 4. Perfiles de expresión normalizados de los genes de la familia AtUTr. Se grafican los niveles de expresión de *AtUTr2* y el resto de los miembros de su familia génica ante distintas condiciones de crecimiento. Los datos provienen de perfiles de expresión de microarreglos ATH1 *Affymetrix*TM normalizados por el método *GCOS* que fueron generados por el consorcio multinacional *AtGenExpress* e incluyen como mínimo una réplica por experimento. La desviación estándar se representa con la barra de error. El perfil de expresión de *AtUTr4* no fue graficado pues no presenta grandes aumentos de expresión ante los tratamientos de estrés aquí analizados (ver tabla suplementaria 1). (A) En raíces, la expresión de *AtUTr2* aumenta en tratamientos de estrés por frío y decrece ante tratamientos de alta temperatura. Los niveles de expresión de *AtUTr1* y *AtUTr3* en cambio, se comportan de la manera inversa ante estos tratamientos. *AtUTr5* y *AtUTr6* no presentan grandes cambios en sus niveles de expresión ante las distintas condiciones analizadas, pero en raíces ambos genes responden a tratamientos de alta temperatura. (B) En tejidos aéreos, la expresión de *AtUTr2* responde a tratamientos con luz UV, así como también lo hace *AtUTr1* y *AtUTr3*. Tal como ocurre en raíces, en tejidos aéreos la expresión de *AtUTr1* y *AtUTr3* esta muy correlacionada ante las distintas condiciones analizadas. Ambos genes responden a tratamientos de estrés por alta temperatura.

2. Verificación por PCR de la inserción de T-DNA.

En este trabajo, caracterizamos una línea insercional de T-DNA de *Arabidopsis* en la región 5' UTR del gen que codifica para *AtUTr2*. Trabajo previo realizado en nuestro laboratorio logró identificar plantas que efectivamente posee una inserción de T-DNA en su genoma. Estas plantas fueron obtenidas desde un grupo de semillas de *Arabidopsis* que fueron facilitadas por la empresa biotecnológica *Syngenta* bajo un acuerdo de transferencia de material. Mediante chequeos por PCR y análisis de segregación se logró identificar la línea *AtUTr2.1*; una línea insercional homocigota para la inserción de T-DNA, pues posee ambas copias del gen *AtUTr2* interrumpidas con el elemento insercional en su 5'UTR (Marchant, L., 2004; Tesis de doctorado). Estas plantas serán las que caracterizaremos en el resto de este trabajo. La presencia del T-DNA en las plantas *AtUTr2.1* fue confirmada utilizando partidores del gen cercanos al sitio de inserción y un partidor que empalma con el borde izquierdo del T-DNA. Con este partidor (partidor **c**) y uno de los partidores del gen (partidor **a** o **b**, según la orientación de la inserción) es posible amplificar una banda utilizando DNA genómico como templado (**Figura 5-A**). Utilizando uno de los partidores del gen (partidor **a** ó **b**) y el partidor del borde izquierdo del T-DNA (partidor **c**), se amplifica una banda al utilizar DNA templado proveniente de plantas mutantes, sean éstas heterocigotas u homocigotas para la inserción. Sin embargo, al utilizar únicamente los partidores del gen (partidores **a** y **b**) sólo se amplifica una banda desde DNA genómico de plantas heterocigotas, ya que estas plantas poseen una de las copias del gen en estado silvestre y un amplificado que incluya el T-DNA es demasiado extenso como para ser amplificado por PCR (**Figura 5-B**). Utilizando este método de selección genotípica por PCR confirmamos que las

plantas caracterizadas en este trabajo, las plantas *AtUTr2.1*, son homocigotas para la inserción de T-DNA, logrando distinguirlas por PCR de las plantas heterocigotas para la inserción y que aún poseen una copia del gen *AtUTr2* intacta en su genoma (Figura 5-C). Debido a que el partidor **c**, tanto con el partidor **a** como con el **b** origina un amplificado, suponemos que la inserción de T-DNA es compleja y posee dos extremos izquierdos insertados con orientaciones opuestas.

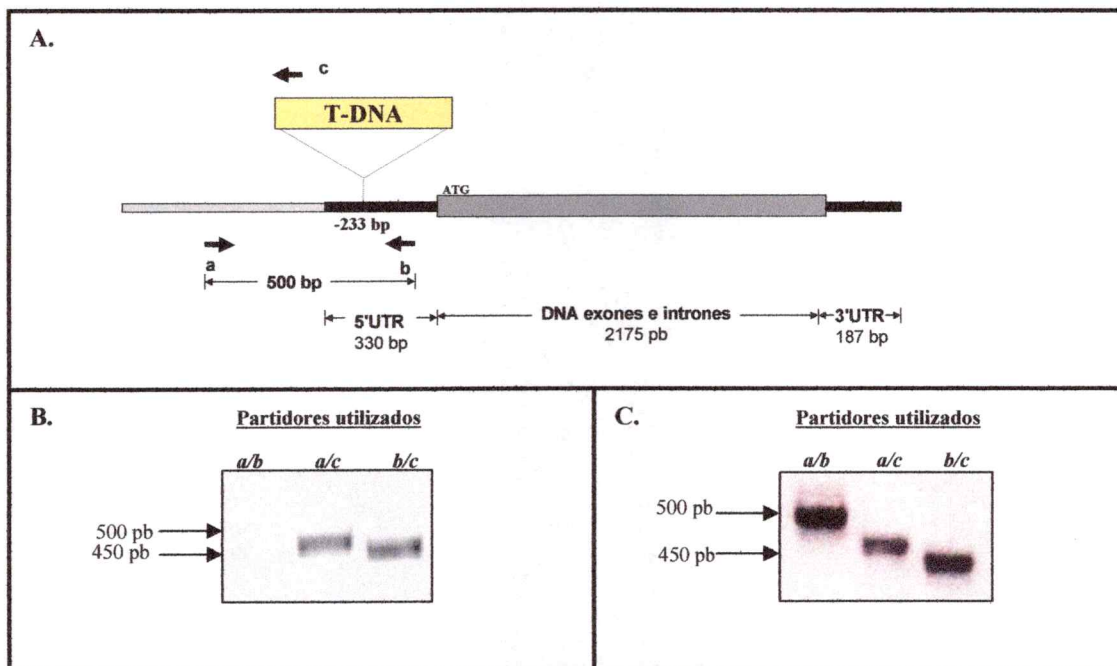


Figura 5. Verificación por PCR de la inserción de T-DNA en plantas homocigotas. (A) Esquema que representa un T-DNA inserto en el DNA genómico de la región 5' no traducida (5'UTR) del transcrito de *AtUTr2* en las plantas *AtUTr2.1*. La caja gris representa la región codificante del gen *AtUTr2* incluyendo sus intrones. Las flechas *a* y *b* representan partidores específicos que flanquean el sitio de la inserción, partidores que originan un amplificado de ~500 bp. La flecha *c* representa un partidor del borde izquierdo del elemento insertional. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR obtenidos al utilizar como templado DNA genómico de plantas homocigotas de la línea insercional, las cuales fueron utilizadas en el resto del trabajo realizado (plantas *AtUTr2.1*). Con el par de partidores *a/b* no se obtiene amplificado pues la inserción de T-DNA es demasiado extensa como para ser amplificada por PCR y ambas copias del gen poseen la inserción (C) Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR obtenidos al utilizar como templado DNA genómico control de plantas heterocigotas de la línea insercional. Debido a que el partidor *c*, tanto con el partidor *a* como con el *b* origina un amplificado, suponemos que la inserción de T-DNA es compleja y posee dos extremos izquierdos insertados con orientaciones opuestas. Se realizó controles con sólo un primer y no generan amplificados (datos no mostrados).

3. Análisis de expresión de *AtUTr2* en la línea insercional.

Mediante experimentos de *Northern blot* se analizó si en la línea *AtUTr2.1* hay alteraciones en la expresión del gen *AtUTr2*. Para ello, se utilizó una sonda radioactiva confeccionada con el DNA codificante de *AtUTr2* (CDS) y la caracterizamos en un experimento de *Southern blot* (ver métodos). Allí, al cortar DNA genómico con distintas enzimas de restricción e hibridarlo con una sonda radioactiva, podemos observar que bajo condiciones de alta estrictez de hibridación la sonda nos permite visualizar sólo una banda en los distintos carriles con las distintas enzimas de restricción utilizadas. Esto sugiere que los distintos productos de digestión obtenidos contienen el locus de *AtUTr2* y que bajo las condiciones de estrictez de hibridación utilizadas no hay hibridación inespecífica con otro segmento de DNA genómico con un alto nivel de identidad de secuencia con *AtUTr2* como lo es *AtUTr4*, un gen con el cual existe un alto nivel de identidad nucleotídico (Norambuena y col., 2002) (Figura 6).

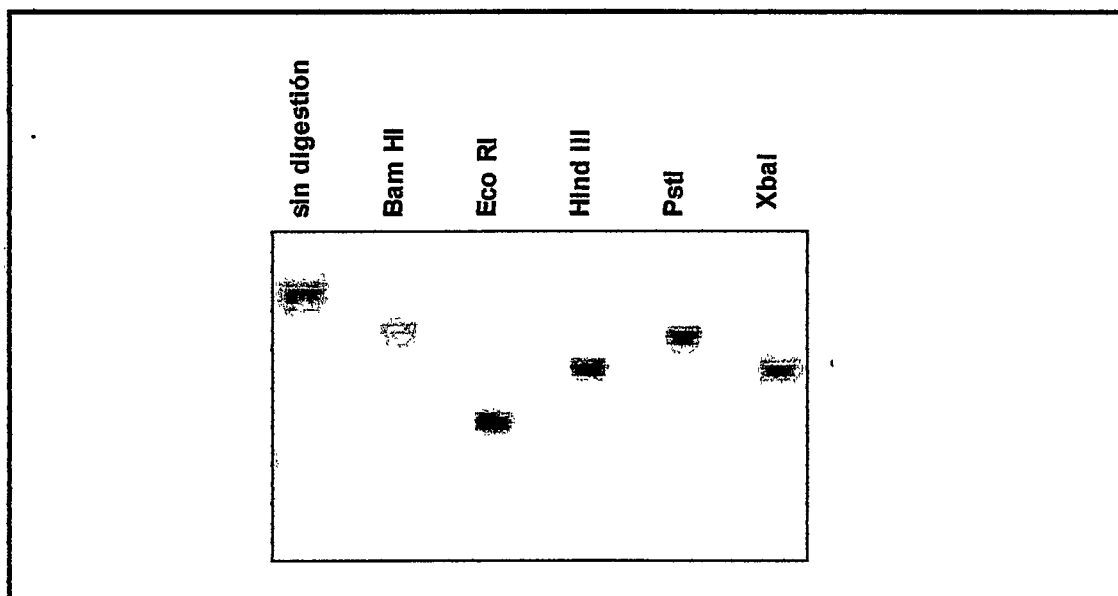


Figura 6. Caracterización de una sonda radioactiva contra *AtUTr2* mediante *Southern blot*. Autoradiografía de una membrana hibridada con una sonda radioactiva confeccionada con el DNA codificante de *AtUTr2* (CDS). En cada carril de un gel 1% de agarosa se cargó 4 μ g de DNA genómico de plantas silvestres de *Arabidopsis* y fueron cortados con distintas enzimas de restricción. Como en todos los carriles se observa una única banda, podemos concluir que bajo estas condiciones de hibridación la sonda radioactiva confeccionada es una buena herramienta para utilizar en experimentos de expresión de *Northern blot* (Figura 7).

Cuando analizamos mediante *Northern blot*, la expresión de *AtUTr2* en aquellas plantas que poseen la inserción de T-DNA en ambas copias del gen (plantas *AtUTr2.1*) y lo comparamos con plantas silvestres control, encontramos que el transcrito reconocido por la sonda radioactiva es más abundante en la línea insercional en comparación con lo observado en plantas silvestres y que este resultado es más notorio cuando se analiza la expresión utilizando RNA obtenido desde plantas crecidas en cultivo de tejidos al 2% de sacarosa por 20 días (**Figura 7**). Además, en la línea insercional se observa que el transcrito reconocido por la sonda radioactiva es de mayor tamaño molecular en las plantas *AtUTr2.1* que en las plantas control, lo que se observa de forma mucho más clara cuando el *Northern blot* es realizado en un gel de agarosa que permite separar mejor las bandas observadas (**Figura 7-B**). Estos resultados muestran que en la línea insercional hay alteraciones en la formación del transcrito de *AtUTr2* e indican que el análisis de esta línea insercional puede entregar importante información del rol biológico de *AtUTr2*.

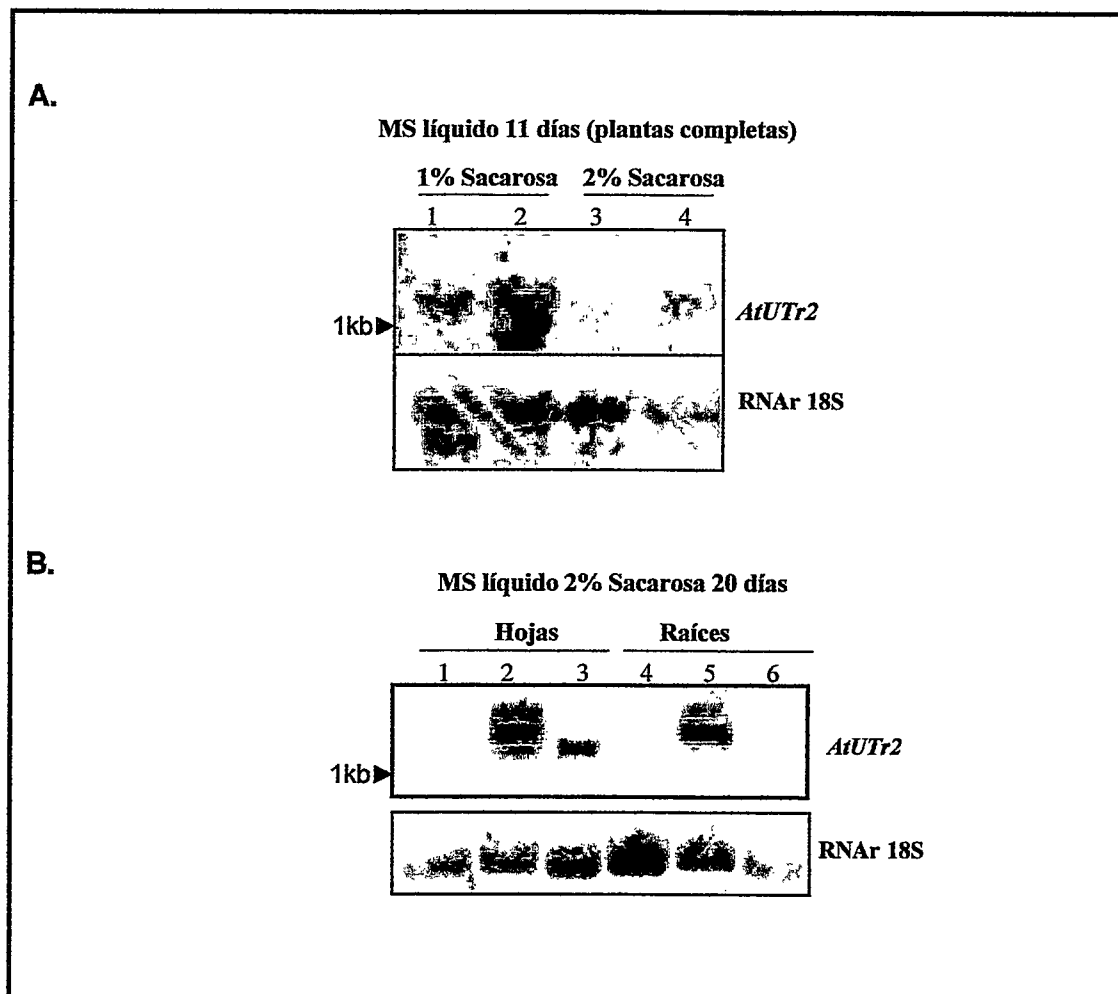


Figura 7. Análisis de la expresión del gen que codifica para *AtUTr2* mediante *Northern blot*. (A) Se cargó 40 μ g de RNA en cada carril de un gel de agarosa al 1% de agarosa de plantas crecidas en medio MS líquido por 11 días. Carril 1 y 3 corresponden a plantas silvestres. Carril 2 y 4 corresponden a muestras de la línea insercional *AtUTr2.1*. Se compara plantas crecidas en 1% sacarosa (carril 1-2) y 2% sacarosa (carril 3-4). (B) Se cargó 40 μ g de RNA en cada carril de un gel al 1.5% agarosa de plantas crecidas en medio MS líquido al 2% de sacarosa por 20 días. Carril 1 y 4 corresponden a muestras de plantas silvestres. Carril 2 y 5 corresponden a muestras de las plantas *AtUTr2.1*. Carril 3 y 6 corresponden a muestras control obtenidas desde una línea insercional que posee la inserción de T-DNA en otra posición.

4. Análisis fenotípicos.

Se analizaron posibles fenotipos macroscópicos en relación con el largo del hipocotilo y el número de raíces laterales que diferencie a las plantas silvestres de las plantas *AtUTr2.1* bajo distintas condiciones de crecimiento. Plantas crecidas tanto en placas como en tierra, no muestran diferencias entre la línea insercional *AtUTr2.1* y las plantas control en el largo del hipocotilo o tallo embrionario. Al analizar esta estructura en plantas de 7 días crecidas, se observa que el largo promedio de éste es mayor en plantas crecidas en oscuridad (etioladas) con respecto al obtenido al analizar plantas crecidas en luz, pues el hipocotilo elonga en etapas tempranas del desarrollo y su elongación es inhibida por luz. Las plantas *AtUTr2.1* no muestran diferencias con respecto a las plantas control en el largo del hipocotilo, independientemente si analizamos plantas crecidas en placas o en cultivo de tejidos en medio líquido; condición de crecimiento en la cual se creció las plantas analizadas en los experimentos de *Northern blot* (**Figura 8**). Al analizar el número de raíces laterales en plantas crecidas en medio líquido, es posible encontrar que en poblaciones de plantas *AtUTr2.1* existe una tendencia a presentar un mayor número de estas estructuras. Si se analiza en plantas etioladas crecidas en medio líquido de cultivo de tejidos por 7 días el número de raíces laterales, se observa que la mayor proporción de las plantas analizadas posee sólo 1 o 2 raíces laterales a los 7 días y de 105 plantas control analizadas encontramos que sólo 5 poseen 3 raíces laterales. En cambio, en las plantas *AtUTr2.1* encontramos 8 plantas de un total de 105 que poseen 3 raíces laterales. Además, incluso 1 planta *AtUTr2.1* posee 4 raíces laterales (**Figura 9-A**). Al analizar plantas crecidas por 11 días las diferencias en las poblaciones se hacen más evidentes. La mayor proporción de las plantas silvestres

posee entre 3 y 6 raíces laterales. Sin embargo en las plantas *AtUTr2.1* es posible encontrar plantas con hasta 7, 8 o incluso 9 raíces laterales (**Figura 9-B**). Cuando analizamos plantas crecidas en medio líquido pero en presencia de luz, el número de raíces laterales por planta aumenta tanto para las plantas *AtUTr2.1* como para plantas controles. A los 7 días de cultivo ya es posible obtener poblaciones donde la mayor proporción de las plantas posee entre 3 y 6 raíces laterales. Nuevamente se observa que las plantas *AtUTr2.1* tienden a poseer más raíces laterales. Cuando se analiza plantas crecidas por 11 días en presencia de luz en cultivo de tejidos, ambas poblaciones aumentan su número de raíces laterales por planta. Además, se mantiene la tendencia de las plantas *AtUTr2.1* a presentar más raíces laterales. Por ejemplo, de 114 plantas control analizadas, sólo 8 poseen más de 25 raíces. En cambio, una población de igual tamaño de plantas *AtUTr2.1* presenta 27 plantas con más de 25 raíces laterales (**Figura 10**).

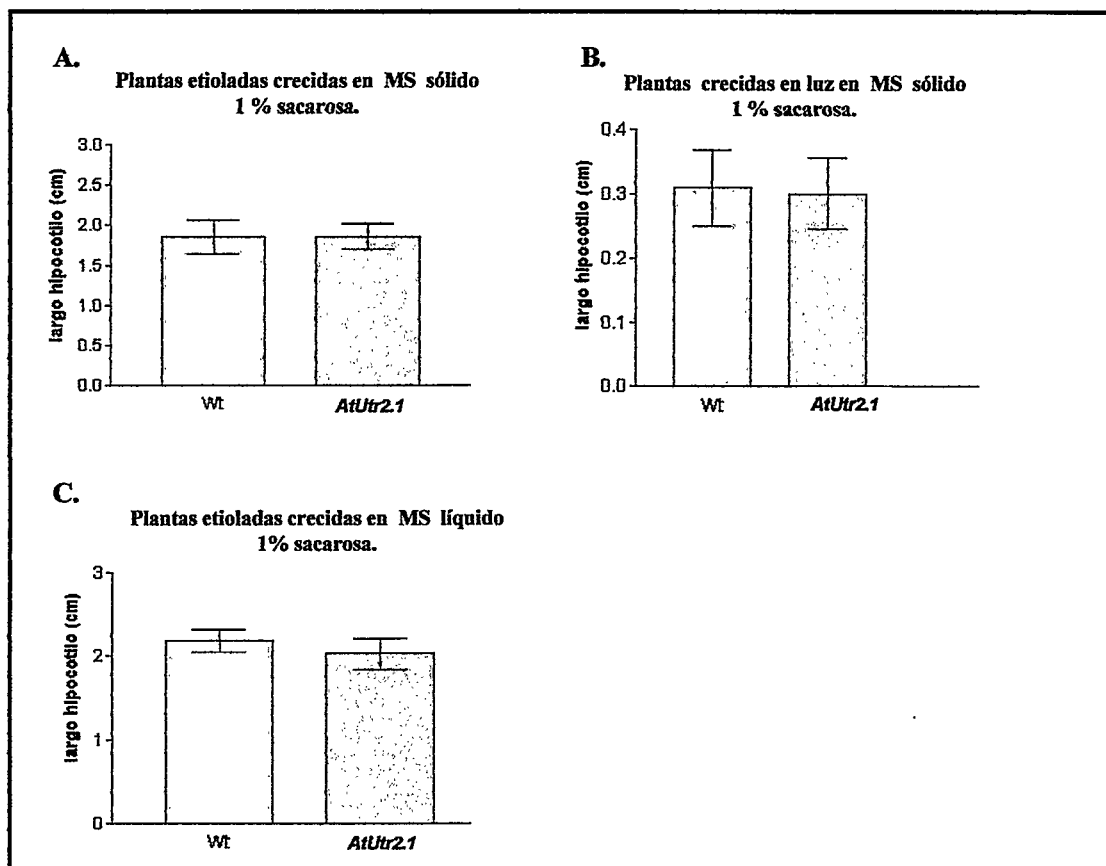


Figura 8. Análisis del largo del hipocotilo de plantas crecidas 7 días ante distintas condiciones. (A) Plantas crecidas 7 días en placas de medio Murashige and Skoog pH 5,8 (MS) sólido 1% sacarosa en ausencia de luz (etioladas). n=19 plantas Wt (plantas control silvestres); n=16 plantas *AtUTr2.1*. (B) Plantas crecidas 7 días en placas de medio MS 1% sacarosa en presencia de luz. n=36 plantas Wt; n=15 plantas *AtUTr2.1*. El hipocotilo elonga muy poco en presencia de luz. (C) Plantas etioladas crecidas 7 días en cultivo de tejidos en medio MS líquido 1% sacarosa. n=14 plantas Wt; n=14 plantas *AtUTr2.1*. En ninguna de las condiciones analizadas se observan diferencias entre plantas silvestres control y plantas de la línea insercional *AtUTr2.1*.

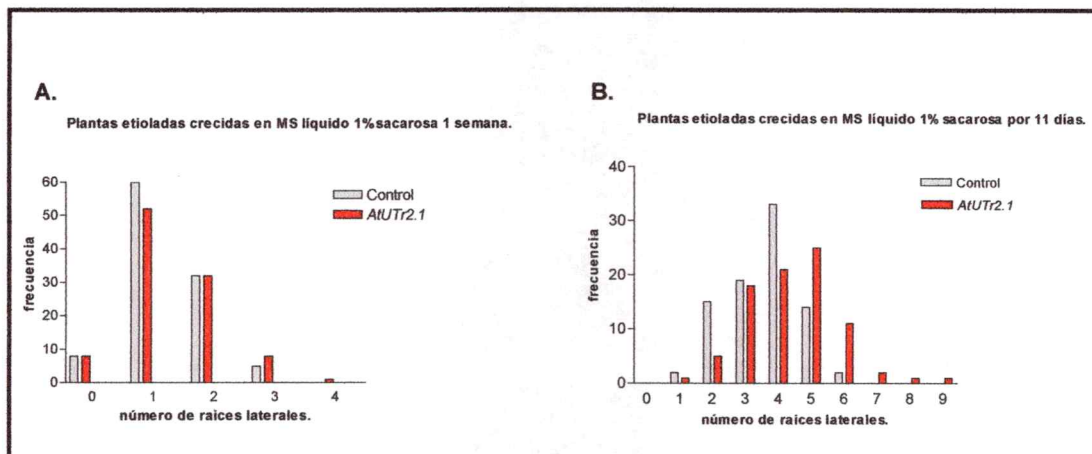


Figura 9. Distribución de frecuencia del número de raíces laterales en plantas etioladas crecidas en cultivo de tejidos (A) Plantas crecidas en medio Murashige and Skoog pH 5,8 (MS) líquido 1% sacarosa por 1 semana n = 105 plantas silvestres control; n = 105 plantas *AtUTr2.1*. (B) Plantas crecidas en medio MS líquido 1% sacarosa por 11 días; n = 85 plantas silvestres control; n = 85 plantas *AtUTr2.1*.

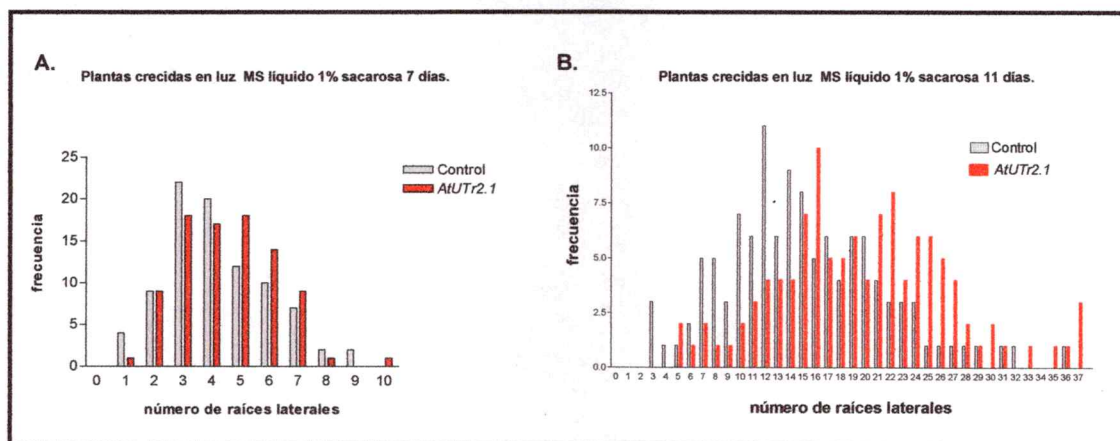


Figura 10. Distribución de frecuencia del número de raíces laterales en plantas crecidas en cultivo de tejidos en presencia de luz. (A) Plantas crecidas en medio Murashige and Skoog pH 5,8 (MS) líquido 1% sacarosa por 1 semana, n = 88 plantas silvestres control; n = 88 plantas *AtUTr2.1*. (B) Plantas crecidas en medio MS líquido 1% sacarosa por 11 días; n = 114 plantas silvestres control; n = 114 plantas *AtUTr2.1*.

5. Análisis de pared celular.

Debido a que la línea insercional *AtUTr2.1* posee efectos sobre los niveles de expresión de *AtUTr2*, decidimos analizar posibles efectos en estas plantas sobre la pared celular. Para ello, analizamos posibles efectos sobre los polímeros de azúcar que poseen galactosa en su estructura, pues sabemos que *AtUTr2* es capaz de transportar UDP-galactosa (Norambuena y col., 2005). Para los análisis de pared celular nos centramos en aquellos tejidos donde *AtUTr2* se expresa de forma importante y donde posiblemente encontremos un mayor efecto en las plantas *AtUTr2.1*.

5.1 Análisis mediante inmunofluorescencia en raíces completas

AtUTr2 se expresa a niveles muy altos en la epidermis de las raíces. Debido a esto, decidimos analizar posibles efectos en las plantas *AtUTr2.1* sobre los polímeros de azúcar que contengan galactosa en la superficie de las raíces. Ramnogalacturonano I (RGI) es un homopolímero de (1→4)- α -D-ácido galacturónico con sustituciones de galactosa en su estructura. Mediante la utilización de anticuerpos monoclonales que reconocen residuos presentes en ramnogalacturonano es posible analizar *in situ* cambios en la composición de esta pectina en la superficie de la raíz. (Willats y col., 2001). LM5 reconoce 4 residuos de galactosa en cadenas de (1→4)- β -D-galactosa presentes en RGI. LM6 reconoce 5 arabinosas en cadenas de (1→5)- α -L-arabinanosa presentes en RGI. Mediante inmunofluorescencias utilizando estos anticuerpos, analizamos posibles cambios en los patrones de marca en las raíces completas de plantas *AtUTr2.1* (**Figura 11**). Sin embargo, en estos experimentos no logramos observar diferencias en el patrón de marca de fluorescencia entre plantas *AtUTr2.1* y plantas silvestres control.

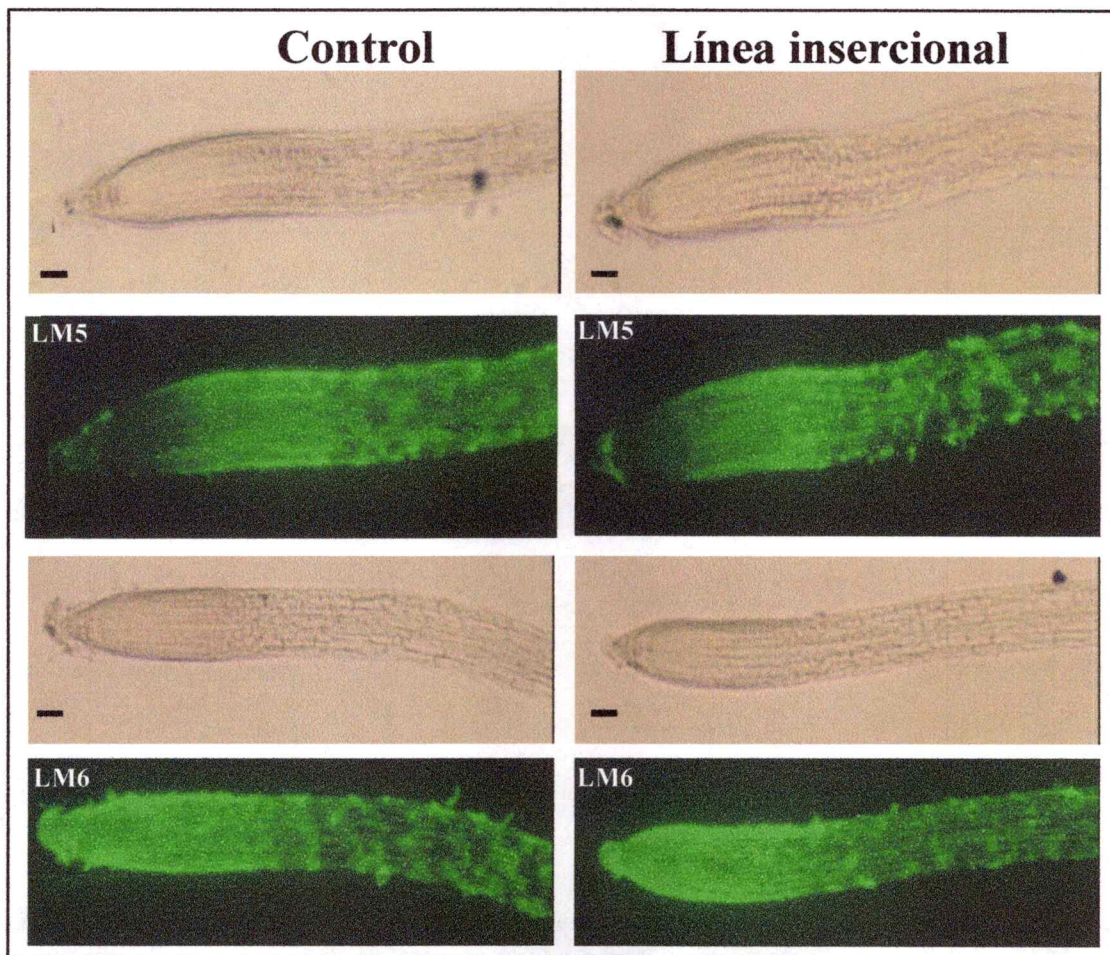


Figura 11. Inmunofluorescencias de raíces incubadas con los anticuerpos monoclonales LM5 y LM6. Plantas crecidas dos semanas en placas de medio MS 1% sacarosa fueron incubadas con anticuerpos para comparar los patrones de marca en raíces (ver métodos). Se muestran imágenes representativas de los patrones de marca de plantas control y plantas de la línea insercional *AtUTr2.1* incubadas con el anticuerpo LM5 y LM6. LM5 reconoce 4 residuos de galactosa en cadenas de (1→4)-β-D-galactosa de ramnogalacturonano I. LM6 reconoce 5 arabinosas en cadenas de (1→5)-α-L-arabinanosa de ramnogalacturonano I. Al analizar los patrones de marcaje podemos concluir que no existen diferencias entre la línea insercional *AtUTr2.1* y las plantas silvestres control con ninguno de los dos anticuerpos utilizados. Barra, 50 μm.

5.2 Análisis de azúcares totales en muestras de pared celular

Otra aproximación para evaluar posibles cambios en la pared celular de las plantas *AtUTr2.1* es directamente analizar muestras de pared celular y comparar contra plantas silvestres. Para realizar estos experimentos, analizamos muestras de pared celular obtenidas tanto desde plantas crecidas en tierra como desde plantas crecidas en cultivo de tejidos. La composición en %mol de azúcares totales en estas muestras fue analizada utilizando cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masa (GC-MS). Cuando analizamos la pared celular en plantas etioladas crecidas en cultivo de tejidos en medio MS líquido 2% sacarosa, observamos que las plantas *AtUTr2.1* crecidas bajo estas condiciones por 20 días poseen mayor %mol de manosa, fucosa y ramnosa que las plantas control en su pared celular. Además, presentan menor contenido de xilosa y arabinosa (**Figura 12-A**). Plantas crecidas bajo las mismas condiciones, pero sólo 11 días, presentaron también diferencias con respecto a las plantas control. Presentando menor %mol de manosa en su pared celular. (**Figura 12-B**).

Cuando analizamos la pared celular en plantas crecidas en tierra, en las plantas *AtUTr2.1* no hay cambios reproducibles en el contenido de galactosa, manosa, xilosa, arabinosa, fucosa ni ramnosa con respecto a plantas control. Sin embargo, debemos mencionar que estas mediciones las realizamos en dos oportunidades, son dos réplicas biológicas. En uno de los experimentos realizados, observamos diferencias en las plantas *AtUTr2.1* con respecto a plantas control en el contenido de galactosa, manosa y fucosa (**Figura 12-B**). Sin embargo, la réplica biológica de este experimento no reprodujo este resultado (**Figura 12-C**). Por tratarse de plantas crecidas en temporadas y estaciones del año distintas, puede haber un efecto más complejo involucrado en la falta de

reproducibilidad en estos experimentos, pues las plantas fueron crecidas en una cámara de crecimiento disponible en el *Instituto Max Planck for Molecular Plant Physiology* con accesibilidad a luz natural. Como conclusión de los experimentos, podemos decir que las plantas *AtUTr2.1* presentan diferencias en su pared celular con respecto a plantas silvestres cuando son crecidas en cultivo de tejidos, observándose que presentan mayor porcentaje de moles de manosa en la pared celular, independientemente de si las plantas son crecidas 11 o 20 días en cultivo de tejidos.

5.3 Análisis de xiloglucano

Si bien el experimento anterior nos indica que la línea insercional no posee diferencias reproducibles en la composición de azúcares totales en material obtenido desde la pared celular, ésta es una aproximación poco específica, pues el análisis no indica en qué producto glicosilado se encuentran las diferencias. Además, esta técnica no permite analizar cualquier tejido, pues se requiere mucha biomasa inicial para realizar el experimento. Debido a lo anterior, decidimos analizar la composición de xiloglucano en la línea insercional, pues se trata de la hemicelulosa más abundante en *Arabidopsis*, es posible analizarlo a partir de muy poca muestra de tejidos y está constituido por distintos azúcares como glucosa, xilosa, galactosa y fucosa (Scheible y col., 2004). Para analizarlo se digiere este polisacárido con una enzima endo- β -glucanasa (XEG) y se analiza la composición relativa de los distintos oligosacáridos liberados mediante espectrometría de masa MALDI-TOF (**Figura 13**). Utilizando esta metodología, se realizó análisis de xiloglucano *in situ* en raíces. Además, se analizó este polisacárido en plantas crecidas en cultivo de tejidos (**Figura 14**). Los resultados

obtenidos indican que existen pequeños cambios en las plantas *AtUTr2.1* en xiloglucano y que estas diferencias son reproducibles y estadísticamente significativas. Como conclusión de este análisis, podemos decir que tanto en raíces como en muestras de xiloglucano obtenidas desde plantas crecidas cultivo de tejidos se observa un aumento en las plantas *AtUTr2.1* en el contenido del oligosacárido acetilado de xiloglucano XXFG con respecto a plantas silvestres (ver Figura 13-14). Podemos concluir también que en las plantas *AtUTr2.1*, independientemente de la condición de crecimiento o el tejido analizado se observa un aumento en el contenido de oligosacáridos acetilados totales y en el contenido de oligosacáridos fucosilados totales. Debemos mencionar, que la acetilación en xiloglucano ocurre en los residuos de galactosa. Además, nótese que los residuos de fucosa justamente se unen a los de galactosa en las moléculas de xiloglucano (ver Figura 13-14).

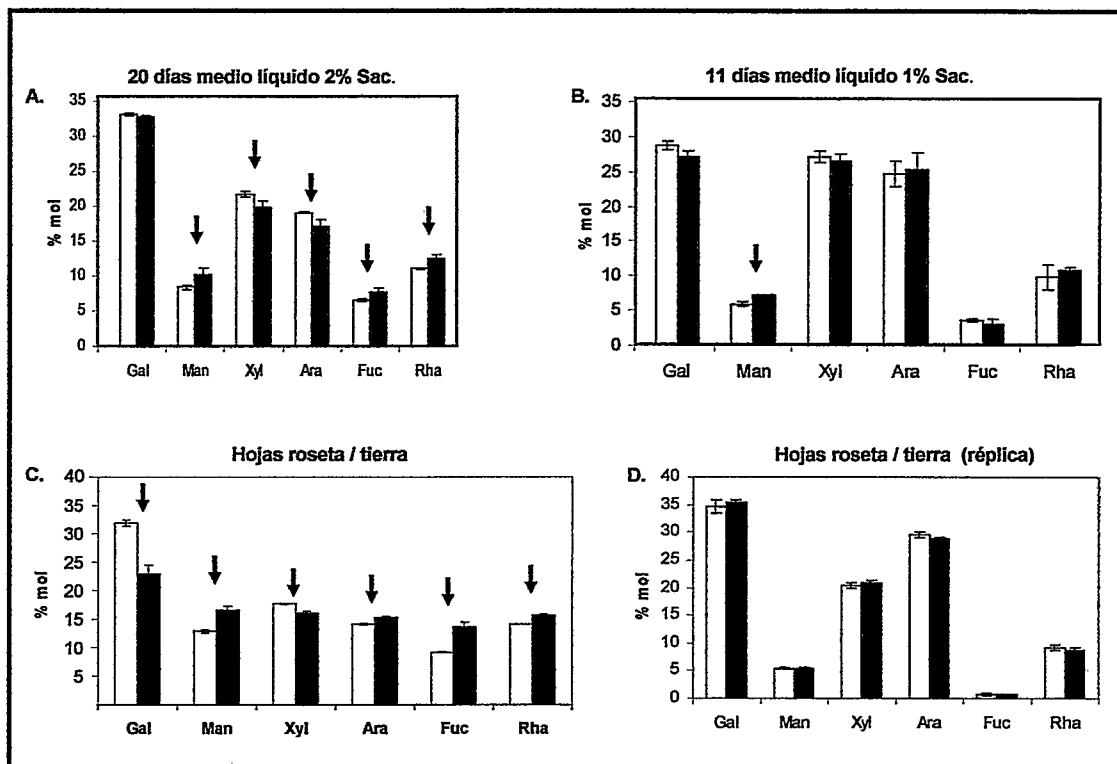


Figura 12. Análisis de azúcares totales mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masa GC-MS. Gal=galactosa, Man=manosa, Xyl= Xilosa, Ara=arabinosa, Fuc=fucosa, Rha=ramnosa. □ = plantas control; ■ = línea insercional. Las diferencias estadísticamente significativas con un P value < 0,05 en un contraste de medias usando la distribución t-Student se marcan con una flecha. Las barras de error representan la desviación estándar entre como mínimo tres réplicas técnicas. (A) Se analizó muestras de pared celular obtenidas desde plantas etioladas crecidas 20 días en cultivo de tejidos en medio Murashige and Skoog (MS) líquido al 2% de sacarosa. (B) Se analizó también muestras de pared celular obtenidas desde plantas etioladas crecidas 11 días en cultivo de tejidos en medio MS líquido al 1% de sacarosa. (C) Se analizó muestras provenientes desde hojas de roseta de plantas crecidas en tierra 3,5 semanas. Se observan importantes disminuciones en galactosa y un aumento en manosa y fucosa en las plantas *AtUTr2.1*. (D) Se realizó una réplica biológica del experimento anterior al analizar nuevamente muestras provenientes desde hojas de roseta de plantas crecidas en tierra 3.5 semanas, pero esta vez las plantas fueron crecidas en otra temporada. En esta réplica biológica no se observan diferencias entre las plantas *AtUTr2.1* y las plantas control en ninguno de los azúcares analizados.

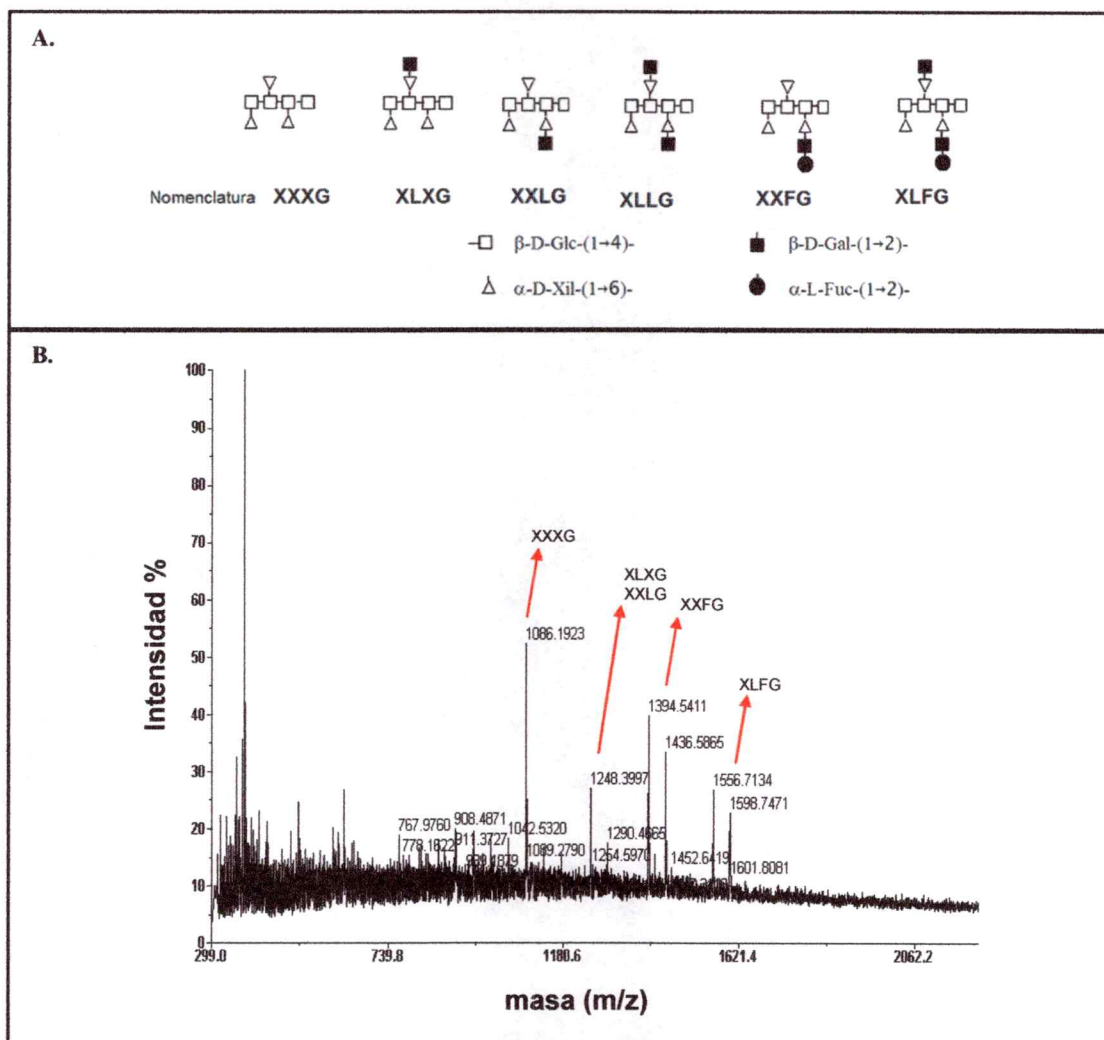


Figura 13. Es posible realizar análisis de composición relativa de los oligosacáridos de xiloglucano que se obtienen después de fragmentarlo enzimáticamente con una endoglucanasa. (A) Esquema de oligosacáridos de xiloglucano que son solubilizados luego de digerirlo enzimáticamente. Este polímero de azúcares está constituido por una cadena lineal de glucosas a la cual se unen de manera periódica y específica residuos de -xilosa, -xilosa-galactosa o -xilosa-galactosa-fucosa. Se representa con letras al grupo de azúcares que se unen a la cadena lineal de glucosas (Glc). X = xilosa; L = xilosa-galactosa; F = xilosa-galactosa-fucosa. (B) Ejemplo de una espectrometría de masas MALDI-TOF obtenida al analizar material de pared celular de plantas silvestres luego de digerirlo con una endo- β -glucanasa (XEG), enzima que corta sólo aquellos enlaces glicosídicos del xiloglucano donde la glucosa no está sustituida, los oligosacáridos resultantes pueden ser analizados mediante espectrometría de masa para luego analizar la composición relativa de cada uno de éstos con respecto al total mediante un análisis estadístico de las señales correspondientes a varios espectros (Lerouxel y col., 2002).

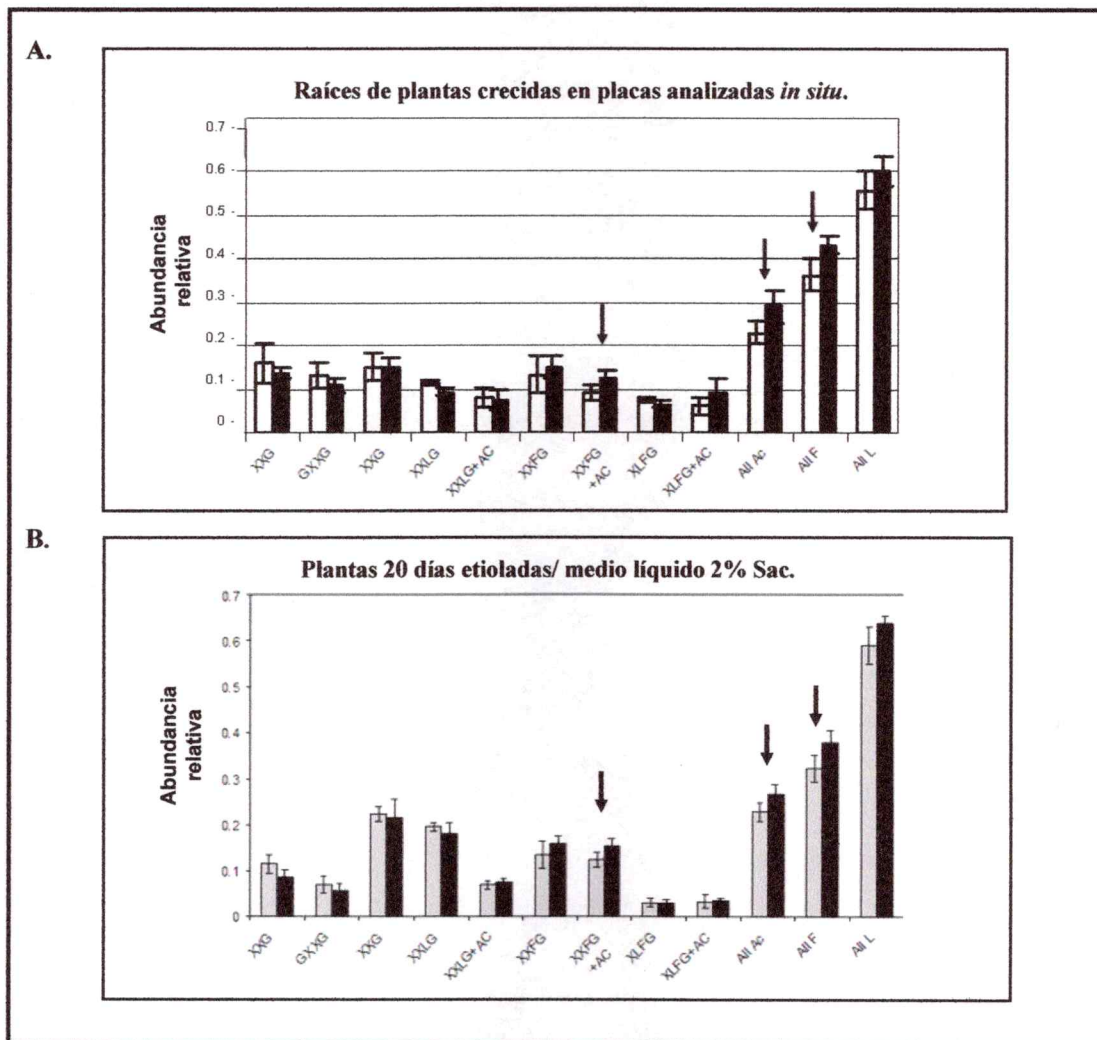


Figura 14. Análisis de la estructura del xiloglucano mediante espectrometría de masa MALDI-TOF. Se marcan con una flecha las diferencias estadísticamente significativas con un P value < 0.05 en un contraste de medias usando la distribución t-Student. Las barras de error representan la desviación estándar entre seis réplicas técnicas. +AC indica la variante acetilada de un oligosacárido de xiloglucano en particular. (A) Análisis *in situ* en las raíces de plantas crecidas 12 días en placas al 3% sacarosa. Plantas control = □; *AtUTr2.1* = ■. (B) Análisis de composición relativa de oligosacáridos de xiloglucano desde plantas etioladas crecidas 20 días en cultivo de tejidos en medio líquido, 2% sacarosa. Control = ■; *AtUTr2.1* = ■. Se observan diferencias estadísticamente significativas en los mismos oligosacáridos que en la parte (A).

6. Análisis Bioinformáticos.

Gracias a que el genoma de *Arabidopsis thaliana* está completamente secuenciado y al aumento explosivo de información pública, hoy en día es posible realizar análisis bioinformáticos y acceder a un múltiples herramientas en base de datos con mucha facilidad. Tenemos acceso a las secuencias de los genes, sus regiones traducidas y no traducidas predichas (Swarbreck y col., 2008). Contamos con información de los inicios de transcripción de cada gen e incluso podemos acceder a bases de datos que nos entregan datos de expresión analizados (Steinhauser y col., 2004; Swarbreck y col., 2008) ¿Cómo podemos aumentar nuestra información funcional de *AtUTr2* utilizando estas herramientas?

6.1 Análisis de la región promotora

La línea insercional *AtUTr2.1* presenta una inserción de T-DNA 233 pb río arriba del inicio de la traducción predicho para el gen *AtUTr2*. Para analizar la región promotora de *AtUTr2*, seleccionamos arbitrariamente un segmento de 1kb de la región río arriba del codón de inicio de la transcripción de este gen, región que no se sobrepone con la secuencia del gen contiguo. Utilizando dicha región, analizamos si en este segmento de DNA podemos encontrar la presencia de motivos en Cis regulatorios que hallan sido publicados en algún organismo vegetal utilizando la base de datos PLACE. (Higo y col., 1999). Al analizar el promotor de *AtUTr2*, se observa en él la presencia de las secuencias de distintos elementos en Cis consenso en organismos vegetales. Sin embargo, el hecho de encontrar cierta secuencia consenso Cis regulatoria en un segmento del promotor de un gen no necesariamente demuestra que ese elemento en Cis

sea efectivamente una caja regulatoria de la transcripción de ese gen y de que podamos usar la información de ese elemento regulatorio para inferir propiedades de la expresión del gen o de su producto proteico. Además, los principales problemas para obtener información analizando las regiones promotoras de los genes son: i) no todos los genes poseen promotores del mismo tamaño ii) hay elementos en Cis regulatorios que son muy frecuentes en el genoma y que prácticamente todos los genes los poseen iii) los elementos Cis descritos son de distintos tamaños y muchas veces de muy pocas bases nucleotídicas. El hecho de encontrar un elemento en Cis consenso en la secuencia río arriba de un gen por sí solo no entrega información directa de utilidad para la dilucidación funcional de la expresión del gen. Sin embargo, si se analiza todos los genes es posible obtener información valiosa. Por ejemplo, saber si un elemento en Cis presente en el promotor de un gen está con mayor o menor frecuencia que la esperada, es decir comparar con el número de veces que en promedio está ese elemento en Cis en el genoma. Si encontramos en un promotor de un gen el elemento en Cis consenso que consiste de secuencia ACGTTA, quizás esa secuencia de bases nucleotídicas está presente en todos los genes del genoma. Para solucionar este problema en los análisis que realizamos en la región promotora y obtener información relevante, analizamos un largo arbitrario de promotor para cada gen de Arabidopsis de 1kb, región que tomamos desde el final de cada 5'UTR de cada gen. Luego, utilizando las bases de datos PlantPag <http://plantpag.mpimp-golm.mpg.de/> y PLACE (Higo y col., 1999), analizamos si en el promotor de *AtUTr2* existe algún elemento en Cis por sobre de lo esperado, tomando como referencia la frecuencia de ese elemento en Cis en todos los promotores del genoma. Por ejemplo, si un elemento en Cis está 5 veces en el promotor de *AtUTr2* y ese

elemento sólo está presente una vez en el promotor de 1.000 de los ~27.000 genes del genoma, eso indica que ese elemento está muy sobre representado en la región promotora del gen con respecto a lo esperado, pues tomando un gen al azar se espera que la probabilidad de encontrar en él un elemento en Cis sea de 0.037 (1.000/27.000). Tomando los elementos regulatorios que están presentes en la región promotora de *AtUTr2* y comparando cada uno con sus respectivas frecuencias en el genoma, encontramos que de los 65 elementos en Cis encontrados allí, sólo 1 de estos está sobre representado en el promotor de *AtUTr2*, el denominado elemento QARBNEXTA. Esta caja regulatoria previamente ha sido descrita en el gen de una extensina en *Brassica Napus*, planta comúnmente conocida como canola o raps y se ha demostrado que puede inducir la expresión de secuencias río abajo bajo escenarios de estrés por daño o tensión (Elliott y col., 1998) (Figura 15-A). ¿Qué potenciales elementos en Cis regulatorios podría alterar la inserción de T-DNA en las plantas *AtUTr2.1*? Debido a que la inserción de T-DNA se encuentra en la zona del gen *AtUTr2* correspondiente a su región 5'UTR, analizamos qué potenciales elementos en Cis regulatorios están alterados por la inserción. La caja regulatoria GT1-CONSENSUS se encuentra justamente localizada en la zona donde se localiza la inserción de T-DNA en las plantas *AtUTr2.1* y se encuentra interrumpida. Este elemento en Cis es una caja consenso que es reconocida por el factor de transcripción GT-1, el cual se ha demostrado es capaz de activar la transcripción génica mediante la interacción directa con elementos de la maquinaria de la transcripción (Le Gourrierc y col., 1999) (Figura 15).

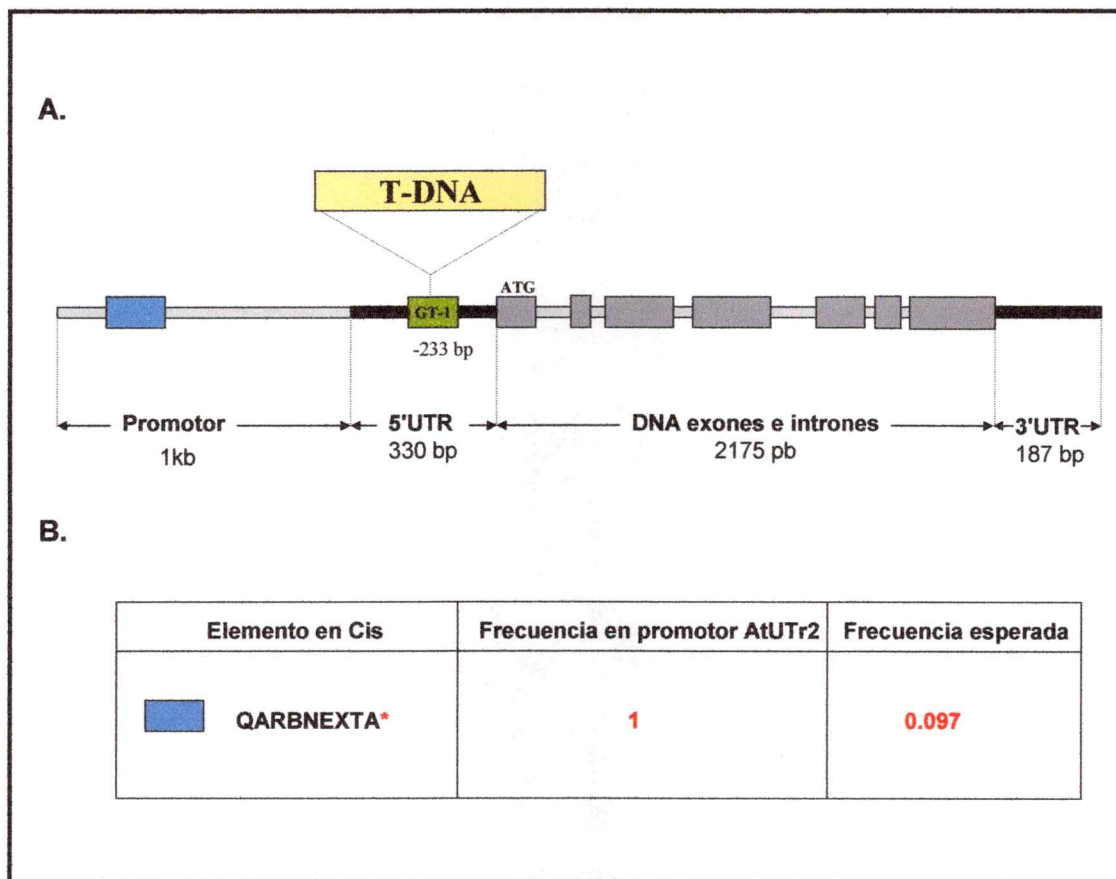


Figura 15. Análisis de elementos en Cis regulatorios en la región río arriba del inicio de la traducción del gen *AtUTr2*. (A) Esquema de DNA genómico donde se representa el gen *AtUTr2*, su región codificante, los UTR y su región promotora. Utilizando la base de datos PLACE (Higo y col., 1999), se analizó la zona de 1kb río arriba del inicio de la transcripción de *AtUTr2*, buscando allí la presencia de motivos en Cis regulatorios que hallan sido publicados en algún organismo vegetal y sus respectivas frecuencias en este promotor. En este esquema se destacan aquellos elementos en Cis que resultan estar enriquecidos en el promotor de *AtUTr2*, tomando como criterio de enriquecimiento aquellos elementos en Cis cuya frecuencia sea al menos un orden de magnitud mayor a la abundancia promedio de este elemento en Cis en los promotores de todos los genes del genoma; tomando todos los promotores del genoma con largo arbitrario de 1kb. Además, representamos con una caja verde el elemento en Cis que está localizado justamente 233 bp río arriba del ATG donde se encuentra la inserción de T-DNA en las plantas *AtUTr2.1*. Esta caja regulatoria corresponde al elemento GT1-CONSENSUS y está presente en el 5'UTR. (B) Tabla donde se presenta con asterisco el elemento en Cis QARBNEXTA, pues esta presente en el promotor de *AtUTr2* con una mayor frecuencia de lo esperado por simple azar.

6.2 Análisis de redes de correlación de expresión

La construcción de redes y su análisis están comenzando rápidamente a ser utilizados para caracterizar los sistemas biológicos, ya que entregan una poderosa visualización de la numerosa información disponible. Las redes se representan como grafos, donde los vértices (o nodos) son genes y los trazos (o arcos) representan algún tipo de relación entre éstos. En este trabajo analizamos redes de coexpresión, utilizando datos de correlación de expresión que están disponibles en la *Comprehensive Systems Biology Database* (Steinhauser y col., 2004). Se ha demostrado que la mayoría de los genes que son coregulados transcripcionalmente codifican para proteínas que interactúan, formando parte de una misma vía o proceso metabólico (Ge y col., 2001; Persson y col., 2005; Usadel y col., 2005). Así, el análisis de correlaciones de expresión y la construcción de redes transcripcionales se han transformado en una poderosa herramienta para ayudar a asignar función y a encontrar nuevas proteínas involucradas en cierto proceso biológico. En nuestras redes, si dos genes correlacionan muy bien en sus perfiles de expresión, tienen un trazo más corto que conecta. Si la correlación no es tan buena, la distancia entre los nodos es mayor, pues las correlaciones de expresión fueron representadas como distancia ($\text{distancia} = 1 - \text{correlación}$) (Usadel y col., 2005). Con el objetivo de asignarle algún rol metabólico a AtUTr2 y evaluar sus potenciales interacciones de expresión con genes del metabolismo de la pared celular, utilizando los datos de correlación de expresión construimos redes de coexpresión génica que representan los niveles de correlación de expresión de AtUTr2 con genes involucrados en el metabolismo de la pared celular (Tabla 3). Lo que hemos realizado es utilizar redes para representar las correlaciones entre los distintos perfiles de expresión de los

genes que nos interesaba saber si coexpresaban. Así, fácilmente podemos representar de forma visual muchos datos de similitud entre perfiles de expresión en una sola imagen. Además, fácilmente se puede identificar aquellos nodos que no interactúan con algún gen de interés, pues no hay un trazo que los une. Debemos señalar, que si bien dibujar los valores de correlación en una red entrega una visualización aproximada de los valores de distancia entre los nodos, resulta muy útil, pues el análisis de los datos en una tabla es muy difícil de analizar si se trata de muchos pares de datos de correlación y analizar las interacciones de un gen en un contexto global es mucho menos intuitivo.

Se analizaron datos de coexpresión génica obtenidos al analizar microarreglos generados por el consorcio multinacional *AtGenExpress*, los que incluyen experimentos donde las plantas fueron crecidas ante distintas condiciones de estrés y fueron generados tanto a partir de tejidos aéreos como de raíces. Estos microarreglos, son agrupados como experimentos de expresión condicional bajo estrés. Al analizar las correlaciones lineales de *Spearman* utilizando estos datos, tanto para raíces como para los tejidos aéreos en la base de datos utilizada hay 60 experimentos de microarreglos disponibles y miden las respuestas globales de expresión a distintos tratamientos y tiempos. Cada experimento como mínimo posee una réplica y sus respectivos controles. Dentro de los tratamientos incluidos en los experimentos hay tratamientos con agentes que producen estrés oxidativo y genotóxico, tratamientos con alta y baja temperatura, sal, luz ultravioleta, daño físico y sequía. Al analizar los datos de coexpresión entre *AtUTr2* y los genes incluidos en la tabla 3 utilizando estos datos, observamos que en tejidos aéreos de estas plantas, el perfil de expresión de *AtUTr2* correlaciona con el de *GONST4*, *MUR2*, *MUR1*, *GER2*, *GAUT*, *MUR4* y *GONST1*, con correlaciones de

Spearman significativas con un P value $\leq 10^{-2}$ (**Figura 16-A**). En raíces en tanto, *AtUTr2* correlaciona con *UGD1*, *XT1*, *SUD3*, *UGD2*, *GONST3*, *MUR3*, *NDPasa2*, *NDPasa3* y *NDPasa5*. Además, al igual que en tejidos aéreos, también correlaciona con *MUR1* (**Figura 16-B**). *AtUTr2* coexpresa con genes que codifican para enzimas que participan en el metabolismo de nucleótidos azúcar en el citosol, como *MUR1*, *GER2*, *SUD3*, *UGD1*. Además, coexpresa con genes involucrados en la biosíntesis de productos glicosilados propiamente tal, como *MUR2*, *GAUT*, *XT1* y con putativos transportadores de nucleótidos azúcar como *GONST3* y *GONST4* (Handford y col., 2004). La proteína *MUR1* participa en la interconversión de GDP-D-manosa a GDP-L-fucosa en el citosol (Bonin y col., 1997) y plantas con mutaciones puntuales en el gen que codifica para esta proteína poseen efectos sobre el xiloglucano (Lerouxel y col., 2002). Además, las glicosiltransferasas *MUR2* y *XT1* han sido involucradas en la biosíntesis de xiloglucano (Faik y col., 2002; Perrin y col., 1999; Perrin y col., 2003). Tanto en raíces como en tejidos aéreos *AtUTr2* posee niveles de correlación de expresión significativos con genes involucrados en el metabolismo de la pared celular y altos niveles de correlación de expresión sugieren una interacción funcional entre las proteínas codificadas por los genes que la poseen (Ge y col., 2001; Persson y col., 2005; Usadel y col., 2005). Así, los resultados obtenidos nos indican que bajo condiciones de estrés *AtUTr2* puede interactuar funcionalmente con proteínas involucradas en el metabolismo de la pared celular, pues coexpresa con genes involucrados en este proceso metabólico ante distintos escenarios de crecimiento bajo tratamientos de estrés.

Tabla 3.

Lista de genes involucrados en la biosíntesis de la pared celular. De la base de datos *Cell Wall Navigator* (Girke y col., 2004) se descargó los códigos de acceso y los nombres de algunos genes involucrados en la biosíntesis de celulosa y callosa, la interconversión de nucleótidos azúcar en el citosol y la biosíntesis de hemicelulosas y pectinas. Además, se agregó a estos genes transportadores de nucleótidos azúcar y nucleósido difosfatasa (NDPasas). La familias de genes GONST y AtGTr son putativos transportadores de GDP-azúcares. La familia AtUTr corresponde a putativos transportadores de UDP-azúcares. El gen denominado AtUTr corresponde al locus AT5G59740, anotado como un putativo transportador de UDP-azúcar.

EPIMERASA / DEHIDRATASAS CITOSÓLICAS	BIOSÍNTESIS DE HEMICELULOSAS	
GER1	<i>Polipéptido reversiblemente glicosilado</i>	
GER2	RGP1	
UGE1	<i>Xiloglucano galactosiltransferasa</i>	
UGE2	MUR3	
RHM1	<i>Xiloglucano fucosiltransferasa</i>	
RHM2	MUR2 (AtFUT1)	
SUD1	<i>Xiloglucano xilosiltransferasa</i>	
SUD2	AtXT1	
SUD3	AtXT2	
MUR1-GMD2	BIOSÍNTESIS DE PECTINA	
MUR4-UXE1	GAUT	
GAE1	GAUT2	
GAE2	QUA1	
GMD1	GAUT4	
DEHIDROGENASAS CITOSÓLICAS	NUCLEÓSIDO-DIFOSFATASAS	
UGD2	NDPasa1	
UGD3	NDPasa2	
UGD1	NDPasa3	
BIOSÍNTESIS DE CELULOSA	NDPasa4	
CesA8 (IRX1)	NDPasa5	
CesA1	NDPasa6	
CesA2 (Ath-A)	TRANSPORTADORES NUCLEOTIDOS AZUCAR	
CesA3 (Ath-B)	AtUTr1	AtGTr1
CesA4 (IRX5)	AtUTr2	AtGTr2
CesA7 (IRX3)	AtUTr3	AtGTr3
BIOSÍNTESIS DE CALLOSA	AtUTr4	GONST1
AtGSL6 (CALS1)	AtUTr5	GONST2
	AtUTr6	GONST3
	AtUTr	GONST4
		GONST5

DISCUSIÓN

¿Cómo las glicosiltransferasas acceden a los nucleótidos azúcar?

Las glicosiltransferasas son enzimas capaces de mediar la biosíntesis de polímeros de azúcar en la ruta secretoria. Estas enzimas, poseen su sitio catalítico orientado hacia el lumen del Golgi y utilizan como sustrato nucleótidos azúcar que son producidos en el citosol. En plantas, se ha postulado la participación de transportadores de nucleótidos azúcar (TNA) en la biosíntesis de productos glicosilados en la ruta secretoria, pues se ha demostrado que en membranas tanto de Golgi como de retículo endoplásmico, existe actividad de transporte para distintos nucleótidos azúcar que una vez incorporados al lumen del organelo pueden potencialmente ser utilizados por las glicosiltransferasas como sustrato. AtUTr2 es una proteína de *Arabidopsis thaliana* de 345 aminoácidos altamente hidrofóbica, localizada subcelularmente en el aparato de Golgi, cuya expresión y subsiguiente caracterización bioquímica, tanto en levaduras como en hojas de tabaco, indican que es capaz de transportar UDP-galactosa. Este nucleótido azúcar es sustrato para la biosíntesis de distintos productos glicosilados de la pared celular sintetizados en la ruta secretoria. Incluyendo hemicelulosas, pectinas y glicoproteínas como arabinogalactanos y extensinas (Norambuena y col., 2005; Scheible y col., 2004; Somerville y col., 2004). Nuestro trabajo, plantea el uso de plantas con alteraciones en la expresión de *AtUTr2* como herramienta en el estudio del rol biológico de esta proteína, pues un análisis de éstas plantas puede entregarnos nuevas luces sobre los procesos biológicos en que la proteína AtUTr2 está involucrada, pues esperamos que

cambios en los niveles de expresión de una proteína de estudio pueden producir alteraciones en los procesos en que ésta participa. Además, tenemos el antecedente de que la carencia de algún TNA puede producir alteraciones estructurales sobre los polisacáridos producidos en la ruta secretoria y provocar efectos tanto a nivel celular como del organismo completo en organismos eucariontes (Hirschberg, 2001), lo que nos hace pensar que plantas con alteraciones en la expresión de algún TNA pueden tener importantes efectos en su matriz extracelular.

En este trabajo, hemos caracterizado una línea insercional de *Arabidopsis* que posee una inserción de T-DNA 233 bp río arriba del inicio de la traducción del gen que codifica para *AtUTr2* y evaluamos tanto posibles efectos sobre la pared celular como posibles fenotipos existentes en estas plantas.

¿Está la inserción de T-DNA en el 5'UTR del gen *AtUTr2*?

Según la anotación del genoma de TAIR 8 (Swarbreck y col., 2008), la inserción de T-DNA en la línea analizada en este trabajo se encuentra en la región 5'UTR del gen que codifica para *AtUTr2*. En trabajo previo realizado en nuestro laboratorio mediante PCR y análisis de segregación, encontramos que la línea insercional *AtUTr2.1* efectivamente posee una inserción de T-DNA en su genoma. Además, tenemos plantas que poseen ambas copias del gen *AtUTr2* con una inserción de T-DNA, es decir, que son homocigotas para la inserción. Utilizando partidores del gen cercanos al sitio de inserción y utilizando un partidore que empalma con el borde izquierdo del T-DNA, realizamos reacciones de PCR a plantas heterocigotas y homocigotas para la inserción de T-DNA y a plantas silvestres control (**Figura 5**). Interesantemente utilizando ambos partidores del gen que flanquean el sitio de la inserción (partidore a ó b) y el partidore del

borde izquierdo del T-DNA (partidor c), se amplifica una banda al utilizar DNA genómico como templado. Esto nos indica que la inserción de T-DNA es compleja y que probablemente hay dos extremos izquierdos del T-DNA con orientaciones opuestas en el sitio de la inserción. Las plantas *AtUTr2.1*, nombre con el cual denominamos a las plantas con la inserción de T-DNA en ambas copias del gen, posee inserto DNA exógeno de tamaño desconocido que puede alterar la expresión de *AtUTr2*. Por ejemplo, al interrumpir algún elemento en Cis regulatorio presente en la zona de la inserción. Sin embargo, no basta con suponer dichos efectos. Justamente la caracterización de una línea insercional lleva consigo evaluar si esta produce algún efecto sobre la expresión del gen de estudio.

¿Existen alteraciones en la expresión de *AtUTr2* en la línea insercional *AtUTr2.1*?

Contestar esta pregunta es fundamental, pues si la línea *AtUTr2.1* posee alteraciones en la transcripción de *AtUTr2*, se convierte en una muy buena herramienta en la dilucidación del rol biológico de este transportador. La inserción de T-DNA en la línea insercional *AtUTr2.1* se encuentra en la región 5'UTR del transcrito de *AtUTr2*. Sabemos que en los organismos eucariontes, la activación transcripcional de un gen es un fenómeno combinatorio, en el cual participan además de elementos reguladores que se unen a elementos en Cis, complejos rearrreglos de compactación de cromatina (Struhl, 1999). En este contexto, pensar que una inserción de DNA foráneo en la región 5'UTR de un gen puede alterar la transcripción de un gen tiene mucho sentido. Según los análisis realizados, el elemento insercional esta interrumpiendo una secuencia que puede ser reconocida por el factor de transcripción GT-1. Se ha demostrado que la alteración de las cajas que reconoce GT-1 pueden alterar los niveles de expresión inducible

promovidos por este factor de transcripción (Buchel y col., 1999), lo que nos hace pensar en la posibilidad de que una alteración en este elemento Cis regulatorio en el 5'UTR de *AtUTr2* sea responsable de las alteraciones en los niveles de expresión de *AtUTr2* detectadas en las plantas *AtUTr2.1*. Nuestros resultados de experimentos de *Northern blot*, (Figura 7) indican que en la línea insercional existen alteraciones en la expresión del gen *AtUTr2*, pues se observa un mayor tamaño molecular del transcrito y una mayor abundancia de éste. Estos resultados validan el uso de las plantas *AtUTr2.1* en estudios de búsqueda de fenotipos y abre la puerta para posibles estudios posteriores con este gen. Sin embargo, debemos considerar la posibilidad de que en estas plantas, como mecanismo compensatorio a la inserción de T-DNA en el 5'UTR de *AtUTr2*, exista la expresión de otro transcrito reconocido por la sonda utilizada y cuyo nivel de expresión en las plantas silvestres sea muy bajo. Por ejemplo, el transcrito de *AtUTr4* posee dos regiones con un nivel de identidad a nivel nucleotídico del 79 y 81% con la sonda confeccionada con la secuencia codificante de *AtUTr2* y es un transcrito expresado normalmente a muy bajos niveles. Sin duda, el uso en trabajos futuros de otras líneas mutantes en estos genes permitirá por cierto complementar este trabajo, pues muchas preguntas quedan abiertas. ¿En las plantas *AtUTr2.1* habrá más proteína *AtUTr2*? ¿El transcrito de mayor tamaño molecular observado en las plantas *AtUTr2.1* es capaz de ser traducido a una proteína funcional? En este trabajo no desarrollamos alguna metodología que nos permitiera medir niveles de la proteína *AtUTr2*. Sería muy interesante poder evaluar los niveles de proteína *AtUTr2* en las plantas *AtUTr2.1* y contrarrestarlos con las mediciones de transcrito realizadas por *Northern blot*. Así, podríamos efectivamente saber si el transcrito anómalo en tamaño molecular observado

en las plantas *AtUTr2.1* es capaz de ser traducido a proteína. Más aún, es posible incluso realizar mediciones de transporte de nucleótidos azúcar en vesículas de Golgi obtenidas desde plantas *AtUTr2.1* y compararlas con mediciones realizadas en plantas silvestres, para así además de tener información de los niveles de proteína *AtUTr2* en estas plantas, tener mediciones de actividad de transporte.

¿Posee la línea insercional algún fenotipo a nivel de la estructura macroscópica?

Al crecer la línea insercional en tierra o en placas, observamos que no posee un fenotipo morfológico evidente. Esto nos llevó a analizar plantas crecidas en otras condiciones, tal como plantas crecidas en cultivo de tejidos en medio líquido. Esta condición de crecimiento fue la utilizada en los experimentos de expresión que evidencian que hay alteraciones en el transcrito de *AtUTr2* en las plantas *AtUTr2.1*. Al analizar el número de raíces laterales en plantas crecidas en esta condición, observamos que en la línea insercional hay una mayor tendencia a desarrollar estas estructuras (**Figura 9-10**). Las raíces laterales se caracterizan por la importancia que en su iniciación y desarrollo poseen factores como la luz, hormonas, azúcares y elementos de la pared celular (Takahashi y col., 2003; van Hengel y col., 2002). Las raíces laterales se forman desde un primordio que emerge desde la raíz principal y que madura en dos grandes etapas. Primero, el primordio logra emerger gracias a la expansión celular que sufren las células de su base. Segundo, la nueva raíz lateral comienza a elongar, lo que ocurre gracias a un aumento en la división celular (Malamy y col., 1997). Debido a que *AtUTr2* se expresa mucho más en la epidermis que en el resto de las capas radicales y que esta capa de células participa activamente en los procesos de diferenciación y reorganización celular que ocurren para dar origen a una raíz lateral, resulta muy

interesante encontrar una mayor tendencia a formar raíces laterales en las poblaciones de plantas *AtUTr2.1* analizadas (**Figura 2; 9; 10**). Otro experimento que realizamos para evaluar posibles fenotipos en estas plantas, fue el análisis de azúcares en muestras de pared celular. Resultados obtenidos al analizar plantas completas crecidas en cultivo de tejidos, muestran que sí existen diferencias en la línea insercional *AtUTr2.1* con respecto a plantas control (**Figura 12**). Cuando se analizó muestras de pared celular obtenidas desde plantas etioladas crecidas 20 días en cultivo de tejidos líquido al 2% de sacarosa, se observó diferencias en la composición de azúcares totales, observándose un menor contenido de xilosa, arabinosa y un mayor contenido de manosa, fucosa y ramnosa en la línea insercional. Cuando se analizó muestras de pared celular obtenidas desde plantas etioladas crecidas 11 días en cultivo de tejidos 1% de sacarosa, se observó también diferencias en las plantas *AtUTr2.1*, pero sólo la manosa mantuvo su mayor composición en la línea insercional si comparamos con los resultados obtenidos en las plantas crecidas 20 días al 2% de sacarosa. Cuando se analizó muestras provenientes desde hojas de roseta de plantas crecidas en tierra 3,5 semanas, se observaron importantes disminuciones en galactosa y un aumento en manosa en la línea insercional *AtUTr2.1* (**Figura 12-C**). Sin embargo, realizamos una réplica biológica de este experimento y no logramos reproducir estas diferencias (**Figura 12-D**). Nosotros pensamos que una posible explicación a esta falta de reproducibilidad, es el hecho que las plantas fueron crecidas en temporadas distintas del año en una cámara de crecimiento con acceso a luz natural. Es necesario realizar más experimentos para corroborar o descartar las diferencias encontradas, pues diversos factores en las condiciones de crecimiento, tal como la estación del año por ejemplo, pueden estar

alterando los resultados. Cuando en plantas completas crecidas en cultivo de tejidos, en placas o en raíces, se analizó la composición relativa de oligosacáridos de la hemicelulosa más abundante en Arabidopsis, el xiloglucano, se encontró cambios reproducibles en la línea insercional y estadísticamente significativos. Como *AtUTr2* se expresa de forma importante en raíces, analizar el xiloglucano *in situ* en estas estructuras permite evaluar un posible efecto sobre este polímero en un tejido donde un efecto de la inserción podría ser más notorio. Además, es posible compararlo con los perfiles de oligosacáridos de xiloglucano obtenidos en otras condiciones de crecimiento. Interesantemente, tanto en raíces como en plántulas completas o en plantas crecidas en placas o cultivo de tejidos, se observa un aumento en la línea insercional en el contenido del oligosacárido de xiloglucano XXFG acetilado (ver Figura 13-14), oligosacárido que contiene galactosa, xilosa y fucosa. Además, en la línea insercional se observa un aumento en el contenido de oligosacáridos acetilados totales y en contenido de oligosacáridos fucosilados totales. Esto nos indica, que hay un efecto en la línea insercional sobre el xiloglucano, independientemente de la condición de crecimiento o el tejido analizado y que justamente se observan cambios en oligosacáridos que están decorados con residuos de galactosa en su estructura.

¿Qué nos indica el perfil de expresión de *AtUTr2*?

Al analizar el perfil de expresión de *AtUTr2* utilizando datos normalizados de expresión provenientes de experimentos públicos de microarreglos, observamos que *AtUTr2* se expresa en mayor medida en hojas senescentes y en la epidermis de las raíces (Figura 2). Además, podemos ver que sus niveles de expresión aumentan ante distintas condiciones de estrés, tales como tratamientos con temperatura, sal y luz ultravioleta

(Figura 3; 4). Estos resultados nos parecen bastante coherentes en el contexto de un posible papel de *AtUTr2* en la formación de productos glicosilados en la ruta secretoria, ya que se ha descrito que la luz UV produce importantes alteraciones en la pared celular y su metabolismo en células vegetales, pues pese a que ciertos metabolitos secundarios como flavonoides pueden proteger a las plantas de la luz UV, las estructuras superficiales de la planta se ven muy afectadas por este estrés (Kovacs y col., 2002; Li y col., 1993). Además, se ha demostrado que la tolerancia a sales en plantas requiere de la participación de productos glicosilados en la ruta secretoria y que plantas mutantes en la glicosilación de proteínas presentan deficiencias en la formación de elementos de la pared celular (Gillmor y col., 2002; Kang y col., 2008).

Al analizar los perfiles de expresión de *AtUTr2*, observamos importantes aumentos en el nivel de expresión de *AtUTr2* cuando los datos de expresión provienen de plantas crecidas en medio MS líquido tratadas con cicloheximida por 3 horas, un conocido inhibidor de la síntesis proteica. Esta inducción de expresión es específica en respuesta a cicloheximida y no en respuesta al tratamiento en sí de adición del compuesto en el medio de crecimiento, pues la inducción de expresión no ocurre al tratar las plantas con otros compuestos a la misma concentración o con tratamientos control (Tabla suplementaria 1). Estos resultados son muy interesantes, pues ningún otro de los miembros de la familia *AtUTr* posee un aumento tan notorio en su expresión cuando las plantas son tratadas con cicloheximida y la inducción es bastante importante (Tabla suplementaria 1). Desconocemos la razón de esta importante inducción, pero sin duda pensamos que este hallazgo puede ser muy importante para experimentos futuros, pues sabemos que la expresión de *AtUTr2* está relacionada con la de otros miembros de su

familia génica y no tenemos mayor información de cómo se regula la expresión de estos genes. Por ejemplo, en raíces, la expresión de *AtUTr2* aumenta en tratamientos de estrés por frío y decrecen ante tratamientos de alta temperatura. Algo completamente opuesto a lo que ocurre con los niveles de expresión de *AtUTr1* y *AtUTr3*, que en raíces aumentan su expresión cuando las plantas son tratadas a alta temperatura y disminuyen su expresión ante condiciones de crecimiento de estrés por frío continuo (ver Figura 4). Nótese que la expresión de *AtUTr1* y *AtUTr3* está muy correlacionada. *AtUTr2* en cambio, no posee altos niveles de correlación con ninguno de los genes *AtUTr* analizados.

¿Cuál es el rol biológico de *AtUTr2*?

Tanto *AtUTr2* como *AtUTr1* y *AtUTr3* son proteínas de la misma familia génica que han demostrado estar localizadas en la ruta secretoria y que pueden actuar como TNA. Sin embargo, pese a que son genes de la misma familia y a que comparten su función molecular, no necesariamente están involucrados en el mismo proceso metabólico. La proteína *AtUTr1* ha sido recientemente localizada subcelularmente en el retículo endoplásmico y relacionada con un proceso celular denominado UPR (*Unfolded Protein Response*), proceso que permite a la célula responder ante el estrés celular gatillado por la acumulación de proteínas mal plegadas en la ruta secretoria, pues plantas mutantes en esta proteína presentan un aumento en la expresión de otras proteínas asociadas a UPR, como las chaperonas de retículo endoplásmico *Calnexina* y *BIP*. (Reyes y col., 2006). Tanto *AtUTr1* como *AtUTr3* poseen altos niveles de correlación con *Calnexina* y *BIP*, lo que evidencia que estas proteínas están funcionalmente relacionadas. *AtUTr2* en cambio, está localizada en el Golgi y por ende su función de

transporte probablemente juega un papel en los procesos metabólicos que ocurren en este organelo y no con procesos que ocurren en otros compartimentos celulares de la ruta secretoria. Sabemos que dentro de los posibles procesos que utilizan nucleótidos azúcar en el Golgi, está la biosíntesis de hemicelulosas, pectinas y glicoproteínas (Norambuena y col., 2005; Scheible y col., 2004; Somerville y col., 2004). Nuestros resultados y la información reunida hasta la fecha, nos indican que la transcripción de *AtUTr2* está muy regulada y que ante escenarios metabólicos de respuesta a estrés hay una relación funcional entre *AtUTr2* y otras proteínas involucradas en el metabolismo de la pared celular. Además, tenemos evidencias de que en las plantas *AtUTr2.1* hay efectos sobre la composición de xiloglucano, lo que nos hace pensar que parte de la UDP-galactosa incorporada al Golgi por esta proteína puede ser canalizada hacia glicosiltransferasas involucradas en la biosíntesis de este polisacárido, tal como la xiloglucano galactosiltransferasa MUR3 (Madson y col., 2003). Sin embargo, debemos recalcar que hay otros polisacáridos que no fueron evaluados en este estudio directamente y que también pueden estar alterados en las plantas *AtUTr2.1*, pues la UDP-galactosa es sustrato de la biosíntesis de glicoproteínas y de varios otros polímeros de azúcar no celulósicos sintetizados en Golgi además de xiloglucano que potencialmente podrían presentar alteraciones, tales como galactomananos y arabinogalactanos.

CONCLUSIONES

- Los niveles de transcrito de *AtUTr2* cambian drásticamente ante distintas condiciones de crecimiento y responden a tratamientos de estrés.
- La línea insercional *AtUTr2.1* presenta alteraciones en la expresión de *AtUTr2*, donde se observa un mayor tamaño molecular del transcrito y una mayor abundancia de éste.
- En la línea insercional *AtUTr2.1* hay diferencias reproducibles y estadísticamente significativas en la composición relativa de oligosacáridos de xiloglucano.
- Ante escenarios metabólicos de respuesta a estrés hay una relación funcional entre *AtUTr2* y otras proteínas involucradas en el metabolismo de la pared celular.

Muestra	AtUTr1	SD	AtUTr2	SD	AtUTr3	SD	AtUTr4	SD	AtUTr5	SD	AtUTr6	SD
cotiledones	59	1	412	4	133	2	2	1	23	4	102	6
hipocotilos	94	9	162	22	194	9	9	4	22	4	96	1
raíces	80	10	261	3	203	5	10	6	36	2	121	5
hojas senescentes	115	5	940	65	211	13	16	5	30	3	120	9
hojas caulinares	74	12	422	3	128	1	8	3	32	4	105	11
mock por 3h	44	7	266	12	139	16	13	7	24	4	104	15
10uM ibuprofeno 3h	75	11	224	59	187	3	6	0	34	7	113	1
10uM AgNO3 3h	74	20	607	112	230	5	3	2	24	2	111	10
10uM ácido salicílico 3h	163	21	425	58	357	1	10	0	20	0	95	3
10uM cicloheximida 3h	15	0	1510	34	51	6	9	3	27	5	114	6

Tabla suplementaria 1. Datos normalizados de expresión de la familia AtUTr. Se presenta un pequeño grupo de datos de expresión en distintos tejidos y ante distintas condiciones de crecimiento. Los datos provienen de perfiles de expresión de microarreglos ATH1 *Affymetrix*TM normalizados por el método *GCOS*. Estos datos, fueron generados por el consorcio multinacional *AtGenExpress* e incluyen como mínimo una réplica por experimento. Los valores promedios de expresión normalizados se presentan para cada gen. La desviación estándar (SD) de cada nivel de expresión se representa en cada columna SD. Se observa que *AtUTr2* se expresa de forma muy fuerte en hojas senescentes y se induce mucho su expresión cuando las plantas son tratadas 3 horas con cicloheximida.

BIBLIOGRAFÍA

Arioli, T., Peng, L., Betzner, A.S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri, C., Hofte, H., Plazinski, J., Birch, R., Cork, A., Glover, J., Redmond, J. y Williamson, R.E. (1998) Molecular analysis of cellulose biosynthesis in Arabidopsis, *Science*, **279**, 717-720.

Assaad, F.F., Qiu, J.L., Youngs, H., Ehrhardt, D., Zimmerli, L., Kalde, M., Wanner, G., Peck, S.C., Edwards, H., Ramonell, K., Somerville, C.R. y Thordal-Christensen, H. (2004) The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae, *Mol Biol Cell*, **15**, 5118-5129.

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

Baldwin, T.C., Handford, M.G., Yuseff, M.I., Orellana, A. y Dupree, P. (2001) Identification and characterization of GONST1, a golgi-localized GDP-mannose transporter in Arabidopsis, *Plant Cell*, **13**, 2283-2295.

Birnbaum, K., Shasha, D.E., Wang, J.Y., Jung, J.W., Lambert, G.M., Galbraith, D.W. y Benfey, P.N. (2003) A gene expression map of the Arabidopsis root, *Science*, **302**, 1956-1960.

Bonin, C.P., Potter, I., Vanzin, G.F. y Reiter, W.D. (1997) The MUR1 gene of Arabidopsis thaliana encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalyzing the first step in the de novo synthesis of GDP-L-fucose, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2085-2090.

Bouton, S., Leboeuf, E., Mouille, G., Leydecker, M.T., Talbotec, J., Granier, F., Lahaye, M., Hofte, H. y Truong, H.N. (2002) QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in Arabidopsis, *Plant Cell*, **14**, 2577-2590.

Buchel, A.S., Brederode, F.T., Bol, J.F. y Linthorst, H.J. (1999) Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression in vivo, *Plant Mol Biol*, **40**, 387-396.

Carpita, N.C. y Gibeaut, D.M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, *Plant J*, **3**, 1-30.

Dean, N., Zhang, Y.B. y Poster, J.B. (1997) The VRG4 gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the Golgi in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem*, **272**, 31908-31914.

Dhugga, K.S., Barreiro, R., Whitten, B., Stecca, K., Hazebroek, J., Randhawa, G.S., Dolan, M., Kinney, A.J., Tomes, D., Nichols, S. y Anderson, P. (2004) Guar seed beta-mannan synthase is a member of the cellulose synthase super gene family, *Science*, **303**, 363-366.

Dormann, P. y Benning, C. (1998) The role of UDP-glucose epimerase in carbohydrate metabolism of *Arabidopsis*, *Plant J*, **13**, 641-652.

Dupree, P. y Sherrier, D.J. (1998) The plant Golgi apparatus, *Biochim Biophys Acta*, **1404**, 259-270.

Egelund, J., Skjot, M., Geshi, N., Ulvskov, P. y Petersen, B.L. (2004) A complementary bioinformatics approach to identify potential plant cell wall glycosyltransferase-encoding genes, *Plant Physiol*, **136**, 2609-2620.

Elliott, K.A. y Shirsat, A.H. (1998) Promoter regions of the extA extensin gene from *Brassica napus* control activation in response to wounding and tensile stress, *Plant Mol Biol*, **37**, 675-687.

Faik, A., Price, N.J., Raikhel, N.V. y Keegstra, K. (2002) An *Arabidopsis* gene encoding an alpha-xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7797-7802.

Freeze, H.H. (2001) Update and perspectives on congenital disorders of glycosylation, *Glycobiology*, **11**, 129R-143R.

Ge, H., Liu, Z., Church, G.M. y Vidal, M. (2001) Correlation between transcriptome and interactome mapping data from *Saccharomyces cerevisiae*, *Nat Genet*, **29**, 482-486.

Gillmor, C.S., Poindexter, P., Lorieau, J., Palcic, M.M. y Somerville, C. (2002) Alpha-glucosidase I is required for cellulose biosynthesis and morphogenesis in *Arabidopsis*, *J Cell Biol*, **156**, 1003-1013.

Girke, T., Lauricha, J., Tran, H., Keegstra, K. y Raikhel, N. (2004) The Cell Wall Navigator database. A systems-based approach to organism-unrestricted mining of protein families involved in cell wall metabolism, *Plant Physiol*, **136**, 3003-3008; discussion 3001.

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

Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. y Korenaga, T. (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999, *Nucleic Acids Res*, **27**, 297-300.

Hirschberg, C.B. (2001) Golgi nucleotide sugar transport and leukocyte adhesion deficiency II, *J Clin Invest*, **108**, 3-6.

Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana, *Nature*, **408**, 796-815.

Kang, J.S., Frank, J., Kang, C.H., Kajiura, H., Vikram, M., Ueda, A., Kim, S., Bahk, J.D., Triplett, B., Fujiyama, K., Lee, S.Y., von Schaewen, A. y Koiwa, H. (2008) Salt tolerance of Arabidopsis thaliana requires maturation of N-glycosylated proteins in the Golgi apparatus, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 5933-5938.

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

Kovacs, E. y Keresztes, A. (2002) Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells, *Micron*, **33**, 199-210.

Krysan, P.J., Young, J.C. y Sussman, M.R. (1999) T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis, *Plant Cell*, **11**, 2283-2290.

Le Gourrierec, J., Li, Y.F. y Zhou, D.X. (1999) Transcriptional activation by Arabidopsis GT-1 may be through interaction with TFIIA-TBP-TATA complex, *Plant J*, **18**, 663-668.

Lerouxel, O., Choo, T.S., Seveno, M., Usadel, B., Faye, L., Lerouge, P. y Pauly, M. (2002) Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting, *Plant Physiol*, **130**, 1754-1763.

Li, J., Ou-Lee, T.M., Raba, R., Amundson, R.G. y Last, R.L. (1993) Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation, *Plant Cell*, **5**, 171-179.

Liepman, A.H., Nairn, C.J., Willats, W.G., Sorensen, I., Roberts, A.W. y Keegstra, K. (2007) Functional genomic analysis supports conservation of function among cellulose synthase-like a gene family members and suggests diverse roles of mannans in plants, *Plant Physiol*, **143**, 1881-1893.

- Lubke, T., Marquardt, T., Etzioni, A., Hartmann, E., von Figura, K. y Korner, C. (2001) Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency, *Nat Genet*, **28**, 73-76.
- Madson, M., Dunand, C., Li, X., Verma, R., Vanzin, G.F., Caplan, J., Shoue, D.A., Carpita, N.C. y Reiter, W.D. (2003) The MUR3 gene of *Arabidopsis* encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins, *Plant Cell*, **15**, 1662-1670.
- Malamy, J.E. y Benfey, P.N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*, *Development*, **124**, 33-44.
- Munoz, P., Norambuena, L. y Orellana, A. (1996) Evidence for a UDP-Glucose Transporter in Golgi Apparatus-Derived Vesicles from Pea and Its Possible Role in Polysaccharide Biosynthesis, *Plant Physiol*, **112**, 1585-1594.
- Neckelmann, G. y Orellana, A. (1998) Metabolism of uridine 5'-diphosphate-glucose in golgi vesicles from pea stems, *Plant Physiol*, **117**, 1007-1014.
- Norambuena, L., Marchant, L., Berninsone, P., Hirschberg, C.B., Silva, H. y Orellana, A. (2002) Transport of UDP-galactose in plants. Identification and functional characterization of AtUTr1, an *Arabidopsis thaliana* UDP-galactos/UDP-glucose transporter, *J Biol Chem*, **277**, 32923-32929.
- Norambuena, L., Nilo, R., Handford, M., Reyes, F., Marchant, L., Meisel, L. y Orellana, A. (2005) AtUTr2 is an *Arabidopsis thaliana* nucleotide sugar transporter located in the Golgi apparatus capable of transporting UDP-galactose, *Planta*, **222**, 521-529.
- Orfila, C., Sorensen, S.O., Harholt, J., Geshi, N., Crombie, H., Truong, H.N., Reid, J.S., Knox, J.P. y Scheller, H.V. (2005) QUASIMODO1 is expressed in vascular tissue of *Arabidopsis thaliana* inflorescence stems, and affects homogalacturonan and xylan biosynthesis, *Planta*, **222**, 613-622.
- Perrin, R.M., DeRocher, A.E., Bar-Peled, M., Zeng, W., Norambuena, L., Orellana, A., Raikhel, N.V. y Keegstra, K. (1999) Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis, *Science*, **284**, 1976-1979.
- Perrin, R.M., Jia, Z., Wagner, T.A., O'Neill, M.A., Sarria, R., York, W.S., Raikhel, N.V. y Keegstra, K. (2003) Analysis of xyloglucan fucosylation in *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, **132**, 768-778.
- Persson, S., Wei, H., Milne, J., Page, G.P. y Somerville, C.R. (2005) Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 8633-8638.

- Reiter, W.D., Chapple, C. y Somerville, C.R. (1997) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition, *Plant J*, **12**, 335-345.
- Reyes, F., Marchant, L., Norambuena, L., Nilo, R., Silva, H. y 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.
- Rollwitz, I., Santaella, M., Hille, D., Flugge, U.I. y Fischer, K. (2006) Characterization of AtNST-KT1, a novel UDP-galactose transporter from *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett*, **580**, 4246-4251.
- Scheible, W.R. y Pauly, M. (2004) Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights, *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 285-295.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredes, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S. y Youngs, H. (2004) Toward a systems approach to understanding plant cell walls, *Science*, **306**, 2206-2211.
- Steinhauser, D., Usadel, B., Luedemann, A., Thimm, O. y Kopka, J. (2004) CSB.DB: a comprehensive systems-biology database, *Bioinformatics*, **20**, 3647-3651.
- Sterling, J.D., Atmodjo, M.A., Inwood, S.E., Kumar Kolli, V.S., Quigley, H.F., Hahn, M.G. y Mohnen, D. (2006) Functional identification of an *Arabidopsis* pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 5236-5241.
- Struhl, K. (1999) Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes, *Cell*, **98**, 1-4.
- Swarbreck, D., Wilks, C., Lamesch, P., Berardini, T.Z., Garcia-Hernandez, M., Foerster, H., Li, D., Meyer, T., Muller, R., Ploetz, L., Radenbaugh, A., Singh, S., Swing, V., Tissier, C., Zhang, P. y Huala, E. (2008) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation, *Nucleic Acids Res*, **36**, D1009-1014.
- Takahashi, F., Sato-Nara, K., Kobayashi, K., Suzuki, M. y Suzuki, H. (2003) Sugar-induced adventitious roots in *Arabidopsis* seedlings, *J Plant Res*, **116**, 83-91.
- Taylor, N.G., Scheible, W.R., Cutler, S., Somerville, C.R. y Turner, S.R. (1999) The irregular xylem3 locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis, *Plant Cell*, **11**, 769-780.
- Usadel, B., Kuschinsky, A., Steinhauser, D. y Pauly, M. (2005) Transcriptional co-response analysis as a tool to identify new components of the wall biosynthetic machinery., *Plant Biosystems*, **139**, 69-73.

Usadel, B., Schluter, U., Molhoj, M., Gimpans, M., Verma, R., Kossmann, J., Reiter, W.D. y Pauly, M. (2004) Identification and characterization of a UDP-D-glucuronate 4-epimerase in Arabidopsis, *FEBS Lett*, **569**, 327-331.

Usadel B., K.A., Steinhauser D., Pauly M. (2005) Transcriptional co-response analysis as a tool to identify new components of the wall biosynthetic machinery., *Plant Biosystems*, **139**, 69-73.

van Hengel, A.J. y Roberts, K. (2002) Fucosylated arabinogalactan-proteins are required for full root cell elongation in arabidopsis, *Plant J*, **32**, 105-113.

Vincken, J.P., York, W.S., Beldman, G. y Voragen, A.G. (1997) Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG, *Plant Physiol*, **114**, 9-13.

Willats, W.G., McCartney, L. y Knox, J.P. (2001) In-situ analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of Arabidopsis thaliana, *Planta*, **213**, 37-44.

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V. y Provart, N.J. (2007) An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets, *PLoS ONE*, **2**, e718.

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