



ESCUELA DE PREGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**Desarrollo de herramientas para el estudio del papel de
GONST4, un transportador de nucleótidos-azúcar, de
Arabidopsis thaliana.**

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

por

Mariela Huichalaf Carbonell

Junio del 2007

Santiago, Chile.



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

UCH-FC
Biotecnología
H899
C.1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**“Desarrollo de herramientas para el estudio del papel de
GONST4, un transportador de nucleótidos-azúcar, de
Arabidopsis thaliana”**

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

MARIELA HUICHALAF CARBONELL

Dr. Michael Handford

Director Seminario de Título

Dra. Liliana Cardemil Oliva

Codirectora Seminario de Título

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dra. Victoria Guixé Leguía

Presidente Comisión

Dra. Ana Preller Simmons

Correctora



Santiago de Chile, junio de 2007



Mariela Huichalaf Carbonell nació el 21 de septiembre de 1980, creció en el calor de su hogar en Huape, y desde pequeña tuvo un contacto estrecho con la naturaleza, disfrutando del aire limpio, entre animales de granja y paisajes sureños. Al terminar sus estudios secundarios en Chillán, Mariela viaja a Santiago en busca de una carrera que se ajustara a su amor por las Ciencias Naturales, y es así como ingresa a Bachillerato y posteriormente a Ingeniería en Biotecnología Molecular, donde conoce a sus amigos que la acompañarán durante su estadía en Juan Gómez Millas. Su infancia de granjerita y el gran amor por las plantas la llevo a involucrarse en la biología vegetal, tema de ésta tesis y de su trabajo.

Mariela mucha suerte en lo que sigue y esperamos, algún día, poder ir a visitarte o ser tus vecinas en tus futuras cabañas en la costa de Brasil.

Tus amiguis Ferni y Carola



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, Jorge y Patricia por la manera en que me enseñaron a vivir, por su cariño y eterna comprensión. A Alvaro, mi hermano, con quien he vivido y compartido durante estos años de universidad. Y a mis abuelas, Nena y Rosa por ser la base de esta hermosa familia.

Gracias Mike por ser un excelente tutor, por toda tu ayuda y el tiempo que le dedicaste a tu primera tesista. Te deseo lo mejor en tu vida. Gracias a todos quienes forman el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, en donde no solo desarrollé este Seminario de Título, sino que también pasé un par de años aprendiendo del trabajo en equipo, a desarrollar habilidades y creando lazos. Agradezco a Angélica, quien me enseñó a trabajar en el laboratorio y me entregó una gran base de conocimientos que, seguro me servirán toda la vida, gracias Ange también, por tus innumerables consejos. A la Dra. Liliana por ser mi primer tutor cuando realice la monografía que me permitiría egresar de Bachillerato y por, posteriormente, recibirme en su grupo de trabajo.

A Ferni y Carola por la reseña que escribieron para este seminario, por todas las ultra bacanes vacaciones que hemos pasado juntas, los innumerables carretes y por un millón de cosas más, al Pablo y al resto de mis amigos de la U, el Nacho, el Negro, Rafa Márquez, a mi vecino, a la Pilar, la Maca y el Matu, a Taldo Peca, planteam, opa y pitilla por hacer de Juan Gómez Millas, sus gradas y pastos un súper buen lugar para estar.

Un especial agradecimiento a los de Chillán, mis amigos de la vida y de la infancia, el Rolo, la Carla, la Negra, Jaime, la Marce, Alexandri, la Feña, Springfill, Vasquis, el Gato, el Perro, Coyiyo, Miky, Pelao, el Flaco, Juan Pablo, por todas las increíbles e inolvidables jaranas de fines de semana, en la semana, de noche, de tarde y mañana que hemos vivido.



INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	v
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
PAPEL Y COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR.	3
TOPOLOGÍA DE LAS REACCIONES DE GLICOSILACIÓN EN EL APARATO DE GOLGI.	5
FUCOSILACIÓN DE POLISACÁRIDOS Y GLICOPROTEÍNAS	9
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.	12
1.1 Amplificación de GONST1 y 4-V5-His por PCR y su clonación en pGEM-T.	12
1.2 Digestión enzimática.	13
1.3 Ligación.	13
1.4 Purificación por gel de productos de PCR y de digestiones enzimáticas.	14
2. TRABAJO CON BACTERIAS.	15
2.1 Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> .	15
2.2 Transformación de <i>E. coli</i> por golpe térmico.	15
2.3 Purificación del ADN plasmidial.	16
3. TRABAJO CON <i>Arabidopsis thaliana</i> .	16
3.1 Búsqueda de mutantes de <i>gonst4</i> en <i>Arabidopsis</i> .	16
3.2 Cultivo de <i>Arabidopsis</i> .	17
3.3 Extracción de ADN genómico.	17
RESULTADOS	19
1. CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR PARA SOBRE-EXPRESIÓN DE GONST4 EN PLANTAS.	19
2. IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES PUTATIVOS DE <i>GONST4</i> DE <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
DISCUSIÓN Y PROYECCIONES	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34



INDICE DE TABLAS

Tabla I. Partidores utilizados en el presente Seminario de Título _____ 14

Tabla II. Programas de PCR utilizados en el presente Seminario de Título _____ 18



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelos para la biosíntesis de polisacáridos no-celulósicos en el aparato de Golgi vegetal.	6
Figura 2. Amplificación de GONST1-V5-His y 4-V5-His clonados en pGEM-T Easy.	22
Figura 3. Análisis de restricción de GONST1-V5-His y 4-V5-His clonados en pGEM-T Easy.	22
Figura 4. Esquema del desarrollo de la clonación en pBI121.	23
Figura 5. Verificación de la clonación de GONST1-V5-His y 4-V5-His en el vector binario pBI121.	24
Figura 6. Esquema de las tres mutantes insercionales putativas de ADN-T de GONST4 identificadas en <i>Arabidopsis</i> .	25
Figura 7. Las semillas provenientes de las líneas SALK mutantes en <i>gonst4</i> adquiridas muestran un fenotipo sensible a kanamicina.	26
Figura 8. Las líneas SALK A, B y C presentan una inserción de ADN-T en el lugar predicho de GONST4.	27



LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADN-T	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
AGPs	Proteínas Arabinogalactanos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Csl	Glicosiltransferasa tipo celulosa sintasa
DMSO	Dimetilsulfoxido
dNTP	desoxirribonucleico trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GAPA	Gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa subunidad A
GDP	Guanosín difosfato
GONST	Transportador nucleótido-azúcar Golgi
GUS	β -glucoronidasa
His	Histidina
kb	Kilobases
LB	Medio Luria-Bertani
MS	Medio Murashige-Skoog
NPTII	Neomicina fosfotransferasa II
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RG I	Ramnogalacturonano I
RG II	Ramnogalacturonano II
TNA	Transportador de nucleótido azúcar
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UDP	Uridin difosfato
UTR	Región no traducida



RESUMEN

En plantas, la pared celular es un compartimiento dinámico con importantes funciones fisiológicas. Está compuesta de polisacáridos, glicoproteínas y compuestos fenólicos. En el lumen del aparato de Golgi se sintetizan hemicelulosas y pectinas, polisacáridos no-celulósicos y se adicionan azúcares a las proteínas de secreción. Ambos procesos son catalizados por glicosiltransferasas, enzimas que poseen su sitio catalítico en el lumen del Golgi y que requieren, como sustrato de nucleótidos-azúcar sintetizados en la fase soluble del citoplasma. Por esto es indispensable la entrada de nucleótidos-azúcar al lumen del organelo. Esta importación es realizada por transportadores de nucleótidos-azúcar (TNAs) específicos en plantas y en otros organismos.

En este Seminario de Título se desarrollaron dos herramientas para estudiar GONST4, un TNA putativo de *Arabidopsis thaliana*. GONST4 posee características moleculares de TNAs y es ortólogo a transportadores de GDP-fucosa ya caracterizados. Por lo tanto, y con estos antecedentes bioinformáticos, creemos que este TNA es el mejor candidato para transportar GDP-fucosa, un sustrato requerido para la modificación de glicoconjugados específicos. Primero, se diseñó un vector para sobre-expresar GONST4 de manera transitoria en *Nicotiana tabacum* y así determinar la especificidad de sustrato de este transportador. Además, esta misma construcción nos permitirá sobre-expresar GONST4 en forma permanente en *Arabidopsis*. Segundo, en bases de datos públicas se identificaron tres líneas de mutantes de *gonst4* insercionales e independientes. Las plantas con mayor y menor expresión de este TNA servirán como herramientas poderosas para comenzar a dilucidar la función *in planta* de GONST4.

ABSTRACT

In plants, the cell wall is a dynamic compartment that plays important physiological roles. It is composed of polysaccharides, glycoproteins and phenolic compounds. Non-cellulosic polysaccharides, such as hemicelluloses and pectins are synthesised in the lumen of the Golgi apparatus and secreted proteins are also glycosylated in this organelle. Both processes are catalysed by enzymes called glycosyltransferases whose active sites face the Golgi lumen and which require cytosolically-synthesised nucleotide-sugars as substrates. For this reason, nucleotide-sugar uptake into the Golgi lumen is essential. This role is achieved in plants and other organisms by specific nucleotide-sugar transporters (NSTs).

In this work, two tools for the study of GONST4, a putative NST of *Arabidopsis thaliana* were developed. GONST4 possesses the molecular characteristics of an NST and is an orthologue of well-characterised GDP-fucose transporters. Therefore, based on bioinformatic analyses, we believe that GONST4 is the most likely candidate for the transport of GDP-fucose, a substrate required for the modification of specific glycoconjugates. Firstly, a vector for transiently over-expressing GONST4 in tobacco was designed in order to determine the substrate specificity of this transporter. The same construct will also be used to stably over-express GONST4 in *Arabidopsis*. Secondly, three independent *gonst4* insertion lines were identified in public databases. The plants with higher and lower expression will be powerful tools for determining the roles of GONST4 *in planta*.

INTRODUCCIÓN

PAPEL Y COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR.

Las células vegetales se encuentran rodeadas por una matriz extracelular denominada pared celular. Ésta determinará la expansión, forma y crecimiento de la célula vegetal, ejerciendo una profunda influencia sobre el desarrollo, la morfología y la rigidez de todo el organismo. Además representa la primera línea de defensa contra la penetración de patógenos y de sus vectores (Handford, 2006). La pared celular está depositada en una serie de capas, y cada una de éstas está formada por diversos polisacáridos, proteínas y compuestos fenólicos. El componente principal son los polisacáridos, y la síntesis de sus diversas estructuras es altamente compartimentalizada en la célula.

Polisacáridos, componentes mayoritarios en la pared celular.

El polisacárido de mayor abundancia en la pared celular es celulosa, sintetizada sobre la membrana plasmática, y exportada directamente hacia ella. Por otra parte se encuentran los polisacáridos no celulósicos como pectinas y hemicelulosas. Estos son sintetizados y glicosilados en el lumen del aparato de Golgi por glicosiltransferasas, para luego ser exocitados a la membrana plasmática para la deposición extracelular.

Las pectinas determinan la porosidad de la pared y sirven como moléculas de reconocimiento que alertan a las células vegetales sobre la presencia de organismos simbioses, patógenos e insectos (Carpita & McCann, 2000). Dentro de las pectinas relevantes se encuentra ramnogalacturonano II (RG II).

Las hemicelulosas son los glicoconjugados de soporte mayoritarios en la pared celular y son importantes ya que entregan diversidad de formas a las distintas matrices de

polisacáridos (Fry, 2000). En dicotiledóneas la principal hemicelulosa es el xiloglucano que entrecruza las microfibrillas de celulosa, aunque también existen otras como manano y glucomanano.

Proteínas estructurales de la pared celular.

Las proteínas estructurales, al igual que todas las proteínas de secreción son sintetizadas y glicosiladas en el retículo endoplasmático. Luego, el árbol de glicosilaciones sufre modificaciones específicas en el lumen del aparato de Golgi mediado por glicosiltransferasas. La glicoproteína madura es transportada en vesículas a la superficie celular (Handford y col. 2006).

Cabe destacar que en todos los casos de glicosilación, tanto los polisacáridos no celulósicos como las proteínas, los sustratos requeridos por las glicosiltransferasas son azúcares activados por un nucleótido – nucleótido-azúcar, siendo los principales UDP-azúcares y GDP-azúcares.

***Arabidopsis thaliana*, la planta modelo.**

Los procesos de síntesis de los diferentes componentes de la pared celular son ampliamente estudiados en *Arabidopsis*, especie con características que la han convertido en planta modelo de estudio. *Arabidopsis* es la planta con flores que presenta el genoma más pequeño que se conoce, éste ha sido secuenciado (Xiaoying y col, 1999; Mayer y col, 1999) y presenta alrededor de 25.500 genes putativos. Esta planta es sencilla, pequeña, prolífica, se cultiva fácilmente y tiene un tiempo de reproducción corto, produciendo semillas bajo condiciones de laboratorio, entre la 8ª y 10ª semanas después de sembradas. Además es una planta de fácil manejo genético, lo que permite la

obtención de mutantes. Al respecto, esfuerzos internacionales pretenden mutagenizar sistemáticamente todos los genes de la planta.

TOPOLOGÍA DE LAS REACCIONES DE GLICOSILACIÓN EN EL APARATO DE GOLGI.

El aparato de Golgi es el organelo especializado en la transferencia de azúcares a polisacáridos y glicoproteínas (Fincher y col, 1983).

La adición de azúcares es catalizada por glicosiltransferasas tipo II.

Las glicosiltransferasas tipo II tienen su sitio catalítico en el lumen del aparato de Golgi, lugar donde catalizan las reacciones de transferencia de azúcares. Como se mencionó anteriormente, el sustrato para las glicosiltransferasas es un azúcar activado por un nucleótido, un nucleótido-azúcar (Feingold & Avigad 1980). Todos los GDP-azúcares (GDP-D-manosa, GDP-L-fucosa, GDP-D-glucosa y GDP-D-galactosa) son sintetizados fuera del organelo, en la fase soluble del citoplasma, en reacciones bien caracterizadas (Seifert, 2004). Por lo tanto, se vuelve indispensable la presencia de transportadores de GDP-azúcares en la membrana del aparato de Golgi, que permitan internalizar los sustratos para las glicosiltransferasas del lumen. La existencia de transportadores de nucleótidos-azúcar (TNAs) ha sido recién descubierta en plantas por lo que hasta la fecha pocos TNAs han sido estudiados a nivel molecular y funcional.

Transportadores de nucleótidos-azúcar en plantas.

Los TNAs actúan como antiportadores, importando nucleótidos-azúcar específicos a la vez que exportan su correspondiente nucleósido-monofosfato (Figura 1A). Se predice que las proteínas TNA son altamente hidrofóbicas y que presentan entre 300-350

aminoácidos de largo. Algoritmos de determinación de dominios transmembrana estiman un número de 6-10 dominios α -hélice (Baldwin y col, 2001, Norambuena y col, 2002). En plantas, el primer TNA identificado y caracterizado fue GONST1, un transportador presente en el Golgi capaz de transportar GDP-manosa (Baldwin y col, 2001). GONST1 es miembro de un grupo de proteínas denominadas GONST. Todas las proteínas GONST poseen la secuencia GX(L/V)NK, un dominio de unión al motivo GDP de un GDP-azúcar, altamente conservado en TNAs de GDP-azúcares de *Saccharomyces cerevisiae* y *Leishmania donovani* (Hong y col, 2000; Gao y col, 2001). Además, el largo y los perfiles de hidrofobicidad son similares, presentan 10 dominios trans-membrana putativos y en el carboxilo terminal del primer dominio, expuesto hacia el lumen del aparato de Golgi, están los residuos NK conservados de unión a nucleótidos monofosfatos (Handford y col, 2006).

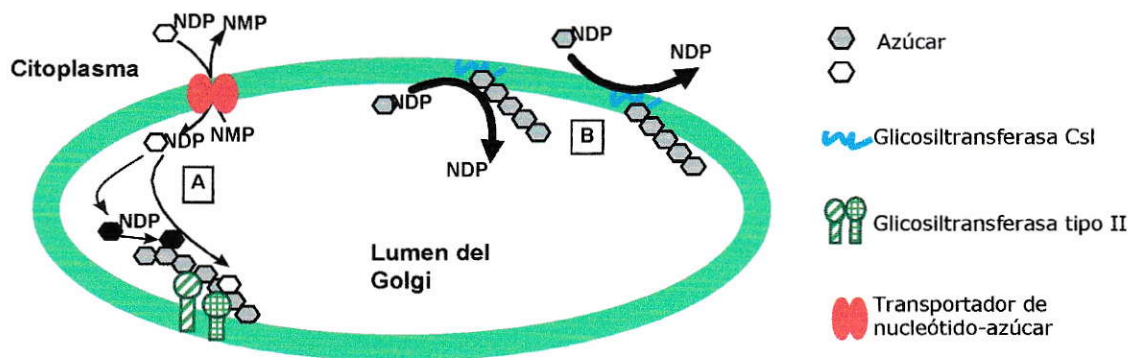


Figura 1: Modelos para la biosíntesis de polisacáridos no-celulósicos en el aparato de Golgi vegetal.

A. Se requiere de glicosiltransferasas tipo II, ancladas en la membrana, para la glicosilación de polisacáridos no-celulósicos y glicoproteínas. Estas enzimas requieren la actividad de transportadores para la importación de su sustrato, nucleótidos-azúcar. **B.** Síntesis luminal de polisacáridos no-celulósicos catalizada por glicosiltransferasas tipo celulosa-sintasa (Csl). No se sabe si estas enzimas necesitan de un nucleótido-azúcar citoplasmático o luminal.

La identificación de TNAs localizados en el aparato de Golgi permitirá estudiar la importancia de estas proteínas en la síntesis de glicoconjugados, además de entregar un potencial punto de control a la síntesis de éstos vía control del nivel de sustrato.

GONST4, un posible transportador de GDP-fucosa.

Se ha descrito que las plantas requieren de cuatro GDP-azúcares; GDP-manosa, GDP-glucosa, GDP-galactosa y GDP-fucosa (Feingold & Avigad 1980). GDP-manosa y GDP-glucosa son requeridas para la síntesis de manano y glucomanano, GDP-galactosa sólo es utilizada en la glicosilación de ramnogalacturonano II (RG II), en tanto que GDP-fucosa es requerida para la glicosilación de los polisacáridos RG II, xiloglucano y para las cadenas laterales de glicoproteínas *N*-enlazadas y proteínas arabinogalactanos *O*-enlazadas (AGPs).

Proponemos que GONST4 sería un excelente candidato para transportar GDP-fucosa, utilizada en la glicosilación de los glicoconjugados recién mencionados. A continuación se exponen evidencias que apoyan lo propuesto.

GONST4 es una proteína ampliamente expresada que se localiza en el aparato de Golgi (Handford y col, 2004) y al igual que todas las proteínas de la familia GONST presenta un dominio de unión a GDP altamente conservado. Además, GONST4 es ortólogo cercano de los transportadores de GDP-fucosa de *L. donovani* y de *S. cerevisiae* (Hong y col, 2000). Estas evidencias nos muestran la afinidad potencial de GONST4 por GDP-fucosa. Por otra parte existen antecedentes que nos llevan a pensar que este TNA no transportaría GDP-manosa ni GDP-glucosa, aunque no se puede descartar que transporte GDP-galactosa. Handford y col, (2004) demostraron que células de *S.*

cerevisiae con defectos en la manosilación de quitinasa (*vrg4-2*) podían revertir su fenotipo por expresión de GONST1, lo que no ocurría por la expresión de GONST4. Esto indica que GONST4 no logra mediar de manera eficiente el transporte de GDP-manosa necesario para rescatar el defecto en la glicosilación de quitinasa. Por otro lado, Liepman et al., (2005) demostraron *in vitro*, que los polisacáridos manano y glucomanano eran sintetizados por enzimas multifuncionales, las glicosiltransferasas tipo celulosa sintasa (Csl), capaces de captar GDP-manosa y GDP-glucosa desde la fase soluble del citoplasma, transferirlas al lumen del Golgi y al mismo tiempo catalizar la reacción de síntesis de estos polisacáridos (Figura 1B). Estos experimentos demuestran que una Csl, y no un TNA es responsable de la internalización de ambas GDP-azúcares. Con respecto a GDP-galactosa mutantes de *Arabidopsis* en GONST1 exhiben un fenotipo enano con tallos débiles igual al que se presenta en plantas con un RG II sin residuos de galactosa, tal como el mutante *nolac-H18* de *Nicotiana tabacum* (tabaco; Iwai y col., 2002). Ya que aún no se ha logrado determinar que las plantas *gonst1* mutantes presenten un RG II sin galactosa producto de la falta en el transporte de esta GDP-azúcar, no se puede descartar el hecho de que GDP-galactosa sea internalizada al Golgi por GONST4.

Hasta la fecha, no se ha descrito ningún transportador de GDP-fucosa en plantas, y considerando que este azúcar es requerido para la glicosilación de RG II, xiloglucano, glicoproteínas *N*-enlazadas y proteínas AGPs, postulamos que GONST4 sería el mejor candidato para el transporte de este nucleótido-azúcar.

FUCOSILACIÓN DE POLISACÁRIDOS Y GLICOPROTEÍNAS.

En *Arabidopsis*, y en dicotiledóneas en general, el xiloglucano es la hemicelulosa de soporte mayoritaria, constituyendo el 20% de la pared celular (Zablackis y col, 1995). Este polisacárido presenta terminales de fucosa adheridos por la α 1, 2 fucosiltransferasa, *AtFUT1* (Perrin y col, 1999).

El déficit en GDP-manosa-4,6-dehidratasa, primera enzima en la síntesis de GDP-fucosa a partir de GDP-manosa en la fase soluble del citoplasma, provoca que los mutantes *mur1* presenten un fenotipo enano y tallos débiles. Esta condición es producto de la carencia total de fucosa en la pared celular (Reiter y col, 1993; Bonin y col, 1997). El déficit de este azúcar se observa en todos los glicoconjugados fucosilados, lo que altera a la planta en su totalidad. Este fenotipo puede ser revertido en un medio rico en fucosa, lo que indica que tanto la entrada del azúcar como la fucosilación de los glicoconjugados se encuentra funcionando (Reiter y col, 1993). Por otra parte, el análisis de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresan esta enzima no muestra un xiloglucano más fucosilado, lo cual se debe a una limitación en la entrega de GDP-fucosa (Perrin y col, 2003).

RG-II es el otro polisacárido que se encuentra glicosilado con fucosa. Ryden y col. (2003) indican que esta glicosilación es completamente necesaria para que esta pectina contribuya a la resistencia y tensión de la pared celular. En los mutantes *mur1* la fucosa es reemplazada por galactosa, lo que altera la estructura de RG II al reducir su estabilidad (O'Neill y col, 2001).

Entre los constituyentes proteicos de la pared celular glicosilados con fucosa, se encuentran las proteínas AGPs y las glicoproteínas *N*-enlazadas. Se sabe que las AGPs

están involucradas en procesos de proliferación celular, expansión celular, embriogénesis somática y muerte celular (Perez-Almeida & Carpita, 2006). El análisis realizado de las AGPs de raíces en los mutantes *mur1* indica que la reducción de fucosa provoca una disminución de la elongación de las células de la raíz en un 50% (van Hengel & Roberts, 2002). Por otro lado, para el grupo de glicoproteínas *N*-enlazadas, la glicosilación constituye un proceso esencial para su correcto plegamiento y destinación (Lerouge y col, 1998).

Por lo tanto, la fucosa es un azúcar ampliamente encontrado en cadenas laterales de varios glicoconjugados sintetizados en el Golgi, tales como xiloglucano, RG II, glicoproteínas *N*-enlazadas y AGPs. Además, la glicosilación con este azúcar es, en muchos casos, estructural y funcionalmente necesaria. Como se mencionó anteriormente, GONST4 es un excelente candidato para el transporte de GDP-fucosa, y ya que no se ha determinado que este nucleótido-azúcar sea transportado por este TNA, es que se necesita de herramientas biológicas para determinar su especificidad de sustrato y para dilucidar su papel *in vivo* mediante la identificación y creación de mutantes de *Arabidopsis* con niveles de expresión de GONST4 alterados. Además, estas herramientas servirán para seguir estudiando la función de los glicoconjugados en plantas a través del conocimiento del control de su síntesis, utilizando como modelo de estudio a *Arabidopsis*.

Por lo tanto, se plantearon como objetivos de este Seminario:

OBJETIVOS

1. Construcción de un vector para sobre-expresión de GONST4 en plantas.
2. Identificación de mutantes putativos de *gonst4* de *Arabidopsis thaliana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

El ADNc de *GONST1* y *4* proviene de los vectores para expresión en *S. cerevisiae* pYES-DEST52-GONST1 y pYES-DEST52-GONST4 (Handford y col, 2004). En este vector, *GONST1* y *4* están acoplados en el extremo 3' al epítipo V5 y a una cola de polihistidina (6xHis). Para clonar GONST1-V5-His y 4-V5-His en pBI121, un vector binario apto para su sobre-expresión en plantas, se amplificaron los TNAs acoplados a los epítipos desde pYES-DEST52 por PCR. Luego de subclonar los fragmentos obtenidos en pGEM-T Easy (Promega) se insertó, mediante digestión enzimática y ligación GONST1-V5-His y 4-V5-His en pBI121. Estos TNAs clonados en pBI121 están bajo el control del promotor fuerte y constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor.

1.1 Amplificación de GONST1 y 4-V5-His por PCR y su clonación en pGEM-T.

Para la construcción de los vectores de sobre-expresión de GONST1 y 4 se diseñaron partidores específicos contra sus ADNcs, estos partidores presentan sitios de restricción compatibles con el vector binario pBI121. GONST1 se usó como control positivo. En el extremo 5' el partidor introduce un sitio de corte para *Bam*HI e incluye el codón ATG del comienzo de la traducción. El partidor 3' es el mismo para los dos genes, éste contiene un sitio de corte para *Sac*I e hibrida con el extremo 3' de la cola de polihistidina de cada gen (Tabla I). Cada reacción de PCR contenía 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 0,5 μM de cada partidor, 1 U Taq ADN polimerasa (Fermentas) con su

buffer correspondiente y 1 ng de pYES-DEST52-GONST1 o pYES-DEST52-GONST4 en un volumen total de 20 µl. El programa de PCR utilizado se denomina *Mike 2* (Tabla II). Luego de la amplificación se separaron los productos de la reacción de PCR por electroforesis en un gel de agarosa 1% en TAE 1x (Tris-base 40 mM, ácido acético glacial 19 mM y EDTA 1 mM pH 8) y luego se purificó el fragmento de interés (Materiales y Métodos 1.4). Finalmente se ligó a pGEM-T Easy según instrucciones del fabricante y se transformó *E. coli* cepa DH5α según 2.2.

1.2 Digestión enzimática.

Las digestiones enzimáticas de pGEM-T-GONST1-V5-His y pGEM-T-GONST4-V5-His se realizaron, según los sitios de corte introducidos en los partidores diseñados, con *Bam*HI (Fermentas) y *Sac*I (Biolabs) en una reacción doble por 60 minutos a 37 °C en buffer Tango 1x (Fermentas). El producto de la digestión se purificó desde un gel de agarosa 1% según 1.4.

1.3 Ligación.

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo a 16 °C durante toda la noche con T4 ADN ligasa proveniente del sistema de pGEM-T Easy. La proporción de la concentración de (ADN inserto/ADN vector) fue de 3:1 y 30:1 en la clonación con pGEM-T Easy y pBI121 respectivamente. La fórmula usada para calcular esta relación es la siguiente:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{kb de inserto} \times \text{razón inserto/vector}}{\text{kb vector}} = \text{ng inserto}$$

(1 kb para el inserto, 3 kb para el vector pGEMT y 14,8 kb para el vector pBI121)

1.4 Purificación por gel de productos de PCR y de digestiones enzimáticas.

Los productos de PCR y de las digestiones enzimáticas se separaron en geles de agarosa 1% en TAE 1x (1.1 y 1.2). Luego de aislar los productos correspondientes del gel utilizando un bisturí, se purificó el ADN de interés a través del sistema Promega Wizard según las instrucciones del fabricante.

Tabla I. Partidores utilizados en este Seminario de Título. Partidores para la amplificación de los genes GONST1 y 4 clonados en los vectores pYES-DEST52 de expresión en *S. cerevisiae*, para su clonación en pGEM-T Easy. Además se muestran los partidores usados para la comprobación de la presencia de las inserciones de ADN-T de las líneas mutantes en GONST4; SALK_094857, SALK_022606 y SALK_122257.

Partidor	Secuencia partidor	Descripción
GONST1 5' BamHI	GTAAGGATCCATGAAATTGTACGAACAC	Junto a His 3' amplifica el ADNc completo de GONST1. Sitio BamHI subrayado
GONST4 5' BamHI	GTAAGGATCCATGTCGTCCTCTCGATTC	Junto a His 3' amplifica el ADNc completo de GONST4. Sitio BamHI subrayado
His 3'	GGCAGAGCTCAGCGGGTTTAAACTCA	Amplifica desde la cola myc-His. Sitio SacI subrayado.
LB	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	Hibrida con la región 3' del ADN-T. Amplifican las zonas entre el borde izquierdo de la inserción y el extremo 3' de GONST4.
3'	ATGGATATGAGGATAATGTGA	Hibrida con la región 3' del ADN genómico de GONST4 en <i>Arabidopsis</i> , incluyendo el codón de termino de traducción del ADN.
GAPA-F	GGTAGGATCGGGAGGAAC	Hibrida con una región 3' interna del ADN de la gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa.
GAPA-R	CTGGTGCCAAGAAGGTTATC	Hibrida con una región 5' interna del ADN genómico de la gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa

2. TRABAJO CON BACTERIAS.

2.1 Preparación de células competentes de *Escherichia coli*.

Se llevaron células de *E. coli* (cepa DH5 α) a un estado de competencia para una transformación del tipo golpe térmico. El preinoculo bacteriano se creció a 37 °C en medio Luria-Bertani (LB; cloruro de sodio 1%, triptona 1% y de extracto de levadura 0,5%) con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3-0.4 a 600 nm, luego se sedimentaron las células a 1000 x g por 10 minutos a 4 °C y se resuspendieron en TSS 1x (polietilenglicol 10%, DMSO 5%, MgCl₂ 1%, medio LB 84%) usando 1/10 del volumen inicial. Finalmente las células se congelaron rápidamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C.

2.2 Transformación de *E. coli* por golpe térmico.

A 200 μ l de las células competentes (descongeladas en hielo) se les agregó 100 ng de plásmido, se dejaron en hielo 15 minutos, luego se incubaron a 42 °C por 1 minuto y se devolvieron a hielo por 2 minutos. A éstas se les adicionó 1 ml de medio LB líquido estéril precalentado y se incubaron 60 minutos con agitación a 37 °C. Finalmente, las células fueron sembradas en placas LB (cloruro de sodio 1%, tristona 1%, de extracto de levadura 0,5% y agar 1,5%) con el respectivo antibiótico; 100 μ g/ml de ampicilina para las células transformadas con los vectores pYES-DEST52 o pGEM-T Easy y 50 μ g/ml de kanamicina (kan) para las células transformadas con pBI121. Todo el procedimiento se realizó bajo condiciones de esterilidad.

La identificación de las colonias positivas se realizó por PCR (programa *Mike 2*; Tabla II) utilizando los partidores 5' *Bam*HI específicos para cada ADNc de los genes GONST

junto al partidor 3'His común con las condiciones descritas en 1.1. Se pincharon las colonias que crecieron en el medio selectivo y se usaron como templados.

2.3 Purificación del ADN plasmidial.

Las colonias de *E. coli* transformadas con los TNAs clonados en pGEM-T Easy y pBI121 que resultaron positivas por PCR, se crecieron durante toda la noche en medio LB líquido con el respectivo antibiótico. Se guardó una alícuota de cada uno de estos clones a -80 °C en glicerol al 60%. Al resto del cultivo se le extrajo el ADN plasmidial a través de purificación por sistemas comerciales según instrucciones del fabricante (Promega), y se almacenó a -20 °C. El ADN elegido para continuar con la clonación fue verificado por una doble digestión enzimática con *Bam*HI y *Sac*I, y además por PCR con las mismas condiciones y partidores ya señalados (1.1 y 1.2).

3. TRABAJO CON *Arabidopsis thaliana*.

3.1 Búsqueda de mutantes de *gonst4* en *Arabidopsis*.

La identificación de mutantes putativas de *gonst4* de *Arabidopsis* se realizó a través de la búsqueda en el dominio público “*Arabidopsis thaliana* insertion database” (www.atidb.org). Usando el número de Acceso de GONST4 (At5g19980) se identificaron tres líneas de mutantes insercionales putativas independientes provenientes de la colección SALK (signal.salk.edu; Alonso y col, 2003). Desde la base de datos, se solicitaron las semillas de las tres líneas que corresponden a la tercera generación (T3). Todas las líneas SALK poseen un ADN-T de un tamaño de 4,5 kb, en el que se encuentra el gen *NPTII* que otorga resistencia al antibiótico kanamicina. Esta descrito

que este ADN-T, por su gran tamaño debería impedir la expresión de cualquier gen que interrumpa (Alonso y col, 2003).

3.2 Cultivo de *Arabidopsis*.

Las semillas de *Arabidopsis* silvestres y de mutantes putativas de *gonst4*, ambas ecotipo Columbia fueron crecidas en placas de MS (mezcla de sales básicas Murashige & Skoog 0,44%, mioinositol 100 ppm, fitoagar 0,7% y sacarosa 30% llevado a pH 5,8 con KOH) suplementado con kanamicina (50 µg/ml) o en una mezcla de tierra de hoja y vermiculita (2:1) estéril. Se sembraron 8-10 semillas de cada línea mutante de T3 y 8-10 semillas silvestres las cuales fueron propagadas a 23 °C con 16 hr luz/8 hr oscuridad.

3.3 Extracción de ADN genómico.

Para verificar la presencia y la ubicación del inserto de ADN-T en el genoma de *Arabidopsis* se extrajo ADN según el procedimiento descrito por Murray & Thompson (1980). Se tomó una hoja de cada una de las 10 plantas de 5 semanas de edad, estas se juntaron y congelaron en N₂ líquido. Luego se maceraron en 0,6 ml de buffer de extracción CTAB (cetil trimetil amonio bromuro 2%, NaCl 5 M, EDTA 0,5 M y Tris HCl 1 M pH 8) y se incubaron a 70 °C por 30 minutos. Se agregó 0,4 ml más de buffer y se volvió a incubar a 70 °C por 15 minutos. Para separar las proteínas y el exceso de polisacáridos, se adicionó ½ volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) se invirtió repetidamente y se centrifugó a 16.100 x g por 10 minutos. Se rescató el sobrenadante, se dejó precipitar el ADN con 1 volumen de isopropanol a -20 °C por 30 minutos, se centrifugó a 16.100 x g por 10 minutos y se lavó el sedimento con etanol al 70% centrifugando por 5 minutos a 16.100 x g. Finalmente se retiró el etanol, se dejó

secar el sedimento a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µl de buffer Tris HCl 10 mM pH 8 con 1 µg de RNAasa A (Fermentas). Para cada reacción de PCR se usaron 0,5 µl del ADN extraído y la misma mezcla de reacción ya señalada (1.1). Se verificó la presencia de ADN-T a través de la amplificación con partidores diseñados contra el extremo 3' o borde izquierdo de la inserción (partidor LB) junto con el extremo 3' de la secuencia genómica de GONST4 (Tabla I) usando el programa *PCR55* (Tabla II). Se verificó la calidad del ADN por PCR con partidores para el gen esencial de la subunidad A de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPA, Número de Acceso At3g26650; Tabla I) usando el programa *Mike 11* (Tabla II).

Tabla II. Programas de PCR utilizados en este Seminario de Título. A. Programa de PCR usado para amplificar GONST1-V5-His y GONST4-V5-His a partir de los vectores pYES-DEST52-GONST1 y pYES-DEST52-GONST4. B. Programa usado para la verificación de las inserciones de ADN-T de las líneas de mutantes de *gonst4* de *Arabidopsis* A, B y C. C. Programa usado para la verificación de la calidad del ADN extraído desde *Arabidopsis*.

A. Mike 2

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	94 °C	5 min	1
2	1	94 °C	30 seg	30
	2	50 °C	1 min	
	3	72 °C	1 min 30 seg	
3	1	72 °C	10 min	1
		4 °C	∞	

B. PCR55

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	94 °C	2 min	1
2	1	94 °C	15 seg	10
	2	55 °C	30 seg	
	3	72 °C	2 min	
3	1	94 °C	15 seg	30
	2	55 °C	30 seg	
	3	72 °C	2 min + 5 seg/ciclo	
4	1	72 °C	10 min	1
		4 °C	∞	

C. Mike 11

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
1	1	94 °C	5 min	1
2	1	94 °C	30 seg	30
	2	58 °C	30 seg	
	3	72 °C	1 min	
3	1	72 °C	10 min	1
		4 °C	∞	

RESULTADOS

1. CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR PARA SOBRE-EXPRESIÓN DE GONST4 EN PLANTAS.

El propósito de diseñar un vector de expresión de GONST4 en plantas es, primero determinar la especificidad de sustrato de este TNA a través de ensayos de transporte con vesículas de Golgi aisladas desde tejido que sobre-exprese GONST4. La extracción de un volumen de Golgi suficiente para realizar estos ensayos requiere de grandes cantidades de tejido por lo que el sistema elegido para determinar la especificidad de sustrato de este TNA es *N. tabacum* (tabaco), el cual ha sido utilizado anteriormente para el análisis de la especificidad de sustratos de otros TNAs de plantas (Norambuena y col, 2005). Las hojas de tabaco podrán ser transformadas de forma transitoria logrando obtener vesículas de Golgi que sobre-expresen GONST4 en cantidades suficientes (100 g) y en pocos días (4-7). La transformación de estas hojas se realizará por infiltración mediada por jeringa de una suspensión que contenga a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* portadora del vector binario que, a su vez porta el gen de interés. En segundo lugar, se utilizará este mismo vector para transformar de manera

permanente *Arabidopsis* y generar líneas con mayor expresión del TNA. La transformación permanente se realiza sumergiendo las inflorescencias de plantas de *Arabidopsis* con la misma suspensión de *Agrobacteria* portadora del vector de interés. De esta manera y debido a la naturaleza del promotor que se encuentra dirigiendo la expresión de GONST4 (promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor) se logrará tener líneas de plantas que sobre-expresen GONST4 en todas las etapas de su desarrollo y en todos sus órganos.

En forma paralela se trabajó con GONST1, un TNA de *Arabidopsis* que al expresarse en *S. cerevisiae*, un sistema heterólogo de expresión, es capaz de transportar GDP-manosa (Baldwin y col 2001). Debido a que se conoce que GONST1 transporta GDP-manosa, este TNA servirá como control en los ensayos de determinación de la especificidad de sustratos de GONST4.

Para lograr la construcción del vector de expresión de GONST1 y 4 en plantas, se clonaron estos TNAs acoplados a un doble epítipo (V5-His) en un vector binario adecuado para la expresión tanto transitoria como permanente en plantas. El vector elegido fue pBI121 (Chen y col, 2003), con resistencia a kanamicina y que, como se planteó, deja a estos TNAs bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor.

Como fuente de GONST1 y 4, se tienen ambos TNAs clonados en el vector para expresión en *S. cerevisiae* pYES-DEST52 (Handford y col, 2004). El extremo 3' del ADNc de este vector se encuentra acoplado al epítipo V5 y a una cola de polihistidina (6xHis). Se usarán estos epítipos para detectar la expresión de los TNAs mediante

inmunodetección con extractos proteicos de las plantas transformadas en forma transitoria o permanente.

Para completar la clonación desde pYES-DEST52 GONST1 o 4 hasta el vector binario pBI121 se diseñaron partidores específicos contra el extremo 5' de cada gen GONST y un partidor común contra el extremo 3' de la cola de polihistidina presente en ambos vectores (Materiales y Métodos 1.1). Los productos de la amplificación correspondieron a fragmentos de 1099 pb para GONST1 y de 1123 pb para GONST4 consistente con el tamaño del ADNc de cada gen GONST fusionado a la cola V5-His agregada (100 pb; datos no mostrados). Los productos de PCR fueron purificados y finalmente ligados en pGEM-T Easy (ver Materiales y Métodos 1.3 y 1.4)

Una vez finalizada la reacción de ligación de GONST1 o 4 en pGEM-T Easy se procedió a transformar células de *E. coli* DH5a competentes por golpe térmico (Materiales y Métodos 2.1 y 2.2). Las colonias en las placas selectivas (ampicilina) fueron verificadas por PCR de colonias con partidores 5' *Bam* HI y 3' His *Sac*I (datos no mostrados). Las colonias que resultaron positivas a la amplificación, se crecieron en medio LB líquido selectivo y se les extrajo el ADN plasmidial según los procedimientos descritos en Materiales y Métodos sección 2.3. Se volvió a verificar la presencia de GONST1-V5-His o 4-V5-His en pGEM-T Easy por PCR (ahora con ADN plasmidial puro como templado; Figura 2) y digestión enzimática doble con *Bam*HI y *Sac*I (Figura 3). Además, para verificar la fidelidad de las secuencias nucleotídicas, los clones positivos fueron secuenciados utilizando partidores que hibridizan con las zonas del vector que flanquean los TNAs. Las colonias elegidas no presentaron mutaciones en los TNA o en los epítomos (datos no mostrados).

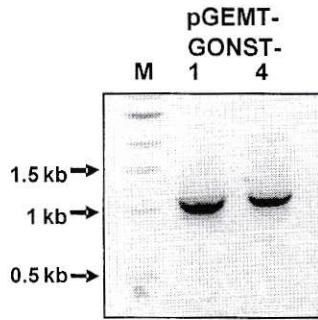


Figura 2: Amplificación de GONST1-V5-His y 4-V5-His clonados en pGEM-T Easy. Gel de agarosa con bromuro de etidio en que se muestran los productos del PCR con la confirmación de la presencia de GONST1-V5-His y 4-V5-His en pGEM-T Easy (clonado según Materiales y Métodos sección 1). Se utilizó partidores 5' *Bam*HI específicos para GONST1 y 4 y 3' His *Sac*I para ambas reacciones. M, marcadores de peso molecular.

La Figura 2 nos muestra los productos de la amplificación de GONST1 y 4 con los partidores 5' *Bam*HI específicos de cada ADNc y el partididor 3' His *Sac*I común (Tabla 1). La migración de cada producto de PCR obtenido concuerda con lo esperado, mostrando una migración levemente menor para GONST4-V5-His (el producto de amplificación esperado para GONST1-V5-His y GONST4-V5-His es 1099 pb y 1123 pb, respectivamente). Este resultado, sumado a la digestión enzimática del vector pGEM-T-GONST1 y 4 que se muestra en la Figura 3, nos confirma la presencia de estos TNAs en el vector de clonamiento pGEM-T Easy.

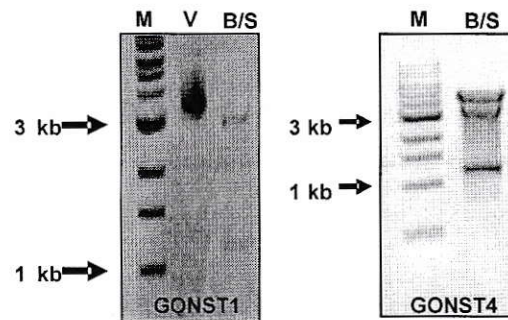


Figura 3: Análisis de restricción de GONST1-V5-His y 4-V5-His clonados en pGEM-T Easy. Gel de agarosa con bromuro de etidio en que se muestra la digestión total de pGEM-T GONST1-V5-His y la digestión parcial de pGEM-T GONST4-V5-His con las enzimas *Bam*HI y *Sac*I (ver Materiales y Métodos 1.2). M, marcadores de peso molecular. V, pGEM-T-GONST1-V5-His sin cortar. B/S, digestión *Bam*HI/*Sac*I. La banda superior en el carril B/S de GONST4 corresponde al vector pGEM-T GONST4-V5-His no cortado.

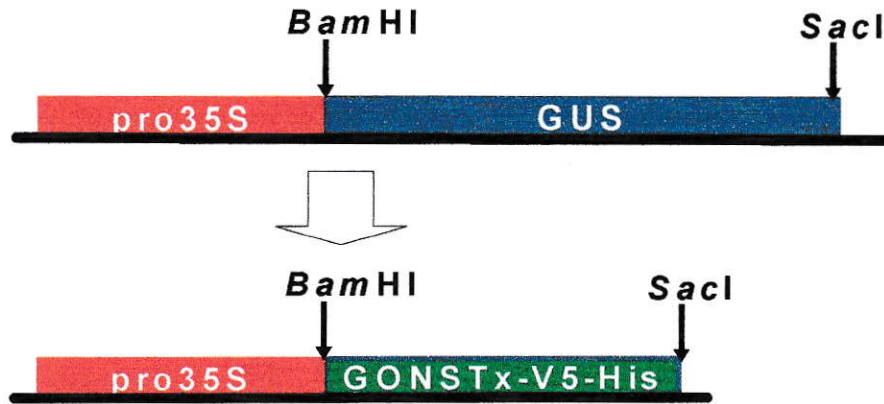


Figura 4: Esquema del desarrollo de la clonación en pBI121. GONST1 y 4 fueron amplificados desde pGEMT con partidores que incluyen los sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI en el extremo 5' y *Sac*I en el extremo 3'. La liberación de GUS (β -glucuronidasa) desde pBI121 y la de los genes GONST1 o 4 de pGEMT se realizó a través de la digestión con estas enzimas (ver Materiales y Métodos 1.2). La ligación de pBI121 lineal con GONSTx se realizó según Materiales y Métodos 1.3.

Luego de clonar GONST1-V5-His y 4-V5-His en pGEM-T Easy los vectores fueron digeridos con *Bam*HI/*Sac*I y el fragmento correspondiente a GONST1-V5-His o GONST4-V5-His fue purificado y ligado en el vector binario pBI121, previamente linearizado con las mismas enzimas (Figura 4). Luego de ligar se transformó *E. coli* cepa DH5 α por golpe térmico. Al igual que la clonación en pGEM-T Easy, la presencia de GONST1 o 4 en las colonias resultantes fue verificada por PCR con los partidores diseñados para estas clonaciones. El ADN plasmidial de las colonias positivas al PCR fue purificado (Materiales y Métodos 1.2, 1.3, 2.).

Para verificar la presencia de GONST1-V5-His y 4-V5-His en el vector binario pBI121 se sometió el ADN plasmidial a PCR con partidores 5'*Bam* HI y 3'*His Sac*I y a una digestión enzimática doble con *Bam*HI y *Sac*I (Figura 5).

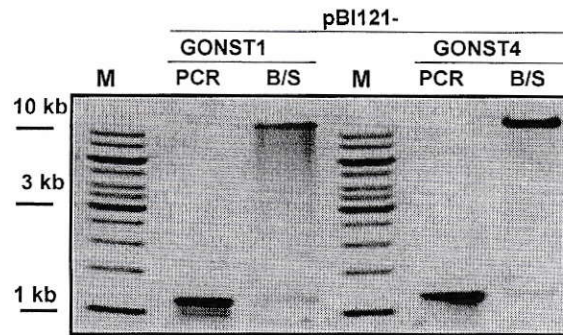


Figura 5: Verificación de la clonación de GONST1-V5-His y 4-V5-His en el vector binario pBI121. El gel de agarosa con bromuro de etidio confirma la presencia de los genes GONST1-V5-His y 4-V5-His en pBI121 a través de PCR y una digestión con *Bam*HI/*Sac*I (B/S) de los plásmidos provenientes de las colonias positivas. M, marcadores de peso molecular.

En la Figura 5 se puede ver, por PCR y digestión enzimática de los vectores pBI121-GONST1-V5-His y GONST4-V5-His construidos, que la clonación de estos TNAs en el vector binario pBI121 de expresión en plantas resultó exitosa, por lo cual el objetivo 1 de este Seminario de Título se ha cumplido.

2. IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES PUTATIVOS DE GONST4 DE *Arabidopsis thaliana*.

El análisis fenotípico de líneas con una baja expresión de GONST4 nos servirá para identificar el papel de este TNA *in vivo*.

La base de datos del dominio público “*Arabidopsis thaliana* insertion database” (www.atibd.org) es un repositorio en donde se pueden buscar todas las líneas mutantes putativas creadas por inserciones de transposones o ADN-T al azar en el genoma de esta especie. El ADN-T es incorporado a plantas de *Arabidopsis* a través de la transformación mediada por *Agrobacteria*. El ADN-T incluye el gen de resistencia a kanamicina (*NPTII*). Debido a que el ADN-T posee un tamaño de 4,5 kb, ocasiona una interrupción que impide la expresión génica de la zona afectada. Utilizando la secuencia nucleotídica de *GONST4* se buscaron líneas mutantes putativas con una

inserción en este TNA. Se encontraron 3 líneas de mutantes insercionales para GONST4 en *Arabidopsis* ecotipo Columbia, ellas fueron; SALK_094857, SALK_022606 y SALK_122257, las que denominamos **A**, **B** y **C**, respectivamente. Tal como se muestra en la Figura 6 las líneas **A**, **B** y **C** presentan una inserción putativa de ADN-T en la zona codificante, el extremo 5' de la región no-traducida (UTR) y en la región promotora de GONST4, respectivamente. Sin embargo, según la base de datos, el lugar de inserción puede tener un error de alrededor de 300 pb río arriba o abajo del supuesto lugar de inserción (www.atibd.org).

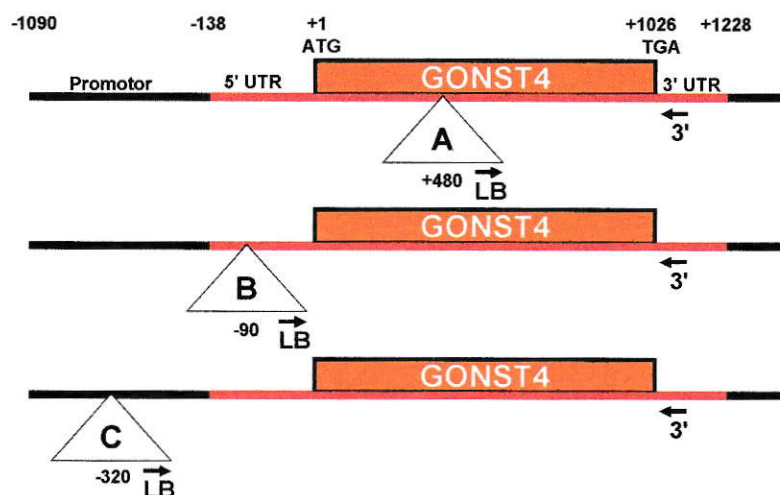


Figura 6: Esquema de las tres mutantes insercionales putativas de ADN-T de GONST4 identificadas en *Arabidopsis*. A través del dominio público “*Arabidopsis thaliana* insertion database” se identificaron las líneas **A**, SALK_094857; **B**, SALK_022606; **C**, SALK_122257 mutantes en *gonst4*. +1 indica la primera base nucleotídica traducida de GONST4. El resto de los números + y – muestran la posición de lo que indican con respecto al ATG del comienzo de la traducción. Se demarcan con triángulos la posición teórica de la inserción de 4,5 kb del ADN-T en las tres líneas. Los partidores utilizados en la verificación de la inserción se muestran como LB y 3’.

Las plantas mutantes provenientes de la colección SALK deberían mostrar resistencia a kanamicina debido a la presencia del gen *NPTII* en el ADN-T. Por lo tanto, para

eliminar la posibilidad que las líneas mutantes fuesen falsos positivos en la base de datos, se verificó la presencia del ADN-T en el genoma sembrando 8 semillas en placas MS suplementado con el antibiótico (50 $\mu\text{g/ml}$). Como se muestra en la Figura 7, al igual que plantas silvestres del mismo ecotipo (Columbia), las 3 líneas de semillas de mutantes en *gonst4* putativas adquiridas muestran un fenotipo sensible a este antibiótico. Se repitió el mismo experimento con menores concentraciones de kanamicina (25, 15, 10 $\mu\text{g/ml}$) con resultados similares (datos no mostrados).

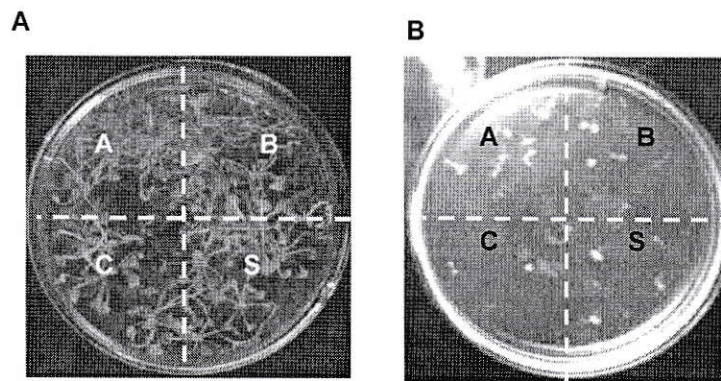


Figura 7: Las semillas adquiridas provenientes de las líneas SALK mutantes en *gonst4* muestran un fenotipo sensible a kanamicina. A. Semillas provenientes de las líneas SALK y semillas silvestres en placas con medio MS sin antibiótico. B. Semillas provenientes de las líneas SALK y semillas silvestres en placas con medio MS suplementado con kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$). En cada placa se sembraron 8 semillas de cada línea y 8 semillas silvestres. Línea A, SALK_094857; B, SALK_022606; C, SALK_122257; S, Silvestre. Las letras A, B, C y S indican el cuadrante en donde se sembraron las semillas de las respectivas líneas.

La sensibilidad de las líneas putativas a kanamicina podría deberse a que todas son falsos positivos en la base de datos de www.atidb.org, o podría ser producto del silenciamiento génico del gen *NPTII*. Para distinguir entre las dos alternativas, se decidió analizar las líneas por PCR para intentar detectar la presencia, y la ubicación del ADN-T en el genoma de las tres líneas provenientes de SALK.

Se crecieron, en tierra, 10 semillas de cada línea A, B y C además de 10 semillas silvestres. Se cosechó una hoja de cada una de las 10 plantas de cada línea y se juntó el tejido para macerar. Se extrajo el ADN genómico total siguiendo la metodología expuesta en Materiales y Métodos 3.3. Una vez verificado el buen estado del ADN por PCR con partidores para GAPA; (datos no mostrados; Tablas I y II) se procedió a amplificar con partidores diseñados contra el borde izquierdo o 3' de la inserción de ADN-T (partidor LB) y contra el extremo 3' del ADNc de GONST4 (partidor 3', Tabla I; Materiales y Métodos 1.1, Figura 6), utilizando el programa *PCR55* (Tabla II). De la mezcla del ADN de las 10 plantas de cada línea A, B ó C se amplificó un producto de PCR, cuyo tamaño es consistente con la ubicación teórica del inserto en *GONST4* (Figura 8).

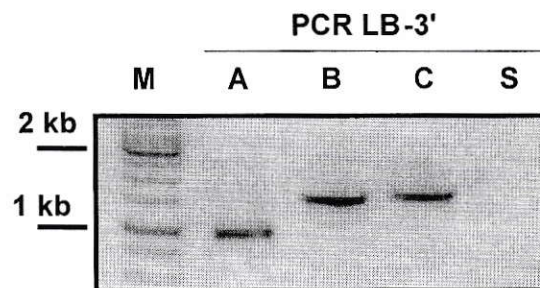


Figura 8: Las líneas SALK A, B y C presentan una inserción de ADN-T en el lugar predicho de *GONST4*. ADN de las líneas mutantes putativas de *GONST4* A, B y C y de plantas silvestres (S) fue sometido a PCR utilizando partidores específicos contra el borde izquierdo del inserto de ADN-T (LB) y contra *GONST4* (3'). Los productos de las reacciones de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa con bromuro de etidio. M, marcadores de peso molecular.

La Figura 8 muestra que el segundo objetivo de este Seminario de Título se ha cumplido. Las 3 líneas de mutantes adquiridas en *GONST4* mostraron las inserciones del ADN-T en el lugar esperado; la línea A presentó interrumpida la zona codificante de

GONST4, la línea B presentó interrumpido el extremo 5'UTR y la línea C presentó una interrupción en la región promotora de GONST4. El tamaño de cada amplificado obtenido fue muy cercano al esperado. Según la base de datos www.atidb.org, la combinación de partidores empleados (LB y 3' específico de GONST4) debía amplificar fragmentos de 840 pb, 1420 pb y 1640 pb a partir del ADN obtenido de las líneas A, B y C, respectivamente. El tamaño preciso de los productos de PCR de cada una de las tres líneas *gonst4* mutantes, mostrados en la Figura 8, se calcularon utilizando el software GenTools. Este programa determinó que el tamaño del producto de PCR amplificado desde el ADN extraído de las líneas A, B y C es de 944 pb, 1462 pb y 1544 pb, respectivamente.

DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

En la última década, se ha avanzado significativamente en entender los mecanismos y las enzimas utilizadas en los procesos de síntesis de las cadenas principales de los polisacáridos no-celulósicos en el lumen del aparato de Golgi y de la síntesis de las diferentes glicoproteínas en el retículo endoplasmático (Carpita & McCann, 2000). Sin embargo, actualmente existen vacíos en el conocimiento de los distintos mecanismos involucrados en la síntesis de las cadenas laterales de estos glicoconjugados en el aparato de Golgi vegetal. Las herramientas biológicas desarrolladas en este Seminario de Título ayudarán a entender parte de este proceso de glicosilación tanto a nivel bioquímico como fisiológico.

La adición de azúcares o glicosilación de los distintos glicoconjugados ocurre mayoritariamente en el lumen del aparato de Golgi en reacciones catalizadas por glicosiltransferasas, enzimas que requieren de un azúcar activado por un nucleótido, un nucleótido-azúcar (UDP o GDP-azúcares; Feingold & Avigad 1980) como sustrato. En el caso de los GDP-azúcares, las reacciones de síntesis de estos nucleótidos-azúcar han sido caracterizadas y se sabe que tienen lugar exclusivamente en la fase soluble del citoplasma (Seifert, 2004). Las glicosiltransferasas tipo II, a diferencia de las glicosiltransferasas tipo Csl, no presentan un dominio que les permita captar los nucleótidos-azúcar citoplasmáticos (Figura 1A y B) por lo que se vuelve indispensable la presencia de proteínas que internalicen el sustrato para estas glicosiltransferasas. Estas proteínas son denominadas transportadores de nucleotidos-azúcar (TNAs).

Al identificar y dilucidar los mecanismos de acción de estos TNAs se logrará comprender mejor el proceso en el cual se desarrolla la síntesis de glicoconjugados, componentes fundamentales de la pared celular. Lograr caracterizar las diferentes enzimas involucradas en la síntesis de estos glicoconjugados servirían, no sólo para entender la mecánica de este proceso, sino también para desarrollar técnicas que nos permitan influir o directamente alterar la composición de la pared celular. Manejos de éste tipo tendrían innumerables aplicaciones biotecnológicas.

En *Arabidopsis*, GONST4, al igual que todas las proteínas de la familia GONST presenta un dominio de unión a GDP altamente conservado (Handford y col, 2004). Por otra parte, las plantas requieren de solo 4 GDP-azúcares; GDP-fucosa, -manosa, -glucosa y -galactosa (Feingold & Avigad 1980). De éstos se postula que GDP-fucosa es el sustrato que GONST4 internaliza al lumen del Golgi, aunque no se puede descartar el

transporte de GDP-galactosa. Análisis bioinformáticos muestran que GONST4 es similar a TNAs capaces de transportar GDP-fucosa por ejemplo los TNAs LPG2 de *L. donovani* y ScVRG4 de *S. cerevisiae* (Hong y col, 2000; Gao y col, 2001). Por otro lado Handford y col (2004) demostraron que GONST4 no logra mediar el transporte de GDP-manosa. Además, al parecer la internalización de GDP-manosa y GDP-glucosa por esta vía no son necesarios ya que estos nucleótidos-azúcar serían sustratos para glicosiltransferasas tipo Csl (Liepman y col, 2005). A la fecha ningún transportador de GDP-fucosa ha sido descubierto en plantas y considerando que existe una alta demanda por este azúcar para la glicosilación de RG II, xiloglucano, glicoproteínas *N*-enlazadas y AGPs, se cree que GONST4 es el mejor candidato para el transporte de GDP-fucosa al lumen del Golgi.

El primer paso en la caracterización funcional de un TNA es la clonación de éste y, tal como se muestra en la Figura 5, la construcción del vector para sobre-expresión de GONST4 en plantas ha resultado exitosa. El constructo diseñado, pBI121-GONST4-V5-His, un sistema binario de clonación es una excelente herramienta que permite la expresión transitoria y permanente de GONST4 *in planta*. Se utilizará este constructo en dos proyecciones; a nivel bioquímico se determinará la especificidad de sustrato de GONST4 y a nivel fisiológico se identificarán los papeles *in vivo* que presenta este TNA. Para la primera proyección, se sobre-expresará GONST4 en forma transitoria en un sistema que permita la obtención de una cantidad de material suficiente para realizar los ensayos de transporte con nucleótidos-azúcar marcados radiactivamente. El sistema adecuado que cumple con estos requisitos es la infiltración de hojas de tabaco con *Agrobacterium* (Norambuena y col, 2005) portando el vector pBI121-GONST4-V5-His.

La sobre-expresión del TNA se determinará mediante inmunodetección utilizando anticuerpos específicos contra los epítomos V5 y/o His acoplados a la proteína. Luego, se realizarán ensayos de transporte con GDP[³H]-fucosa (entre otros) utilizando fracciones subcelulares enriquecidas en aparato de Golgi para determinar la especificidad de sustratos de GONST4. La misma construcción obtenida servirá para lograr la segunda proyección, la generación de plantas de *Arabidopsis* con sobre-expresión permanente de este TNA. La decisión de generar una línea con sobre-expresión permanente en *Arabidopsis* y no en tabaco radica principalmente en que la síntesis de glicoconjugados en plantas silvestres de *Arabidopsis* (a diferencia de tabaco) ha sido bien estudiada, y se encuentran protocolos disponibles para la caracterización de las distintas macromoléculas glicosiladas. Esto facilitará la interpretación de los resultados obtenidos con las plantas que sobre-expresen GONST4 en esta especie. Por otra parte, *Arabidopsis* posee un ciclo de vida bastante mas corto que tabaco por lo que se pueden tener varias generaciones de plantas transgénicas rápidamente. El análisis de este fenotipo, en conjunto con el análisis de las líneas de mutantes insercionales SALK obtenidas permitirán determinar el o los papeles de este TNA *in planta*.

La identificación y adquisición de las 3 líneas de mutantes insercionales para GONST4 en *Arabidopsis*; SALK_094857, SALK_022606 y SALK_122257, denominadas A, B y C, desde el dominio público “*Arabidopsis thaliana* insertion database” (www.atidb.org) permitirá analizar los defectos morfológicos de las plantas mutantes en *gonst4* crecidas. Estas plantas deberían exhibir niveles reducidos de expresión de GONST4 *in vivo* debido a la interrupción de este gen por 4,5 kb de ADN-T. Recordemos que las líneas A, B y C presentan la secuencia de GONST4 interrumpida en la zona codificante,

5'UTR y en el promotor de este TNA respectivamente. La Figura 8 muestra tamaños de productos de reacciones de PCR confirmatorios aproximados de 944 pb para la línea A, 1462 pb para la línea B y 1544 pb para C, cifras que son cercanas a lo teóricamente esperado (A, 840 pb; B, 1420 pb; C, 1640 pb). Las leves diferencias entre los tamaños observados y los esperados están todas dentro del error reconocido (300 pb) por los gestores de la base de datos www.atidb.org.

Las plantas mutantes provenientes de la colección SALK deberían mostrar resistencia a kanamicina debido a la presencia del gen *NPTII* en el ADN-T. Se encontró que las 3 líneas de semillas adquiridas mostraron un fenotipo sensible a distintas concentraciones de este antibiótico (Figura 7). A través de la amplificación con partidores diseñados contra el extremo 3' de la inserción y contra el extremo 3' de *GONST4* se logró ratificar la presencia del ADN-T en las tres líneas (Figura 8), es decir que efectivamente la secuencia génica de *GONST4* se encuentra interrumpida en los sitios ya mencionados. La sensibilidad de las mutantes al antibiótico kanamicina es entonces producto del silenciamiento génico del gen *NPTII*. El silenciamiento génico post-transcripcional estaría ocurriendo por la degradación del ARN de *NPTII*. La reducción de la acumulación del ARNm del transgen en el citoplasma no afecta la tasa de transcripción (Vaucheret y col, 2001). Este fenómeno se presenta en algunas de las plantas provenientes de la línea SALK (signal.salk.edu/tdna_FAQs, Chen y col, 2006) y es irreversible. Este mecanismo endógeno es muy común en plantas y se presenta, justamente como una medida de resistencia ante ARNs exógenos codificados por virus y otros transgenes.

Las mutantes con mayores y menores niveles de expresión de GONST4 serán analizados tanto a niveles macroscópicos como microscópicos. Los primeros análisis se realizarán observando el crecimiento de plantas crecidas en placas MS. La transparencia de este medio permite mirar a la planta en su totalidad y observar, por ejemplo las raíces. Microscópicamente se podrán hacer cortes de los distintos órganos de la planta y observar la estructura de la pared celular por microscopía óptica a través de tinción contra celulosa. Algunos de los glicoconjugados fucosilados tales como xiloglucano y proteínas N-enlazadas se pueden analizar por microscopía de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos contra los residuos de fucosa (Faye y col, 1993; Puhlmann y col, 1994). Además se podrá determinar la capacidad que presenten estas líneas para transportar GDP-fucosa.

El desarrollo de herramientas que conduzcan a caracterizar algunos TNAs es el primer paso que permita estudiar la importancia de estas proteínas en la síntesis de glicoconjugados sintetizados en el aparato de Golgi. Por lo tanto, la caracterización de GONST4, un putativo transportador de GDP-fucosa para la decoración de los glicoconjugados xiloglucano, RG II, glicoproteínas N-enlazadas y AGPs, y la obtención de plantas con niveles de expresión de este TNA alteradas servirán como excelentes herramientas para dilucidar la función de estas macromoléculas en plantas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso J., A. Stepanova, T. Leisse, C. Kim, H. Chen, y col (2003).** Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657.
- Baldwin T., M.G. Handford, M.I. Yuseff, A. Orellana, P. Dupree (2001).** Identification and characterization of GONST1, a Golgi-localized GDP-mannose transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:2283-2295.
- Bonin C.P., I. Potter, G.F. Vanzin, W.D. Reiter (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. USA* 94: 2085-2090.
- Carpita N.C., M. McCann (2000).** The Cell Wall. *In* Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan BB, Gruissem W and Jones R eds. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. Pp 52-107.
- Chen P.Y., C.K., Wang, S.C. Soong, K.Y. To (2003).** Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Mol. Breed.* 11:287-293.
- Chen M., G. Han, C.R. Dietrich, T.M. Dunn, E.B. Cahoon (2006).** The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the Arabidopsis LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell* 18: 3576-3593.
- Faye L., V. Gomord, A. Fitchette-Lainé, M.J. Chrispeels (1993).** Affinity purification of antibodies specific for Asn-linked glycans containing α 1,4-fucose or β 1,2-xylose. *Anal. Biochem.* 209: 104-108
- Feingold D.S., G. Avigad (1980).** Sugar nucleotide transformations in plants. *In* The Biochemistry of Plants, Vol 3. Stumpf PK and Conn EE eds. Academic Press, New York, NY. pp101-170.
- Fincher G.B., B.A. Stone, A.E. Clarke (1983).** Arabinogalactan-proteins: Structure, biosynthesis and function. *Annu. Rev.Plant Physiol.* 34: 47–70.
- Fry S.C (2000).** The growing plant cell wall: Chemical and metabolic analysis. The Blackburn Press, Caldwell, NJ.
- Gao XD, A. Nishikawa, N. Dean (2001).** Identification of a conserved motif in the

yeast Golgi GDP-mannose transporter required for binding to nucleotide-sugar. *J. Biol. Chem.* 276: 4424-4432.

Handford M.G (2006). Biosynthesis of the Plant Cell Wall. *Cien. Inv. Agr.* 33:149-224.

Handford M.G., C. Rodríguez-Furlán, A. Orellana (2006). Nucleotide-sugar transporters: Structure, function and roles *in vivo*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39 (9): 1149-1158.

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

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

Iwai H., N. Masaoka, T. Ishii, S. Satoh (2002). A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem. *PNAS* 99:16319–16324.

Lerouge P., M. Cabanes-Macheteau, C. Rayon, A.C. Fitchette-Lainé, V. Gomord, L. Faye (1998). N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol Biol* 38: 31-48.

Liepman AH, CG. Wilkerson, K. Keegstra (2005). Expression of cellulose synthase-like (Csl) genes in insect cells reveals that CslA family members encode mannan synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 2221-2226.

Mayer K., R. Wambutt, G. Murphy, G. Volckaert, T. Pohl y col (1999). Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402: 769 – 777.

Murray M.G., W.F. Thompson (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8: 4321-4326.

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

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

- O'Neill M.E., S. Eberhard, P. Albersheim, A.G. Darvill (2001).** *Arabidopsis* growth requires borate cross-linking of the cell wall pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Science* 294: 846–849.
- Perez-Almeida, N. Carpita (2006).** Las B-galactosidasas y la dinámica de la pared celular. *Interciencia* 31:476-486.
- Perrin R.M., A.E. DeRocher, M. Bar Peled, W. Zeng, L. Norambuena, A. Orellana, N.V. Raikhel, K. Keegstra (1999).** Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. *Science* 284: 1976-1979.
- Perrin R.M., Z. Jia, T.A. Wagner, M.A. O'Neill, R. Sarria, W.S. York, N.V. Raikhel, K. Keegstra (2003).** Analysis of xyloglucan fucosylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132: 768-778.
- Puhlmann J., E. Bucheli, M.J. Swain, N. Dunning, P. Albersheim, A.G. Darvill, M.G. Hahn (1994).** Generation of monoclonal antibodies against plant cell wall polysaccharides. I. Characterization of a monoclonal antibody to a terminal $\alpha(1-2)$ -linked fucosyl-containing epitope. *Plant Physiol.* 104: 699-710
- Reiter W.D., C.C.S. Chapple, C.R. Somerville (1993).** Altered growth and cell walls in a fucose-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Science* 261: 1032-1035.
- Ryden P., K. Sugimoto-Shirasu, A. Charles Smith, K. Findlay, W.D. Reiter, M.C. McCann (2003).** Tensile properties of *Arabidopsis* cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. *Plant Physiology* 132: 1033–1040.
- Seifert GJ (2004).** Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: How to bring the inside to the outside. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 277-284.
- Van Hengel AJ, K. Roberts (2002).** Fucosylated arabinogalactan-proteins are required for full root cell elongation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 32: 105-113.
- Vaucheret H, C. Béclin, M. Fagard (2001).** Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science* 114: 3083-3091.
- Xiaoying L., K. Samir, R. Steve, S. Terrance, M.I. Benito y col (1999).** Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402: 761 – 768.
- Zabackis, J. Huang, B. Müller, A.C. Darvill, P. Albersheim (1995).** Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiol.* 107: 1129-1138.