

UCH FE
Biotecnología
R173
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**Determinación de la especificidad de sustratos y desarrollo
de herramientas para el estudio 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

Consuelo del Pilar Rámila Garrido

Noviembre del 2008

Santiago, Chile.

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



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta.

CONSUELO DEL PILAR RÁMILA GARRIDO

**“DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATOS Y
DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE GONST4, UN
TRANSPORTADOR DE NUCLEÓTIDOS-AZÚCAR, DE *ARABIDOPSIS
THALIANA*.”**

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

Dr. Michael Handford
Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dra. Liliana Cardemil Oliva
Presidenta Comisión

Dr. Ricardo Cabrera Paucar
Evaluador



Biografía



Segunda hija de los cuatro de mi familia, como regalo de cumpleaños para Joly y haciendo que mi hermana perdiera su reinado, nací el 12 de Julio del año 1984. Encontrando la manera de hacer y deshacer alianzas para poder pelear con cada uno de mis hermanos se forjó mi infancia, siempre con los cariños de mis padres y regaloneos de la laucha que inventaba las más exóticas formas de evitar los conflictos. Una infancia feliz en la cual diversos personajes pasarían por mi vida, y otros se quedarían hasta

hoy. Mi educación empieza en el particular colegio André, compartiendo aula con mis queridísimas compañeras de innumerables viajes, las que constantemente desafiarían mi manera de ver el mundo. Llena de incertidumbre, decidí estudiar la carrera del futuro... es así como me encontré inmersa en la Facultad de Ciencias de la gran Universidad de Chile, pequeño mundo donde conocí la ciencia gracias a los profes y a mis amigos de estudios, grupo que compartía mi peculiar forma de aprender y, sin los cuales, todo hubiese sido más complicado. Como sucede en la vida, el tiempo pasó mucho más rápido de lo esperado y hoy, sigo mi formación en nuevas disciplinas que han dado un vuelco a mi vida.

Dedicatoria.

A mi familia, en especial a mis padres, Joly y Laucha, que han sido un gran ejemplo, me han enseñado lo esencial y han sido el mejor apoyo durante toda mi vida.



Agradecimientos.

A mis amigas, Barbi, Ale, Feña, Galletita y Lato, por su apoyo, viajes, alegrías y consejos. Al Pato, Ema, Seba, Dani y Pauli, por todo lo compartido en los años de Universidad. A los profes de la U, en especial a la profe Claudia Stange, por su preocupación y consejos, y al profe Mike por su comprensión y paciencia además de su tutela. A mis hermanitos, Javi, Benja y Cata por aguantarme, apoyarme, por las peleas, las tonteras y por quererme, a la Magda por su entrega, a la Cuquita por los consejos de la voz de la experiencia, a la Veroca por todo su cariño y apoyo durante mi vida, al tío Ernestito por todo lo que me enseñó y quiso, a la tía Goga y al tío Luis, que ya son parte de mi núcleo, a la tía Consuelo por estar siempre ahí para mí y para toda mi familia, a mi primo Baldito que me mostró un camino hermoso cuando más lo necesitaba. Finalmente, a mis papás, que siempre han sido grandes personas en todo aspecto y de los cuales nunca dejo de aprender.





Índice.

Listado de Figuras.....	VI
Listado de Tablas.....	VII
Abreviaturas utilizadas.....	VIII
Resumen.....	IX
Abstract.....	X
1. Introducción.	1
1.1. Funciones e importancia de la pared celular.....	1
1.2. Composición de la pared celular.....	1
1.2.1. Polisacáridos.....	1
1.2.2. Proteínas.....	3
1.3. Formación de la pared celular.....	3
1.4. Biosíntesis de los polisacáridos no-celulósicos presentes en la pared celular....	4
1.5. Transportadores de nucleótido-azúcar.....	6
1.6. Familia de transportadores de GDP-azúcar en Arabidopsis: Familia GONST...7	7
1.7. GONST4 un posible transportador de GDP-fucosa de Arabidopsis.....	8
1.8. Importancia de la fucosa en las funciones de los componentes de la pared celular.....	9
2. Hipótesis.	12
3. Objetivos.	12
3.1. Objetivo general.....	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
4. Materiales y métodos.	14
4.1. Materiales y métodos generales.....	14
4.1.1. Construcciones y plásmidos utilizados.....	14
4.1.2. Obtención de células competentes de <i>A. tumefaciens</i>	15
4.1.3. Transformación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i>	16
4.2. Comprobación de la funcionalidad del constructo.....	17
4.2.1. Infiltración de hojas de <i>Nicotiana tabacum</i>	17
4.2.2. Microscopía de epifluorescencia.....	17
4.2.3. Extracción de RNA.....	18
4.3. Reacción de RT-PCR.....	19
4.4. Western Blot.....	22
4.5. Ensayos de Transporte.....	24
4.5.1. Extracción de Aparato de Golgi.....	24
4.5.2. Cuantificación de proteínas.....	25
4.5.3. Ensayo de Transporte.....	26
4.6. Transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i> con pGWB8GONST4Orf-His y búsqueda de plantas homocigotas.....	27
4.6.1. Transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i> con el vector pGWB8GONST4Orf-His.....	27
4.6.2. Selección de transformantes de <i>A. thaliana</i>	27
4.6.3. Extracción de DNA genómico de <i>A. thaliana</i>	28

4.6.4.	<i>Reacción de PCR, en búsqueda de las transformantes.</i>	29
4.6.5.	<i>Reacción de RT-PCR, verificación de la expresión del constructo.</i>	29
4.7.	Búsqueda de ortólogos de GONST4 mediante técnicas de bioinformática.	30
5.	Resultados.	31
5.1.	Verificación de la funcionalidad del constructo pVKH18-EN6:GONST4Orf.	31
5.2.	Verificación de la funcionalidad del constructo pGWB8GONST4Orf-His.	32
5.2.1.	<i>GONST4 es transcrito en hojas de N. tabacum infiltradas con el vector pGWB8GONST4Orf-His.</i>	32
5.2.2.	<i>GONST4-His se traduce en hojas de N. tabacum infiltradas con el vector pGWB8GONST4Orf-His.</i>	33
5.3.	Estudio del transporte de nucleótidos-azúcar a través de GONST4 fusionado con GFP ó con una cola de Histidina.	33
5.3.1.	<i>GONST4 fusionado a una cola de GFP.</i>	34
5.3.2.	<i>GONST4 fusionado con una cola de His.</i>	35
5.4.	Transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i> con pGWB8GONST4Orf-His y obtención de plantas homocigotas.	36
5.4.1.	<i>Transformación estable de A. thaliana con el constructo pGWB8GONST4Orf-His.</i>	36
5.4.2.	<i>Obtención de plantas homocigotas para el constructo GONST4Orf-His a partir de la T1.</i>	37
5.4.3.	<i>Expresión génica de GONST4-His en las transformantes de A. thaliana</i>	40
5.5.	Búsqueda de ortólogos de GONST4 mediante técnicas de bioinformática.	41
6.	Discusión y proyecciones.	47
7.	Conclusiones	55
8.	Congresos	56
9.	Referencias.	57



Listado de Figuras.

Figura 1. Modelo de la biosíntesis de polisacáridos en el aparato de Golgi.	5
Figura 2. Esquema de una de las posibles glicosilaciones de xiloglucano.	10
Figura 3. Aparato de transferencia.	23
Figura 4. Verificación de la transcripción del constructo GONST4-His.	32
Figura 5. Verificación de la expresión del constructo GONST4-His.	33
Figura 6. (a) Transporte de GDP-fucosa y UDP-glucosa en fracciones enriquecidas en aparato de Golgi de hojas de tabaco que sobreexpresan GONST4-GFP relativo al control. (b) Prueba T de Student.	34
Figura 7. (a) Transporte de GDP-fucosa y UDP-glucosa en fracciones enriquecidas en aparato de Golgi de hojas de tabaco que sobreexpresan GONST4-His relativo al control. (b) Prueba T de Student.	35
Figura 8. Transformación estable de <i>A. thaliana</i> con el vector pGWB8-GONST4Orf-His.	36
Figura 9. Las 7 plantas resistentes a higromicina de la T1 son transformantes.	37
Figura 10. Sólo 2 de las 7 plantas resistentes a higromicina de la T2 son transformantes	39
Figura 11. 11 de las 12 plantas de la T3 son transformantes.	39
Figura 12. <i>GONST4-His</i> es transcrito en una de las líneas transformantes homocigotas.	40
Figura 13. Alineamiento múltiple de los mejores candidatos a ser ortólogos de GONST4.	44
Figura 14. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de los transportadores ortólogos a GONST1 y los posibles ortólogos a GONST4	45



Listado de Tablas.

Tabla I. Partidores utilizados para las distintas reacciones de PCR.	20
Tabla II. Programas utilizados para las distintas reacciones de PCR.	21
Tabla III. Componentes de las reacciones de PCR.	22
Tabla IV. Tasa de transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformada con pGWB8GONST4Orf-His, mediante inmersión floral	36
Tabla V. Test de χ^2 aplicado a la progenie de las líneas T1; verificación de heterocigocidad.	38
Tabla VI. Posibles ortólogos de GONST4.	43
Tabla VII. Número de dominios de transmembrana de los supuestos ortólogos de GONST4 obtenidos con distintos programas de predicción.	43



Abreviaturas utilizadas.

APS:	Persulfato de amonio.
BCIP:	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato.
CTAB:	Cetil trimetil amonio bromuro.
DNA:	Ácido desoxirribonucleico.
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético.
H ₂ O _d :	Agua destilada.
kb:	Kilo base (1000 pares de bases).
kDa:	Kilo Dalton.
MS:	Medio de Murashige y Skoog,
NBT:	Nitro blue tetrazolium en dimetilformamida.
NDP:	Nucleótido difosfato.
Pb:	Pares de bases.
RNA:	Ácido ribonucleico.
RG:	Ramnogalacturonano.
SDS:	Dodecil sulfato de sodio.
TEMED:	N,N,N',N'-tetrametiletenendiamina.
Wt:	Silvestre.

Resumen.

La pared celular es una matriz extracelular que rodea las células vegetales y cumple variados roles fisiológicos, tanto estructurales como de protección además de participar en el desarrollo y diferenciación celular. Su composición varía según el tipo celular y estado de desarrollo, pero fundamentalmente está compuesta de polisacáridos, glicoproteínas y compuestos fenólicos. Dentro de los polisacáridos y las glicoproteínas, existe una gran cantidad que contienen fucosa; el xiloglucano cuya cadena celulósica principal presenta residuos laterales de xilosa, que a su vez pueden estar unidos a residuos de fucosa o galactosa, el ramnogalacturonano II (RG II), donde la fucosa se encuentra como ramificación y los arabinogalactanos, proteínas altamente glicosiladas con arabinosa, galactosa y algunos residuos de fucosa. Como las modificaciones laterales y glicosilación de proteínas requieren de GDP-fucosa en el lumen del aparato de Golgi, se necesita de un transportador que sea capaz de ingresar la GDP-Fucosa, producida en el citoplasma, al interior de este organelo. Esta función sería realizada por un transportador de nucleótido-azúcar. En trabajos anteriores, se ha encontrado una familia de posibles transportadores de GDP-azúcares a partir de la homología de éstos al transportador GONST1 de *Arabidopsis thaliana*, y su localización en el aparato de Golgi, denominada familia GONST. En particular, el posible transportador GONST4 parece ser un candidato ideal para transportar GDP-Fucosa.

En el presente Seminario de Título se estudió este posible transportador. En primer lugar, se verificó la funcionalidad de los dos vectores utilizados para su sobreexpresión: pGWB8-GONST4Orf-His y pVKH18-EN6:GONST4. Luego, se realizaron ensayos de

transporte con fracciones de vesículas enriquecidas en aparato de Golgi, obtenidas de hojas de *Nicotiana tabacum* transformadas de manera transitoria con los distintos vectores. Se encontró que las fracciones obtenidas desde hojas que sobreexpresan *GONST4-His*, presentan niveles significativamente aumentados de transporte de GDP-fucosa (pero no UDP-glucosa) en comparación con la preparación control. Sin embargo, no se observó un aumento en el transporte de este nucleótido-azúcar en un ensayo de transporte realizado con vesículas obtenidas de hojas transformadas con pVKH18-EN6:GONST4. Como herramienta para estudios posteriores de este transportador se obtuvo una línea homocigota de plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresa *GONST4-His*. Además se realizó un análisis bioinformático, encontrando 5 posibles ortólogos de GONST4 en especies muy variadas (vid, arroz, algodón y musgo).

Abstract.

The cell wall is an extracellular matrix that surrounds plant cells and has a variety of physiological roles, including structural, protection and participation in development and cell differentiation. Its composition varies with cell type and development state, but it is mostly composed of polysaccharides, glycoproteins and phenolic compounds. Among polysaccharides, many contain fucose. Fucose decorates xyloglucan, rhamnogalacturonan II (RG II), and arabinogalactans, a highly glycosylated protein with arabinose, galactose and some residues of fucose. As the lateral modifications and glycosylations require GDP-fucose for its catalysis in the Golgi lumen, a transporter capable of internalising GDP-fucose from the cytosol, is required. This role is performed by a nucleotide-sugar transporter. A possible family of GDP-sugars transporters has

been identified in *Arabidopsis thaliana*, which are localized in the Golgi apparatus. Of this GONST family, the putative transporter GONST4 is an ideal candidate to transport GDP-fucose.

In this Thesis, the putative transporter GONST4 was studied. Firstly, the functionality of the two vectors used to overexpress it, was studied: pGWB8-GONST4Orf-His and pVKH18-EN6:GONST4. Subsequently, different transport assays were carried out with Golgi-enriched vesicle fractions extracted from *Nicotiana tabacum* leaves transiently transformed with the vectors. Those taken from leaves overexpressing GONST4-His incorporated significantly more GDP-fucose, but not UDP-glucose compared to control vesicles. However, an increase in GDP-fucose transport was not observed when vesicles obtained from leaves transformed with pVKH18-EN6:GONST4 were used. As a tool for further studies of this transporter, a homozygous line of *Arabidopsis thaliana* that overexpresses *GONST4-His* was obtained. Finally, bioinformatic analysis was performed and five possible orthologues of *GONST4* were found in different species (grapevine, rice, cotton and moss).

1. Introducción.

1.1. Funciones e importancia de la pared celular.

La pared celular es una matriz extracelular que rodea las células vegetales y cuya composición varía durante el desarrollo y según el tipo celular. Esta matriz constituye una estructura fundamental ya que tiene múltiples funciones, dentro de las que se encuentran; mantener y determinar la forma celular, dar soporte y fuerza mecánica (para el crecimiento de la planta) pero al mismo tiempo mantener la flexibilidad y plasticidad. También participa en el desarrollo y la diferenciación celular (Mc-Cabe et al., 1997; O'Neill et al., 2001), da protección frente a estrés osmótico, controla la tasa y dirección del crecimiento celular y es una barrera física contra patógenos. Además es una fuente de almacenamiento de carbohidratos ya que sus componentes pueden ser reutilizados en otros procesos metabólicos, y participa en la señalización, por ejemplo, fragmentos llamados oligosacarinas actúan como hormonas (Albersheim, 1985).

1.2. Composición de la pared celular.

La pared celular está compuesta principalmente de polisacáridos, incluyendo celulosa (la macromolécula más abundante), pectina y hemicelulosas. Por otra parte, proteínas, lignina y agua son otros componentes que la forman.

1.2.1. Polisacáridos.

La celulosa es un polímero lineal e insoluble compuesto de unidades de D-glucosa unidas por enlaces del tipo $\beta(1 \rightarrow 4)$. Cada cadena de celulosa puede estar formada por hasta 25.000 moléculas de glucosa. Estas cadenas se unen paralelamente y de manera no

covalente, por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, con otras 30 a 36 cadenas para formar microfibrillas que rodean la célula perpendicularmente al plano de expansión. Estas microfibrillas le otorgan la fuerza a la pared celular.

Las hemicelulosas son polímeros lineales cuyas unidades también se encuentran unidas por enlaces del tipo $\beta(1\rightarrow4)$. A diferencia de la celulosa, éstas no forman microfibrillas debido a sus modificaciones laterales y se encuentran unidos de manera no covalente (por puentes de hidrógeno) a la celulosa, interconectando las microfibrillas. En plantas dicotiledóneas la principal hemicelulosa es el xilogucano. Éste tiene el mismo esqueleto que la celulosa, pero el 75% de sus residuos de glucosa se encuentran unidos a D-xilosa, que a su vez pueden estar decorados con residuos de D-galactosa y L-fucosa. Otras hemicelulosas incluyen mananos y xilanos que generalmente se encuentran en baja proporción. Se ha descrito que las hemicelulosas estarían involucradas tanto en el entrecruzamiento de microfibrillas de celulosa, como en la lignificación, ya que unirían a precursores específicos que determinarían la estructura de ésta (Atalla, 1995).

Las pectinas forman una matriz gelificada dentro de la pared celular. Dentro de la gran variedad de pectinas, se encuentran los homogalacturonanos, polímeros formados por ácido D-galacturónico unidos por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$. Otros ácidos pécticos son los ramnogalacturonanos (RG). RGI está formado por un esqueleto en donde se alternan unidades de L-rhamnosa y ácido D-galacturónico con cadenas laterales de arabinosa y galactosa; la longitud de estas cadenas laterales determinan la porosidad de la pared. RGII posee un esqueleto igual al de los homogalacturonanos, pero es altamente

ramificado con 12 azúcares distintas, incluyendo fucosa (O'Neill et al, 2004). Estos polímeros están interconectados por cationes divalentes (ej. calcio), lo que también hace que se atrapen moléculas de agua formando un gel altamente hidratado (Handford, 2006). Las pectinas realizan diversas funciones; determinan la porosidad de la pared celular y otorgan una superficie cargada para la adhesión intercelular y el reconocimiento celular (tanto célula-célula como de patógenos; Carpita y McCann, 2000).

1.2.2. *Proteínas.*

Las proteínas que forman la pared celular son glicoproteínas. Se clasifican según el aminoácido prioritario en su estructura en tres grupos: Las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HPRG), las ricas en prolina (PRP) y las enriquecidas en glicina (GRP). La función de estas proteínas es estructural y también servirían como andamios para el depósito de la lignina. Otro grupo de proteínas son las proteínas arabinogalactanos (AGP), altamente glicosiladas con arabinosa, galactosa y fucosa. Estarían involucradas en procesos biológicos como proliferación celular y diferenciación, patrones de crecimiento y formación y en la interacción planta-microbio (Georg et al., 2007). Cabe destacar que todas las proteínas que se encuentran en el espacio extracelular, ya sea ancladas a la membrana (receptores) o solubles (enzimas) son altamente *N*-glicosiladas.

1.3. **Formación de la pared celular.**

La pared celular se forma en el período de división de la célula, cuando la placa se forma entre los núcleos de las células hijas. Una serie de vesículas, sintetizadas en el aparato de Golgi, migran a través del citoesqueleto hasta el ecuador de la célula donde se unen y

vierten su contenido. De esta forma, la membrana de la vesícula pasa a ser membrana plasmática de la nueva célula. En un principio las vesículas contienen casi únicamente polisacáridos pécticos, construyendo la lamela media. Una vez que se haya terminado, el aparato de Golgi sintetiza otros polisacáridos no-celulósicos (hemicelulosas y pectinas) que son transportados hacia la pared, con los que se sintetizará la pared primaria y, en algunos tipos celulares, la secundaria. A diferencia de los polisacáridos no-celulósicos, la celulosa es sintetizada en la membrana plasmática por el complejo celulosa sintasa que transfiere dos UDP-glucosa a la cadena creciente de celulosa. Este complejo, al igual que las proteínas que componen la pared celular, sería sintetizado en el retículo endoplásmico, modificado (glicosilado) en el aparato de Golgi y finalmente exocitado. La naturaleza e interacción de los distintos polisacáridos son modificadas de acuerdo con el estadio de desarrollo celular por las proteínas de la pared (Carpita y McCann, 2000; Handford 2006).

1.4. Biosíntesis de los polisacáridos no-celulósicos presentes en la pared celular.

Los polisacáridos no-celulósicos son sintetizados en el aparato de Golgi. Las enzimas que catalizan estas reacciones son las glicosiltransferasas cuyos sustratos son azúcares activados por nucleótidos, específicamente UDP o GDP-azúcares. Existen tres tipos de estas enzimas, se ha descrito la presencia de dos de ellas en plantas: glicosiltransferasas tipo III, que poseen múltiples dominios transmembrana y que tomarían los nucleótidos activados directamente desde el citoplasma y expulsarían el polímero sintetizado hacia el lumen del organelo (Richmond y Somerville, 2000; Somerville et al., 2004), y las tipo II, que se encontrarían ancladas a la membrana por su extremo amino terminal hidrofóbico

y cuyo sitio catalítico se encuentra en el extremo carboxilo terminal (Wulff et al., 2000; Sterling et al., 2001). Por ende, estas últimas, necesitan de un transportador de nucleótido-azúcar (TNA) para el ingreso del sustrato al lumen del aparato de Golgi (Figura 1).

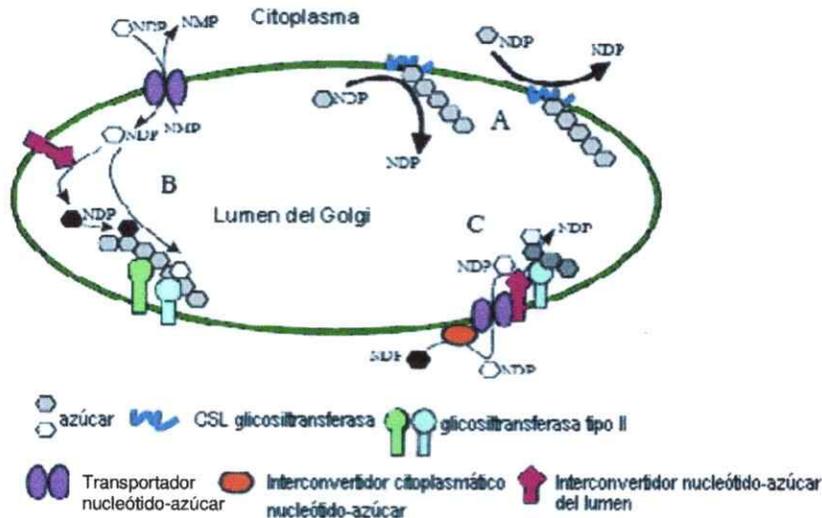


Figura 1. Modelo de la biosíntesis de polisacáridos en el aparato de Golgi (Handford, 2006).

Se ha propuesto que las glicosiltransferasas tipo III, también llamadas tipo celulosa sintasa (CSL), sintetizarían los polisacáridos que contienen un esqueleto principal similar al de la celulosa (con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$), como xiloglucano, galactano, manano y xilano. Existen 8 familias de CSLs en *Arabidopsis thaliana* y se ha demostrado su importancia especialmente en la síntesis de mananos (Liepman et al., 2005).

Las glicosiltransferasas tipo II estarían encargadas de decorar los distintos polisacáridos no celulósicos y las glicoproteínas. Esta actividad ha sido observada mediante el estudio de mutaciones para distintos genes que codifican para estas enzimas en *Arabidopsis*. Mutaciones en *AtFUT1*, una fucosiltransferasa, causan niveles disminuidos de L-fucosa

en la pared celular, especialmente en xiloglucano (*mur2*; Vanzin y cols., 2002). La mutante *mur3* también presenta menos L-fucosa pero esta mutación se encuentra en una glicosiltransferasa específica para xiloglucano que actuaría sobre algunos residuos de D-galactosa de la molécula (Reiter y cols., 1997; Madson y cols, 2003).

1.5. Transportadores de nucleótido-azúcar.

La mayoría de los nucleótidos-azúcar requeridos para la síntesis y decoración de los polisacáridos no-celulósicos y las glicoproteínas son sintetizados en el citoplasma. Por lo tanto, se necesita que sean importados al interior del aparato de Golgi, ya que las glicosiltransferasas tipo II catalizan estas reacciones en el lumen del organelo. Los encargados de realizar este ingreso son los transportadores de nucleótido-azúcar (TNAs).

Dada la diversidad de nucleótidos-azúcar y la escala de los procesos de biosíntesis que se llevan a cabo en el aparato de Golgi, se hace necesario un gran flujo a través de la membrana de este organelo. Los primeros TNAs de *Arabidopsis* caracterizados fueron GONST1 (transportador de GDP-manosa; Baldwin y cols. 2001) y AtUTr1 (transportador de UDP-galactosa y UDP-glucosa; Norambuena y cols. 2002). Además genes codificantes para TNAs han sido clonados desde otros organismos (Martinez-Duncker y cols. 2003). Los TNAs son proteínas con múltiples dominios de transmembrana y funcionarían como antiporters, ingresando los NDP-azúcares y extrayendo los respectivos nucleótidos monofosfatos del lumen del Golgi (Figura I). El transporte es dependiente de temperatura y saturable (Handford, 2006).

Los TNAs pertenecen a la superfamilia de transportadores de drogas/metabolitos. En plantas, esto incluye el traslocador plastídico de triosa-fosfato (TPT) y otros traslocadores de fosfato relacionados (Knappe y cols., 2003). La mayoría de los TNAs descritos son monoespecíficos, pero algunos son capaces de transportar más de un nucleótido azúcar (Hong y cols., 2000; Norambuena y cols., 2002).

Dada su importancia en la entrega de los sustratos necesarios para la biosíntesis de glicanos, los TNAs podrían ser reguladores de este proceso a través del control de los niveles de sustrato. Por ejemplo, mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* en el transportador de GDP-manosa, VRG4, son incapaces de manosilar efectivamente proteínas y glicolípidos (Dean y cols. 1997), y mutantes de *Leishmania donovani* en el transportador de GDP-manosa, LPG2, no presentan manosa en los lipofosfoglicanos de la superficie celular, proceso que ocurre en el aparato de Golgi (Ma y cols, 1997).

1.6. Familia de transportadores de GDP-azúcar en Arabidopsis: Familia GONST.

A partir de la similitud de secuencia con GONST1, un transportador de GDP-manosa, se encontraron otros 4 posibles transportadores de GDP-azúcares del aparato de Golgi en *Arabidopsis* (Handford y col, 2004). Todos poseen entre 300 y 350 aminoácidos y se predice que tendrían 10 dominios transmembrana. Además, poseen un motivo característico de unión a GDP altamente conservado; GX(L/V)NK (Gao y cols, 2001) y tendrían residuos NK conservados de antiporte o de unión a nucleótidos monofosfatos en el extremo carboxilo terminal del primer dominio (que se predice estaría expuesto hacia el lumen del aparato de Golgi). Los miembros de esta familia fueron denominados GONST2, 3, 4 y 5 y se agrupan en tres clados: GONST1 con GONST2, GONST3 con

GONST4, y GONST5 con otras 6 proteínas no caracterizadas (Handford y cols, 2004). La expresión transitoria en tabaco de los miembros de cada grupo, fusionados a la Proteína Fluorescente Verde (GFP) sugirió que éstos se localizan en el aparato de Golgi. Además, se realizó un ensayo de complementación, utilizando una levadura mutante (*vrg4-2*) deficiente en el transporte de GDP-manosa y que presenta dos fenotipos asociados a esta mutación: sensibilidad a higromicina B y reducción de la glicosilación en la quitinasa extracelular (Dean y col, 1997). Los resultados mostraron que sólo GONST1 y GONST2 fueron capaces de complementar ambos fenotipos, indicando que GONST2 es un transportador de GDP-manosa. GONST3, 4 y 5 fueron capaces de revertir sólo la sensibilidad al antibiótico, mostrando que son capaces de transportar GDP-manosa a través del aparato de Golgi, pero con una menor eficiencia.

1.7. GONST4 un posible transportador de GDP-fucosa de Arabidopsis.

En plantas, se requiere cuatro GDP-azúcares para la síntesis de los distintos componentes de la pared celular, GDP-manosa, GDP-glucosa, GDP-galactosa y GDP-fucosa (Feingold y Avigad, 1980). Basándose en los siguientes antecedentes (Handford y cols., 2004), se propone que GONST4 sería capaz de transportar GDP-fucosa:

- 1) GONST4 se localiza en el aparato de Golgi y posee las características moleculares de un TNA, específicamente un dominio de unión a GDP altamente conservado.
- 2) La síntesis de (gluco)manano es el único requerimiento en el aparato de Golgi para GDP-manosa y GDP-glucosa. Se demostró *in vitro* que la biosíntesis de ambas hemicelulosas era realizada por las glicosiltransferasas tipo celulosa sintasa (CSL), capaces de captar GDP-manosa y GDP-glucosa desde el citosol, transferirlas al lumen

del Golgi y al mismo tiempo catalizar la reacción de síntesis de estos polisacáridos (Figura I; Liepmann y cols., 2005). De estos experimentos se desprende que una CSL, y no un TNA es responsable de la importación de ambos GDP-azúcares.

3) Las mutantes en GONST1 de *Arabidopsis* presentan un fenotipo enano con tallos débiles igual al que se obtiene en plantas con un RG II sin residuos de galactosa, tales como el mutante *nolac-H18* de tabaco (Iwai y col., 2002). A pesar de esto, aún no se ha logrado determinar si las plantas mutantes *gonst1* presentan un RG II sin galactosa debido a la falla en el transporte de GDP-galactosa, por lo que no es posible descartar por completo que la importación de GDP-galactosa sea realizada por GONST4.

4) No se ha descubierto transportador de GDP-fucosa alguno en plantas y, considerando que este azúcar es requerido para la decoración de RG II, xiloglucano, glicoproteínas *N*-enlazadas y proteínas arabinogalactanos *O*-enlazadas, postulamos que GONST4 sería el mejor candidato para el transporte de GDP-fucosa.

Además, GONST4 es ortólogo cercano de TNAs de otros organismos que son capaces de transportar GDP-fucosa, como LPG2 de *Leishmania donovani* (Hong y col, 2000).

1.8. Importancia de la fucosa en las funciones de los componentes de la pared celular.

El principal glicano de interconexión en la pared celular primaria de la mayoría de las dicotiledóneas es el xiloglucano. Éste es un polisacárido compuesto por un esqueleto de D-glucano, sustituido a intervalos regulares por residuos de D-xilosil. En la mayoría de las plantas, una parte de los residuos de xilosa llevan residuos de D-galactosil, algunos de los cuales son decorados con unidades de L-fucosil (Fry y cols., 1989). De esta

manera, el esqueleto principal de glucosa $\beta(1\rightarrow4)$ es decorado con cadenas laterales siguiendo patrones regulares de xilosa, xilosa-galactosa, xilosa-galactosa-fucosa. Uno de estos patrones se representa en la Figura 2.

La celulosa y el xiloglucano interactúan formando una red y se ha sugerido que un componente clave para la asociación entre estos polisacáridos es la presencia de fucosa en las cadenas laterales trisacáridas. Modelos computacionales predicen que los xiloglucanos que contienen fucosa adoptan

conformaciones espaciales más favorables para la unión con celulosa que el xiloglucano no-fucosilado (Levy y cols, 1991). El xiloglucano fucosilado se une a la celulosa *in vitro* a una tasa 2 veces más alta que la xilosa no fucosilada (Levy y cols, 1997). Sin embargo, estudios *in vivo* han mostrado que la fucosilación del xiloglucano no es absolutamente requerida para la formación de la red celulosa-xiloglucano. Por ejemplo, mutantes en AtFUT1, una fucosiltransferasa de xiloglucano, no poseen defectos en su crecimiento ni en la fuerza de los tallos a pesar de una reducción de L-fucosa de un 99% con respecto a la silvestre (Vanzin y cols, 2002).

También se cree que el xiloglucano fucosilado jugaría un papel en el crecimiento de las plantas. Se ha mostrado que oligosacáridos derivados de éste, llamados oligosacarinas, actúan como inhibidores de la elongación estimulada por auxina en epicotilos de arveja.

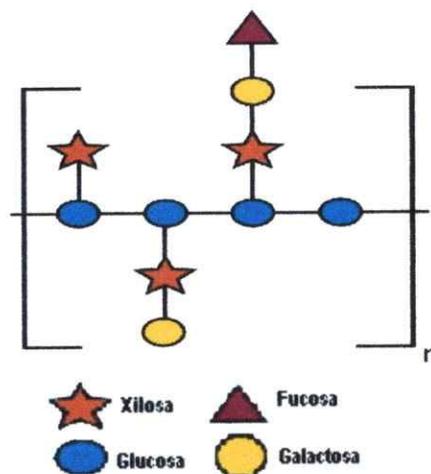


Figura 2. Esquema de una de las posibles glicosilaciones de xiloglucano.

La actividad biológica de las oligosacarinas dependería de la presencia de L-fucosa terminal (Augur y cols, 1993).

Otra estructura que juega un papel significativo en la integridad de la pared celular, y que también se encuentra fucosilado, es la pectina RG-II. Para el estudio de la importancia de los residuos de fucosa en la función de este polisacárido, se estudió el RGII en el mutante *murl* de *Arabidopsis*, el cual es incapaz de sintetizar GDP-fucosa. Este mutante presenta un fenotipo enano y tallos débiles (Reiter y col, 1993). Al medir la fuerza de los hipocotilos de estos mutantes se observó una gran disminución con respecto a los silvestres, sin embargo este fenotipo pudo ser revertido al agregar borato al medio de crecimiento, ya que el borato participa en la formación de dímeros de RG-II (O'Neill y cols, 1996; Ryden y col, 2003). Esto indica que los residuos de L-fucosa, en particular los residuos α 1,2 y α 1,4 fucosa de RG-II son muy importantes para la formación de dímeros y otorgan resistencia y tensión a la pared en células vegetales.

Otra función atribuida a los residuos de fucosa, es la otorgada en las proteínas arabinogalactanos *O*-enlazadas. Al estudiar las raíces de las mutantes *murl*, se observó que existía una caída en la elongación celular en zonas periódicas de este órgano y se postuló que este fenotipo podía deberse a la falta de fucosilación en las proteínas AGP (Van Hengel y cols, 2002). Además, en el plegamiento y targeting de las glicoproteínas *N*-enlazadas, el proceso de glicosilación es esencial, lo que también atribuiría una función a los residuos de fucosa presentes en ella (Wilson y cols, 2001; Strasser y cols, 2004).

Como se mencionó anteriormente, los componentes de la pared celular primaria juegan múltiples papeles de gran relevancia en distintas funciones celulares. Para poder

comprender de manera más acabada estas funciones, se hace necesario estudiar en detalle los distintos componentes de ésta, su síntesis y la regulación de la misma. Los TNAs del aparato de Golgi de plantas son unas de las proteínas involucradas en la biosíntesis de los componentes de la pared y por ende su estudio ayudaría a comprender en detalle tanto el papel que desempeñan en la regulación de la síntesis de los distintos glicoconjugados, como el papel de éstos últimos en las funciones de la pared celular.

En esta memoria de título se estudió un posible transportador de GDP-fucosa del aparato de Golgi de *Arabidopsis*, GONST4, dada la importancia de la fucosilación en los distintos glicoconjugados presentados. Para estudiar la función de este transportador *in vivo* y la función de los glicoconjugados fucosilados, se obtuvieron plantas transgénicas homocigotas de *Arabidopsis* que sobreexpresan este TNA. Por otra parte, se realizaron ensayos de transporte con fracciones enriquecidas en aparato de Golgi de tabaco sobreexpresando GONST4 de manera transitoria, para determinar la especificidad de sustrato. Finalmente, dado la frecuente distribución de la fucosa en glicoconjugados de diversas especies vegetales, se buscaron genes ortólogos a GONST4 a través de herramientas bioinformáticas.

2. Hipótesis.

GONST4 es un transportador de GDP-Fucosa del Aparato de Golgi de *Arabidopsis thaliana*.

3. Objetivos.

3.1. Objetivo general

Determinar la funcionalidad del posible transportador de GDP-fucosa de *A. thaliana*, GONST4, a través de ensayos de transporte mediante su sobre-expresión transitoria en hojas de tabaco y construir herramientas para el análisis de su función *in vivo* en *Arabidopsis thaliana*.

3.2. Objetivos específicos.

1) Análisis funcional de los vectores binarios de sobre-expresión de Gonst4; pVKH18-EN6:GONST4 y pGWB8-GONST4O-His.

- Verificación de la funcionalidad del vector pVKH18-EN6:GONST4 mediante la observación utilizando microscopía de epifluorescencia en extractos de hojas de tabaco transformadas de manera transitoria con el vector.
- Análisis de expresión de GONST4-His (RT-PCR y western blot) en extractos de hojas de tabaco transformadas de manera transitoria con el vector de sobre-expresión pGWB8-GONST4O-His.

2) Estudio de la especificidad de GONST4.

- Determinación del transporte de GDP-fucosa y UDP-glucosa en fracciones enriquecidas en aparato de Golgi obtenidas a partir de hojas de tabaco transformadas con pVKH18-EN6:GONST4 o pGWB8-GONST4O-His.

3) Obtención de plantas *Arabidopsis thaliana* que presenten niveles alterados de expresión de *GONST4*.

- Transformación mediante la técnica de inmersión floral de plantas *Arabidopsis thaliana* con *Agrobacterium tumefaciens* portando el vector para aumentar los niveles de expresión de GONST4 (pGWB8-GONST4O-His).
- Selección con antibióticos de plantas transformadas y verificación de la transformación de las plantas por PCR y de la expresión de *GONST4-His* por RT-PCR.
- Obtención de las siguientes generaciones de plantas pGWB8-GONST4O-His hasta obtener una línea homocigota para esta característica.

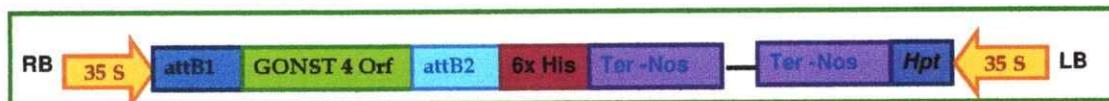
4) Búsqueda y análisis bioinformático de ortólogos de GONST4.

4. Materiales y métodos.

4.1. Materiales y métodos generales.

4.1.1. Construcciones y plásmidos utilizados.

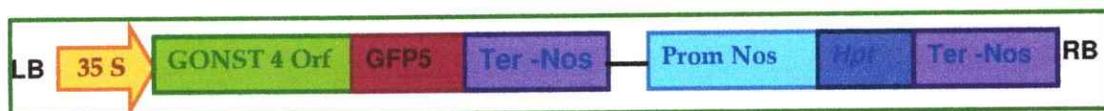
Para la memoria de título que se presenta a continuación se utilizó el constructo que se muestra en el siguiente diagrama:



Este constructo fue realizado para la sobre-expresión de GONST4 en plantas. Como se observa, el promotor es el 35S del virus mosaico de la coliflor (CaMV), y el terminador corresponde al terminador Nos. Además el constructo tiene el gen de resistencia a higromicina (*Hpt*), para plantas, y el cDNA que codifica para el transportador GONST4 (*GONST4Orf*, número de acceso At5g19980) se encuentra flanqueado por los sitios de

recombinación attB1 y attB2, con una cola de 6 histidinas (6x His). Este constructo se encuentra en el vector binario pGWB8, que contiene el gen que confiere resistencia a kanamicina en bacterias (*NPTII*). El vector fue realizado por Rodrigo Caroca (Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Universidad de Chile, 2007).

Además se utilizó el vector binario pVKH18-EN6:GONST4 (Handford y cols, 2004), que contiene el gen que confiere resistencia a kanamicina en bacterias (*NPTII*), posee el cDNA codificante para GONST4 unido a una cola de GFP bajo el control del promotor 35S del CaMV y el cDNA codificante para otorgar resistencia a higromicina en plantas (*Hpt*). En el siguiente diagrama se presenta el constructo descrito:



4.1.2. Obtención de células competentes de *A. tumefaciens*.

Se inoculó *Agrobacterium tumefaciens* en 5 ml de medio LB (1% cloruro de sodio, 1% triptona y 0,5% de extracto de levadura) con los antibióticos rifampicina (10 µg/ml) y gentamicina (50 µg/ml) para la selección del DNA cromosomal y del plásmido Ti, respectivamente. Luego se incubó a 28°C con agitación durante toda la noche. Al día siguiente se inocularon 4 ml de este cultivo en 100 ml de LB con los antibióticos antes mencionados a la concentración indicada. Se incubó este cultivo hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,5, se incubó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 3.000 g por 20 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 1 ml de CaCl₂ 20 mM (estéril y a 4°C). Se realizaron alícuotas de 100 µl de esta suspensión y se

congelaron en nitrógeno líquido. Finalmente se guardaron a -80°C hasta ser utilizadas. Todo este procedimiento fue realizado en condiciones de esterilidad.

4.1.3. Transformación de células competentes de *A. tumefaciens*.

Se descongeló una alícuota de 200 µl de *A. tumefaciens*, cepa GV3101 competente en hielo. Se le agregaron 100 ng del plásmido y se dejó en nitrógeno líquido por 5 minutos, luego se mantuvo a temperatura ambiente por 5 minutos más y se agregó 1 ml de LB (1% cloruro de sodio, 1% triptona y 0,5% de extracto de levadura). Este cultivo fue incubado a 28°C con agitación por toda la noche y se sembraron 200 µl en una placa con medio LB-agar (LB y 1,6% agar) con gentamicina 25 µg/ml para seleccionar las bacterias que tengan el plásmido Ti y estreptomycinina 50 µg/ml para seleccionar las transformadas con el plásmido pGWB8. Luego se picaron las colonias resistentes y se dejaron creciendo en 5 ml de LB a 28°C con agitación por un día.

A estos cultivos se les realizó una purificación del DNA plasmidial según las instrucciones del fabricante (Promega) y luego una reacción de PCR para verificar que las colonias resistentes correspondían a transformantes. Se utilizó 1 µl de la solución de plásmido obtenida como templado y los partidores NPTII 3 y NPTII 5 (Tabla I), utilizando el programa de PCR, NPT (Tabla II) para verificar la presencia del plásmido pGWB8. Para verificar la presencia del plásmido pGWB8GONST4Orf-His, se utilizó el programa Gonst ant (Tabla II) y los partidores Gonst4 S y Gonst4 Full (Tabla I). Las colonias positivas para estas reacciones fueron guardadas en glicerol al 60% a -80°C hasta ser utilizadas. Todo este procedimiento se realizó bajo condiciones de esterilidad.

4.2. Comprobación de la funcionalidad del constructo.

4.2.1. Infiltración de hojas de Nicotiana tabacum.

Para verificar la funcionalidad del constructo y realizar ensayos de transporte con vesículas de aparato de Golgi que presenten niveles aumentados de GONST4, se procedió a infiltrar hojas de tabaco con *A. tumefaciens* portando el vector de interés, ya sea transformadas con PGWB8GONST4Orf-His y con PGWB8 (como control), o con pVKH18-EN6:GONST4Orf (Handford et al, 2004) y sin transformar (como control). Para realizar esto, se cultivó *A. tumefaciens* a 28°C, por 24 horas en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente para cada vector; kanamicina a una concentración de 50 µg/ml para el vector pVKH18-EN6:GONST4Orf y las concentraciones indicadas anteriormente de cada antibiótico para los demás vectores. Luego, se centrifugó este cultivo a 5.000 g durante 10 minutos y se resuspendió el sedimento en 1/3 del volumen utilizado para su crecimiento de medio de infiltración (0,44 % MS, 15% sacarosa, 100 ppm de inositol y 300 µM Acetosiringona).

Con esta solución se procedió a inyectar con una jeringa una hoja de *N. tabacum* variedad XANTHI, de 4 semanas de edad y crecida a 22 °C con 16 horas de luz diarias, previamente humedecida, por su parte abaxial. Luego de la infiltración, las plantas se mantuvieron a 23°C y con 16 horas de luz diarias hasta la cosecha de las hojas, que se realizó pasado 3 a 5 días en el caso de extracción de RNA (sección 3.2.3) o pasado 5 días en el caso de extracción de aparato de Golgi (sección 3.5.1; Batoko y cols., 2000).

4.2.2. Microscopía de epifluorescencia.

Se infiltraron hojas de tabaco con *A. tumefaciens* transformada con el vector pVKH18-EN6:GONST4Orf y con *A. tumefaciens* sin transformar (como control). Tras 72 horas de la infiltración, se observó la epidermis de una hoja de tabaco bajo el microscopio de epifluorescencia (OLYMPUS IX70). Este tejido fue excitado a 400 nm (correspondiente a la longitud de onda a la cual se obtiene una máxima fluorescencia para GFP) observándose la emisión de GFP a 509 nm (donde se encuentra el peak de emisión para esta proteína). Además se observó la muestra en campo claro.

4.2.3. Extracción de RNA.

Para verificar la expresión del constructo, en tabaco y en *Arabidopsis thaliana*, se homogenizaron entre 50 y 100 mg de tejido (ya sea de hojas de tabaco de 3 a 5 días después de la infiltración, u hojas de *A. thaliana* cosechadas a las 5 semanas de edad) en 1 ml de RNA-Solv con un pequeño mortero congelado con Nitrógeno líquido. Luego, se agregaron 0,2 ml de cloroformo, se agitó con vórtex por 15 segundos y se incubó en hielo por 10 minutos. Una vez incubado, se centrifugó por 15 minutos a 12.000 g a temperatura ambiente. Se rescató aproximadamente el 80% de la fase superior (acuosa) para transferirla a un nuevo tubo eppendorf. Se agregaron 500 µl de isopropanol enfriado a -20°C (para precipitar el RNA) y se homogeneizó. Se dejó incubando a -20°C por 15 minutos y se centrifugó por 10 minutos a 12.000g a temperatura ambiente. Luego, el sedimento fue lavado con 1 ml de etanol 80% enfriado a -20°C y se agitó por 10 minutos con un vórtex. Para volver a obtener el sedimento, se centrifugó por 3 minutos a 14.000 rpm y se dejó secar este sedimento por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió el RNA en 20 µl de agua libre de RNAsas (DEPC) y se guardó a -20°C

hasta ser utilizado. Para determinar la calidad del RNA extraído, se corrió un gel de agarosa 1% en buffer en TAE 1x (Tris-base 40 mM, ácido acético glacial 19 mM y EDTA 1 mM, a pH 8) y se observó la presencia de las bandas correspondientes a los transcritos para las subunidades 28 S y 18 S (en una proporción aproximada de 2:1). La cuantificación se realizó con el espectofotómetro nanodrop (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis).

Tratamiento con DNAsa.

Para eliminar contaminación del RNA con DNA, se tomaron 4 µg de RNA y se agregó 1 µl buffer DNAsa + 1 µl DNAsa + 0,5 µl inhibidor de RNAsa completando el volumen hasta 10 µl con H₂O DEPC, se dejó incubando a 37 °C por 20 minutos y se puso en hielo. Finalmente se agregó 1 µl de EDTA DEPC 25 mM y se dejó a -20 °C.

4.3. Reacción de RT-PCR.

Utilizando los 4 µg de RNA que previamente fueron tratados con DNAsa, se realizó una reacción de retro-transcripción según las instrucciones del fabricante (Invitrogen) utilizando como partidor oligo AP (Tabla I). Luego se realizó una reacción de PCR con partidores específicos para GONST4, GONST4 S y GONST4 AS los que se muestran en la Tabla I. Los programas utilizados para realizar las reacciones de retro-transcripción (programa Impron II) y de PCR (programa Gonst ant) se muestran en la Tabla II Las concentraciones de los distintos compuestos utilizados se muestran en la Tabla III Los controles utilizados para cada reacción se describen en los resultados.

Tabla I. Partidores utilizados para las distintas reacciones de PCR.

Partidor	Secuencia partidor	Descripción
GONST4 S	5' CACCATGTCGTCCTCTCGATTC GAT 3'	Primer utilizado para la amplificación de Gonst 4 portando o no la cola de histidina, según el primer con que se combine. Hibrida con la región 5' interna de Gonst4.
GONST4 full	5' TACAACAGAAGCTAGTTTCCC 3'	Primer utilizado para amplificar Gonst4 Orf, no incluye el codón de término. Utilizado junto con Gonst4 S da un amplificado de 1023 pb. Hibrida con la región 3' interna de Gonst4.
GONST4 AS	5' GACTAAGAGCGGTGTTAGAGA 3'	Primer utilizado para amplificar Gonst4 Orf. Utilizado junto con Gonst4 S da un amplificado de 349 pb. Hibrida con la región 3' interna de Gonst4.
His3	5' GCATGATGATGATGATGATGG CTG 3'	Primer utilizado para amplificar Gonst4-His. Utilizado en combinación con Gonst4 S se obtiene un amplificado de 1086 pb aproximadamente. Hibrida con la cola de histidina.
NPT II 3'	5' CTATGTCCTGATAGC 3'	Primer utilizado para amplificar el gen de resistencia a kanamicina. Utilizado en combinación con NPT II 5' se obtiene un fragmento de 640 pb aproximadamente. Hibrida con la región 3' interna de NPT II.
NPT II 5'	5' CAAGATGGATTGCAC 3'	Primer utilizado para amplificar el gen de resistencia a kanamicina. Utilizado en combinación con NPT II 3' se obtiene un fragmento de 640 pb aproximadamente. Hibrida con la región 5' interna de NPT II.
GAPA-F	5' GGTAGGATCGGGAGGAAC 3'	Primer utilizado para verificar la calidad del DNA. Hibrida contra una región 5' interna del DNA de la gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa.
GAPA-R	5' CTGGTGCCAAGAAGGTTATC 3'	Primer utilizado para verificar la calidad del DNA. Hibrida contra una región 3' interna del DNA de la gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa.
Oligo AP	5' CGCCACGCGTCGACTAGTACTT TTTTTTTTTTTTTTTTT 3'	Primer utilizado para la reacción de retrotranscripción. Hibrida con la cola de poliadenina de los RNA _m .

Tabla II. Programas utilizados para las distintas reacciones de PCR.

Para todos los casos en que el templado utilizado fue DNA genómico, se realizó Hotstart; lo que corresponde a 5 minutos de denaturación a 94 °C como primer paso, luego se agrega la enzima Taq polimerasa a 80 °C. Este caso está ejemplificado en todos los programas en los que se utilizó.

a) **Impron II.** Programa utilizado para retro transcripción. Utilizando oligo AP como partidor.

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	70°C	5 min	1
2	2	25°C	5 min	1
3	3	42°C	60 min	1
4	4	70°C	15 min	1

b) **Gonst ant.** Programa utilizado para verificar la expresión de GONST4 en *Nicotiana tabacum*. Se utilizaron los partidores Gonst4 S y Gonst4 full.

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1 Hotstart	1	94°C	5 min	1
	2	80°C	Agregar Taq	
2	1	94°C	30 sec	30
	2	58°C	30 sec	
	3	72°C	1 min	
3	1	72°C	10 min	1
		4°C	∞	

c) **Mike 11.** Programa utilizado para verificar la calidad del DNA extraído. Se utilizaron los partidores Gapa F y Gapa R.

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1 Hotstart	1	94°C	5 min	1
	2	80°C	Agregar Taq	
2	1	94°C	30 sec	30
	2	58°C	30 sec	
	3	72°C	1 min	
3	1	72°C	10 min	1
		4°C	∞	

d) **PCR His.** Programa utilizado para determinar la presencia del inserto y también para verificar la presencia del transcrito GONST4Orf-His en *A. thaliana*. En este caso la concentración de MgCl₂ es de 5 mM en lugar de 3 mM. Se utilizaron los partidores Gonst4 S y His3.

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1 Hotstart	1	94°C	5 min	1
	2	80°C	Agregar Taq	
2	1	94°C	30 sec	30
	2	55,5°C	30 sec	
	3	72°C	2 min	
3	1	72°C	10 min	1
		4°C	∞	

e) **NPT.** Programa utilizado para determinar la presencia del gen *NPTII*, que confiere resistencia a kanamicina en *A. tumefaciens*. Se utilizaron los partidores NPTII 3' y NPTII 5'.

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	94°C	5 min	1
2	1	94°C	30 sec	30
	2	52°C	30 sec	
	3	72°C	1 min	
3	1	72°C	10 min	1
		4°C	∞	

Tabla III. Componentes de las reacciones de PCR

Compuesto.	Concentración o volumen final.
Buffer (fermentas)	1X
MgCl ₂	3 mM
dNTPs	0,2 mM
Primer sentido	0,5 μM
Primer antisentido	0,5 μM
Taq (fermentas)	0,5 U
H ₂ O _d	Hasta completar 20 μl
DNA templado	0,5 μl

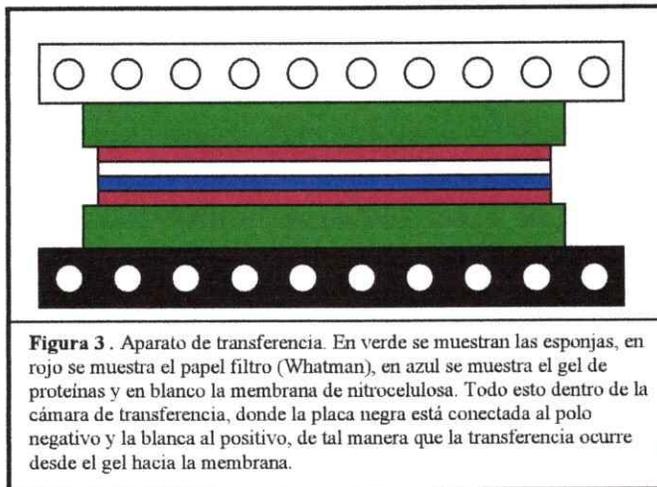
4.4. Western Blot.

Se preparó un gel SDS-Page al 10%. Para esto, primero se preparó una solución separadora al 10% (2 ml de H₂O_d+ 1,7 ml de solución de acrilamida 30% (29,2% acrilamida y 0,8% N,N'-metilen-bis-acrilamida) + 1,3 ml de Tris 1,5 M (pH 8,8) + 0,05 ml de SDS 10% + 0,05 ml de APS 10% + 0,002 ml de TEMED , luego se cargó esta solución entre los vidrios de preparación del gel. Se tapó esta solución con isopropanol frío al 10% para evitar la formación de burbujas y ayudar a la polimerización. Una vez polimerizado, se agregaron 2 ml de la solución estancadora (1,4 ml de H₂O_d + 0,33 ml de solución de acrilamida 30% + 0,25 ml de Tris 1 M (pH 6,8) + 0,02 ml de SDS 10% + 0,02 ml de APS 10% + 0,002ml de TEMED) y se dispuso la peñeta para formar los carriles sobre esta última solución. Una vez polimerizada esta solución, se procedió a colocar el gel en la cámara de corrida de electroforesis con el buffer de corrida de electroforesis [Tris Glicina 1X (Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M, pH 8,3 y SDS 0,1%)].

Antes de cargar las muestras, se las incubaron a 60 °C por 10 min con el buffer de carga (BC) 3X (2 volúmenes de muestra y 1 volumen de BC [190 mM Tris pH 6,8 + 30% v/v glicerol, 15% v/v β-mercaptoetanol, 6% v/v SDS, 0,03% v/v azul de bromofenol]).

Luego se cargó el gel poniendo en el primer carril 5 µl de un Standard de Peso Molecular (Fermentas), luego 10 µl del control negativo (extracto de proteínas de tomate, 40 µg) y luego 10 µl de la muestra, que corresponden a 50 µg (fracción enriquecida en aparato de Golgi, de hojas infiltradas con *A. tumefaciens* transformado con el vector pGWB8GONST4Orf-His). Finalmente se corrió el gel a 4 °C y a voltaje constante de 100 V hasta que el frente (azul de bromofenol) alcanzó el final del gel.

Se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se armó el aparato para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Figura 3) con todos los componentes



sumergidos en el buffer de transferencia (Tris Glicina1X, Metanol 20%, a 4°C). Éste se ubicó en una cámara de transferencia con buffer de transferencia y se dejó transfiriendo a 4°C a voltaje constante de 100 V durante 1 a 2

horas hasta que se llegó a una intensidad de corriente de 350 mA. Se desarmó y se observó que los pesos moleculares estuvieran adheridos a la membrana, y se prosiguió a lavar ésta con H₂O_d durante 5 minutos. Luego se tiñó por 5 minutos más con una solución de Rojo de Ponceau (Rojo de Ponceau 0,1%, ácido acético 5%) para verificar la

transferencia de las muestras. Luego de lavar la membrana con H_2O_d se dejó bloqueando con TBS-T (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 140 mM y 0,1% Tween) más 5% de leche descremada, durante toda la noche con agitación. Se lavó 2 veces por 5 minutos con TBS-T y se incubó con TBS-T + 1% leche descremada + anticuerpo primario, en este caso α -His Ratón 1:200 (Invitrogen) por 60 minutos. Luego se lavó 3 veces por 10 minutos cada una con TBS-T para quitar el anticuerpo primario no adherido, y se incubó con el anticuerpo secundario, en este caso antiratón AP (fosfatasa alcalina; Sigma), 1:1000 en TBS-T + 1% leche por 60 minutos más. Para quitar el anticuerpo secundario que no quedó adherido, se lavó 3 veces por 10 minutos con TBS-T.

Para el revelado, se procedió a lavar 2 veces por 5 minutos con Buffer Alcalino (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM y $MgCl_2$ 5 mM a pH 9,5). Luego se incubó con 10 ml de buffer alcalino + 66 μ l NBT al 50% + 33 μ l BCIP al 50% hasta revelar las bandas esperadas, por 30 minutos, con agitación suave y periódica. Se detuvo el revelado sacando la membrana de la solución y agregándole 10 ml de EDTA 20 mM a pH 8.

Todos los pasos de este protocolo, a no ser que se especifique lo contrario, se realizaron con agitación y a temperatura ambiente.

4.5. Ensayos de Transporte.

4.5.1. Extracción de Aparato de Golgi.

Se maceraron las hojas de tabaco transformadas transitoriamente, después de 5 días de la infiltración, sin la vena principal en un mortero frío con 1 volumen de SPM 0,5 M (sacarosa 16% p/p, KH_2PO_4 100 mM pH 6,65, $MgCl_2$ 5 mM DTT 10 mM) el cual fue preparado al momento de utilizar. Se filtró el macerado con 4 capas de gasa, y se

centrifugó por 15 minutos a 10.000 rpm y a 4°C. Luego, se rescató el sobrenadante y se dispuso en un tubo de ultracentrífuga sobre un cojín de 7 ml de una solución de SPM 1,3 M (sacarosa 38% p/p, KH₂PO₄ 100 mM pH 6,65, MgCl₂ 5 mM, DTT 10 mM en H₂O_d) lo que se centrifugó por 90 minutos a 28.000 rpm y a 4 °C.

Se procedió a retirar el sobrenadante, dejando la interfase y el cojín de SPM 1,3 M. Entonces se formó un gradiente de sacarosa, agregando a la interfase 8 ml de SPM 1,1 M (sacarosa 33% p/p, KH₂PO₄ 100 mM pH 6,65, MgCl₂ 5 mM DTT 10 mM), 7 ml de SPM 0,7 M (sacarosa 23% p/p, KH₂PO₄ 100 mM pH 6,65, MgCl₂ 5 mM DTT 10 mM) y 8 ml de SPM 0,25 M (sacarosa 8% p/p, KH₂PO₄ 100 mM pH 6,65, MgCl₂ 5 mM DTT 10 mM), en el orden mencionado, cuidando de no mezclar cada fase. Este gradiente se centrifugó por 90 minutos a 28.000 rpm y a 4 °C.

Se colectó la interfase correspondiente al Aparato de Golgi, que se encuentra entre la solución de SPM 1,1 M y 1,3 M (Leelavathi et al, 1970) y se centrifugó por 100 min a 37.000 rpm (4 °C). Se resuspendió el sedimento obtenido en 200 µl STM (sacarosa 250 mM, MgCl₂ 1 mM y Tris HCl 10 mM pH 7,5) y se guardó a -80 °C hasta ser utilizada.

Todo este procedimiento se realizó a 4 °C, cuidando que siempre los distintos extractos estuviesen en hielo y que las distintas soluciones estuviesen a 4 °C.

4.5.2. *Cuantificación de proteínas.*

Una vez obtenida la fracción enriquecida en aparato de Golgi, se procedió a cuantificar las proteínas presentes. Se realizó una curva de calibración con distintas cantidades de BSA (de 0 a 20 µg) llevando cada solución a un volumen final de 20 µl. La muestra se diluyó 10 veces y se cargaron 2 µl de esta solución y 2 µl de la muestra sin diluir,

llevándolas a un volumen final de 20 μl con $\text{H}_2\text{O}_\text{a}$. A cada una de las distintas soluciones, que se hacen por duplicado, se le agregó 180 μl de una solución ácido bicinchonínico: CuSO_4 (50:1). Se incubaron estas soluciones dispuestas en una placa de Elisa por 30 minutos a 37 °C y se midió la absorbancia a 562 nm, con un lector de placa Elisa.

4.5.3. *Ensayo de Transporte.*

Para determinar la especificidad de sustrato del transportador GONST4, se realizaron distintos ensayos de transporte con GDP-fucosa o UDP-glucosa como sustrato. Utilizando las fracciones enriquecidas en aparato de Golgi obtenidas desde hojas de tabaco infiltradas con *A. tumefaciens* transformada con pGWB8GONST4Orf-His, como muestra, o con pGWB8 como control. También se realizó este ensayo con las fracciones obtenidas desde hojas de tabaco infiltradas con *A. tumefaciens* transformado con pVKH18-EN6:GONST4 y con *A. tumefaciens* solo, como control.

Se procedió a tomar 50 μl de las distintas fracciones enriquecidas en aparato de Golgi (45 a 227 μg de proteína) y se incubaron, separadamente, a 25 °C por 30 segundos. Luego se agregó 50 μl de la mezcla de reacción (2 μM GDP-Fucosa + 0,1 μCi GDP-[^3H]Fucosa (Perkin-Elmer) ó 2 μM UDP-Glucosa + 0,1 μCi UDP-[^3H]Glucosa (GE Healthcare)) y se incubó por 0 ó 3 minutos. Se detuvo la reacción agregando 1 ml de STM frío (4 °C) y se colocaron las vesículas inmediatamente en un filtro de nitrocelulosa (0,45 μm éster de celulosa 25 mm diámetro, Millipore.), se lavaron con 10 ml de STM frío por filtración al vacío y se dejó secando. Luego se transfirieron los distintos filtros a viales y se les agregó 3 ml de líquido de centelleo (Ecoscint A; National Diagnostics, Atlanta, GA) para contar en un contador de centelleo.

Además, se utilizó como control de unión inespecífica de los nucleótidos-azúcares marcadas radioactivamente a la membrana, una reacción a tiempo 0 y utilizando STM en lugar de fracción enriquecida en aparato de Golgi.

4.6. Transformación estable de *Arabidopsis thaliana* con pGWB8GONST4Orf-His y búsqueda de plantas homocigotas.

4.6.1. Transformación estable de Arabidopsis thaliana con el vector pGWB8GONST4Orf-His.

La transformación estable de *A. thaliana* se llevó a cabo según el protocolo de inmersión floral descrito por Clough y Bent (1998). Se incubó *A. tumefaciens* cepa GV3101 transformada con el vector pGWB8GONST4Orf-His en medio LB suplementado con gentamicina 25 µg/ml y estreptomycinina 50 µg/ml por 24 horas, luego se centrifugó este cultivo a 5.000 g por 20 minutos. El sedimento fue resuspendido suavemente en una solución al 5% sacarosa con 0,005% v/v de surfactante Silwet L-77, hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,8. Por otra parte, se crecieron plantas de *A. thaliana* en tierra a 25 °C con 16 horas de luz, hasta alcanzar el estado de floración y se embebieron los tejidos aéreos de estas plantas en la suspensión de *A. tumefaciens* durante 3 seg. Luego se taparon las plantas con un plástico negro para mantener la humedad y la oscuridad y se dispusieron de manera horizontal. Después de 24 horas del tratamiento, el plástico fue removido y se dejó las plantas hasta que las silicuas se secaron y se extrajeron las semillas.

4.6.2. Selección de transformantes de A. thaliana.

Las semillas (generación T1) de *A. thaliana* obtenidas, fueron sembradas en medio MS (0,44% MS, 20% sacarosa, 0,7% agar y 100 ppm mioinositol llevado a pH 5,8 con KOH)

suplementado con higromicina 25 µg/ml, para seleccionar las plantas que habían sido transformadas con pGWB8GONST4Orf-His. Se sembraron ~100 semillas por placa, sembrándose también semillas silvestres (no-transformadas) como control. Todas las semillas fueron previamente esterilizadas. Se cultivaron en una cámara a 23 °C con 16 horas de luz diarias. Una vez pasadas 3 semanas desde la siembra, se contaron las plántulas sobrevivientes y se traspasaron a una mezcla de tierra de hoja:vermiculita (2:1) y se dejaron crecer en las mismas condiciones. Luego se extrajo DNA genómico (sección 3.6.3) de las plantas resistentes a higromicina y se verificó la presencia del inserto con una reacción de PCR (sección 3.6.4). Se esperó 5 semanas hasta que las plantas T1 positivas por PCR semillaran. Sus semillas (T2) fueron sembradas en medio MS con higromicina, el número de plantas resistentes fueron contadas y sometidas a reacciones de PCR (sección 3.6.4) para identificar líneas homocigotas.

Para esterilizar las semillas, éstas fueron inmersas por 30 min en TritonX-100 al 0,1 %, luego fueron lavadas por 5 min con etanol al 70% y fueron sumergidas en una solución de TritonX-100 al 0,1% con Cloro por 10 min, y luego lavadas 4 veces con H₂O_d.

4.6.3. *Extracción de DNA genómico de A. thaliana.*

Se removieron dos hojas de las plantas de 6 semanas de edad y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Luego se maceraron con 1ml el buffer de extracción CTAB (2% CTAB, NaCl 5M, EDTA 0,5 M y Tris HCl 1 M pH 8), y se incubaron a 70°C por 30 min. Se volvió a agregar 0,5 ml del buffer y se incubó a 70°C por 15 min. Para separar las proteínas y el exceso de polisacáridos, se adicionó ½ volumen de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1), la mezcla se invirtió repetidamente y se centrifugó

por 10 minutos a 13.000 rpm. Se rescató el sobrenadante y se precipitó el DNA con 1 volumen de isopropanol a -20 °C por 30 min., se centrifugó por 10 minutos a 13.000 rpm y se lavó el sedimento obtenido con etanol al 70%. Se centrifugó por 5 minutos más a 13.000 rpm. y se retiró el etanol, dejándose secar el sedimento a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 30 µl de buffer Tris HCl pH 8 con 1 µg de RNAasa A (Fermentas). Para cada reacción de PCR se utilizaron 0,5 µl del DNA extraído.

4.6.4. *Reacción de PCR, en búsqueda de las transformantes.*

Para verificar la calidad del DNA, se realizó una reacción de 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 de PCR Mike 11 (Tabla II). Para verificar si las plantas resistentes a higromicina correspondían efectivamente a transformantes, se realizó una reacción de PCR utilizando el DNA genómico como templado, con los partidores Gonst4 S y His 3, se utilizaron estos partidores ya que *Arabidopsis thaliana* tiene GONST4 en su genoma, pero no unido a una cola de histidina. Se realiza la reacción con el programa PCR His (Tabla II). Las concentraciones de los distintos compuestos utilizados se muestran en la Tabla III.

4.6.5. *Reacción de RT-PCR, verificación de la expresión del constructo.*

Una vez que se encontraron las plantas homocigotas, se realizó una reacción de retro transcripción, utilizando el programa de PCR Impron II (Tabla II), con el partidador oligo AP (Tabla I) y 4 µg del RNA obtenido a partir de las 12 plantas homocigotas, provenientes de 2 líneas distintas mediante el procedimiento detallado en la sección 1.3.

Luego se realizó una reacción de PCR con los partidores Gonst4 S y His 3 (Tabla I) utilizando el programa PCR His (Tabla II). Las concentraciones de los distintos compuestos utilizados se muestran en la Tabla III.

4.7. Búsqueda de ortólogos de GONST4 mediante técnicas de bioinformática.

Para encontrar a los ortólogos de GONST4, se realizó un alineamiento con las distintas secuencias aminoacídicas pertenecientes a plantas y otros organismos relacionados presentes en la base de datos de NCBI. Se utilizó el programa BLAST, específicamente protein blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Una vez encontradas las proteínas con mayor identidad, se procedió a buscar en ellas el dominio de unión a GDP altamente conservado (GVVNK o GVLNK) (Gao y cols, 2001). Con estos candidatos se predijeron los distintos dominios de transmembrana de las proteínas con mayor identidad utilizando los programas TMAP, TMHMM v 2.0, THUMBUP, TMpred y SVMtm (ver Referencias). Finalmente se realizó un alineamiento múltiple utilizando el programa ClustalW, y se buscaron los motivos conservados con el programa MEME. El alineamiento fue editado con el programa Microsoft Word 1997.

5. Resultados.

5.1. Verificación de la funcionalidad del constructo pVKH18-EN6:GONST4Orf.

La funcionalidad del constructo pVKH18-EN6:GONST4Orf, en el que GONST4 se encuentra unido a una cola de GFP (Handford et al., 2004), fue verificada con ayuda de Elizabeth Torres (Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular, Facultad de Ciencias) observando la fluorescencia emitida en la epidermis de una hoja de tabaco previamente infiltrada con *A. tumefaciens* transformada con este vector. Luego de 3 días de la infiltración, se aisló la epidermis, y se observó al microscopio de epifluorescencia excitándola a 400 nm y detectando la fluorescencia a 509 nm. Además se observó la muestra en campo claro para determinar que la fluorescencia no estaba siendo emitida por los cloroplastos. Por otra parte, se infiltraron hojas de tabaco con *A. tumefaciens* sin el vector y no se observó fluorescencia alguna (datos no mostrados).

Se determinó que existe fluorescencia en el tejido infiltrado con el vector y que ésta no se debe a la emisión por parte de los cloroplastos, ya que al superponer la fotografía obtenida de la muestra excitada a 400 nm con la fotografía obtenida del mismo sector a campo claro, la fluorescencia no está presente en los lugares donde se encuentran los estomas (que es donde se concentran éstos). Además, su distribución en la célula, donde se localiza de manera discreta en puntos, el tamaño de los mismos (~1 µm) y la gran cantidad de éstos por célula (~8) corresponden al patrón de expresión de fluorescencia esperable para la localización en el aparato de Golgi. De estos resultados se puede concluir que la construcción pVKH18-EN6:GONST4Orf es expresada.

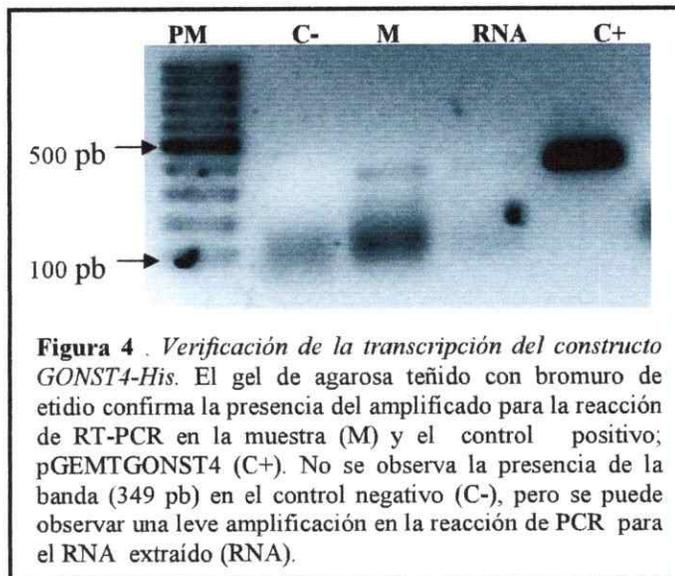
5.2. Verificación de la funcionalidad del constructo pGWB8GONST4Orf-His.

La funcionalidad del constructo fue estudiada en primer lugar transitoriamente en el modelo *Nicotiana tabacum* (tabaco) y no en *Arabidopsis thaliana*, debido a la facilidad con que éste es transformado. Se puede infiltrar una gran cantidad de tejido y luego de 4-5 días, se pueden realizar análisis moleculares y bioquímicos.

5.2.1. *GONST4* es transcrito en hojas de *N. tabacum* infiltradas con el vector pGWB8GONST4Orf-His.

Para determinar si el vector binario pGWB8GONST4Orf-His era funcional, se infiltraron hojas de *N. tabacum* con *A. tumefaciens* transformada con este vector o con el vector vacío (como control negativo). Luego de 3 días, se extrajo el RNA de estas hojas y se realizó una reacción de RT-PCR. Como se muestra en Figura 4, *GONST4-His*, está siendo transcrito ya que se observa el fragmento del tamaño esperado de 349 pb.

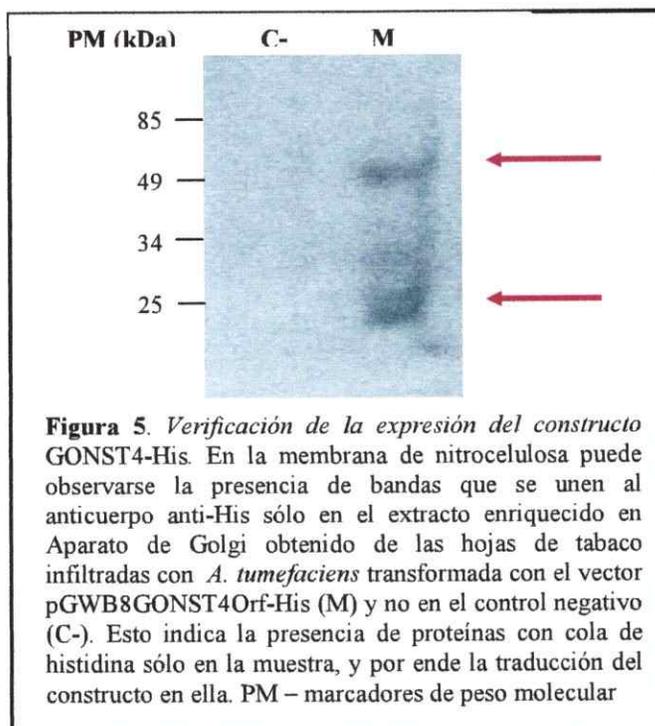
A pesar de que se observa una leve amplificación en la muestra de RNA (reacción de PCR realizada al RNA extraído de la hoja infiltrada con el vector con el inserto, utilizada como control para la contaminación con DNA), lo que puede ser un artefacto debido a que al cargar el gel



parte del contenido de la muestra haya pasado hacia este carril (ya que se observan las mismas bandas en ambos), se puede concluir que *GONST4-His* se expresa.

5.2.2. *GONST4-His* se traduce en hojas de *N. tabacum* infiltradas con el vector pGWB8GONST4Orf-His.

Para verificar la expresión y acumulación de GONST4-His en *N. tabacum*, se procedió a



extraer una fracción enriquecida en Aparato de Golgi de hojas de tabaco infiltradas con *A. tumefaciens* transformadas con pGWB8GONST4Orf-His, para luego realizar un ensayo de western blot y determinar la presencia de la proteína GONST4-His en esta fracción. Como se observa en Figura 5, existe acumulación de esta proteína en

hojas transformadas con el vector de interés, y no así en el control (C-). De las Figuras 4 y 5, se concluye que el constructo es funcional.

5.3. Estudio del transporte de nucleótidos-azúcar a través de GONST4 fusionado con GFP ó con una cola de Histidina.

Para estudiar el transporte hacia el interior del aparato de Golgi, se analizó, mediante un ensayo de transporte, el ingreso de GDP-[³H]fucosa a una fracción enriquecida en este organelo extraída de hojas de *N. tabacum* transformadas con pVKH18-EN6:GONST4Orf o con pGWB8-GONST4Orf-His. Como controles se utilizaron el ingreso de UDP-[³H]glucosa a estas fracciones y fracciones enriquecidas en aparato de

Golgi extraídas de hojas infiltradas con *A. tumefaciens* con el vector pGWB8 vacío. Se usó UDP-Glucosa como control ya que no se predice que GONST4 transporte este nucleótido-azúcar, pues ningún TNA es capaz de transportar tanto GDP-azúcares como UDP-azúcares. En todos los experimentos, los resultados se muestran estandarizados por la cantidad de proteína acumulada según la cuantificación con ácido bicinchonínico.

5.3.1. *GONST4* fusionado a una cola de GFP.

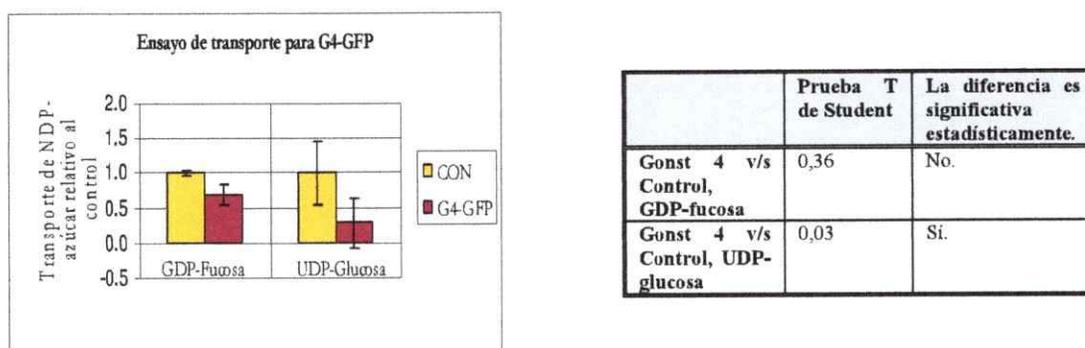


Figura 6 (a) Transporte de GDP-fucosa y UDP-glucosa en fracciones enriquecidas en aparato de Golgi de hojas de tabaco que sobreexpresan GONST4-GFP relativo al control. **(b)** Prueba T de Student, realizada para comparar el transporte en vesículas extraídas de hojas que sobreexpresan GONST4-GFP v/s aquellas extraídas de hojas transformadas con el vector vacío.

La diferencia en el transporte de GDP-fucosa no es estadísticamente significativa entre la fracción enriquecida en aparato de Golgi obtenida de hojas de tabaco que sobreexpresan el transportador fusionado a una cola de GFP y las vesículas obtenidas de hojas infiltradas con el vector vacío pGWB8 (Figura 6). Si observamos los resultados obtenidos para el transporte de UDP-glucosa, notamos que el transporte es menor en las vesículas obtenidas de hojas de tabaco que sobreexpresan el transportador. Esto puede deberse a que las vesículas obtenidas no hayan sido de la misma calidad en ambas fracciones, lo que es corroborado por la prueba t de Student aplicada ya que la diferencia

es estadísticamente significativa para el transporte de UDP-glucosa (Figura 6(b)). La mala calidad de las vesículas obtenidas de hojas que expresan GONST4-GFP podría explicar que el transporte de GFP-fucosa no haya aumentado en las mismas. Por otra parte, la cola de GFP podría estar interfiriendo en la función del TNA GONST4 por lo que se descartó seguir trabajando con este vector y se decidió realizar los ensayos de transporte sobreexpresando GONST4 fusionado con una cola de histidina, que es de menor tamaño (22 aminoácidos en comparación con los 238 aminoácidos que conforman a GFP).

5.3.2. GONST4 fusionado con una cola de His.

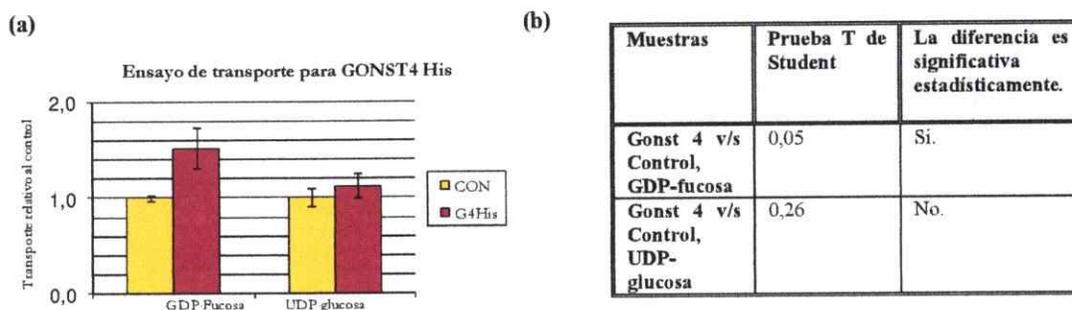


Figura 7 (a) Transporte de GDP-fucosa y UDP-glucosa en fracciones enriquecidas en aparato de Golgi de hojas de tabaco que sobreexpresan GONST4-His relativo al control. (b) Prueba T de Student, realizada para comparar el transporte en vesículas extraídas de hojas que sobreexpresan GONST4-His v/s aquellas extraídas de hojas transformadas con el vector vacío.

El transporte de GDP-fucosa es significativamente mayor en vesículas extraídas de hojas que expresan GONST4-His que en vesículas de hojas transformadas con el vector vacío (pGWB8) (Figura 7), mientras que no hay un transporte significativamente diferente de UDP-glucosa entre las dos muestras. Esto indicaría que GONST4 transporta GDP-fucosa. Además corrobora la funcionalidad del constructo pGWB8-GONST4Orf-His.

5.4. Transformación estable de *Arabidopsis thaliana* con pGWB8GONST4Orf-His y obtención de plantas homocigotas.

Para poder estudiar la función de GONST4 *in vivo* en la planta *A. thaliana*, es necesario contar con mutantes que sobreexpresen este transportador o que presenten cantidades disminuidas del mismo. En esta memoria de título se realizó lo primero, obteniéndose mutantes homocigotas que sobre-expresan el transportador GONST4.

5.4.1. Transformación estable de *A. thaliana* con el constructo pGWB8GONST4Orf-His.

Para obtener plantas transformantes, se utilizó el método de inmersión floral (ver sección 3.6.1 de Materiales y Métodos). Se sembraron las semillas obtenidas (T1) en medio de selección con higromicina y se determinó una tasa de transformación del 0,97 % (Tabla IV).

En la figura 8 se muestra el crecimiento de una planta resistente y de las no resistentes. Las ocho plantas resistentes fueron traspasadas a tierra, aunque desafortunadamente una

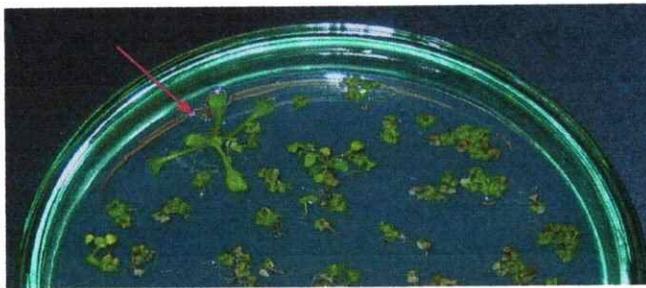


Figura 8. Transformación estable de *A. thaliana* con el vector pGWB8-GONST4Orf-His. En la figura se muestran las plántulas obtenidas tras 19 días de la siembra en medio de selección con higromicina (25 µg/ml) de las semillas obtenidas a partir de la inmersión floral. La flecha roja indica una de las 8 plántulas resistentes obtenidas, correspondiente a T1.5.

Tabla IV.

Tasa de transformación para *A. thaliana* transformada con pGWB8GONST4Orf-His, mediante inmersión floral.

Plantas resistentes a higromicina.	8
Plantas no resistentes a higromicina.	817
Total.	825
Tasa de transformación.	0,97%

línea murió durante este proceso. Al DNA extraído de las 7 restantes, que conforman la 1ª generación transgénica (T1), se le realizó una reacción de PCR utilizando el programa PCR His, para verificar que las plantas resistentes correspondieran efectivamente a transformantes y no fueran plantas resistentes a higromicina no transformadas como se ha observado anteriormente (Lawand y cols, 2002).

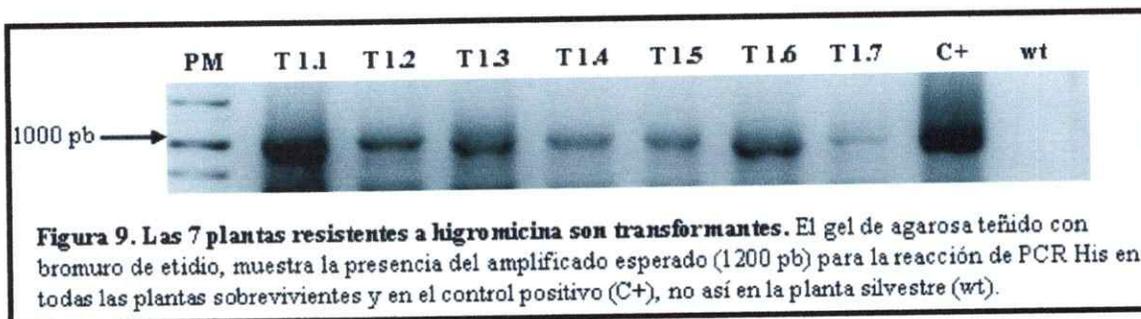


Figura 9. Las 7 plantas resistentes a higromicina son transformantes. El gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, muestra la presencia del amplificado esperado (1200 pb) para la reacción de PCR His en todas las plantas sobrevivientes y en el control positivo (C+), no así en la planta silvestre (wt).

Se obtuvo el amplificado esperado de aproximadamente 1086 pb, correspondiente a *GONST4-His* en todas ellas (figura 9). De esto puede concluirse que las plantas resistentes son transformantes.

5.4.2. *Obtención de plantas homocigotas para el constructo GONST4Orf-His a partir de la T1.*

Las plantas diploides transformantes obtenidas en la primera generación deben ser heterocigotas (hemicigotas). Entonces para obtener las plantas homocigotas fue necesario autofertilizar las plantas hemicigotas obtenidas anteriormente.

Las semillas de las 7 plantas transformantes (T1), fueron sembradas en medio selectivo. A pesar de que el medio contenía higromicina, lamentablemente, tres de estas placas se contaminaron con un hongo voraz (las correspondientes a las líneas T1.3, T1.6 y T1.7)

y por ende no se obtuvo plántulas de ellas. De las plántulas obtenidas de las semillas de T1.1, T1.2, T1.4 y T1.5, aproximadamente tres cuartos sobrevivieron (Tabla V (a)), obteniéndose una proporción aproximada de 3:1, que fue confirmada para las líneas T1.2, T1.4 y T1.5 al aplicarles la prueba de χ^2 como se muestra en la Tabla V(a). Esto indica que estas líneas presentan una sola inserción y que son heterocigotos.

(a)

Progenie de línea T1	1.1	1.2	1.4	1.5
Plantas T2 resistentes	189	283	255	151
Plantas T2 no resistentes	43	92	81	56
Relación Resistentes : no resistentes.	4,4	3,07	3,14	2,7
Test de χ^2	5,172	0,043	0,142	0,465
Línea heterocigota	No	Si	Si	Si

(b)

Progenie de línea T1	1.1
Test de χ^2	59.751
Línea con dos inserciones.	No

Tabla V.

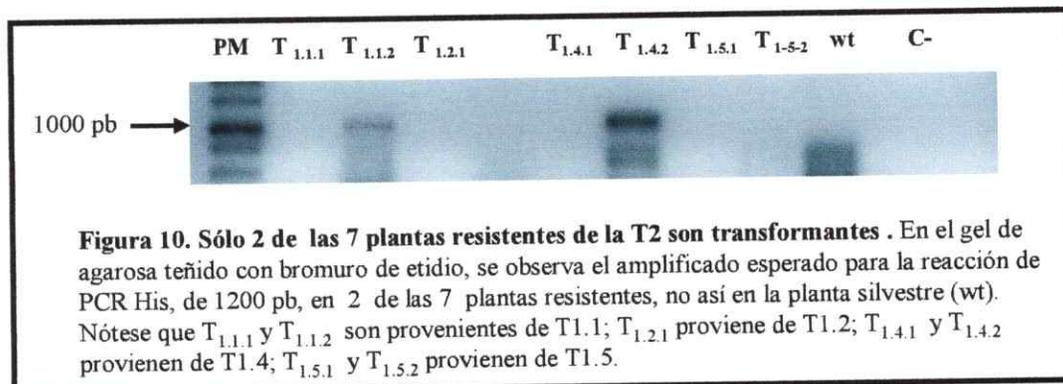
(a) Proporción de plantas resistentes obtenidas en la segunda generación de transformantes (T2). Test de χ^2 aplicado a la progenie de las líneas T1. Se supuso una distribución de 3:1, se tomó en cuenta que los grados de libertad para la hipótesis con un 5% de error, es 1 (números de fenotipos -1). Por ende, todos los casos en que los valores para esta prueba fueron inferiores al valor crítico (3,84) corresponden a heterocigotos para esta inserción; las líneas T1.2, T1.4 y T1.5.

(b) Test de χ^2 aplicado a la progenie de T1.1, suponiendo que ésta posee dos inserciones en su genoma y por ende una distribución de 15:1, proporción esperada para dos locus no ligados. Se tomó en cuenta que los grados de libertad para la hipótesis con un 5% de error, es 1 (números de fenotipos -1). El valor obtenido para esta prueba es muy superior al valor crítico, por ende se descarta la posibilidad de que T1.1 tenga 2 inserciones en su genoma.

Para descartar que T1.1 no resultara positiva para esta prueba por la presencia de **dos** insertos en su genoma, se realizó un nuevo test de χ^2 , donde otra vez dio negativo (Tabla V(b)). Esto indica que T1.1 no posee dos insertos en su genoma y que las explicaciones del resultado obtenido en el test de χ^2 mostrado en la Tabla V(a) son otras (ver Sección 5). A pesar de que en la prueba de χ^2 realizada, la planta T1.1 no resultó ser heterocigota, se siguieron analizando las cuatro líneas para obtener una línea homocigota que se encuentre transformada con el constructo y que sobreexpresa GONST4.

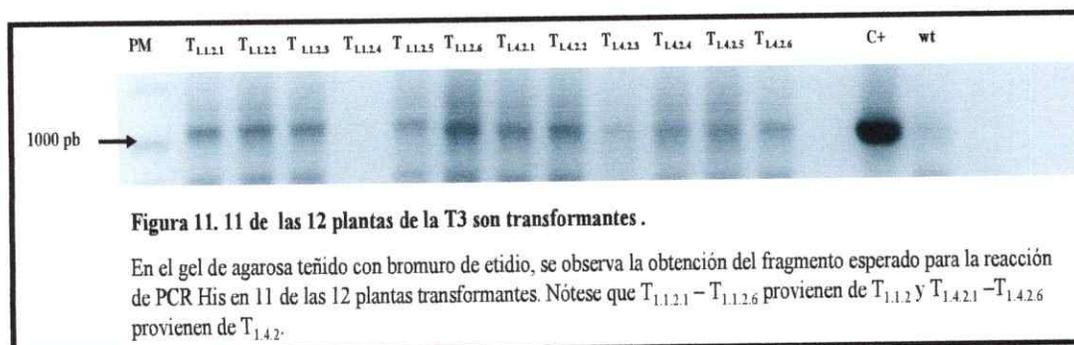
Una vez que las plántulas crecieron, se extrajo DNA de 2 plantas de cada línea y se les realizó una reacción de PCR His para verificar que las plantas resistentes fueran transformantes.

Sorprendentemente sólo 2 plantas dieron positivas para esta reacción, las plantas T_{1.1.2} (proveniente de T1.1) y T_{1.4.2} (proveniente de T1.4; Figura 10).



En el gel sólo se observan 7 de las 8 plantas a las que se les extrajo DNA, dado que no se obtuvo DNA de la extracción de la muestra correspondiente a la segunda planta proveniente de T1.2.

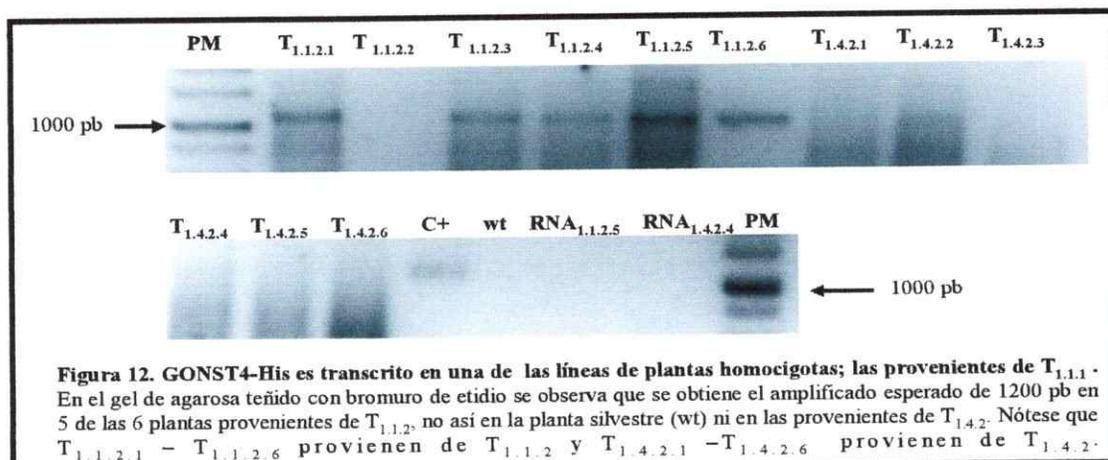
Las semillas (T3) obtenidas a partir de estas dos plantas fueron sembradas en medio selectivo, obteniéndose un 100% de resistencia para ambas líneas, indicando que son homocigotas. Se traspasaron estas plántulas a tierra y luego se extrajo el DNA de 6 plantas de cada línea para realizar una reacción de PCR His.



Como se observa en la Figura 11, todas las plantas provenientes de ambas líneas (T_{1.1.2} y T_{1.4.2}) excepto T_{1.1.2.4}, presentan el amplificado esperado. Esto se debe a que no se obtuvo DNA de esta planta (lo que es corroborado por la presencia de la banda esperada en el RT-PCR). Por ende se puede concluir que todas las plantas de la tercera generación de transformantes, son homocigotas.

5.4.3. Expresión génica de GONST4-His en las transformantes de *A. thaliana*

De las mismas plantas anteriores, es decir, de las once transformantes de la tercera generación, y de la posible transformante T_{1.1.2.4} (en la que no se obtuvo amplificado para la reacción de PCR His) se extrajo RNA y se realizó una reacción de transcripción reversa, para luego realizar una reacción de PCR His.



Como se observa en la Figura 12, el constructo se expresa en 5 de las 6 plantas provenientes de T_{1.1.2}, y en ninguna proveniente de T_{1.4.2}. No se obtuvo el amplificado esperado en T_{1.1.2.2} debido probablemente a que el RNA proveniente de T_{1.1.2.2} es de muy baja concentración, sólo 0,1 µg/ µl según la cuantificación con el espectrofotómetro

nanodrop. Se utilizó RNA proveniente de ambas líneas como control para la contaminación con DNA genómico.

5.5. Búsqueda de ortólogos de GONST4 mediante técnicas de bioinformática.

Actualmente pueden encontrarse las secuencias genómicas completas o parciales de diversas especies vegetales en las bases de datos disponibles, lo que facilita la búsqueda de ortólogos de distintas proteínas. Como se mencionó en la introducción, la fucosa es un azúcar presente en diversos glicoconjugados de la pared celular (xiloglucano, RG II, proteínas arabinogalactanos, entre otras). Por lo tanto, el transporte de este azúcar activado hacia el interior del aparato de Golgi es un requerimiento de diversas especies vegetales. Como una primera aproximación para identificar ortólogos de GONST4 en otras especies vegetales, se utilizaron las herramientas bioinformáticas disponibles en la web: protein blast de NCBI y cinco programas para predecir el número y ubicación de los dominios transmembranas.

Al utilizar la herramienta protein blast en la base de datos de la NCBI, se identificaron 24 secuencias que presentaban un porcentaje de identidad mayor al 20% a la secuencia aminoacídica de GONST4 (Tabla VI). Una vez encontrados estos posibles ortólogos de GONST4, se procedió a realizar un análisis de su secuencia.

Primero, se seleccionaron sólo las candidatas que poseen el motivo GX(L/V)NK, de unión a GDP (Gao y cols, 2001) mostrado en negrita en la Figura 13. Además todas las seleccionadas presentaron el motivo NK de unión a nucleótidos monofosfatos (Figura 13). Luego, se predijo el número de dominios de transmembrana con los programas TMAP, TMHMM v 2.0, THUMBUP, TMpred y SVMtm, dando como resultado que los

supuestos TNAs poseen 8-10 dominios de transmembrana, lo que concuerda con lo que se ha encontrado o predicho en TNAs de diversas especies (Eckhardt y cols., 1999). Las predicciones con los distintos programas se muestran en la Tabla VII, y tienen congruencia con aquéllos obtenidos con el programa TMAP, por lo que se muestran estos dominios de transmembrana en la Figura 13. Además todas las proteínas poseen entre 300 y 350 aminoácidos lo que también coincide con otros TNAs conocidos. Luego de realizar este análisis se encontraron 6 posibles ortólogos de GONST4 en especies muy diversas (Destacados con un asterisco en la Tabla VI). Para verificar que los posibles ortólogos encontrados fueran transportadores de GDP-Fucosa y no de otros nucleótidos azúcares, se realizó un alineamiento múltiple de estas secuencias con los ortólogos de GONST1 caracterizados en la literatura (Vrg4p *S. cerevisiae* (Deany cols, 1997), Vrg4p *Candida albicans* (Nishikawa y cols, 2002), Vrg4p *Candida glabrata* (Nishikawa y cols, 2002) y Lpg2p *Leishmania mexicana* (Ma y cols, 1997)). Se buscaron los motivos conservados en cada grupo de ortólogos, con el programa MEME Suite. Como se muestra en la Figura 14, los motivos encontrados son distintos entre ambos grupos. Los motivos 5a y 3a sólo están presentes en los posibles ortólogos a GONST4, además los motivos 1a y 1b tienen poca identidad entre ambos grupos y lo mismo sucede con los motivos 2a, 2b, 4a y 4b. El solapamiento entre los motivos 3a y 3b no corresponde a un motivo conservado de transporte de GDP-manosa ya que solamente se encuentra en los ortólogos de Vrg4 y no en GONST1, ni en Lpg2p. Interesantemente, se observa que la mayoría de los motivos presentes en el grupo de posibles ortólogos a GONST4 no se encuentran en *Ostreococcus lucimarinus*.

Tabla VI. Posibles ortólogos de GONST4.

Proteínas que presentan una identidad mayor al 20% en otras especies de plantas presentes en la base de datos de NCBI. Destacados con un asterisco (*) se muestran los 6 candidatos a ser ortólogos de GONST4 después de todos los análisis realizados.

Posibles ortólogos a GONST4	Especie	Porcentaje de identidad
* gb EDQ69426.1	<i>Physcomitrella patens subsp. patens</i> (musgo)	76%
gb EDP05117.1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (alga unicelular de división de las Clorofitas)	56%
emb CAL57815.1	<i>Ostreococcus tauri</i> (alga verde unicelular de la división de las Clorofitas)	52%
gb ABP00621.1	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCE9901 (alga verde unicelular de la división de las Clorofitas)	50%
* gb ABP00435.1	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCE9901 (alga verde unicelular de la división de las Clorofitas)	48%
* emb CAO65603.1	<i>Vitis vinifera</i> (vid)	81%
* dbj BAF23141.1	<i>Oryza sativa</i> (arroz)	79%
* gb ABO41833.1	<i>Gossypium raimondii</i> (algodón)	67%
* gb ABO41844.1	<i>Gossypium hirsutum</i> (algodón)	67%
gb AAB40650.1	<i>Zea mays</i> (maíz)	44%
gb AAK01174.2 AF314182.1	<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	38%
gb ABJ98060.1	<i>Thellungiella halophila</i> (planta halófila que comparte muchas características con <i>Arabidopsis</i>)	40%
sp P29463 TPT_SOLTU	<i>Solanum tuberosum</i> (papa)	37%
dbj BAE92526.1	<i>Brassica rapa</i> (nabo)	46%
dbj BAA21939.1	<i>Brassica oleracea</i> (col silvestre)	48%
gb AAF86907.1 AF223359.1	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> (hierba del rocío)	46%
gb ABK93162.1	<i>Populus trichocarpa</i> (álamo de California)	44%
gb ABK94265.1	<i>Populus trichocarpa</i> (álamo de California)	46%
emb CAA81386.1	<i>Flaveria pringlei</i> (planta de la familia de las Asteraceas)	41%
dbj BAC24040.1	<i>Brassica oleracea</i> (col silvestre)	42%
prf I1805409A	<i>Pisum sativum</i> (guisante)	37%
dbj BAE92528.1	<i>Brassica oleracea</i> (col silvestre)	48%
gb AAR09054.1	<i>Brassica napus</i> (raps)	46%
emb CAA32016.1	<i>Spinacia oleracea</i> (espinaca)	37%

Tabla VII. Número de dominios de transmembrana de los supuestos ortólogos de GONST4 obtenidos con distintos programas de predicción.

Posible Proteína	Programa					Promedio
	TMAP	TMHMM v.2.0	THUMBUP	TMpred	SVMtm	
GONST4 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	8	9	10	10	10	9,4
CAO65603 (vid)	10	9	9	10 ó 9	10	9,5
EDQ69426 (musgo)	9	8	7	9	8	8.2
ABP00435 (alga verde unicelular)	8	10	7	10 ó 9	9	8.7
BAF23141 (arroz)	9	9	9	10 ó 9	10	9.3
AB041833 (algodón)	10	9	9	10	10	9.6
AB041844 (algodón)	10	9	9	10	10	9.6

Figura 13. Alineamiento múltiple de los mejores candidatos a ser ortólogos de GONST4, denominados según la especie en dónde se encuentran. Se muestran en gris los residuos NK conservados de unión a nucleótidos monofosfatos (en el extremo carboxilo terminal del primer dominio) y el dominio de unión a GDP conservado en todas las proteínas y en colores los dominios de transmembrana predichos con el programa TMAP (entre 8 y 10).

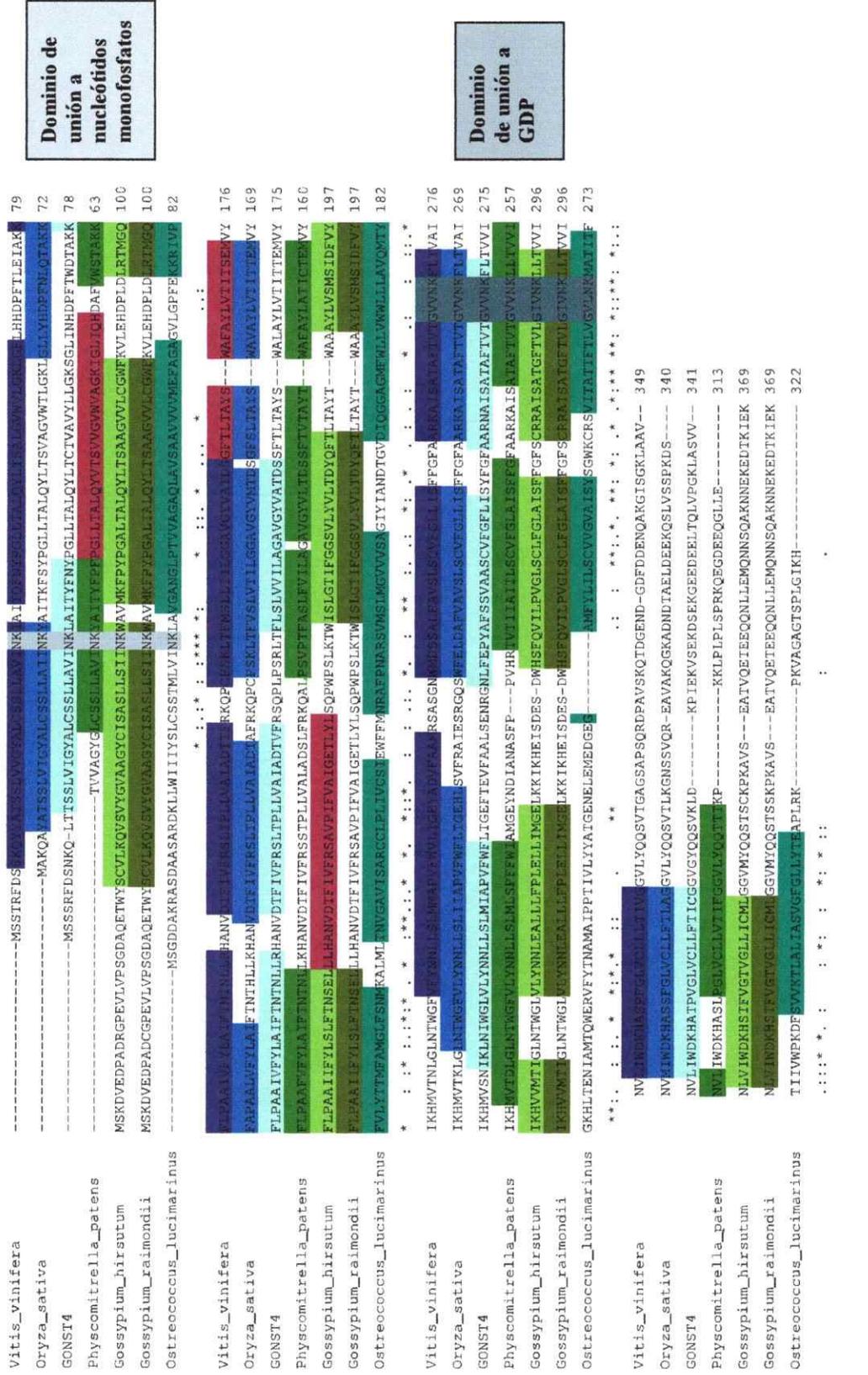
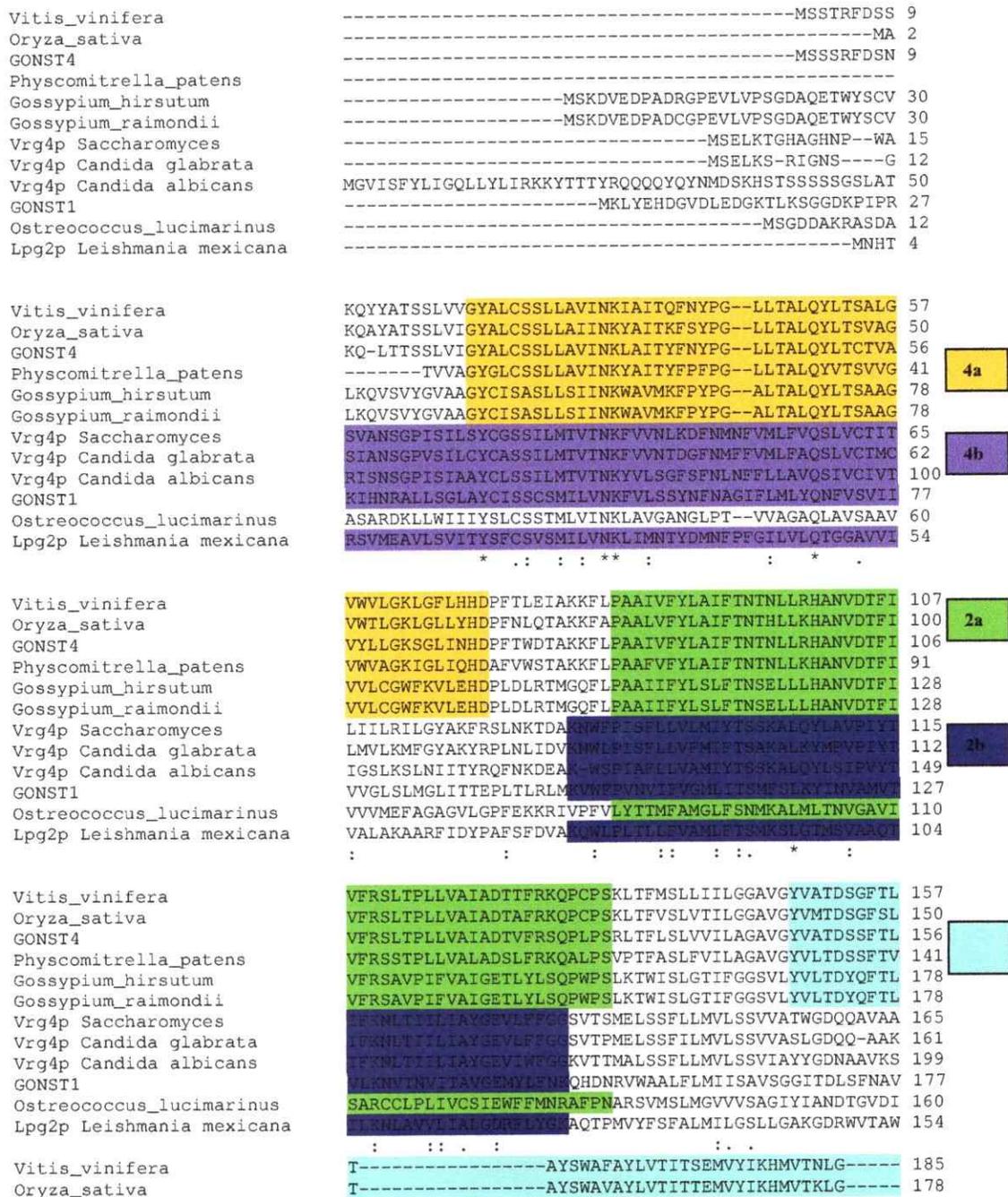


Figura 14. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de los transportadores ortólogos a GONST1 y los posibles ortólogos a GONST4. Se muestran los diferentes motivos encontrados para cada grupo de ortólogos. El número indica el orden de mayor a menor conservación de los motivos. Los números de acceso de los ortólogos de GONST1 son: CAC07406 para Lpg2p, de *Leishmania mexicana*, AAK51897 para Vrg4p de *Candida glabrata*, AAK74075 para Vrg4p de *Candida albicans* y NP_011290 para Vrg4p de *Saccharomyces cerevisiae*.



GONST4
 Physcomitrella_patens
 Gossypium_hirsutum
 Gossypium_raidmondii
 Vrg4p Saccharomyces
 Vrg4p Candida glabrata
 Vrg4p Candida albicans
 GONST1
 Ostreococcus_lucimarinus
 Lpg2p Leishmania mexicana

T-----AYSWALAYLVTTITEMVYIKHMVSNIK----- 184
 T-----AYTWAFAYLATICTEMVYIKHMVTDLG----- 169
 T-----AYTWAAYLVSMSTDFVYIKHVMTIG----- 206
 T-----AYTWAAYLVSMSTDFVYIKHVMTIG----- 206
 KAASLAEGAAGAVASFNPGYFWMFTNCITTSALFVLIMRKRIKLTN----- 210
 IAQPLAN-----NSILSPEYYWMFLNCICSASFVLMRKRIKLTN----- 201
 HDDAFAL-----YLGFWMLTNCFASAAFVLMRKRIKLTN----- 235
 G-----YAWQIANCFLTASYSLTLRKTMDTAKVQTQS 209
 QGG-----AGMFWLLVWVLLLAVQMTYKHLTENIA----- 191
 G-----LVWTFLNIVSTVSYTLYMKAVLGSVSN----- 182

Vitis_vinifera
 Oryza_sativa
 GONST4
 Physcomitrella_patens
 Gossypium_hirsutum
 Gossypium_raidmondii
 Vrg4p Saccharomyces
 Vrg4p Candida glabrata
 Vrg4p Candida albicans
 GONST1
 Ostreococcus_lucimarinus
 Lpg2p Leishmania mexicana

--LNTWGFVFNLLSLMMPVFWLVTGEYADVFAAMRSASGNWMDSSAL 233
 --LNTWGFVLYNNLSLIIAPVFWFLTGEHLSVFRATERSGQSWFELDAF 226
 --LNIWGLVLYNNLSLMIAPVFWFLTGEFTEVFAALSENKLNLFEPYAF 232
 --LNTWGFVLYNNLSLMLSPFFWIAMGEYNDIANASFP---PVHRTVTI 214
 --LNTWGLVLYNNLEALLFPLELLIMGELKKIKHEISDES-DWHSFQVI 253
 --LNTWGLVLYNNLEALLFPLELLIMGELKKIKHEISDES-DWHSFQVI 253
 --FKDFDTMFYNNVALPILLFLLSFCVEDWSSVNLNNSND-----SL 252
 --FKDYDTMFYNNALALPILLGFSFLSEDWSSENLAQNFSGE-----SL 243
 --FKDFDTMYNNLLSIPILLICSFIFEDWSSANVSLNFPADNRVT--TI 281
 GNLNEFSMVLNNTLSLPLGLLLSYFFNEMDYLYQTPLLRLPS-----FW 254
 --MTQWERVFTYNAIPIPTIVLYATGENELEMEDEGEG-----AM 230
 -SIGRYGPVFNLLSLPFFLIMGVGDMMPPSAATGETTTFG-----R 224

3b

Vitis_vinifera
 Oryza_sativa
 GONST4
 Physcomitrella_patens
 Gossypium_hirsutum
 Gossypium_raidmondii
 Vrg4p Saccharomyces
 Vrg4p Candida glabrata
 Vrg4p Candida albicans
 GONST1
 Ostreococcus_lucimarinus
 Lpg2p Leishmania mexicana

FAVLSLCVFGLLISFFGFAARKAISATATFTVTGVVKNKFLTVAINVLIWDR 283
 VAVLSLCVFGLLISFFGFAARKAISATATFTVTGVVKNKFLTVAINVMIWDR 276
 SVAASCVFGLISYFGFAARNAISATATFTVTGVVKNKFLTVAINVLIWDR 282
 IAITLSCVFGGLAISFFGFAARKAISATATFTVTGVVKNKLLTVVINVLIWDR 264
 LPVGLSCLFGLAISFFGFSRRRAISATATFTVLGIVNKLTVVINVLIWDR 303
 LPVGLSCLFGLAISFFGFSRRRAISATATFTVLGIVNKLTVVINVLIWDR 303
 TAMTISGVASVGISYCSGWCVRVTSSTTYSMVGALNKLPIALSGLIFFDA 302
 SAMTISGMTSVGISYCSGWCVRATSTTYSMVGALNKLPIALAGLIFPDA 293
 TAMTISGASSVGISYCSAWCVRVTSSTTYSMVGALNKLPIALSGLIFPDA 331
 MVMTLISGLLGLAISFTSMWFLHQTGATTYSLVGSLNKIPLSIAGIVLFFNV 304
 FYLLISCVGVVAISYSGWKCRRSVITATTFILVGVLNKMATITFTIIVWPK 280
 LVLAFSVLVSSVMTFVFWCMSTTSPITMSVVGSLNKIPLTLGLMLVPHQ 274

1a

1b

Vitis_vinifera
 Oryza_sativa
 GONST4
 Physcomitrella_patens
 Gossypium_hirsutum
 Gossypium_raidmondii
 Vrg4p Saccharomyces
 Vrg4p Candida glabrata
 Vrg4p Candida albicans
 GONST1
 Ostreococcus_lucimarinus
 Lpg2p Leishmania mexicana

HASFTLVCLLTLGAGVLYQSVTLRQAPSQRDPAVSKQTDGEND-GD 332
 HASFTLVCLLTLGAGVLYQSVTLRQSSVQR-EAVAKQGGKADNDTAE 325
 HATFVGLVCLLTLGAGVLYQSVTLRQSSVQR-EAVAKQGGKADNDTAE 324
 HASFTLVCLLTLGAGVLYQSVTLRQSSVQR-EAVAKQGGKADNDTAE 324
 HSTFVGLVCLLTLGAGVLYQSVTLRQSSVQR-EAVAKQGGKADNDTAE 350
 HSTFVGLVCLLTLGAGVLYQSVTLRQSSVQR-EAVAKQGGKADNDTAE 350
 FRNFLSILSIFIGFLSGIYAVAKQKK----- 329
 FRNFLSILSIFIGFLSGIYAVAKQKK----- 320
 AVNFWVSISIFVGFAGLVYAVAKQKK----- 358
 FTSLQNSASILFGLVAGVVFARAKMREKS----- 333
 DESVVKTLALIASVGFGLLYTEAPLRKP-----KV 310
 FFTATGYLGILIALSAGFLYTHLNIRANHAKASSDTGHMQQAGKPSAES 324

5a

Vitis_vinifera
 Oryza_sativa
 GONST4
 Physcomitrella_patens
 Gossypium_hirsutum
 Gossypium_raidmondii
 Vrg4p Saccharomyces
 Vrg4p Candida glabrata
 Vrg4p Candida albicans
 GONST1
 Ostreococcus_lucimarinus
 Lpg2p Leishmania mexicana

FDENQAKGISGKLAAV-- 349
 LDEEKQSLVSSPKDS--- 340
 EDELTQLVPGKLASV-- 341
 EGDEEQGLE----- 313
 MQNNSQAKNNEKEDTKIEK 369
 MQNNSQAKNNEKEDTKIEK 369
 QQAQPLRK----- 337
 VQKN----- 324
 QKEQSQQLPPTK----- 370

 AGAGTSPGLIKH----- 322
 IVLVRADEISKGTSKSE-- 341

6. Discusión y proyecciones.

En esta memoria de título se estudió la función del transportador de nucleótido-azúcar del aparato de Golgi de *A. thaliana*; GONST4. Se utilizaron dos vectores binarios: pVKH18-EN6:GONST4Orf y pGWB8GONST4Orf, cada uno posee el cDNA de GONST4 fusionado a una proteína o péptido que permite su detección, ya que no existe un anticuerpo para detectar GONST4 directamente. El primero contiene el cDNA de GONST4 fusionado a GFP (proteína de 238 aminoácidos) lo que permite la detección de la expresión de GONST4 bajo un microscopio de epifluorescencia (Handford y cols., 2004). En el segundo, el cDNA del TNA se encuentra fusionado a una cola de Histidina, un epítoto de sólo 6 aminoácidos, que permite la inmuno-detección de la expresión de GONST4. La detección de proteínas fusionadas a este epítoto es un método ampliamente utilizado (Gómez y cols, 2003; Hong y cols, 2005 entre otros).

Primero, se verificó la funcionalidad de las construcciones a utilizar. Con este fin, se verificó la expresión de GONST4-GFP en hojas de tabaco infiltradas con el vector pVKH18-EN6:GONST4Orf a través de microscopía de epifluorescencia. Los resultados obtenidos muestran que el constructo es funcional ya que se observó fluorescencia en hojas infiltradas con *A. tumefaciens* con el vector y no así en hojas infiltradas con el vector vacío. El patrón de fluorescencia es consistente con una localización en el aparato de Golgi y concuerda con los resultados obtenidos con el mismo vector observado bajo microscopía confocal (Handford y cols, 2004).

Entonces se realizó un ensayo de transporte para GONST4-GFP. Como se muestra en la Figura 6(a), este ensayo de transporte no arrojó resultados estadísticamente

significativos, a pesar de que la razón del transporte de GDP-Fucosa/UDP-Glucosa es $5,78 \pm 0,066$ veces mayor en las fracciones de aparato de Golgi extraída de hojas que sobreexpresan GONST4-GFP en comparación con el control. Esto da un indicio de que GONST4 podría transportar GDP-fucosa, aunque no es concluyente ya que el error asociado a estos resultados es alto y por ende, no es estadísticamente significativo. El transporte absoluto de GDP-Fucosa resultó no ser distinto entre la fracción que sobreexpresa el transportador y la fracción control (Figura 6(b)). Para explicar este resultado, inferimos de la Figura 6(a) que el estado de las vesículas no era óptimo, ya que al aplicar la prueba t de Student al transporte de UDP-Glucosa, que se utiliza como control, éste arroja que ambas muestras son diferentes. La única diferencia entre ambas es la sobreexpresión de GONST4-GFP lo que no debiese interferir en el transporte de UDP-Glucosa, ya que ningún transportador de GDP-azúcares es también capaz de transportar UDP-azúcares (Handford, 2006). Específicamente se ha visto que el ingreso de UDP-Glucosa y GDP-Fucosa al aparato de Golgi ocurre de manera independiente en plantas (Wulff y cols., 2000). Una alternativa es que el transporte de UDP-glucosa se viese interferido por la expresión de GONST4, aunque esto no ocurre al sobreexpresar este transportador unido a una cola de Histidina (Figura 7(a)). Por estas razones, se considera más probable que las diferencias en transporte de los nucleótidos-azúcar se deben a que el estado de las vesículas no fuera el mismo para ambas muestras. Sin embargo no se puede descartar que la cola de GFP esté interfiriendo en el transporte de GDP-Fucosa. A pesar de que otros ensayos de transporte realizados a distintos TNAs unidos a una cola de GFP han resultado y por ende, esta proteína no ha interferido en su actividad (Norambuena y cols, 2005), en este caso pudiese ser que la interacción de una

proteína de alto peso molecular, GFP, con GONST4, si lo haga, aunque ésta no afecta su localización (es destinado al Golgi). Que GONST4 unido a GFP interfiera en su capacidad de transportar GDP-Fucosa y esto no ocurra en otros transportadores puede deberse a que este transportador posea una estructura menos estable (por ejemplo diferencias en número y distribución de puentes de H, interacciones de Van der Waals, etc.) y/o puede deberse a que el extremo C-terminal de esta proteína sea determinante en su estructura y por ende en su actividad, y al estar unido a otra proteína no pueda estabilizarla. Debido a este último razonamiento se procedió a realizar un ensayo de transporte con GONST4 fusionada a un epítoto más pequeño, una cola de 6 Histidinas (22 aminoácidos incluyendo el sitio de clonamiento).

Para verificar la funcionalidad de la construcción pGWB8-GONST4Orf-His, primero se analizó la expresión del mRNA de *GONST4-His* mediante el ensayo de RT-PCR. Como se observa en la Figura 4, *GONST4-His* es expresado en estas hojas, y sólo se observa una amplificación menor en el PCR realizado al RNA extraído, lo cual puede deberse a que se haya derramado parte de la muestra en este carril, ya que ambas (el control y la muestra) presentan bandas muy similares sólo con diferencia en intensidad, ó a que se encontrara levemente contaminado con DNA plasmidial. De todas formas esta amplificación es poco significativa en relación con la obtenida en la muestra de cDNA, y considerando que ambas reacciones fueron realizadas con la misma cantidad de RNA, si la banda observada en el RT-PCR correspondiera a contaminación con DNA genómico, debiera observarse una intensidad de banda similar en ambas muestras, lo que no ocurre. Luego se realizó un ensayo de *western blot* para determinar si GONST4-His era traducido. Este ensayo arrojó un resultado positivo ya que sólo se observan proteínas en

el carril correspondiente a la fracción de vesículas extraídas de hojas de tabaco transformadas con el vector pGWB8-GONST4Orf-His, y no así en el control negativo (Figura 5). Se observa una proteína que migra a ~25 kDa en lugar de ~40 kDa, el peso molecular esperado de GONST4. Esta observación concuerda con lo esperado ya que se ha mostrado que los TNAs presentan este comportamiento (Hong y cols., 2005) debido a que, al ser altamente hidrofóbicos, unen SDS en una mayor proporción, lo que determina que tengan mayor proporción de cargas negativas. Por otra parte, se puede ver una segunda banda correspondiente a ~50 kDa, probablemente debido a la formación de dímeros de esta proteína, esto concuerda con la literatura ya que la formación de oligómeros de TNAs (dímeros a hexámeros), ha sido previamente descrita (Hong y cols., 2005).

Una vez comprobada la funcionalidad de este constructo, se realizó un ensayo de transporte. El transporte de GDP-fucosa aumenta significativamente en las vesículas extraídas de hojas de tabaco infiltradas con *A. tumefaciens* transformada con pGWB8-GONST4Orf-His en comparación con aquéllas obtenidas de hojas infiltradas con *A. tumefaciens* transformada con el vector vacío (Figura 7). Se puede decir con un 95% de certeza, según la prueba T de Student realizada, que GONST4 transporta este nucleótido-azúcar. Por otra parte estos resultados corroboran que el vector pGWB8-GONST4Orf-His es funcional. Se ha demostrado que GONST4 es un transportador de *Arabidopsis*, que transporta GDP-Fucosa y no UDP-Glucosa y por ende la realización de nuevos ensayos de transporte utilizando otros GDP-azúcares y UDP-azúcares, podría dilucidar su especificidad y función.

Una vez corroborada la funcionalidad del vector de sobreexpresión pGWB8-GONST4Orf-His, y demostrado que GONST4 es un transportador de GDP-Fucosa, se procedió a transformar establemente plantas de *A. thaliana* con este vector para estudiar la función *in vivo* del transportador. En una primera etapa, se transformaron plantas con el vector mencionado mediante el método de inmersión floral, obteniendo una tasa de transformación del 0,97% (Tabla IV), esperable para este método (típicamente ~1% (Clough y Bent, 1998)). Además todas las plantas resistentes resultaron ser transformantes (Figura 9). Una vez obtenida la progenie de estas líneas, se realizó el Test de χ^2 para verificar que éstas fueran heterocigotas con un solo inserto. Del test se puede concluir que las líneas T1.2, T1.4 y T1.5 lo son (Tabla V(a)), pero la progenie de línea T1.1 presenta un mayor nivel de supervivencia por lo que no resultó ser heterocigota según esta prueba estadística. Una posible explicación para esto, es que esta línea presentara 2 insertos en su genoma, lo que fue descartado al aplicar un segundo Test de χ^2 para esta posibilidad (Tabla V(b)). Por lo tanto, otra explicación es que se hayan sembrado una alta densidad de semillas y, por ende al contar éstas quizás no pudieron verse las no viables debajo de las plántulas resistentes. Alternativamente, puede explicarse por una distribución no homogénea de la higromicina lo que haya llevado a que muchas plantas sobrevivieran por una escasez de éste o por una supervivencia natural de plantas no transformadas como se ha observado anteriormente (Lawand y cols, 2002), a pesar de que esto no se haya producido en la progenie de las otras 4 líneas estudiadas.

A pesar de que la línea T1.1 no haya demostrado ser heterocigota, aunque al parecer por el razonamiento anterior sí lo sería, se siguió trabajando con ella y las otras líneas, para lograr obtener una línea homocigota que sobreexpresa GONST4.

Para verificar que las plantas obtenidas de la autofecundación de las líneas T1 fueran efectivamente transformantes, se realizó una prueba de PCR (programa PCR-His). Solamente en 2 de las 7 plantas analizadas se obtuvo la banda esperada (Figura 10). Esto puede deberse a que las cinco plantas resistentes pero no-transformantes, sean plantas 'quimeras' en las cuales se encuentra el gen que otorga resistencia a higromicina solamente en el tejido radicular y no en la parte aérea de donde se extrajo DNA para realizar el análisis molecular (Schmulling y Schell, 1993). Por otra parte puede ser que la concentración de higromicina no haya sido óptima, resultando en una mayor cantidad de plantas resistentes no transformantes (falsos positivos). Se prosiguió entonces con las líneas transformantes; T_{1.1.2} y T_{1.4.2}. El 100% de descendencia obtenida de estas líneas resultó ser resistente (T2), lo que indica que son homocigotas. Al verificar que las plantas fueran realmente transformantes mediante la reacción PCR-His, se obtuvo que toda la progenie de T_{1.4.2} y 5 de las 6 descendientes de T_{1.1.2} presentaron el amplificado esperado (Figura 11), debido a que no se obtuvo DNA de un descendiente (T_{1.1.2.4}). Esto es corroborado por la presencia del amplificado esperado en la reacción de RT-PCR (Figura 12) realizado al RNAm extraído de esta planta, ya que si esta planta no fuese transformante, no podría existir esta banda como es en el caso de la planta silvestre. Los resultados obtenidos por PCR corroboran que las líneas T_{1.1.2} y T_{1.4.2} son homocigotas. Una vez teniendo las plantas transformantes homocigotas para GONST4, se analizó la expresión de *GONST4-His* en estas líneas a través de RT-PCR (Figura 12). Se encuentra

que sólo la progenie de T_{1.1.2} (excepto T_{1.1.2.2}, dado a la baja concentración del RNAm extraído) poseen transcripción de *GONST4-His* y no así los descendientes de T_{1.4.2}, quizás debido a que el T-DNA se insertó en un lugar transcripcionalmente inactivo del genoma o que se haya gatillado silenciamiento génico post-transcripcional en esta línea. Por lo tanto, se cumplió con el objetivo propuesto, y se obtuvo una línea homocigota transformante que sobreexpresa *GONST4-His*, T_{1.1.2}. Una vez verificada la acumulación de proteína GONST4-His en esta línea y para dilucidar la función de este transportador en *Arabidopsis*, será posible realizar ensayos de transporte con vesículas aisladas de esta línea. Además, se analizarán las diferencias fenotípicas otorgadas por la sobreexpresión de este TNA y se estudiará la composición química de la pared de las hojas, donde se podrá ver si existe un aumento de los distintos azúcares, enfocándose en fucosa.

Para concluir esta tesis, se realizó un análisis bioinformático de modo de encontrar posibles ortólogos de GONST4 en distintas especies, y así poder tener indicios de su importancia como transportador de GDP-Fucosa en el reino vegetal. Se encontraron 6 posibles ortólogos en especies diversas. En todas ellas se encuentra el dominio de unión a GDP altamente conservado y la predicción de dominios de transmembrana arroja los resultados esperados para TNAs (8-10). En las dos especies de algodón y vid, la presencia de un posible transportador de GDP-Fucosa es consistente con el hecho de que las plantas dicotiledóneas presentan fucosa en varios componentes de la pared, como xiloglucano, RG II y proteínas N-enlazadas (Carpita y McCann, 2000). En cuanto al musgo, *Physcomitrella patens*, se ha determinado que también contiene xiloglucano y RG II (Nothnagel y Nothnagel, 2007), requiriendo un transportador de GDP-fucosa para su síntesis. Con respecto al alga verde, *Ostreococcus lucimarinus*, se ha observado que

diversos representantes de las clorofitas presentan proteínas ricas en hidroxiprolina las cuales son altamente N-glicosiladas (Domozych y cols., 1980). Finalmente en la monocotiledónea *Oryza sativa*, se ha mostrado que su pared celular también contiene xiloglucano (Shibuya y cols., 1983). Además se ha mostrado la presencia de proteínas arabinogalactanos en otra monocotiledónea similar; trigo (Philippe y cols., 2005) y, por ende, necesita de un transportador de GDP-Fucosa que internalice este sustrato al Golgi. Por otra parte, al comparar los motivos conservados encontrados en este grupo de posibles ortólogos a GONST4, con el grupo de ortólogos a GONST1 (transportador de GDP-manosa del Aparato de Golgi de *A. thaliana*), se encontraron motivos que sólo se encuentran en el grupo de posibles ortólogos a GONST4 y no en los transportadores de GDP-manosa (Figura 14). Esto podría indicar que estos posibles transportadores no sean transportadores de GDP-manosa y es otra evidencia de que serían transportadores de GDP-fucosa. Es importante mencionar que el posible ortólogo encontrado en *Ostreococcus lucimarinus* no presenta los motivos conservados encontrados en todos los demás ortólogos a GONST4, lo que disminuye la posibilidad de que éste sea funcionalmente similar a GONST4.

Este análisis bioinformático apoya la hipótesis planteada en este trabajo, ya que posibles ortólogos a GONST4 estarían ampliamente representados en diversas especies que requieren este GDP-azúcar. Además la presencia de un transportador de GDP-Fucosa es requerido en diversas especies tanto vegetales (monocotiledóneas y dicotiledóneas) como especies desde las cuales ellas habrían evolucionado (alga verde), indicando una gran importancia desde el origen evolutivo de las mismas. Como proyección, se podría

estudiar la especificidad de sustrato de estos posibles ortólogos para validar estas conclusiones.

El estudio de GONST4 y la elucidación tanto de su función, especificidad, control de su expresión como de la distribución de ortólogos en distintos organismos podrán, en conjunto con el estudio de otros componentes de la pared celular, ayudar a comprender de mejor manera cómo ocurre su formación, la interrelación de sus distintos componentes y cómo éstos están regulados, y con esto mejorar enormemente el actual modelo que presenta muchas interrogantes.

7. Conclusiones

- Se verificó la funcionalidad de los vectores pVKH18-En6GONST4Orf-GFP y pGWB8GONST4Orf-His mediante microscopia de epifluorescencia, y RT-PCR y *western blot* y respectivamente.
- Se determinó que GONST4-His es capaz de transportar GDP-fucosa, probando la hipótesis del Semianrio de Título.
- Se obtuvo una línea homocigota de *Arabidopsis* que sobre-expresa *GONST4-His*.
- Se encontraron 5 posibles ortólogos de GONST4 en diversas especies fotosintéticas.

8. Congresos

Este trabajo ha sido presentado en los siguientes congresos;

1. Febres, S., Miranda, J.P., Rámila, C., Ampuero, D. and Handford, M. Biochemical and functional analysis of GONST3 and 4, nucleotide-sugar transporters of *Arabidopsis thaliana*. III Reunión de Biología Vegetal, Talca, 23-24 octubre 2008 (póster).
2. Miranda, J., Rámila, C., Caroca, R., Handford, M. GONST4, un transportador de nucleótidos-azúcar de *Arabidopsis thaliana*, transporta GDP-Fucosa.. II Reunión de Biología Vegetal, Santiago, 5-6 de Noviembre 2007 (póster).
3. Rámila, C., Miranda, J., Caroca, R., Handford, M. Desarrollo de herramientas para el estudio de GONST3 y 4, transportadores de nucleótidos-azúcar de *Arabidopsis thaliana*. XXX Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, Chillán, 25-28 Septiembre 2007 (póster).

9. Referencias.

- Albersheim P. (1985).** Oligosaccharins. *Sci. Amer.* 253; 58.
- Atalla R. H. (1995).** Cellulose and the hemicelluloses: patterns for cell wall architecture and the assembly of lignin. 8th simposium on wood and pulping chemistry june 6-9 Helsinki, Finland, p 77-84.
- Augur C., Benhamou N., Darvill A. and Albersheim P. (1993).** Purification, characterization, and cell wall localization of an α -fucosidase that inactivates a xyloglucan oligosaccharin. *Plant J.* 3: 415-426.
- Baldwin T., Handford M., Yuseff M., Orellana A. and Dupree P. (2001)** Identification and characterization of GONST1, a Golgi-localized GDP-mannose transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13;2283-2295.
- Batoko H., Zheng H.-Q., Hawes C. and Moore I. (2000).** A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants. *Plant Cell* 12; 2201-2217.
- Carpita N. and McCann M. (2000).** The cell wall. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Chapter 2. Edited by Buchanan, B. pp 52-108. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.
- Clough S. and Bent A. (1998).** Floral dip: a simplified method or *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16(6); 735-743.
- Dean N., Zhang Y.B. and Poster J.B. (1997).** The *VRG4* gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the Golgi in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem* 272; 21908-31914.
- Domozych D., Stewart K. And Mattox K. (1980).** The comparative aspects of cell wall chemistry in the Green Algae (*Chlorophyta*). *J. Mol. Evol.* 15; 1-12.
- Eckhardt M., Gotza B. and Gerardy-Schahn R. (1999).** Membrane Topology of the Mammalian CMP-Sialic Acid Transporter. *J Biol. Chem.* 274 (13); 8779-8787.
- Feingold D.S. and Avigad G (1980).** Sugar nucleotide transformations in plants. *The Biochemistry of Plants* 3; 101-170
- Fry, S. C. (1989).** The structure and function of xyloglucan. *J. Exp. Bot.* 40; 1-11.

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

Georg J. and Roberts K. (2007). The Biology of Arabinogalactan Proteins. *Annual Review of Plant Biology* 58 (1); 137.

Gómez-Merino F., Arana-Ceballos F., Trejo-Téllez L. and Skirycz A. (2005). The DGK inhibitor R59022 differentially affects AtDGK2 and AtDGK7 activity *in vitro* and alters plant growth and development. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (41); 34888–34899.

Handford M., Rodriguez-Furlán C. and Orellana A. (2006). Nucleotide-sugar transporters: structure, function and roles *in vivo*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39; 1149-1158.

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

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

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

Knappe S., Tanja L., Schneider A., Voll L., Flügge U. and Karsten F. (2003). Characterization of two functional phosphoenolpyruvate/phosphate translocator (PPT) genes in *Arabidopsis*--AtPPT1 may be involved in the provision of signals for correct mesophyll development. *The Plant journal for cell and molecular biology* 36(3); 411-20.

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

Leelavathi D.E., Estes L.W., Feingold D.S. and Lombardi B. (1970). Isolation of a Golgi-rich fraction from rat liver. *Biochim Biophys Acta* 211; 124-138.

Levy S., Maclachlan G. and Staehelin L. A. (1997). Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during *in vitro* binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. *Plant J.* 11; 373–386.

- Levy S., York W. S., Stuike-Prill R., Meyer B. and Staehelin L. A. (1991).** Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan: the role of the fucosylated sidechain in surface-specific sidechain folding. *Plant J.* 1; 195–215.
- Liepman A.H., Wilkerson C.G. and Keegstra K. (2005).** Expression of cellulose synthase-like (Csl) genes in insect cells reveals that CslA family members encode mannan synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102;2221-2226.
- Madson M., Dunand C., Li X., Verma R., Vanzin G., Caplan J., Shoue D., Capita N. and Reiter W. (2003).** The *MUR3* Gene of *Arabidopsis* Encodes a Xyloglucan Galactosyltransferase That Is Evolutionarily Related to Animal Exostosins. *The Plant Cell* 15; 1662-1670.
- Martinez-Duncker I., Mollicone R., Codogno P. and Oriol R. (2003).** The nucleotide-sugar transporter family: a phylogenetic approach. *Biochimie* 85; 245–260.
- Murashige T. and Skoog F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3); 473-497.
- Nishikawa A., Poster J., Jigami Y. and Dean N. (2002).** Molecular and phenotypic analysis of CaVRG4, encoding an essential Golgi apparatus GDP-mannose transporter. *Journal of bacteriology* 184; 29-42.
- Nishikawa A., Mendez B., Jigami Y., Dean N. (2002).** Identification of a *Candida glabrata* homologue of the *S. cerevisiae* VRG4 gene, encoding the Golgi GDP-mannose transporter. *Yeast* 19 (8); 691 – 698.
- Norambuena L., Marchant L., Berninsone P., Hirschberg C., Silva H. and Orellana A. (2002)** Transport of UDP-galactose in plants. Identification and functional characterization of AtUTr1, an *Arabidopsis thaliana* UDP-galactose/UDP-glucose transporter. *J. Biol. Chem.* 277;32923-32929.
- Ma D., Russell D., Beverley S. and Turco S. (1997).** Golgi GDP-mannose Uptake Requires *Leishmania* LPG2 a member of a eukaryotic family of putative nucleotide-sugar transporters. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 272(6);3799-3805.
- Norambuena, L., Nilo, R., Handford, M., Reyes, F., Marchant, L., Meisel, L., and 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.
- Nothnagel A. and Nothnagel E. (2007).** Primary Cell Wall Structure in the Evolution of Land Plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 49 (8); 1271–1278.

O'Neill M. A., Warrenfeltz D., Kates K., Pellerin P., Doco T., Darvill A. G. and Albersheim P. (1996). Structure of Plant Cell Walls XLIII. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plants, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate diester. *In vitro* conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. *J. Biol. Chem.* 271; 22923-22930.

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

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

Philippe S., Robert P., Barron C., Saulnier L. and Guillon F. (2006). Deposition of cell wall polysaccharides in Wheat endosperm during grain development: Fourier Transform- Infrared Microspectroscopy study. *J. Agric. Food Chem.* 54 (6); 2303 -2308.

Reiter W. D., Chapple C.C.S. and Somerville C.R. (1993). Altered growth and cell walls in a fucose-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Science* 261;1032-1035.

Reiter W.D., Chapple C.C.S. and Somerville C.R. (1997). Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. *Plant J.* 12; 335-345.

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.

Richmond T.A. and Somerville C.R. (2000). The cellulose synthase superfamily. *Plant Physiol.* 124; 495-498.

Richmond T.A. and Somerville C.R (2001). Integrative approaches to determining Csl function. *Plant Mol. Biol.* 47; 131-143.

Ryden P., Sugimoto-Shirasu K., Smith A., Findlay K., Reiter W. and McCann M. (2003). Tensile Properties of Arabidopsis Cell Walls Depend on Both a Xyloglucan Cross-Linked Microfibrillar Network and Rhamnogalacturonan II-Borate Complexes. *Plant Physiol.* 132; 1033-1040.

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

- Segawa H., Soares R., Kawakita M., Beverley S. and Turco S. (2005).** Reconstitution of GDP-mannose Transport Activity with Purified Leishmania LPG2 Protein in Liposomes *J. Biol. Chem.* 280 (3); 2028-2035
- Seifert G. and Roberts K. (2007).** The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology* 58; 137-161.
- Shibuya N., Misaki A. and Iwasky T.(1983).** The structure of Arabinoxylan and Arabinoglucuronoxylan isolated from Rice endosperm cell wall. *Agric. Biol. Chem.* 47(10); 2223-2230.
- Somerville C.R. et al. (2004).** Toward a systems approach to understanding plant-cell walls. *Science* 306; 2206-2211.
- Sterling J., Quigley H., Orellana A. and Mohnen D. (2001).** The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme α -1,4-galacturonosyltransferase is located in the lumen of the Golgi. *Plant Physiol.* 127; 360-371.
- Strasser R., Altmann F., Mach L., Glossl J. and Steinkeller H. (2004).** Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking beta 1,2-linked xylose and core alpha 1,3-linked fucose. *FEBS Letters* 561; 132-136.
- Van Hengel A. and Roberts K. (2002).** Fucosylated arabinogalactan-proteins are required for full root cell elongation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 32; 105-113.
- Vanzin G.F., Madson M., Carpita N., Raikhel N., Keegstra K. and Reiter W. (2002).** The *mur2* mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99; 3340-3345.
- Vierhuis E., York W. S., Kolli, V. S. K., Vincken J.-P., Schols H. A., Van Alebeek G. W. and Voragen, A. G. (2001)** *Carbohydr. Res.* 332, 285-297.
- Wilson I.B.H., Rendic D., Freilinger A., Dumic J., Altmann F., Mucha J., Mueller S. and Hauser M. (2001)** Cloning and expression of cDNAs encoding α 1,3-fucosyltransferase homologues from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* 1527; 88-96.
- Wulff C., Norambuena L. and 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(3); 867-878.
- Sitios de análisis bioinformáticos (fecha última revisión: 10 de noviembre del 2008):**

BLASTP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

MEME : http://meme.sdsc.edu/meme4_1/cgi-bin/meme.cgi

SVMtm Transmembrane Domain Predictor:

http://ccb.imb.uq.edu.au/svmtm/svmtm_predictor.shtml

THUMBUP: http://sparks.informatics.iupui.edu/Softwares-Services_files/thumbup.htm.

TMAP: <http://bioinfo4.limbo.ifm.liu.se/tmap/index.html>.

TMHMM v.2.0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>.

TMpred: http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html.