

UCH-FC
Biotecnología
N 712
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

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



“Uso de la proteína fluorescente verde para el estudio de la localización subcelular de proteínas involucradas en la biosíntesis de polisacáridos no-celulósicos en plantas.”

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

Ricardo Andrés Nilo Poyanco

SANTIAGO DE CHILE, 2002



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE PREGRADO**

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Pregrado presentada por el candidato:

RICARDO NILO POYANCO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 08 de Julio 2002.

Director de Tesis
Dr. Ariel Orellana López

LA COMISION

Dra. Lee Ann Meisel
Presidente

Dra. Luz Maria Pérez Roepke

Dr. Francisco Pérez Correa

"Felix qui potuit rerum cognoscere causas"

Virgilio (Georgicas, II, 489)

"Feliz quién pudo conocer las causas de las cosas"

RESUMEN

SUMMARY

1. INTRODUCCION	8
2. HIPOTESIS	13
3. MATERIALES Y METODOS	14
3.1. Materiales	14
3.1.1. Material biológico.	14
3.1.2. Medios de cultivo.	14
3.1.3. Plasmidios utilizados.	14
3.2. Métodos	16
3.2.1. Amplificación por PCR de los genes de putativos Transportadores de Nucleótidos Azúcar y NDPasas.	16
3.2.1.1. Diseño de los partidores modificados.	17
3.2.1.2. Reacción de amplificación por PCR.	19
3.2.2. Análisis de ADN.	19
3.2.2.1. Electroforesis de ADN.	19
3.2.2.2. Cuantificación de ADN por espectrofotometría.	19
3.2.3. Subclonamiento de los genes de Transportadores de Nucleótidos Azúcar y Nucleósido Difosfatasas en los vectores de expresión en plantas.	19
3.2.3.1. Reacción de Adenia-adición (A-adición) de los amplificados.	20
3.2.3.2. Ligaciones.	21
3.2.3.3. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .	21
3.2.3.4. Selección de colonias transformadas con el vector pGEMT recombinante.	22
3.2.3.5. Desfosforilación de ADN plasmidial.	22
3.2.3.6. Minipreparación de ADN plasmidial de <i>E. coli</i> .	22
3.2.3.7. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.	23
3.2.4. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	23
3.2.4.1. Preparación de células electrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	23

3.2.4.2. Electroporación de células electrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	23
3.2.4.3. Protocolo de Minipreparación de ADN plasmidial de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	24
3.2.5. Mapas de los vectores obtenidos en esta tesis.	25
3.2.6. Transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	27
3.2.6.1. Inmersión Floral.	27
3.2.6.2. Protocolo de esterilización de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	29
3.2.7. Microscopía de fluorescencia	29
3.2.7.1. Observación de la fluorescencia de la GFP <i>in vivo</i> utilizando una lupa de disección.	29
3.2.7.2. Observación de la fluorescencia de la GFP <i>in vivo</i> utilizando microscopía de epifluorescencia.	29
3.2.7.3. Observación de la fluorescencia de la GFP <i>in vivo</i> utilizando microscopía confocal.	30
3.2.8. Transformación transiente de <i>Allium cepa</i> .	31
3.2.8.1. Placas y tejido a ser utilizado.	31
3.2.8.2. Preparación de las partículas.	31
3.2.8.3. Preparación del ADN a ser disparado.	31
3.2.8.4. Bombardeo.	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Clonamiento de los genes de Transportadores de Nucleótidos Azúcar y Nucleósido Difosfatasas en marco con la GFP.	33
4.2. Incorporación de los genes fusionados a GFP en vectores binarios.	34
4.3. Transformación génica de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	36
4.4. Análisis de la fluorescencia en las plantas transgénicas.	37
4.4.1. Análisis usando una lupa de disección.	37
4.4.2. Análisis de la fluorescencia en las plantas transgénicas utilizando microscopía de epifluorescencia.	38
4.5. Expresión transiente de las proteínas de fusión con la GFP.	42
4.5.1. Análisis del patrón de fluorescencia de la proteína fluorescente verde.	42

4.5.2. Análisis del patrón de fluorescencia del Retículo Endoplasmático.	42
4.5.3. Análisis del patrón de fluorescencia de Plastidios.	43
4.5.4. Análisis del patrón de fluorescencia de Golgi.	43
4.5.5. Análisis del patrón de fluorescencia de las proteínas quiméricas de las Nucleósido Difosfatasas y Transportadores de Nucleótidos Azúcar con la GFP.	44
5. DISCUSION	53
6. BIBLIOGRAFIA	59
7. AGRADECIMIENTOS	65

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BMD	2,3-butanediona monoxima
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
dATP	Desoxi Adenosina Trifosfato
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetraacético
IPTG	Isopropil -beta- tiogalactosidasa
LB	Medio Luria-Bertani
Mb	Megabases
ml	Militros
mM	Milimolar
MS	Murashige and Skoog
NDPasa	Nucleósido 5'-difosfatasa
NDP	Nucleósido Difosfato
NMP	Nucleósido Monofosfato
ng	nanogramos
pb.	Pares de bases
PCR	Reacción de la Polimerasa en Cadena
Pi	Fósforo inorgánico
Pipes	Piperazina-N-N'-bis (acido 2-etanosulfónico)
pmol	Picomoles
RE	Retículo Endoplasmático
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TB	Tampón de transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>
TNAs	Transportadores de nucleótidos azúcar
U.A.	Unidades de absorbancia
µg	Microgramos
µl	Microlitros
X-Gal	5-bromo-4-cloro3-indolil-betaD- galactopiranosido

Resumen

El aparato de Golgi es un organelo central en la síntesis de la pared celular primaria de plantas, ya que es en este compartimento donde se biosintetizan tanto hemicelulosas como pectinas, los dos principales polisacáridos que conforman esta matriz. Se sabe que en el lumen del aparato de Golgi se encuentran el dominio catalítico de las glicosiltransferasas, enzimas responsables de realizar la transferencia de residuos de azúcar, provenientes de nucleótidos azúcar, a los polisacáridos en formación en el interior del Golgi. Otras proteínas esenciales en este proceso serían las proteínas transportadoras de nucleótidos azúcar que permitirían el ingreso de los nucleótidos azúcar utilizados por las glicosiltransferasas desde el citosol al lumen del Golgi. A su vez, las nucleósido difosfatasa, enzimas encargadas de hidrolizar los nucleósidos difosfatos liberados por las glicosiltransferasas a nucleósidos monofosfatos, eliminarían los nucleósidos difosfatos, inhibidores de las glicosiltransferasas, y favorecerían la reacción de transferencia hacia los polisacáridos al consumir el nucleósido difosfato.

Recientemente, en nuestro laboratorio, se identificaron genes de *Arabidopsis thaliana* que codifican para transportadores de nucleótidos azúcar y putativas NDPasas. Como una forma de acercarnos a conocer la localización subcelular *in vivo* de estas proteínas, se clonaron sus genes en vectores de expresión en plantas, fusionados con el gen que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP). Mediante técnicas implementadas en el laboratorio durante este trabajo, se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y se transformaron transientemente células de epidermis de cebolla con estas construcciones. La comparación de los patrones obtenidos con las proteínas quiméricas generadas en este estudio, con la distribución subcelular de proteínas marcadas con GFP de localización conocida, sugiere que el producto génico del gen AtUTr2-smGFP presenta una localización en estructuras que corresponden al aparato de Golgi, en células epidermales de cebolla. Respecto a la localización del producto génico de AtUTr1-smGFP, con los antecedentes obtenidos es difícil poder determinar su localización subcelular. En cuanto a las dos proteínas candidatas a nucleósido difosfatasa, AtNDPasa1-smGFP y AtNDPasa2-smGFP, a pesar de los variados esfuerzos, no se pudo determinar su localización subcelular.

Summary

The Golgi apparatus is a central organelle in the primary plant cell wall biosynthesis since it is in this compartment where the synthesis of two of the main components of this matrix, hemicelluloses and pectins, take place. It is known that the catalytic domain of the glycosyltransferases are found in the lumen of the Golgi apparatus, and that these enzymes are responsible for the transfer of the sugar moiety from the nucleotide sugar to the growing polysaccharides inside the Golgi. Along with these enzymes, nucleotide sugar transporters are essential in this process since they would allowed the nucleotide sugar entry from the cytosol into the lumen of the Golgi where they can be used by the glycosyltransferases. In turn, the nucleoside diphosphatases, the enzymes that hydrolyse the nucleoside diphosphates released by the glycosyltransferases to nucleoside monophosphates, would have an important role in this process since they would eliminate an inhibitor of the glycosyltransferases, the nucleoside diphosphates and, also, they would drive the transfer reaction to the polysaccharide synthesis by consuming the nucleoside diphosphates.

Recently, in our laboratory, genes from *Arabidopsis thaliana* that code for nucleotide sugar transporters and for nucleotide diphosphatases were identified. As an approach to know the *in vivo* subcellular localization of these proteins their genes were cloned in plant expression vectors, fused with the gene that code for the Green Fluorescent Protein (GFP). By means of techniques implemented at the laboratory in the course of this work, transgenic plants of *Arabidopsis thaliana* were generated and onion epidermal cells were transiently transformed with these constructs. The comparison between the patterns obtained with the quimeric proteins made in this study with the subcellular distribution patterns of GFP-tagged proteins of known subcellular localization allowed us to postulate that the gene product of the construct AtUTr2-smGFP presents a localization in structures that resemble the Golgi apparatus, in onion epidermal cells. Concerning the gene product of the construct AtUTr1-smGFP it isn't possible, with the data obtained, to assign it a precise subcellular localization. In the case of the proteins candidates to nucleoside diphosphatases, AtNDPasa1-smGFP and AtNDPasa2-smGFP, despite of the important efforts made, no clear subcellular localization could be obtained.

1. Introducción

El Aparato de Golgi es el sitio de síntesis y modificación de N-glicoproteínas, O-glicoproteínas y proteoglicanos tales como los arabinogalactanos. Además, es el lugar donde ocurre la síntesis *de novo* de polisacáridos de la pared celular tales como hemicelulosas y pectinas. Algunas de las enzimas localizadas en el aparato de Golgi se encuentran en todas las células eucariontes, sin embargo, otras tales como las enzimas involucradas en la síntesis de polisacáridos complejos de la pared celular, son únicas de los tejidos vegetales (Nebenführ y Staehelin, 2001).

La pared celular primaria de las células vegetales está compuesta principalmente de polisacáridos, entre los cuales se encuentran celulosa, hemicelulosas y pectinas. La celulosa (1,4- β -D-glucano) forma microfibrillas que se unen a las hemicelulosas formando una matriz. La hemicelulosa predominante en la mayoría de las paredes celulares de plantas es el xiloglucano, el cual está formado de una cadena lineal de 1,4- β -D-glucano, al cual se unen de manera periódica cadenas laterales de mono, di o trisacáridos. Por otro lado, las pectinas presentan una carga negativa alta, y tienden a formar estructuras tipo gel *in vitro*. Los polisacáridos pécticos son generalmente clasificados como homogalacturonanos, ramnogalacturonano I y ramnogalacturonano II. Los últimos dos polisacáridos son estructuralmente muy complejos, y aparentemente estarían covalentemente conectados a los homogalacturonanos; sin embargo, la naturaleza precisa de las uniones entre los componentes pécticos permanece indefinida (Reiter y col., 1997).

Pectinas y hemicelulosas son sintetizadas en el aparato de Golgi de plantas por glicosiltransferasas. Estas enzimas transfieren los monosacáridos desde los nucleótidos azúcar a la cadena de polisacáridos que se está sintetizando en el lumen del Golgi. La biosíntesis de estos polisacáridos no celulósicos requiere la coordinación de la actividad glicosiltransferasa con la incorporación de nucleótidos azúcar provenientes desde el citosol de la célula, lugar en donde ocurre la síntesis de estos compuestos (Carpita y col., 1996). Neckelman y Orellana (1998), plantearon un modelo en el cual se postula que los nucleótidos azúcar (NDP azúcar) ingresarían desde el citosol de la célula al lumen del aparato de Golgi vía transportadores de nucleótidos azúcar (TNAs) presentes en la membrana de este organelo. Una vez en el lumen, estos azúcares serían incorporados a polímeros en formación por acción de las glicosiltransferasas, liberando nucleósidos difosfatos (NDP), los cuales serían inmediatamente

hidrolizados a nucleósidos monofosfatos (NMP) y fósforo inorgánico (Pi) por la acción de nucleósido difosfatasa (NDPasas). Una vez formado el NMP, este sale desde el lumen de las cisternas de Golgi acoplado a la entrada del nucleótido azúcar. A su vez, el fosfato saldría del lumen del organelo por una vía distinta aún no caracterizada. Uno de los puntos novedosos de este modelo es que, aparte de adjudicar un importante rol a las glicosiltransferasas en el mecanismo de biosíntesis de hemicelulosas y pectinas, asigna un papel importante a las NDPasas y a los transportadores de nucleótidos azúcar (TNAs) en la síntesis de polisacáridos en el aparato de Golgi. Los TNAs serían esenciales en este proceso ya que son los encargados de ingresar los sustratos para las transferasas desde el citosol al lumen del Golgi. Por otro lado, la importancia de las NDPasas también se puede desprender fácilmente del modelo ya que estas liberan NMP y fosfato a partir del NDP producido por las glicosiltransferasas, el que es utilizado para la incorporación, a través de un proceso de intercambio, de nuevas moléculas de nucleótidos azúcar. Además, al eliminar un inhibidor de las glicosiltransferasas, como son los NDPs, y debido a que su acción desplaza la reacción de transferencia hacia los productos al consumir NDP, esta enzima colaboraría de manera vital al proceso de biosíntesis de los polímeros no celulósicos.

El estudio molecular de estos transportadores y NDPasas podría arrojar información sobre los mecanismos de localización y organización de estas proteínas. Ese conocimiento, a su vez, podría generar los medios de entender y modificar el desarrollo de las plantas a través de la alteración de la química y de la estructura de la pared celular (Gibeaut, 2000). Para poder identificar los genes de putativos transportadores de nucleótidos azúcar y de nucleósido difosfatasa de plantas, se eligió como modelo de estudio a *Arabidopsis thaliana*. Entre las ventajas de trabajar con *Arabidopsis thaliana*, se pueden enumerar:

- Ciclo de vida corto; genoma pequeño comparado con otras plantas (125Mb); fácil de transformar; baja cantidad de ADN repetitivos (Meinke y col., 1998; Page y Grossniklaus, 2002; Walbot, 2000).

Otra de las ventajas es que el genoma de *A. thaliana* se encuentra completamente secuenciado (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Esto permite identificar genes de plantas que posean similitud con genes conocidos provenientes de otras especies. Utilizando este acercamiento, en nuestro laboratorio recientemente se identificaron y subsecuentemente se clonaron los siguientes genes candidatos a TNAs y NDPasas de *Arabidopsis thaliana*:

- AtUTr1 y AtUTr2, cuyos genes son homólogos a transportadores de uridina-5'-difosfato galactosa (UDP-Gal) de humano.
- AtNDPasa1 y AtNDPasa2, cuyos genes son homólogos a nucleósido difosfatasa de *Pisum sativum*, cerebro humano y de *S. cerevisiae*.

Estudios funcionales han mostrado que los genes AtUTr1 y AtUTr2 descritos anteriormente, corresponden efectivamente a transportadores de nucleótidos azúcar. Por otro lado los genes AtNDPasa 1 y 2 son capaces de complementar una mutante de NDPasa de Golgi de levaduras. Estudios adicionales muestran que estos genes codifican para proteínas con características enzimáticas de apirasa. Junto con los estudios funcionales, es necesario determinar la localización subcelular precisa de los productos de estos genes de *Arabidopsis* ya que se sabe que en el retículo endoplasmático (RE) también se llevan a cabo reacciones de glicosilación, por lo que se podrían encontrar tanto TNAs como NDPasas en ese organelo (Berninsone y Hirschberg, 1998). Una aproximación experimental que ha sido utilizada para estudiar la localización de proteínas es generar quimeras de las proteínas en cuestión con la proteína fluorescente verde (GFP), expresar estas quimeras en células y analizar su distribución por microscopía de fluorescencia y microscopía confocal (Baldwin y col., 2001).

La GFP es una proteína originaria de la medusa *Aequorea victoria*, la cual al ser incitada por una radiación de una longitud de onda determinada emite una fluorescencia de color verde brillante. El gen que codifica para la GFP puede ser expresado en varias líneas celulares y organismos, lo que permite que esta proteína se utilice como marcador molecular para la expresión de genes en varios sistemas (Gadella y col., 1999).

La utilización de la GFP como proteína reportera en lugar de otras tales como la luciferasa y la β -glucuronidasa se debe a que, a diferencia de esas dos proteínas, la detección de la fluorescencia en la GFP no requiere de sustratos y cofactores, o de la destrucción de la muestra biológica ya que el único cromóforo responsable por la fluorescencia es formado por una modificación postraduccional dentro de la proteína luego de la constitución del anillo cíclico y oxidación de los residuos 65-67, Ser-Tyr-Gly (Davis y Viestra, 1998; Fuhrmann, 1999). Además, posee otras características ventajosas para cumplir su función de reportero, entre las que resaltan su tamaño relativamente pequeño (26.9kD) y su tolerancia a fusiones tanto en el amino como en el carboxilo terminal (Pang, 1996). Todo ello permite su uso para estudiar la expresión de genes, la localización subcelular y el tráfico de proteínas y organelos

in vivo (Köhler, 1998). Finalmente, otro factor importante, la visualización en largos períodos de tiempo, también es posible debido a la estabilidad de la GFP (Scott y col., 1999).

Este tipo de estrategia ha sido ampliamente utilizada en sistemas vegetales, tanto para determinar la localización subcelular de proteínas como para el seguimiento *in vivo* de procesos que ocurren a nivel celular (Haseloff and Siemering, 1998; Baldwin y col., 2001; Hawes y col., 2001).

Como se mencionó anteriormente la visualización de las quimeras de GFP requiere introducir el ADN que codifica para las proteínas quiméricas en tejidos vegetales. Dos estrategias utilizadas con este fin son la transformación estable de plantas, y la expresión transiente en tejidos tales como la epidermis de cebolla. Para transformar establemente *Arabidopsis thaliana* habitualmente se utiliza el microorganismo *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria posee la habilidad natural de transformar plantas. Durante el proceso de transformación, un segmento específico del vector binario, el T-DNA, es transferido desde la bacteria a la planta hospedera. Este segmento de ADN está delimitado por dos repetidos directos imperfectos de 24 pares de bases, los denominados bordes derechos e izquierdos. Esos bordes se requieren para la transferencia del T-DNA y pueden mediar la transferencia de cualquier secuencia de ADN que se encuentre entre ellos al núcleo de la planta (Laufs y col., 1999). El sistema de *Agrobacterium* es atractivo debido a lo fácil del protocolo, además de los costos de equipamientos mínimos. Otra ventaja es que las plantas transgénicas obtenidas por este método generalmente contienen inserciones de una sola copia (Hansen y Wright, 1999).

Para transformar *A. thaliana* con *Agrobacterium tumefaciens* se ha utilizado el método denominado Inmersión Floral (Clough y Bent, 1998). En este método, las flores de *Arabidopsis* son sumergidas en una solución que contiene *Agrobacterium* y, subsecuentemente, algunas de las semillas obtenidas son transgénicas. Aunque la eficiencia total es baja, el gran número de semilla recuperadas para el análisis y la facilidad del método hacen de esta una muy buena alternativa para obtener plantas transgénicas (Clough y Bent, 1998; Hansen y Wright, 1999).

Para poder analizar los resultados de la transformación estable de *A. thaliana* se requiere de un tiempo considerable, ya que además de obtener las diversas construcciones es necesario esperar un ciclo de vida completo de esta planta para obtener las semillas que, al germinar, van a resultar en plantas transgénicas. Como una estrategia alternativa al estudio de la localización subcelular de las proteínas quiméricas en *Arabidopsis thaliana* se puede realizar,

por medio de la expresión transiente, el análisis de los resultados de las construcciones en células de epidermis de cebolla, *Allium cepa*. Este proceso de transformación se puede hacer en un tiempo mucho más corto ya que no requiere la construcción de los vectores binarios, sólo se necesitan vectores de expresión en plantas. El otro factor importante es que la transformación de las células y la obtención de los resultados se logran en un par de días.

Las células de epidermis de cebollas, *Allium cepa*, presentan diversas ventajas para la visualización de estructuras celulares. Han sido utilizadas como modelo para microscopía de luz, debido a que son grandes, relativamente transparentes, presentan poca autofluorescencia y se encuentran naturalmente como monocapa, haciéndolas ideales para observar proteínas de fusión con GFP. Como sistema modelo las células de cebolla han probado ser de gran utilidad en el estudio de estructuras celulares incluyendo la membrana plasmática, el RE, el núcleo, depósitos de callosa, el citoesqueleto y plasmodesmos. Las células de cebolla que expresan transientemente varias construcciones pueden ser vistas con un límite teórico de resolución de 200nm, permitiendo la observación de organelos y otras estructuras a un nivel subcelular. Mientras que las ventajas son numerosas los posibles problemas del sistema son mínimos. Las células en los catáfilos de cebolla están sujetas al daño durante el proceso de aislamiento. Sin embargo es fácil de analizar el estado de las células al observar la presencia del flujo citoplasmático (Scott y col., 1999).

Para llevar a cabo la transformación de la epidermis de cebolla una de las técnicas utilizadas es la biobalística. El principio de transformación de esta técnica consiste en utilizar una pistola que dispara partículas de metal, las cuales transportan mecánicamente el ADN hacia el interior de la célula. Aunque originalmente diseñado para transportar genes foráneos a través de las paredes celulares de las plantas, se ha demostrado que este método funciona con éxito en sistemas tales como bacterias, levaduras y líneas celulares de mamíferos. No solamente sistemas unicelulares, sino que también plantas y animales completos (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*) pueden ser transformados. Las ventajas del método son el tiempo corto de manipulación del equipo para realizar el experimento y la alta eficiencia de transformación.

En esta tesis intentamos determinar la localización subcelular de los productos génicos de AtUTr1, AtUTr2, AtNDPasa1 y AtNDPasa2. Para ello se construyeron proteínas quiméricas con la proteína fluorescente verde (GFP), y posteriormente se transformaron tejidos vegetales. Para ello implementamos la metodología necesaria para generar plantas

transgénicas mediante la transformación con *Agrobacterium* y para realizar la transformación transiente de células epidermales de cebolla utilizando biobalística. Una vez realizadas las transformaciones, la expresión y localización subcelular de las proteínas quiméricas, fueron analizadas utilizando microscopía de fluorescencia y confocal. Los resultados obtenidos fueron comparados a la localización de proteínas fusionadas a la GFP que poseen una localización subcelular conocida.

2. Hipótesis

- ❖ Los genes identificados en *Arabidopsis thaliana* que codifican para Transportadores de Nucleótidos Azúcar (AtUTr1 y AtUTr2) y las Nucleósido Difosfatasa (AtNDPasa1 y AtNDPasa2) se localizan en el aparato de Golgi.

Objetivo General

- ❖ Estudiar *in vivo* la distribución subcelular de Transportadores de Nucleótidos Azúcar y Nucleósido Difosfatasa utilizando proteínas quiméricas de los genes de interés fusionados con la GFP.

Objetivo Específicos

- Generar construcciones en las cuales los genes de Transportadores de Nucleótidos Azúcar y de Nucleósido Difosfatasa se encuentren fusionados con el gen de la proteína fluorescente verde. Clonar estas construcciones en vectores diseñados para transformar plantas.
- Implementar los sistemas de transformación genética de *Arabidopsis thaliana* y de expresión transiente de *Allium cepa*.
- Analizar la localización subcelular de las proteínas quiméricas versus el patrón de localización de las proteínas o péptidos fusionados a GFPs cuya destinación subcelular ya ha sido previamente caracterizada.

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Material Biológico.

Semillas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo columbia.

Cepa de *Escherichia coli* - DH5 α .

Cepa de *Agrobacterium tumefaciens* - GV3101.

Cebollas.

3.1.2. Medios de Cultivo.

Para *E. coli* y *A. tumefaciens*:

a) Medio líquido: Medio Luria-Bertani al 2%.

b) Medio sólido: Medio Luria-Bertani al 2% y agar ultrapuro al 1,5%.

Para *A. thaliana*:

a) Medio sólido: Murashige y Skoog (MS) 0,5X y agar ultrapuro al 0,8%.

3.1.3. Plasmidios utilizados.

- pGEMT - vector de clonamiento proveniente de Promega. Este vector se encuentra linealizado y posee colas de timidina en sus extremos 3', las cuales pueden ser utilizadas para realizar ligaciones con productos de PCR amplificados por ADN polimerasas tales como la Taq polimerasa, que deja colas de adenina en los extremos 3' de los productos de PCR. También posee el sistema de α -complementación para facilitar la identificación de las bacterias transformantes con plasmidios recombinantes. Confiere resistencia a ampicilina en bacterias.
- psmGFP - vector de expresión en plantas derivado del plasmidio pUC118. Posee el promotor CaMV35S río arriba del gen que codifica para la smGFP y la región terminadora de la nopalina sintetasa (NosT) río abajo. Confiere resistencia a ampicilina en bacterias (Davis y Vierstra, 1998).
- pEL103 - vector binario que posee en su secuencia el promotor CaMV35S seguido de la secuencia omega, que promueve la traducción de las secuencias que se encuentran río abajo. Como terminador está la región terminadora de la nopalina sintetasa. Posee un gen

que confiere resistencia a kanamicina a las plantas y otro gen que le confiere resistencia a kanamicina a las bacterias (Eric Lam, Rutgers University, EUA).

- pBIN m-gfp5-ER – Este vector binario se utilizó para obtener un patrón de retículo endoplasmático en plantas. En este caso la GFP posee en su amino terminal un péptido señal derivado de la quitinasa básica vacuolar de *A. thaliana* y en su carboxilo terminal la secuencia HDEL, asegurando de esa forma la secreción y retención de la proteína en el lumen del RE (Haseloff y col., 1997). Este vector se mantiene en bacterias por selección con kanamicina y proporciona resistencia a este mismo antibiótico en plantas. Posee el gen que codifica para la m-gfp5-ER río abajo del promotor CaMV35S y río arriba del terminador NosT (Jim Haseloff, University of Cambridge, Inglaterra).
- pVKH18En6-STtmdGFP – Vector binario se que utilizó como control del patrón subcelular de Golgi. Este vector contiene en su secuencia el gen que codifica para la STtmdGFP. Esa proteína quimérica consiste de la GFP fusionada a los 52 aminoácidos del amino terminal de la 2,6-sialiltransferasa de rata la cual, a su vez, comprende 9 aminoácidos del dominio citoplasmático, el dominio transmembrana y 26 aminoácidos del dominio luminal. Estudios en hojas de *Nicotiana clelandii* demostraron su localización preferencial en la región trans de las cisternas de Golgi. Este vector posee en su secuencia el promotor CaMV35S seguido de la secuencia omega. Río abajo se encuentra el casete que codifica para la STtmdGFP. Como terminador de la transcripción contiene el NosT. Posee un gen que le confiere resistencia a plantas a higromicina (Boevink y col., 1998).
- pCK RecAGFP – Este vector de expresión en plantas se utilizó como control del patrón subcelular de plastidios. En este caso el gen de la GFP está fusionado en su amino terminal al péptido de tránsito del gen RecA de cloroplastos de *Arabidopsis*. Este vector posee un promotor CaMV35S, un enhancer transcripcional doble río arriba del péptido de tránsito RecA fusionado al gen de la GFPS65C y una señal de poliadenilación del CaMV35S río abajo (Akashi y col., 1998).

Nota: Todas las GFPs presentes en estos vectores son derivadas de la mGFP4, una versión modificada de la GFP silvestre de *Aequorea victoria* en la cual se realizaron sustituciones en los nucleótidos que alteran el uso de los codones (pero no la secuencia aminoacídica) para eliminar el reconocimiento del intrón críptico de plantas presente en la proteína silvestre, evitando, de esa forma, la producción de una GFP truncada incapaz de fluorescer (Haseloff y col., 1997).

3.2. Métodos

3.2.1. Amplificación por PCR de los genes de putativos Transportadores de Nucleótidos Azúcar y NDPasas.

Para poder observar la localización subcelular de los Transportadores de Nucleótidos Azúcar y NDPasas, los genes de interés serían amplificados mediante PCR para luego ser clonados vía cortes con enzimas de restricción, en marco con el gen de la proteína fluorescente verde que se encuentra en un vector de expresión de plantas (Figura 1). En este caso el vector elegido fue el vector psmGFP (Figura2).

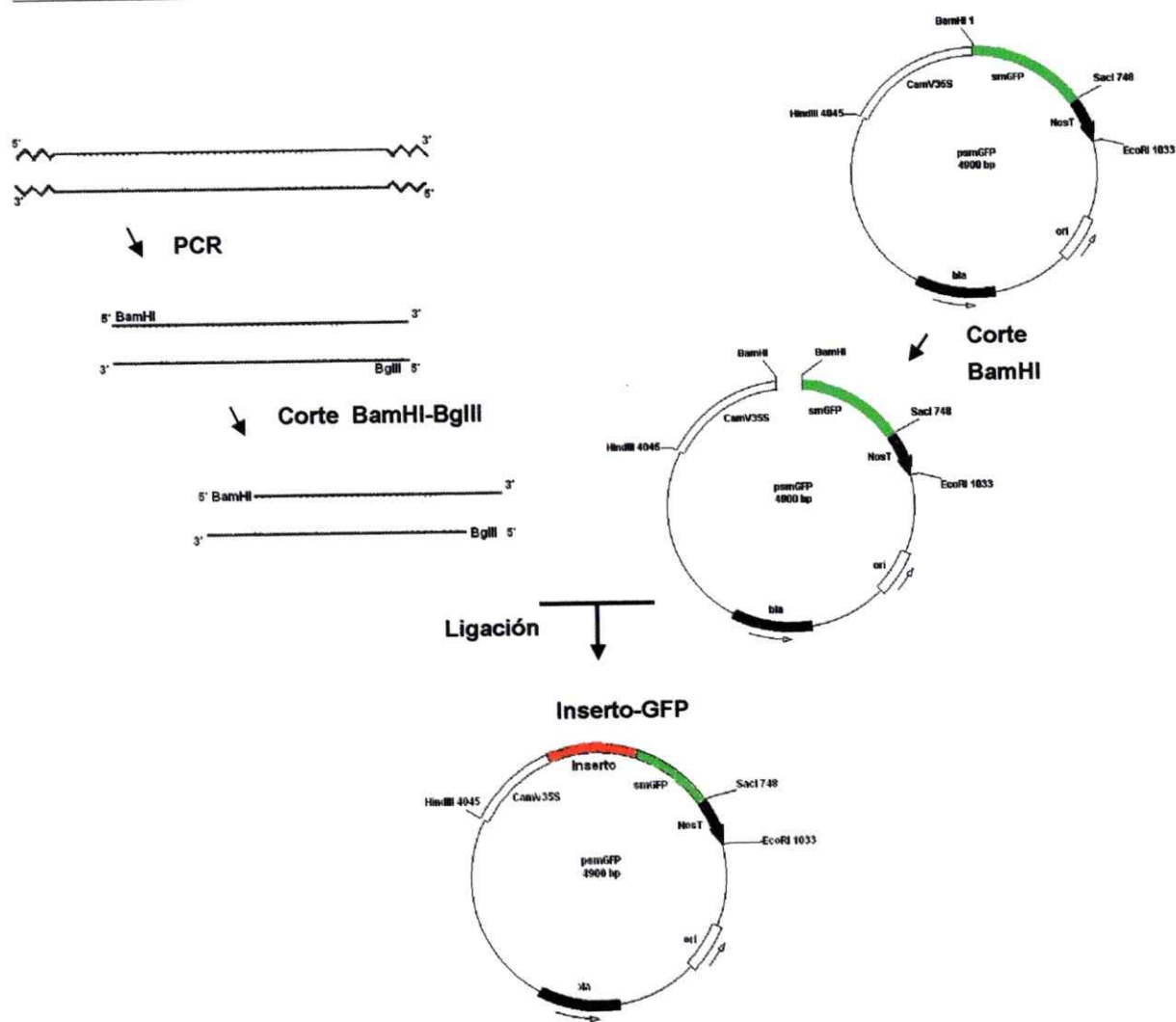


Figura 1: Esquema de la estrategia de clonamiento de los genes de interés en el vector de transformación de plantas que posee a la GFP en su secuencia.

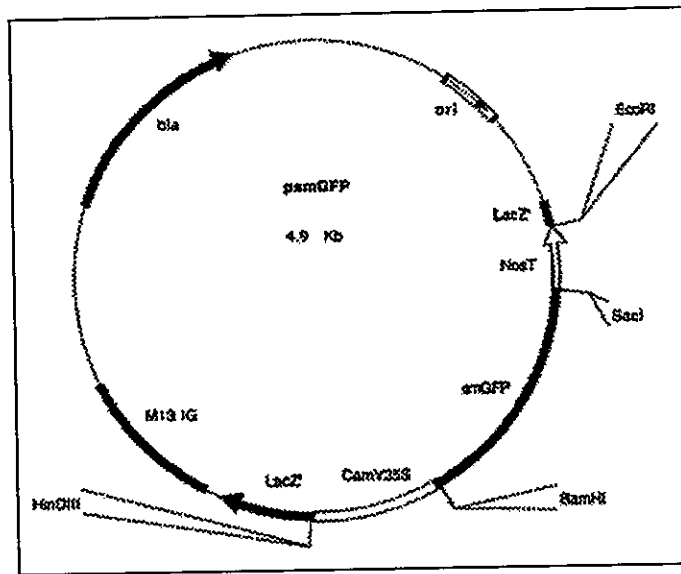
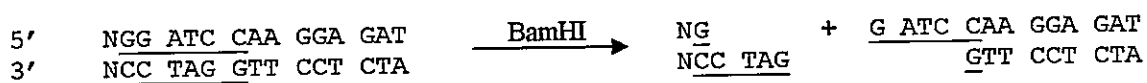


Figura 2- Plasmidio psmGFP. Vector de expresión en plantas derivado del plasmidio pUC18. Posee el promotor CaMV35S río arriba del gen que codifica para la smGFP y la región terminadora de la nopalina sintetasa (NosT) río abajo, como terminador de la transcripción.

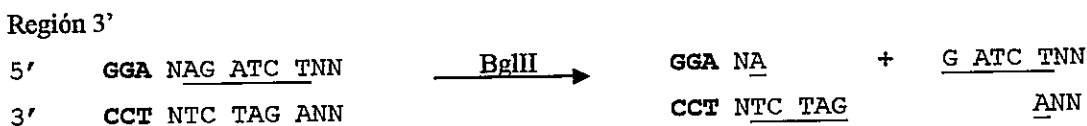
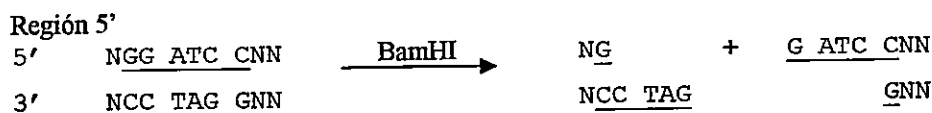
3.2.1.1. Diseño de los partidores modificados.

Se diseñaron partidores para las regiones 5' y 3' de los genes de interés, con modificaciones en relación con la secuencia original para insertar los sitios de corte para las enzimas BamHI en el 5' y BglII en el 3'. De esa forma, al cortar los fragmentos amplificados por PCR con esas enzimas, los fragmentos podrían ser clonados en el sitio BamHI del vector de expresión en plantas psmGFP (Figura 3).

Resultado del corte del vector smGFP con la enzima de restricción BamHI.



Resultado del corte de los genes de interés con BamHI en el 5' y con BglII en el 3'.



Como resultado de la ligación del vector smGFP cortado con BamHI con los insertos cortados con BamHI y BglII se mantiene el inserto en marco con el gen de la smGFP.

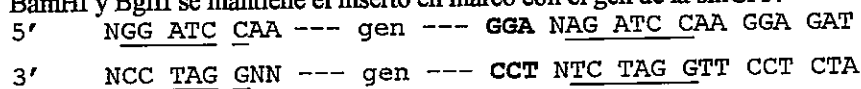


Figura 3: Esquema de la estrategia de subclonamiento de los genes de los TNAs y de las NDPasas en marco con el gen de la GFP, en el vector de expresión en plantas psmGFP. Subrayados se encuentran los sitios de restricción y, en negrita, se encuentran los codones que codifican para los aminoácidos que sustituyeron los codones de término de los genes de interés. La letra N se utilizó para denotar un nucleótido cualquiera.

Los partidores 3' fueron diseñados, además, de manera tal que el codón de término de los genes fuese sustituido por uno que codifique para un aminoácido de tamaño relativamente pequeño tal como glicina o leucina y que el gen se mantuviese en marco de lectura con el gen de la GFP (figura 3).

Como resultado de la estrategia descrita anteriormente, se diseñaron los siguientes partidores para amplificar los putativos genes de Transportadores de Nucleótidos Azúcar, AtUTr1 y AtUTr2, y los genes de putativas Nucleósido Difosfatasa, AtNDPasa1 y AtNDPasa2 (Figura 4).

AtNDPasa1

Partidor 5'- 5' TCGTGGATCCAT**ATG**GAAACCGATTAAGTTCCAG 3'
BamHI

Partidor 3'- 5' GACCAAGATCTT**CAA**ATTCGAGTCGCTATGTAC 3'
BglII

AtNDPasa2

Partidor 5'- 5' ACATGGATCCCTGTTGACGGAGGTAAG**ATG** 3'
BamHI

Partidor 3'- 5' CAAAATAGATCTC**TCC**CGGTGAGGATACGGCCTC 3'
BglII

AtUTr1

Partidor 5'- 5' TCACGGATCCTA**ATG**GAGGTCCATGGCTCC 3'
BamHI

Partidor 3'- 5' AGGGAAGATCTC**TCC**ACTCTTTTGCTTCTTCTT 3'
BglII

AtUTr2

Partidor 5'- 5' GTAAGGATCC**ATG**AAGGAGGAACAAACAAGG 3'
BamHI

Partidor 3'- 5' ATGGAGATCTC**TCC**AACCAATGACTTCCTTTC 3'
BglII

Figura 4: Partidores utilizados para amplificar los genes de interés. En negrita se observa el codón de inicio de la traducción, el ATG; subrayados se encuentran los sitios de restricción para las enzimas BamHI y BglII y, en negrita y cursivas, se encuentran los codones que codifican para los aminoácidos que sustituyeron los codones de término de los genes.

3.2.1.2. Reacción de amplificación por PCR.

La amplificación por PCR se realizó utilizando como template para las reacciones los vectores AtNDPasa1-p426 GPD y AtNDPasa2-p426 GPD, para obtener los fragmentos de la AtNDPasa1 y de la AtNDPasa2, respectivamente, y a partir de una genoteca de *Arabidopsis thaliana* se amplificó AtUTr1 y AtUTr2. Los productos obtenidos de la amplificación se analizaron en gel de agarosa al 1% y se purificaron según se describe más abajo.

3.2.2 Análisis de ADN.

3.2.2.1. Electroforesis de ADN.

EL ADN plasmidial se analizó en geles de agarosa al 0,8-1% (p/v) conteniendo bromuro de etidio a una concentración aproximada del 1%. Se utilizó la solución TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M y EDTA 0,001 M, pH 8,5) como tampón de corrida y se aplicó una diferencia de potencial entre 60-100 V. Las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador UV a una longitud de onda de 254 nm.

3.2.2.2. Cuantificación de ADN por espectrofotometría.

La concentración de ADN se determinó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260nm y usando la siguiente equivalencia: $C_{ADN} (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times 5$, donde C es la concentración de ADN, y A_{260} es la absorbancia obtenida a 260 nm (Sambrook y col., 1989).

3.2.3. Subclonamiento de los genes de Transportadores de Nucleótidos Azúcar y Nucleósido Difosfatasas en los vectores de expresión en plantas.

Para poder ligar el gen amplificado al plasmidio de expresión en plantas se formarían extremos complementarios cortando el vector y el inserto con enzimas de restricción que permitieran la ligación de ambos extremos. Debido a las dificultades que se presentan normalmente al intentar cortar fragmentos de ADN amplificados por PCR con enzimas de restricción y de al mismo tiempo cerciorar si ese corte fue realmente llevado a cabo, se procedió a utilizar una estrategia alternativa que nos permitiera superar ambos problemas.

Esta estrategia consistió en clonar los insertos amplificados por PCR directamente en el vector pGEMT para luego, mediante cortes con enzimas de restricción, obtener el inserto cortado a partir del vector transformado.

El vector pGEMT es un vector comercial, el cual se encuentra abierto y que, además, presenta la particularidad de poseer en sus extremos 3' una cola de timidina (T) (Figura 5). Esta cola de T permite realizar ligaciones de alta eficiencia del vector pGEMT con los amplificados de PCR obtenidos con polimerasas como la Taq DNA polimerasa y la Elongasa, que dejan colas de adenina en los extremos 3' de los amplificados.

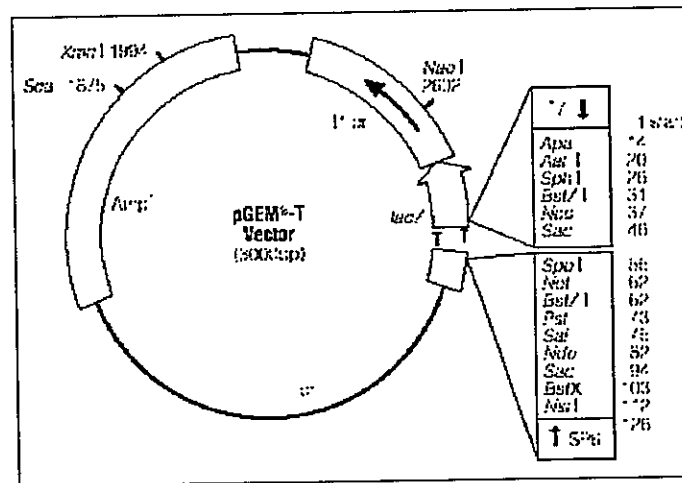


Figura 5- Vector de clonamiento pGEMT. Este vector se encuentra linearizado y posee colas de timidina en sus extremos 3', las cuales pueden ser utilizadas para realizar ligaciones con productos de PCR amplificados por ADN polimerasas que dejan colas de adenina en los extremos 3' de los productos de PCR. También posee el sistema de α -complementación para facilitar la identificación de las bacterias transformantes con plasmidios recombinantes.

3.2.3.1. Reacción de Adenina-adición (A-adición) de los amplificados.

Para llevar a cabo la amplificación de los vectores en las reacciones de PCR se utilizó la *Pfu* polimerasa, la cual por poseer una actividad exonucleásica 3'-5' corrige posibles errores cometidos durante la polimerización y, por consiguiente, permite obtener un producto de síntesis de alta fidelidad. Debido a esa actividad correctiva la *Pfu* polimerasa no deja colas de adenina en sus amplificados, por lo que se debió, como primer paso para subclonar los insertos en el vector pGEMT, colocar colas de adenina a los amplificados. Para ello se utilizó el siguiente protocolo:

En un tubo de PCR de 0,6 ml se agregaron 7 μ l del producto de PCR purificado, 0,4 μ l de dATP 5 mM, 1 μ l de tampón de PCR de la Taq DNA polimerasa, 0,3 μ l de MgCl₂ 50 mM,

0,3 μ l de Taq DNA polimerasa y 1 μ l de agua destilada estéril. Esta reacción se incubó durante 22 min. a 70°C.

3.2.3.2. Ligaciones.

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo según lo descrito por Sambrook y col. (1989). Para el caso del vector pGEMT, se siguió el protocolo descrito en su respectivo kit, el cual consiste en agregar a un tubo de PCR 4 μ l del producto de la reacción de A-adición, 5 μ l del tampón de la ligasa del kit del pGEM, 0,5 μ l del vector pGEMT (25 ng), 0,5 μ l de ligasa, incubando la reacción a 4°C durante a lo menos 16 hrs.

3.2.3.3. Transformación de células competentes de *E. coli*

1) Preparación de bacterias competentes.

Este protocolo está basado en el método de Inoue y col. (1990). Se prepararon bacterias competentes a partir de cepas de *E. coli* DH5 α para lo cual se creció un preinóculo en 3 ml de LB durante 10 horas. Luego, se utilizaron 250 μ l de ese cultivo para inocular 125 ml de medio SOB (Tripton 2%; extracto de levadura 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM y MgSO₄ 10 mM). Este se creció a 20°C hasta llegar a una densidad óptica de 0,5 U.A. a 600 nm. Se incubó las células en hielo durante 10 min. para luego sedimentar las células a 3.000xg a 4°C durante 10 min. Se resuspendieron cuidadosamente las células en 40 ml de tampón TB (Pipes 10 mM; MnCl₂ 55 mM; CaCl₂ 15 mM; KCl 250 mM pH 6,7) y se incubó las células en hielo por 10min., sedimentando nuevamente las células a 3.000xg a 4°C durante 10 min. Se resuspendió el precipitado en 5 ml de tampón TB. Se agregó DMSO hasta obtener una concentración final del 7% de DMSO y se incubaron en hielo por 10 min. Se alicuotaron las células competentes, se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C.

2) Transformación de células competentes.

Se siguió el protocolo de Inoue y col. (1990). Se colocaron las células competentes en hielo por 5 minutos luego de los cuales se incubaron con el ADN, también en hielo, por 20 minutos. Luego de ese tiempo se procedió a dar un shock térmico a 42°C durante 30 seg., después de los cuales se dejaron las células en hielo por dos minutos. Se incubaron las células en 900 μ l de medio LB durante una hora para finalmente plaquearlas en las placas de LB con

el antibiótico adecuado. Luego de 13 horas a 37°C se observaban los resultados. Las placas se guardaron a 4°C.

3.2.3.4. Selección de colonias transformadas con el vector pGEMT recombinante.

Para seleccionar a las colonias transformadas con el vector pGEMT que, debido a la ligación realizada previa la transformación de bacterias, tiene ahora en su secuencia clonado uno de los genes de interés, se utilizó la selección por medio de la alfa-complementación, lo que permite discriminar, en placas que contienen X-Gal e IPTG, las colonias transformantes por su color blanco versus las no transformantes de color azul.

3.2.3.5. Desfosforilación de ADN plasmidial.

Las reacciones de desfosforilación se llevaron a cabo según Sambrook y col. (1989). Se utilizaron 0,01 unidades de fosfatasa alcalina para desfosforilar 1 pmol de vector digerido con una enzima de restricción que deja extremos cohesivos. Se realizaron reacciones, al mismo tiempo, con 0,1 y 0,001 unidades. Todas las reacciones se incubaron a la temperatura recomendada para la fosfatasa que se estaba utilizando por una hora en un volumen final de 30µl. Se detuvieron las reacciones incubando las reacciones a 65°C por 20 minutos y luego agregando 1µl de EDTA 0,5 M. Luego el ADN se purificó mediante una extracción con fenol-cloroformo y se precipitó con etanol 100%, para luego volver a lavar el ADN con etanol 70%. Se retiró el etanol y se resuspendió el ADN en agua destilada estéril.

3.2.3.6. Minipreparación de ADN plasmidial de *E. coli*.

Este protocolo está basado en el protocolo de Xiang (1994). Se dejaron creciendo las bacterias por 16 horas en 3 ml de medio LB, para luego centrifugar 1,5 ml durante 30 segundos a 16.000xg. Se eliminó el sobrenadante y luego se agregó 100 µl de la solución I (Glucosa 50 mM; EDTA 10 mM; Tris-HCl pH 8,0, 25 mM). Luego, se agitó utilizando vortex hasta resuspender completamente el precipitado. Después, se agregó 200 µl de la solución II (0,2 N NaOH, SDS 1%), recién preparada, y se agitó manualmente 4 veces, hacia arriba y hacia abajo. Finalmente, se agregó 150 µl de la solución III (a 28,5 ml de agua destilada agregar 60 ml de acetato de potasio 5 M y luego agregar 11,5 ml de ácido acético glacial) y se agitó con fuerza 8 veces.

Se sedimentaron las células a 16.000xg durante 4 min. y luego se recuperó el

sobrenadante, tomando cuidado con no tomar parte del precipitado, de color blanquecino, que se mantienen en solución. Se agregó 850 µl de etanol 96% a temperatura ambiente y se agitó el tubo manualmente 4 veces, suavemente. Se centrifugó por 1 minuto, para luego eliminar el sobrenadante con cuidado para no mover el ADN. Se dejó el tubo secando por 5 minutos a 37°C y luego se agregó agua destilada con RNAasa. Se resuspendió el ADN con cuidado. Finalmente, se dejó a 37°C durante 30 minutos para que la RNAasa actuase, y luego se guardó a -20°C.

3.2.3.7. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.

La purificación de ADN a partir de geles de agarosa fue llevada a cabo utilizando el kit de extracción de ADN CONCERT Matrix Gel Extraction System, de Gibco.

3.2.4. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

3.2.4.1. Preparación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*.

Este protocolo está basado en el protocolo descrito por Sambrook y col., (1989), para la preparación de células electrocompetentes de *E. coli*.

Se inoculó 200 ml de medio LB con 1 ml de un cultivo que se creció toda la noche. Se creció el cultivo agitando fuertemente hasta obtener una densidad óptica de 0,5 a 0,7 U.A. a 600 nm. Luego, se colocó 100ml de cultivo en dos matraces, y estos se dejaron en hielo durante 10 minutos. Se centrifugaron los cultivos a 4.300xg por 13 minutos. Se retiró el máximo de sobrenadante posible y se resuspendieron las células en 2 ml de glicerol 10% frío, y se agregó 98 ml de glicerol 10% frío a ambos recipientes. Se volvió a centrifugar al igual que anteriormente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió las células en 1 ml de glicerol 10% frío, para luego agregar a cada recipiente 9 ml de glicerol 10% frío. Se volvió a sedimentar las células como anteriormente y se botó el sobrenadante, resuspendiendo las células en el sobrenadante que permaneció en los recipientes. Se alicuotaron 40 µl de las células en tubos de 1,5 ml fríos y se guardaron las células a -80°C.

3.2.4.2. Electroporación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*.

Se descongelaron las células en hielo y se agregó cerca de 200 ng de ADN a tubos con 40 µl de células electrocompetentes. Se colocó la mezcla en la cubeta y se dejó la cubeta en

hielo junto con la cámara del electroporador durante 10 minutos. Se ajustó el electroporador a los siguientes parámetros: 1.800 V, 200 Ohm y 25 μ F.

Antes de electroporar se secó la cubeta y la cámara. Se colocó la cámara y luego se insertó la cubeta, dando el pulso de corriente. Inmediatamente después se agregó a la cubeta 400 μ l de medio LB fresco a temperatura ambiente, para posteriormente transferir esa mezcla a un tubo, el cual se dejó en agitación durante 90 minutos a 28°C. Se centrifugaron las células a 16.000xg durante 30 segundos para luego plaquear las células en placas con los antibióticos adecuados, las cuales se dejaron a 28°C por dos días, al cabo de los cuales se debieran ver las colonias de *A. tumefaciens*.

3.2.4.3. Protocolo de Minipreparación de ADN plasmidial de *Agrobacterium tumefaciens*.

Se dejaron creciendo las bacterias por 16 horas en 5 ml de medio LB, para luego centrifugar 1.5 ml durante 30 segundos a 16.000xg. Se eliminó el sobrenadante y luego se repitió este paso dos veces. Luego, se agregó 100 μ l de la solución I (Glucosa 50 mM; EDTA 10 mM; Tris-HCl pH 8,0, 25 mM) y se agitó utilizando vortex hasta resuspender completamente el precipitado, dejando el tubo a temperatura ambiente por 5 minutos.

Se agregó 20 μ l de lisozima a una concentración de 20 mg/ml, se agitó y se incubó durante 15 minutos. A este mismo tubo se agregó 200 μ l de la solución II (0,2 N NaOH, SDS 1%), recién preparada, y se agitó manualmente 4 veces, hacia arriba y hacia abajo. Se dejó en hielo durante 5 minutos. Finalmente, se agregó 150 μ l de la solución III (a 28,5 ml de agua destilada, seguido de 60 ml de acetato de potasio 5 M y luego 11,5 ml de ácido acético glacial) y se agitó con fuerza 8 veces. Se dejó en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó el tubo a 16.000xg durante 5 minutos y luego se recuperó el sobrenadante, tomando cuidado con no tomar parte del precipitado, de color blanquecino, que se mantienen en solución.

Se agregó al sobrenadante obtenido en el paso anterior 400 μ l de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en una proporción de 25:24:1. Se agitó utilizando vortex fuertemente, se centrifugó durante 5 minutos y luego se recuperó la porción acuosa superior. A la porción acuosa se agregó cloroformo y se volvió a centrifugar por 5 minutos, recuperándose la porción acuosa. A esta porción se agregó 500 μ l de isopropanol 96%. Se agitó el tubo con la mano 4 veces, suavemente y se dejó incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 10 minutos, para luego eliminar el sobrenadante con cuidado para no mover el ADN. Se dejó el tubo secando durante 5 minutos a 37°C y

luego se agregó agua destilada con RNAasa. Se resuspendió el ADN con cuidado y se guardó a -20°C .

3.2.5. Mapas de los vectores obtenidos en esta tesis.

Como resultado de las reacciones con el vector pGEMT se obtuvieron los siguientes vectores:

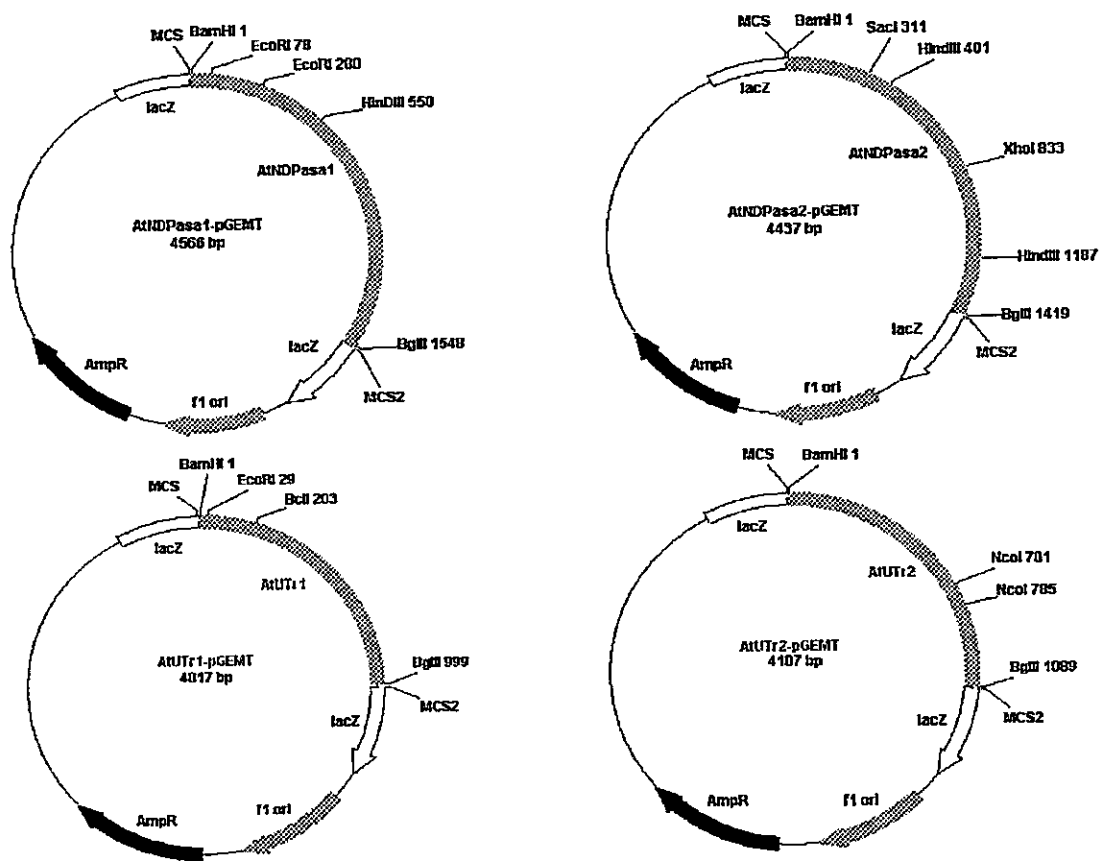


Figura 6: Mapas de restricción de los plasmidios derivados del vector pGEMT en los cuales se encuentran clonados, respectivamente, los genes de AtNDPasa1, AtNDPasa2, AtUTr1 y AtUTr2.

A partir de los genes de interés escindidos del pGEMT y clonados en el vector psmGFP posteriormente se obtuvieron los siguientes vectores:

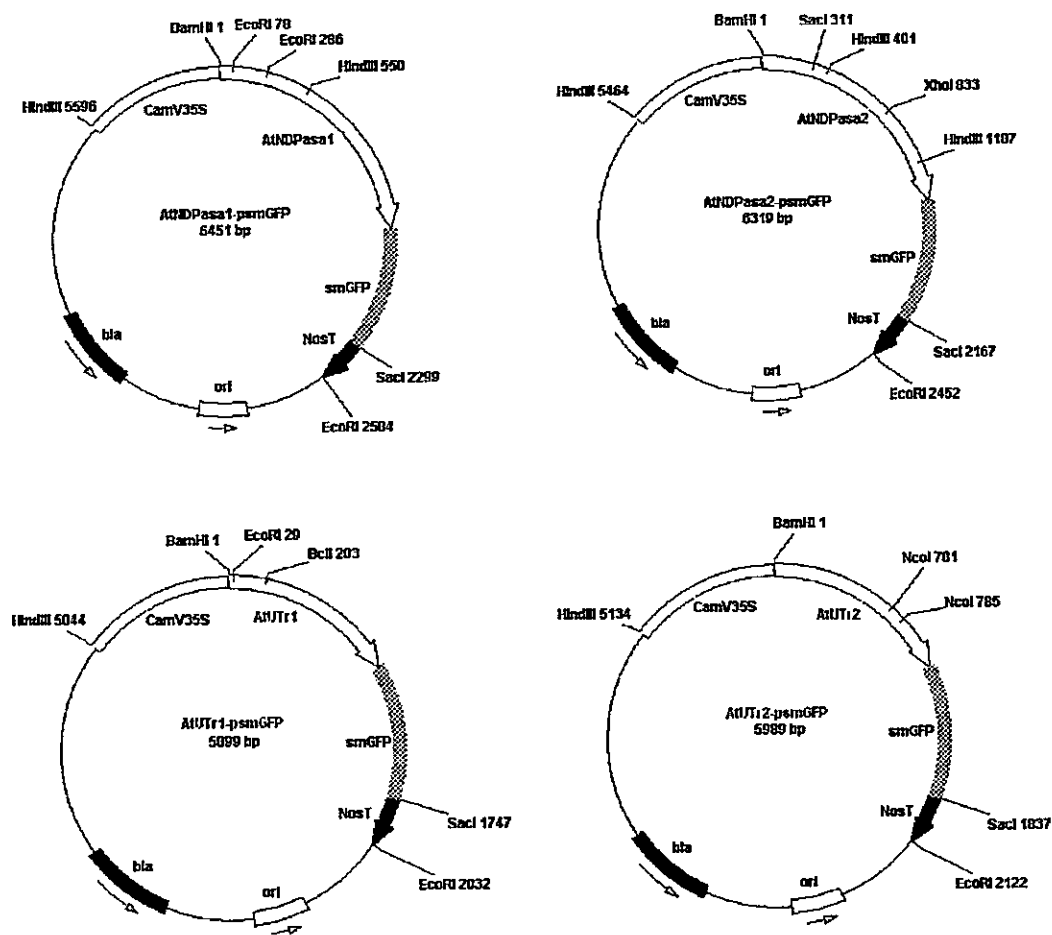


Figura 7: Mapas de restricción de los plasmidios derivados del vector psmGFP en los cuales se encuentran clonados, respectivamente, los genes de AtNDPasa1, AtNDPasa2, AtUTr1 y AtUTr2.

Luego, para los casos de la AtNDPasa1 y para AtUTr1 se clonaron los genes de interés fusionados a la smGFP en el sitio BamHI-SacI del vector pEL103. En el caso de la AtNDPasa2 fue necesario realizar el corte BamHI-EcoRI, liberando de esa forma el fragmento que comprende la AtNDPasa2, la smGFP y el terminador de la transcripción NosT. Ello debido a que el gen de la AtNDPasa2 posee en su secuencia el sitio de restricción para SacI, lo que impide seguir la estrategia utilizada en los otros dos casos. Los siguientes son los mapas de los vectores binarios (incluyendo el pEL103):

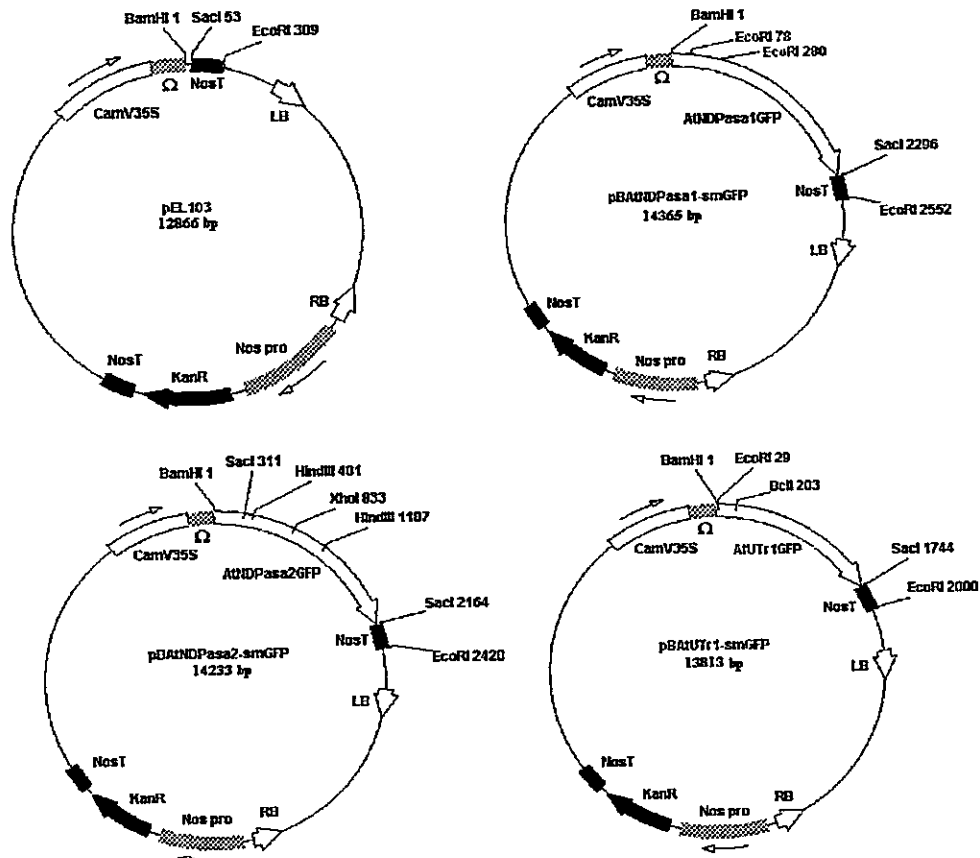


Figura 8: Mapas de restricción del plasmidio pEL103 y de los plasmidios derivados de este vector en los cuales se encuentran clonados, respectivamente, las construcciones de AtNDPasa1-psmGFP, AtNDPasa2-psmGFP y AtUTr1-psmGFP.

3.2.6. Transformación estable de *Arabidopsis thaliana*.

3.2.6.1. Inmersión Floral.

Este protocolo está basado en el protocolo descrito por Clough y Bent (1998). Se utilizaron plantas de aproximadamente 4-5 semanas. Cuando las primeras inflorescencias adquirieron un tamaño de más de 3 cm, se cortaron cerca de la base. De esa forma, en cuatro-cinco días se tenían plantas con a lo menos dos inflorescencias. Un día antes de transformar, se dejó creciendo el preinóculo de *Agrobacterium tumefaciens* en 3 ml de medio LB con antibiótico. En este caso como se trata de la cepa GV3101 se debe crecer el *Agrobacterium* en una concentración final de 25 mg/l de gentamicina. Además, se agregó kanamicina a una concentración final de 50 mg/l debido a que los vectores binarios que fueron utilizados para transformar *Agrobacterium* poseen en su secuencia un gen que le proporciona resistencia a kanamicina.

Se tomó 1 ml del cultivo y se dejó creciendo en 500 ml de LB con 25 mg/l de gentamicina y 50 mg/l de kanamicina. En aproximadamente 12 horas se obtiene una densidad óptica (O.D.), a 600 nm, de 0,8 U.A. Una vez alcanzada esa densidad óptica, se sedimentaron las células a 3.100xg por 20 minutos. Mientras ocurre la centrifugación, se debe empezar a preparar la solución de transformación, la cual consistió en Silwet L-77 a una concentración final de 0,05% y de sacarosa 5%. Para el volumen de 500 ml de bacterias se preparan 250 ml de esta solución.

Al finalizar la centrifugación se resuspendió las células en la solución de transformación. Se colocaron los 250 ml en un vaso de capacidad de 250 ml y se dejó en agitación suave. Se tomó el macetero en donde se encuentra la planta y se sumergió la planta (toda la parte aérea) en el vaso por a lo menos 10 segundos. Se retiró la planta y se dejó de lado en una bandeja con un poco de agua. Este procedimiento se repitió para seis plantas. Una vez guardadas todas las plantas se colocó una cubierta de plástico sobre la bandeja para mantener un ambiente húmedo. Se guardó la bandeja en oscuridad durante 16 horas. Finalmente, se enderezaron las plantas y se dejó en un fotoperíodo normal (16 horas de luz – 8 horas de oscuridad). Este proceso de transformación se volvió a repetir una semana después, para aumentar la eficiencia de la transformación.

Se siguió regando las plantas normalmente por dos a tres semanas y luego se dejó secar en un régimen de luz continua. Se recolectaron las semillas secas. Para seleccionar las transformantes se sembraron las semillas en placas de MS 0,5X / 0,8% agar con el antibiótico adecuado (50 µg/ml de kanamicina ó 75 µg/ml de higromicina B según el caso). Se dejaron dos días a 4°C y luego se crecieron en un fotoperíodo normal (16 horas de luz – 8 horas de oscuridad) por 7-10 días, período luego del cual se puede apreciar la diferencia entre las plantas resistentes y las silvestres.

3.2.6.2. Protocolo de esterilización de semillas de *Arabidopsis thaliana*.

Se agregaron cerca de 500 semillas en tubos de 1,5 ml, se lavaron las semillas, con agitación (110 rpm) por 10 minutos con 800 µl de etanol 70%. Luego, se dejó sedimentar las semillas y se retiró el sobrenadante. Se agregó 800 µl de una solución de SDS 1% e hipoclorito de sodio 10% y se dejó agitando a 110 rpm por 30 minutos. Al cabo de ese tiempo se dejó precipitar las semillas y se lavaron tres veces con 800 µl de agua destilada estéril. Finalmente, se precipitaron las semillas y se resuspendieron en 200 µl de agua. Las semillas

así tratadas pueden ser utilizadas para ser sembradas en las placas de MS 0,5X / 0,8% agar con el antibiótico adecuado.

3.2.7. Microscopía de Fluorescencia

Un gran rango de muestras absorben radiación lumínica, se excitan y luego re-irradian o emiten luz. La emisión que cesa casi instantáneamente después de la excitación es llamada fluorescencia.

Los siguientes factores hacen de la fluorescencia una importante herramienta en la biología molecular y celular.

- Especificidad – Los fluoróforos ó moléculas fluorescentes tienen longitudes de onda de absorción y de emisión específicas.
- Sensibilidad – Bajo óptimas condiciones, hasta un fluoróforo puede ser detectado.
- Sensibilidad Espectral – Las longitudes de onda de excitación ó de emisión de ciertos fluoróforos pueden reflejar cambios físicos, químicos y fisiológicos.

3.2.7.1. Observación de la fluorescencia de la GFP *in vivo* utilizando lupa de disección.

La expresión de la GFP fue observada utilizando una lupa de disección Leica MZ-12 equipada con un módulo fluorescente consistente de una lámpara de mercurio de 100 W y filtros de excitación y emisión GFP Plus (Leica, Heerbrugg, Suiza). Este sistema (filtro de excitación 480/40 nm; espejo dicróico 505 nm LP; filtro de emisión 510 nm LP) permite la visualización de la GFP luego de la excitación con luz azul.

3.2.7.2. Observación de la fluorescencia de la GFP *in vivo* utilizando microscopía de epifluorescencia.

Los microscopios de fluorescencia más corrientemente utilizados llevan a cabo la iluminación de la muestra de una forma incidente (epiiluminación) y han incorporado el uso de un espejo dicróico para permitir la separación de la luz fluorescente emitida de la luz de excitación reflejada.

Entre las ventajas de los microscopios de epifluorescencia se pueden destacar:

- La radiación de excitación viaja en un camino opuesto al de la fluorescencia observada. Ello minimiza los efectos de la absorción de la luz debido al grosor de la muestra.

- La apertura total del objetivo permite una mejor excitación y recolección de la fluorescencia emitida proporcionando un máximo de brillo.

En esta tesis se utilizó un microscopio invertido de fluorescencia OLYMPUS IX70, en el cual se excitó la GFP utilizando una longitud de onda de excitación de 480 nm, y las señales de emisión siendo obtenidas en su máximo en 535 nm.

3.2.7.3. Observación de la fluorescencia de la GFP *in vivo* utilizando microscopia confocal.

Los microscopios confocales difieren de los convencionales (de campo claro) debido a que ellos no captan objetos fuera de foco. En un microscopio confocal, la mayoría de la luz que se encuentra fuera de foco es excluida de la imagen final, incrementando notablemente el contraste y, por lo tanto, la visibilidad de pequeños detalles en la muestra.

La capacidad del microscopio confocal de captar la información de un plano focal le permite al investigador realizar cortes ópticos de la muestra. Por lo tanto, tal como se observa en la Figura 9, al mover el plano focal paso a paso a lo largo del espécimen, una serie de secciones ópticas pueden ser obtenidas.

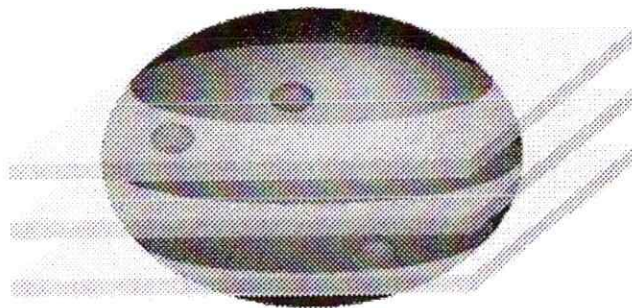


Figura 9: Cortes ópticos realizados por microscopia confocal. Una esfera es seccionada a distintas profundidades utilizando el microscopio confocal, lo que permite no solamente obtener imágenes con una alta resolución sino que construir un esquema tridimensional del objeto.

La observación de la GFP fue llevada a cabo en un microscopio confocal Carl Zeiss. Series de cortes ópticos de 0,5 μm a 2 μm fueron obtenidas utilizando una longitud de onda de excitación de 488 nm, y las señales de emisión siendo obtenidas en su máximo en 515 nm. Las imágenes fueron tratadas utilizando el programa Adobe Photoshop.

3.2.8. Transformación transiente de *Allium cepa*.

Este protocolo de biobalística para observar expresión transiente en epidermis de *Allium cepa* está basado en el protocolo de Scott y cols. (1999).

3.2.8.1. Placas y tejido a ser utilizado.

Se prepararon placas de agar de medio Murashige y Skoog (MS) 1X más sacarosa 30 g/l y agar 1,5%, pH 5,7. Sobre estas se colocaron catáfilos de cebollas (lo más frescas posible) de a lo menos 2X2 cm con la parte externa de la catáfilo en contacto con la placa. Se deben utilizar las placas de esa forma preparadas a lo más una hora después de haber colocado el catáfilo.

3.2.8.2. Preparación de las partículas.

Se pesaron 60mg de partículas de tungsteno. Se agregó etanol 70% y se agitó utilizando vortex fuertemente durante 10 minutos para luego incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se precipitan las partículas centrifugando por 5 segundos a 16.000xg. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 1ml de agua. Se agitó utilizando vortex durante 1 minuto y luego se volvió a sedimentar las partículas centrifugando durante 3 segundos a 16.000xg. Se removió el líquido del sobrenadante y se volvió a repetir el lavado con agua dos veces más. Finalmente se agregó 1ml de glicerol 50% para dejar las partículas a una concentración final de 60 mg/ml. Estas partículas deben ser guardadas a -20°C.

3.2.8.3. Preparación del ADN a ser disparado.

Se agitó utilizando vortex por 5 minutos las partículas de tungsteno a una concentración de 60 mg/ml. Se agregó 50 µl a un tubo de 1,5 ml. Se colocó el tubo de lado y en su pared se agregó 10 µl de ADN a una concentración mínima de 1 µg/µl. Se agregó 50 µl de CaCl₂ 2,5 M e inmediatamente se agitó utilizando vortex fuertemente durante 3 minutos. Se agregaron 20 µl de espermidina a una concentración 0,1 M y se volvió a agitar utilizando vortex durante 10 minutos. Se dejó reposar el tubo durante 5 minutos. Se removió y se eliminó el líquido para luego agregar 140 µl de etanol 70%. Se removió y se eliminó el líquido para luego agregar 140 µl de etanol 100%. Se repitió este lavado con etanol 100%. Una vez que se retiró el sobrenadante del último lavado se agregó 20 µl de etanol 100%. Se resuspendió suavemente todo el precipitado y se utilizaron 6 µl para cada disparo.

3.2.8.4. Bombardeo

Se colocó el ADN en los discos portadores y se dejó secar por 5 minutos. Un esquema de un equipo similar al utilizado se ilustra en la Figura 10. Se realizó el bombardeo a una presión de 1100 psi (aproximadamente 75 bares) y a un vacío de 20 pulgadas de mercurio. Se dejaron las placas a 22-24°C, en luz continua. Se observaron los resultados 18 a 22 horas después del disparo en un microscopio confocal.

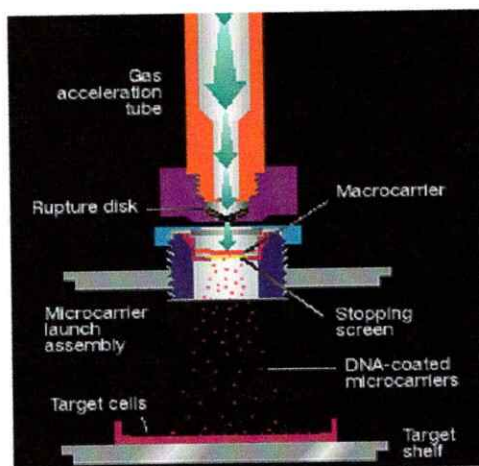


Figura 10: Esquema del proceso utilizado por la biobalística para transformar distintos tejidos blanco. El ADN unido a los proyectiles de tungsteno se coloca en un disco portador denominado aquí como “macrocarrier”. Los discos de ruptura (rupture disc) mantienen confinado un gas inerte a una alta presión dentro del tubo de aceleración (gas acceleration tube). Este gas es liberado rápidamente al disparar una aguja que rompe los discos de ruptura, chocando con la parte posterior del disco portador, expulsando con una gran fuerza a las partículas de tungsteno sobre el blanco (target cells). La pantalla de retención (stopping screen) es la responsable de evitar el paso de pedazos de materiales allende los microproyectiles que llevan al ADN unido.

4. Resultados

4.1. Clonamiento de los genes de Transportadores de Nucleótidos Azúcar y Nucleósido Difosfatasa en marco con la GFP.

Utilizando partidores específicos se amplificaron mediante PCR los marcos de lectura abierto de los genes que codifican para transportadores de nucleótidos azúcar y NDPasas. De esta forma se obtuvieron fragmentos de ADN de aproximadamente 1,55 kb para la AtNDPasa1, de 1,45 kb para la AtNDPasa2 y de aproximadamente 1 kb para AtUTr1 y AtUTr2, siendo AtUTr2 de un peso molecular ligeramente mayor que AtUTr1. Estos resultados coinciden con los tamaños moleculares esperados para los marcos de lectura abierto que son de 1.548 pb para la AtNDPasa1, de 1.425 pb para la AtNDPasa2, de 999 pb para AtUTr1 y de 1.089 pb para AtUTr2. Los fragmentos amplificados se ligaron al vector pGEMT y posteriormente se transformó *E. coli*. Los plasmidios aislados se digirieron con las enzimas BamHI y BglII, y se obtuvieron fragmentos de los tamaños esperados (Figura 11).

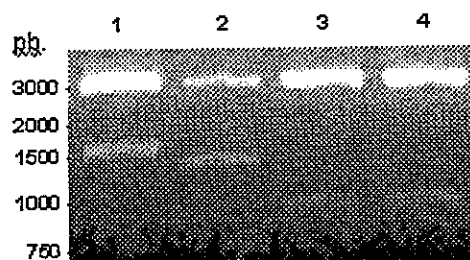


Figura 11: Liberación de los fragmentos de la AtNDPasa1 (carril 1), AtNDPasa2 (carril 2), AtUTr1 (carril 3) y AtUTr2 (carril 4) de los vectores recombinantes derivados del plasmidio pGEMT correspondientes. Los vectores fueron sometidos a un corte con las enzimas de restricción BamHI y BglII, resultando en la escisión de fragmentos cuyos tamaños se correlacionan con los tamaños esperados. Los resultados se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

Posteriormente los fragmentos clonados en pGEMT fueron clonados en el vector psmGFP como se describe en Métodos. Una vez obtenidos los vectores recombinantes se procedió a realizar un análisis de restricción para confirmar y determinar la orientación del inserto en cada caso (Figura 12). Estos cortes fueron los siguientes:

- AtNDPasa1-psmGFP - Al cortar con la enzima EcoRI, se obtienen fragmentos de aproximadamente 0,2 kb, de 2,3 kb y de 4,0 kb.
- AtNDPasa2-psmGFP - Al cortar con la enzima SacI, se obtienen fragmentos de 1,9 kb y de 4,4 kb.

- c) AtUTr1-psmGFP - Al cortar con la enzima EcoRI, se obtienen fragmentos de 2,0 kb y de 4,0 kb.
- d) AtUTr2-psmGFP - Al cortar con la enzima NcoI, se obtienen fragmentos de 0,084 kb (fragmento que no se logra observar en el gel debido a su pequeño tamaño), de 0,5 kb, de 1,2 kb y de 4,3 kb. En este caso se obtienen más fragmentos de lo que se deduce según el mapa del vector AtUTr2-psmGFP debido a la presencia de dos sitios NcoI en el vector psmGFP que no se muestran en ese mapa. Los sitios se encuentran a 450 pb río arriba y a 1275 pb río abajo del sitio BamHI.

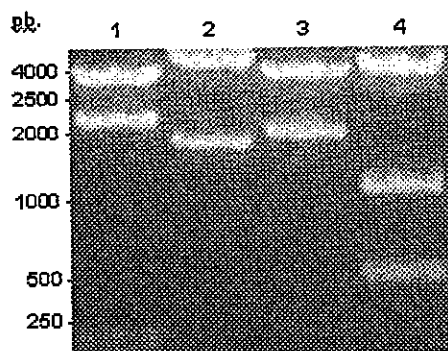


Figura 12: Mapa de restricción de los plasmidios aislados derivados del vector psmGFP. Carril 1 - AtNDPasa1-psmGFP digerido con EcoRI; Carril 2 - AtNDPasa2-psmGFP digerido con SacI; Carril 3 - AtUTr1-psmGFP digerido con EcoRI; Carril 4 - AtUTr2-psmGFP digerido con NcoI. Los cortes con las enzimas de restricción se realizaron según lo descrito en métodos y los fragmentos de ADN se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

Los tamaños de los fragmentos, en los otros tres casos, coinciden con los mapas de restricción que se observan en la Figura 7.

4.2. Incorporación de los genes fusionados a GFP en vectores binarios.

Los genes fusionados a GFP se clonaron en el vector binario pEL103, tal como se describe en la sección Métodos. Los plasmidios generados fueron analizados por cortes con enzimas de restricción, los que liberaron los fragmentos esperados (Figura 13). En todos los casos los fragmentos obtenidos corresponden a los tamaños esperados tal como se puede observar en los mapas que se encuentran en la Figura 8. Desafortunadamente no fue posible obtener el gen AtUTr2 clonado en el vector binario.

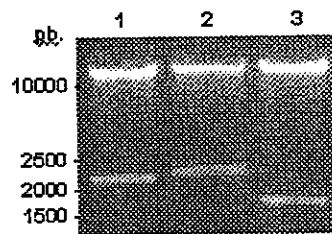


Figura 13: Análisis de los plasmidios aislados derivados del vector pEL103. Carril 1 – pBA_tNDPasa1-smGFP digerido con BamHI-SacI. Se obtienen fragmentos de aproximadamente 2,3 kb y de 12,0 kb; Carril 2 – pBA_tNDPasa2-smGFP digerido con BamHI-EcoRI. Se obtienen fragmentos de aproximadamente 2,4 kb y de 11,8 kb; Carril 3 – pBA_tUTr1-smGFP digerido con BamHI-SacI. Se obtienen fragmentos de aproximadamente 1,7 kb y de 12,0 kb. Los cortes con las enzimas de restricción se realizaron según lo descrito en métodos y los fragmentos de ADN se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

Los plasmidios binarios conteniendo los genes de interés fusionados a GFP junto con los vectores binarios pBIN m-gfp5-ER (GFP destinada al RE) y pVKH18En6-STmdGFP (GFP destinada al A. de Golgi) fueron incorporados en *A. tumefaciens*. En todos los casos se verificó si las células de *A. tumefaciens* habían sido transformadas correctamente, aislando el ADN plasmidial y reintroduciendolo en *E. coli* desde donde se purificó el ADN y se analizó utilizando enzimas de restricción. El resultado de esas digestiones puede ser observado en la Figura 14.

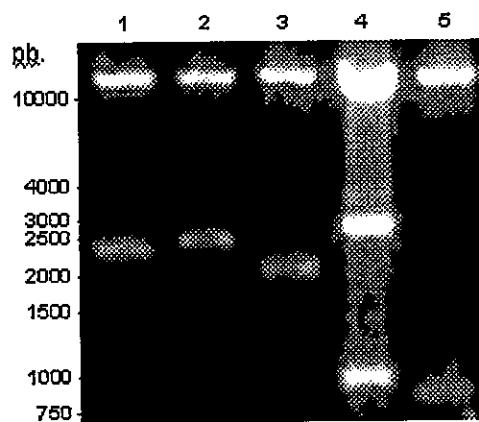


Figura 14: Resultado de los cortes con enzimas de restricción realizados para asegurar la presencia de los vectores binarios en las colonias de *A. tumefaciens*. Carril 1- pBA_tNDPasa1-smGFP digerido con BamHI-EcoRI, liberando fragmentos de 11,8 kb, de 2,3 kb, de 0,2 kb y de 0,1 kb (los dos últimos mencionados no se alcanzan a ver en el gel); Carril 2 – pBA_tNDPasa2-smGFP digerido con BamHI-EcoRI liberando fragmentos de 11,8 kb y de 2,4 kb; Carril 3 – pBA_tUTr1-smGFP digerido con BamHI-EcoRI liberando fragmentos de 11,8 kb y de 2,0 kb; Carril 4- pVKH18En6-STmdGFP digerido con BamHI-BglII liberando fragmentos de 2,8 kb y de 0,9 kb; Carril 5- pBIN m-gfp5-ER digerido con BamHI-SacI liberando fragmentos de 12,0 kb y de 0,8 kb.

4.3. Transformación génica de *Arabidopsis thaliana*.

Para introducir en *Arabidopsis thaliana* los genes de las proteínas quiméricas que contienen GFP, se utilizó la técnica recientemente desarrollada denominada Inmersión Floral (Clough y Bent, 1998). Esta consiste en sumergir las flores de *Arabidopsis* en una solución que contiene *Agrobacterium* transformado con el vector binario conteniendo el gen de interés. Luego, se recolectan las semillas provenientes de estas flores para, subsecuentemente, sembrarlas en medios con antibióticos que permiten seleccionar las plantas resistentes al marcador de selección. Este análisis nos permite identificar en una primera etapa las posibles plantas transgénicas. Las plantas transformadas con el vector pBIN m-gfp5-ER y con los vectores derivados del plasmidio pEL103, presentan resistencia a kanamicina mientras que las plantas transformadas con el vector pVKH18En6-STmdGFP presentan resistencia a higromicinaB. Como se puede observar en la Figura 15, en presencia de kanamicina las plantas sensibles presentan una coloración blanquecina y un tamaño mucho menor al de las plantas resistentes sembradas al mismo tiempo (Figura 15A). En el caso de las plantas expuestas al antibiótico higromicinaB, las plantas sensibles apenas alcanzan a germinar, al contrario de las resistentes que lo hacen normalmente (Figura 15B).

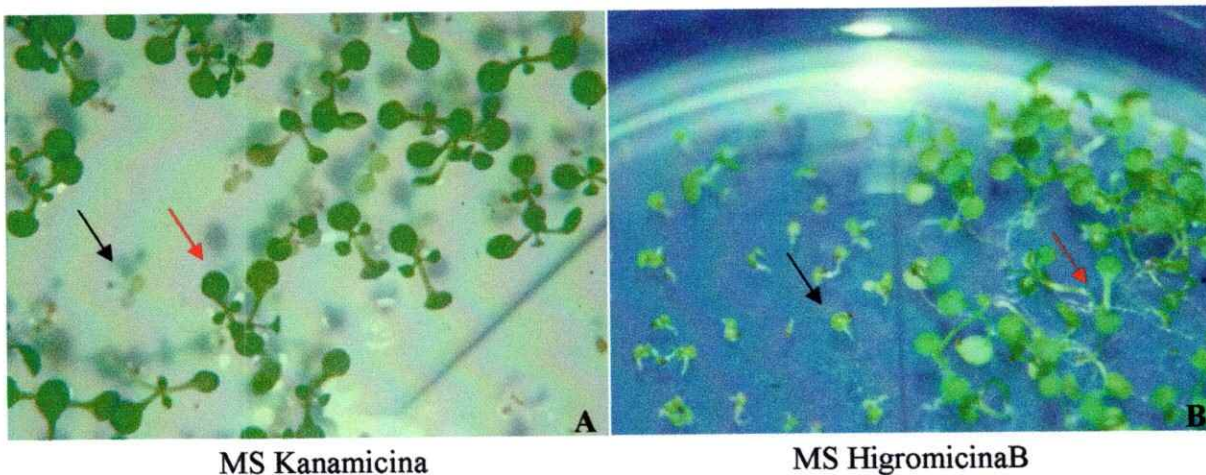


Figura 15: Selección de plantas transgénicas en placas de medio MS con antibióticos. **A** - Placa de MS kanamicina. Se puede observar la clara diferencia entre las plantas sensibles a kanamicina (indicadas por la flecha de color negro), de color blanquecino y de menor tamaño versus las plantas resistentes (indicadas por la flecha de color rojo). **B**- Placa de MS higromicinaB. Se puede observar la diferencia entre las plantas sensibles a higromicinaB (indicadas por la flecha de color negro) que apenas alcanzaron a germinar versus las plantas resistentes (indicadas por la flecha de color rojo). Todas las plantas fueron crecidas por una semana en un régimen de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

El análisis del número de plantas resistentes versus el número de plantas sensibles permitió determinar la eficiencia de transformación obtenida para cada caso. Esos datos se

resumen en la Tabla 1 y demuestran que la eficiencia obtenida es similar a la observada en la literatura, la cual oscila entre el 0,9% y el 4% para el método Inmersión Floral (Clough, y Bent, 1998).

<u>Planta transgénica</u>	<u>Plantas Resistentes</u>	<u>Plantas Sensibles</u>	<u>Eficiencia de transformación</u>
STtmdGFP	11	960	1,15%
AtUTr1-smGFP	62	1460	4,25%
AtNDPasa1-smGFP	9	355	2,54%
AtNDPasa2-smGFP	21	2314	0,90%

Tabla 1: Eficiencia de transformación de *Arabidopsis thaliana* obtenida mediante el método de Inmersión Floral para cada una de las plantas transgénicas. El valor promedio de eficiencia fue del 2,21%. Para el caso de la m-gfp5-ER estos cálculos no se pudieron llevar a cabo por falta de semillas para realizar el análisis.

4.4. Análisis de la fluorescencia en las plantas transgénicas.

Para determinar si las plantas seleccionadas utilizando los antibióticos expresaban las proteínas quiméricas conteniendo GFP, analizamos la fluorescencia de estas plantas utilizando una lupa y microscopía de fluorescencia.

4.4.1. Análisis usando lupa de disección.

Las plantas se colocaron bajo una lupa de disección equipada con un módulo fluorescente consistente de una lámpara de mercurio de 100 W y filtros de excitación y emisión GFP Plus. De esa forma se pudo observar, en las plantas transformadas con la construcción m-gfp5-ER, una fluorescencia de color verde brillante, típica de la GFP, en la raíz y tricomas (Figura 16). La autofluorescencia de la clorofila impidió discernir la fluorescencia de la GFP en tejidos con altos niveles de este pigmento debido a que la clorofila b presenta un pico de absorción a 453 nm, y por lo tanto es excitada en conjunto con la GFP, para luego emitir en el rango del rojo.

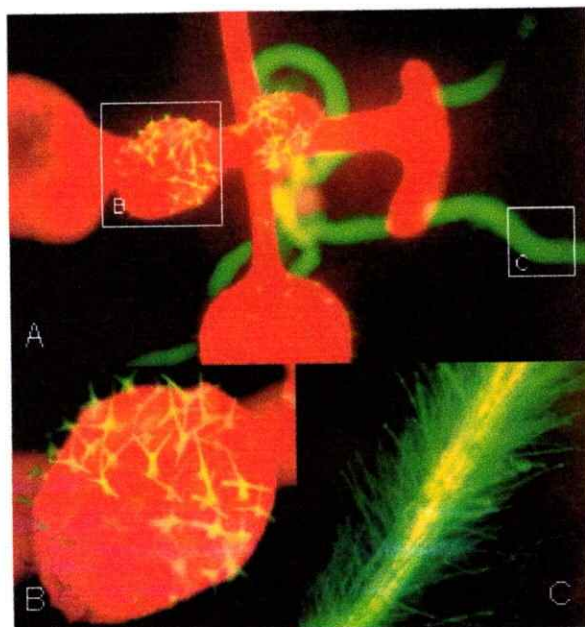


Figura 16: Observación de una planta de *Arabidopsis thaliana* transformada con la m-gfp5-ER bajo una lupa de disección acoplada a una lámpara que emitía luz azul. Tal como se puede notar, se observa un color verde brillante en distintas zonas de la planta, como en la raíz (C). En otras regiones, como en los tricomas (B), esta fluorescencia se ve de un color amarillo-verdoso debido a la combinación de la emisión verde típica de la GFP sumada a la emisión de color rojo proveniente de la autofluorescencia que presenta la clorofila al ser incidida por la luz UV. Esa autofluorescencia es tan alta en las hojas que en ese lugar de la planta prácticamente no se puede detectar la emisión verde de la GFP (A).

En el caso de las otras plantas transgénicas obtenidas, las transformadas con las construcciones pBA_tNDPasa1-smGFP, pBA_tNDPasa2-smGFP, pBA_tUTr1-smGFP y con pVKH18En6-STtmdGFP, no se logró observar ninguna fluorescencia utilizando esta lupa de disección.

4.4.2. Análisis de la fluorescencia en las plantas transgénicas utilizando microscopía de epifluorescencia.

Tomando en cuenta las diferencias de los niveles de expresión del transgen entre plantas debido al efecto posicional del sitio de integración del T-DNA (Gallie, 1998), se observó un mayor número de líneas de plantas transgénicas con el auxilio de un microscopio de epifluorescencia, con el fin de detectar la emisión de la GFP con una mayor sensibilidad y detalle (Tabla 2).

Plantas transgénicas	Positivas	Negativas	Total
STtmdGFP	2	6	8
AtUTr1-smGFP	3	20	23
AtNDPasa1-smGFP	0	9	9
AtNDPasa2-smGFP	0	13	13
m-gfp5-ER	5	0	5
No transformadas	0	6	6

Tabla 2: Número de líneas independientes observadas por cada tipo de planta transgénica en un microscopio de epifluorescencia. En la columna de plantas positivas se detalla el número de plantas que presentaron un patrón de fluorescencia reconocible. En la columna de plantas negativas se detalla el número de plantas que no presentaron un patrón de fluorescencia claro o fluorescencia alguna. Todas las plantas fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia.

Al utilizar un aumento de 4X, se pudo observar que las plantas transformadas con el vector pBIN m-gfp5-ER presentaban una clara fluorescencia a nivel de la raíz (Figura 17C), mientras que en el caso de las plantas silvestres no se logra discernir ninguna fluorescencia (Figura 17A). En el caso de las plantas transgénicas transformadas con la STtmdGFP, se observó una baja fluorescencia (Figura 17E), pero mayor que la de las plantas silvestres.



Figura 17: Raíces de plantas transgénicas observadas en un microscopio de epifluorescencia con un aumento de 4X. A- Imagen de epifluorescencia de una planta silvestre; C- Imagen de una planta transgénica transformada con la m-gfp5-ER; E- Imagen de una planta transgénica transformada con la STtmdGFP; G- Imagen de una

planta transgénica transformada con la AtNDPasa1-smGFP; I- Imagen de una planta transgénica transformada con la AtNDPasa2-smGFP; K- Imagen de una planta transgénica transformada con la AtUTr1-smGFP. B, D, F, H, J y L- Imágenes de campo claro de A, C, E, G, I y K, respectivamente. Barras- 100µm.

En el caso de la AtNDPasa1-smGFP, AtNDPasa2-smGFP y con AtUTr1-smGFP no se pudo observar un nivel de fluorescencia comparable al de plantas expresando la m-gfp5-ER, sino que la fluorescencia fue similar al de una planta silvestre (Figura 17 G, I y K respectivamente).

Al observar, con un aumento de 20X, las raíces de las plantas transformadas con las AtNDPasas fusionadas a la GFP se logró detectar una diferencia entre los niveles de fluorescencia en comparación con las plantas silvestres. Se observaron acumulos en el interior de las células, los cuales no presentaban una forma definida (Figura 18, G e I).

En el caso de AtUTr1-smGFP, se observaron en algunas plantas agregados de fluorescencia que eran más evidentes en los pelos radiculares. Esos cuerpos fluorescentes se correlacionaban con estructuras visibles en la imagen de campo claro correspondiente (Figura 18, K y L), los cuales pueden ser vistos más claramente en la Figura 19 C y D. Agregados similares pueden ser observados en otra planta, con una mayor intensidad de emisión, en la Figura 19E.

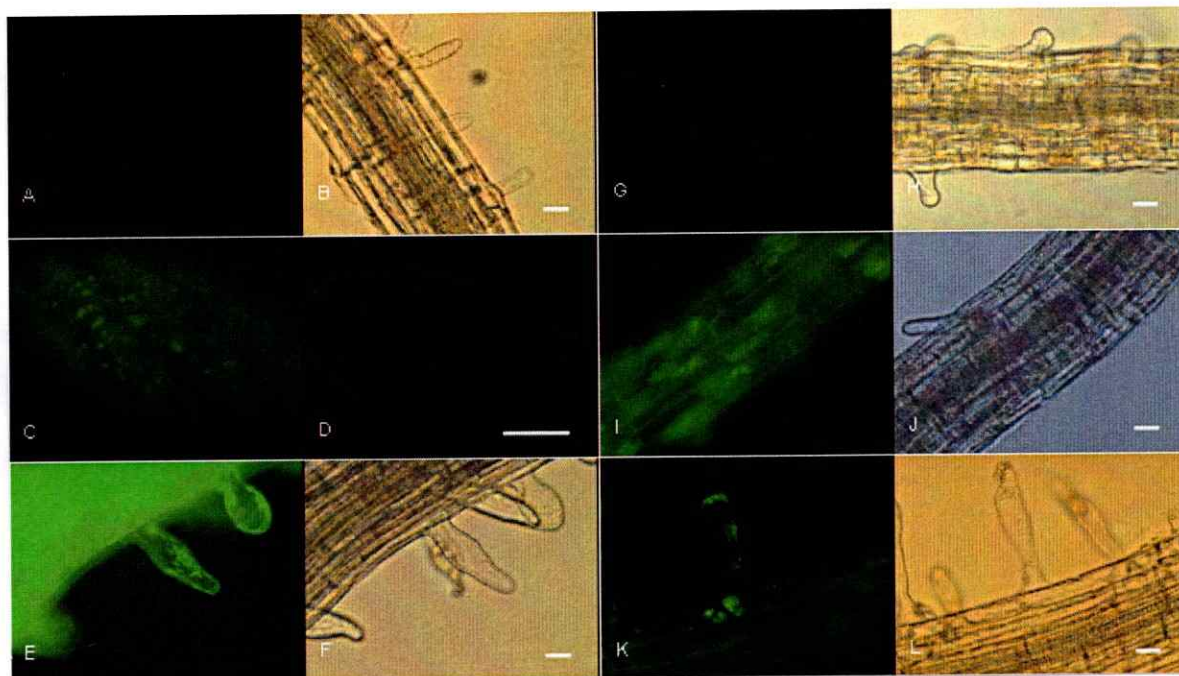


Figura 18: Imágenes de plantas transgénicas observadas bajo microscopía de epifluorescencia. A- Plantas silvestres; C- Plantas transgénicas transformadas con la STtmdGFP; E- Plantas transgénicas transformadas con la m-gfp5-ER; G- Plantas transgénicas transformadas con la AtNDPasa1smGFP; I- Plantas transgénicas transformadas con la AtNDPasa2smGFP; K- Plantas transgénicas transformadas con AtUTr1smGFP. B, D, F, H,

J y L- Imágenes de campo claro de A, C, E, G, I, y K respectivamente. Aumento de 20X y barras- 20 μm , excepto en C y D, en las cuales el aumento es de 100X y la barra de 10 μm .

En el caso de las plantas transformadas con la STtmdGFP, de destinación al aparato de Golgi, se logró detectar en algunas de las líneas transgénicas la presencia de puntos de un tamaño de aproximadamente 1 μm (Figura 18C). Estos puntos se lograron detectar principalmente en los pelos radiculares y presentaban una alta movilidad. El nivel de fluorescencia fue bastante bajo, lo que dificultó la toma de las imágenes.

Las plantas transformadas con la m-gfp5-ER presentaron una fuerte fluorescencia en toda su extensión. En los pelos radiculares se presentaron de manera nítida corpúsculos fusiformes altamente fluorescentes ya descritos en la literatura por Hawes y col. (2001). Con el aumento de 20X no se logró observar un patrón reticulado en esas células (Figura 18E y Figura 19A).

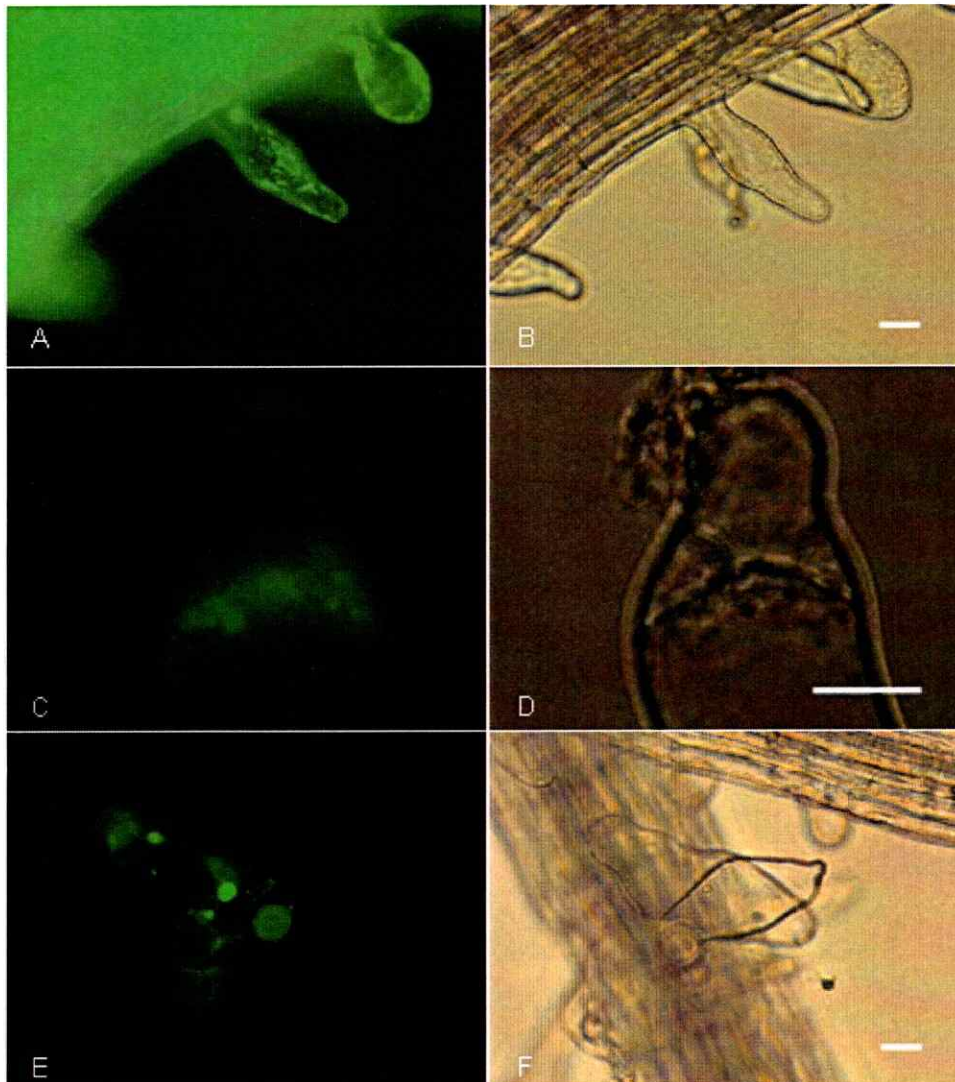


Figura 19: Imágenes de plantas transgénicas transformadas con m-gfp5-ER y con AtUTr1-smGFP observadas bajo microscopía de epifluorescencia. A- Pelo radicular de una planta transformada con la m-gfp5-ER observado con un aumento de 20X C- Pelo radicular de una planta transformada con AtUTr1-smGFP observado con un aumento de 100X, en el cual se puede notar la presencia de los corpúsculos fluorescentes, los cuales se correlacionan con estructuras membranosas que se pueden observar en la correspondiente imagen de campo claro en D. E- Pelo radicular de una planta transformada con AtUTr1-smGFP observado con un aumento de 20X, en el cual se puede notar claramente la presencia de los corpúsculos de gran tamaño y en el cual se concentra la GFP. B, D y F- Imágenes de campo claro de A, C y E respectivamente. C y D- Aumento de 100X y barras de 10 μ m; A, B, E y F- Aumento de 20X y barra de 20 μ m.

4.5. Expresión transiente de las proteínas de fusión con la GFP.

En paralelo a la transformación de *Arabidopsis thaliana* se implementó la técnica de transformación transiente de catáfilos de cebolla por biobalística.

Producto de esta metodología se pudo observar, tanto en un microscopio de epifluorescencia como en un microscopio confocal, los distintos patrones de fluorescencia ya observados para la GFP como para los otros péptidos fusionados a esta proteína con una destinación específica dentro de la célula vegetal. La acumulación de GFP se pudo detectar claramente desde 16 horas hasta 48 horas después del disparo. Además, se logró observar fluorescencia en catáfilos transformados guardados a 4°C más de cinco días después de realizado el bombardeo, tal como se ha visto en la literatura (Scott y col., 1999). La eficiencia de transformación obtenida permitió observar, a lo menos, 5 células distintas transformadas por disparo.

4.5.1. Análisis del patrón de fluorescencia de la proteína fluorescente verde.

La observación de la fluorescencia de la smGFP en células de epidermis de cebolla arrojó el resultado ya descrito en la literatura (Davis y Vierstra, 1998), es decir, un patrón en el cual la fluorescencia está concentrada tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula (Figura 20 A y B), apareciendo también en las hebras transvacuolares, las cuales contienen citoplasma (Figura 20A).

4.5.2. Análisis del patrón de fluorescencia de Retículo Endoplasmático.

El patrón que se presentó en las células de epidermis de cebolla transformadas por biobalística con la construcción m-gfp5-ER cuando observado bajo microscopía de epifluorescencia es levemente distinto al obtenido con microscopía confocal, ya que en este último caso la fluorescencia obtenida es bastante más profusa que en el caso de la fluorescencia del retículo observada en el microscopio de epifluorescencia, en la cual se nota

claramente el patrón reticulado (Figuras 21A- microscopía de epifluorescencia y 21C- microscopía confocal). Los cortes ópticos realizados con el microscopio confocal permiten contemplar la distribución cortical de la fluorescencia, la cual se asemeja a lo observado por A. Scott al utilizar esta misma construcción para transformar células de epidermis de cebollas (Scott y col., 1999) y es consistente con la localización subcelular de este organelo en células vegetales.

4.5.3. Análisis del patrón de fluorescencia de Plastidios.

Otro de los patrones a ser investigado es el de los plastidios, organelos de las células vegetales que llevan a cabo reacciones metabólicas y de biosíntesis, incluyendo la fijación de carbono y la síntesis de ácidos grasos, carotenos, purinas y pirimidinas. Algunas de las proteínas de este organelo son codificadas en el núcleo, luego son sintetizadas en el citosol como precursores. Estas proteínas poseen péptidos de tránsito que los destinan hacia y a través de la doble membrana de los plastidios (Köhler y col., 1997). Para poder visualizar el patrón subcelular de estos organelos en plantas se utilizó la construcción en la cual el gen de la GFP está fusionado en su amino terminal al péptido de tránsito del gen RecA de cloroplastos de *Arabidopsis* (Akashi y col., 1998).

Producto de la transformación de plastidios utilizando la construcción RecAGFP se obtuvo un patrón punteado, en el cual cada uno de los puntos poseía un diámetro que variaba entre 1.7 μm a 3 μm . El número de organelos era mayor en la imagen de epifluorescencia (Figura 22A) que en la del microscopio confocal (Figura 22D), quizás debido a que en el primer caso la imagen capta organelos a lo largo de toda la célula mientras que en el segundo se observan los organelos que se encuentran a esa altura del eje Z.

4.5.4. Análisis del patrón de fluorescencia de Golgi.

Para determinar el patrón de localización subcelular de Golgi, se utilizó el vector pVKH18En6-STtmdGFP. En las células de cebolla transformadas se pudo observar un patrón punteado que se presenta a lo largo de toda la célula (Figura 23), el cual difiere del observado en células animales, que es más bien perinuclear. Otra notable diferencia respecto de las células animales es el gran número de aparatos de Golgi que se encuentran en una célula vegetal.

Cada punto que se observa en las imágenes corresponde a uno de estos organelos. Estos puntos presentan un tamaño que varía de los 0.8 μm hasta los 1.4 μm , lo que se

correlaciona con datos vistos en la literatura (Boevink y col., 1998), avalando los resultados obtenidos en este experimento.

Utilizando el microscopio confocal para obtener imágenes en un lapsus de tiempo de cerca de dos minutos se pudo observar el movimiento de esos puntos el cual es, en ciertos sectores de la célula, notorio (figura 24).

Tal como se puede observar en la Figura 23, la cantidad de organelos que representan al aparato de Golgi es mucho mayor que los que se observan en el caso de los plastidios, y el tamaño es claramente menor. Esas dos diferencias hacen posible discriminar puntos que representen los plastidios de aquellos que representen el aparato de Golgi en una célula de cebolla transformada con una proteína quimérica con GFP cuya destinación subcelular es desconocida.

4.5.5. Análisis del patrón de fluorescencia de las proteínas quiméricas de las Nucleósido Difosfatasa y Transportadores de Nucleótidos Azúcar con la GFP.

En el caso de AtUTr1-smGFP, el patrón obtenido fue de tipo reticulado, tal como se puede observar en la Figura 25. Sin embargo, este patrón no fue idéntico al obtenido al analizar la expresión de la proteína generada por m-gfp5-ER en células de cebolla (Figura 21). En este caso como en los otros dos, también se observó una distribución cortical de la fluorescencia. Además de ese patrón, se observó una fuerte fluorescencia en cuerpos membranosos de gran tamaño que no se observaron en ningún otro tipo de experimento realizado anteriormente. Esos cuerpos se observaron solamente en aquellas células que presentaban fluorescencia y, asimismo, se correlacionaban perfectamente con estructuras que se observaron en la microscopía de luz (Figura 25 E y F).

En el caso de AtUTr2-psmGFP, se observó un patrón de fluorescencia en el cual se vislumbraron puntos de un tamaño muy similar a los observados en el caso del aparato de Golgi, es decir, con un tamaño cercano al micrómetro (Figura 26). La distribución de esos puntos también se asemejó mucho al de los puntos que representaban los dictiosomas ya que se encontraban a lo largo de toda la célula. A parte de esos puntos se logró observar aglomeraciones fluorescentes en ciertas zonas de la célula. Otro punto a destacar fue el hecho de que en ciertas células transformadas con AtUTr2-psmGFP, por debajo del patrón punteado se pudo distinguir un patrón reticulado, de intensidad mucho más débil que la de los puntos, lo que se ha observado en diversos estudios en los cuales proteínas que residen en el lumen

del aparato de Golgi son fusionadas a la GFP y utilizadas para transformar plantas (Boevink y col., 1998; Nebenfür y col., 1999).

Al aumentar el contraste de la Figura 26C, se logró observar que la gran mayoría de los puntos colocalizaban con el RE (Figura 27). Ello se correlaciona con el comportamiento del aparato de Golgi vegetal observado por Brandizzi y col (2002).

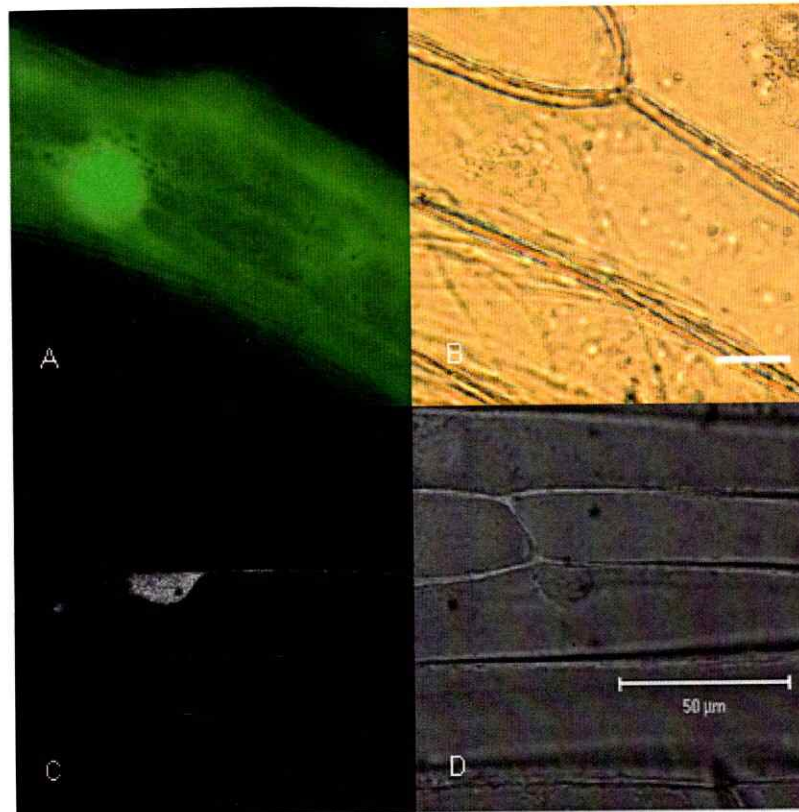


Figura 20: Patrón de fluorescencia de la GFP soluble en células epidermis de cebolla transformadas con la smGFP. A- Imagen observada por microscopía de epifluorescencia; C- Imagen observada por microscopía confocal. En ambas imágenes se observa una clara localización en el núcleo y en el citoplasma. En el panel se puede A observar, además, las hebras transvacuolares. No se observa la presencia de otro tipo de organelo en el interior de la célula vegetal. B y D- Imágenes de campo claro de A y C, respectivamente. Aumento de A y B- 30X, barra de 20μm. Aumento de C y D- 40X, barra de 50μm. Los cortes ópticos en el microscopio confocal fueron realizados a cada 2μm.

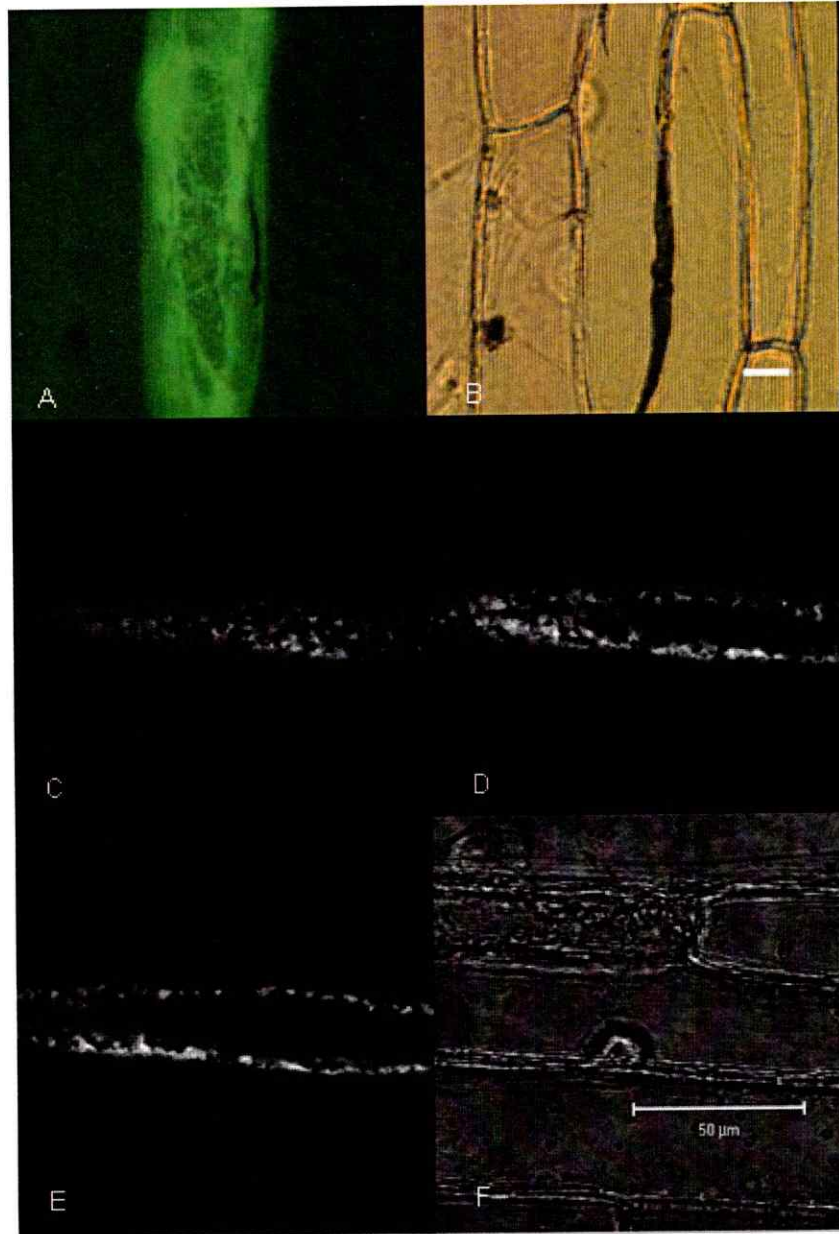


Figura 21: Patrón de fluorescencia del retículo endoplasmático en células de cebolla transformadas con la m-gfp5-ER. A- Imagen observada por microscopía de epifluorescencia; C, D y E- Imágenes observadas por microscopía confocal. En A se puede observar un claro patrón reticulado, el cual no se logra apreciar muy bien en las imágenes de microscopía confocal. Los sucesivos cortes ópticos realizados con el microscopio confocal (C, D y E) permiten observar una característica típica del retículo en plantas, su distribución cortical. B y F- Imágenes de campo claro de A y C, respectivamente. Aumento de A y B- 20X, barra de 20 μ m. Aumento de C, D, E y F- 40X, barra de 50 μ m. Los cortes fueron realizados a cada 1 μ m.

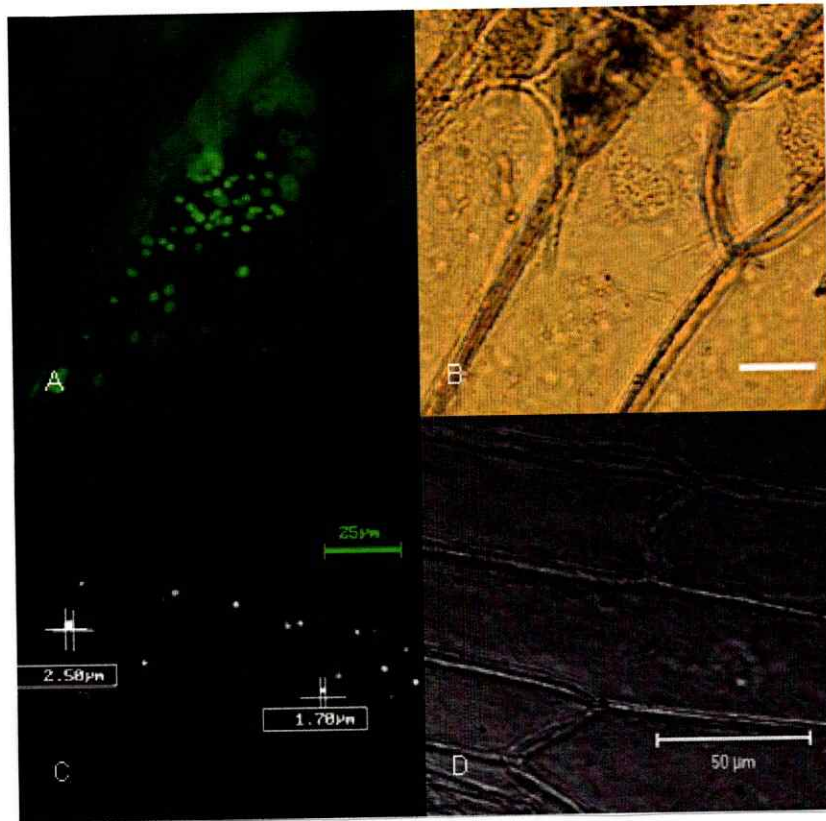


Figura 22: Patrón de fluorescencia de plastidios en células de cebolla transformadas con la RecAGFP. A y C- Imagen de fluorescencia de una célula de cebolla transformada Se observaron varios puntos fluorescentes distribuidos por toda la célula. En algunos casos se puede observarlos como puntos individuales, mientras que en otros casos se observaron los puntos muy cercanos unos a otros. B y D- Imágenes de campo claro de A y C, respectivamente. Aumento de A y B- 30X, barra de 20 μ m. Aumento de C y D- 40X, barra de 50 μ m. Los cortes ópticos en el microscopio confocal fueron realizados a cada 2 μ m.

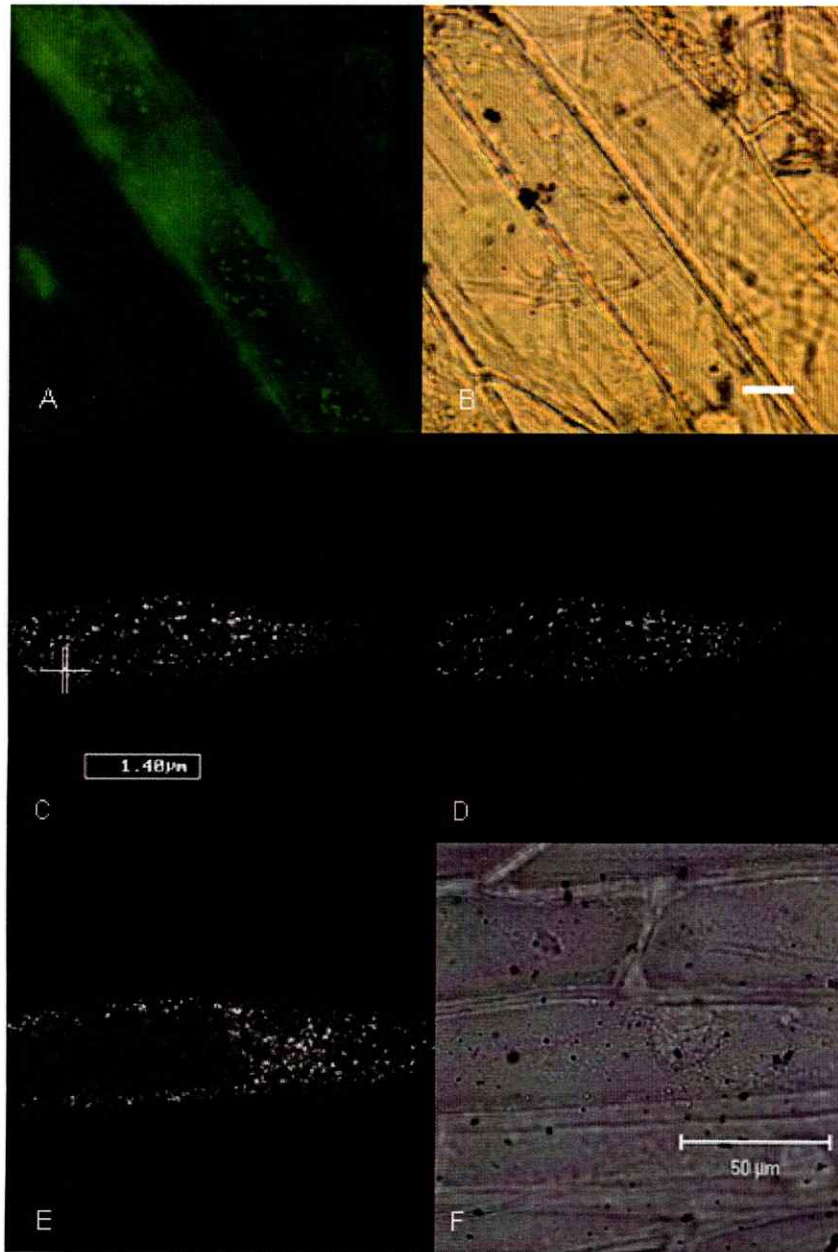


Figura 23: Patrón de fluorescencia del aparato de Golgi en células de cebolla transformadas con la STmdGFP. A- Imagen observada por microscopía de epifluorescencia; C, D y E- Imágenes observadas por microscopía confocal. En los dos casos se observa un gran número de puntos, los cuales varían de tamaño desde $0.8\mu\text{m}$ a $1.4\mu\text{m}$. Cada punto corresponde a un organelo. B y F- Imágenes de campo claro de A y C, respectivamente. Aumento de A y B- 20X, barra de $20\mu\text{m}$. Aumento de C, D, E y F- 40X, barra de $50\mu\text{m}$. Los cortes ópticos en el microscopio confocal fueron realizados a cada $2\mu\text{m}$.

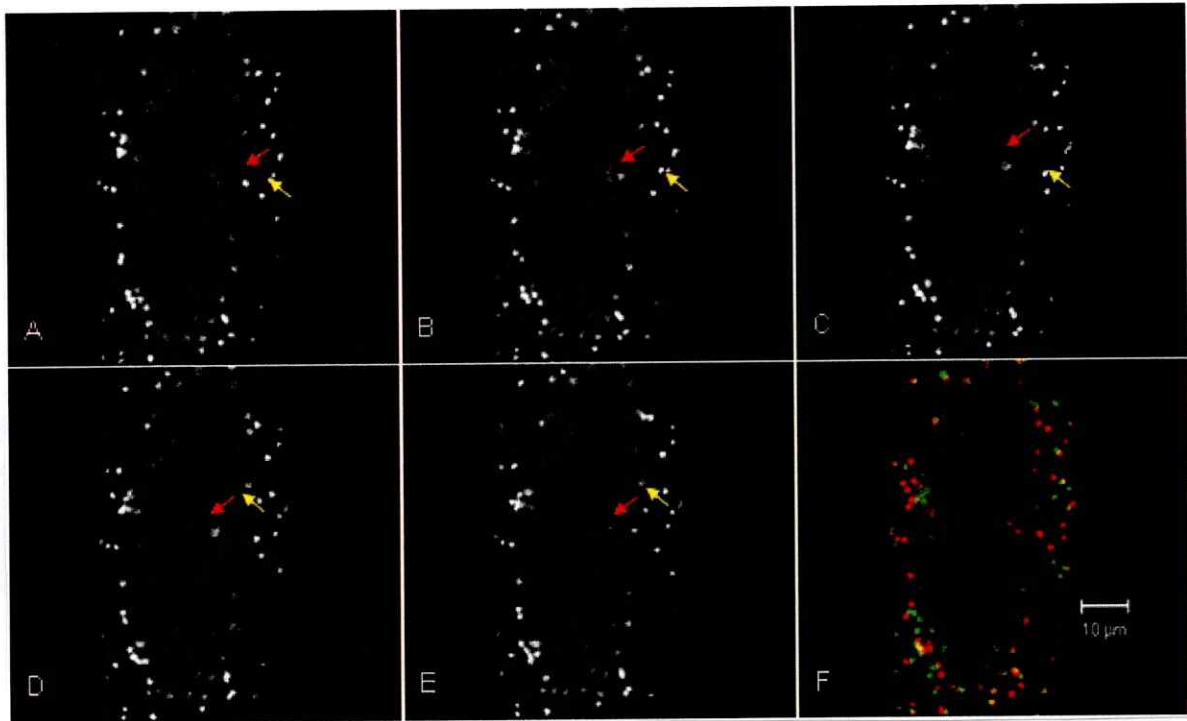


Figura 24: Movilidad de los puntos que representan el aparato de Golgi en células de cebolla transformadas con la STmdGFP. En A, B, C, D y E se observan imágenes tomadas a distintos tiempos. En F se observa el movimiento neto de cada uno de los puntos que representa un aparato de Golgi. Los puntos blancos representan organelos que no presentaron movimiento, mientras que los de colores representan puntos con un movimiento activo. Tal como se puede observar, todos los puntos presentaron un cierto grado de movimientos. Los puntos que se encuentran indicados por las flechas presentaron un alto grado de desplazamiento, tanto en el plano X-Y como en el Z.

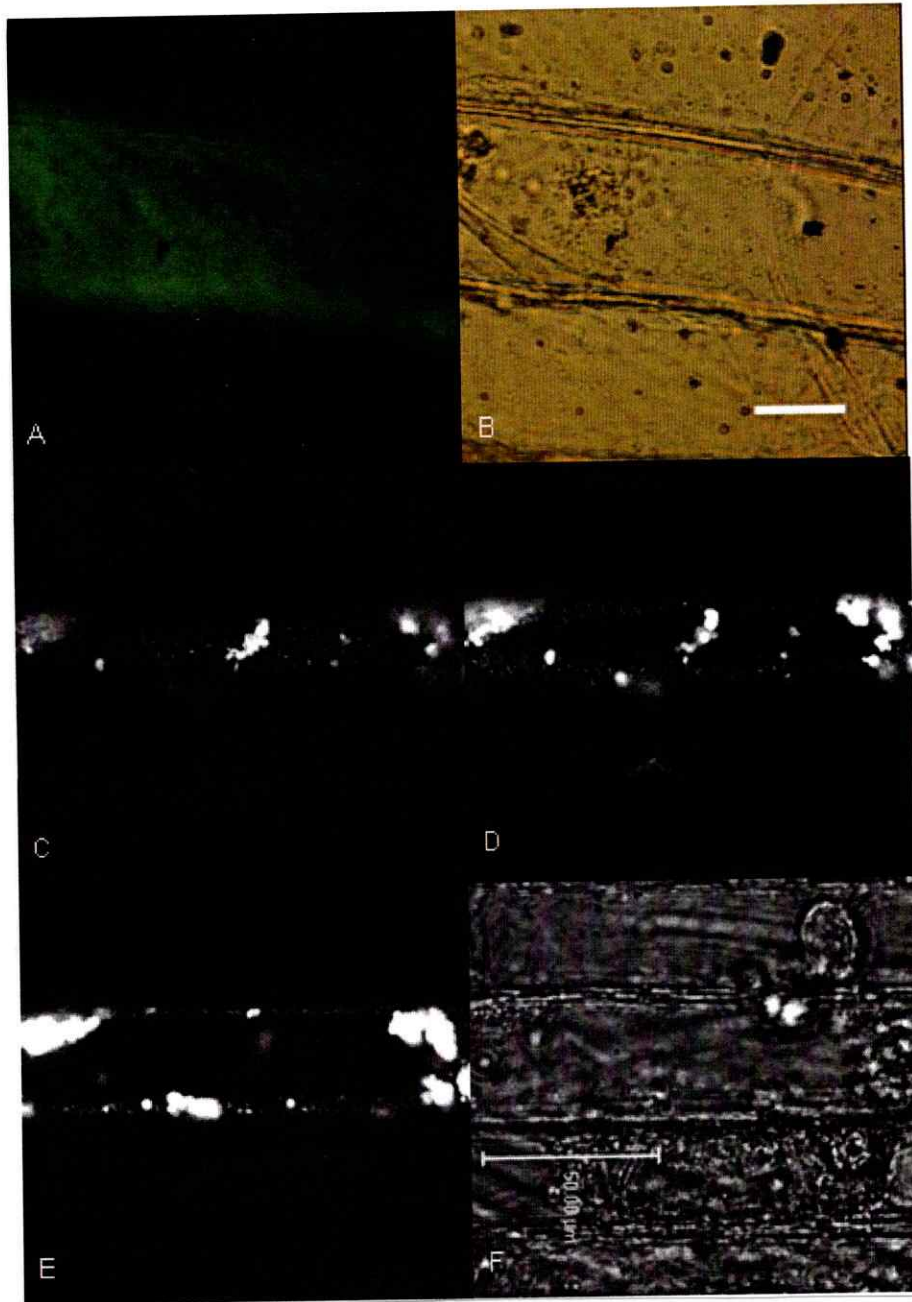


Figura 25: Patrón de fluorescencia de la AtUTr1-psmGFP en células de cebolla transformadas. A- Imagen de epifluorescencia de una célula con baja fluorescencia pero que no presenta corpúsculos fluorescentes; C, D y E- Se observa la presencia de un patrón reticulado cortical, que va desapareciendo mientras más profundo es el corte del confocal. Son visibles, a su vez, cuerpos fluorescentes de gran tamaño y que concentran la fluorescencia de la GFP. F- Se puede observar en esta imagen de contraste de fase que las estructuras observadas en E colocalizan con estructuras de naturaleza membranosa observadas en esta imagen. B- Imagen de campo claro de A. Aumento de A y B- 30X, barra de 20 μ m. Aumento de C, D, E y F- 40X, barra de 50 μ m. Los cortes ópticos fueron realizados a cada 1 μ m.

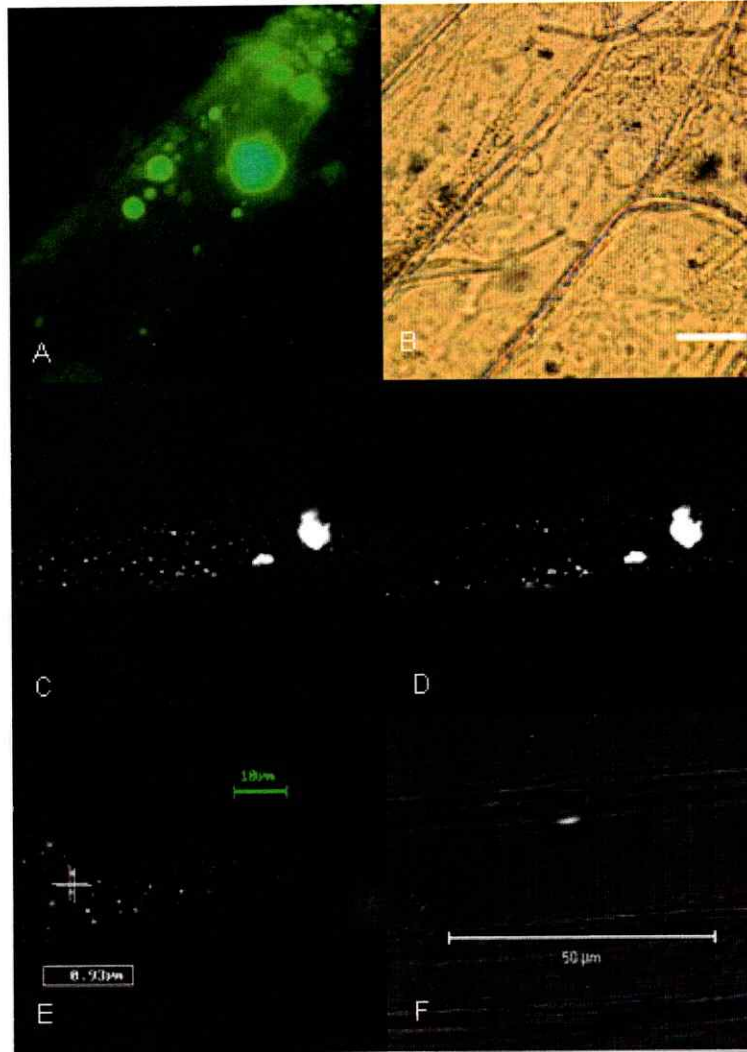


Figura 26: Patrón de fluorescencia de la AtUTr2-psmGFP en células de cebolla transformadas. A- célula observada por microscopía de epifluorescencia que presenta cuerpos fluorescentes de gran tamaño; C, D y E- Se vislumbraron puntos de un tamaño cercano al micrómetro. La distribución y el tamaño de esos puntos se asemejaron mucho al de los puntos que representaban los aparatos de Golgi en las células transformadas con la STtmdGFP. A parte de esos puntos se logró observar aglomeraciones fluorescentes en ciertas zonas de la célula. B y F- Imágenes de campo claro de A y C, respectivamente. Aumento de A y B- 30X, barra de 20 μ m. Aumento de C, D, E y F- 40X, barra de 50 μ m. Los cortes ópticos fueron realizados a cada 1 μ m.

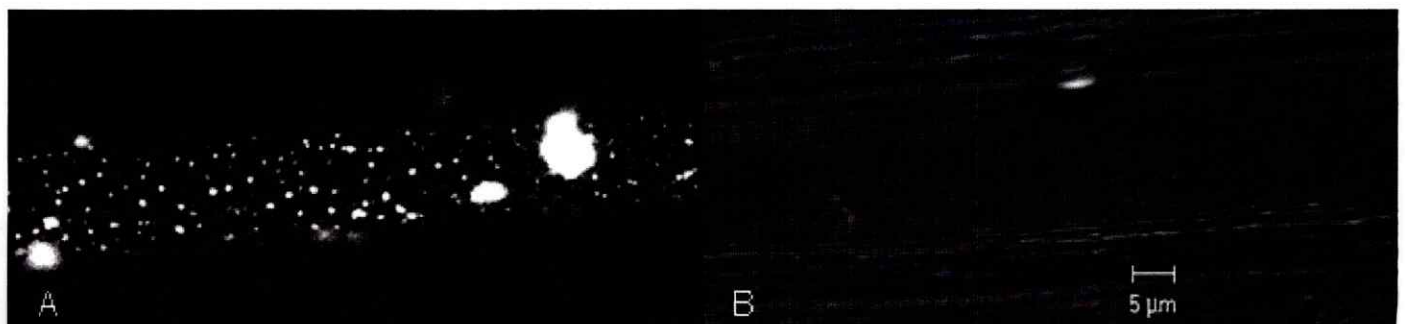


Figura 27: Localización de AtUTr2-smGFP sobre el retículo endoplasmático. En esta imagen se puede distinguir que la gran mayoría de los puntos se localizan sobre las uniones que presenta el retículo endoplasmático.

En el caso de las AtNDPasas-psmGFP no se logró vislumbrar ningún tipo de fluorescencia.

Tal como se puede observar en la figura 28, la estrategia de expresar transientemente distintas construcciones fusionadas a la GFP en células de epidermis de cebolla permite discriminar la localización subcelular de cada una de esas proteínas quiméricas.

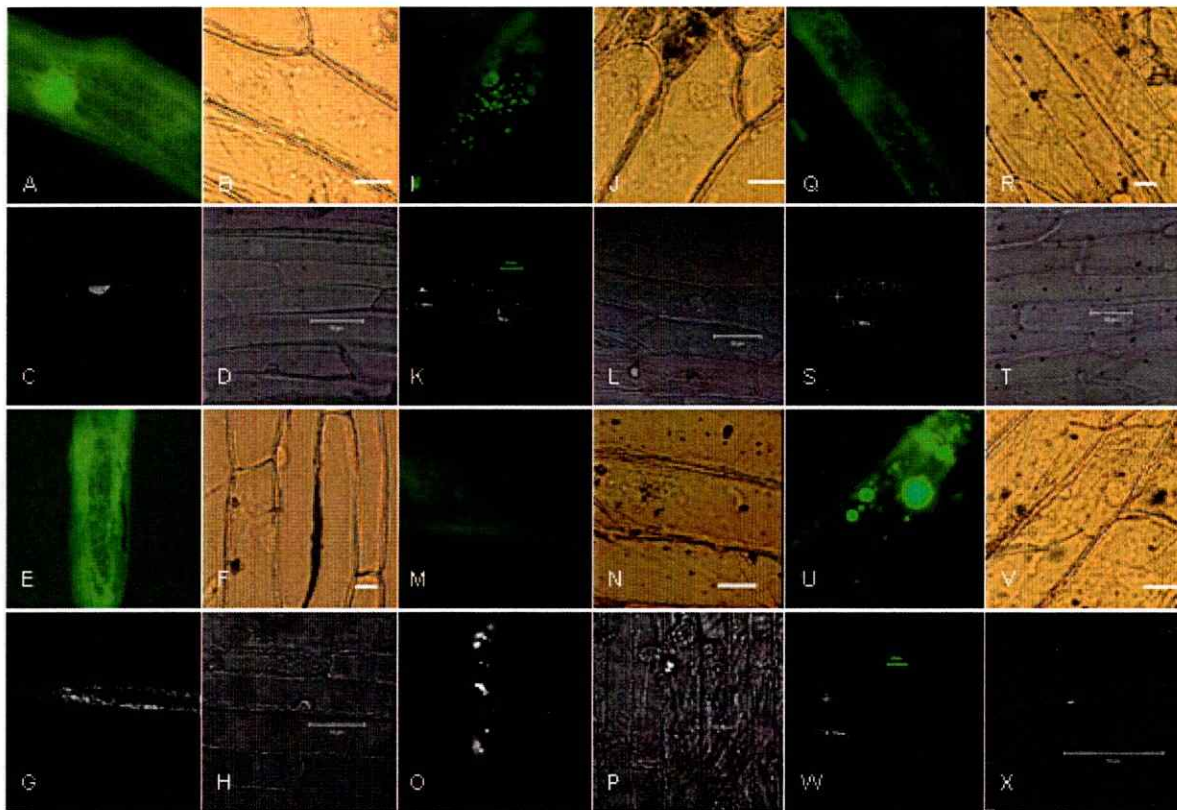


Figura 28: Resumen de las imágenes obtenidas al transformar células de epidermis de cebolla con las distintas construcciones ya descritas anteriormente. Los controles de localización para distintos organelos tales como plastidios, aparato de Golgi y retículo endoplasmático muestran claramente que es posible discriminar estos organelos por las diferencias de sus morfologías reflejadas por la fluorescencia de la GFP, tanto por microscopía confocal como por microscopía de epifluorescencia. El patrón de AtUTr2-smGFP se asemeja al de Golgi. A, B, C y D- GFP soluble; E, F, G y H- Retículo endoplasmático; I, J, K y L- Plastidios; M, N, O y P- AtUTr1-smGFP; Q, R, S y T- Aparato de Golgi; U, V, W y X- AtUTr2-smGFP.

5- Discusión

Este trabajo está enfocado en el estudio de la localización subcelular de proteínas que participarían en la biosíntesis de la pared celular primaria de plantas, proceso del cual se conoce muy poco a pesar de su gran importancia. Particularmente, se implementó con éxito metodología que no existía en nuestro país al comienzo de esta tesis. Esta se basa en el uso de la proteína fluorescente verde, que permite investigar *in vivo* la localización subcelular de proteínas y la dinámica que ellas presentan. En esta tesis se generaron quimeras de la GFP con transportadores de nucleótidos azúcar y nucleósido difosfatasa. Estos dos tipos de actividades (transportadores y fosfatasa) estarían involucradas en la síntesis de hemicelulosas y pectinas, dos de los principales polisacáridos que conforman la pared celular vegetal. El proceso de biosíntesis de esos polímeros se lleva a cabo en el aparato de Golgi (Staehein y Moore, 1995) y consistiría básicamente en el ensamble de polisacáridos por acción de glicosiltransferasas utilizando como sustrato nucleótidos azúcar y liberando NDP. Los nucleótidos azúcar ingresarían desde su sitio de síntesis, en el citosol, por la acción de transportadores de nucleótidos azúcar, mientras que el NDP es degradado a NMP y Pi por NDPasas (Neckelmann y Orellana, 1998).

En el laboratorio se identificaron genes de *Arabidopsis* homólogos a las NDPasas (AtNDPasa1 y AtNDPasa2) y TNAs (AtUTr1 y AtUTr2), los que podrían corresponder a proteínas de Golgi; sin embargo, se ha descrito que este tipo de proteínas podrían estar involucradas en reacciones de glicosilación en el lumen del RE (Berninsone y Hirschberg, 1998). Para analizar la localización subcelular utilizamos la estrategia de generar proteínas quiméricas que poseen GFP y posteriormente comparar su patrón de fluorescencia con el de proteínas de localización conocida. De esta forma, los genes que codifican para las proteínas quiméricas que poseen GFP fueron incorporados de forma estable en *A. thaliana* y de manera transiente en células de epidermis de cebolla. Este tipo de estrategias han sido ampliamente utilizados en sistemas vegetales (von Armin y col., 1998; Nebenfür y col., 1999; Kiessling, 2000; Cutler y col., 2000; Baldwin y col., 2001).

Producto de la transformación de *A. thaliana* se obtuvieron plantas transgénicas de los genes AtNDPasa1, AtNDPasa2, AtUTr1 y AtUTr2 fusionados a la GFP y de los genes que codifican para proteínas que se localizan en retículo endoplasmático (m-gfp5-ER) y aparato de Golgi (STtmdGFP). Los porcentajes de eficiencia logrados en la transformación fueron similares a los obtenidos en la literatura, variando entre un 0,9% a un 4% (Tabla 1).

La observación de estas plantas con el auxilio de una lupa, bajo una radiación de una longitud de onda en el rango entre los 440 nm y los 480 nm, permitió detectar fluorescencia en las plantas transformadas con la m-gfp5-ER, sin embargo, en las otras plantas transformadas no fue posible detectar fluorescencia bajo estas condiciones. Al utilizar microscopía de epifluorescencia se observó, con un aumento de 4X, fluorescencia de baja intensidad en las raíces de algunas de las plantas transformadas con la proteína que se destina al Golgi.

Al utilizar un aumento de 20X en el microscopio de epifluorescencia se captó, en los pelos radiculares de las plantas transformadas con la proteína de destinación al Golgi, la presencia de puntos de un pequeño tamaño que presentaban una alta motilidad. Este patrón de fluorescencia y motilidad también lo observamos en células de cebolla transformadas con este gen, confirmando lo publicado anteriormente sobre la dinámica del aparato de Golgi en las células vegetales (Boevink y col., 1998; Nebenfür y col., 1999). La razón de observar la fluorescencia proveniente de los organelos más claramente en las células radiculares puede ser atribuida a que estas células se encuentran aisladas del resto de la raíz, por lo tanto es más fácil detectar la fluorescencia emanada de los organelos. Pese a que es posible detectar fluorescencia, la señal es baja, por lo tanto es posible que existan elementos que interfieran con la captación de la fluorescencia desde el Golgi.

En las líneas de plantas transgénicas de AtUTr1-smGFP se observaron cuerpos fluorescentes de un tamaño promedio de 10 μm y de forma irregular, visibles principalmente en los pelos radiculares. Estructuras similares se observaron en células de epidermis de cebolla que expresaban AtUTr1-smGFP, al observarlas por microscopía confocal. Sin embargo, en estas células también fue posible observar un patrón de fluorescencia reticulado, reminiscente de la estructura del retículo endoplasmático. El hecho que los cuerpos fluorescentes de gran tamaño colocalicen con estructuras que se observan por microscopía de contraste de fase, que aparecen solo en las células que expresan AtUTr1-smGFP, asociado al hecho que se observa un patrón tipo retículo endoplasmático, sugiere que AtUTr1 se sintetiza en ribosomas asociados al retículo, y la proteína se puede agregar/acumular en estructuras membranosas que deriven de este organelo, lo cuál explicaría el patrón observado en las líneas transgénicas y en las células de epidermis de cebolla. No podemos descartar que esta proteína se encuentra en el RE de las plantas, y su función sea transportar UDP-glucosa requerida para la glucosilación de los N-oligosacáridos que ocurre durante el plegamiento de

las proteínas (Parodi, 2000). Una última posibilidad es que la proteína AtUTr1-smGFP haya sido incapaz de alcanzar el organelo de la vía secretoria en la cual esta normalmente reside, por la presencia de la GFP. Esta habría impedido que AtUTr1 lograra establecer las interacciones con otras proteínas, las cuáles podrían ser necesarias para alcanzar el aparato de Golgi, tal como ocurre con algunas glicosiltransferasas que participan en la biosíntesis de heparan sulfato en células animales (McCormick y col., 2000). Una manera de distinguir si la proteína AtUTr1-smGFP es funcional sería realizar ensayos de transporte de UDP-galactosa y UDP-glucosa, comparando esos resultados con la proteína sin la GFP.

En el caso de células de epidermis de cebolla que expresan AtUTr2-psmGFP, se obtuvo un patrón punteado similar al que presenta STtmdGFP, proteína que se localiza en el aparato de Golgi de células vegetales (Boevink y col., 1998; Baldwin y col., 2001). Algunos experimentos podrían ayudar a obtener más información que apoye (o refute) la localización que se le imputa a la proteína quimérica AtUTr2-smGFP. En primer lugar, es necesario investigar si estos puntos son capaces de moverse tal como lo hacen los que se observan en plantas transformadas con la STtmdGFP, ya que ese movimiento es característico del aparato de Golgi de plantas y ya ha sido estudiado por varios autores (Nebenfür y col., 1999; Boevink y col., 1998; Nebenfür y Staehelin, 2001). Segundo, sería interesante ver el efecto de la droga brefeldina A sobre el patrón que presenta AtUTr2-smGFP. Se ha visto que esta droga produce un dramático efecto sobre la morfología del aparato de Golgi, provocando tanto el enclaustramiento como la vesiculación de este organelo, dependiendo de las condiciones y del tejido estudiado (Baldwin y col., 2001).

La presencia de un débil pero inequívoco patrón reticulado observado en algunas muestras de células de epidermis de cebollas que expresan AtUTr2-smGFP no es de extrañar ya que en la literatura se ha observado que proteínas ya bien caracterizadas como pertenecientes al aparato de Golgi de plantas, tales como ERD2 y Manosidasa I, las que al ser fusionadas con GFP o sus derivados presentaban, en conjunto con el patrón punteado del aparato de Golgi, un débil patrón reticulado (Boevink y col., 1998; Nebenfür y col., 1999). Según Nebenfür y col. (1999) ello se podría deber a proteínas quiméricas en tránsito por el RE hacia el Golgi o destinadas a ser degradadas. El hecho de que mucho de los puntos observados se ubiquen sobre el RE refuerza la hipótesis de que estos puntos podrían representar al aparato de Golgi, ya que esa disposición ha sido vista por otros en la literatura (Boevink y col., 1998; Brandizzi y col., 2002 a).

En el caso de las plantas transgénicas transformadas con la AtNDPasa1-psmGFP y con la AtNDPasa2-psmGFP la emisión de la GFP fue muy baja, y a diferencia de la planta silvestre, en estas plantas se presentaron agregados fluorescentes en sus raíces. La naturaleza de estos no ha podido ser determinada en este estudio.

Según Haseloff y Amos (1995), tres etapas principales deben ser cumplidas para emplear a la GFP con éxito en plantas. Primero, la apoproteína de GFP debe ser producida en cantidades apropiadas en las células de las plantas; segundo, la apoproteína debe lograr una oxidación y la correcta constitución posttraduccional del anillo cíclico para producir una GFP madura; tercero, la proteína fluorescente debería ser adecuadamente destinada dentro de la célula, para permitir el correcto procesamiento posttraduccional, una acumulación segura de altas cantidades de proteína ó para facilitar la detección de células que expresan la proteína.

La primera de las tres etapas pudo haber sido un paso limitante para el caso de las AtNDPasas, ya que pese a que la expresión de esos genes, tanto en el vector binario como en el vector de expresión en plantas, se encontraba bajo el promotor constitutivo CaMV35S, la traducción pudo no haber sido eficiente como para llegar a alcanzar un nivel apropiado de acumulación de las proteínas quiméricas. Se sabe que la GFP requiere de una cantidad de hasta 100 veces más moléculas para poder ser detectada que otros sistemas reporteros que utilizan una señal de amplificación enzimática (Köhler, 1998). Ello podría ser especialmente gravitante para el caso de las NDPasas debido a que se ha visto que, por ejemplo, la proteína YND1, que es una apirasa homóloga a la GDPasa de *S. cerevisiae* que podría estar cumpliendo funciones similares a las de las NDPasas presentes en este estudio, se encuentra acumulada en niveles muy bajos en ese organismo (Gao y col., 1999). Mecanismos celulares posttranscripcionales ó posttraduccionales podrían estar conllevando a una baja acumulación de las AtNDPasas en las células vegetales y, por lo tanto, imposibilitando la detección de la GFP fusionada a estas proteínas. Alternativamente, la fusión podría tener un efecto negativo en la fluorescencia misma de la GFP ó un mal plegamiento de la proteína podría resultar en menores niveles de fluorescencia (Brandizzi y col., 2002b).

La tercera etapa requerida para emplear con éxito a la GFP se cumple a cabalidad en el RE. Se sabe que el lumen del RE contiene componentes tales como las chaperonas, que auxilian el plegamiento de las proteínas, por lo que la secreción y retención de la GFP en el RE debiera permitir una formación y acumulación de la proteína fluorescente madura (Haseloff y col., 1997). Ello facilitaría la detección de la GFP fusionada a algún péptido que

se destine al RE en las células vegetales. Es difícil poder determinar si el aparato de Golgi presenta el conjunto de condiciones necesarias para poder detectar la presencia de la GFP, principalmente en tejidos de un mayor grosor y con una mayor autofluorescencia que los de las células de los catáfilos de cebolla, como en el caso de *A. thaliana*. En la literatura se ha podido apreciar la fluorescencia de la GFP en el Golgi en varios sistemas, pero en *A. thaliana* no se ha podido encontrar ejemplos. Este hecho sugiere que en la planta pueden existir mecanismos que estén disminuyendo la eficiencia de la emisión de fluorescencia (cantidad, plegamiento correcto, condiciones fisiológicas tales como pH, iones). Existen antecedentes de que un transportador de nucleótidos azúcar fusionadas a una proteína derivada de GFP pudo ser observado en epidermis de cebolla, sin embargo, a pesar de numerosos intentos, nunca se ha podido encontrar una planta transgénica de *Arabidopsis thaliana* transformada con esa proteína quimérica que permita observar la fluorescencia (Paul Dupree, comunicación personal). Brandizzi y col. (2002 a) sugieren la posibilidad de que proteínas de membrana acumuladas en el Golgi están en contacto con un ambiente lítico que puede liberar a la proteína reportera (en este caso la GFP) dejándola soluble, lo cual permitiría que esta llegara a la vacuola, lo que diluiría la señal obtenida. Ello dependería de la naturaleza de la unión entre la proteína de membrana y el reportero y del estado celular de la muestra. Quizás en *Arabidopsis* esa situación se vea acentuada, lo que explicaría lo difícil de la detección de proteínas intrínsecas del aparato de Golgi fusionadas a la GFP en esa planta.

Otro problema asociado a la detección de la fluorescencia de la GFP se produce al utilizar la microscopía confocal. Pese a que esta permite obtener una mejor calidad de imágenes, presenta el problema de que la razón relativamente baja existente entre la señal y el ruido detectados por el sistema limitan la cantidad de tratamiento de las imágenes obtenidas, lo que impide obtener la máxima sensibilidad para poder obtener los datos deseados (Goodwin, 1999). La utilización de microscopía de epifluorescencia permitió observar de una forma muy clara los patrones de la GFP en las células de epidermis de cebolla, pero en el caso de *Arabidopsis* el grosor de las muestras acentuó la presencia de una fluorescencia difusa que dificultó la observación de los patrones de distribución subcelulares de los distintos organelos de la célula vegetal.

Actualmente, existe una gran variedad de GFPs derivadas de la nativa de *Aequorea victoria* siendo utilizadas para diferentes experimentos. Como ya se mencionó en Métodos, todas las GFPs utilizadas en este trabajo son derivadas de la mGFP4 (Haseloff y col., 1997) la

cual es una versión de la GFP que fue especialmente modificada para eliminar un intrón críptico reconocido por las plantas y que se encuentra naturalmente en la GFP silvestre, que era responsable, en parte, por la prácticamente nula acumulación de GFP en células vegetales. En la literatura se ha visto que la expresión estable de la GFP en plantas transgénicas ha sido infructuosa. Parte de esos problemas fueron resueltos al eliminar el intrón críptico de la GFP. Pero pese a ello las señales detectadas seguían siendo bajas (Davis y Vierstra, 1998). La smGFP utilizada para ser fusionada a los genes de interés en este estudio es una versión de la mGFP4 que posee modificaciones en su secuencia aminoacídica diseñadas de forma de evitar problemas de agregación que presenta la GFP nativa y, de esa forma, incrementar el número de moléculas de GFP (Davis y Vierstra, 1998). A su vez, la GFP presente en la m-gfp5-ER es una versión mejorada de la mGFP4 en la cual se realizaron cambios en la secuencia primaria de la proteína para que esta presentara los dos picos de excitación de la GFP, a 390nm y a 480nm, de igual tamaño, mejorando así la capacidad de detectar la GFP5 a 480nm, longitud de onda de muchos de los equipos utilizados para excitar a las moléculas fluorescentes (Haseloff y Siemering, 1998). Pese a esas características, la m-gfp5 apenas se pudo detectar en el caso de las plantas transgénicas transformadas con el vector pVKH18En6-STtmdGFP, el cual también posee esa versión de la GFP. Ponappa y col. (1999) determinaron que, en el caso de la soja, la smRS-GFP (versión de la smGFP que posee una emisión de color rojo) presentó una fluorescencia más visible que la m-gfp5-ER (Ponappa y col., 1999), lo que lleva a pensar que la expresión de la GFP se ve regulada por varios factores adicionales a los ya mencionados por Haseloff y Amos (1995).

Finalmente, es importante destacar que en el transcurso de esta tesis se implementaron dos de las metodologías más utilizadas para transformar plantas, como son la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* de *A. thaliana* y la transformación vía biobalística de *Allium cepa*. El éxito de la transformación de *A. thaliana* vía el método de Inmersión Floral en conjunto con la reciente información sobre los blancos de la transformación de *Arabidopsis* (Desfeux y col., 2000) debieran facilitar la adaptación de ese método a la transformación de otras especies, incluyendo aquellas de valor comercial. Los beneficios son claros: la transformación sin cultivo de tejidos puede proporcionar un método eficiente que requiere menos esfuerzo, trabajo, gastos y especialización. Además, las tasas de mutagénesis no deseadas son reducidas, lo que evita problemas con los productos obtenidos a partir de estas plantas transformadas (Hansen y Wright, 1999; Bent, 2000).

6. BIBLIOGRAFIA

- Akashi, K., Grandjean, O., Small, I. (1998) Potential dual targeting of an Arabidopsis archaeobacterial-like histidyl-tRNA synthetase to mitochondria and chloroplasts. *FEBS Lett.* 431(1): 39-44.
- Baldwin, T.C., Handford, M.G., Yuseff, M.I., Orellana, A., and Dupree, P. (2001) Identification and Characterization of GONST1, a Golgi-Localized GDP-Mannose Transporter in Arabidopsis. *Plant Cell* 13(10): 2283-2295.
- Bent, AF. (2000) Arabidopsis in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol* 124(4):1540-7
- Berninsone, P. and Hirschberg, C.B. (1998) Nucleotide sugars, nucleotide sulfate, and ATP transporters of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 15; 842: 91-99.
- Berninsone, P.M. and Hirschberg, C.B. (2000) Nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus. *Current opinion in structural biology* 10: 542-547.
- Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, A., and Hawes, C. (1998) Stacks on tracks: The plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* 15: 441-447.
- Brandizzi, F., Snapp, E.L., Roberts, A.G., Lippincott-Schwartz, J., Hawes, C. (2002 a) Membrane protein transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent: evidence from selective photobleaching. *Plant Cell.* 14 (6): 1293-309.
- Brandizzi, F., Fricker, M., Hawes, C. (2002 b) A greener world: the revolution in plant bioimaging. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (7): 520-30.

Carpita, N., McCann, M., and Griffing, L.R. (1996) The plant extracellular matrix: news from the cell's frontier. *Plant Cell* 8(9): 1451-1463.

Clough, S. and Bent, A. (1998) Floral Dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743

Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffittis, J.S., and Somerville, C.R. (2000) Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 28;97(7): 3718-3723.

Davis, S.J. and Vierstra, R.D. (1998) Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 36: 521-528.

Desfeux, D., Clough, S., and Bent, A. (2000) Female Reproductive Tissues Are the Primary Target of *Agrobacterium*-Mediated Transformation by the Floral-Dip Method. *Plant Physiol.* 123: 895-904.

Fuhrmann, M., Oertel, W., and Hegemann, P. (1999) A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 19(3): 353-361

Gadella, T., Van der Krogt, G., and Bisseling, T. (1999) GFP-based FRET microscopy in living plant cells. *Trends Plant Sci.* 4: 287-291.

Gallie, D.R. (1998) Controlling gene expression in transgenics. *Curr Opin Plant Biol* 1(2): 166-72.

Gao, X.D., Kaigorodov, V., and Jigami, Y. (1999) Ynd1, a Homologue of *GDA1*, Encodes Membrana-bound Apyrase Requireride for Golgi N- and O-Glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 23; 274(30): 21450-21456.

Gibeaut, D.M. (2000) Nucleotide sugars and glycosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides. *Plant Physiol. Biochem.* 38 (1/2): 69-80.

Goodwin P.C. (1999) GFP biofluorescence: imaging gene expression and protein dynamics in living cells. Design considerations for a fluorescence imaging laboratory. *Methods Cell Biol.* 1999; 58: 343-67.

Hansen, G., and Wright, M. (1999) Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.* 4: 226-231.

Haseloff, J., Siemering, K.R., Prasher, D.C., and Hodge, S. (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18; 94(6): 2122-2127.

Haseloff, J., and Amos, B. (1995) GFP in plants. *Trends Genet.* 11(8): 328-329.

Haseloff, J. and Siemering, K. (1998) The uses of GFP in plants, in Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols Chalfie, M. and Kain, S. Eds. John Wiley.

Hawes, C., Saint-Jore, C., Martin, B., Zheng, H.Q. (2001) ER confirmed as the location of mystery organelles in Arabidopsis plants expressing GFP! *Trends Plant Sci.* 6 (6): 245-6.

Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 30; 96(1): 23-28.

Kiessling, J., Kruse, S., Rensing, S.A., Harter, K., Decker, E.L., and Reski, R. (2000) Visualization of a cytoskeleton-like FtsZ network in chloroplasts. *J Cell Biol.* 13;151(4): 945-950.

Köhler, R. (1998) GFP for in vivo imaging of subcellular structures in plant cells. *Trends Plant Sci.* 3: 317-320.

Köhler, R.H., Cao, J., Zipfel, W.R., Webb, W.W., and Hanson, M.R. (1997) Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. *Science* 27; 276(5321): 2039-2042.

Laufs, P., Autran, D., and Traas, J. (1999) A chromosomal paracentric inversion associated with T-DNA integration in *Arabidopsis*. *Plant J* 18(2): 131-139.

McCormick C, Duncan G, Goutsos KT, and Tufaro F. (2000) The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18; 97(2): 668-73.

Meinke, D., Cherry, J., Dean, C., Rounsley, S., and Koornneef, M. (1998) *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* 282: 662-682.

Nebenführ, A., and Staehelin L.A. (2001) Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. *Trends Plant Sci.* 6: 160-167.

Nebenfür, A., Gallager, L.A., Dunahay, T.G., Frohlick, J.A., Mazurkiewicz, A.M., Meehl, J.B., and Staehelin, L.A. (1999) Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol.* 121(4): 1127-42.

Neckelmann, G., and Orellana, A. (1998) Metabolism of Uridine 5'-Diphosphate-Glucose in Golgi Vesicles from Pea Stems. *Plant Physiol.* 117: 1007-1014.

Page, D.R., and Grossniklaus, U. (2002) The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet.* 3(2): 124-36.

Pang, S.Z., DeBoer, D.L., Wan, Y., Ye, G., Layton, J.G., Nether, M.K., Armstrong, C.L., Fry, J.E., Hinchee, M.A., and Fromm, M.E. (1996) An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiol.* 112(3): 893-900.

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

Peltier, J.B., Friso, G., Kalume, D.E., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I., and van Wijk K.J. (2000) Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell* 12(3): 319-41.

Ponappa, T., Brzozowski, A.E., and Finer, J.J. (1999) Transient expresion and stable transformation of soybean using the jellyfish green fluorescent protein. *Plant Cell Reports* 19: 6-12.

Reiter, W-D. (1998) *Arabidopsis thaliana* as a model system to study synthesis, structure, and function of the plant cell wall. *Plant Physiol. Byochem.* 36 (1-2): 167-176.

Reiter, W.D., Chapple, C., and Somerville CR. (1997) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. *Plant J.* 12(2): 335-345.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), 2nd Ed.

Scott, A., Wyatt, S., Tsou, P.-L., Robertson, D., and Allen N. (1999) Model System for Plant Cell Biology: GFP Imaging in Living Onion Epidermal Cells. *BioTechniques* 26: 1125-1132.

Spector, L., Goldman, R. and Leinwand L. (1998) *Cells: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), 2nd Ed.

Staehelein, L.A. and I. Moore (1995) The plant Golgi apparatus: Structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:261-288.

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

Von Armin, A.G., Deng, X.W., and Stacey, M.G., (1998) Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene* 9;221(1): 35-43.

Walbot, V. (2000) *Arabidopsis thaliana* genome. A green chapter in the book of life. *Nature* 408: 794-795.

Wee, E.G., Sherrier, D.J., Prime, T.A., and Dupree, P.(1998) Targeting of active sialyltransferase to the plant Golgi apparatus. *Plant Cell* 10 (10):1759-68.

Xiang, C., Wang, H., Shiel, P., Berger, P., and Guerra, D.J. (1994) A modified alkaline lysis miniprep protocol using a single microcentrifuge tube. *Biotechniques* 17(1): 30-32.

7. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi familia por el constante apoyo que me ha proporcionado durante el desarrollo no solamente de esta tesis sino que de mi etapa universitaria.

Quisiera también agradecer a todos aquellos que se vieron en algún momento desplazados por este trabajo, por la paciencia y comprensión, principalmente por parte de mi polola y de mis amigos más cercanos.

Mi sincera gratitud al doctor Ariel Orellana por recibirme y guiarme durante esta jornada, y a los doctores Herman Silva y Lee Meisel por los alcances y consejos proporcionados durante mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros y ex-compañeros de laboratorio, mi reconocimiento y deseo de fortuna en su atribulada vida científica.

Finalmente, no quisiera dejar de mencionar que esta tesis fue financiada con fondos del proyecto Fondecyt número 1000675- "Regulación en el aparato de Golgi de la síntesis de polisacáridos de la pared celular en plantas".