

UCH F C
Biotecnología
F 123
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

“Generación de herramientas para determinar la topología y especificidad de sustrato de GONST4, un transportador de nucleótido-azúcar de *Arabidopsis thaliana*”

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

SEBASTIÁN ALEJANDRO FEBRES VARELA

Director de Seminario de Título:
Dr. Michael Handford



Enero de 2010
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Sebastián Alejandro Febres Varela

“Generación de herramientas para determinar la topología y especificidad de sustrato de GONST4, un transportador de nucleótido-azúcar de Arabidopsis thaliana”

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

Dr. Michael Handford
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación

Dr. Ricardo Cabrera Paucar
Presidente Comisión

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Evaluador

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.



Santiago de Chile, Enero de 2010

A mis padres





AGRADECIMIENTOS.

Nietzsche decía que “Todo aquel que disfruta cree que lo que importa del árbol es el fruto, cuando en realidad es la semilla. He aquí la diferencia entre los que creen y los que disfrutan”. Hoy, justamente quiero agradecerles por creer en mí y, por lo tanto, haciéndole honor a las palabras de Nietzsche, voy a tomarme la libertad de dedicarles unas palabras a los que cultivaron esta semilla y hoy disfrutan de su fruto.

A mis padres, a quienes dedico esta memoria, les agradezco por toda la sabiduría y cariño que me han entregado desde cuando medía 49 cm hasta el día de hoy y sobre todo, por ese amor incondicional y perfecto que me han regalado. Los amo.

A mi hermano Mauricio por enseñarme a vivir la vida de distintas formas y regalarme siempre una sonrisa no matter what. Sin ti no sería quién soy. Te amo.

Al buen Tebish a Vinkito y a Ema por ser los mejores amigos. Gracias por vuestra amistad, porque la vida se construye de experiencias y desde que los conozco nos han sobrado. Los quiero mucho.

A la linda persona que me acompañó mis últimos años universitarios, por tu cariño, por ser como eres y aportarme siempre con tu punto de vista crítico. He aprendido mucho de ti Makesita. Te amo.

Cómo olvidar a Patito. Imposible olvidar esas innumerables sesiones intensas de estudio llegando a la prueba con un battery y 1 minuto antes o esas sesiones intensas de carrete. Eres una de las personas a las que admiro. Te quiero.

A los hombres de Vinateros (no se confundan con el nombre, es un barrio de Madrid). Kako y Andy, con Uds. viví la mejor experiencia de mi vida que fue ese intercambio por 7 meses. Son dos amigos de los mejores. Los quiero mucho.

A las amistades que fortalecen el alma. Los lekes, Moneli, Gabriel, Bilz, Harvey, Lucho, Chelo, Cojo gracias por esos innumerables momentos de carcajadas. Los zorros, Diego Miri (el ejecutivo búlgaro, te quiero perrito), Mati, Francisco, Daniel, Joy. Los quiero

A los maestros que cultivaron mi conocimiento. Gracias a todos quiénes alimentaron mi cerebro con conocimiento, enseñanzas y experiencia. Principalmente, gracias a Mike por ir más allá de la relación Profesor – Alumno y por ayudarme a entender que las cosas no siempre salen bien.

Gracias también a esa fuerza invisible y poderosa que me guía, me cuida y siempre se encarga de que encuentre los caminos.

A todos a quienes omito intencionalmente y que formaron parte de mi mundo universitario también les agradezco ya que sin Uds. probablemente este tiempo no hubiese tenido ese grado de genialidad que tuvo.



INDICE

| | |
|--|--------|
| Listado de Figuras..... | VI |
| Listado de Tablas..... | VIII |
| Listado de Abreviaturas..... | IX |
| RESUMEN..... | XI |
| ABSTRACT..... | XIII |
| 1-. INTRODUCCIÓN..... | - 1 - |
| 1.1 Generalidades de la Pared Celular..... | - 1 - |
| 1.2 Componentes de la Pared Celular..... | - 2 - |
| 1.3 Biosíntesis de los polisacáridos de la pared celular..... | - 4 - |
| 1.4 Transportadores de nucleótido azúcar (TNAs)..... | - 6 - |
| 1.5 Familia de transportadores GONST..... | - 8 - |
| 1.6 GONST4 un posible transportador de GDP-L-galactosa..... | - 9 - |
| 1.7 Consideraciones experimentales..... | - 11 - |
| 2. OBJETIVOS..... | - 13 - |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | - 14 - |
| 3.1 Análisis bioinformático..... | - 14 - |
| 3.1.1 Predicción de dominios transmembrana en GONST4..... | - 14 - |
| 3.1.2 Construcción del árbol filogenético..... | - 14 - |
| 3.1.3 Búsqueda de residuos determinantes para la especificidad (SDRs)..... | - 15 - |
| 3.2 Síntesis de GDP-L-galactosa..... | - 15 - |
| 3.2.1. Reacciones enzimáticas con GDP-D-manosa 3,5' epimerasa..... | - 16 - |
| 3.2.2. HPLC de fase reversa con par iónico..... | - 16 - |
| 3.2.3. PACE (Polysaccharide Analysis using Carbohydrate gel Electrophoresis)..... | - 17 - |
| 3.3 Generación de vectores pGWB12-G4 y pMDC43-G4..... | - 19 - |
| 3.3.1 PCR de GONST4..... | - 19 - |
| 3.3.2 Visualización de DNA y RNA mediante electroforesis..... | - 21 - |
| 3.3.3 Clonamiento de GONST4 en pCR8®/GW/TOPO®..... | - 21 - |
| 3.3.4 Crecimiento y transformación de <i>E. coli</i> DH5a..... | - 22 - |
| 3.3.5 Mini-preparaciones de DNA plasmidial..... | - 22 - |
| 3.3.6 Confirmación de transformación de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> | - 23 - |
| 3.3.7 Recombinación con pMDC43 y con pGWB12..... | - 23 - |
| 3.3.8 Confirmación de la recombinación..... | - 24 - |

| | |
|--|--------|
| 3.3.9 Generación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . | - 25 - |
| 3.3.10 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . | - 25 - |
| 3.4. Análisis de funcionalidad de los vectores pGWB12-G4 y pMDC43-G4. | - 26 - |
| 3.4.1 Infiltración de hojas de <i>Nicotiana tabacum</i> . | - 26 - |
| 3.4.2 Extracción de RNA. | - 26 - |
| 3.4.3 RT-PCR. | - 27 - |
| 3.4.4 Extracción aparato de Golgi. | - 28 - |
| 3.4.5 Microscopía confocal. | - 29 - |
| 3.5 Ensayo de transporte. | - 29 - |
| 3.5.1 Cuantificación de proteínas. | - 29 - |
| 3.5.2 Ensayo de Transporte. | - 30 - |
| 4. RESULTADOS. | - 32 - |
| 4.1 Árbol Filogenético de Transportadores Nucleótido Azúcar (TNAs). | - 32 - |
| 4.2 Síntesis de GDP-L-galactosa. | - 39 - |
| 4.3 Generación de vectores para el estudio de GONST4. | - 45 - |
| 4.3.1 Generación del vector de entrada: pCR8-G4. | - 45 - |
| 4.3.2 Recombinación LR de pCR8-G4 con el vector de destinación pMDC43. | - 48 - |
| 4.3.3 Recombinación LR de pCR8-G4 con el vector de destinación pGWB12. | - 49 - |
| 4.3.4 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con los vectores pMDC43-G4 y pGWB12-G4. | - 51 - |
| 4.3.5 Comprobación de la funcionalidad del vector pMDC43-G4 mediante RT-PCR... | - 51 - |
| 4.3.6 Comprobación de la funcionalidad del vector pMDC43-G4 mediante microscopía confocal. | - 52 - |
| 4.4 Estudio del transporte de nucleótido azúcar mediado por N-GFP GONST4. | - 54 - |
| 5. DISCUSIÓN. | - 56 - |
| 6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES. | - 64 - |
| 8. BIBLIOGRAFÍA. | - 66 - |





Listado de Figuras.

| | |
|---|----|
| Figura 1: Estructura del ramnogalacturonano II (RG-II)..... | 4 |
| Figura 2: Modelo general de transporte de un TNA..... | 7 |
| Figura 3: Esquema de reacción de GME..... | 15 |
| Figura 4: Principio de derivatización de los azúcares..... | 18 |
| Figura 5: Esquema del vector pCR8®/GW/TOPO®..... | 21 |
| Figura 6: Esquema de predicción de DTM para GONST4..... | 33 |
| Figura 7: Filogenia de TNAs con diferentes especificidades de sustrato generado por el método Bayesiano..... | 38 |
| Figura 8: HPLC en fase reversa con par iónico de los productos de la reacción de GDP-manosa con la enzima GME..... | 41 |
| Figura 9: Correlación entre área del peak y concentración de GDP-manosa..... | 43 |
| Figura 10: PACE de los productos obtenidos mediante HPLC..... | 44 |
| Figura 11: PCR de colonias 1-4 de <i>E. coli</i> transformadas con pCR8-G4..... | 46 |
| Figura 12: Análisis de restricción de colonias 1-4 de <i>E. coli</i> transformadas con pCR8-G4..... | 47 |
| Figura 13: PCR de colonias S1-S3 de <i>E. coli</i> transformadas con pMDC43-G4..... | 49 |
| Figura 14: Análisis de restricción de colonias S1-S3 de <i>E. coli</i> transformadas con pMDC43-G4..... | 49 |
| Figura 15: Comprobación de la recombinación LR de GONST4 en el vector de destinación pGWB12..... | 50 |
| Figura 16: PCR de colonias AT1-AT6 de <i>A. tumefaciens</i> transformada con pMDC43-G4..... | 51 |
| Figura 17: RT-PCR confirmativo de la funcionalidad del vector pMDC43-G4..... | 52 |

Figura 18: Comprobación de la funcionalidad del vector pMDC43-G4 en hojas de tabaco.....53

Figura 19: Ensayo de transporte de GONST4-GFP.....55

Figura 20: Residuos distintivos de GONST4 y de cada familia de TNAs.....58



Listado de Tablas.

| | |
|--|-------|
| Tabla I : Partidores utilizados en las reacciones de PCR..... | 20 |
| Tabla II: Programas utilizados para amplificar GONST4 y GAPA..... | 20 |
| Tabla III: Secuencias utilizadas para el análisis filogenético..... | 36-37 |

Listado de Abreviaturas.

| | |
|----------|---|
| APS: | Persulfato de amonio. |
| BCIP: | 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato. |
| CTAB: | Cetil trimetil amonio bromuro. |
| DNA: | Ácido desoxirribonucleico. |
| DMSO: | Dimetil sulfóxido. |
| d.p.i.: | Días post infiltración. |
| DTM: | Dominio transmembrana. |
| EDTA: | Ácido etilendiaminotetraacético. |
| GDP-fuc: | GDP-fucosa. |
| GDP-gal: | GDP-galactosa. |
| GDP-gul: | GDP-gulosa. |
| GDP-man: | GDP-manosa. |
| GME: | GDP-D-manosa 3'5' epimerasa. |
| GONST4: | Transportador de Nucleótido Azúcar de Golgi N°4 |
| HPLC: | Cromatografía líquida de alta presión. |
| kb: | Kilo base (1000 pares de bases). |
| kDa: | Kilo Dalton. |
| MS: | Medio de Murashige y Skoog. |
| NA: | Nucleótido-azúcar. |
| NBT: | Azul de Nitrotetrazolio en dimetilformamida. |
| NDP: | Nucleótido difosfato. |
| PACE: | Análisis de polisacáridos usando gel de electroforesis de azúcares. |

| | |
|----------|-------------------------------------|
| pb: | Pares de bases. |
| O.N. | Over night (toda la noche). |
| RNA: | Ácido ribonucleico. |
| RG: | Ramnogalacturonano. |
| SDS: | Dodecil sulfato de sodio. |
| TEAA: | Acetato de trietil-amonio |
| TEMED: | N,N,N',N'-tetrametiletenendiamina. |
| TNA: | Transportador de Nucléotido Azúcar. |
| TPT | Transportador de Triosa Fosfato |
| UDP-glu: | UDP-glucosa |

RESUMEN.

En plantas, el aparato de Golgi es el organelo especializado en reacciones de glicosilación. En el lumen de este organelo, se sintetiza la mayoría de los polisacáridos no celulósicos de la pared celular y se modifican los lípidos y proteínas mediante la adición de cadenas laterales de carbohidratos. Los sustratos para la síntesis de estos glicanos son azúcares activados mediante la adición de un nucleótido (nucleótido-azúcar, NA). La mayoría de las enzimas involucradas en la síntesis de NA están localizadas en el citosol y, por lo tanto, es indispensable la presencia de transportadores que transloquen los NA hacia el lumen del aparato de Golgi para que ocurra el proceso de glicosilación.

En un trabajo previo, y mediante la genética reversa, se identificó GONST4 de *Arabidopsis thaliana* el cual, junto con otros miembros de la familia GONST, posee las características moleculares de un transportador de nucleótido-azúcar (TNA).

Con el fin de comprender la relación estructura-función de este TNA es indispensable conocer su organización tridimensional en el plano de la bicapa lipídica. Para lograr este objetivo, se estudió las relaciones evolutivas que GONST4 posee con sus ortólogos a través de una filogenia realizada mediante el algoritmo bayesiano. Como resultado de esto, se observó que GONST4 se agrupa junto a otros transportadores que no poseen sustrato caracterizado, en un clado distinto al de GONST1 y GONST2. Esto último, da indicios de que este TNA podría transportar un sustrato diferente a los ya caracterizados, dentro de los cuales destaca GDP-L-galactosa, importante para la síntesis de la pectina ramnogalacturonano II (RG II). En conjunto a esto, se realizó una predicción bioinformática de dominios transmembrana (DTM) para este TNA y se

encontró dos posibles modelos con 9 y 10 DTM. Para permitir validar uno de estos modelos de topología de membrana, se generó herramientas moleculares con fusiones de epítopes al extremo N-terminal de GONST4.

Respecto de la especificidad de este TNA, en esta memoria se adaptó un protocolo de síntesis enzimática de GDP-L-galactosa a partir de GDP-D-manosa utilizando la enzima GDP-manosa 3'-5' epimerasa (GME) y posteriormente se realizó una purificación de los productos obtenidos mediante HPLC en fase reversa. A través de un ensayo de transporte, se mostró que GONST4 es capaz de importar GDP-L-galactosa al lumen del aparato de Golgi, identificando así, el primer TNA conocido capaz de transportar este NA.

ABSTRACT.

In plants, the Golgi apparatus is the organelle specialised in glycosylation reactions. In the lumen of this organelle, most of the non-cellulosic polysaccharides of the cell wall are synthesised and lipids and proteins are modified by the addition of carbohydrate side chains. The substrates for the synthesis of these glycans are sugars activated by the addition of a nucleotide (nucleotide-sugar, NS). The majority of the enzymes involved in NS synthesis are localised in the cytosol. Therefore, the presence of transporters which translocate the NS into the Golgi lumen are essential for the glycosylation process.

In a prior study using a reverse genetics approach, GONST4 was identified in *Arabidopsis thaliana* which, along with other members of the GONST family, possesses the molecular characteristics of a nucleotide-sugar transporter (NST).

In order to understand the structure-function relation of this NST, it is essential to study the three-dimensional organisation of GONST4 in the plane of the lipid bilayer. To achieve this goal, the evolutionary relation of GONST4 with its orthologues was studied by phylogeny using the Bayesian algorithm. It was observed that GONST4 appears along with TNAs with no characterised substrate and in a clade distinct from GONST1 and GONST2. This means that GONST4 could transport a substrate which is different from those already characterised, including GDP-L-galactose which is important for the synthesis of the pectin rhamnogalacturonan II (RG II). Together with this, a bioinformatic prediction of the number of transmembrane domains (TMD) in GONST4 revealed two possible models with 9 and 10 TMD. In order to validate one of

these models of membrane topology, molecular tools with tags fused to the N-terminus of GONST4 were generated.

To study the specificity of this NST, it was necessary to adapt a protocol for the enzymatic synthesis of GDP-L-galactose from GDP-D-mannose using the enzyme GDP-mannose 3'-5' epimerase (GME), which was subsequently purified by reverse phase HPLC. Using a transport assay, it was demonstrated that GONST4 is capable of importing GDP-L-galactose into the Golgi lumen, thus identifying the first known NST able to transport this NS.

1-. INTRODUCCIÓN.

1.1 Generalidades de la Pared Celular.

Una característica que resalta de inmediato de las células vegetales es que todas se encuentran rodeadas de una matriz extracelular, compuesta principalmente de celulosa, a la que se denomina *pared celular*. Sin embargo, además de celulosa, posee una enorme variedad de otros polisacáridos (hemicelulosas y pectinas), proteínas y compuestos fenólicos (Brett y Waldron, 1990).

La síntesis de la pared celular es un proceso altamente compartimentalizado. Las proteínas que la componen son sintetizadas en el retículo endoplasmático y posteriormente modificadas en el aparato de Golgi antes de ser transportadas en vesículas a la superficie celular, mientras que los compuestos fenólicos son sintetizados en el citoplasma. De los polisacáridos, la celulosa y callosa son sintetizadas en la membrana celular mientras que las hemicelulosas y pectinas son sintetizadas en el aparato de Golgi (O'Neill et al., 2001).

La pared celular cumple múltiples funciones dentro de las que destacan: (1) resistir la presión osmótica ejercida por el citoplasma y la membrana celular lo que implica mantener y determinar la forma celular, dar soporte y fuerza mecánica para el crecimiento de la planta sin perder la flexibilidad y plasticidad celular (Handford, 2006); (2) participar en el desarrollo y la diferenciación celular (O'Neill et al., 2001); (3) establecer una barrera física contra patógenos; (4) controlar la tasa y dirección del crecimiento celular; (5) actuar como fuente de almacenamiento de carbohidratos reutilizando sus componentes en otros procesos metabólicos, y (6) participar en la

señalización ya sea hormonal (Albersheim, 1985) o de sustancias producidas en respuesta a patógenos.

1.2 Componentes de la Pared Celular.

La pared celular está compuesta de proteínas, lignina, agua y, principalmente de polisacáridos, los cuales son el enfoque de este estudio. Esta estructura de soporte contiene una gran diversidad de azúcares que constituyen polímeros y que es posible encontrarlos en su forma D- o L- (por ejemplo L-galactosa o D-galactosa). Los azúcares pueden, a su vez, estar ligados en forma lineal o formando ramificaciones mediante enlaces α - y β - y pueden sufrir acetilaciones, metil-esterificaciones, etc, lo que añade una alta variedad en cuanto a la composición de la pared celular vegetal. Como fue mencionado anteriormente, la celulosa es el principal componente de la pared celular. Este polisacárido es un polímero insoluble y lineal compuesto de unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces β (1 \rightarrow 4). Las cadenas de celulosa que se forman por fuerzas de van der Waals y por puentes de hidrógeno se agrupan generando las denominadas microfibrillas. En menor proporción, se encuentran las hemicelulosas y pectinas que son polímeros más solubles y que, por lo general, no forman microfibrillas debido a las ramificaciones y modificaciones que sufren (ej: esterificación). Las hemicelulosas son las encargadas de unir estas microfibrillas de celulosa entre sí, formando un entramado muy complejo. En dicotiledóneas, la principal hemicelulosa es el xiloglucano. Este polímero comparte el mismo esqueleto que la celulosa, y aproximadamente un 75% de los residuos de glucosa están unidos a D-xilosa (Handford, 2006). A los residuos de xilosa se encuentra unido por lo general D-galactosa y, en menor cantidad, L-fucosa.

Las pectinas son otro componente importante de la pared celular ya que forman una matriz que le otorga flexibilidad a la pared. Dentro de las pectinas se encuentra el homogalacturonano, el cual es un polímero de ácido D-galacturónico ligado mediante enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$; el ramnogalacturonano I (RG-I) compuesto de unidades alternantes de L-ramnosa $\alpha(1\rightarrow2)$ y ácido D-galacturónico $\beta(1\rightarrow4)$ que, a diferencia del homogalacturonano, posee ramificaciones con cadenas laterales de $\alpha(1\rightarrow5)$ L-arabinano y $\beta(1\rightarrow4)$ D-galactano el cual puede estar o no arabinosilado. El tamaño de estas cadenas laterales es un factor clave en la porosidad de la pared celular. Otra de las pectinas a destacar es el ramnogalacturonano II (RG-II; Figura 1) que posee un esqueleto igual al homogalacturonano pero con una elevada composición de cadenas laterales (posee 4 cadenas: A-D) que contienen más de 10 azúcares distintos unidos entre sí por alrededor de 20 tipos de enlaces diferentes (O'Neill et al, 2004). Fuera de las interacciones covalentes que existen entre estas tres pectinas, RG-II establece una interacción no covalente mediada por iones borato, formando dímeros en la pared celular de *Arabidopsis thaliana* (O'Neill et al, 2001).

Otro componente no menos importante de la pared celular son las proteínas. La mayoría de ellas son glicoproteínas y se clasifican según el aminoácido prioritario en su estructura: (1) ricas en hidroxiprolina o HPRG; (2) ricas en prolina o PRP; y (3) enriquecidas en glicina o GRP. La función de estas proteínas es estructural, así por ejemplo algunas funcionan como andamios para la deposición de la lignina. Otro grupo de proteínas son las proteínas arabinogalactanos (AGP), altamente glicosiladas con

sintetizado en el retículo endoplasmático, posteriormente N-glicosilado en el aparato de Golgi y, finalmente, exocitado hacia la membrana plasmática.

Para los polisacáridos no-celulósicos, las enzimas encargadas de la elongación de las cadenas de glicanos y de formar las ramificaciones son llamadas glicosiltransferasas. Estas enzimas son proteínas de membrana que se encuentran en el aparato de Golgi y requieren como sustrato, azúcares activados en forma de nucleótidos azúcares, comúnmente UDP- o GDP-azúcares (Feingold and Avigad, 1980). Existen glicosiltransferasas de dos tipos involucradas en la síntesis de la pared celular: (1) proteínas de membrana tipo II que se encuentran ancladas a la membrana por su extremo N-terminal y cuyo sitio catalítico se encuentra en su extremo C terminal (Wulff et al, 2000). Estas enzimas son las encargadas de agregar residuos de azúcares a las glicoproteínas y la mayoría de los polisacáridos no celulósicos. Se han descrito una serie de mutantes en genes que codifican para estas enzimas demostrando la actividad mencionada. Así por ejemplo, la mutante *mur3* de *Arabidopsis* presenta menor cantidad de L-fucosa y la mutación se encuentra en una fucosiltransferasa específica de xiloglucano (Reiter et al, 1997); y (2) proteínas con múltiples dominios transmembrana tipo III las cuales captan el nucleótido-azúcar del citoplasma, transfieren el azúcar al polisacárido naciente y lo liberan hacia el lumen del aparato de Golgi. Estas enzimas también son llamadas enzimas tipo celulosa sintasa (CSL), dado su similitud funcional, y de secuencia con las celulosas sintasas de la membrana plasmática. Además, se ha descrito que son capaces de sintetizar polisacáridos que contienen un esqueleto similar al de la celulosa. Dentro de los polisacáridos que sintetizan se encuentra el xiloglucano,

galactano, xilano y manano. En *Arabidopsis* se han descrito 8 familias de CSLs que intervienen principalmente en la síntesis de mananos (Liepman et al, 2005).

Los sustratos utilizados por ambos tipos de glicosiltransferasa son nucleótidos azúcares. El nucleótido unido al azúcar en particular no sólo participa en la “activación” del azúcar, sino que también es importante para la destinación final del azúcar. Por ejemplo el residuo de D-glucosa encontrado en el xiloglucano es suministrado a partir de UDP-D-glucosa, mientras que para el glucomanano es suministrado a partir de GDP-D-glucosa. Todos los nucleótidos azúcares cuya unidad nucleotídica es GDP como GDP-D-manosa, GDP-L-fucosa, GDP-D-glucosa y GDP-L-galactosa son sintetizados en el citoplasma (Seifert, 2004), mientras que algunos de los UDP-azúcares son sintetizados en el lumen del aparato de Golgi.

Analizando esta información, surge la necesidad de que la célula vegetal tenga proteínas que sean capaces de transportar los nucleótidos-azúcares sintetizados en el citoplasma hacia el lumen del aparato de Golgi en donde se encuentra el sitio activo de las glicosiltransferasas tipo II. Las proteínas que cumplen esta función son los denominados transportadores de nucleótido-azúcar o TNAs.

1.4 Transportadores de nucleótido azúcar (TNAs).

A nivel bioquímico los TNAs funcionan como transportadores antisentido que acoplan la salida del nucleósido monofosfato correspondiente, a la entrada del nucleótido-azúcar (Figura 2). Los nucleósidos monofosfatos son formados por la acción de una nucleósido difosfatasa que hidrolisa el producto de la reacción catalizada por las glicosiltransferasas (Orellana et al, 1997). En el genoma de *Arabidopsis* existen al menos 20 TNAs (Norambuena et al, 2002), sin embargo, hasta el día de hoy, en

Arabidopsis sólo se han caracterizado TNAs capaces de transportar GDP-D-manosa, UDP-D-glucosa y UDP-D-galactosa (Norambuena et al, 2002; Norambuena et al, 2005; Baldwin et al, 2001; Rollwitz et al, 2006; Bakker et al, 2005). Sin embargo, y dado que se requiere del transporte de hasta 12 nucleótidos azúcares para completar la síntesis de todos los componentes de la pared celular, es muy probable que los otros TNAs que no han sido caracterizados sean capaces de transportar otro tipo de nucleótidos-azúcares. Se han generado algunas líneas de plantas de *Arabidopsis* mutantes de TNAs que demuestran que mutaciones en estos genes pueden provocar severos efectos en el crecimiento y en las etapas de desarrollo (Handford et al, 2006). En conjunto con esto, los TNAs pueden regular la síntesis de moléculas específicas. Por ejemplo células humanas con un transportador de GDP-D-fucosa deficiente pierden la fucosilación de proteínas y glicolípidos (Sturla et al, 2006).

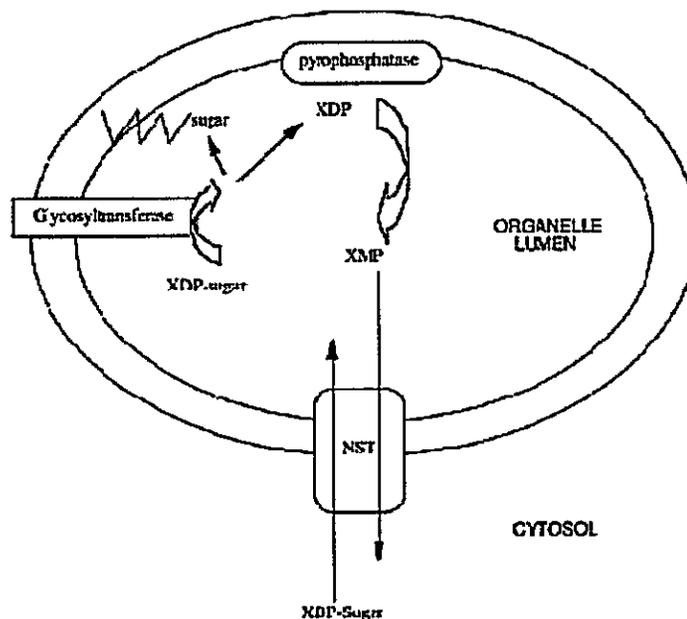


Figura 2: Modelo general de transporte mediado por un TNA. El azúcar-XDP entra al lumen del aparato de Golgi acoplado a la salida de un nucleósido monofosfato (XMP) el cual es producido por la acción de una pirifosfatasa ubicada en la membrana del organelo. La glicosiltransferasa tipo II es la encargada de transferir el azúcar a la cadena naciente, proteína o lípido, liberando así el nucleósido difosfato (Extraída de Martínez-Duncker et al, 2003).

Los TNAs pertenecen a la superfamilia de transportadores de drogas/metabolitos. En plantas, esto incluye el traslocador plastídico de triosa-fosfato (TPT) y otros traslocadores de fosfato relacionados (Knappe y cols., 2003).

En cuanto a su funcionalidad, la mayoría de los TNAs descritos son monoespecíficos, pero algunos son capaces de transportar más de un nucleótido azúcar (Hong et al, 2000; Norambuena et al, 2002). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito un TNA capaz de transportar UDP y GDP-azúcares en ningún organismo.

1.5 Familia de transportadores GONST.

Cuando se obtuvo la secuencia de un TNA de *Arabidopsis* que se localizaba en el aparato de Golgi y que era capaz de transportar GDP-D-manosa (GONST1; Baldwin et al, 2001), se realizó un BLAST con su secuencia contra el genoma de *Arabidopsis* y se encontraron otros 4 posibles transportadores de GDP-azúcares del aparato de Golgi en *Arabidopsis* (Handford y col, 2004). Todos poseen entre 300 y 350 aminoácidos y se predice que tendrían entre 9 y 10 dominios transmembrana. Poseen un motivo característico de unión a GDP altamente conservado; GX(L/V)NK (Gao et al, 2001) y tienen residuos NK conservados de antiporte o de unión a nucleósidos monofosfatos en el extremo carboxilo terminal. Los miembros de esta familia fueron denominados GONST2, 3, 4 y 5 y en estudios han sido agrupados en tres clados: GONST1 con GONST2, GONST3 con GONST4, y GONST5 con otras 6 proteínas no caracterizadas (Handford et al, 2004). Al expresar GONST1, GONST4 y GONST5 fusionados a la proteína fluorescente verde (GFP) transitoriamente en tabaco, se les encuentran localizados en el aparato de Golgi y es muy probable que los otros dos TNAs también se localicen en este organelo. Vrg4p de *Saccharomyces cerevisiae* es un TNA de GDP-D-

manosa, y la cepa mutante (*vrg4-2*) es deficiente en el transporte de GDP-D-manosa y presenta dos fenotipos asociados a esta mutación: sensibilidad a higromicina B y reducción de la glicosilación en la quitinasa extracelular (Dean et al, 1997). Los resultados de un ensayo de complementación funcional de la familia GONST expresada en *vrg4-2* mostraron que sólo GONST1 y GONST2 fueron capaces de complementar ambos fenotipos, indicando que GONST2 es un transportador de GDP-D-manosa, mientras que GONST3, 4 y 5 fueron capaces de revertir sólo la sensibilidad al antibiótico, mostrando que son capaces de transportar GDP-D-manosa a través del aparato de Golgi, pero con una menor eficiencia.

1.6 GONST4 un posible transportador de GDP-L-galactosa.

Tal como fue mencionado, GONST4 es un transportador de nucleótido azúcar de *Arabidopsis* que se localiza en el aparato de Golgi. Posee 341 aminoácidos de los cuales más de un 40% son de carácter hidrofóbico, lo cual reafirma su condición de proteína de membrana. Junto a esto, dentro de su secuencia posee el sitio de unión a GDP (G₂₆₄VVVK₂₆₈).

Con relación al sustrato que esta proteína es capaz de transportar, aún no se ha realizado ningún ensayo que lo determine. Sin embargo, se sabe que dentro de los posibles GDP-azúcares que pueda transportar, los que las plantas utilizan son GDP-L-fucosa, GDP-D-manosa, GDP-D-glucosa y GDP-L-galactosa (Feingold y Avigad, 1980). En particular este último nucleótido azúcar resulta de particular interés debido a que hasta la fecha no se ha descrito algún TNA en ningún organismo que lo utilice como sustrato. Además, la síntesis de glucomanano es el único requerimiento en el aparato de Golgi para GDP-D-manosa y GDP-D-glucosa. Se demostró *in vitro* que la biosíntesis de

ambas hemicelulosas es realizada por glicosiltransferasas tipo celulosa sintasa (CSL), capaces de captar GDP-D-manosa y GDP-D-glucosa desde el citoplasma, transferirlas al lumen del Golgi y al mismo tiempo catalizar la reacción de síntesis de estos polisacáridos (Liepmann y cols., 2005). Por lo tanto, debido a que existen otras proteínas encargadas de transportar GDP-D-manosa y GDP-D-glucosa, los posibles sustratos *in vivo* de GONST4 se limitarían a GDP-L-fucosa y/o GDP-L-galactosa.

Está demostrado (Rehus et al, 2004) que L-galactosa es un componente importante de la pared celular primaria de las plantas y que la mayoría de este azúcar, si no toda la L-galactosa de la pared celular primaria, se encuentra localizada en la cadena A de ramnogalacturonano II (RG-II; Figura 1). En conjunto con esto, los mismos estudios demostraron que en la mutante *mur1* de *Arabidopsis* que posee un defecto en la enzima que convierte GDP-D-manosa en GDP-L-fucosa, reemplaza en el xiloglucano, en glicoproteínas y en toda la estructura de RG-II, los residuos de L-fucosa por L-galactosa produciéndose un fenotipo con múltiples defectos en la pared celular (O'Neill et al, 2001).

En conjunto a esto, GDP-L-galactosa es requerido también para la síntesis de ácido ascórbico (vitamina C) en plantas, incluyendo *Arabidopsis* (Seifert y Roberts 2004). Las funciones del ácido ascórbico son principalmente funcionar como antioxidante y como cofactor enzimático. Sumado a esto, cumple un rol importante en procesos como la fotosíntesis, foto-protección, resistencia al estrés, control del crecimiento celular y en la biosíntesis de hormonas (Davey et al, 2000; Conklin y Barth, 2004).

1.7 Consideraciones experimentales.

Dentro de la ruta de biosíntesis del ácido ascórbico existe una etapa limitante: la conversión de GDP-D-manosa en GDP-L-galactosa. Esta reacción es catalizada por una enzima denominada GDP-D-manosa 3'5' epimerasa (GME). La enzima GME es capaz de realizar la epimerización de los carbonos 3 y 5 de la D-manosa produciendo GDP-L-galactosa y como producto secundario GDP-L-gulosa que resulta de una epimerización incompleta que sólo ocurre en el carbono 5 (Major et al 2005). GDP-D-manosa se encuentra disponible comercialmente, pero tanto GDP-L-galactosa no marcada como marcada radioactivamente, no lo está. Tomando esto en consideración, la reacción catalizada por GME es una opción viable para sintetizar GDP-L-galactosa, y luego purificarlo mediante HPLC. Sin embargo, luego de la purificación se hace necesario comprobar que el producto formado y purificado realmente corresponde a GDP-L-galactosa. Una forma de verificar esto es utilizando la técnica " Análisis de polisacáridos usando gel de electroforesis de azúcares " (PACE). Esta metodología permite agregar un fluoróforo a monosacáridos reductores y separarlos por electroforesis en geles de poliacrilamida (Goubet et al, 2002) para su identificación contra estándares comerciales.

Debido a la importancia que posee la pared celular para las diversas funciones celulares, resulta de gran importancia estudiar en detalle los componentes de ella y sus mecanismos de síntesis y regulación. Con este objetivo en mente, resulta sumamente interesante tener una mayor comprensión de los TNAs. En esta memoria de título se abordó algunos temas para caracterizar funcional y estructuralmente GONST4. En relación a la parte estructural se realizaron predicciones *in silico* para determinar la estructura terciaria de la proteína. Se comenzó con predicciones sobre la estructura

secundaria de la proteína con herramientas bioinformáticas para dar soporte a las predicciones de dominios transmembrana que se generaron posteriormente y que, a su vez, generaron preguntas sobre el número de dominios transmembrana que esta proteína posee. Para responder a éstas, se desarrolló una estrategia molecular que consistió en generar vectores con epítopes (GFP y una secuencia FLAG) en los extremos N terminal de la proteína para que sea posible estudiar la orientación de este extremo y así validar uno de los modelos de dominios transmembrana. Además, se desarrolló la herramienta para generar el vector con un epítope en el extremo C terminal. En cuanto a la caracterización funcional de la proteína se generó una filogenia de distintos TNAs con distintas especificidades de sustrato, se sintetizó y purificó GDP-L-galactosa que posteriormente se utilizó para ensayos de transporte, mostrándose por primera vez un TNA capaz de transportar GDP-L-galactosa. De esta manera se da comienzo a la caracterización de la topología de membrana que posee esta proteína y se da pie a la comprensión del mecanismo a través del cual opera y las regiones de la secuencia que podrían ser importantes para el transporte de GDP-L-galactosa.

2. OBJETIVOS.

OBJETIVOS GENERALES.

- 1-. Desarrollar herramientas moleculares que permitan identificar la localización subcelular del extremo N terminal de GONST4.
- 2-. Implementar y desarrollar una metodología de síntesis de GDP-L-galactosa marcada radioactivamente para ser utilizada posteriormente en ensayos de transporte.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1.a) Realizar predicciones *in silico* sobre la estructura secundaria y terciaria de GONST4 y generar un árbol filogenético para determinar las relaciones que existen entre los distintos TNAs y GONST4.
- 1.b) Generar un vector molecular que posea la secuencia FLAG y otro que posea la secuencia codificante de GFP en el extremo N-terminal de GONST4.
- 2.a) Diseñar un protocolo de HPLC mediante el cual sea posible separar GDP-D-manosa de GDP-L-galactosa.
- 2.b) Sintetizar y purificar GDP-L-galactosa y GDP-[¹⁴C]-L-galactosa mediante reacciones con la enzima GDP-manosa 3,5 epimerasa (GME) usando GDP-D-manosa no-marcada, y luego marcada radioactivamente como sustrato.
- 2.c) Realizar ensayos de transporte con vesículas de Golgi extraídas de hojas de tabaco infiltradas con los vectores desarrollados en el objetivo 1.b) utilizando como sustrato GDP-[¹⁴C]-L-galactosa sintetizada previamente (2.b).

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Análisis bioinformático.

3.1.1 Predicción de dominios transmembrana en GONST4.

Para la predicción de dominios transmembrana (DTM) de los distintos TNAs se utilizaron 3 herramientas distintas: (1) TMPRED (www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html); (2) TMHMM v 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) y; (3) HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>). Tomando en cuenta los resultados que estas herramientas entregaron, se procedió a analizar la estructura secundaria de la proteína utilizando JPRED 3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>) para ver si ésta concordaba con los DTM predichos.

3.1.2 Construcción del árbol filogenético.

Se realizó un BLAST y un PSI-BLAST (Altschul et al, 1990) con la secuencia de GONST4 (NCBI accesion: 29329823) hasta llegar a la convergencia y luego se seleccionaron secuencias con un e-value $< 10^{-4}$. En este punto se eliminaron secuencias por los siguientes criterios: (a) secuencias parciales y (b) inclusión de una secuencia en otra. Una vez seleccionadas las secuencias, se realizó un alineamiento mediante CLUSTALX (Higgins et al, 1994) y se generaron árboles tentativos con SplitsTree4 utilizando el algoritmo de Neighbor Joining (NJ) con 1000 repeticiones para descartar secuencias que dieran valores Bootstrap inferiores a 50. Finalmente, con las 60 secuencias escogidas se generó el árbol filogenético utilizando el software MrBAYES

versión 3.1.2 (Ronquist et al 2003) el cual utiliza un algoritmo basado en el método bayesiano. Se utilizó como número de generaciones (nfreq) 1.000.000 y una frecuencia de muestreo (samplefreq) de 1.000. El modelo evolucionario utilizado fue el modelo mixto.

3.1.3 Búsqueda de residuos determinantes para la especificidad (SDRs).

Una vez obtenido el árbol filogenético se procedió a utilizar el alineamiento y la información sobre las familias obtenidas para obtener información acerca de los residuos importantes para la función de la proteína. Para esto se utilizó la herramienta disponible en el sitio: <http://mutations.mit.edu/SDR>.

3.2 Síntesis de GDP-L-galactosa.

La enzima GDP-D-manosa 3,5' epimerasa (GME) posee la capacidad de convertir GDP-D-manosa en GDP-L-galactosa (Major et al, 2005). Previamente se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la U. de Chile una cepa de *Escherichia coli* que produce esta enzima recombinante luego de ser inducida vía IPTG. Para el trabajo posterior se utilizó un extracto crudo de esta enzima recombinante.

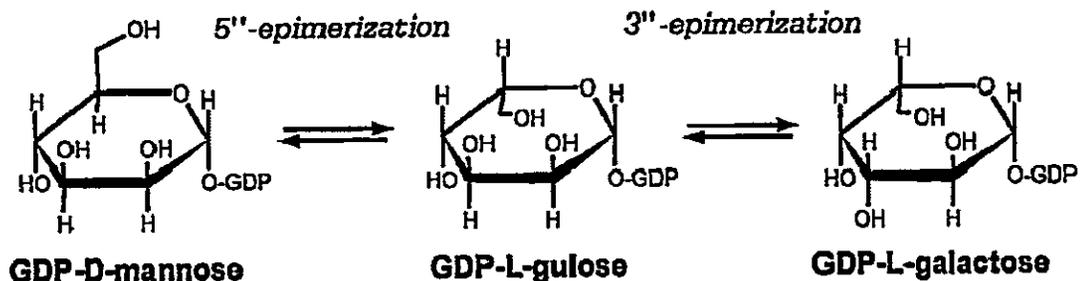


Figura 3: Esquema de reacción catalizada por GME. La reacción ocurre en dos pasos. En primer lugar se produce una epimerización en el carbono 5' dando lugar a un producto intermedio (GDP-L-gulosa) y luego una epimerización en el carbono 3' dando lugar a GDP-L-galactosa.

3.2.1. Reacciones enzimáticas con GDP-D-manosa 3,5' epimerasa.

Se realizaron dos tipos de reacciones dependiendo de si el sustrato estaba o no marcado radioactivamente. Para las reacciones sin radioactividad se utilizó un volumen final de 50 μL que contiene 75 μg de proteína de un extracto crudo de *E.coli* que contiene la enzima, GDP-D-manosa 150 μM y buffer Tris-HCl 50 mM pH=8,0. En el caso de las reacciones con marca, se utilizó un volumen final de 150 μL que contiene GDP-[U- ^{14}C]-manosa (GE Healthcare) 150 μM (282 mCi/mmol), 75 μg de extracto crudo de la enzima y buffer Tris-HCl 50 mM pH=8,0. A continuación las reacciones fueron incubadas en baño termoregulado a 21 $^{\circ}\text{C}$ durante 8 horas. Se eliminó el extracto enzimático, con el fin de eliminar el ruido del espectro, mediante filtros Amicon YM-3 que atrapan moléculas con un peso mayor a 3 kDa. Las reacciones fueron traspasadas al filtro y luego centrifugados a 20 $^{\circ}\text{C}$ a 25.000 g durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo, el filtrado fue almacenado a -20 $^{\circ}\text{C}$ o utilizado inmediatamente.

3.2.2. HPLC de fase reversa con par iónico.

Se utilizó un sistema Waters de HPLC que consiste en el modelo N°626 de bombas, un controlador de 600S y un detector UV modelo 2487. Los buffers fueron preparados con agua nanopura filtrada y los nucleótidos azúcar fueron resueltos en una columna Purospher STAR RP18 endcapped (0.46 x 25 cm; Merck) con un flujo de 1 mL/min. En primer lugar, durante 5 min se utilizó un flujo isocrático de acetonitrilo 1% en buffer TEAA 20 mM pH=6,0. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó un gradiente lineal desde 1-2,5% de acetonitrilo en buffer TEAA 20 mM durante 20 min y finalmente la columna fue lavada con 4% de acetonitrilo en buffer TEAA 20 mM por 10 minutos. El

efluente fue monitoreado en dos canales con un detector UV a 254 nm y el otro a 280 nm. Previamente a cada corrida la columna se activó lavando durante 30 minutos con acetonitrilo al 10%, luego se realizó un gradiente lineal de 10 minutos desde acetonitrilo 10% en buffer TEAA 20 mM pH=6,0 hasta acetonitrilo 1% en buffer TEAA 20 mM pH=6,0 para finalmente equilibrar durante 20 minutos con esta última condición. Si al final de este tiempo el detector de absorbancia se mantenía constante, se procedía a cargar las muestras al aparato; en caso contrario, se seguía equilibrando hasta alcanzar este estado de equilibrio. Las fracciones de interés fueron colectadas cada 1 minuto desde los 11 hasta los 17 minutos de cada corrida e identificadas en el caso de las reacciones con marca radioactiva, por su aparición en el espectro y por el número de cuentas en el contador de centelleo. Para esto último, se tomaron 2 µL de cada fracción y se diluyeron en 4 mL de líquido de centelleo (Ecosint A; National Diagnostics, Atlanta, GA). Una vez identificadas las fracciones, fueron secadas al vacío en SpeedVac y luego resuspendidas en agua nanopura (50 µL de agua por cada 100 pmoles).

3.2.3. *PACE (Polysaccharide Analysis using Carbohydrate gel Electrophoresis).*

Se utilizó esta técnica para verificar la identidad de los nucleótidos azúcares purificados por HPLC (Goubet et al, 2002).

a) Hidrólisis y derivatización con 2-aminoacridona (AMAC).

En primer lugar, para liberar el azúcar del nucleótido, se realizó la hidrólisis del nucleótido-azúcar en HCl 0,1 M durante 10 minutos a 100 °C (Paladini y Leloir, 1952) con las fracciones colectadas del HPLC. Una vez realizado este tratamiento, se procedió a derivatizar los azúcares con el fluoróforo AMAC (Figura 4). Para esto se tomaron 5 µL

de cada uno de los azúcares (estándares de manosa y galactosa 1 mM; fracciones correspondientes a GDP-D-manosa y GDP-L-galactosa de la sección 3.2.2 hidrolizada) y fueron secados completamente al vacío. Una vez secados se agregó a cada tubo 5 μ L de NaCNBH₃ (1 M, preparado en el momento) y 5 μ L de AMAC (0,1 M, en ácido acético/DMSO, 3/17, v/v) y esta mezcla fue incubada 8 hrs. a 37 °C en oscuridad. La solución fue secada nuevamente al vacío y luego los azúcares derivatizados se resuspendieron en 100 μ L de urea 6 M y fueron guardados a -20 °C siendo estables por al menos 6 meses en estas condiciones.

PACE

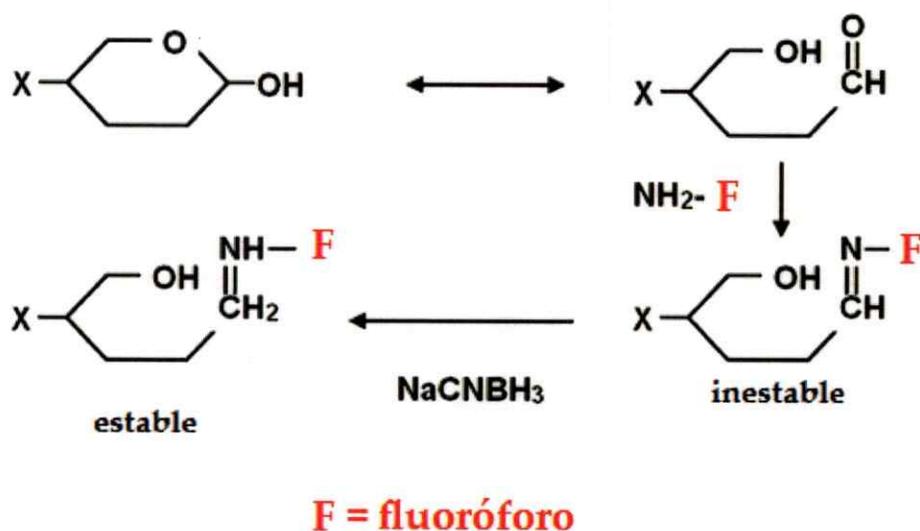


Figura 4: Principio de derivatización de los azúcares. X representa un grupo OH- para monosacáridos o un azúcar para el caso de oligosacáridos. El fluoróforo se liga al azúcar mediante un ataque nucleofílico al grupo ceto formando un intermediario inestable que es rápidamente estabilizado por la adición de cianoborato de sodio.

b) Electroforesis. (modificada de Goubet et al 2002).

Se preparó un gel con 8 mL de solución separadora al 20% (19,4% acrilamida y 0,6% N,N'-metilen-bis-acrilamida) que contiene Tris-borato 0,5 M pH =8,2, persulfato de amonio (APS) 0,1%, N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) 0,1% y urea 30% (p/v); y 2 mL de una solución concentradora al 5% (4,9% acrilamida y 0,1% N,N'-metilen-bis-acrilamida) que contenía Tris-borato 0,5 M pH =8,2, APS 0,1%, TEMED 0,1% y urea 46% (p/v). Las dimensiones del gel eran 140 mm de largo y 0,5 mm de espesor con carriles de 15 mm de ancho. Una vez polimerizado el gel, se procedió a cargar 10 µL de cada muestra y para observar el frente de migración se cargó 2 µL de azul de bromofenol en otro carril. Se utilizó como buffer de corrida Tris-borato 0,1 M pH=8,2 y las muestras fueron corridas a 100 V durante 30 min., luego a 200 V durante 30 min. y finalmente a 500 V por 60 min. Durante la electroforesis la cámara se mantuvo en hielo y dentro de un refrigerador a 4 °C. Para visualizar el gel se utilizó un transiluminador UV (longitud de onda 360 nm) y la imagen fue capturada con una cámara digital.

3.3 Generación de vectores pGWB12-G4 y pMDC43-G4.

3.3.1 PCR de GONST4.

Para las reacciones de PCR de GONST4 se utilizó 0,5 U de Taq DNA polimerasa (Fermentas) en Buffer 1X, MgCl₂ 5 mM, dNTPs 0,2 mM, partidores G4F3 y G4R3 (ver tabla I) 0,5 µM, 1 µL de molde correspondiente y agua hasta completar 20 µL. El programa utilizado para la reacción está descrito en la tabla II (PCR GONST4 ORF). Como control positivo de PCR se utilizó plasmido secuenciado que contiene el gen de GONST4 (pTOPO-G4O, R. Caroca)

Tabla I. Partidores utilizados en las reacciones de PCR.

| Nombre | Secuencia | Descripción |
|----------|---|--|
| G4F3 | 5'- <u>ATG</u> TCG TCC TCT CGA TTC GAT TC -3' | Secuencia que amplifica GONST4 desde el codón de inicio del gen (subrayado). |
| G4R3 | 5'- <u>TCA</u> TAC AAC AGA AGC TAG TTT CCC -3' | Secuencia que amplifica GONST4 desde el codón de término (subrayado). Si se amplifica con G4F3 amplifica el gen completo desde el codón de inicio hasta el codón de termino (1026 pb). |
| GAPA F | 5'- GGT AGG ATC GGG AGG AAC -3' | Secuencia utilizada para verificar la integridad del cDNA. Hibrida con una región 5' interna de la secuencia de la gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa. |
| GAPA R | 5'- CTG GTG CCA AGA AGG TTA TC 3' | Secuencia utilizada para verificar la integridad del cDNA. Hibrida con una región 3' interna de la secuencia de la gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa. Con GAPA F produce un amplicón de 400 pb. |
| Oligo AP | 5'- CGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T -3' | Secuencia utilizada para la reacción de RT. Hibrida con la cola de poliadenina de los RNA _m . |

Tabla II. Programas utilizados para amplificar GONST4 y GAPA (a) y para la reacción de transcripción reversa (b).

a) GONST4 ORF.

| Estado | Paso | Temperatura | Tiempo | Nº de ciclos |
|-----------------|------|--|--------|--------------|
| 1-. "Hot Start" | 1 | 94°C | 5 min | 1 |
| | 1 | 94°C | 30 seg | |
| 2-. Reacción | 2 | 64°C (<i>gonst4</i>) 58°C (<i>gapa</i>) | 30 seg | 30 |
| | 3 | 72°C | 40 seg | |
| 3-. Terminación | 1 | 72°C | 10 min | 1 |
| | | 4°C | ∞ | |

b) Programa RT.

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

3.3.2 Visualización de DNA y RNA mediante electroforesis.

La integridad del DNA y RNA total se analizó en un gel de agarosa al 1% (p/v), el cual fue preparado con buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH=8) y bromuro de etidio 1 µg/mL. Se mezcló cada muestra con buffer de carga [Azul de bromofenol 0.25% (p/v), xylene cyanol 0.25% (p/v) y glicerol 80% (v/v)] en una proporción 1:6. El gel se corrió en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X a una diferencia de potencial de 100 V durante aproximadamente 20 min. La visualización se llevó a cabo en una cámara oscura equipada con un trans-iluminador UV (GeneGenius Classic de SynGene®).

3.3.3 Clonamiento de GONST4 en pCR8®/GW/TOPO®.

El vector pCR8®/GW/TOPO® (Invitrogen) es un vector de entrada del sistema Gateway®, posee resistencia a espectinomicina y tiene los sitios de recombinación del bacteriófago λ: attL1 y attL2 (Figura 5). La ligación que ocurre con este vector es del tipo TA y se produce por la hibridación que se produce entre las timinas libres que posee el vector en el extremo 5' y las adeninas libres que deja *Taq*

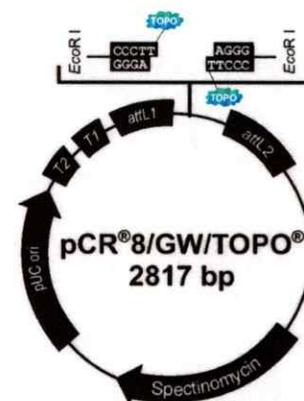


Figura 5: esquema del vector pCR8®/GW/TOPO®.

polimerasa en el extremo 3' del producto PCR.

Para la reacción se utilizaron 4 μL del producto de PCR de *GONST4*, 1 μL de solución salina (1,2 M NaCl + 0,06 M MgCl_2) y 1 μL del vector. La mezcla se incubó por 30 minutos a 25 °C. Luego de este tiempo, se tomaron 3 μL de esta reacción para guardar a -20°C y los otros 3 μL se utilizaron para transformar *E. coli DH5a*. Los transformantes fueron seleccionados en placas de LB-agar (1,6% agar, 1% NaCl, 1% triptona y 0,5% de extracto de levadura) + espectinomicina a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.3.4 Crecimiento y transformación de *E. coli DH5a*.

Se tomó una alícuota (~150 μL) de células de *E. coli DH5a* químicamente competentes y se le agregó 3 μL del producto de la sección precedente. Una vez mezclados ambos componentes, el tubo fue incubado en hielo por 45 minutos y a continuación se a 42 °C por 1,5 minutos y luego dejarlas nuevamente en hielo. Inmediatamente se agregó al tubo 1 mL de medio LB (1% NaCl, 1% triptona y 0,5% de extracto de levadura) y se incubaron las células por 1 hora a 37 °C para luego sembrarlas en el medio de selección correspondiente (LB-agar + antibiótico adecuado) e incubarlas 8 hrs. a 37 °C.

3.3.5 Mini-preparaciones de DNA plasmidial.

Las colonias de bacterias que se analizaron, fueron crecidas en 5 mL de medio LB líquido con el antibiótico adecuado. De los 5 mL, 1 mL fue guardado en stock con glicerol al 20% a -80 °C como respaldo. Los plásmidos bacterianos fueron aislados de los 4 mL restantes, mediante mini-preparaciones siguiendo las instrucciones del

fabricante (AxyPrep Plasmid Miniprep Kit, Axygene®, N° de catalogo AP-MN-P-250). Finalmente, se resuspendieron los plásmidos en 35 μ L de una solución de 2,5 mM Tris-HCl, pH=8,5.

3.3.6 Confirmación de transformación de *E. coli* y *A. tumefaciens*.

En el caso de *E. coli*, el DNA plasmidial obtenido es lo suficientemente abundante para poder digerirlo con endonucleasas en los pasos de clonación y verificación. Por el contrario para *A. tumefaciens*, debido al menor número de copias de sus plásmidos y la poca eficiencia de extracción, la cantidad de DNA plasmidial extraído no es suficiente como para realizar pruebas con endonucleasa, pero si suficiente para servir como molde en reacciones de PCR.

La confirmación de que el vector poseía el inserto correspondiente fue realizada por dos métodos: (1) verificación mediante PCR y (2) digestión enzimática con *HpaI*. Para el primer método se utilizó el protocolo de PCR ya descrito (sección 3.3.1), mientras que para la restricción se utilizó 10 U de la enzima *HpaI* en buffer Neb4 1X y aproximadamente 100 ng del vector completando con agua a un volumen final de 20 μ L. La mezcla se dejó incubó a 37 °C durante 1 hora. Las colonias positivas fueron denominadas pCR8-GONST4 y guardadas a -80 °C en glicerol 20%.

3.3.7 Recombinación con *pMDC43* y con *pGWB12*.

Se utilizaron 2 vectores de destinación del sistema Gateway® para recombinar con pCR8-GONST4: (1) vector pMDC43 (Curtis et al 2003) que posee sitios attR1 y attR2, resistencia a kanamicina, en su extremo 5' posee 2 promotores fuertes y constitutivos 35S del virus mosaico del coliflor seguidos por la región codificante de la

proteína fluorescente verde (GFP) y; (2) vector pGWB12 (Nakagawa 2007) que también posee los sitios attR1 y attR2, resistencia a kanamicina, promotor 35S y la secuencia FLAG (DYKDDDDK) en su extremo 5'. Para cada una de las reacciones, se utilizó 150 ng del vector de entrada (pCR8-GONST4), 150 ng del vector de destinación, buffer de reacción LR clonasa 1X y buffer TE pH=8,0 hasta completar 16 μ L. Una vez mezclados los componentes, se agregó 4 μ L del "mix" enzimático de LR clonasa que se mantuvo todo el tiempo en hielo. La reacción fue incubada durante 1 hora a 25 °C y luego se detuvo agregando 2 μ L de Proteinasas K a cada tubo seguido por una incubación de esta reacción a 37 °C durante 10 minutos. Una vez realizado esto, se procedió a transformar células de *E. coli* DH5 α químicamente competentes que luego fueron sembradas en medio LB-agar Kan 100 μ g/mL e incubadas O.N. a 37 °C.

3.3.8 Confirmación de la recombinación.

La recombinación fue confirmada mediante dos métodos: (1) PCR de *GONST4* y; (2) digestión enzimática. Para el primer método se utilizó el protocolo de PCR ya descrito (sección 3.3.1). Para el análisis del vector pMDC43-G4 se utilizó 10 U de la enzima *PstI* en buffer 1X, aproximadamente 150 ng del vector y agua hasta completar 20 μ L. La reacción fue incubada a 37 °C durante 1 hora. En el caso del análisis del vector pGWB12-GONST4 se utilizaron 10 U de la enzima *EcoRI* en buffer 1X, aproximadamente 100 ng del vector y agua hasta completar 20 μ L. La reacción fue incubada a 37 °C durante 30 minutos. Las colonias positivas fueron guardadas a -80 °C en glicerol 20%.

3.3.9 Generación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*.

Se inoculó *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 en 5 mL de medio LB (1% NaCl, 1% triptona y 0,5% de extracto de levadura) con los antibióticos rifampicina (10 µg/ml) y gentamicina (50 µg/ml) para la selección del DNA cromosómico y del plásmido Ti, respectivamente. Luego se incubó a 28 °C con agitación durante toda la noche. Al día siguiente se inocularon 4 mL de este cultivo en 100 ml de LB con los antibióticos antes mencionados a la concentración indicada. Se incubó este cultivo hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,5, se incubó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 3.000 g por 20 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 1 mL de CaCl₂ 20 mM (estéril y a 4 °C). Se realizaron alícuotas de 100 µL de esta suspensión y se congelaron en nitrógeno líquido. Finalmente se guardaron a -80 °C hasta ser utilizadas. Todo este procedimiento fue realizado en condiciones de esterilidad.

3.3.10 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

Se descongeló una alícuota de 200 µl de *A. tumefaciens* competente en hielo. Se le agregaron 200 ng del plásmido (pMDC43-G4 o pGWB12-G4) y se incubó en hielo por 20 minutos. Pasado este tiempo, el tubo fue congelado durante 5 minutos en nitrógeno líquido, luego se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos más y se agregó 1 ml de LB. Este cultivo fue incubado a 28 °C con agitación O.N. y luego fue sembrado en medio LB-agar con Gentamicina 100 µg/mL, Rifampicina 10 µg/mL y Kanamicina 100 µg/mL e incubado por 2 días a 28 °C. Finalmente las colonias resistentes se crecieron en 5 ml de LB con antibiótico de selección a 28 °C con agitación por 24 hrs. A estos cultivos se les realizó un shock térmico en termociclador a 95°C

durante 5 minutos y luego una reacción de PCR GONST4 ORF (ver tabla II, sección 3.3.1) para verificar que las colonias resistentes correspondían a transformantes. Las colonias positivas para estas reacciones fueron guardadas en glicerol al 20% a -80 °C hasta ser utilizadas. Todo este procedimiento se realizó bajo condiciones de esterilidad.

3.4. Análisis de funcionalidad de los vectores pGWB12-G4 y pMDC43-G4.

3.4.1 Infiltración de hojas de *Nicotiana tabacum*.

Para verificar la funcionalidad de las construcciones, se procedió a infiltrar hojas de tabaco con *A. tumefaciens* portando el vector de interés. Para realizar esto, se incubó *A. tumefaciens* a 28 °C O.N. en medio LB Gentamicina 100 µg/mL, Rifampicina 10 µg/mL y Kanamicina 100 µg/mL (ya que ambos vectores poseen la misma resistencia). Luego, se centrifugó este cultivo a 5.000 g durante 5 minutos y se resuspendió el sedimento en medio de infiltración (0,5 X MS, sacarosa 20 g/L, MES 10 mM y Acetosiringona 300 µM, pH=5,7) hasta obtener una densidad óptica de 0,5. Esta solución se incubó incubando durante 2 horas con agitación a 28 °C y luego se procedió a inyectar con una jeringa hojas de *N. tabacum* variedad Xanthi, de 4 semanas de edad y crecida a 22 °C con 16 horas de luz diarias, previamente humedecida, por su parte abaxial. Luego de la infiltración, las plantas se mantuvieron a 23 °C y con 16 horas de luz diarias hasta la cosecha de las hojas, que se realizó 3 días post infiltración (d.p.i).

3.4.2 Extracción de RNA.

Se homogenizaron aproximadamente 100 mg de hojas de tabaco 3 d.p.i. en un mortero estéril con nitrógeno líquido. Una vez homogenizado el tejido, se transfirió a un tubo que contenía 1 mL de RNA-Solv®, se agregó 0,2 ml de cloroformo, se agitó en

vórtex por 10 segundos y se incubó en hielo por 10 minutos. Una vez incubado, se centrifugó por 15 minutos a 12.000 g a 4 °C. Se rescató el máximo posible de la fase superior (acuosa) para transferirla a un nuevo tubo eppendorf que contenía 500 µl de isopropanol enfriado a -20 °C. Se incubó a -20 °C por 20 minutos y luego se centrifugó por 10 minutos a 12.000 g a temperatura ambiente. Luego, el sedimento fue lavado con 1 ml de etanol 80% enfriado a -20 °C y se agitó por 10 segundos con vórtex. A continuación se centrifugó por 5 minutos a 7.500 g, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar por aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente hasta que se evaporó el etanol remanente. Finalmente se resuspendió el RNA en 30 µl de agua libre de RNAsas (DEPC) y se guardó a -20 °C hasta ser utilizado. Para determinar la calidad del RNA extraído, se corrió una muestra en un gel de agarosa 1% en buffer en TAE 1x (sección 3.3.2) y se observó la presencia de las bandas correspondientes a los RNA ribosomales de las subunidades 28 S y 18 S (en una proporción aproximada de 2:1). La cuantificación se realizó con el programa nanodrop (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis).

Tratamiento con DNAasa.

Para eliminar contaminación del RNA con DNA, se tomaron 2 µg de RNA y se agregó 1 µL buffer DNAasa + 1 µL DNAasa + 0,5 µL inhibidor de RNAasa completando el volumen hasta 10 µl con H₂O DEPC. Se incubó a 37 °C por 20 minutos y se puso en hielo. Finalmente se agregó 1 µL de EDTA DEPC 25 mM y se guardó a -20 °C.

3.4.3 RT-PCR.

Para realizar la reacción de retrotranscripción se utilizaron 5,5 µL del RNA tratado con DNAasa (1 µg) y 1 µL de oligo AP (tabla I). Esta mezcla fue dejada en el

termociclador durante 5 minutos y luego se agregó a cada tubo 13,5 μ L de "mix-RT" (Buffer Impron II 1X, $MgCl_2$ 25 mM, dNTPs en DEPC 10 mM y RT-Impron II (Invitrogen)). Para esta reacción de retrotranscripción se utilizó el programa RT (tabla II, sección 3.3.1). Una vez concluida esta etapa, se procedió a amplificar 1 μ L de los cDNAs obtenidos con el programa GONST4 ORF. Los controles se encuentran especificados en la sección de resultados.

3.4.4 Extracción aparato de Golgi.

Se maceraron las hojas de tabaco transformadas transitoriamente, de 3 d.p.i., sin la vena principal en un mortero frío con 1 volumen de SPM 0,5 M (sacarosa 16% p/p, KH_2PO_4 100 mM pH 6,65, $MgCl_2$ 5 mM, DTT 10 mM) el cual fue preparado al momento de utilizar. Se filtró el macerado con 2 capas de gasa, y se centrifugó por 15 minutos a 16.000 g y a 4°C. Luego, se rescató el sobrenadante y se dispuso en un tubo de ultracentrífuga sobre un cojín de 7 mL de una solución de SPM 1,3 M (sacarosa 38% p/p, KH_2PO_4 100 mM pH 6,65, $MgCl_2$ 5 mM, DTT 10 mM) lo que se centrifugó por 90 minutos a 130.000 g y a 4 °C.

Se procedió a retirar el sobrenadante, dejando la interfase y el cojín de SPM 1,3 M. Se formó un gradiente de sacarosa, agregando a la interfase 8 mL de SPM 1,1 M (sacarosa 33% p/p, KH_2PO_4 100 mM pH 6,65, $MgCl_2$ 5 mM, DTT 10 mM), 7 mL de SPM 0,7 M (sacarosa 23% p/p, KH_2PO_4 100 mM pH 6,65, $MgCl_2$ 5 mM, DTT 10 mM) y 8 mL de SPM 0,25 M (sacarosa 8% p/p, KH_2PO_4 100 mM pH 6,65, $MgCl_2$ 5 mM, DTT 10 mM), en el orden mencionado, cuidando de no mezclar cada fase. Este gradiente se centrifugó por 90 minutos a 130.000 g y a 4 °C.

Se colectó la interfase correspondiente al aparato de Golgi, que se encuentra entre la solución de SPM 1,1 M y 1,3 M (Leelavathi et al, 1970) y la interfase correspondiente a retículo endoplasmático (entre SPM 0,7 M y 1,1 M) se diluyeron en agua y se centrifugó por 100 min a 230.000 g (4 °C) en tubos independientes. Se resuspendió el sedimento obtenido en 200 µL STM (sacarosa 250 mM, MgCl₂ 1 mM y Tris HCl 10 mM pH 7,5) y se guardó a -80 °C hasta ser utilizada. Todo este procedimiento se realizó a 4 °C, cuidando que siempre los distintos extractos estuviesen en hielo y que las distintas soluciones estuviesen a 4 °C.

3.4.5 Microscopía confocal.

Las hojas de tabaco infiltradas con *A. tumefaciens* transformada con el vector pMDC43-G4 y con *A. tumefaciens* sin transformar como control, fueron analizadas por microscopía confocal. Tras 3 d.p.i, se observó la epidermis de una hoja de tabaco bajo el microscopio confocal. Este tejido fue excitado a 400 nm (correspondiente a la longitud de onda a la cual se obtiene una máxima fluorescencia para GFP) observándose la emisión a 509 nm que es la longitud de onda donde se encuentra el máximo de emisión para esta proteína. Además se observó la muestra en campo claro para distinguir los límites celulares.

3.5 Ensayo de transporte.

3.5.1 Cuantificación de proteínas.

La cuantificación proteica de la muestra obtenida en la sección 3.4.4 se llevó a cabo mediante el Kit Protein Determination Bicinchoninic Acid Method (SIGMA). A cada una de las muestras (Golgi, RE y curva de calibración de BSA 1 µg/µL), que se

midieron por triplicado, se les agregó 180 μL de una solución ácido bicinchonínico (Sigma B9643): CuSO_4 (50:1). La curva de calibración se realizó agregando 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 15 μL de la solución de BSA y se completó con agua nanopura hasta 20 μL . Para las muestras de Golgi y RE se utilizó 2 μL , llevándolas a un volumen final de 20 μL con H_2O_d y SDS 0,1%. Todas las muestras fueron dispuestas en una placa de ELISA e incubado por 15 minutos a 37 °C. Se midió la absorbancia a 562 nm, con un lector de placa ELISA.

3.5.2 Ensayo de Transporte.

Para determinar la especificidad de sustrato del transportador GONST4, se realizaron distintos ensayos de transporte con GDP-L-fucosa, UDP-D-glucosa, GDP-D-manosa y GDP-L-galactosa como sustrato. Se utilizaron las fracciones enriquecidas en aparato de Golgi obtenidas desde hojas de tabaco infiltradas con *A. tumefaciens* transformada con pMDC43-G4 (Handford et al, 2004), como muestra, o con *A. tumefaciens* GV3101 sin vector, como control.

Se procedió a tomar 50 μL de las distintas fracciones enriquecidas en aparato de Golgi (46 - 76 μg de proteína) y se incubaron, separadamente, a 25 °C por 30 segundos. Luego se agregó 50 μL de la mezcla de reacción (2 μM GDP-Fucosa + 0,1 μCi GDP-[^3H]Fucosa (Perkin-Elmer); 2 μM UDP-Glucosa + 0,1 μCi UDP-[^3H]Glucosa (GE Healthcare); 2 μM GDP-D-manosa + 0,1 μCi GDP-D-[U- ^{14}C]-Manosa (GE Healthcare) o 50 μL de GDP-D-[U- ^{14}C]-Galactosa (sección 3.2)) en STM y se incubó por 3 minutos. Se detuvo la reacción agregando 1 mL de STM frío (4 °C) y se dejaron las vesículas inmediatamente en un filtro de nitrocelulosa (0,45 μm éster de celulosa 25 mm diámetro, Millipore), se lavaron los filtros con 10 mL de STM frío por filtración al vacío y se dejó

secando. Luego se transfirieron los distintos filtros a viales y se les agregó 4 mL de líquido de centelleo (Ecoscint A; National Diagnostics, Atlanta, GA) para contar en un contador de centelleo.

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

4. RESULTADOS.

4.1 Árbol Filogenético de Transportadores Nucleótido Azúcar (TNAs).

Con el objetivo de comenzar a dilucidar las relaciones estructurales y funcionales de GONST4 con el resto de los TNAs, se construyó un filogenia que incluyó 52 secuencias de TNAs de distintas especies y 9 de TPTs (Tabla III). Las secuencias fueron alineadas mediante Clustal W, y manualmente se removieron los gaps con la herramienta GeneDoc. Luego, con los 233 sitios conservados, se construyó una filogenia utilizando el algoritmo bayesiano. Se obtuvo ocho clados principales que fueron nombrados correlativamente (Familias 1-8) según su aparición en el árbol (Figura 7).

Las distintas familias que se obtuvieron presentan al menos un sustrato comprobado experimentalmente para alguno de sus integrantes con excepción de la familia nº1.

Si observamos los sustratos caracterizados que contiene cada familia, es fácil percatarse que cada una de las familias descritas tiene asociado un sustrato particular que transporta, es decir, cada una de estas familias puede asociarse a un NA. La familia 1 está compuesta de 6 secuencias correspondientes a 5 especies vegetales diferentes. Para esta familia no existe aún un sustrato caracterizado y tiene particular importancia en esta investigación debido a que incluye a GONST4. El análisis bioinformático de sus secuencias protéicas mediante TMPRED y TMHMM 2.0 indica que estos transportadores tendrían teóricamente 9 o 10 DTM. La secuencia 5, correspondiente a GONST4, posee un sitio de unión a ATP/GTP tipo A (Saraste et al 1990) analizado en PROSITE (acceso nº PS00017). Este sitio en particular (AVYLLGKS) sería el

encargado de interactuar con el grupo fosfato del nucleótido. En los modelos de DTM generados para este transportador, este sitio aparece orientado hacia el citoplasma o hacia el lumen de Golgi (Figura 6a y 6b respectivamente) dependiendo del número de DTM. Sin embargo, debido que el TNA reconoce el sustrato en el citoplasma, el modelo con 9 DTM podría ajustarse a la orientación encontrada en la planta.

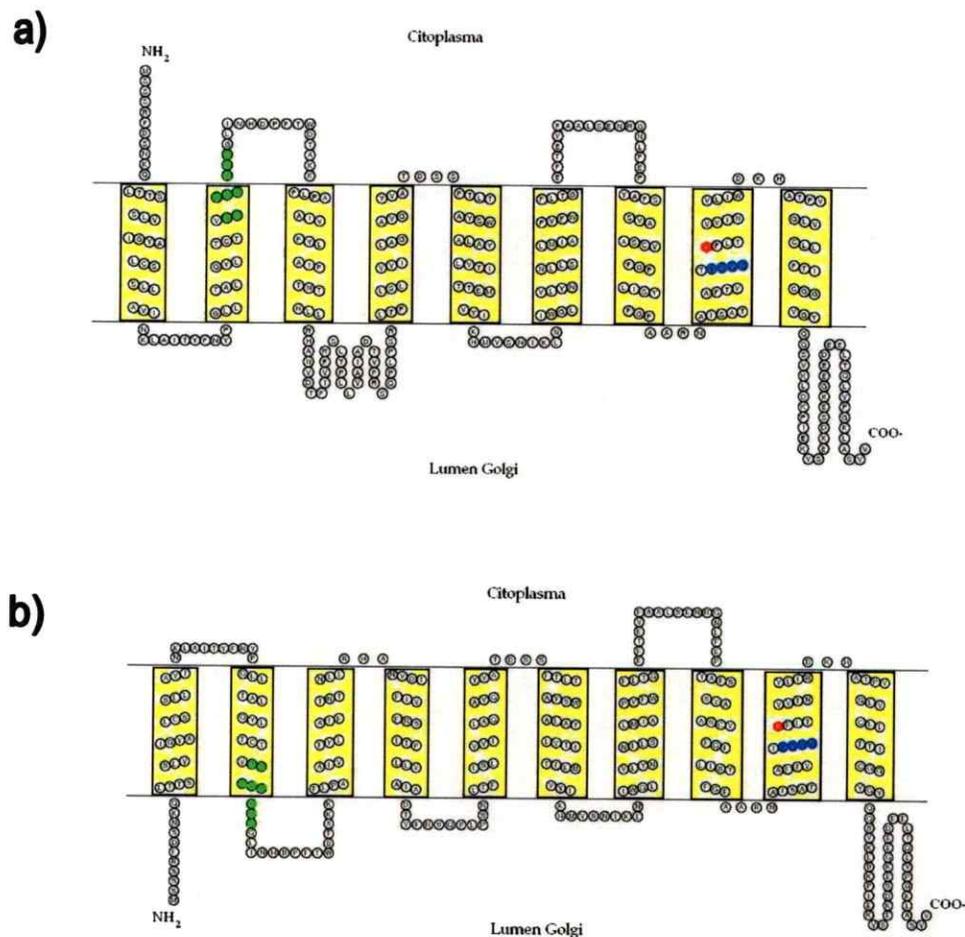


Figura 6: Esquema de predicción de DTM para GONST4. Según los software utilizados (TMPRED y TMHMM) para la predicción de los DTM (ver Materiales y Métodos sección 3.1.1) se obtuvo dos posibles configuraciones de la topología de GONST4 en la membrana: a) modelo con 9 DTM; b) modelo con 10 DTM. Con color se muestra el sitio **GVVNK** al cual se le ha asignado interacción directa con el NA y el sitio **AVYLLGKS** identificado en PROSITE como sitio de interacción con GTP.

La familia 2 incluye 5 secuencias que pertenecen principalmente a especies protistas que actúan como parásitos y que en su mecanismo de infección utilizan un transportador tipo LPG2 (Martinez-Dumcker et al, 2003). El funcionamiento correcto de TNAs de este tipo está involucrado directamente con la virulencia de estos parásitos. Mutantes de este gen en la especie n°8 (tabla III) son incapaces de producir la proteína de lipofosfoglicano que sirve para proteger al parásito del ambiente hidrolítico de sus huéspedes (Sacks et al, 2000). Según las predicciones realizadas, estructuralmente poseen entre 8-9 DTM en su mayoría con el extremo N terminal orientado hacia el citoplasma y poseen como sustrato predicho GDP-manosa.

La familia 3 está compuesta por tres secuencias de especies vegetales dentro de las cuales se encuentra GONST2 (secuencia n°12) y que poseen especificidad por GDP-manosa y 8 DTM predichos para todos sus integrantes.

La familia más numerosa resultó ser la n° 4 que concentra a transportadores de GDP-D-manosa (Dean et al, 1997) en su mayoría caracterizados y que poseen en promedio 8 DTM predichos. Las especies que contiene esta familia corresponden en su mayoría a integrantes del Reino Fungi.

En cuanto a la familia n°5 cabe destacar que la integran cuatro transportadores que debieran ser capaces de transportar UDP-azúcares ya que uno de sus miembros (secuencia n°33) posee múltiple especificidad por el azúcar del NA. Esto último entrega las bases para suponer que los componentes de esta familia debieran ser capaces de transportar estos sustratos con diferente eficacia. Si esto fuese correcto esta familia sería la que tendría el rango más amplio de reconocimiento de azúcares.

La familia n° 6 está compuesta por 8 secuencias pertenecientes al reino animal que también transportan UDP-azúcares, incluyendo UDP-glucosamina y UDP-N-acetilgalactosamina. En su mayoría las predicciones indican que tendrían 8 DTM y la mayoría tendría su extremo N terminal orientado hacia el lumen del aparato de Golgi.

En cuanto a la familia n°7 se puede mencionar que comprenden transportadores de GDP-fucosa. Las secuencias n°44 y 45 se ha demostrado que restablecen el transporte de GDP-fucosa en líneas celulares de mamífero deficientes en el transporte de GDP-fucosa (Lübke et al, 2001). Es importante mencionar que no ha sido caracterizado ningún transportador de GDP-fucosa en plantas, aunque en arveja se ha demostrado que debiera ser mediado por algún transportador (Wulff et al, 2000). Finalmente, la familia n°8 está integrada por transportadores de UDP-galactosa que poseen en promedio 8 DTM. Esta familia es la que posee el valor de soporte más bajo debido a la baja relación entre las especies vegetales y las pertenecientes al reino animal, sin embargo las coincidencias estructurales y funcionales son altas entre ellas.

Se utilizó como “outgroup” a las secuencias de TPTs (n° 53-61) debido a que en diversos estudios (Martínez-Duncker et al, 2003; Jack et al 2001) ha sido descrita como una familia muy cercana tanto estructural como funcionalmente a las familia de los TNAs. Ambas familias son proteínas con múltiples dominios transmembrana tipo III, transportan carbohidratos unidos a una molécula de fosfato, son antiporters soluto/soluto y algunos de sus miembros son capaces de formar homodímeros.

Tabla III: Secuencias utilizadas para el análisis filogenético. NCBI, número de identificación en NCBI; TMD, dominios transmembrana predichos..

| Familia | ID secuencia | NCBI | DTM | Tamaño (aa) | Especie | Sustrato caracterizado | Orientación N Terminal |
|---------|--------------|-----------|------|------------------------------------|--------------------------------------|--|------------------------|
| 1 | 1 | 157342891 | 10 | 349 | <i>Vitis.vinifera</i> | | Golgi |
| | 2 | 115475261 | 10 | 342 | <i>Oryza Sativa</i> | | Golgi |
| | 3 | 162683012 | 9 | 313 | <i>Physcomitrella patens patens</i> | | Citoplasma |
| | 4 | 133902302 | 10 | 369 | <i>Gossypium Raimondi</i> | | Citoplasma |
| | 5 | 29329823 | 9-10 | 341 | <i>Arabidopsis thaliana (GONST4)</i> | | Golgi |
| | 6 | 29329821 | 10 | 372 | <i>Arabidopsis thaliana (GONST3)</i> | | Golgi |
| 2 | 7 | 71657564 | 8 | 358 | <i>Trypanosoma cruzi StBrener</i> | | Citoplasma |
| | 8 | 9998817 | 9 | 341 | <i>Leishmania mexicana</i> | GDP-Manosa | Citoplasma |
| | 9 | 146099491 | 9 | 341 | <i>Leishmania infantum</i> | GDP-Manosa | Citoplasma |
| | 10 | 154336631 | 9 | 341 | <i>Leishmania braziliensis</i> | | Citoplasma |
| | 11 | 72387780 | 8 | 340 | <i>Trypanosoma brucei</i> | | Golgi |
| 3 | 12 | 15487237 | 8 | 333 | <i>Arabidopsis thaliana (GONST1)</i> | GDP-Manosa | Golgi |
| | 13 | 29329819 | 8 | 375 | <i>Arabidopsis thaliana (GONST2)</i> | | Citoplasma |
| | 14 | 15042812 | 8 | 368 | <i>Oryza sativa</i> | | Citoplasma |
| 4 | 15 | 121712594 | 8 | 381 | <i>Aspergillus clavatus</i> | GDP-Manosa | Golgi |
| | 16 | 119498605 | 8 | 382 | <i>Neosartorya fischeri</i> | GDP-Manosa | Citoplasma |
| | 17 | 14010202 | 8 | 324 | <i>Candida glabrata</i> | GDP-Manosa | Citoplasma |
| | 18 | 70998672 | 8 | 382 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | GDP-Manosa | Citoplasma |
| | 19 | 6321213 | 8 | 337 | <i>Sacharomyces cerevisiae</i> | GDP-Manosa | Citoplasma |
| | 20 | 89241880 | 8 | 329 | <i>Pichia pastoris</i> | GDP-Manosa | Citoplasma |
| | 21 | 156064845 | 8 | 391 | <i>Sacharomyces sclerotorium</i> | GDP-Manosa | Golgi |
| | 22 | 126138426 | 8 | 327 | <i>Pichia.stiptis</i> | GDP-Manosa | Citoplasma |
| | 23 | 154322673 | 8 | 392 | <i>Botryotinia fuckeliana</i> | GDP-Manosa | Golgi |
| | 24 | 14971021 | 9 | 371 | <i>Candida albicans</i> | GDP-Manosa | Citoplasma |
| | 25 | 19115591 | 8 | 345 | <i>Sacharomyces pombe</i> | | Golgi |
| | 26 | 50556628 | 8 | 326 | <i>Yarrowia lipolyptica</i> | | Citoplasma |
| | 27 | 119182733 | 8 | 408 | <i>Candida immitis</i> | | Citoplasma |
| | 28 | 83764960 | 8 | 368 | <i>Aspergillus oryzae</i> | | Citoplasma |
| 29 | 145253861 | 8 | 381 | <i>Aspergillus niger</i> | | Citoplasma | |
| 30 | 111062297 | 8 | 381 | <i>Phaeosphaeria nododrum SN15</i> | | Citoplasma | |
| 5 | 31 | 91078302 | 9 | 333 | <i>Tribolium castaneum</i> | | Citoplasma |
| | 32 | 125979525 | 9 | 382 | <i>Drosophila pseudobscura</i> | | Golgi |
| | 33 | 14971008 | 9 | 373 | <i>Drosophila melanogaster</i> | UDP- GalNAc/GlcA/ Gal/GlcNAc/Gl c | Golgi |
| | 34 | 158292748 | 9 | 346 | <i>Anopheles gambiae</i> | | Golgi |

| Familia | ID secuencia | NCBI | DTM | Tamaño (aa) | Especie | Sustrato caracterizado | Orientación N Terminal |
|----------|--------------|-----------|-----|-------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| 6 | 35 | 108795331 | 8 | 343 | <i>Sus scrofa</i> | UDP-GlcA/GalNAc | Golgi |
| | 36 | 1665787 | 7 | 383 | <i>Homo sapiens</i> | | Citoplasma |
| | 37 | 123858126 | 8 | 334 | <i>Mus musculus</i> | UDP-GlcA/GalNAc | Golgi |
| | 38 | 55726940 | 8 | 355 | <i>Pongo abelii</i> | | Golgi |
| | 39 | 53236929 | 8 | 340 | <i>Xenopus laevis</i> | | Golgi |
| | 40 | 126722865 | 8 | 355 | <i>Bos taurus</i> | UDP-GlcA/GalNAc | Golgi |
| | 41 | 157817576 | 8 | 325 | <i>Rattus norvegicus</i> | UDP-GlcA/GalNAc | Golgi |
| | 42 | 156395593 | 9 | 335 | <i>Nematostella vectensis</i> | | Golgi |
| 7 | 43 | 13940504 | 9 | 363 | <i>Caenorhabditiselegans</i> | GDP-Fucosa | Golgi |
| | 44 | 14009667 | 8 | 364 | <i>Homo sapiens</i> | GDP-Fucosa | Citoplasma |
| | 45 | 91090017 | 9 | 334 | <i>Tribolium castaneum</i> | | Golgi |
| | 46 | 66555662 | 9 | 335 | <i>Apis mellifera</i> | | Golgi |
| 8 | 47 | 4689083 | 7 | 353 | <i>Sacharomyces pombe</i> | UDP-Galactosa | Golgi |
| | 48 | 7770097 | 8 | 393 | <i>Homo sapiens</i> | UDP-Galactosa | Citoplasma |
| | 49 | 6429657 | 8 | 390 | <i>Mus musculus</i> | UDP-Galactosa | Citoplasma |
| | 50 | 18395434 | 8 | 332 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | UDP-Gal/Glc | Golgi |
| | 51 | 18394108 | 8 | 331 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | UDP-Galactosa | Citoplasma |
| Outgroup | 52 | 2997591 | 7 | 401 | <i>Pisum sativum</i> | GPT | Golgi |
| | 53 | 14150753 | 7 | 387 | <i>Oryza sativa</i> | GPT | Citoplasma |
| | 54 | 21554690 | 7 | 388 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | GPT | Golgi |
| | 55 | 61608932 | 8 | 402 | <i>Glycine max</i> | | Golgi |
| | 56 | 118426385 | 7 | 387 | <i>Sorghum bicolor</i> | | Citoplasma |
| | 57 | 21593093 | 7 | 410 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | TPT | Citoplasma |
| | 58 | 1352198 | 7 | 408 | <i>Flaveria pringlei</i> | TPT | Citoplasma |
| | 59 | 13518113 | 10 | 417 | <i>Oryza sativa</i> | TPT | Citoplasma |
| | 60 | 1778145 | 6 | 411 | <i>Nicotiana tabacum</i> | PPT | Golgi |

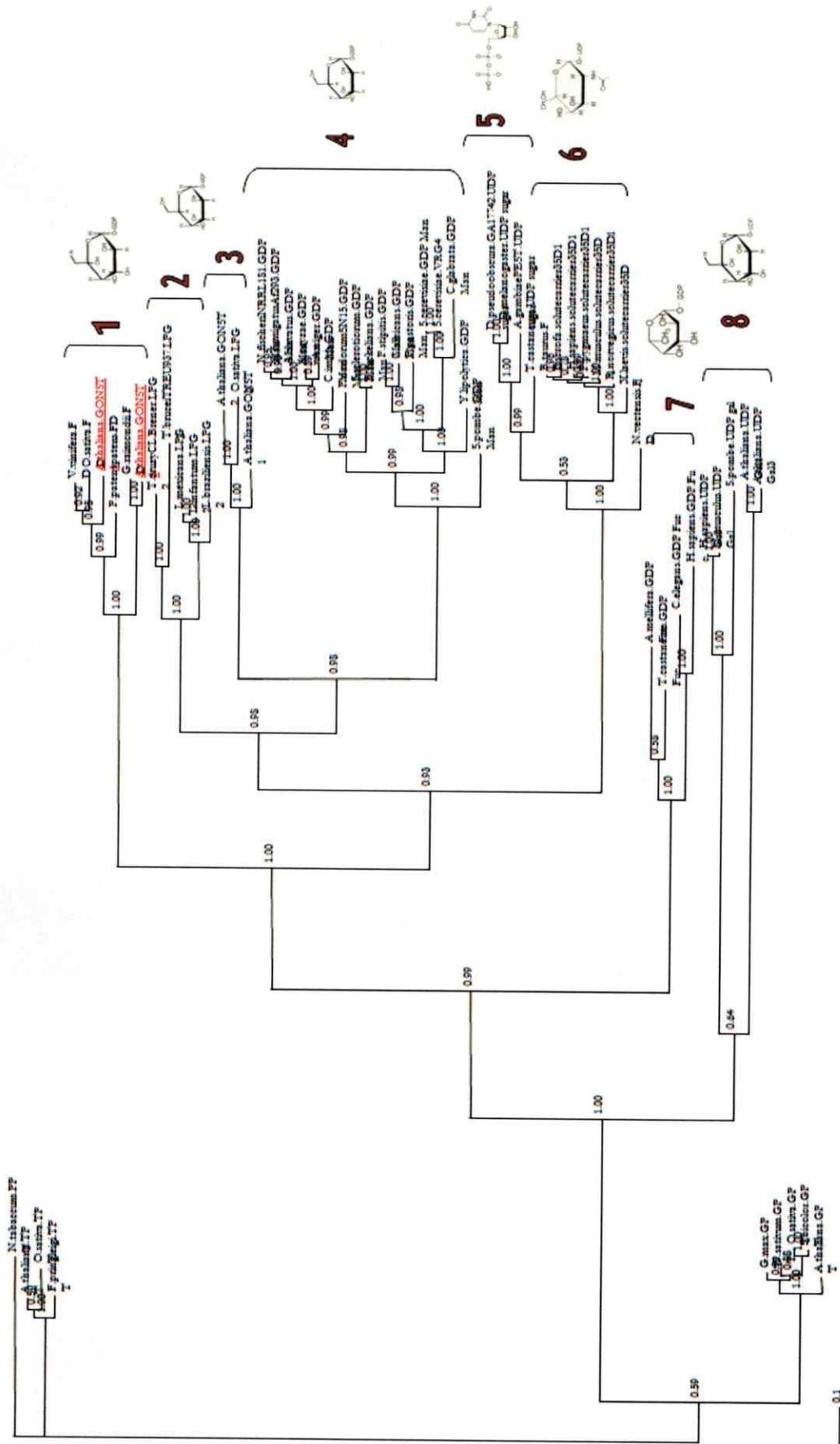


Figura 7: Filogenia de TNAs con diferentes especificidades de sustrato generado por el método Bayesiano. El árbol fue construido como filograma utilizando a la familia de translocadores de triosa fosfato (TPT) como outgroup. Se agrupó por familias: Familia 1 aún no ha sido caracterizada funcionalmente. Familias 2,3 y 4 incluyen transportadores de GDP-Man; Familias 5-6 corresponden a transportadores de UDP-azúcares como UDP-GlcA/GalNAc/Xyl/Gal/GlcNA, la Familia 7 transporta GDP-Fuc y la Familia 8 contiene transportadores de UDP-Gal. Los números indicados en cada nodo indican los valores de soporte (máx. 1.00). La barra de escala indica 0,1 sustituciones aminoácidas por sitio. Los nombres indicados en el árbol corresponden a la especie y al sustrato caracterizado en caso de que exista tal estudio. GONST3 y GONST4 aparecen subrayados con color rojo. Nótese que GONST4 aparece en un clado que ninguno de sus representantes posee un sustrato caracterizado.

Es importante notar de estos resultados que GONST4 aparece en un clado en que ninguno de sus integrantes posee un sustrato caracterizado por lo cual resulta de particular interés estudiar el o los posibles sustratos que utilice este transportador.

4.2 Síntesis de GDP-L-galactosa.

Como consecuencia de que en el árbol filogenético generado GONST4 aparezca en un clado aparte, se decidió probar si esta proteína era capaz de transportar un NA distinto a los que identifican a cada familia del árbol. Dentro de estos, GDP-L-galactosa aparece como un candidato (sección 1.6). Sin embargo, este NA no se encuentra disponible comercialmente y por lo tanto, surgió la necesidad de sintetizarlo en el laboratorio. Con este objetivo, se utilizó la enzima GDP-D-manosa 3'5' epimerasa (GME) de *Arabidopsis thaliana* que había sido previamente sobreexpresada en *E. coli* (Wolucka et al, 2001). Aunque la eficiencia de conversión de GDP-D-manosa a GDP-L-galactosa con esta enzima bordea solamente 15% (Major et al, 2005), GME resulta ideal para el objetivo que se persigue.

Debido a la alta similitud estructural entre GDP-D-manosa, GDP-L-gulosa y GDP-L-galactosa (epímeros en los carbonos 3' y 5') y a las bajas concentraciones que se producirían producto de la reacción, se debía utilizar una técnica de alta sensibilidad y que permitiera una resolución adecuada para separar estos tres compuestos. Es por ambos motivos que se decidió utilizar la técnica de HPLC en fase reversa con par iónico. Esta técnica tiene la ventaja de ser altamente sensible y en este caso permite la separación de los compuestos por hidrofobicidad debido a que las cargas negativas que

aportan los fosfatos del nucleótido son neutralizadas por una molécula con carga positiva en la fase móvil (TEAA).

Para estudiar la reacción y el perfil de elución de HPLC se realizaron 3 ensayos diferentes. En primer lugar se realizó un ensayo que sólo tenía en la mezcla de reacción el buffer y GDP-D-manosa (Blanco Enzima, Figura 8a). En segundo lugar se hizo un ensayo que tenía GME y el buffer pero no el sustrato (Blanco Sustrato, Figura 8b) y finalmente, se realizó un ensayo con todos los componentes necesarios para que se produzca la reacción (enzima, sustrato y buffer; Figura 8c) con el fin de diferenciar cuáles picos corresponden a productos, cuál a sustrato remanente y cuáles a ruido producido por el extracto crudo que contenía la enzima.

En la Figura 8c, la aparición del peak n°1 (GDP-D-manosa) ocurre a $13,8 \pm 0,2$ min y el pico representa un 80% de la reacción, es decir, sólo reacciona un 20% que se transforma en los productos: peak n°2 (supuestamente GDP-L-galactosa) (15%) aparece a los $14,9 \pm 0,3$ min. y peak n°3 (supuestamente GDP-D-gulosa) (5%) que aparece a $16,1 \pm 0,2$ min.

Es importante mencionar que los resultados mostrados en la Figura 8 corresponden a la reacción incubada por 12 horas a 21 °C. Se probó la incubación de la reacción por 3, 5 y 8 horas dando como resultado una menor proporción de los productos (GDP-L-galactosa y GDP-L-gulosa; datos no mostrados) y en el caso de incubarlo más de 12 horas se obtenía la misma proporción que el ensayo mostrado tipo. El efecto de la temperatura también fue estudiado (15°C, 19°C, 21° C, 23 °C 25°C) y la proporción se mantenía relativamente constante en el rango entre 19 y 23 °C mientras

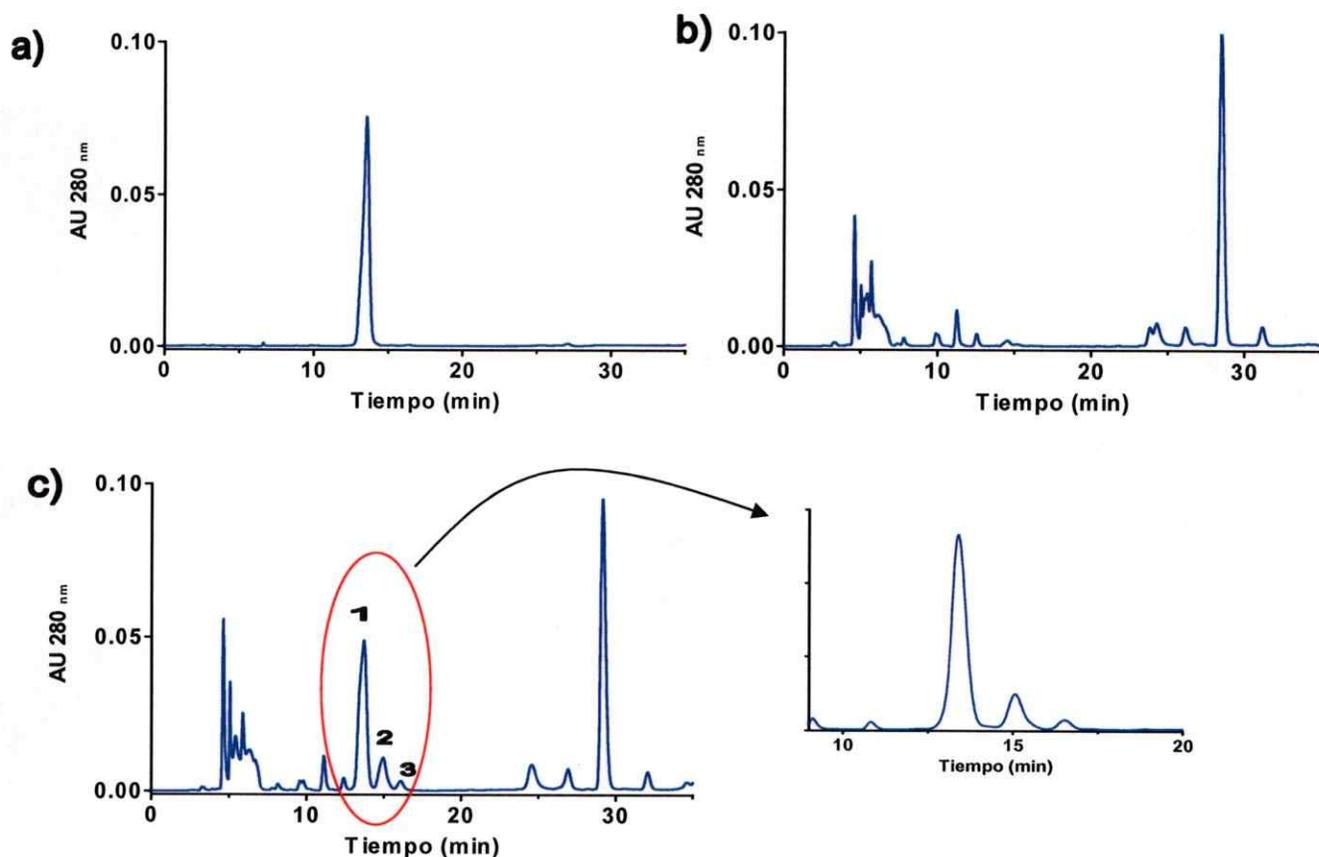


Figura 8: HPLC en fase reversa con par iónico de la reacción de GDP-D-manosa con la enzima GME. Los componentes de cada una de las reacciones se encuentran descritos en la sección 3.2.1 de Materiales y Métodos. a) Blanco enzima, se observa un pico a los 13,8 minutos correspondiente a GDP-D-manosa. b) Blanco Sustrato, se observan múltiples picos que corresponden a diferentes impurezas que contiene el extracto enzimático utilizado y; c) Reacción completa, se observan los mismos picos que en blanco sustrato más 3 nuevos peaks (1, 2 y 3) que, en teoría, corresponden a GDP-D-manosa, GDP-L-galactosa y GDP-L-gulosa, respectivamente (Major et al, 2005).

que si se salía de esos rangos la cantidad de producto se veía afectada y disminuía drásticamente (datos no mostrados). Si observamos la figura 8, se puede apreciar que fuera de los tres picos destacados, se observa una gran cantidad de ruido que se descartó como productos de reacción debido a su aparición en el blanco sustrato. Sin embargo, para corroborar que los picos del ruido realmente corresponden sólo a moléculas que quedan en el extracto crudo de la enzima, se realizaron reacciones a distintas concentraciones de GDP-D-manosa y se vio la correlación que tenía el área del pico de

interés con la concentración del sustrato (Figura 9). Al cambiar la concentración de GDP-D-manosa, y luego de reaccionarla con GME el área del pico de este sustrato no-reaccionado (pico 1 en Figura 8c), o del supuesto GDP-L-galactosa (pico 2 en Figura 8c) cambiaba proporcionalmente (Figura 9a y 9b, respectivamente), mientras que para el resto de los picos el área se mantenía constante (Figura 9c), lo que indica claramente que los peaks analizados no correspondían a productos de la reacción de GME. Para llegar al protocolo obtenido se realizó una serie de pruebas con solventes y distintas concentraciones de la sal para analizar el efecto en la separación de la señal sobre GDP-D-manosa y GDP-L-fucosa (datos no mostrados). Con los resultados de esto, la optimización de la metodología se centró en lograr la mayor separación entre los 3 NA de la reacción sin perder resolución. Para esto, se fue variando la longitud de la etapa en que se realiza el gradiente de TEAA en acetonitrilo (separación) y la concentración inicial y final del acetonitrilo en función de los resultados obtenidos. Por ejemplo, si los productos de reacción aparecían demasiado juntos, se aumentaba el tiempo de separación o si los productos aparecían muy tarde y juntos se aumentaba el margen de separación (concentración final – inicial de acetonitrilo) aumentando ambos extremos. La mejor separación se obtuvo en 20 minutos partiendo desde TEAA en acetonitrilo 1% hasta TEAA en acetonitrilo 2,5% con lo que se lograba una separación de 1 minuto aproximadamente entre cada pico y no se perdía la resolución (Figura 8c).

El hecho de estar trabajando con un extracto enzimático crudo suponía el problema del ruido que esto podía provocar en el sistema (HPLC) al ser éste tan sensible. Para esto se filtraron las reacciones en filtros Amicon de 3 kDa y la columna fue utilizada con precolumna ya que previamente se utilizó purificación de proteínas

mediante Fenol:Cloroformo pero los resultados fueron negativos, no pudiéndose observar ni los peaks de productos ni el peak del sustrato remanente.

Los tres ensayos realizados para analizar cuáles peaks corresponden a productos son claros y concluyentes y, en conjunto con los análisis de correlación (Figura 9), muestran que GME genera dos productos y que gran parte del sustrato (GDP-D-manosa, 80%) no reacciona.

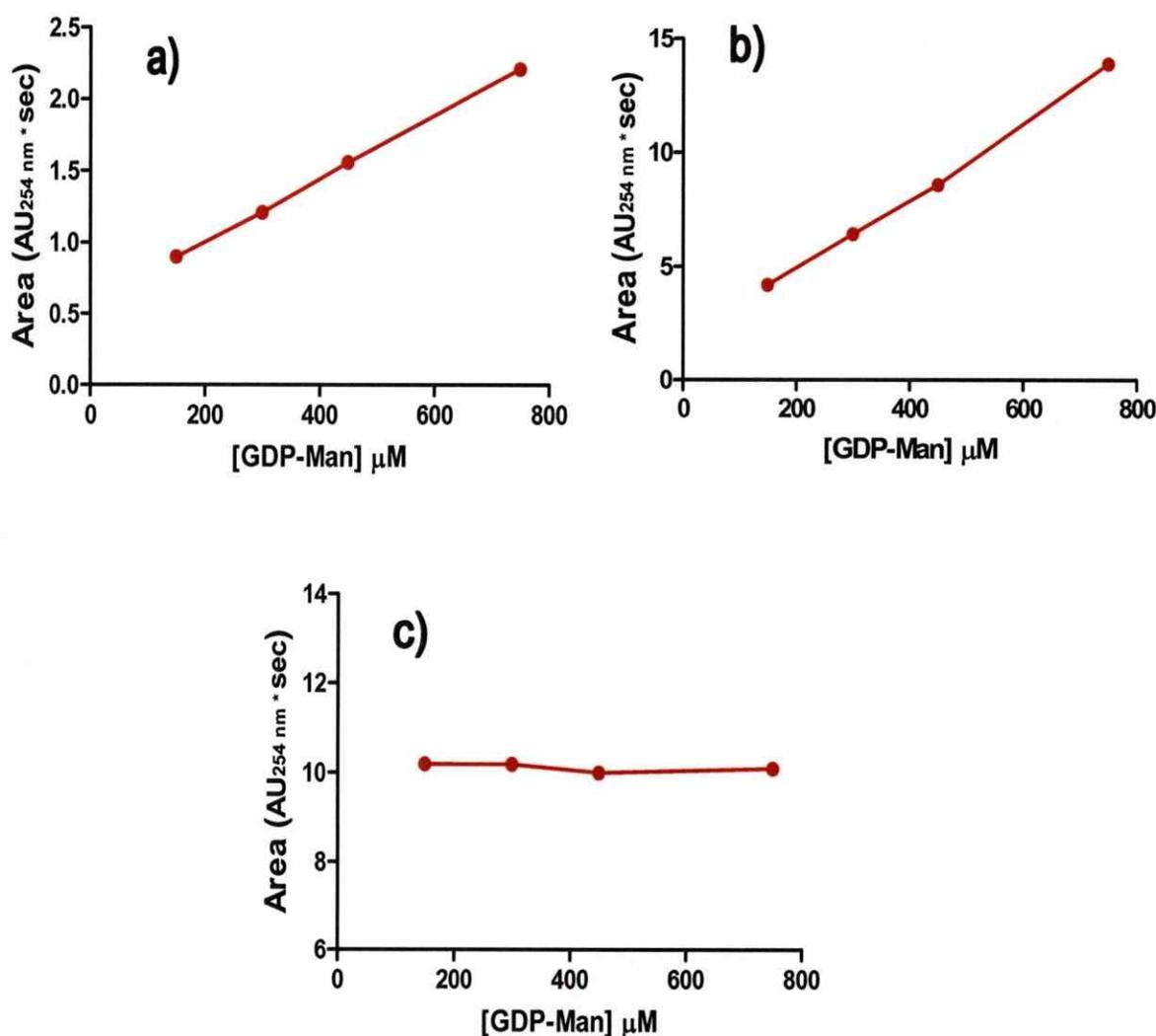


Figura 9: Correlación entre área del picos seleccionados y concentración de GDP-manosa. Se analizó todos los picos que aparecen en el perfil de elución de la reacción de GDP-manosa con la enzima GME (ver sección 3.2.1 Materiales y Métodos) para determinar cuáles corresponden a productos propios de la reacción. a) GDP-D-manosa no-reaccionada (pico 1 de Figura 7c); b) supuesto GDP-L-galactosa (Pico 2 de Figura 7c); y c) Otro peak indicado como x en Figura 8. Para todo el resto de los peaks que no fueron numerados se observó la misma tendencia que en c) es decir, que no existe correlación entre el área del peak y la concentración del sustrato (Datos no mostrados).

GDP_D-manosa y GDP-L-galactosa es aproximadamente de 1 minuto, las fracciones colectadas son fracciones puras, dado que no se observa contaminación de manosa en la muestra de galactosa, y viceversa (Fig. 9).

4.3 Generación de vectores para el estudio de GONST4.

Con el objetivo de estudiar la especificidad de sustrato y la orientación en la membrana de GONST4, la estrategia fue utilizar la tecnología GATEWAY® (Invitrogen) para tener esta proteína unida a genes reporteros en su extremo N-terminal y con esta construcción, poder determinar su orientación.

Para clonar el gen codificante de GONST4 en el vector de entrada del sistema GATEWAY® pCR8, se diseñaron los partidores G4F3 y G4R3 (Tabla II, Sección 3.1.1) que amplifican las 1026 pb, es decir, desde el ATG hasta el codón de termino. Para establecer un programa de PCR óptimo con estos partidores, se determinaron los tiempos de cada etapa, concentraciones de reactivos en base a los que se utilizaban en el laboratorio para amplificar un producto de ~1 kb, y la temperatura óptima de apareamiento (ver sección 3.3.1 Tabla II para las condiciones óptimas, datos no mostrados).

4.3.1 Generación del vector de entrada: pCR8-G4.

El vector pCR8 es un vector de entrada del sistema GATEWAY® (Invitrogen) que utiliza la deoxiademina (A) que deja la *Taq* polimerasa en el extremo 3' de los productos de PCR. Para aprovechar esto, el vector (lineal), posee una deoxitimina (T) desapareada que se encuentra unida covalentemente a un residuo de tirosina de la topoisomerasa I asociada al vector. Sin embargo, debido a esta característica que facilita

la clonación, se produce una complicación: el producto PCR se puede insertar en las dos posibles orientaciones (sentido o antisentido). En este estudio, el vector con el inserto en antisentido, no tiene utilidad alguna debido a que se busca expresar la proteína acoplada a un gen reportero en su extremo N terminal y el inserto en antisentido pierde esta funcionalidad

Una vez amplificado el gen de GONST4 por PCR, se purificó la banda desde el gel y luego se clonó en este vector de entrada (sección 3.3.3). Luego de transformar *E. coli*, las colonias se crecieron en medio LB selectivo con espectinomicina y a las que fueron resistentes se les realizó una mini-preparación para realizar los análisis confirmativos correspondientes.

En primer lugar se comprobó mediante PCR (Figura 11) que las colonias que habían sido seleccionadas poseían el gen de GONST4 y no habían crecido en la placa por mutación espontánea. En la figura 11 se observa claramente que todas las colonias seleccionadas dan como resultado un amplificado de 1 kb correspondiente a GONST4.

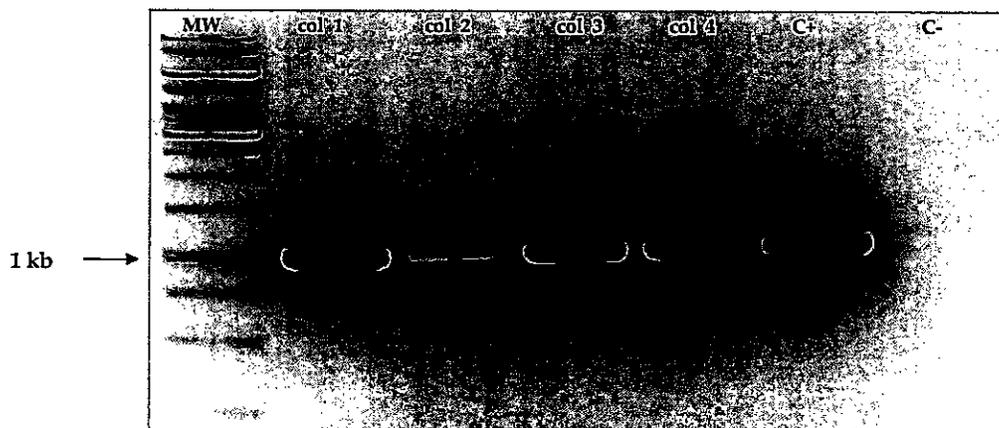


Figura 11: PCR de colonias 1-4 de *E. coli* transformadas con pCR8-G4. Gel de agarosa con bromuro de etidio en que se muestra la reacción de PCR GONST4-ORF (Tabla II) utilizando como molde mini-preparaciones de las colonias 1-4. Se utilizó como control negativo el vector vacío pMDC43. Se observa la presencia de una banda de ~2,5 kb correspondiente al vector obtenido de la mini-preparación y otra banda de 1 kb correspondiente al amplificado GONST4. MW: estándar de peso molecular, C+: control positivo, C-: control negativo.

Una vez comprobado mediante PCR que estas colonias poseían el gen de GONST4 se procedió a verificar mediante restricción su orientación dentro del vector pCR8 (Figura 12). La enzima *HpaI* corta en un sitio dentro del vector y asimétricamente dentro del gen de GONST4 (801 + 225 pb) por lo que fácilmente se reconoce cuando el clonamiento es o no direccional. Por lo tanto, si GONST4 está en sentido se espera bandas de 2815 y 1028 pb, y si está en antisentido, se espera bandas de 3487 y 360 pb. En la figura 12 se muestra la digestión del vector en las cuatro colonias que poseían el gen clonado (verificado por PCR, Figura 11). De estas cuatro colonias, tres de ellas tenían el gen clonado en la orientación antisentido (col. 1, 2 y 4) y sólo una colonia lo tenía en la orientación deseada (col. 3). Esta colonia fue secuenciada, no encontrándose ninguna mutación a lo largo de las 1026 pb, y fue utilizada posteriormente para la recombinación con los vectores de destinación GATEWAY® pMDC43 y pGWB12.

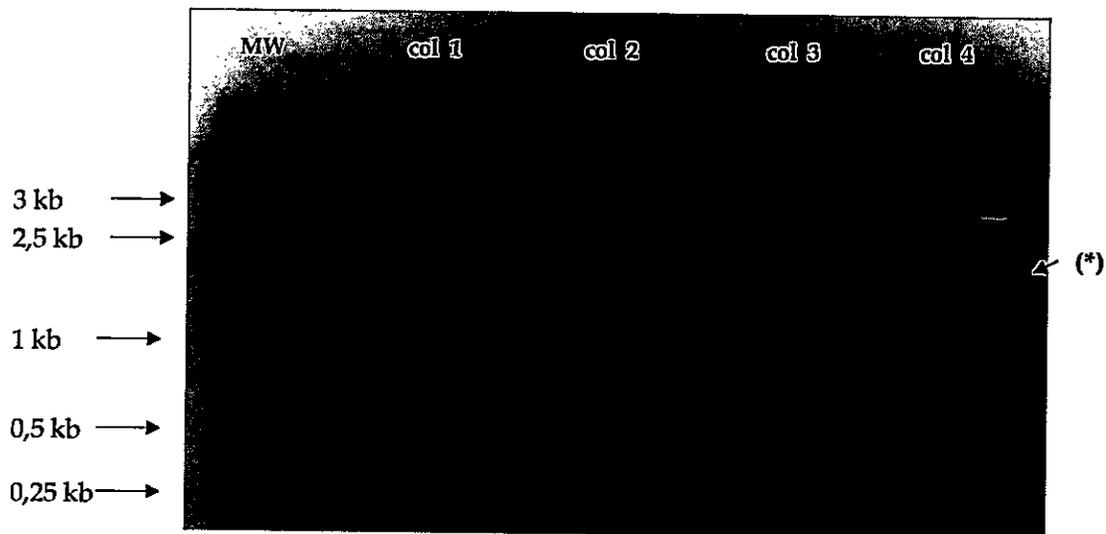


Figura 12: Análisis de restricción de colonias 1-4 de *E. coli* transformadas con pCR8-G4. Gel de agarosa con bromuro de etidio en que se muestra la digestión parcial de cuatro mini-preparaciones de pCR8-G4 (col 1-4) con *HpaI* que corta dentro del vector y dentro del inserto liberando dos fragmentos de 2815 pb y 1028 pb si el inserto se encuentra en orientación correcta o 3487 pb y 360 pb si se encuentra en orientación inversa. MW: estándar de peso molecular. (*) la flecha representa plásmido no cortado

4.3.2 Recombinación LR de pCR8-G4 con el vector de destinación pMDC43.

Una vez obtenido el vector de entrada, se procedió a recombinar éste con los vectores de destinación elegidos para los análisis posteriores. El vector pMDC43 posee GFP en su extremo 5' bajo el control de dos promotores 35S (Odell et al, 1985). Este último es un promotor constitutivo de plantas que fue descubierto estudiando la manera de infección del virus del mosaico de coliflor. El hecho de que el vector tenga este promotor río arriba de la secuencia codificante para GFP permitirá la síntesis de GONST4 con GFP en su extremo N terminal, lo que, a su vez, permitirá visualizar fácilmente la acumulación de la proteína de fusión y posteriormente estudiar su especificidad de sustratos. Además, permite realizar en el futuro (ver discusión), por ejemplo, experimentos de inmunofluorescencia para determinar si el extremo N terminal se encuentra hacia el lado citosólico o orientado hacia el lumen de Golgi.

Una vez realizada la recombinación LR entre pCR8-G4 y pMDC43 (sección 3.3.7), y la transformación de *E. coli*, se analizaron tres colonias (S1-S3) a las cuales se les realizó una mini-preparación y posteriormente una reacción de PCR con partidores específicos para GONST4. En la figura 13 se observa un amplificado de 1 kb para las tres colonias, lo que deja en evidencia la presencia del gen de GONST4 en estas colonias. Sin embargo, para saber con certeza que la recombinación fue exitosa, fue necesario realizar un análisis de restricción. Para este objetivo se utilizó la enzima *PstI* que corta asimétricamente dentro de GONST4 liberando dos fragmentos de 246 pb y otro de 780 pb y que, al igual que en pCR8, corta en un sitio único dentro del vector (pMDC43) fuera de la región con la que recombina. Por esta razón, cuando una colonia

sea positiva, con GONST4 clonado en sentido en pMDC43-G4 se liberarán un fragmento de ~1900 pb y otro de ~10100 pb. Los resultados de este análisis muestran que la recombinación efectuada resultó ser exitosa (Figura 14).



Figura 13: PCR de colonias S1-S3 de *E. coli* transformadas con pMDC43-G4. Gel de agarosa con bromuro de etidio en que se muestra la reacción de PCR GONST4-ORF (Tabla II) utilizando como molde mini-preparaciones de las colonias S1-S3. Se utilizó como control negativo el vector pMDC43 sin recombinar. Se observa la presencia de una banda de 1 kb correspondiente a GONST4. MW: estándar de peso molecular, C+: control positivo.

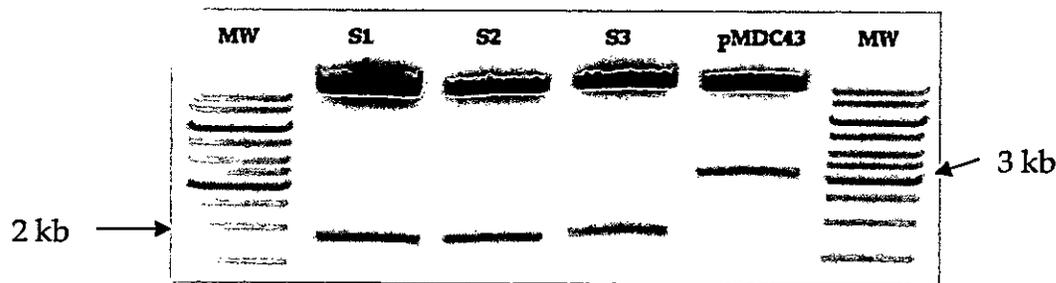


Figura 14: Análisis de restricción de colonias S1-S3 de *E. coli* transformadas con pMDC43-G4. Gel de agarosa con bromuro de etidio en que se muestra la digestión total de tres mini-preparaciones de pMDC43-G4. *Pst*I corta en el vector y dentro del inserto liberando un fragmento de 1900 pb y otro de 10100 pb. En el caso del vector vacío (pMDC43), la enzima corta dentro del sitio de recombinación y fuera de él (3092 + 9368 pb). MW: estándar de peso molecular.

4.3.3 Recombinación LR de pCR8-G4 con el vector de destinación pGWB12.

Al igual que para pMDC43 se realizó la recombinación LR entre el vector pCR8-G4 y el vector de destinación pGWB12. Este último, resulta de utilidad para estudiar la orientación del extremo N-terminal de GONST4 ya que posee una secuencia que codifica a un epítipo río arriba del lugar donde se produce la recombinación. Este

epítipo corresponde a la secuencia FLAG (D Y K D D D K) que debido a su pequeño tamaño resulta interesante ya que disminuiría los posibles efectos que pueda producir sobre la estructura de la proteína.

La recombinación se verificó en primer lugar mediante PCR con partidores específicos para GONST4 (Figura 15 a). Luego para confirmar los resultados de PCR se realizó un ensayo de restricción con la enzima *EcoRI* que al igual que en los casos anteriores corta asimétricamente dentro del gen liberando un fragmento de 631 pb y otro de 395 pb y, además, corta en un sitio único dentro del vector. De esta manera, si la recombinación fue exitosa, se debiera liberar en el ensayo una banda de 2723 pb y otra de 14171 pb que es justamente lo que se observa en la Figura 15 b).

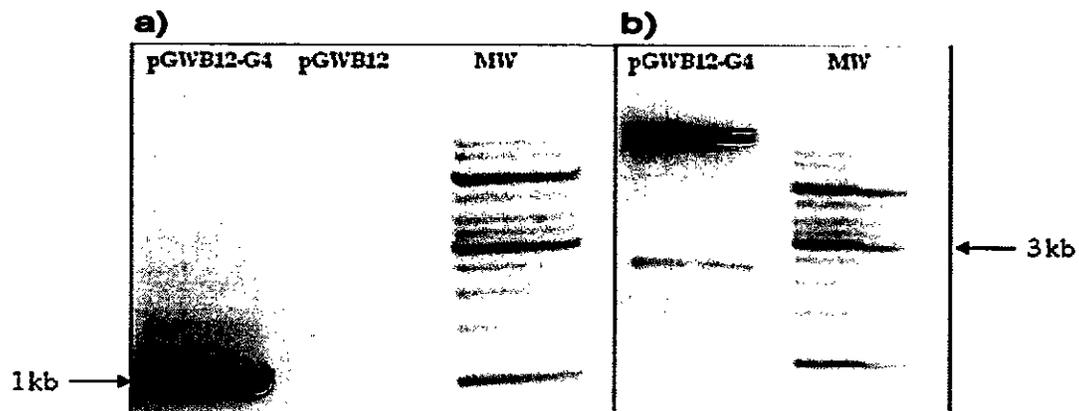


Figura 15: Comprobación de la recombinación LR de GONST4 en el vector de destinación pGWB12. Gel de agarosa con bromuro de etidio en que se muestra en: a) PCR de una mini-preparación de la colonia seleccionada (pGWB12-G4) y del vector vacío (pGWB12) como control negativo utilizando el programa GONST4-ORF (Tabla II, sección 3.1.1). Se observa una banda de 1 kb correspondiente a GONST4. b) Análisis de restricción: se observa la digestión total de una mini-preparación de pGWB12-G4 con *EcoRI* que corta dentro del vector y dentro del inserto liberando dos fragmentos, uno de 2723 pb y otro de 14171 pb. MW: estándar de peso molecular.

4.3.4 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con los vectores pMDC43-G4 y pGWB12-G4.

Con los dos vectores de destinación generados, se transformó, por separado *A. tumefaciens* con ambas construcciones. En la figura 16 se muestra un PCR de colonias de *Agrobacterium* transformadas con pMDC43-G4 sometidas a un shock térmico de 95°C por 5 minutos y luego se realizó un PCR directamente sobre una dilución de estas colonias. Se muestra el PCR confirmativo para la transformación con pMDC43-G4 donde se observa que cuatro (AT1, 3, 4 y 6) son clones positivos para GONST4 mientras que las otras dos colonias probablemente no tengan el plásmido. Para *A. tumefaciens* transformada con el vector pGWB12-G4 los resultados son muy similares (datos no mostrados).

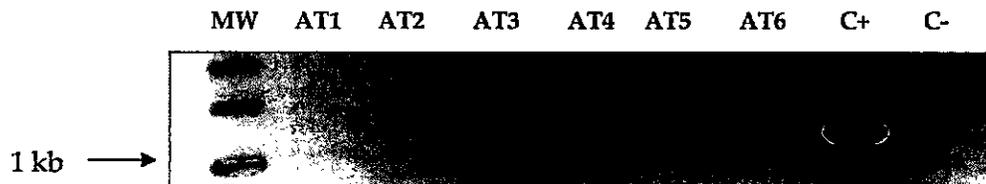


Figura 16: PCR de colonias AT1-AT6 de *A. tumefaciens* transformada con pMDC43-G4. Gel de agarosa con bromuro de etidio en que se muestra la reacción de PCR GONST4-ORF (Tabla II) utilizando como molde DNA de las colonias AT1-AT6. Se utilizó como control negativo DNA de *Agrobacterium tumefaciens* sin transformar. Se observa la presencia de una banda de 1 kb en las colonias AT1, AT3-4 y AT6 correspondiente a GONST4. C-: *Agrobacterium* sin transformar, MW estándar de peso molecular. Las bandas aparecen levemente desplazadas hacia arriba debido al tamaño del gel.

4.3.5 Comprobación de la funcionalidad del vector pMDC43-G4 mediante RT-PCR

Una vez que se tenía el vector pMDC43-G4 en *Agrobacterium* se procedió a infiltrar hojas de tabaco con colonia 4 y 3 días post infiltración (d.p.i) se verificó la expresión de GONST4 mediante RT-PCR. Para este objetivo, se extrajo RNA desde las hojas de tabaco, se cuantificó y se verificó su integridad por electroforesis (datos no

mostrados). A continuación se realizó la retrotranscripción con oligo-dT y, con el cDNA obtenido, finalmente se realizó la reacción de PCR.

Los resultados de este experimento (Figura 17, panel superior) muestran que en las hojas seleccionadas se estaba expresando GONST4 debido a que en el gel de la electroforesis se observa la banda de 1 kb correspondiente a su cDNA. Como control de calidad se utilizó el gen de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPA) cuya expresión es constitutiva (Figura 17, panel inferior).

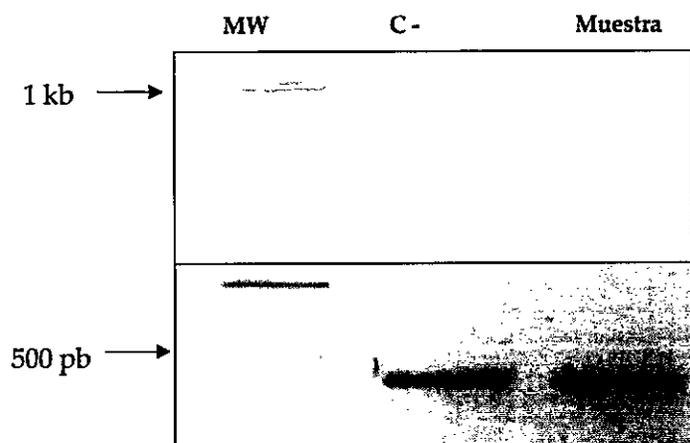


Figura 17: RT-PCR confirmativo de la funcionalidad del vector pMDC43-G4. Gel de agarosa 1% con bromuro de etidio donde se muestra la expresión del cDNA de GONST4 mediante RT-PCR. Se utilizó RNA obtenido desde hojas de *N. tabacum* 3 d.p.i. con *Agrobacterium tumefaciens* transformada con el vector pMDC43-G4. En el panel superior se observa que en la muestra se amplifica GONST4 y no así para el control negativo, mientras que la expresión de GAPA es similar tanto para el control negativo como para la muestra (panel inferior). MW: estándar de peso molecular. C-: hoja de tabaco infiltrada con *Agrobacterium* sin transformar.

4.3.6 Comprobación de la funcionalidad del vector pMDC43-G4 mediante microscopia confocal.

Para comprobar que el vector pMDC43-G4 es funcional, se infiltró hojas de tabaco y 3 d.p.i. se visualizó la señal de GFP en el microscopio confocal (Figura 18) en donde se observó una amplia distribución de la señal de fluorescencia a lo largo del tejido foliar infiltrado. Se observaron señales puntuales en el citoplasma que, por su tamaño y distribución intracelular, corresponden a Golgi y RE (Figura 18 a). Estas

señales no colocalizan con la fluorescencia emitida por los cloroplastos (Figura 18 c), por lo que se puede concluir que son propias de GFP y no de artefactos celulares que produzcan fluorescencia. Al comparar el campo claro (Figura 18 b) con el panel a) se puede notar que la fluorescencia se hace más intensa en los bordes de las células posiblemente porque la vacuola ocupa gran parte del volumen celular y por lo tanto, concentra la señal a un volumen menor. De estas imágenes se puede concluir que el vector pMDC43-G4 se expresa en Golgi y RE tal como era esperado.

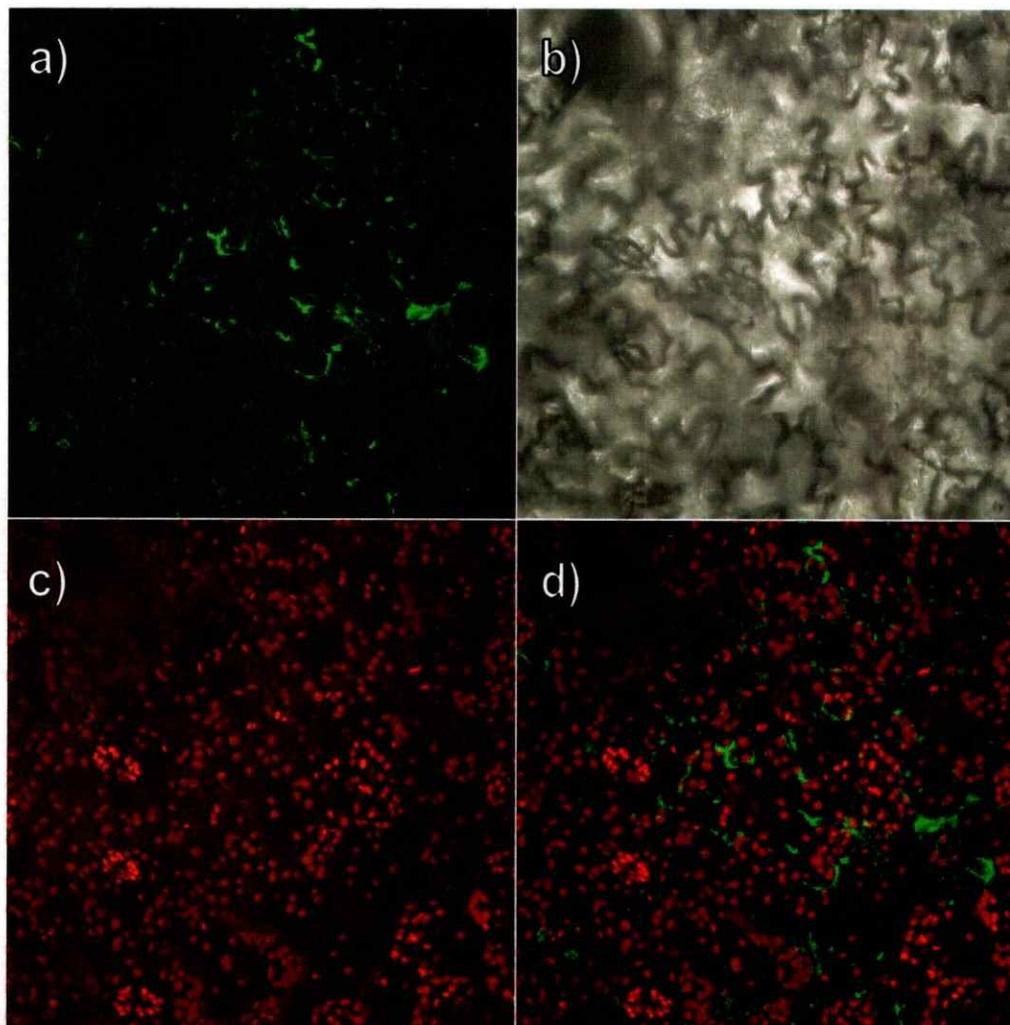


Figura 18: Comprobación de la funcionalidad del vector pMDC43-G4 en hojas de tabaco. Imágenes obtenidas en microscopio confocal. Se observan hojas de tabaco luego de 3 d.p.i con *A. tumefaciens*. a): Canal filtrado a XYZ nm (GFP) b): campo claro de la misma sección; c): Canal filtrado a XYZ nm (clorofila); d): **sobreposición de a y c.** Las imágenes están aumentadas 400 veces, la barra blanca equivale a 100 μm .

4.4 Estudio del transporte de nucleótido azúcar mediado por N-GFP GONST4.

Una vez que se determinó la acumulación de GONST4 con GFP acoplada a su extremo N-terminal, se procedió a medir la especificidad de sustrato de este TNA. Una fracción enriquecida en el aparato de Golgi fue extraída de hojas de *Nicotinia tabacum* previamente infiltradas con *A. tumefaciens* portando el plásmido pMDC43-G4 o pMDC43 como control negativo. Para verificar la integridad de las vesículas extraídas, se utilizó la incorporación de UDP-[³H]-D-glucosa a estas fracciones. GONST4 no debería ser capaz de transportar UDP-azúcares debido al sitio de unión de GDP que posee y tal como se mencionó en la introducción, no se ha descrito un transportador que sea capaz de transportar GDP-azúcares y UDP-azúcares. Este ensayo de transporte con UDP-[³H]-D-glucosa no demostró diferencias significativas estadísticamente (t de student = 0,12) entre el control y N-GFP GONST4 (datos no mostrados).

Luego, se midió la incorporación de GDP-[¹⁴C]-D-manosa y GDP-[¹⁴C]-L-galactosa (sección 4.2) mediado por N-GFP GONST (Figura 19). No hubo una diferencia significativa en la incorporación de GDP-[¹⁴C]-D-manosa entre vesículas de Golgi extraídas de tabaco infiltrados con pMDC43-G4 comparada con las extraídas del control (pMDC43 vacío). Sin embargo, la incorporación de GDP-[¹⁴C]-L-galactosa fue significativamente mayor ($2,93 \pm 1,19$ veces) en la muestra obtenida de hojas infiltradas con pMDC43-G4, por lo que se puede concluir que N-GFP GONST4 es capaz de transportar GDP-L-galactosa.

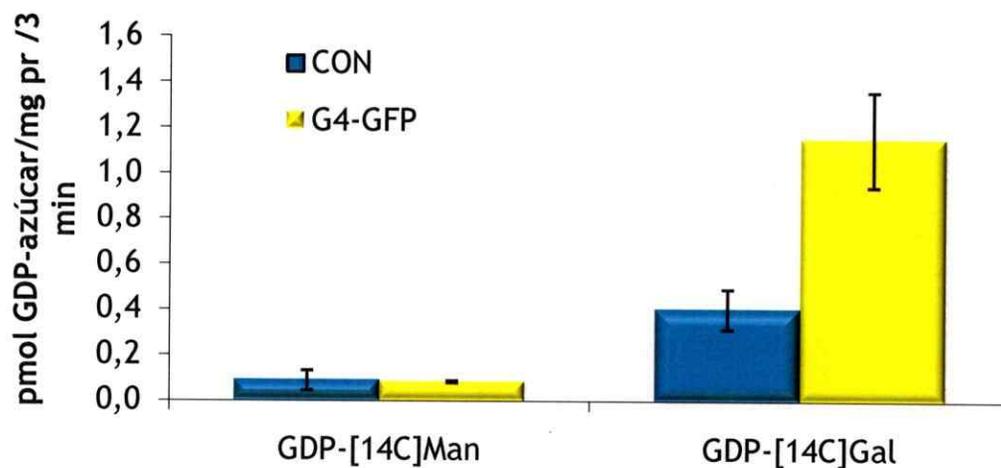


Figura 19: N-GFP GONST4 es capaz de transportar GDP-L-galactosa. Se utilizó vesículas enriquecidas en Golgi obtenidas desde *N. tabacum* (ver Materiales y métodos sección 3.4.4 y 3.5.2) 3 d.p.i. con *Agrobacterium tumefaciens* sin transformar (control) y transformadas con el vector pMDC43-G4 (G4-GFP), observándose un aumento de 2,93 veces en el transporte de GDP-[14C]-L-galactosa. Las barras representan el error (n = 3).

5. DISCUSIÓN.

En la memoria presentada se abordó el tema de la especificidad de sustrato del transportador de nucleótido-azúcar de *Arabidopsis*: GONST4. Con el propósito de obtener evidencia de los sustratos potenciales de GONST4 se realizó un análisis filogenético, mediante el algoritmo bayesiano, incluyendo TNAs caracterizados y predichos de distintos organismos y utilizando como "outgroup" la familia de los transportadores de triosa fosfato (TPT). Esta última familia comparte ciertas características estructurales y funcionales con los TNAs; ambas familias poseen proteínas de membrana tipo III dentro de sus miembros, transportan carbohidratos unidos a moléculas con fosfato, son antiporters soluto/soluto y, debido al hecho de ser proteínas plastidiales, se puede suponer que son proteínas ancestrales a los TNAs. El valor de confiabilidad para este grupo como outgroup es de 1,00 por lo que, con mayor razón, se justifica la utilización de esta familia con esos fines (Fig. 7).

El árbol generado presenta altos valores de confiabilidad para cada rama. Existen sólo tres valores (0,58; 0,59 y 0,64) que están por debajo del 0,9 de probabilidad posterior. Sin embargo los valores no son lo suficientemente bajos ($< 0,50$) como para poner en duda la estructura presentada y, en conjunto a esto, por la posición en que se encuentran estos valores, las familias descritas en el árbol no se verían afectadas en caso de que esas ramas estuvieran o no separadas.

Dentro de la familia 1, que tiene particular importancia en esta memoria debido a que es en la que se agrupa a GONST4, fue posible distinguir algunos motivos conservados. En primer lugar se encontró dos motivos que han sido descritos como

motivos de unión a GDP: (1) Motivo [AG]xxxxGK[ST] (Saraste et al, 1990) y (2) el motivo G V/I V N K (Baldwin et al, 2001). En particular, el residuo de lisina de este último motivo (Lys 269 en GONST4) se encuentra presente en todas las familias excepto en las N° 7 y 8, incluida la familia de los TPTs, indicando que este residuo podría jugar un rol importante en la función de los TNAs. Profundizando esta observación, se puede proponer que debido a que estas proteínas se especializan en el transporte de moléculas con carga negativa (grupos fosfato del NA o triosa fosfato), requieren de algún aminoácido con carga positiva, como es el caso de lisina, para interactuar con el sustrato y poder generar los cambios conformacionales necesarios para que la molécula atraviese la bicapa lipídica. Tomando esto en consideración, existen otros dos residuos de lisina (Lys 33 y 177 en GONST4) que se encuentran altamente conservados en la mayoría de las familias lo que da aun más indicios de la importancia que tienen estos residuos de carga positiva en este tipo de proteínas capaces de transportar moléculas con carga negativa. Con respecto a la especificidad del azúcar, no se conoce un motivo de unión de los TNAs que sea específico para un tipo de azúcar particular. Sin embargo, del alineamiento se pueden obtener algunos residuos que son característicos de cada familia (Figura 20). En esta figura, los residuos más destacados son aquellos que presentan carga (K, D y E) o bien aquellos que se encuentran relativamente cercanos a los motivos de unión a GDP antes mencionados (K₂₈₂H₂₈₃). De manera análoga, como estrategia para encontrar algún motivo específico para la unión del azúcar que compone el NA, se buscó en la literatura sitios de unión de proteínas que unen sólo azúcares y se encontró que, por ejemplo, las proteínas que unen manosa poseen en su secuencia el sitio EPN (Weis et al, 1992) y las que unen galactosa poseen el sitio QPD (Drickamer 1992). Sin embargo, no

NH₂ SSSRFDSNKQLTTSSSLVIGYALCSSLLAVINKLAITYFNYPGLLLTALQY
 LTCTVAVYLLGKSGLINHDPFTWDTAKKFLPAAIVFYLAIFTNTNLLRHANVDT
 FIVFRSLTPLLVAIADTVFRSQPLPSRLTFLSLVVILAGAVGYVATDSSFTLTA
 YSWALAYLVTITTEMVYIKHMVSNIKLNIWGLVLYNNLLSLMIAPVFWFLTGEF
 TEVFAALSENRGNLFE^{EPY}AFSSVAASCVEGFLISYFGFAARNAISATAFTVTGV
 VNKFLT^{VV}INVL^{WD}KHATPVGLVCLLETICGGVGYQQSVKLDKPIEKVSEKDS
 EKGEDEELTQLVPGK^{ASVV} **COOH⁻**

| | | |
|----|----------------------------------|-------------|
| 1 | <u>SGFSGAEMIVTGFISARIFVVKKHL</u> | Desconocido |
| 2 | VFQFSTYTMLRGPMTWMTMVSKQFY | GDP-Man |
| 3 | CAVLATVMATESMISWLTYLSKVPs | GONST1 |
| 4 | ILYFSMyVMIDDTISWVTYMAKAPV | GDP-Man |
| 5 | FSFVAINGVLKGLLMLTNTICNDYN | UDP-azúcar |
| 7a | IAYCFGYStLiaLFATLKLHSAfqW | GDP-Fuc |
| 7b | IaYCFGNATLirLYVI fPiGAatKW | GDP-Fuc |
| 8a | LTTTAVAGFLVLRLLVYDGASIFHF | UDP-Gal |
| 8b | IDPTVCTNQaADIQNTSGNTTRGNQ | UDP-Gal |

Figura 20: Residuos distintivos de GONST4 y de cada familia de TNAs. Se presenta la secuencia de GONST4 con la posición de los residuos distintivos encontrados para cada familia (amarillo) y motivos similares de unión a azúcares presentes en la secuencia (verde). Bajo la secuencia se encuentran los residuos distintivos para cada una de las familias del árbol. Las familias 7 y 8 se separaron en dos grupos (a y b; subfamilias) debido a las grandes diferencias que presentaban en estos residuos consenso. En mayúscula se muestran residuos idénticos en todos los integrantes de la familia y en minúscula aquellos que no son iguales en todos los integrantes pero que la mayoría de ellos lo conserva.

fue posible encontrar el sitio EPN en TNAs que se saben que transportan GDP-D-manosa (ver tabla III). Adicionalmente ni EPN ni QPD se encuentran en los miembros de la familia 1, aunque todos poseen sitios que presentan características similares en cuanto al patrón de hidrofobicidad (DPF y EPY, destacados en Fig 20). Sin embargo, éstas no han sido descritas como secuencias de unión de azúcares. Como proyección de este análisis, mutaciones sitio-dirigidas a los residuos conservados (en amarillo o en verde, Figura 20) serían interesantes desde el punto de vista funcional para estudiar cómo se afecta el transporte o la unión de GDP a la proteína dependiendo del tipo de

modificación aminoacídica que se realice (por ejemplo, cambio de aminoácido cargado por uno hidrofóbico) y también para estudiar los cambios que puedan generarse desde el punto de vista estructural.

En relación a esto último, una caracterización estructural al nivel de una cristalografía sería ideal para comprender de mejor manera cómo funcionan estos transportadores y, así, generar un modelo tridimensional de calidad para los representantes de las diversas familias presentadas. Sin embargo, la dificultad que presenta el hecho de cristalizar proteínas de membrana ha hecho más complicada esta tarea por lo que se requiere de otro tipo de estrategias para comenzar a dilucidar poco a poco la estructura de los TNAs.

En esta memoria se plantean dos modelos de DTM. De ambos, el modelo con 9 DTM resulta más atractivo por el hecho de que ambos motivos descritos de unión a GDP se encuentran orientados hacia el citoplasma y podrían así tener contacto con el sustrato. En conjunto con esto se ha descrito (Gao et al, 2001) que la presencia del extremo amino terminal hacia el citoplasma es esencial para que exista un correcto direccionamiento del transportador Vrg4p de levadura hacia el aparato de Golgi. Específicamente, en esta memoria se abordó el problema mediante la generación de vectores con fusiones proteicas (GFP y FLAG) para identificar la posición (lumenal o citoplasmática) del extremo amino terminal de GONST4 y así poder validar alguno de los dos modelos de DTM planteados (Figura 6). Además, uno de estos vectores, fue utilizado para determinar la especificidad de sustrato de GONST4.

Para el desarrollo de los vectores se utilizó la tecnología GATEWAY[®] que otorga la ventaja de que una vez generado el vector de entrada con el gen de interés

clonado, es posible recombinarlo con una amplia gama de vectores de destinación (con distintos epítopes en amino o carboxilo terminal, con promotores en duplicado, sin promotor, etc). Es por esta razón, que el vector pCR8-G4 puede ser utilizado para los fines que se estime conveniente, aunque con algunas excepciones (por ejemplo, epítopes en su extremo carboxiterminal), debido a que la secuencia de GONST4 clonada contiene el codón de término. Los vectores de destinación generados (pGWB12-G4 y pMDC43-G4) poseen la secuencia codificante para un epítope FLAG y GFP, respectivamente. Se utilizó dos vectores porque cada uno de ellos se aplica para fines distintos. Por un lado GFP es una molécula fácilmente detectable por microscopía y que podría dar indicios de la localización subcelular de GONST4 pero presenta la desventaja de tener un tamaño considerable (240 aa) que podría interferir de alguna manera con la estructura de la proteína en la que se inserta como gen reportero. Con el objeto de descartar estos factores se utilizó un segundo vector que posee como epítope la secuencia FLAG que sólo tiene 6 aminoácidos y que, debido a esto, no interferiría con la estructura de la proteína. No obstante, esta secuencia es más difícil de detectar ya que no posee fluorescencia intrínseca como el caso de GFP y la manera más simple de detectarla es mediante Western Blot. Con estos vectores se persigue el mismo objetivo pero desde diferentes puntos de vista. En primer lugar, el vector pMDC43-G4 se utilizó para verificar que GONST4 se dirigía hacia el aparato de Golgi a pesar de la inserción de algún epítope y para posteriormente realizar ensayos de inmunofluorecencia o de Dot-Blot en presencia o ausencia de Triton X100 y visualizar si el extremo amino terminal se orienta hacia el interior del lumen de Golgi o hacia el citoplasma. Por otra parte, el vector pGWB12-G4 posee una secuencia que contiene sólo 6 aminoácidos y

que, por lo mismo, resulta una tecnología más “limpia” y con menos distorsión de los resultados atribuible a la presencia de un epítipo de tamaño más grande como GFP que en teoría podría afectar la estabilidad de la proteína, efecto que en la práctica suena bastante complicado debido al tamaño de la proteína y a la gran cantidad de DTM predichos. Sin embargo, el resultado con este vector sería mucho menos atribuible a factores externos. Con este vector se pretende realizar los ensayos de Dot-Blot en presencia o ausencia de Tritón X100 y comenzar con la dilucidación de la estructura terciaria de la proteína.

El resultado de la localización subcelular (Fig. 19) indica que GONST4-GFP N terminal se encuentra en Golgi y en retículo endoplasmático (RE). Los transportadores de la familia GONST son transportadores que se localizan específicamente en el aparato de Golgi (Handford et al, 2004). La presencia en este caso de GONST4 en el RE podría explicarse mediante una posible sobrecarga del sistema al sobreexpresar con un promotor constitutivo como lo es el promotor 35S o bien porque el direccionamiento de la proteína podría depender en gran medida de su extremo N terminal y al estar este con un epítipo de este tamaño, este direccionamiento se vería interferido por la molécula de GFP. Esto último se avala en que fusiones GONST4-GFP en el extremo C terminal muestran señal sólo en el aparato de Golgi (pVK-G4; Handford et al, 2004). Para descartar que sea el tamaño de la molécula de GFP lo que interfiere con un correcto direccionamiento se podrían realizar ensayos de inmunofluorescencia con el vector pGWB12-G4.

Tal como se mencionó anteriormente, la evidencia de la filogenia parecía indicar que GONST4 transportaba un sustrato distinto a los que se habían caracterizado en otras

especies. Dentro de estos sustratos estaba GDP-L-galactosa que es un NA que no se encuentra disponible comercialmente con o sin marca radioactiva. Por esta razón, fue necesario aplicar un método de síntesis y purificación del NA para poder utilizarlo posteriormente en ensayos de transporte y verificar la actividad de GONST4 en su presencia.

El producto de interés para este estudio (GDP-L-galactosa) sólo representa un 15% de los NA totales que quedan en la mezcla de reacción. La enzima GME tiene una K_m de 4,4 μM y una k_{cat} de $0,041 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Wolucka et al, 2003) lo que indica que la enzima posee una alta afinidad por GDP-D-manosa pero la tasa de conversión a GDP-L-galactosa y GDP-L-gulosa es baja. Es por esta razón, que se realizaron diversas pruebas aumentando el tiempo de reacción y las proporciones se mantuvieron (datos no mostrados). Sumado a esto, al agregar al medio una concentración determinada de GDP-L-galactosa al inicio de la reacción (se utilizó una concentración equivalente al 5% final), el equilibrio final se mantenía (0,8 GDP-D-man; 0,15 GDP-L-gal; 0,05 GDP-L-gul; datos no mostrados). Lo mismo sucedía en el caso de partir con una concentración inicial de GDP-L-gulosa, por lo tanto, la enzima GME cataliza la interconversión de estos azúcares y las proporciones finales están determinadas por el equilibrio termodinámico que se da en solución. Esto último también sugiere que en *A. thaliana* el flujo a través de la vía de conversión está regulado por las enzimas que vienen más abajo en la ruta que consumen un azúcar en preferencia de otro. Otros parámetros estudiados, fueron la temperatura, obteniéndose el máximo de actividad a 21 °C y un aumento en la concentración de la proteína que no tenía efecto alguno en las proporciones finales. En cuanto a un aumento en la concentración de sustrato, se

observaban efectos lineales en cuanto a la concentración de producto sin afectar las proporciones (Fig.8).

La técnica utilizada para detectar que efectivamente el producto obtenido era GDP-L-galactosa fue PACE que es una tecnología poco convencional pero que resultó ser la única eficaz debido a las bajas cantidades que se pretendía detectar (pmoles). Otras técnicas más simples como algunas colorimétricas para galactosa o enzimáticas con galactosa oxidasa no dieron resultados debido a la baja sensibilidad de los métodos (datos no mostrados). Sin embargo, para PACE el mayor inconveniente resultó ser la visualización de las bandas que resultaban un poco difusas y grandes. No fue posible lograr bandas de mejor calidad pero para el objetivo que se perseguía, es decir, identificar el producto de la reacción con GME como galactosa, resultó ser un método satisfactorio.

Finalmente, para estudiar la especificidad de sustrato de GONST4, se utilizó fracciones enriquecidas en Golgi extraídas desde hojas de tabaco infiltradas con el vector pMDC43-G4 que se observó por microscopía confocal que efectivamente la proteína se dirigía hacia el aparato de Golgi y retículo endoplasmático (Figura 18) . Con estas fracciones enriquecidas, se realizó ensayos de transporte con GDP-L-galactosa sintetizada observándose un aumento estadísticamente significativo en el transporte de este NA en las hojas transformadas versus el control lo que da un indicio sobre el posible transporte de GDP-L-galactosa que realiza GONST4. El hecho de que esta molécula sea un sustrato que transporta GONST4 resulta consistente con los datos obtenidos de la filogenia que indican que esta proteína pertenece a un clado aparte del resto (Familia 1) y que, además, ninguno de sus miembros tiene algún sustrato

caracterizado. Sin embargo, para corroborar este resultado, se deberían realizar ensayos de transporte con vesículas obtenidas de hojas de tabaco infiltradas con el vector pGWB12-G4 y, en el caso de observar un efecto similar, se podría comenzar a estudiar la composición de RG-II en plantas GONST4.

6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES.

- Se generó el vector pMDC43-G4 para ser utilizado como herramienta molecular mediante la cual, por estudios de inmunofluorescencia, permitirá dilucidar el número de DTM de GONST4 y validar uno de los dos modelos de topología de membrana propuestos en esta memoria.
- Se estandarizó una metodología de síntesis de un NA (GDP-L-galactosa) que no se encuentra disponible comercialmente y que puede resultar útil para el estudio de otros integrantes de la familia de los TNAs.
- La enzima GME cataliza la interconversión de GDP-D-manosa a GDP-L-galactosa y GDP-L-gulosa en proporciones 8 : 1,5 : 0,5. Estos azúcares y las proporciones finales están determinadas por el equilibrio termodinámico que se da en solución.
- Los residuos que distinguen a la familia 1, a la cual pertenece GONST4, podrían ser importantes en la unión del azúcar, por lo que mutaciones sitio-dirigidas a estos residuos podrían entregar información relevante sobre la especificidad por el azúcar del NA.
- GONST4 sería el primer TNA conocido capaz de transportar GDP-L-galactosa. El único polisacárido que se conoce requiere este NA es la pectina RG-II por lo

que resulta interesante estudiar el efecto que tendrían mutantes *GONST4-* sobre la composición de azúcares de esta pectina.

8. BIBLIOGRAFÍA.

Albersheim P. (1985). Oligosaccharins. *Sci. Amer.* **253**; 58-59

Altschul S.F, Gish W, Miller W, Myers E.W, Lipman D.J (1990). Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410

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

Bakker H, Routier F, Oelmann S, Jordi W, Lommen A, Gerardy-Schahn R. and Bosch D (2005). Molecular cloning of two *Arabidopsis* UDP-galactose transporters by complementation of a deficient Chinese hamster ovary cell line. *Glycobiology* **15** 2:193-201

Berninsone PM, Hirschberg CB (2000). Nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus. *Curr Opin Struct Biol.* **10**: 542-547.

Bonin CP, Potter I, Vanzin GF, Reiter W-D (1997). The *MURI* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalyzing the first step in the novo synthesis of GDP-L-fucose. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:2085-2090.

Brett C, Waldron K. (1990). Physiology and biochemistry of plant cell walls. *Topics in Plant Physiology* **2**; 4-57.

Carpita N. and McCann M. (2000). The cell wall. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Chapter 2. Edited by Buchanan, B. pp 52-108. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.

Conklin, P.L., Barth, C., (2004). Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant Cell Environ.* **27**, 959-970.

Curtis M. and Grossniklaus U. (2003). A Gateway™ cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* **133**:462-469.

Davey, M.W., Van, M.M., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I.J.J., Strain, J.J., Favell, D., Fletcher, (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 825-860.

- Dean N., Zhang Y.B. and Poster J.B. (1997).** The *VRG4* gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the Golgi in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem* **272**; 21908-31914.
- Delmer DP, Haigler CH (2002)** The regulation of metabolic flux to cellulose, a major sink for carbon in plants. *Metabolic. Eng.* **4**: 22-28
- Drickamer K. (1992)** Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose binding protein. *Nature* **360**: 183-186
- Eckhardt M, Gotza B, Gerardy-Schahn R (1999).** Membrane topology of the mammalian CMP-sialic acid transporter. *J Biol Chem.* **274**: 8779-8787.
- Erns M, Brauchart D, Boresch S and Sieghart W (2003).** Comparative modeling of GABA_A receptors: Limits, insights, future developments. *Neuroscience* **119**:933-943.
- Feingold D.S. and Avigad G (1980).** Sugar nucleotide transformations in plants. *The Biochemistry of Plants* **3**; 101-170
- Gao XD, Nishikawa A, Dean N (2001).** Identification of a conserved motif in the yeast Golgi GDP-mannose transporter required for binding to nucleotide sugar. *J Biol Chem.* **276**: 4424-4432.
- Goubet F, Jackson P, Deery MJ, and Dupree P (2002).** Polysaccharide Analysis Using Carbohydrate Gel Electrophoresis: A Method to Study Plant Cell Wall Polysaccharides and Polysaccharide Hydrolases. *Analytical Biochemistry* **300**, 53-68.
- Handford MG, Sicilia F, Brandizzi F, Chung JH and Dupree P (2004).** *Arabidopsis thaliana* expresses multiple Golgi-localised nucleotide-sugar transporters related to GONST1. *Mol. Gen. Genomics* **272**:397-410.
- Handford M. G., Sicilia F., Brandizzi F., Chung J.H., Dupree P. (2004).** *Arabidopsis thaliana* expresses multiple Golgi-localised nucleotide-sugar transporters related to GONST1. *Mol Gen Genomics* **272**; 397-410.
- Handford M., Rodriguez-Furlán C. and Orellana A. (2006).** Nucleotide-sugar transporters: structure, function and roles *in vivo*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **39**; 1149-1158.
- Handford MG (2006).** Biosynthesis of plant cell walls. *Ciencia e Investigación Agraria* **33**: 179-196
- Higgins D., Thompson J.D, Gibson T (1994).** CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* **22** 4673-4680.

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

Jack DL, Yang NM, Saier MH Jr (2001). The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur J Biochem* ;**268**:3620-3639.:

Kato N, Pontier D, Lam E (2002). Spectral profiling for the simultaneous observation of four distinct fluorescent proteins and detection of protein-protein interaction via fluorescence resonance energy transfer in tobacco leaf nuclei. *Plant Physiol* **129**:931-942

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

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

Liepman A.H., Wilkerson C.G. and Keegstra K. (2005). Expression of cellulose synthase-like (Csl) genes in insect cells reveals that CslA family members encode mannan synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**;2221-2226.

Lübke T, Marquardt T, Etzioni A, Hartmann E, von Figura K, Körner C (2001). Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorder of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency, *Nat. Genet.* **28**; 73-76.

Martinez-Duncker I, Mollicone R, Codogno P and Oriol R (2003). The nucleotide sugar transporter family: a phylogenetic approach. *Biochimie* **85**:245-260.

Major LL, Wolucka BA and Naismith JH (2005). Structure and Function of GDP-Mannose-3',5'-Epimerase: An Enzyme which Performs Three Chemical Reactions at the Same Active Site. *J. Am. Chem. Soc.* **51**: 18309-18320

Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai K, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T and Kimura T (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **1**: 34-41

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

O'Neill, M., S. Eberhard, P. Albersheim, and A.G. Darvill (2001). Requirement of borate crosslinking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science* 294: 846-849.

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

Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N.-H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313, 810-812.

Ordenes VR, Reyes FC, Wolff D and Orellana A (2002). A thapsigargin-sensitive Ca²⁺ pump is present in the pea Golgi apparatus membrane. *Plant Physiol* 129:1820-1828.

Orellana, A., G. Neckelmann, and L. Norambuena. (1997). Topography and function of Golgi uridine-5'-diphosphatase from pea stems. *PlantPhysiol.* 114:99-107.

Paladini AC, Leloir LF (1952). Studies on uridine-diphosphate-glucose. *Biochem J* 51: 426-430.

Rabina J, Mäki M, Savilahti EM, Järvinen N, Penttilä L and Renkonen R (2001). Analysis of nucleotide sugars from cell lysates by ion-pair solid phase extraction and reversed phase high-performance liquid chromatography. *Glycoconjugate Journal* 18:799-805.

Reuhs, B.L, Glenn J, Stephens S.B, Kim J.S, Christie D.B, Glushka J.G, Zablackis E, Albersheim P, Darvill A.G and O'Neill M (2004). L-galactose replaces L-fucose in the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II synthesized by L-fucose-deficient *mur1 Arabidopsis* mutant. *Planta* 219: 147-157.

Rollwitz I, Santaella M, Hille D, Flügge U, Fischer K (2006). Characterization of AtNST-KT1, a novel UDP-galactose transporter from *Arabidopsis thaliana*. *Febbs letters* 17: 4246-4251.

Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.

Sacks D.L, Modi G, Rowton E, Späth G, Epstein L, Turco S.J, Beverley S.M (2000). The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97; 406-411.

Saraste M., Sibbald P.R., Wittinghofer A (1990). The P-loop -- a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 430-434.

Seifert G. and Roberts K (2004). The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology* **58**; 137-161.

Sturla, L., R. Rampal, R.S. Haltiwanger, F. Fruscione, A. Etzioni, and M. Tonetti. (2003). Differential terminal fucosylation of *N*-linked glycans versus protein *O*-fucosylation in leukocyte adhesion deficiency type II (CDG IIc). *J. Biol.Chem.* **278**:26727-26733.

Watanabe K, Suzuki K and Kitamura S (2006). Characterization of GDP-D-mannose 3'5'-epimerase from rice. *Phytochemistry* **67**: 338-346.

Weis WI, Drickamer K, Hendrickson WA (1992). Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* **360**:127-34.

Wolucka BA, Persiau G, Van Doorselaere J, Davey MW, Demol H, Vandekerckhove J, Van Montagu M, Zabeau M, Boerjan W (2001). Partial purification and identification of GDP-mannose 3",5"-epimerase of *Arabidopsis thaliana*, a key enzyme of the plant vitamin C pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*(**26**):14843-8.

Wolucka BA , Van Montagu M (2003). GDP-Mannose 3_5_-Epimerase Forms GDP-L-gulose, a Putative Intermediate for the de Novo Biosynthesis of Vitamin C in Plants. *J. of Biol. Chemistry* **278**: 47483-47490.

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