

UCH-FC
Biotecnología
A 663
C.1



ESCUELA DE PREGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

“Análisis bioquímico para la determinación de la actividad enzimática de VvSDH1, una posible sorbitol deshidrogenasa de *Vitis vinífera* (vid)”

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

Por

Jorge Andrés Araya Flores

Director de Seminario de Título: Dr. Michael Handford
Co – Directora de seminario de Título: Dra. Claudia Stange

Septiembre 2011
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. **Jorge Andrés Araya Flores**.

“Análisis bioquímico para la determinación de la actividad enzimática de VvSDH1, una posible sorbitol deshidrogenasa de *Vitis vinífera* (vid)”

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

Dr. Michael Handford
Director Seminario de Título

Dra. Claudia Stange Klein
Co-Directora

Comisión de Evaluación

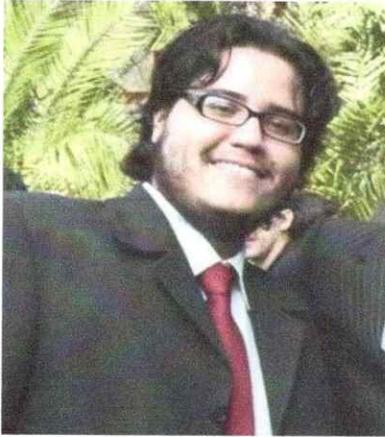
Dr. Marcelo Baeza Cancino
Presidente Comisión

Dra. Victoria Guixé Leguía
(Reemplaza Dra. Claudia Stange)
Evaluadora



Santiago de Chile, septiembre de 2011

BIOGRAFIA



Una calurosa mañana del 11 de enero de 1985 a eso de las 11 de la mañana fue el momento en el que tuve contacto por primera vez con esta realidad. Mis padres, Mario Araya y Margarita Flores decidieron que su tercer hijo llevase por nombre de Jorge Andrés.

Mi educación básica y media la realicé en un colegio científico humanista, mixto y perteneciente a los Marianistas. El año 2002 fue el año en el cual se podría decir que se cerró uno de los primeros ciclos en mi vida, salir de la burbuja del colegio, realizando eso si una transición pre-universitaria de un año.

Luego de esta etapa, durante el año 2004 ingresé al Programa Académico de Bachillerato de la Universidad de Chile, dando así inicio a lo que se podría denominar un nuevo ciclo, durante el cual para el año 2006 ya me encontraba en la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular.

Durante el tiempo de permanencia en la universidad conocí a muchas personas, muchas realidades y creo que todos quienes han vivido esta etapa saben que el mundo se abre de una manera impresionante... durante este periodo crecí bastante, tanto como científico y como persona, hice muchas amistades y contactos, conocí personas maravillosas, viví el amor y el desamor, la alegría y la tristeza, la impotencia y el alivio entre tantas otras situaciones... y es así como hoy me encuentro a punto de realizar “el rito” que marcará el fin de este ciclo, dejar de ser un estudiante universitario de pregrado y comenzar con uno nuevo, con nuevos desafíos y nuevas situaciones.

AGRADECIMIENTOS

Son tantas las personas que han participado en este proceso y como muchos sabrán mi memoria tan mala que me es imposible nombrarlas a todas sin que alguien se me quede fuera...

... Sin duda y primero que todo agradecer a mi familia, por el apoyo eterno e incondicional que siempre he sentido de su parte, no tengo duda alguna que sin ellos jamás habría llegado hasta este punto en mi vida y no sería lo que soy hoy... a mis padres por formarme en los valores necesarios para afrontar la vida y a mis hermanos por el cuidado, apoyo y preocupación que siempre ha existido...

... a mis amigos, a aquellos de toda la vida que a pesar de que el tiempo pase y a veces juegue en contra para compartir siempre están ahí... a los de la universidad en especial a “las niñas” que me acompañaron durante estos largos años... también a ti por acompañarme y apoyarme siempre incondicionalmente durante todo este proceso...

... a la gente que fui conociendo en el camino, compañeros de carrera a quienes tuve la alegría de conocer y también a aquellos que me hubiese gustado tener la oportunidad de conocer más...

... a la gente del laboratorio, por el ambiente de trabajo grato que siempre ha existido y en especial por las tertulias “científicas” con una cerveza en mano... todas instancias que me han ayudado en demasía a crecer como científico y como persona... a mi tutor por el apoyo y entrega a sus alumnos, siempre dispuesto a discutir algún resultado o cualquier inquietud que tuviese tanto dentro del ámbito científico como fuera de él...

... gracias a la vida por darme la oportunidad de participar y llegar al fin de este ciclo y dar así comienzo a una nueva etapa...





ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT	xi
1 INTRODUCCION	1
1.1 Distribución de carbohidratos en plantas.....	1
1.2 Alcoholes de Azúcar en plantas	1
1.3 El sorbitol en los organismos vegetales	3
1.4 Sorbitol Deshidrogenasa (SDH).....	4
1.5 Estrategia Desarrollada.....	7
2 HIPOTESIS	9
3 OBJETIVOS	9
3.1 Objetivo General:.....	9
3.2 Objetivos específicos:	9
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1 Equipos y programas computacionales utilizados.....	10
4.1.1 Centrifugas	10

4.1.2	Termociclador	10
4.1.3	Digitalización de resultados obtenidos en geles de agarosa, generación de esquemas y estudios <i>in-silico</i>	10
4.1.4	Cuantificación de ácidos nucleicos	10
4.2	Material Biológico	11
4.2.1	Vectores utilizados y crecimiento de bacterias	11
4.2.2	Preparación de <i>A. tumefaciens</i> quimiocompetentes.....	13
4.2.3	Especies vegetales utilizadas	13
4.3	Partidores, programas utilizados para reacciones de amplificación de ácidos nucleicos y geles de agarosa	13
4.4	Construcción de pCAMBIA1302 PG-VvSDH1	15
4.4.1	Purificación de pCR8-VvSDH1 y pCAMBIA1302 PG-GFP	15
4.4.2	Obtención de <i>VvSDH1</i> y de pCAMBIA1302 PG lineal.....	15
4.4.3	Generación de pCAMBIA PG-VvSDH1	16
4.4.4	Transformación de <i>E. coli</i> MACH1 quimiocompetente.....	16
4.4.5	Comprobación molecular de pCAMBIA PG-VvSDH1.....	17
4.5	Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con pCAMBIA PG-VvSDH1	18
4.5.1	PCR de colonias de <i>A. tumefaciens</i> para amplificar <i>VvSDH1</i>	18
4.6	Análisis funcional de pCAMBIA PG-VvSDH1.....	19
4.6.1	Transformación transitoria de <i>S. lycopersicum</i> con <i>A. tumefaciens</i>	19
4.6.2	Extracción de RNA.....	19
4.6.3	Reacción de transcripción reversa (RT).....	20
4.6.4	PCR para amplificar <i>18S</i> y <i>VvSDH1</i>	21
4.6.5	Extracción de proteínas totales de frutos de tomate	22
4.6.6	Ensayo de actividad SDH a partir de extractos crudos.	22
4.7	Análisis estadístico	23
5	RESULTADOS	24
5.1	Construcción del vector binario pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1	24
5.1.1	Purificación de pCR8-VvSDH1 y pCAMBIA 1302 PG-GFP	24
5.1.2	Obtención de <i>VvSDH1</i> y pCAMBIA-PG	24

5.1.3	Generación y comprobación molecular de pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1	26
5.2	Análisis de la funcionalidad transcripcional de pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1	31
5.2.1	Transformación y corroboración de la presencia del vector en <i>A. tumefaciens</i>	31
5.2.2	Reacciones de Transcripción reversa	31
5.3	Análisis de la actividad enzimática de VvSDH1 con sorbitol como sustrato.....	33
6	DISCUSION	36
6.1	Construcción y verificación del vector pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1	37
6.2	Análisis de la funcionalidad transcripcional de pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1.....	39
6.3	Análisis bioquímico de VvSDH1 con sorbitol.	40
7	CONCLUSIONES	45
8	PROYECCIONES	45
9	CONGRESOS.....	47
10	ANEXO.....	48
11	BIBLIOGRAFIA	49



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Partidores utilizados.....	14
Tabla 2: Programas utilizados en el termociclador.....	15



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ruta metabólica del sorbitol en rosáceas.	4
Figura 2: Estructura cristalográfica de SDH de rata.....	6
Figura 3: Estructura de la subunidad de SDH de rata.....	6
Figura 4: Esquema de los vectores existentes utilizados.....	12
Figura 5: Purificación de pCR8-VvSDH1 y pCAMBIA 1302 PG-GFP.	24
Figura 6: Digestión enzimática para la obtención de fragmentos de interés.....	25
Figura 7: Bandas de interés purificadas.....	25
Figura 8: Vector pCAMBIA 1302 PG VvSDH1.....	26
Figura 9: PCR de colonias para amplificar <i>VvSDH1</i>	27
Figura 10: Amplificación de <i>PG-VvSDH1</i> desde pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1.....	28
Figura 11: Digestión doble de pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1.....	29
Figura 12: Digestión simple de pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1 con <i>NsiI</i>	30
Figura 13: Amplificación de <i>VvSDH1</i> mediante PCR de colonias en <i>A. tumefaciens</i>	31
Figura 14: Resultados del análisis de la funcionalidad transcripcional de pCAMBIA1302 PG-VvSDH1.....	32
Figura 15: Cinética enzimática de VvSDH1 con sorbitol.....	34
Figura 16: Actividad de sorbitol deshidrogenasa en frutos de tomate infiltrados.....	35



LISTA DE ABREVIATURAS

ADH: Alcohol deshidrogenasa
CaMV35S: Promotor 35S del Virus de Mosaico de Coliflor
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario
CDS: Secuencia codificante (“Coding Sequence”)
DEPC: Dietil Pirocarbonato, compuesto que inactiva RNAsa por modificación covalente en residuos de histidina
dNTPs: Deoxi-nucleótidos-trifosfato: dATP, dTTP, dGTP, dCTP.
DO: Densidad óptica
EST: “expressed sequence tag” o marcador de secuencia expresada
EtOH: Etanol
GFP: proteína verde fluorescente (green fluorescent protein)
idonatoDH: L-idonato deshidrogenasa
kb: Kilobases (1000pb)
L 100pb: Estándar de peso molecular de ácidos nucleicos de 1000 pares de bases.
L 1Kb: Estándar de peso molecular de ácidos nucleicos de 1000 pares de bases.
LB: Medio Luria Bertani
Np: nanopura
ORF: “open reading frame” o marco abierto de lectura
pb: Pares de bases
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PT: proteínas totales
RNA: Ácido ribonucleico ribosomal.
SDH: sorbitol deshidrogenasa-NAD dependiente
Tm: Temperatura de apareamiento del ADN, temperatura a la cual dos hebras complementarias en solución se separan completamente.
U: unidad enzimática
UV: Luz ultra-violeta.



RESUMEN

El sorbitol es el mayor producto fotosintético en especies de árboles frutales de importancia económica para Chile pertenecientes a la familia *Rosaceae*. El sorbitol se sintetiza a partir de la glucosa en las hojas y es transportado por el floema hasta los órganos sumidero, en donde es convertido a fructosa por la acción de la enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH).

A pesar de que el sorbitol es propio y característico de especies vegetales pertenecientes a la familia *Rosaceae*, secuenciaciones de los genomas de otras especies vegetales han revelado la presencia de secuencias ortólogas del tipo *SDH* en especies no *Rosaceae*. En este contexto, trabajos anteriores identificaron un marco de lectura abierta en el genoma de *Vitis vinifera* (vid) el cual se denominó *VvSDH1*. *VvSDH1* posee 75-86% de identidad aminoacídica con SDHs conocidas de especies pertenecientes a la familia *Rosaceae*.

En el presente seminario de título, se construyó y comprobó la funcionalidad transcripcional de un vector de expresión para *VvSDH1* (pCAMBIA-PG-*VvSDH1*) el cual permite que ésta se exprese específicamente en frutos bajo el control del promotor de la poligalacturonasa de tomate (PG). Además, se comprobó mediante la extracción de proteínas totales desde frutos de tomate transformados transitoriamente con esta construcción, que *VvSDH1* genera un aumento significativo en la oxidación de sorbitol con respecto a su control.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, considerando que *Vitis vinifera* no es una planta perteneciente a la familia *Rosaceae*, muestran que VvSDH1 es capaz de oxidar sòrbitol, con lo cual surgen preguntas sobre la funci3n que podr3a cumplir *in vivo*, sin poder descartar que posea actividad con otros sustratos.



ABSTRACT

Sorbitol is the major photosynthetic product in fruit tree species belonging to the *Rosaceae* family which is of economic importance to Chile. Sorbitol is synthesised from glucose in the leaves and transported through the phloem to sink organs, where it is converted to fructose by the enzyme sorbitol dehydrogenase (SDH).

Although sorbitol is characteristic of plants belonging to the *Rosaceae* family, the sequencing of other plant genomes has revealed the presence of SDH-type orthologous sequences in non-*Rosaceae* species. In this context, previous work has identified an open reading frame in the genome of *Vitis vinifera* (grape) named *VvSDH1*. *VvSDH1* has 75-86% amino acid identity with SDHs from species belonging to the *Rosaceae* family.

In this work, pCAMBIA-PG-*VvSDH1* was constructed, which allows *VvSDH1* to be expressed specifically in fruits under the control of the promoter of the tomato polygalacturonase (PG), and subsequently tested for transcriptional functionality. In addition, it was found, by extracting total protein from tomato fruits transiently transformed with the construction above, that the presence of *VvSDH1* generates a significant increase in the oxidation of sorbitol with respect to its control.

The results obtained in this work, considering that *Vitis vinifera* is not a plant belonging to the *Rosaceae* family, show that *VvSDH1* is capable of oxidizing sorbitol, which raises questions about its potential role *in vivo*, without being able to rule out its possible activity with other substrates.

1 INTRODUCCION

1.1 Distribución de carbohidratos en plantas

La distribución de carbohidratos en las plantas es fundamental para el desarrollo de las mismas. Este proceso comienza con la fijación inicial de carbono a través de la fotosíntesis, para continuar con la conversión metabólica y la posterior distribución de compuestos de carbono reducidos a lo largo del organismo vegetal. Dependiendo de la especie, esta última etapa consiste en el movimiento de azúcares o de alcoholes de azúcar (poli alcoholes o polioles) desde los tejidos fotosintéticos hasta los tejidos sumidero no fotosintéticos (Slewinisky y Braun 2010).

1.2 Alcoholes de Azúcar en plantas

Los alcoholes de azúcar son la forma reducida de azúcares del tipo aldosa o cetosa. La cadena de carbón de éstos puede ser lineal (polioles acíclicos o alditoles) o dispuesta como un anillo (polioles cíclicos o ciclitoles). El termino poliol se refiere a compuestos con tres o más carbonos, los cuales poseen un grupo hidroxilo (OH). Los alditoles reciben su nombre de acuerdo al número de átomos de carbono que posean, siendo los más comunes aquellos que están constituidos por seis carbonos (hexitoles). En plantas superiores se han reportado diecisiete alditoles entre los cuales al menos trece diferentes se han identificado en angiospermas (Lewis 1984). Los tres hexitoles mas comunes en angiospermas son el manitol, el cual es la forma reducida de la manosa; el sorbitol o glucitol, la forma reducida de la glucosa y el galactitol o dulcitol, la forma reducida de la galactosa (Noiraud y cols. 2001). Todos estos compuestos se clasifican como “solutos compatibles” (dentro de los cuales también se incluyen compuestos de amonio

cuaternarios, prolina y compuestos sulfónicos terciarios) con la característica de acumularse en altas concentraciones dentro de las células sin interferir con el metabolismo de las mismas (Stoop y cols., 1996).

En algunas familias de plantas superiores, el transporte de carbohidratos se realiza en forma de sacarosa o rafinosa en conjunto con algún poli alcohol dependiendo de la familia a la que el organismo pertenezca. Es así como en Apiaceas (e.g. apio), Oleaceas (e.g. olivo) y Rubiaceas (e.g. café) se transporta manitol; en Celastraceas (e.g. *Euonymus* spp.) se transporta galactitol y en Rosaceas (e.g. manzana) y Plantaginaceas (e.g. llantén) se transporta sorbitol (Pommerrenig y cols. 2007).

Tanto el manitol como el sorbitol son productos fotosintéticos primarios en hojas maduras (Stoop y cols., 1996). Se ha descrito, por ejemplo, que una alta tasa fotosintética en apio (*Apium graveolens*) está vinculada con la síntesis de manitol lo que representa un sumidero adicional en la fijación fotosintética de CO₂ (Pharr y cols, 1995). Además de esto, se ha descrito que el transporte de polioles a través del floema de la planta provee por lo menos cinco ventajas al organismo comparado con el transporte de azúcares. Primero, confieren un uso de carbono más eficientemente, debido a que la utilización de un alcohol de azúcar con respecto a un azúcar como la sacarosa o rafinosa tiene un mayor rendimiento neto de ATP en órganos no fotosintéticos (Pharr y cols, 1995). Segundo, otorgan una mejor protección contra radicales hidroxilos debido a la capacidad de neutralizarlos (Smirnoff y Cumbers, 1989; Shen y cols., 1997). Tercero, en su forma lineal son eficientes osmolitos por lo que su acumulación permite mejorar la tolerancia a la salinidad (Everard y cols., 1994; Stoop y Pharr, 1994; Hu y cols., 2005;

Rejskova y cols., 2007; Pommerrenig y cols., 2007). Cuarto, pueden compensar reducciones en el potencial hídrico, además de establecer puentes de hidrogeno a través de sus grupos hidroxilos en casos de limitación de agua (Popp y Smirnof, 1995), pudiendo estabilizar membranas y mantener actividades enzimáticas otorgando resistencia al estrés térmico (Hasegawa y cols., 2000). Finalmente, son capaces de formar complejos con el boro, el cual es un importante micronutriente para los organismos vegetales, lo que permite mejorar la movilización de éste a través del floema (Bellaloui y cols., 1999; Lehto y cols., 2004).

1.3 El sorbitol en los organismos vegetales

Junto con la sacarosa, el sorbitol es el mayor producto fotosintético en muchas especies de árboles frutales de importancia económica para Chile pertenecientes a la familia Rosacea tales como manzana, pera, durazno, cereza, damasco y ciruela. Tanto el sorbitol como la sacarosa son transportados desde las hojas hasta los órganos sumidero como son los frutos y raíces (Bielecki, 1982; Loescher, 1987). El sorbitol es un alditol cuya fórmula molecular es $C_6H_{14}O_6$, posee una masa molecular de 182.17 g/mol y su nombre según la nomenclatura IUPAC es (2R,3R,4R,5S)-hexane-1,2,3,4,5,6-hexol (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). En sistemas vegetales, el sorbitol se sintetiza a partir de glucosa mediante la catálisis realizada por tres enzimas, incluyendo una aldosa 6-fosfato reductasa cuya reacción está acoplada a la oxidación de NADPH. Una vez que el sorbitol ha sido transportado a los órganos sumideros, éste puede ser oxidado en fructosa mediante la reacción reversible catalizada por la enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH) con la reducción concomitante de NAD^+ , formando NADH (figura 1) (Loescher, 1987).

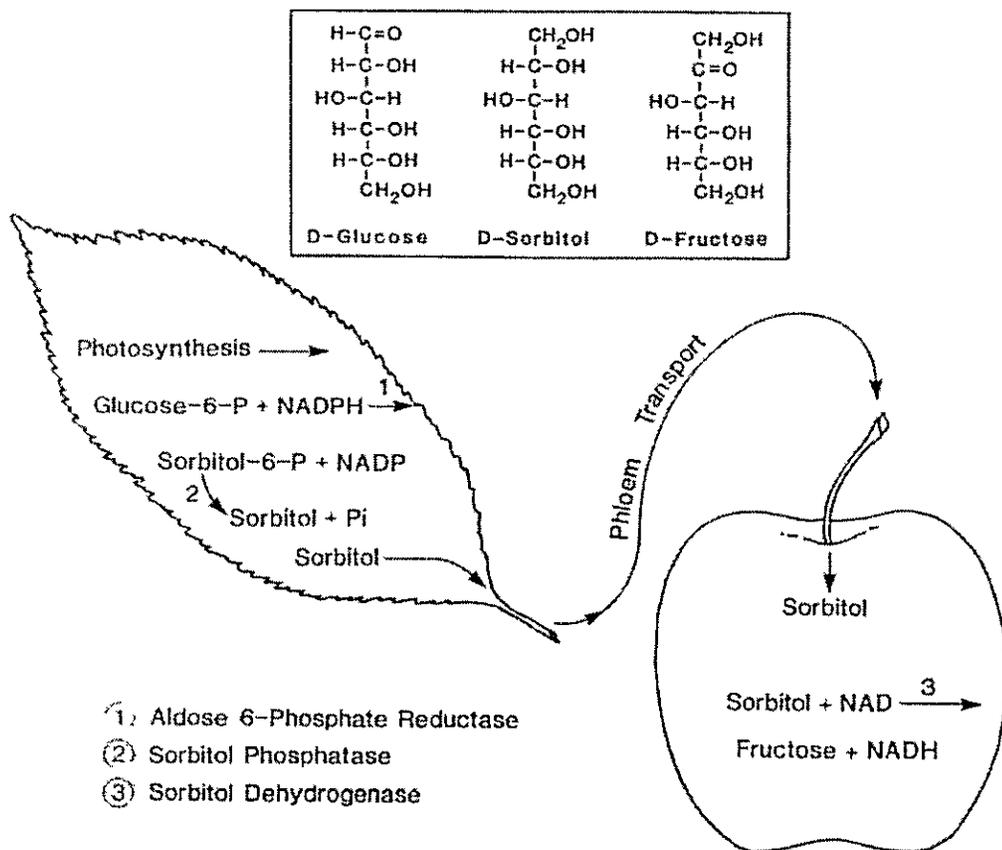


Figura 1: Ruta metabólica del sorbitol en rosáceas. Resumen de las reacciones involucradas en la síntesis y catabolismo de sorbitol en Rosáceas, junto con la estructura molecular de los principales metabolitos (Loescher, 1987).

1.4 Sorbitol Deshidrogenasa (SDH)

La enzima sorbitol deshidrogenasa (L-iditol:NAD⁺ oxidoreductasa, EC 1.1.1.14) cataliza la reacción reversible D-sorbitol + NAD⁺ ↔ D-fructosa + NADH + H⁺. Fue parcialmente purificada por primera vez en 1951 desde el hígado de rata (Negm y Loescher, 1979; Blakley, 1951), posteriormente desde pera japonesa (Oura y cols., 2000) y caracterizada desde manzana utilizando proteínas recombinantes (Yamada y cols., 1998), mostrando que es una enzima presente tanto en animales como en plantas.

En mamíferos, SDH se expresa ubicuamente en todos los tejidos salvo en el tracto intestinal (Estonius y cols., 1993) y ha sido ampliamente estudiada debido a la relación que pueda tener la acumulación de sorbitol en diferentes tejidos con las complicaciones de la diabetes en humanos (Gabbay, 1973). Es así como se han obtenido estructuras cristalográficas de SDH desde ratón (Johansson y cols., 2001) y desde humanos (Pauly y cols., 2003). Se ha descrito que SDH es una enzima que utiliza estrictamente NAD⁺ como coenzima para llevar a cabo la oxidación de sorbitol a fructosa, es un tetrámero con un ion de zinc por subunidad aunque puede ser considerada como un dímero de dímeros (figura 2) y posee una relación distante con respecto a alcoholes deshidrogenasas (ADH) de mamíferos presentando solamente alrededor de un 20% de identidad posicional (Johansson y cols., 2001; Eklund y cols., 1985). Si se analiza la estructura de cada subunidad, éstas presentan dos dominios distintivos. Uno de ellos es el dominio de unión a coenzima, el cual presenta un motivo de “plegamiento de Rossman” y un sitio de unión a NAD⁺ (similar a lo que ocurre en ADH). El otro dominio es el catalítico, el cual posee un sitio de unión a zinc (figura 3) (Johansson y cols., 2001).

En el reino vegetal, a pesar de que el sorbitol es un poliol característico y propio de las especies pertenecientes a la familia Rosácea, se ha encontrado SDH en especies que no son miembros de ésta. Por ejemplo, se ha detectado actividad SDH en extractos crudos desde semillas de soja en proceso de germinación (Kuo y cols., 1990). Además, se ha purificado parcialmente SDH desde endosperma de maíz en desarrollo (Doehlert, 1987) y desde tallos de *Viscum álbium*, una planta parasítica (Wanek y Richter 1993).



Figura 2: Estructura cristalográfica de SDH de rata. Homotetrámero que se puede considerar como un dímero de dímeros (modificado de Johansson y cols., 2001).

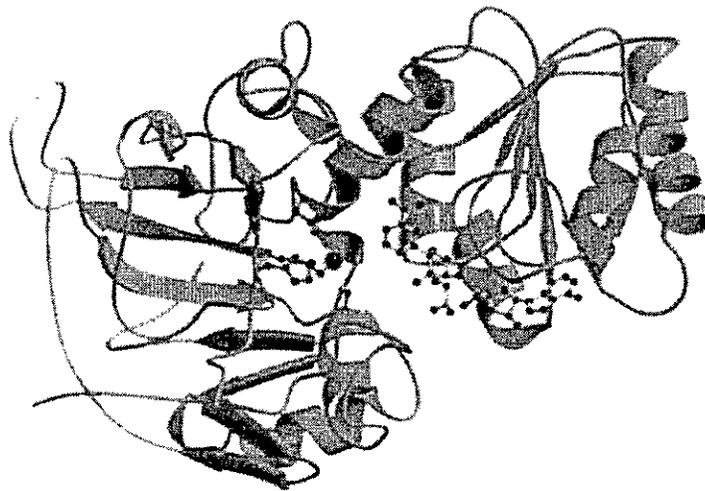


Figura 3: Estructura de la subunidad de SDH de rata. La subunidad de SDH presenta 2 dominios, el del lado derecho de la imagen corresponde al dominio de unión a coenzima el cual presenta un motivo de "plegamiento de Rossman" y de unión a NAD^+ en donde este último se representa en modelo "ball and stick". A la izquierda de la imagen se muestra el sitio catalítico en donde se aprecia la molécula de zinc como una esfera negra marcada y sorbitol (modelo ball and stick) (modificado de Johansson y cols. 2001).

Además, los proyectos de mapeo genómico en plantas han revelado que secuencias ortólogas del tipo SDH están ampliamente representadas en el reino vegetal y están

presentes en bases de datos de marcadores de secuencia expresada (EST por su sigla en inglés de "expressed sequence tag") de especies de plantas no rosáceas al ser comparadas con la secuencia de SDH de manzana (*Malus x domestica*). Tales especies incluyen *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* (maíz), *Citrus paradisi* (pomelo), *Poncirus trifoliata* (naranja espinoso), *Medicago sativa* (alfalfa), *Gossypium raimondii* (algodón) y *Pinus taeda* (pino) (Ohta K. y cols., 2005).

1.5 Estrategia Desarrollada

Una de las líneas de investigación realizadas en nuestro laboratorio está enmarcada en el proyecto INNOVA, el cual busca obtener una variedad de manzanas más dulce mediante la conversión de sorbitol en fructosa (mediante SDH), siendo esta última un azúcar que genera una mayor sensación de dulzor. Dentro del marco de este proyecto, se está identificando y caracterizando SDHs de otras especies vegetales, y se está evaluando su actividad enzimática comparada con las SDHs ya descritas. Además de esto, se está estudiando el rol que puede tener sorbitol así como SDH en plantas que no pertenecen a la familia de las Rosáceas, por ejemplo en *Arabidopsis thaliana*.

Es precisamente dentro de este último marco de investigación que se identificó, mediante homología de secuencias aminoacídicas, una posible SDH perteneciente a *Vitis vinifera* (uva), que llamamos VvSDH1. El cDNA de *VvSDH1* fue aislada y clonada durante el desarrollo del seminario de título de Yu-Wen Tang Hsu. Sus estudios mostraron que VvSDH1 posee entre un 75 y 86% de identidad aminoacídica con SDHs conocidas (i.e. manzana, tomate y maíz), y que además posee los dominios

característicos de unión a zinc y a NAD⁺ encontrados en SDHs de otras especies (Tang, 2011; sección 1.4).

Con el objetivo de determinar si VvSDH1 es efectivamente una enzima con actividad sorbitol deshidrogenasa, durante este seminario de título se construyó, mediante técnicas moleculares, un vector de expresión de VvSDH1, dirigiendo su expresión específicamente a los frutos utilizando el promotor del gen de la poligalacturonasa de tomate (Montgomery y cols., 1993) el cual se nombró pCAMBIA PG-VvSDH1. Es importante que la expresión de SDH sea fruto específica puesto que se ha descrito que la disminución en las concentraciones de sorbitol en hojas de manzana afecta el crecimiento y normal desarrollo del organismo (Teo y cols., 2006). Es por esto que para una futura transformación estable con el vector construido se hace necesario que la expresión de una posible sorbitol deshidrogenasa se realice solamente en el fruto.

Una vez obtenido este vector, se comprobó su funcionalidad transcripcional mediante la transformación transitoria de frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*), Además, se determinó si es que VvSDH1 posee o no actividad sorbitol deshidrogenasa.

2 HIPOTESIS

El marco de lectura abierto aislado desde *Vitis vinífera* (vid) VvSDH1, el cual posee homología con enzimas sorbitol deshidrogenasa ya caracterizadas, presentará la actividad enzimática necesaria para metabolizar sorbitol.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

Expresión y análisis de la actividad sorbitol deshidrogenasa de VvSDH1 en un sistema heterólogo.

3.2 Objetivos específicos:

3.2.1 Construcción del vector binario pCAMBIA1302 PG-VvSDH1, para la expresión fruto-específica de VvSDH1.

3.2.2 Análisis de la funcionalidad transcripcional de pCAMBIA1302 PG-VvSDH1 utilizando frutos de tomate transformados transitoriamente con *A. tumefaciens* portadora del vector.

3.2.3 Análisis de la actividad sorbitol deshidrogenasa de VvSDH1 obtenida a partir de extractos crudos de frutos de tomate transformados transitoriamente con el vector pCAMBIA1302 PG-VvSDH1.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Equipos y programas computacionales utilizados

4.1.1 Centrifugas

Todas las centrifugaciones de volúmenes menores a 2 mL y realizadas a temperatura ambiente se hicieron en una centrifuga spectrafuge 24D Labnet®, mientras que todas las demás centrifugaciones se realizaron en una centrifuga Universal 32R Hettich®

4.1.2 Termociclador

Las reacciones de PCR o de Transcripción Reversa fueron realizadas en un termociclador MyCycler™ BIORAD® para gradientes y en un termociclador XP Cycler BIOER® cuando la temperatura de hibridación era única.

4.1.3 Digitalización de resultados obtenidos en geles de agarosa, generación de esquemas y estudios *in-silico*

Los resultados en geles de agarosa fueron visualizados mediante un trans-iluminador UV (GeneGenius Classic de SynGene®) el cual cuenta con un sistema de fotografía digital a través del software GeneSnap. Con respecto a los esquemas de construcciones y los estudios *in silico* realizados se utilizó el programa Vector NTI 10.3.0 (Invitrogen®).

4.1.4 Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de DNA se llevó a cabo mediante Image J 1.38X (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, Java 1.6.0_02) el cual analiza las imágenes captadas (sección 3.1.3). Las cuantificaciones de RNA fueron realizadas con la tecnología Nanodrop®.

4.2 Material Biológico

4.2.1 Vectores utilizados y crecimiento de bacterias

Se utilizaron 3 clones distintos de *Escherichia coli*: pCR8-VvSDH1 (en cepa DH5 α) la cual posee pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) en el cual se encuentra integrada la CDS de *VvSDH1* flanqueada por los sitios de restricción *SpeI* (5') y *BstEII* (3') (Tang, 2011; Figura 4A); pCAMBIA1302 PG-GFP (en cepa DH5 α) la cual posee una modificación del vector binario pCAMBIA1302 realizada en nuestro laboratorio donde se reemplazó el promotor CaMV 35S por una secuencia proveniente del promotor de la poligalacturonasa de tomate (Mandujano, 2008; sección 1.5; Figura 4B); cepa MACH1 en estado quimiocompetente.

Todos los clones de *E. coli* fueron crecidos en medio LB líquido [NaCl 1% (p/v), triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), pH 7 a 25 °C] con agitación de 200 rpm o en placas con LB sólido [LB líquido con agar 1,6% (p/v)] agregando, según sea el caso, espectomicina [100 μ g/mL] para seleccionar a bacterias portadoras de pCR8-VvSDH1 o kanamicina (100 μ g/mL) para seleccionar a bacterias portadoras de pCAMBIA PG-GFP y pCAMBIA PG-VvSDH1. Los cultivos se mantuvieron durante 14-16 h a 37 °C.

Además, se utilizó la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* la que fue crecida en medio LB líquido con agitación de 200 rpm o LB sólido por 36-48 h a 28 °C. El medio LB fue suplementado con los antibióticos rifampicina (10 μ g/mL) y gentamicina (50 μ g/mL) para la selección de la cepa y del plasmidio Ti, respectivamente. En el caso de cepas portadoras del vector pCAMBIA PG-GFP y pCAMBIA PG-VvSDH1, se agregó

también kanamicina (100 µg/mL).

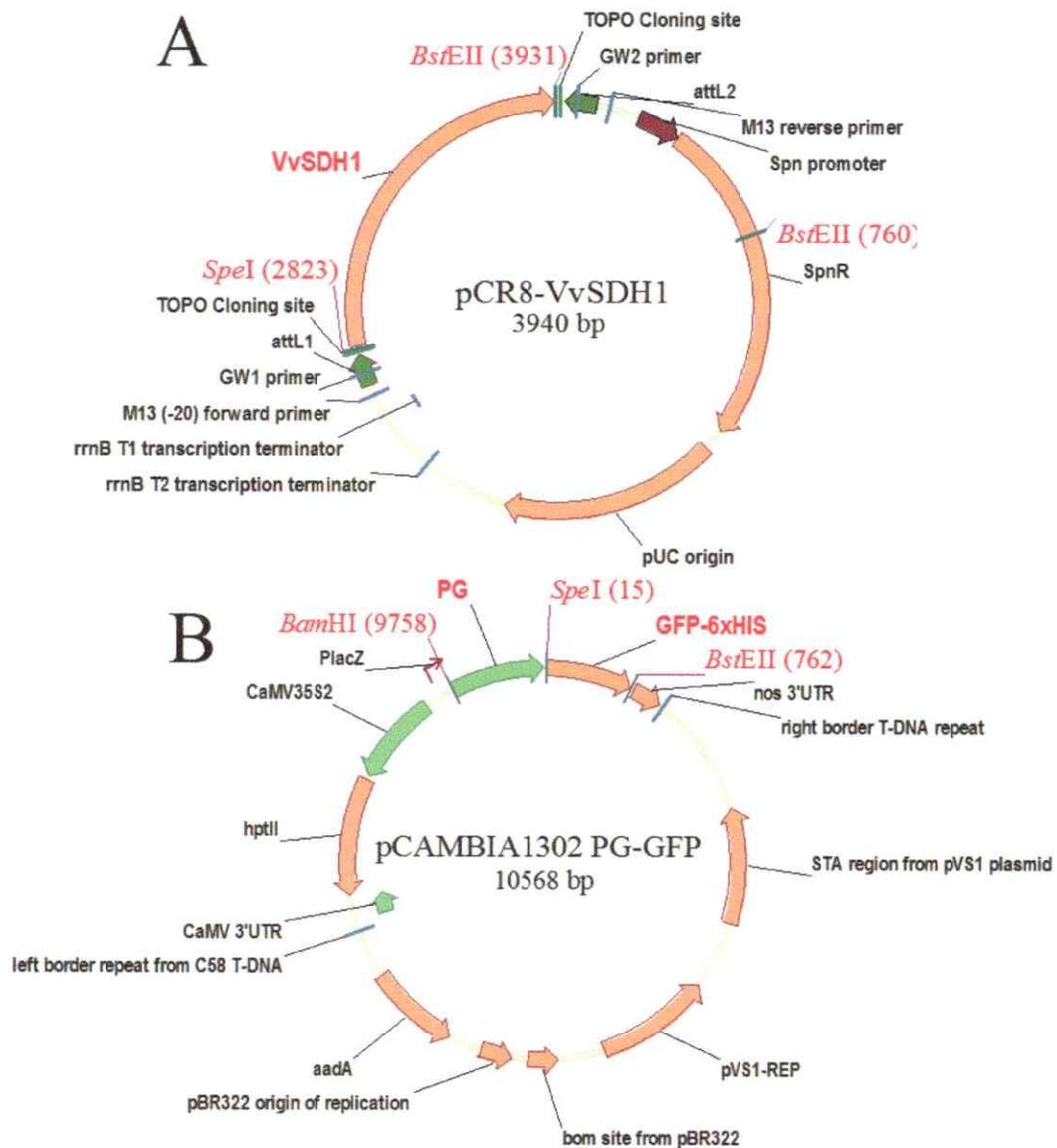


Figura 4: Esquema de los vectores existentes utilizados. En A se muestra pCR8-VvSDH1 (Tang, 2011). En B se muestra pCAMBIA1302 PG-GFP siendo PG el promotor de la poligalacturonasa de tomate el cual fue insertado en reemplazo del promotor constitutivo CaMV 35S (Mandujano, 2008). En rojo se muestran los elementos relevantes para este seminario de título.

4.2.2 Preparación de *A. tumefaciens* quimiocompetentes

Se prepararon *A. tumefaciens* quimiocompetentes para lo cual se incubó un inóculo de 20 µl en 5 mL de LB líquido suplementado con antibióticos (sección 4.2.1) con agitación a 28 °C por toda la noche. Al día siguiente se traspasó el cultivo a 100 mL de LB líquido y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (DO_{600nm} entre 0,5 y 1,0). Se traspasó el cultivo a dos tubos de Falcon de 50 mL los que se incubaron en hielo durante 10 min. Se sedimentó centrifugando (3000 g, 20 min, 4 °C), se desechó el sobrenadante y cada sedimento fue suspendido en 1 mL de CaCl₂ 20 mM estéril. Se congelaron alícuotas de 100 µL en nitrógeno líquido para luego almacenarlas a -80 °C hasta su uso posterior.

4.2.3 Especies vegetales utilizadas

Se utilizaron frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate) comerciales de la categoría “granel”.

4.3 Partidores, programas utilizados para reacciones de amplificación de ácidos nucleicos y geles de agarosa.

Todos los partidores utilizados se encontraban disponibles en nuestro laboratorio al momento de realizar los experimentos (Tabla 1). Los partidores 1 y 2 fueron utilizados para amplificar el CDS de *VvSDHI* (amplificado de 1124 pb). Los partidores 3 y 4 amplifican una secuencia interna de *VvSDHI* (amplificado de 758 pb). Los partidores 5 y 6 amplifican una región interna del gen de expresión constitutiva *18S* (amplificado de 200 pb). Con los partidores 7 y 2 se logra amplificar una secuencia que abarca el

promotor de la poligalacturonasa (*PG*) y *VvSDHI* cuando éstos se encuentran acoplados en sentido en la misma construcción. Finalmente, el partidor 8 se utiliza para llevar a cabo la reacción de transcripción reversa.

Tabla 1: Partidores utilizados. Nombre, secuencia y breve descripción de los partidores utilizados.

	Nombre	Secuencia	Descripción
1	VvSDHSpe52	5'-GGCA <u>ACTAGT</u> AAAATGGGAAAAGGAGGGATG-3'	Sitio de corte <i>SpeI</i> (<i>BcuI</i>) subrayado. Codón de inicio en azul. Partidor en sentido
2	VvSDHBst33	5'-GGCAGGTGACCGTCTAGAGGTTGAACATGACC-3'	Sitio de corte <i>BstEII</i> (<i>Eco91I</i>) subrayado. Codón de término en azul. Partidor anti sentido
5	18S_F	5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3	Híbrida con una región interna del gen <i>18S</i> . Partidor en sentido.
6	18S_R	5'-ACAATGATCCTCCGCAGGT-3'	Híbrida con una región interna del gen <i>18S</i> . Partidor anti sentido.
7	PG-BamHI-F	<u>GGATCCT</u> AAGTACCATCACATAATTGAGA	Sitio de corte para <i>Bam</i> HI subrayado. Híbrida con el promotor <i>PG</i> . Partidor en sentido
8	OligoAP	5'-CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	Híbrida con poli A en la región 3' de los mRNA.

Para la amplificación de las cadenas de ácidos nucleicos, se utilizaron diferentes programas dependiendo del molde utilizado y el producto deseado (Tabla 2).

Los geles de agarosa utilizados para visualizar los productos de amplificación de ácidos nucleicos se prepararon con solución amortiguadora TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) a diferentes concentraciones de agarosa (p/v). Una vez realizada la

electroforesis el gel, se incubó a temperatura ambiente en una solución de bromuro de etidio 5 mM durante 10 min y se visualizó el gel (sección 4.1.3).

Tabla 2: Programas utilizados en el termociclador. Se muestra el nombre de los programas utilizados en el termociclador para la amplificación de ácidos nucleicos

Nombre	Nº Ciclos	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min:s)
VvSDH1	1	Desnaturalización	94	05:00
	32	Desnaturalización	94	00:30
		Hibridación	59	00:50
		Extensión	72	01:30
	1	Extensión	72	10:00
PG_VvSDH1	1	Desnaturalización	94	05:00
	32	Desnaturalización	94	00:30
		Hibridación	60	00:50
		Extensión	72	01:45
	1	Extensión	72	10:00
RT	1	Desnaturalización	-	-
	1	Desnaturalización	72	05:00
		Hibridación	25	05:00
		Extensión	42	59:59
	1	Extensión	72	15:00
18S	1	Desnaturalización	94	05:00
	32	Desnaturalización	94	00:45
		Hibridación	56	00:45
		Extensión	72	00:45
	1	Extensión	72	10:00

4.4 Construcción de pCAMBIA1302 PG-VvSDH1

4.4.1 Purificación de pCR8-VvSDH1 y pCAMBIA1302 PG-GFP

Se cultivaron cepas de *E. coli* transformadas con los vectores de interés (sección 4.2.1) y posteriormente se realizó la extracción de DNA plasmidial mediante centrifugación siguiendo el protocolo estipulado por el fabricante (Axyprep Plasmid Miniprep).

4.4.2 Obtención de *VvSDH1* y de pCAMBIA1302 PG lineal.

Se realizó una digestión enzimática simple con *BstEII* cuya reacción consistió en: 1 µg de plásmido, amortiguador orange w/BSA Fermentas® 1X, 10 U de *BstEII* Fermentas®

y H₂O np (volumen final, 20 µL). También se realizó una digestión enzimática doble con *Bst*EII y *Spe*I cuya reacción consistió en: 1 µg de plásmido, amortiguador Tango Fermentas® 1X, 10 U de *Bst*EII Fermentas®, 5 U de *Spe*I Fermentas® y H₂O np (volumen final, 20 µL). Estas reacciones se realizaron para pCR8-VvSDH1 y pCAMBIA-PG-GFP. La reacción se realizó a 37 °C durante una hora y se detuvo a 80 °C durante 20 min. Posteriormente, se cargaron 20 µL de la reacción de digestión simple para cada vector y 55 µL (se realizaron 3 reacciones de 20 µL cada uno) de la digestión doble en un gel de agarosa al 0,5% para el caso de pCAMBIA-PG-GFP y al 1,0% para el caso de pCR8-VvSDH1. Ambos geles fueron sometidos a electroforesis durante 45 min a 80 V y corriente constante, teñidos en bromuro de etidio y se les tomó una fotografía (sección 4.1.3). Luego, se purificaron los fragmentos de interés (*VvSDH1* de aproximadamente 1100 pb en el caso de la digestión de pCR8-VvSDH1 y pCAMBIA-PG de aproximadamente 9800 pb en el caso de pCAMBIA PG-GFP) siguiendo el protocolo del fabricante (Wizard SV gel and PCR clean-up system, Promega®).

4.4.3 Generación de pCAMBIA PG-VvSDH1

La reacción de ligación consistió en: 150 ng de vector linealizado (pCAMBIA-PG), 50 ng de inserto (*VvSDH1*), amortiguador ligasa Promega 1X, 1,5 U T4 DNA ligasa Promega y H₂O libre de DNAsa (volumen final, 10 µL). Se realizó además un control en las mismas condiciones antes señaladas pero sin agregar el fragmento *VvSDH1*.

4.4.4 Transformación de *E. coli* MACH1 quimiocompetente

Se utilizó el método de transformación mediante golpe térmico. Se mezcló una alícuota de 100 µl de bacterias MACH1 quimiocompetentes (disponibles en el laboratorio) con la

reacción de ligación y otra con el control de ligación. Ambas alícuotas se mantuvieron en hielo durante 30 min. Posteriormente, se aplicó un golpe térmico de 42 °C durante 45 s y luego se depositaron en hielo por 2 min. Después se agregó 1 mL de LB líquido y se incubó por 4 h a 28 °C. Luego, se sembraron alícuotas de 150 µL y de 50 µL en LB sólido suplementado con antibiótico (sección 4.2.1) y se incubaron a 37 °C por 16 h.

4.4.5 Comprobación molecular de pCAMBIA PG-VvSDH1

4.4.5.1 PCR de colonias de *E. coli* para amplificar *VvSDH1*

Se picaron colonias desde las placas sembradas y se suspendieron en 10 µL de H₂O np. A partir de esta suspensión, se tomó 1 µL de cada muestra para ser utilizada como molde para la reacción de PCR. La mezcla utilizada para PCR consistió en: 1X amortiguador de reacción Biolasa (Bioline®), 5 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM de VvSDH1Spe52, 0,5 µM VvSDH1Bst33 (Tabla 1) y 1 U Taq Biolasa (Bioline®) (volumen final, 20 µL). El programa utilizado para la reacción de PCR fue VvSDH1 (Tabla 2).

4.4.5.2 Obtención del vector pCAMBIA-PG-VvSDH1

Se realizó una mini preparación mediante kit (sección 4.4.1) de las colonias identificadas en sección 3.4.5.1 luego de crecerlas en LB líquido para obtener de esta manera pCAMBIA PG-VvSDH1.

4.4.5.3 PCR para amplificar PG-VvSDH1

Se tomó una alícuota de 1 µL de cada mini-preparación para ser utilizada como molde para la PCR. La mezcla utilizada consistió en: 1X amortiguador de reacción Biolasa

(Bioline®), 5 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 μM de PG-*Bam*HI-F, 0,5 μM VvSDH1Bst33 (Tabla 1), 1 μL de molde y 1 U Taq Biolasa (Bioline®) (volumen final, 20 μL). El programa utilizado para la PCR fue PG-VvSDH1 (Tabla 2)

4.4.5.4 Digestiones enzimáticas de pCAMBIA PG-VvSDH1

Se realizó una digestión enzimática doble de pCAMBIA PG-VvSDH1 con *Bam*HI y *Bst*EII la cual consistió en 1 μg de plásmido, amortiguador Tango Fermentas® 1X, 10 U de *Bam*HI Fermentas®, 5 U de *Bst*EII Fermentas® y H₂O np (volumen final, 20 μL). También, se realizó una digestión simple con *Bam*HI utilizando 1 μg de vector, amortiguador Orange Fermentas® 1X, 10 U de *Bam*HI (volumen final, 20 μL). Además, se realizó una digestión simple con *Nsi*I utilizando 1 μg de plásmido, 2 μL de amortiguador Red Fermentas® 1X Fermentas®, 20 U de *Nsi*I Fermentas® y H₂O np (volumen final, 20 μL).

4.5 Transformación de *A. tumefaciens* con pCAMBIA PG-VvSDH1

Alícuotas de 100 μL de *A. tumefaciens* quimiocompetentes fueron mezcladas con 500 ng del vector pCAMBIA PG-VvSDH1 (sección 4.4.5.2), se incubó en nitrógeno líquido (5 min) y se descongelaron en hielo. Se le adicionó 1 mL de LB líquido el cual se incubó a 28 °C, 200 rpm durante 16 h. Posteriormente, se sembraron en LB sólido con antibióticos (sección 4.2.1).

4.5.1 PCR de colonias de *A. tumefaciens* para amplificar VvSDH1

Se picaron 10 colonias las cuales fueron suspendidas en 10 μL de H₂O np. Se tomó 1 μL de cada suspensión para ser utilizada como molde de PCR. La mezcla utilizada consistió en: 1X amortiguador de reacción Biolasa (Bioline®), 5 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTPs,

0,5 μM de VvSDH1Spe52, 0,5 μM VvSDH1Bst33 (Tabla 1) y 1 U Taq Biolasa (Bioline®) (volumen final, 20 μL). El programa utilizado para la PCR fue VvSDH1 (Tabla 2). Las colonias positivas fueron crecidas nuevamente en LB líquido (sección 4.2.1) y posteriormente almacenadas con glicerol (50% v/v) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para usos posteriores.

4.6 Análisis funcional de pCAMBIA PG-VvSDH1

4.6.1 Transformación transitoria de *S. lycopersicum* con *A. tumefaciens*

Para la transformación transitoria, se utilizó la técnica de agro-infiltración. Para ello, *A. tumefaciens* transformadas con pCAMBIA PG-VvSDH1 y pCAMBIA PG-GFP (como control negativo) fueron crecidos en LB líquido (sección 4.2.1) hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 1.0. Se sedimentaron las bacterias (3000 g, 5 min, $22\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se suspendieron hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,8 en medio de infiltración (MMA) [MES 10 mM pH 5,7, MgCl_2 10 mM y acetosiringona (3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenona) 150 μM].

Para la transformación de tomates, se usaron jeringas BD ultra-fine™II (capacidad 500 μL) con aguja de 3 mm inyectando suavemente la suspensión a 3-4 mm de profundidad con el fin de minimizar el daño en el fruto (modificado de Orzaez y cols., 2006). Se inyectó una sección del fruto con *A. tumefaciens* portando pCAMBIA PG-VvSDH1 y otra sección del mismo fruto con pCAMBIA PG-GFP (como control negativo). Los frutos se mantuvieron por 4 días en condiciones ambientales controladas (sección 4.2.3).

4.6.2 Extracción de RNA

Se utilizó una modificación del protocolo publicado por Verwoerd y cols. (1989). Una muestra de tejido transformado se molió en un mortero con nitrógeno líquido hasta

obtener un polvo fino. Se agregaron 225 mg de tejido pulverizado a un tubo eppendorf de 2 mL que contenía 750 μ L de Fenol básico (pH 8,0 a 25 °C) y 750 μ L de buffer de extracción [0,1 M LiCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,0 a 25 °C, 10 mM EDTA, 1% SDS (p/v)]. Las muestras se mezclaron agitando vigorosamente (> 1 min) y posteriormente se incubaron durante 5 min a 65 °C. Luego, se agregaron 375 μ L de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1) y se agitó vigorosamente (> 1 min). Las muestras se centrifugaron (12000 g, 10 min, 4 °C), se extrajo la fase acuosa hacia un nuevo tubo y se agregó 750 μ L de isopropanol. Se volvió a centrifugar (12000 g, 10 min, 4 °C), el sobrenadante fue descartado y se suspendió el sedimento en 250 μ L de H₂O DEPC para luego agregar 0,1 volumen de NaOAc (3 M pH 5,2 a 25 °C) y 2 volúmenes de EtOH 100%. Posteriormente, las muestras se dejaron precipitando a -80 °C durante 1 h. Una vez transcurrido el tiempo, fueron centrifugadas (10000 g, 15 min, 4 °C), se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con EtOH 70%. Se repitió la última centrifugación y finalmente se suspendió el precipitado en H₂O DEPC.

4.6.3 Reacción de transcripción reversa (RT)

4.6.3.1 Tratamiento con DNAsa

Se cuantificó el RNA total obtenido (sección 4.1.4) y se trataron 2 μ g de cada muestra (sección 4.6.2) con 1 U de DNasaI (Fermentas), amortiguador DNasaI 1X, 10 U de “RiboLoc RNase Inhibitor” (Fermentas®), y H₂O DEPC (volumen final, 10 μ L). Se incubó (37 °C, 30 min), se dejó en hielo (1 min) y finalmente, se adicionó 1 μ L de EDTA 25 mM para detener la reacción.

4.6.3.2 Transcripción Reversa (RT)

La reacción se llevó a cabo utilizando el sistema “RT-ImProm-II Reverse Transcription System” de Promega®. Las muestras sometidas al tratamiento de DNasa (sección 4.6.3.1) fueron divididas en dos tubos (5,5 µl en cada uno, llamados tubo A y B, siendo este último un control del tratamiento de DNasa). A cada tubo, se le adicionó 0,5 µM Oligo-AP (Tabla 1). Además, se preparó la “mezcla RT” [1X “ImProm-II Reaction Buffer”, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTPs, 0,5 U de “RiboLock RNAase Inhibitor”, 1 µl “ImProm-II Reverse Transcriptase” y H₂O DEPC suficiente de tal manera que al adicionar la mezcla de RNA tratada con DNasa y Oligo-AP, el volumen final fuese de 20 µl] y la “mezcla sin RT” la cual fue exactamente igual a la antes mencionada salvo que no contiene “ImProm-II Reverse Transcriptase”.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador, en el que se ejecutó el protocolo RT (Tabla 2). En el paso a 70 °C, se colocaron solamente los tubos en presencia de RNA y oligo-AP. Luego, se detuvo el programa y las muestras fueron incubadas en hielo (5 min). Posteriormente, a los “tubos A” se les añadió la “mezcla RT” y a los “tubos B” la “mezcla sin RT”. Una vez agregado, se volvieron las muestras al termociclador y se continuó el programa.

4.6.4 PCR para amplificar *18S* y *V_vSDHI*

A todas las muestras obtenidas luego de realizar la RT, se les realizaron reacciones de PCR que consistieron en 1X amortiguador de reacción Biolasa (Bioline®), 5 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM de partidor en sentido, 0,5 µM partidor en anti sentido, 1 µL de molde y 1 U Taq Biolasa (Bioline®) (volumen final, 20 µL). Una reacción se

realizó a todas las muestras utilizando el programa 18S y los partidores 18S_F y 18S_R. Posteriormente, se utilizó el programa VvSDH1 con los partidores VvSDHSpe52 y VvSDHBst33 (véase Tabla 1 y Tabla 2 para mayor información sobre los partidores y programas utilizados).

4.6.5 Extracción de proteínas totales de frutos de tomate

La extracción total de proteínas se llevó a cabo modificando el protocolo descrito por Lo Bianco y Reiger (1998). Se extrajo 3 g de tejido del mesocarpo de tomates 4 días después de haber sido transformados transitoriamente (sección 4.6.1) en una mitad con bacterias portadoras de pCAMBIA PG-VvSDH1 y la otra mitad con pCAMBIA PG-GFP a modo de control. Éstos fueron macerados en un mortero, previamente enfriado a 4 °C, en presencia de 5 mL de solución A [Tris-HCl 0,1 M (pH 9 a 25 °C) y glicerol 8% (v/v)] y 5 mL de solución B [Tween-20 0,1% (v/v), PVPP 1% (p/v)] que fue agregada durante el procedimiento. Una vez homogenizado completamente, la mezcla resultante fue filtrada a través de una gaza y vertida en un tubo Falcon de 50 mL, para luego centrifugarla (3500 g, 15 min, 4 °C). Finalmente, las proteínas de interés se encuentran en el sobrenadante el cual fue almacenado en alícuotas de 200 µL. El contenido de proteínas totales en el extracto se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

4.6.6 Ensayo de actividad SDH a partir de extractos crudos.

Los ensayos de actividad se realizaron según lo descrito por Lo Bianco y Reiger (1998). Para estos efectos se hicieron reaccionar 100 µL de extracto crudo con 900 µL de “solución de reacción” [Tris-HCl pH 9 a 25 °C, 1 mM NAD⁺, 300 mM sorbitol]. La

reacción se llevó a cabo en una cubeta de cuarzo a 25 °C midiendo cada 5 s durante 6 min a 340 nm (espectrofotómetro Lambda Ez 201, PelkinElmer®). Se realizaron ensayos con 3 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas para cada muestra.

4.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de actividad fueron analizados estadísticamente a partir de un estudio ANOVA de 2 vías y t-test de 2 colas, mediante el programa “Prism 5” (versión 5.00 for Windows)

5 RESULTADOS

5.1 Construcción del vector binario pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1.

Considerando los antecedentes con respecto a la expresión constitutiva de SDH en organismos vegetales (sección 1.5) y para determinar la posible actividad de VvSDH1 en fruto, lo primero que se realizó fue construir un vector que cumpla con estas características. Es decir, se generó un vector para la expresión de VvSDH1 en frutos.

5.1.1 Purificación de pCR8-VvSDH1 y pCAMBIA 1302 PG-GFP

Una vez crecidas las colonias portadoras de los vectores de interés (sección 4.2.1, Figura 4) se realizó la extracción de los mismos, y se visualizaron en un gel de agarosa en donde se aprecia la presencia de pCR8-VvSDH1 en carril 1 y de pCAMBIA 1302 PG-GFP en carril 2 (Figura 5).

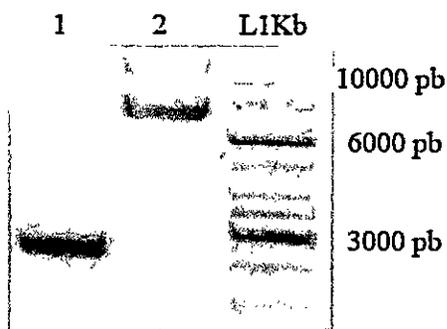


Figura 5: Purificación de pCR8-VvSDH1 y pCAMBIA 1302 PG-GFP. Gel de agarosa sometido a electroforesis y teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se cargó una alícuota de la purificación de pCR8-VvSDH1 mientras que en el carril 2 se cargó una alícuota de la purificación de pCAMBIA 1302 PG-GFP.

5.1.2 Obtención de *VvSDH1* y pCAMBIA-PG

Se realizaron digestiones simples y dobles (sección 4.4.2) para ambos vectores obtenidos (Figura 6) en donde la banda 2 de la figura 6A correspondería a *VvSDH1* mientras que la banda 1 en la figura 6B correspondería a pCAMBIA1302 PG linealizado. Ambas bandas

posteriormente se purificaron (sección 4.4.2) y se corroboró su pureza mediante electroforesis en geles de agarosa (Figura 7)

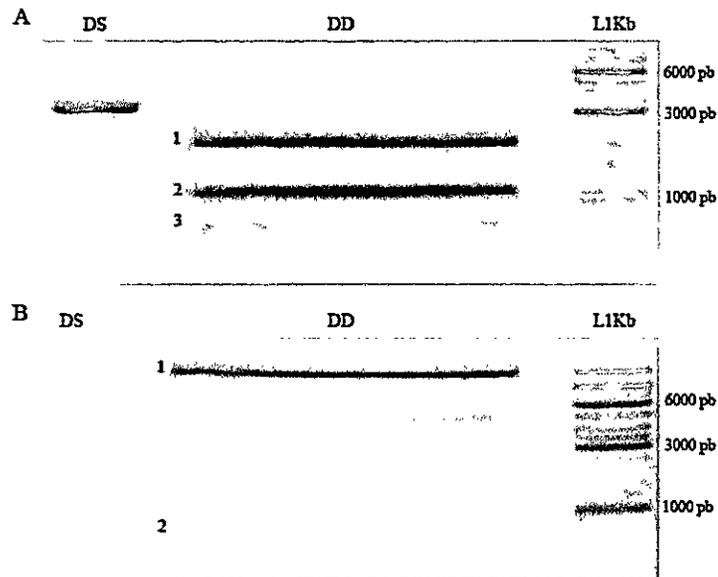


Figura 6: Digestión enzimática para la obtención de fragmentos de interés. Geles de agarosa sometidos a electroforesis y teñidos con bromuro de etidio. En A se muestra el vector pCR8-VvSDH digerido por una (*Bst*EII, DS) o por dos enzimas (*Bst*EII y *Spe*I, DD). 1 corresponde a una banda de alrededor de 2500 pb, 2 a una banda cercana a 1000 pb y 3 a una banda de alrededor de 750 pb. En B se muestra el vector pCAMBIA PG-GFP tratado con las mismas enzimas, 1 corresponde a una banda superior a 10000 pb mientras que 2 es de alrededor de 750 pb.

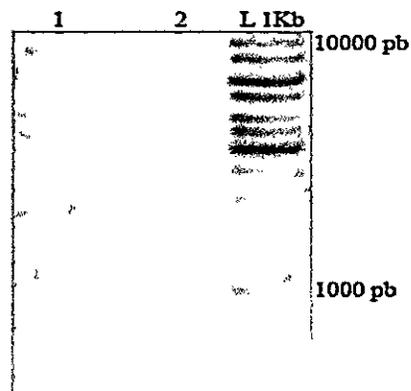


Figura 7: Bandas de interés purificadas. Gel de agarosa sometido a electroforesis y teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se observa una única banda de pCAMBIA1302 PG con un tamaño cercano a las 10000 pb mientras que en el carril 2 se observa una única banda de *VvSDH1* cercana a las 1000 pb.

5.1.3 Generación y comprobación molecular de pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1

Una vez realizada la ligación entre las secuencias de interés *VvSDH1* y pCAMBIA-PG (sección 4.4.3), se transformaron bacterias *E. coli* (sección 4.4.4) y se corroboró que la construcción obtenida fuese correcta (secciones 5.1.3.1 a 5.1.3.4). En la figura 8 se muestra el vector esperado.

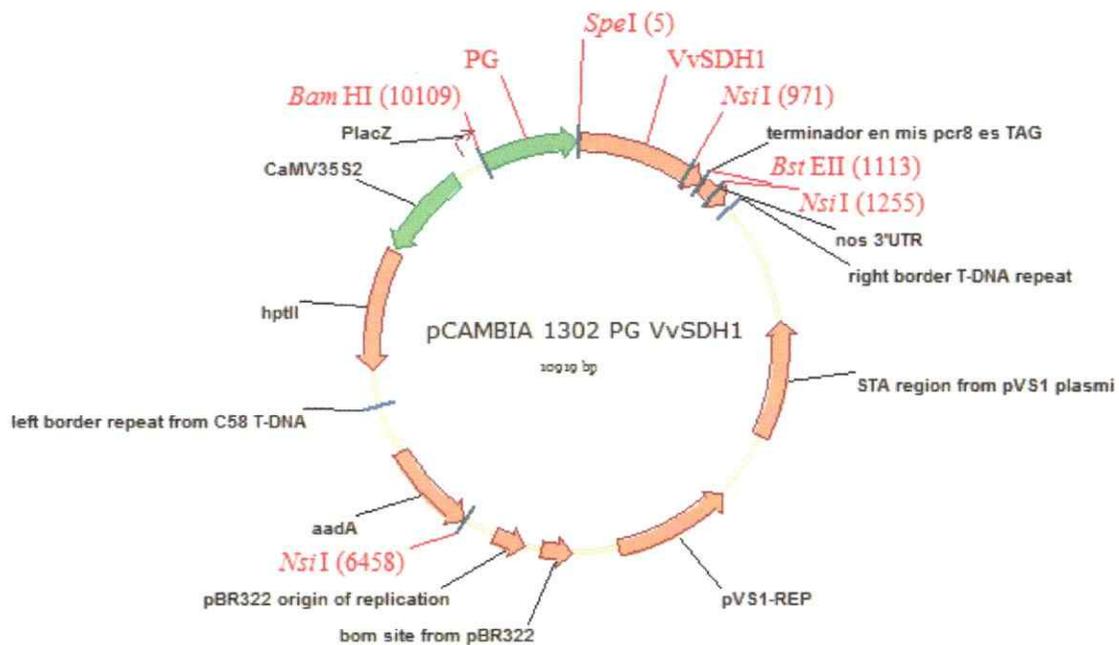


Figura 8: Vector pCAMBIA 1302 PG VvSDH1. Esquema del vector esperado de acuerdo a las secuencias aisladas y el correcto funcionamiento de la reacción de ligación. En rojo se muestran los elementos relevantes para este trabajo tales como los sitios de corte de enzimas de restricción (*Bam*HI, *Spe*I, *Nsi*I y *Bst*EII) además del promotor *PG* y el gen *VvSDH1*.

5.1.3.1 PCR de colonias para amplificar *VvSDH1*

De las colonias obtenidas luego de la transformación (sección 4.4.4) se seleccionaron 10 desde la reacción de ligación y 2 desde la reacción control (sin inserto). A las 12 colonias, se les realizó un PCR para amplificar *VvSDH1* (sección 4.4.5.1). Los resultados se muestran en la Figura 9.

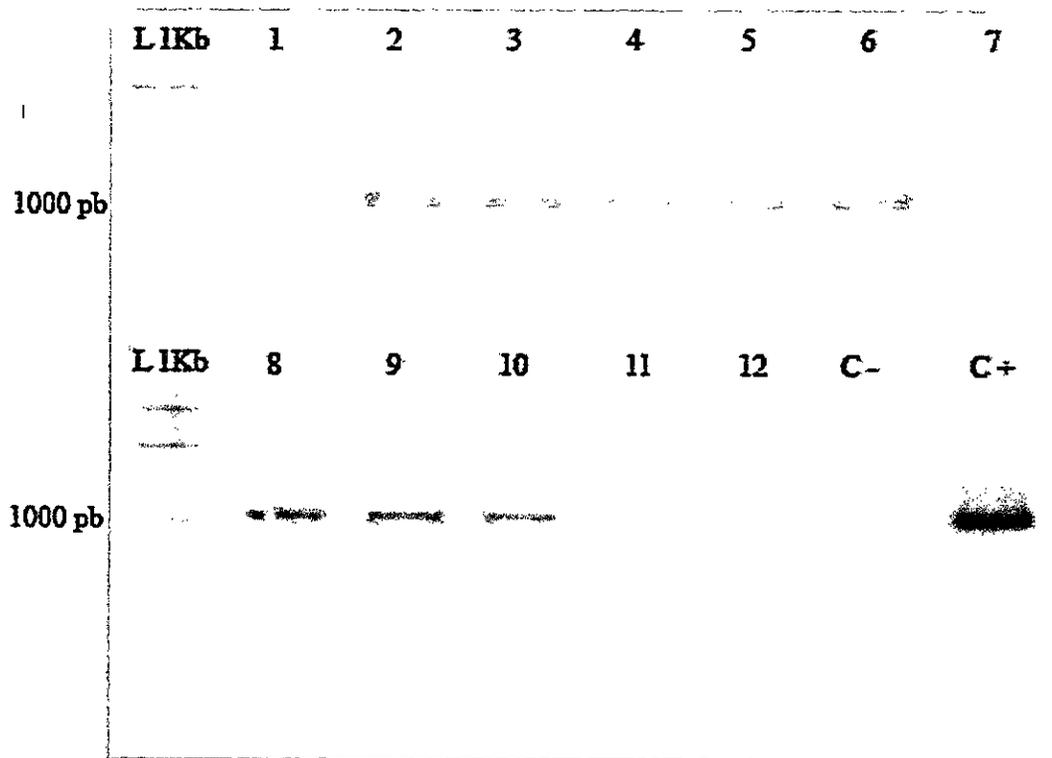


Figura 9: PCR de colonias para amplificar *VvSDHI*. Gel de agarosa sometido a electroforesis y teñido con bromuro de etidio. Los carriles del 1 al 10 corresponden a reacciones de PCR utilizando como molde colonias de *E. coli* transformadas luego de la reacción de ligación (ver texto). Los carriles 11 y 12 corresponden a amplificadas de colonias que crecieron en la placa de control negativo de transformación. El carril C- es un control negativo de la PCR (H_2O como molde) y C+ una reacción en que se utilizó el vector pCR8-VvSDHI como molde. En todos los carriles, exceptuando el 11, 12 y C-, se observa un amplificado cercano a 1000 pb.

5.1.3.2 Amplificación de *PG-VvSDHI* desde pCAMBIA 1302 *PG-VvSDHI*

Se seleccionaron 8 de las 10 colonias positivas para la amplificación de *VvSDHI* y luego de purificar el vector (sección 4.4.1) se realizó un PCR (sección 4.4.5.3) para amplificar el promotor *PG* y *VvSDHI*, el cual debiese generar una banda de aproximadamente 1900 pb. Todos los vectores aislados amplificaron una banda cercana a las 2000 pb (Figura 10), mostrando que *VvSDHI* se insertó en la orientación deseada con respecto al promotor (Figura 8).

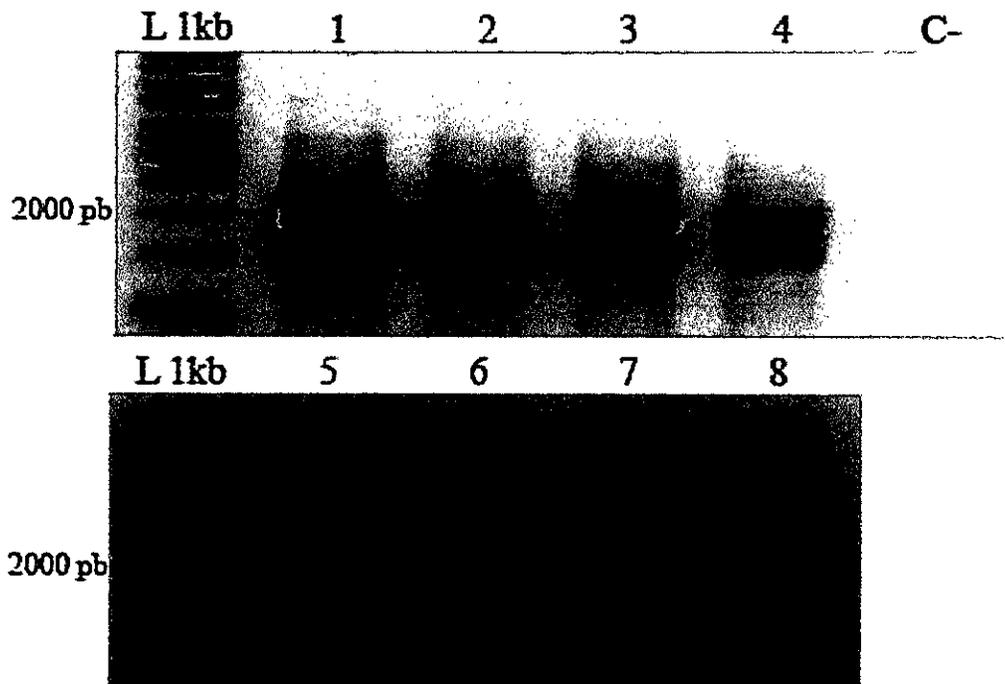


Figura 10: Amplificación de *PG-VvSDHI* desde pCAMBIA 1302 *PG-VvSDHI*. Gel de agarosa sometido a electroforesis y teñido con bromuro de etidio. Para todos los vectores analizados (números del 1 al 8) se observó la amplificación de una banda de alrededor de 2000 pb, sin observarse amplificación para el control negativo sin molde (C-).

5.1.3.3 Digestión doble de pCAMBIA 1302 *PG-VvSDHI*

Se seleccionaron todas las colonias positivas para la amplificación de *PG-VvSDHI* y luego de purificar el vector (sección 4.4.1), se realizó una digestión doble (sección 4.4.5.4) con las enzimas *Bam*HI y *Bst*EII (ver Figura 8). A partir de esta reacción se debería obtener una banda de aproximadamente 2000 pb, la que correspondería al fragmento que abarca la región promotor-gen, *PG-VvSDHI*. En cinco de las colonias, se obtuvo el patrón de digestión esperada, aunque en las otras tres, se observó una banda inesperada de alrededor de 750 pb (Figura 11).

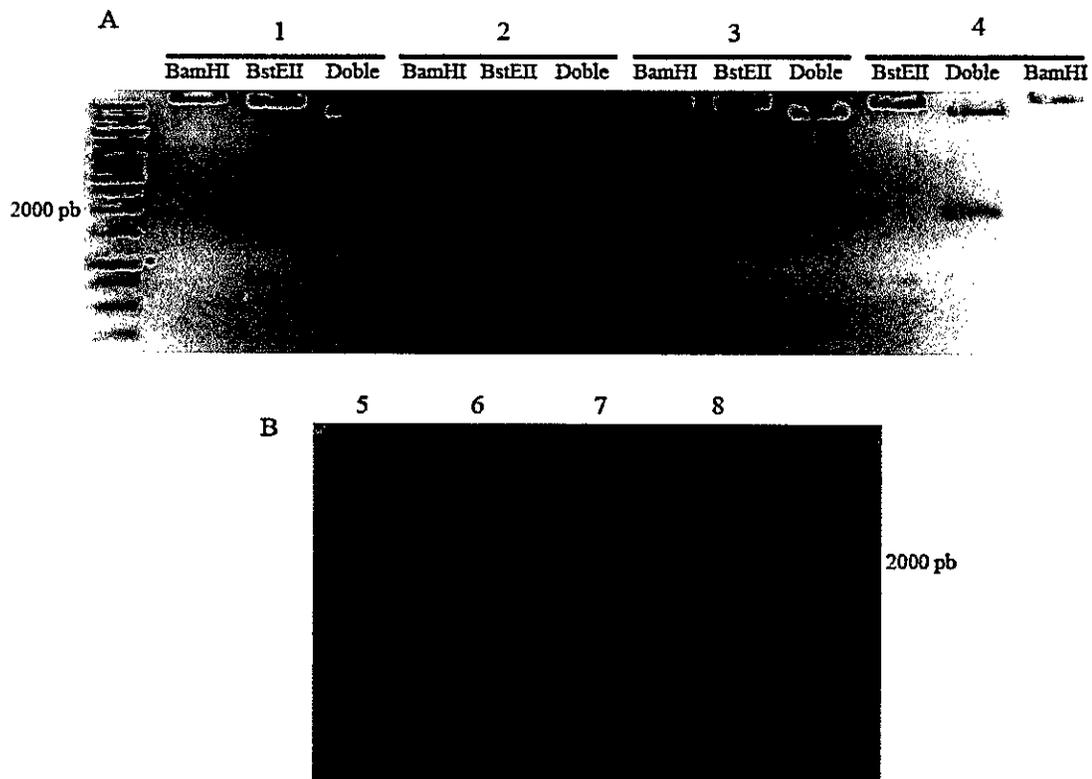


Figura 11: Digestión doble de pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1. Gel de agarosa sometido a electroforesis y teñido con bromuro de etidio. En A se muestran los resultados de digestiones dobles y simples con las enzimas *Bam*HI y *Bst*EII realizadas a vectores provenientes de 4 colonias (números del 1 al 4). Se observa una banda esperada de alrededor de 2000 pb para colonias 2 y 3, mientras que para 1 y 4 se observa además una banda inesperada de alrededor de 750 pb tanto para la digestión con *Bst*EII sola como para la digestión doble. En B se muestran los resultados de una digestión doble con *Bst*EII y *Bam*HI para vectores provenientes de colonias 5 al 8. Se observa una banda esperada para colonias 5, 6 y 8, mientras que para 7 se observa además una banda inesperada de 750 pb. Tanto para A como para B se muestra un estándar de peso molecular (de 1000 pb) indicándose la banda correspondiente a 2000 pb

5.1.3.4 Digestión simple de pCAMBIA1302 PG-VvSDH1 con *Nsi*I

Dado los resultados inesperados obtenidos en el ensayo anterior para 3 de las 8 colonias, se realizó un segundo ensayo de restricción para la corroboración del vector mediante la enzima *Nsi*I (ver Figura 8). El ensayo se realizó con 4 vectores provenientes de clones positivos mostrados en Figura 12 y uno que arrojó una banda inespecífica en el mismo gel. Considerando la estructura del vector, se esperarían bandas de 284, 5203 y 5432 pb si la construcción del vector fuese exitosa.

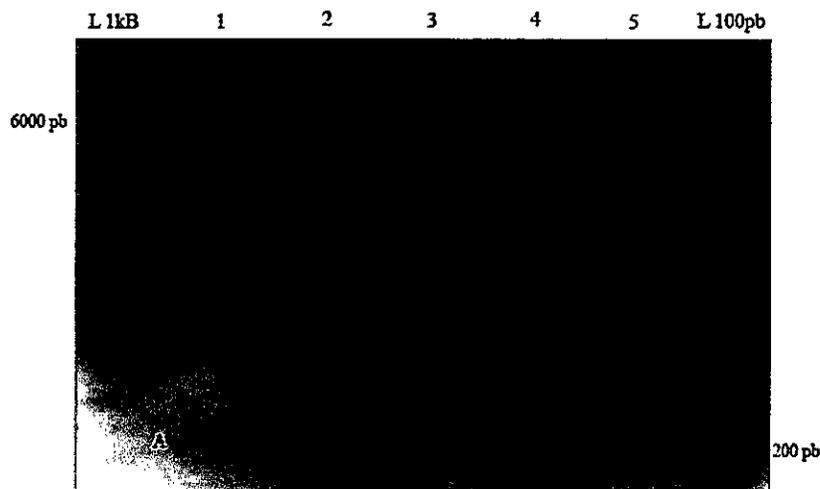


Figura 12: Digestión simple de pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1 con *Nsi*I. Gel de agarosa sometido a electroforesis y teñido con bromuro de etidio. Los carriles 1, 2, 3 y 4 corresponden a muestras provenientes desde clones que resultaron positivos para los análisis anteriores al vector (Figura 11). Se aprecia una banda de aproximadamente 200 pb (A) y una banda de alrededor de 5000 pb (C). El carril 5 corresponde a una muestra proveniente de un clon con resultados inesperados para los análisis anteriores al vector (Figura 11). Se aprecia una banda cercana a 1000 pb (B) que no aparece en las demás muestras, además de no presentar la banda cercana a 200 pb (A).

En resumen, mediante técnicas moleculares, se determinó que se había obtenido por lo menos cuatro clones portando el vector pCAMBIA1302 PG-VvSDH1 (Figura 12). En los análisis de los clones, el uso de digestiones enzimáticas (en vez de confiar solamente en los resultados de PCR) fue extremadamente informativo. Por lo tanto, el objetivo 1 de este Seminario de Título se ha cumplido exitosamente y de todas maneras, los resultados inesperados anteriormente expuestos serán analizados más adelante (Sección 6.1, discusión).

5.2 Análisis de la funcionalidad transcripcional de pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1

5.2.1 Transformación y corroboración de la presencia del vector en *A. tumefaciens*.

Una vez verificada la correcta construcción del vector y con el objetivo de comprobar la funcionalidad transcripcional del mismo, se procedió a realizar la transformación de *A. tumefaciens* con pCAMBIA1302 PG-VvSDH1. Una vez obtenidas colonias transformantes de *A. tumefaciens* (sección 4.5) se procedió a verificar la presencia del vector a través de la amplificación del *VvSDH1* mediante PCR de colonias (Figura 13). Cuatro de ocho clones arrojaron resultados positivos en este análisis, y se escogió uno de ellos para continuar con los siguientes ensayos (clon 8).

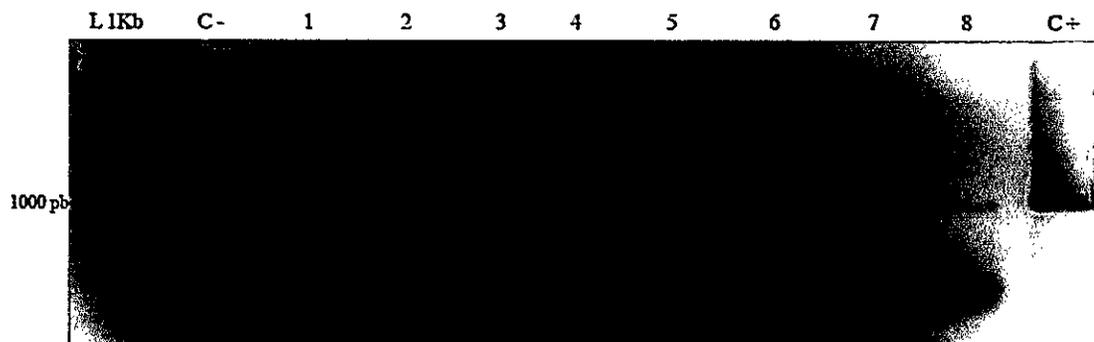


Figura 13: Amplificación de *VvSDH1* mediante PCR de colonias en *A. tumefaciens*. Gel de agarosa sometido a electroforesis y teñido con bromuro de etidio. Se tomaron 8 colonias crecidas en las placas luego de la transformación. Se observa una banda cercana a las 1000 pb para las muestras 2, 3, 5, 8 y C+; siendo este ultimo un control positivo utilizado pCR8-VvSDH1 en la reacción de PCR. El control negativo (C-) no posee molde.

5.2.2 Reacciones de Transcripción reversa

Considerando que el vector generado posee un promotor fruto específico, y que el tomate es un organismo modelo para los análisis en frutos (Orzaez y cols., 2006), se eligió este sistema para evaluar la funcionalidad de pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1. Por

lo tanto, se infiltraron frutos de tomate con *A. tumefaciens* portando este vector o pCAMBIA 1302 PG-GFP (como control negativo; sección 3.6.1). Luego de 4 días, a partir de RNA aislado (sección 4.6.2) desde los frutos transformados, se realizó la reacción de RT (sección 4.6.3). Posteriormente, se realizaron reacciones de PCR tanto para *18S*, a modo de comprobar la integridad del cDNA y descartar la presencia de DNA genómico (muestras 1 y 3 Figura 14B), como para *VvSDHI*, resultados que se muestran en la Figura 14.

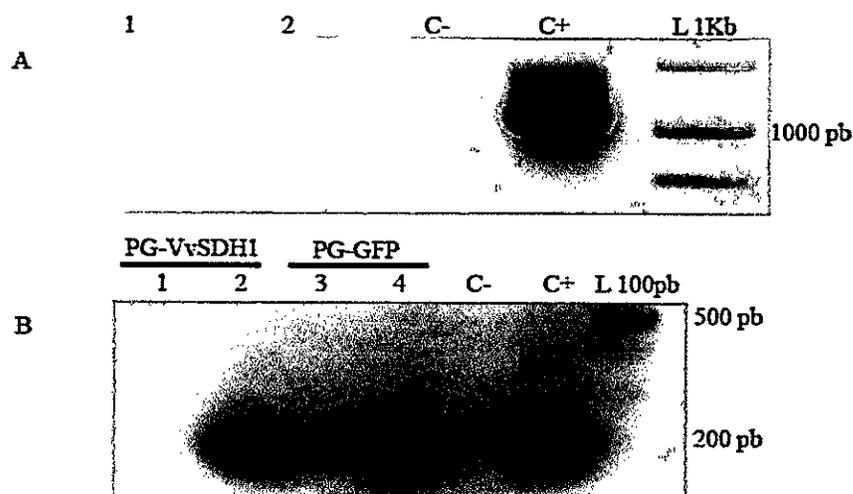


Figura 14: Resultados del análisis de la funcionalidad transcripcional de pCAMBIA1302 PG-VvSDHI. Gel de agarosa sometido a electroforesis y teñido con bromuro de etidio. En A se muestran los productos de PCR para la amplificación de *VvSDHI* utilizando cDNA como molde proveniente de RNA extraído de tomates infiltrados con PG-VvSDHI en 1 y PG-GFP en 2, en C- se utilizó agua como molde a modo de control negativo y en C+ una alícuota del vector pCR8-VvSDHI a modo de control positivo. Se aprecia una banda cercana a 1000 pb solo en 1 y C+. En B se muestran los productos de PCR para la amplificación de una parte del *18S*. Como molde se utilizó: RNA extraído desde frutos infiltrados con PG-VvSDHI sin tratamiento de transcripasa reversa en 1 y con tratamiento en 2; RNA extraído desde frutos infiltrados con PG-GFP sin tratamiento de transcripasa reversa en 3 y con tratamiento en 4; H₂O a modo de control negativo en C- y un cDNA de *A. thaliana* previamente comprobado en nuestro laboratorio por Lorena Pizarro a modo de control positivo en C+. Tanto para 2, 4 y C+ se aprecia una banda cercana a las 200 pb mientras que en 1, 3 y C- no se aprecia banda, lo que indica que no existe contaminación por DNA genómico.

En resumen, mediante técnicas moleculares se comprueba que el vector PG-VvSDH1 es funcional a nivel transcripcional, con lo cual se cumple el objetivo específico número 2 de este Seminario de Título.

5.3 Análisis de la actividad enzimática de VvSDH1 con sorbitol como sustrato

Los análisis bioinformáticos de la secuencia aminoacídica de VvSDH1 indican que posee las características moleculares de una sorbitol deshidrogenasa de vid (sección 1.4). Para verificar su actividad enzimática experimentalmente, se realizaron ensayos utilizando D-sorbitol y NAD^+ como sustratos, monitoreando la formación de NADH. Los ensayos se realizaron a partir de extractos de proteínas totales (PT) obtenidos de tomates transformados transitoriamente con el vector en estudio (pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1) y con un control (pCAMBIA 1302 PG-GFP). En cada réplica, una mitad del tomate fue infiltrada transitoriamente (sección 4.6.1) con pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1 y la otra con pCAMBIA 1302 PG-GFP. Además de esto, se realizaron controles sin agregar extracto crudo y sin agregar sorbitol en el medio; para ambos casos no se registró aumento en la absorbancia. En la Figura 15 se muestran las cinéticas enzimáticas de tres réplicas biológicas (A y B, C y D, E y F, respectivamente), siendo la diferencia entre ambas muestras la actividad atribuible a VvSDH1. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de ANOVA de 2 vías.

Considerando que la actividad atribuible a VvSDH1 es la diferencia entre los extracciones de proteínas totales provenientes de las transformaciones con pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1 y pCAMBIA 1302 PG-GFP, se analizaron los resultados de actividad por minuto para cada réplica biológica, lo cual se validó mediante un t-test (Figura 16).

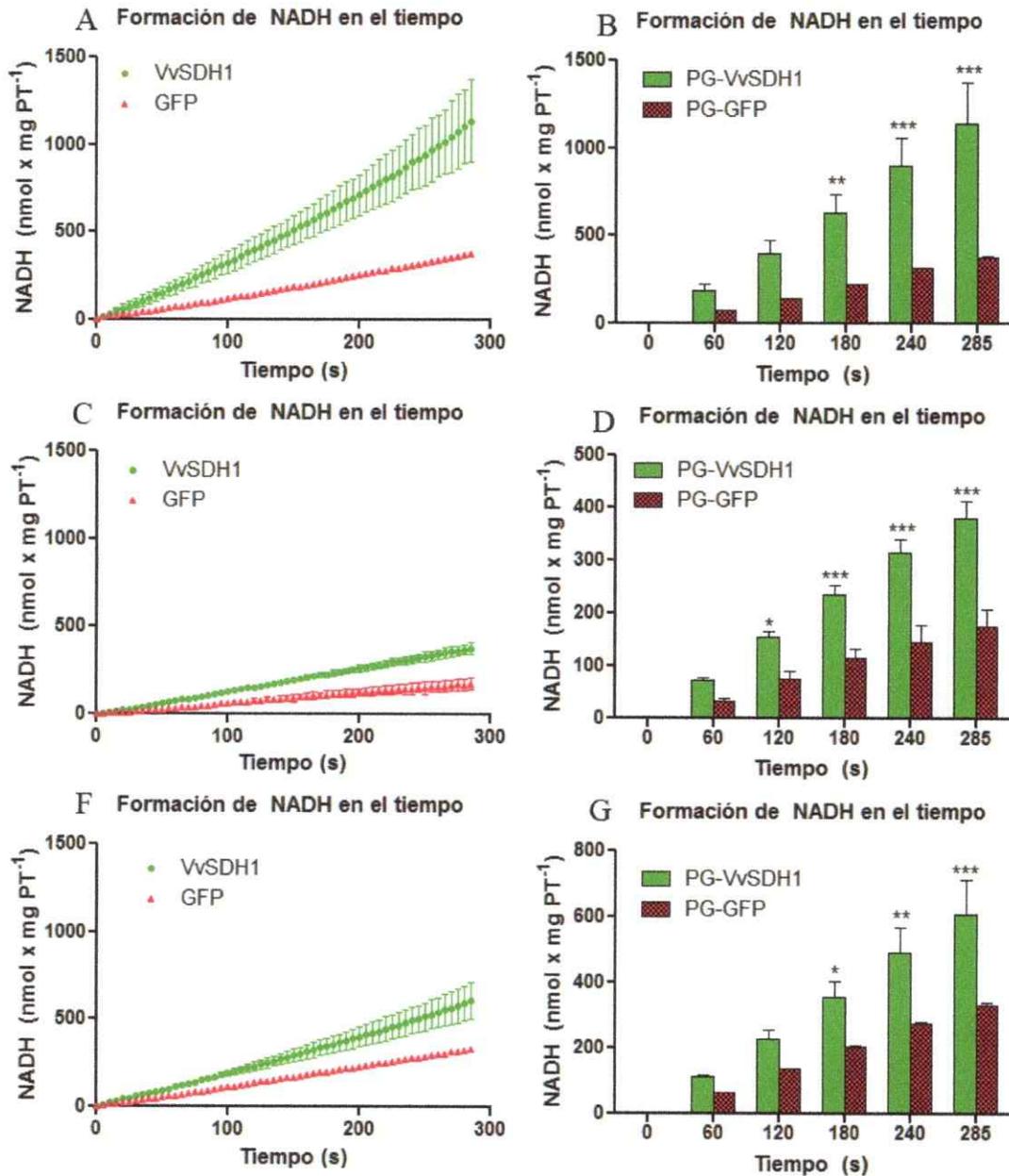


Figura 15: Cinética enzimática de VvSDH1 con sorbitol. En la figura se grafica la aparición de NADH en el tiempo para los extractos de proteínas totales (PT). A representa la cinética enzimática en el tiempo de una réplica biológica, mientras que en B se comparan los valores por minuto, encontrándose diferencias estadísticamente significativas a 180, 240 y 285 segundos. C representa la cinética enzimática en el tiempo de la segunda muestra biológica, mientras que en D se comparan los valores por minuto encontrándose diferencias estadísticamente significativas a 120, 180, 240 y 285 segundos. E representa la cinética enzimática en el tiempo de la tercera muestra biológica mientras que F es la comparación de los valores por minuto, encontrándose diferencias estadísticamente significativas a los 180, 240 y 285 segundos (las barras representan la desviación estándar de 2 réplicas técnicas, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

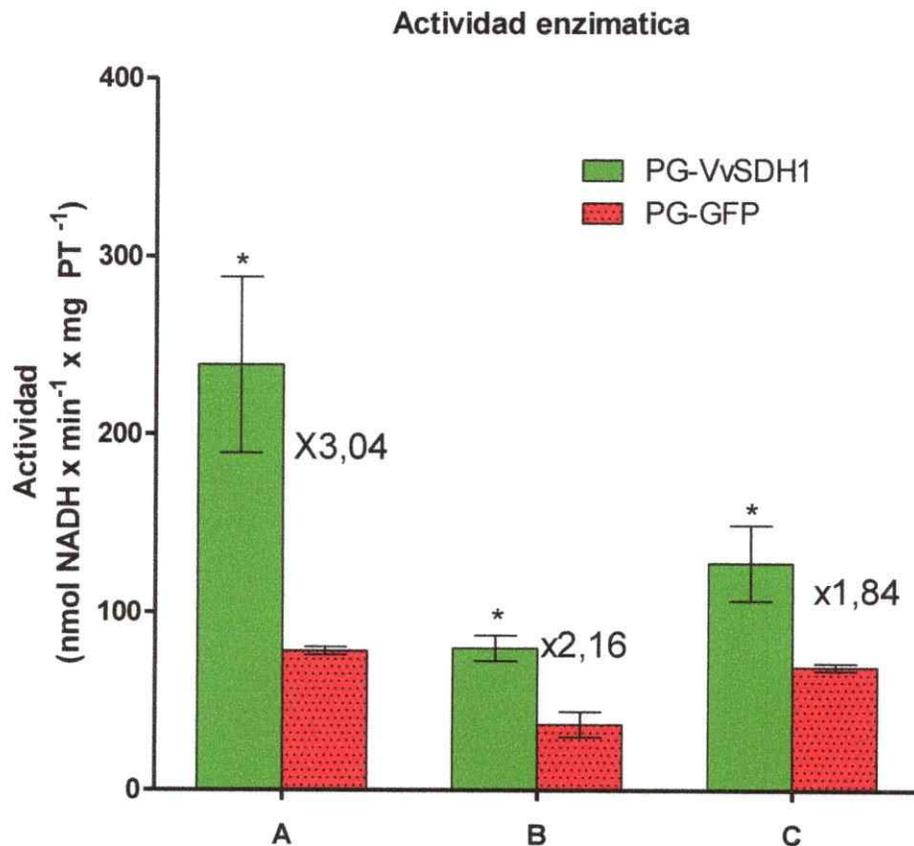


Figura 16: Actividad de sorbitol deshidrogenasa en frutos de tomate infiltrados. Se muestra el promedio de formación de NADH por minuto tanto para los extractos de proteínas totales (PT) provenientes de la transformación con pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1 y pCAMBIA 1302 PG-GFP A, B y C corresponden a las 3 replicas biológicas.

Todos los resultados anteriormente expuestos sugieren que efectivamente VvSDH1 se está expresando en frutos de tomate transformados transitoriamente y que se está traduciendo a una proteína que es capaz de oxidar sorbitol con la producción de NADH con lo cual se cumple con el objetivo específico número tres (sección 0).

6 DISCUSION

A pesar de que sorbitol es un alcohol de azúcar característico de especies vegetales pertenecientes a la familia de las Rosáceas, en la literatura se puede encontrar publicaciones que informan la presencia de SDH en especies que no forman parte de esta familia (Kuo y cols., 1990; Doehlert, 1987; Wanek y Richter 1993). Además de esto, se han descrito en especies no Rosáceas secuencias que son ortólogas a SDHs de plantas Rosáceas (Ohta y cols., 2005). Con el objetivo de identificar y caracterizar un ORF clonado desde *Vitis* (Tang, 2011), el cual presenta >75% identidad aminoacídica con SDHs ya descritas, es que se comenzó con las investigaciones de este seminario de título.

Además de lo antes mencionado y enmarcado en el proyecto INNOVA, el cual busca obtener una variedad de manzanas con mayor dulzor mediante la conversión de sorbitol en fructosa, *VvSDHI* podría ser un candidato para la obtención de esta nueva variedad si es que posee actividad del tipo SDH. Es por esto que, considerando que la expresión constitutiva de enzimas con actividad SDH no permite un crecimiento normal del organismo (Teo y cols., 2006), lo primero que se realizó fue la construcción de un vector que fuese capaz de expresar *VvSDHI* específicamente en frutos.

Para esto se construyó el vector pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1 (Figura 8) el cual posee el promotor fruto específico proveniente de la poligalacturonasa de tomate y que fue construido en nuestro laboratorio (Mandujano, 2008). Trabajos previos (Aguayo, 2010) mostraron que efectivamente el promotor PG es fruto específico puesto que al comandar la expresión de GFP se observa fluorescencia en frutos de tomate pero no en hojas de tabaco.

6.1 Construcción y verificación del vector pCAMBIA 1302 PG-VvSDHI

A través de todos los análisis moleculares realizados para la comprobación de la construcción del vector de interés se puede afirmar que al menos 4 clones cumplieron con las pruebas realizadas (Figura 12 carriles 1, 2, 3 y 4) con lo cual se cumplió con el objetivo específico número uno (sección 0). Sin embargo, durante la construcción del vector de interés se obtuvieron algunos resultados inesperados al momento de comprobar la integridad del mismo.

Luego de realizar una reacción de PCR para amplificar la región promotor-gen (*PG-VvSDHI*) se quiso hacer una doble comprobación y se realizó una digestión enzimática con *Bam*HI y *Bst*EII cuyo producto debió ser la aparición de un fragmento de aproximadamente 2000 pb correspondiente a la región promotor-gen (sección 5.1.3.3, Figura 11). Sin embargo, los resultados mostraron una banda inespecífica cercana a las 750 pb en algunos clones (Figura 11A muestras 1 y 4 carril *Bst*EII y doble, Figura 11B carril 7). Para comprobar este resultado inesperado, se realizó una segunda digestión enzimática con *Nsi*I (sección 5.1.3.4).

A pesar de que la reacción de ligación entre *VvSDHI* y el vector se realizó mediante corte y empalme con enzimas que no poseen extremos cohesivos entre sí, la reacción de digestión con *Nsi*I permite descartar la posibilidad de que *VvSDHI* se haya insertado en orientación inversa con respecto al promotor. En caso de que el empalme de *VvSDHI* en el vector sea en sentido con respecto al promotor *PG*, al digerir con *Nsi*I se esperan bandas de 284, 5203 y 5432 pb lo cual es concordante con los resultados obtenidos para las muestras 1, 2, 3 y 4 (Figura 12; por la resolución del gel, las bandas de 5203 y 5432

pb migran juntas), las cuales habían sido seleccionadas dado los resultados positivos al digerirlas con *Bam*HI y *Bst*EII (sección 5.1.3.3). En el caso de que la inserción hubiese sido en sentido contrario, la teoría indica que las bandas esperadas son de 5203, 4620 y 1097 pb lo cual es concordante con el resultado obtenido en el carril 5 de la Figura 12. Sin embargo, considerando que el DNA plasmidial ensayado y cargado en el carril 5 de la Figura 12 fue analizado por la reacción de PCR que amplifica la *PG-VvSDHI*, resulta imposible que el gen se encuentre en sentido contrario con respecto al promotor puesto que no se generaría el producto de PCR esperado (en la Figura 10 se aprecia que todas las muestras cargadas salvo el control negativo amplifican para el producto esperado). Además de esto, tal como se mencionó, las enzimas utilizadas para la construcción del vector no poseen extremos cohesivos. Por lo tanto, ¿cómo se puede explicar los resultados obtenidos con la muestra 5?

Luego de examinar la estructura del vector pCR8-VvSDH1 (Figura 4A, sección 4.2.1) y los resultados mostrados de la digestión enzimática con *Spe*I y *Bst*EII (Figura 7A, sección 5.1.2), se observa que al digerir pCR8-VvSDH1 con *Bst*EII, se genera una banda de aproximadamente 750 pb, la cual coincide con la banda inespecífica observada para algunas muestras al realizar la digestión doble de pCAMBIA1302 PG-VvSDH1 con *Bam*HI y *Bst*EII (Figura 11). Esto sugiere que al purificar la banda del gel correspondiente a *VvSDHI* (banda 2, Figura 6A), ésta se copurificó con la banda correspondiente a 768 pb correspondiente a un fragmento de pCR8 (banda 3, Figura 6A). En la figura 7 carril 2 se muestra la purificación del *VvSDHI* y en ésta no se aprecia la banda de 768 pb lo cual sugiere que la concentración de la banda copurificada fue

demasiado baja para ser detectada mediante tinción con bromuro de etidio. El hecho de que la reacción de PCR de *PG-VvSDH1* es positiva para la muestra 5 de pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1 (Figura 10), indica que ese vector quedó construido con el fragmento contaminante unido al extremo 3' de *VvSDH1* (Anexo 1). Al realizar una digestión *in silico* con *NsiI* de esta construcción inesperada, se liberaran fragmentos teóricos de 5432, 5203 y 1053 pb, fragmentos que concuerdan precisamente con lo observado experimentalmente en muestra 5 (Figura 12). De esta manera, se confirma que efectivamente el motivo de la aparición de las bandas inespecíficas al digerir algunos clones de pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1 (Figuras 11 y 12), se debió a la copurificación de un fragmento de menor tamaño cuando se extrajo *VvSDH1* desde el vector pCR8.

A pesar que los vectores con un fragmento extra (Anexo 1) no son lo esperado, éstos podrían ser igualmente funcionales tanto a nivel de transcripción como para efectos de analizar la actividad bioquímica ya que la clonación original de *VvSDH1* en pCR8 posee un codón de termino de la traducción en su extremo 3'.

6.2 Análisis de la funcionalidad transcripcional de pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1

Una vez construido el vector, el siguiente paso fue comprobar su funcionalidad a nivel transcripcional. Considerando que el promotor que comanda la expresión del gen es fruto específico (Montgomery y cols., 1993; Aguayo, 2010) se decidió hacer las pruebas de expresión mediante la infiltración transitoria de *Solanum lycopersicum* (tomate) ya que es un especie modelo y el método de transformación transitoria ha sido descrito (Orzaez y cols., 2006). A pesar de que el proceso de transformación transitoria es simple de realizar, la extracción de RNA desde frutos es compleja debido a su alto contenido de

compuestos fenólicos, polisacáridos y otras sustancias que pueden ser interferentes (Davis y cols., 2006; Hu y cols., 2002). Debido a esto, un paso limitante en el desarrollo de este seminario fue la estandarización de la extracción de RNA, puesto que con soluciones comerciales como RNASOLV® o TRIZOL® fue imposible obtener purificaciones con índices que reflejaran la pureza del RNA (datos no mostrados). Por lo demás, con los protocolos disponibles en la literatura al igual que para las soluciones comerciales no se lograron resultados positivos, ya sea para los índices de pureza del RNA o al momento de comprobar la integridad del cDNA a través PCR a *18S*. Además, en su mayoría los protocolos están diseñados para volúmenes de reacción sobre los 15 mL, lo cual excede la capacidad para la utilización de los equipos disponibles en el laboratorio. Por ende, fue necesario escalarlos, resultando finalmente el protocolo detallado en este seminario de título (sección 4.6.2). Mediante este método, se determinó que efectivamente la construcción realizada es funcional a nivel transcripcional puesto que, solamente al infiltrar con pCAMBIA1302-PG-VvSDH1, se expresa *VvSDH1*. Además, el segmento de ~200 pb de *18S* es amplificado solo en las muestras que fueron sometidas a transcripción reversa (Figura 14), lo cual descarta que la amplificación de *VvSDH1* se deba a la presencia de DNA genómico remanente, cumpliendo así con el objetivo específico número dos (sección 0).

6.3 Análisis bioquímico de VvSDH1 con sorbitol.

A partir de un extracto de proteínas totales fue posible determinar que VvSDH1 posee la capacidad de oxidar sorbitol acoplado a la reducción de NAD^+ a NADH (Figura 15 y 16).

La complejidad de esta etapa radica en las variables implicadas durante el proceso tanto de transformación como en el ensayo con proteínas totales:

Primero, existe actividad endógena de tipo SDH en el modelo de estudio (Ohta y cols., 2005) lo cual explica que la infiltración con el vector pCAMBIA1302 PG-GFP registre producción de NADH. Al no ser igual entre cada réplica biológica la actividad endógena que posee, el diseño experimental consistió en comparar la actividad de un mismo fruto infiltrado en una mitad con el vector de interés con respecto a la otra mitad infiltrada con un control (expresando GFP), la que se considera que posee sólo la actividad SDH propia del fruto. Por lo tanto, la diferencia de actividad medida entre los extractos provenientes de ambas mitades es la actividad atribuible a la acción de VvSDH1.

Segundo, al ser una transformación transitoria, los niveles de transcritos producidos y por ende la cantidad de enzima sintetizada dependerá en gran medida de la eficiencia de transformación en el fruto, la cual puede ser diferente entre cada réplica biológica, lo que podría generar un enmascaramiento en la actividad de VvSDH1 en un fruto con alta actividad endógena y una tasa de transformación baja.

Tercero, el material biológico utilizado proviene de tratamientos de almacenamiento a bajas temperaturas para el transporte hacia los comercios y cuando se encuentran almacenados en los mismos. Sin duda que para obtener resultados que sean más reproducibles las condiciones óptimas de ensayo se debiesen realizar con cultivos propios en condiciones controladas de forma tal de asegurar por una parte el estadio de maduración, ya que el segmento de PG utilizado posee una regulación positiva durante

la maduración del fruto (Montgomery y cols., 1993). Por otra parte, el tratamiento que tenga el fruto antes del ensayo debe ser lo más similar posible para de esta forma reducir la variabilidad de actividad máxima entre las diferentes réplicas biológicas. Si se consideran las diferencias obtenidas entre las réplicas biológicas (Figura 15 A, C y E) posiblemente los frutos comprados y utilizados no se encontraban en estadios similares. A pesar de ello, esta variable se mitiga en parte al estandarizar la actividad de VvSDH1 con respecto al control (PG-GFP) proveniente del mismo fruto, lo cual se ve reflejado en que los aumentos de actividad de tipo SDH para cada réplica biológica son estadísticamente significativos (Figura 15). Más aun, al calcular el promedio de la actividad enzimática por minuto entra cada replica técnica de cada réplica biológica, el aumento de actividad del promedio de este conjunto de datos continúa siendo estadísticamente significativo (validada por un t-test de dos colas; Figura 16), lo cual indica que el modelo experimental montado para la medición de la capacidad de oxidar sorbitol con generación de NADH a partir de extractos de frutos de tomate es confiable.

Finalmente, los ensayos al ser realizados con extractos crudos poseen otras moléculas distintas de la proteína que quedan en la fase soluble (entre ellas pigmentos). La presencia de estas moléculas podría explicar la variabilidad existente entre cada réplica técnica, dado que cada una se realiza con alícuotas diferentes del mismo extracto. A pesar de que se homogeniza el extracto antes de cada medición, no se puede asegurar que el contenido de cada alícuota sea exactamente el mismo.

Aun considerando lo antes expuesto, se puede concluir que VvSDH1 efectivamente es capaz de oxidar sorbitol, generando un aumento máximo de 3 veces en la reducción de

NAD⁺ con respecto al control. Estos resultados son concordantes con ensayos realizados en el laboratorio para una SDH aislada desde manzana con un aumento de 2,38 veces (Aguayo, 2010) y otra aislada desde tomate ensayada en durazno (2 veces, Mandujano, 2008). Considerando la actividad que tiene VvSDH1 con respecto a estas otras SDHs, los resultados sugieren que VvSDH1 podría ser perfectamente una candidata para obtener una variedad de manzanas más dulces (proyecto Innova).

De esta manera se da por cumplido el objetivo específico número tres (sección 0) y a la vez con el objetivo general del presente seminario de título al lograr determinar, que VvSDH1 es una enzima que posee actividad enzimática para la oxidación de sorbitol.

Sabiendo que VvSDH1 cataliza la oxidación de sorbitol, surge la pregunta sobre el rol que tendría la enzima, el sorbitol y la fructosa en vides. En trabajos realizados en el laboratorio, se estudió *in silico* la expresión de *VvSDH1* en condiciones de estrés mediante Plexdb, encontrando que existe una regulación positiva de la misma bajo condiciones como aumento de salinidad y sequia, entre otros (Tang, 2011). Sin embargo, existen pocos reportes en la literatura que describen la presencia de sorbitol en *Vitis vinifera* (co-elución con manitol, Andersen y Brodbeck, 1989; Roubelakis-Angelakis y Kliewer, 1978), aunque enzimas relacionadas con el metabolismo de sorbitol (por ejemplo, transportadores) han sido identificadas en estudios metabolómicos y transcriptómicos (Zamboni y cols., 2008; Deluc y cols., 2007).

A pesar de que los resultados muestran que VvSDH1 es capaz de oxidar sorbitol, éste podría no ser su único sustrato. Durante la caracterización de otras SDH vegetales se ha

encontrado que poseen actividad con otros polioles (xilitol, manitol, L-itol, entre otros; Oura y cols., 2000; Yamaguchi y cols., 1994). Además, cabe destacar que en estudios bioinformáticos realizados en el laboratorio (Tang, 2011), se encontró que, aunque *VvSDHI* posee mayor identidad de secuencia aminoacídica con otras SDHs caracterizadas, igualmente posee una alta identidad con una L-idoato-2-deshidrogenasa (76%). Por ende, no se puede descartar que su rol fisiológico en *vid* sea la participación en la síntesis de la vitamina C, un intermediario en la producción de ácido tartárico, el ácido principal en la uva y el vino (Debolt y cols. 2006). Por lo tanto, a pesar de que en las SDH caracterizadas su mayor afinidad es por sorbitol, se vuelve indispensable realizar un estudio más acabado con respecto a la especificidad de sustrato de *VvSDHI* y poder inferir de mejor forma el rol que juega en vivo.

7 CONCLUSIONES

El presente trabajo se realizó continuando con la línea de investigación iniciada en nuestro laboratorio (Tang, 2011) y muestra que el *VvSDH1*, aislado desde *Vitis vinifera*, codifica para una proteína que es bioquímicamente activa para la oxidación de sorbitol.

En la presente investigación, se generó un vector con un promotor fruto específico (pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1) capaz de expresar *VvSDH1* en frutos de tomate transformados transitoriamente. Esta construcción permitiría a futuro transformar de manera estable organismos vegetales sin afectar su normal desarrollo (Teo y cols., 2006).

Además, se demostró que VvSDH1 oxida sorbitol con la reducción de NAD^+ a NADH, comportamiento que se vio reflejado en las tres réplicas biológicas analizadas, obteniéndose un aumento máximo en la producción de NADH de 3 veces con respecto al control.

8 PROYECCIONES

A pesar de que los antecedentes bioinformáticos sugieren que VvSDH1 sería una SDH y que a través de los análisis bioquímicos realizados en el presente seminario, se determinó que VvSDH1 efectivamente es capaz de oxidar sorbitol, las SDH vegetales caracterizadas tienen, en general afinidad por más de un sustrato (Oura y cols., 2000; Yamaguchi y cols., 1994). Por lo tanto, es necesario realizar ensayos de especificidad de sustrato de VvSDH1 con diferentes alcoholes de azúcar presentes en *Vitis*. Si estos experimentos fueran realizados con VvSDH1 recombinante y purificada, se podría determinar la actividad específica y calcular parámetros cinéticos tales como la

velocidad máxima y la Km para cada sustrato analizado. De esta forma y al compararla con otras enzimas caracterizadas se podría determinar si es que VvSDH1 es una candidata adecuada en el contexto del proyecto INNOVA desarrollado en nuestro laboratorio.

Considerando que *Vitis Vinifera* no pertenece a la familia de las Rosaceas resulta interesante investigar cual es el rol que cumple VvSDH1 *in vivo* para lo que sería necesario, además de caracterizar su actividad enzimática, determinar su perfil de expresión en distintos tejidos y estadios de desarrollo de la baya.

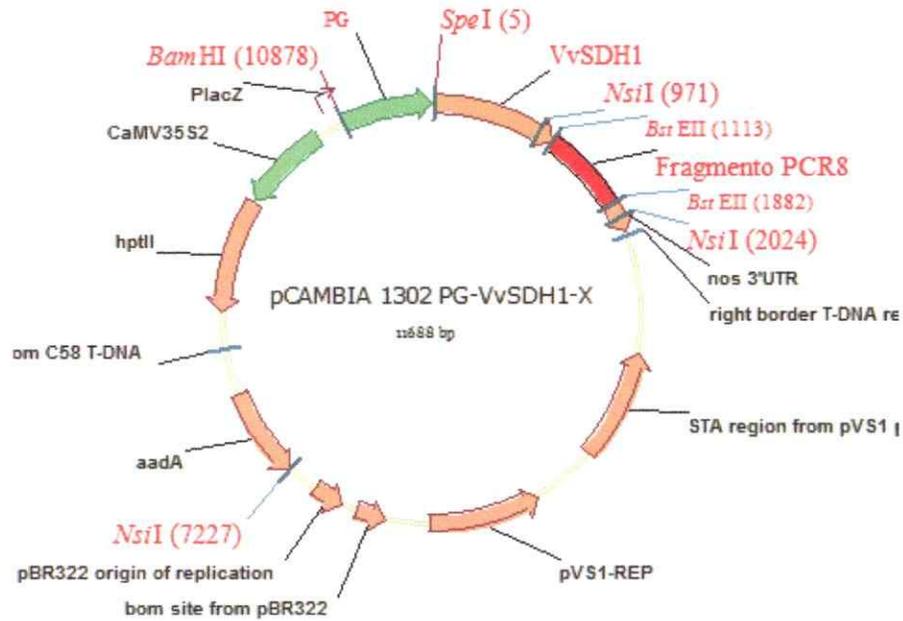
9 CONGRESOS

Yu-wen Tang, **Jorge Araya** and Michael Handford (2010). Identification and expression analysis of *VvSDH1*, a putative sorbitol dehydrogenase of grapevine (*Vitis vinifera*). Quinta Reunión Anual de la Sociedad de Biología Vegetal, Olmué, Chile. (Poster session)

Sofia Zamudio, **Jorge Araya**, Yu-wen Tang, Michael Handford (2011). The metabolism of sorbitol in non-Rosaceae species. Society for Experimental Biology Annual Main Meeting, Glasgow, Escocia (Poster session)

Jorge Araya, Yu-wen Tang and Michael Handford (2011) *VvSDH1*, a grapevine (*Vitis vinifera*) protein with homology to a sorbitol dehydrogenase from apple (*Malus x domestica*), oxidises sorbitol *in vitro*. XXXIV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, Valdivia (Poster session)

10 ANEXO



Anexo 1: Estructura de pCAMBIA 1302 PG-VvSDH1-X. En la figura se muestra la posible construcción obtenida debido a una copurificación de una banda desconocida de aproximadamente 750 pb (segmento en rojo del vector) junto con *VvSDH1* desde pCR8 (ver texto para los detalles). Las leyendas en rojo se muestran los sitios importantes a considerar para este seminario de título.

11 BIBLIOGRAFIA

- Aguayo M. F.**, (2010), Construcción y verificación funcional de vectores para sobre-expresar MdSDH, una Sorbitol Deshidrogenasa de Manzana, e implementación de un sistema de transformación estable de tomate. Seminario de Titulo, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Andersen, P., Brodbeck, B.** (1989). Chemical composition of xylem exudate from bleeding spurs of *Vitis rotundifolia* Noble and *Vitis* hybrid Suwannee in relation to pruning date. *American Journal of Enology and Viticulture*, **40**(3), 155
- Bellaloui N, Brown PH, Dandekar AM.**, (1999), Manipulation of in vivo sorbitol production alters boron uptake and transport in tobacco, *Plant Physiol.* **119**: 735–742.
- Bielecki RL.** Sugar alcohols. En: Loewus FA, Tanner W, eds. *Plant carbohydrates. I. Intracellular carbohydrates*, Encyclopedia of plant physiology New series, Vol. 13A. Berlin 1982 Springer, 158–192.
- Blakley R.L.**, (1951), The metabolism and antiketogenic effects of sorbitol. *Sorbitol dehydrogenase*, *Biochem J* **49**: 257-271
- Davis, A. R., Levi, A., Kim, S., King, S. R., Hernandez, A.** (2006). RNA extraction method from fruit tissue high in water and sugar. *HortScience* **41**(5), 1292-1294.
- Debolt, S., Cook, D. R., Ford, C. M.** (2006). L -Tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *PNAS* **103**, 5608-5613.
- Deluc, L. G., Grimplet, J., Wheatley, M. D., Tillett, R. L., Quilici, D. R., Osborne, C., y cols.**, (2007). Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC genomics*, **8**(1), 429
- Doehlert, D.C.**, 1987, Ketose reductase activity in developing maize endosperm, *Plant Physiol.* **84**: 830–834.
- Eklund H., Horjales E., Jörnvall H., Brändén C., Jeffery J.**, 1985, Molecular aspects of functional differences between alcohol and sorbitol dehydrogenases, *Biochemistry* **24**: 8005–8012.
- Estonius M., Danielsson O., Karlsson C., Persson H., Jörnvall H., Höög J.-O.**, 1993, Distribution of alcohol and sorbitol dehydrogenases: assessment of mRNAs in rat tissues, *Eur. J. Biochem* **215**: 497–503.
- Everard, J. D., Gucci, R., Kann, S. C., Flore, J., Loescher, W. H.** (1994). Gas Exchange and Carbon Partitioning in the Leaves of Celery (*Apium graveolens* L.) at Various Levels of Root Zone Salinity. *Plant physiology*, **106**(1), 281-292.
- Gabbay K.H.**, 1973, The sorbitol pathway and the complications of diabetes, *New Engl. J. Med.* **288**: 831–836.
- Gibeaut, Hulett, Cramer, Seeman.** (1997). Maximal Biomass of *Arabidopsis thaliana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. *Plant Physiol.* **115**: 317-319.

- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K., Bohnert, H. J.** (2000). PLANT CELLULAR AND MOLECULAR RESPONSES TO HIGH SALINITY. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**, 463-499.
- Hu, C. G., Honda, C., Kita, M., Zhang, Z., Tsuda, T., Moriguchi, T.** (2002). A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. *Plant Molecular Biology Reporter*, **20** (1), 69-69
- Hu, L., Lu, H., Liu, Q., Chen, X., Jiang, X.** (2005). Overexpression of mtlD gene in transgenic *Populus tomentosa* improves salt tolerance through accumulation of mannitol. *Tree physiology*, **25**(10), 1273-81.
- Johansson K., El-Ahmad M., Kaiser C., Jörnvall H., Eklund H., Höög J., Ramaswamy S.**, (2001), Crystal structure of sorbitol dehydrogenase. *Chemico-biological interactions*. **130-132**: 351-358.
- Kuo, T.M., Doehlert, D.C., Crawford, C.G.**, (1990), Sugar metabolism in germinating soybean seeds. Evidence for the sorbitol pathway in soybean axes, *Plant Physiol.* **93**: 1514-1520.
- Lehto, T., Raisanen, M., Lavola, A., Julkunen-Tiitto, R., Aphalo, P. J.** (2004). Boron mobility in deciduous forest trees in relation to their polyols. *New Phytologist*, **163**(2), 333-339.
- Lewis D.H.**, Physiology and metabolism of alditols, En: Lewis D.H. (Ed.), *Storage Carbohydrates in Vascular Plants*, Cambridge University Press, Cambridge, 1984, pp. 157-179.
- Lo Bianco, R., Rieger, M., Sung, S.-J. S.** (1999). Activities of sucrose and sorbitol metabolizing enzymes in vegetative sinks of peach and correlation with sink growth rate. *J. AMER. Soc. HORT. Sci*, **124**(4), 381-388.
- Loescher W.H.**, (1987), Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants, *Physiologia Plantarum* **70**: 553-557.
- Mandujano P** (2008), Construcción y evaluación de vectores para sobre-expresar la sorbitol deshidrogenasa de tomate (LeSDH) en plantas. Seminario de Título, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Montgomery, J., Pollard, V., Deikman, J., Fischer, R. L.** (1993). Positive and negative regulatory regions control the spatial distribution of polygalacturonase transcription in tomato fruit pericarp. *The Plant cell*, **5**(9), 1049-62
- Negm F.B. y Loesher W.H.**, (1979), Detection and characterization of sorbitol dehydrogenase from apple callus tissue, *Plant Physiol.* **64**: 69-73.
- Noiraud, N.** (2001). Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **39**(9), 717-728
- Ohta Kazuhiro, Moriguchi Ryo, Kanahama Koki, Yamaki Shohei, Kanayama Yoshinori**, 2005, Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant, *Phytochemistry* **66**: 2822-2828.
- Orzaez, D., Mirabel, S., Wieland, W. H., Granell, A.** (2006). Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiology*, **140**(1), 3.

- Oura, Y., Yamada, K., Shiratake, K., Yamaki, S.**, (2000), Purification and characterization of a NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase from Japanese pear fruit, *Phytochemistry* **54**: 567–572.
- Pauly T., Ekstrom J., Beebe D., Chrnyk B., Cunningham D., Griffor M., Kamath A., Lee S., Madura R., Mcguire D.**, 2003, X-Ray Crystallographic and Kinetic Studies of Human Sorbitol Dehydrogenase, *Structure* **11**: 1071–1085.
- Pharr D.M., Stoop J.M.L., Williamson J.D., Feusi M.E.S., Massel M.O., Conkling M.A.** (1995), The dual role of mannitol as osmoprotectant and photoassimilate in celery, *Hort. Sci.* **30**: 1182–1188.
- Pommerrenig, B., Papini-Terzi, F. S., Sauer, N.** (2007). Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. *Plant physiol.*, **144**(2), 1029-38.
- Popp M., Smirnoff N.**, Polyol accumulation and metabolism during water stress, En: Smirnoff M. (Ed.), *Environment and Plant Metabolism. Flexibility and Acclimatation*, Bioscientific Publishers Ltd, Oxford, 1995, pp. 199–215
- Rejsková, A., Patková, L., Stodůlková, E., Lipavská, H.** (2007). The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions. *Plant physiol.* **164**(2), 174-84.
- Roubelakis-Angelakis, K. A., Kliewer, W. M.** (1979). The composition of bleeding sap from Thompson Seedless grapevines as affected by nitrogen fertilization. *American Journal of Enology and Viticulture*, **30**(1), 14.
- Shen, B., Jensen, R. G., Bohnert, H. J.** (1997). Mannitol Protects against Oxidation by Hydroxyl Radicals. *Plant physiol.* **115**(2), 527-532.
- Slewiniski, T. L., y Braun, D. M.** (2010). Current perspectives on the regulation of whole-plant carbohydrate partitioning. *Plant Science*, **178**(4), 341-349
- Smirnoff, N., Cumbes, Q. J.** (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, **28**(4), 1057–1060.
- Stoop J.M.H., Pharr D.M.**, (1994), Mannitol metabolism in celery stressed by excess macronutrients, *Plant Physiol.* **106**: 503–511.
- Stoop J.M.H., Williamson J.D., Pharr D.M.**, (1996), Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress, *Trends Plant Sci.* **1**:139–144.
- Tang Y.**, (2011), Construcción y verificación de vectores para sobre expresar VvSDH1, una posible sorbitol deshidrogenasa de *Vitis vinifera* (vid), Seminario de Titulo, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Teo, G., Suzuki, Y., Uratsu, S. L., Lampinen, B., Ormonde, N., Hu, W. K., Dejong, T.M., Dandekar, A.M.**, (2006). Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(49), 18842-7.

Verwoerd, T. C., Dekker, B. M. M., Hoekema, A. (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Research*, **17**(6), 2362

Wanek, W., Richter, A., (1993), -IDITOL:NAD-oxidoreductase in *Viscum album*: utilization of host-derived sorbitol, *Plant Physiol. Biochem.* **31**: 205–211.

Yamada, K., Oura, Y., Mori, H., Yamaki, S., (1998), Cloning of NADdependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit and gene expression, *Plant Cell Physiol.* **39**: 1375–1379.

Yamaguchi, H., Kanayama, Y., Yamaki, S. (1994). Purification and properties of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit. *Plant and cell physiology*, **35**(6), 887.

Zamboni, A., Minoia, L., Ferrarini, A., Tornielli, G. B., Zago, E., Delledonne, M., y cols., (2008). Molecular analysis of post-harvest withering in grape by AFLP transcriptional profiling. *Journal of experimental botany*, **59**(15), 4145