

Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

ESTUDIO DE LA DESTINACIÓN INTRACELULAR DE LA POLIFENOL OXIDASA DE CHIRIMOYA (*ANNONA CHERIMOLA*) MEDIANTE LA EXPRESIÓN TRANSITORIA DE CONSTRUCCIONES QUIMÉRICAS CON LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE.

Memoria de Título entregada a la
Universidad de Chile en
cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al título de
Bioquímico por

CHRISTIAN FERNANDO MONTES SEREY

Director de memoria

**Dr. Humberto Godofredo Prieto
Encalada.**

Laboratorio de Biotecnología
Instituto de Investigaciones
Agropecuarias, CRI La Platina

Profesor patrocinante

Dr. Sergio Lobos Camus.
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, Diciembre de 2007

*...A mi hija Valentina, quien ha sido mi fuerza
y la excusa perfecta para crecer como persona...*

AGRADECIMIENTOS:

Quiero agradecer a mis padres, quienes han sido piedra angular en la difícil tarea de ser padre y estudiante.

Al resto de mi familia, hermanos, primos y amigos, los que siempre están ahí en las buenas y en las malas aguantándome mis mañas. Ellos saben quiénes son y que los quiero mucho.

A mi grupo de trabajo, los simios del “GodoTeam” y a nuestro jefe, mi tutor *Humberto* por su paciencia y disposición a ayudar.

A *Daniel Valdez* por su apoyo logístico en microscopía confocal.

Al *Dr. Gustavo Zúñiga* por facilitarnos su laboratorio para nuestros estudios fisiológicos.

A *Manuel Paneque* por conseguirnos los vectores de expresión.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto Fondecyt n° 1040011 y por el proyecto Consorcio Biofrutales código 501236-46.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.- RESUMEN.....	ix
2.- ABSTRACT.....	x
3.- ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	1
4.- INTRODUCCIÓN.....	2
4.1 PRODUCTOS MÍNIMAMENTE PROCESADOS.....	3
4.2 PPO DE <i>ANONNA CHERIMOLA</i>	5
4.2.1 Análisis bioinformático del propéptido N-terminal de Ac-PPO.....	10
4.3 Hipótesis.....	13
4.3.1 Objetivo general.....	13
4.3.2 Objetivos específicos.....	13
5.- Materiales y métodos.....	14
5.1 Material vegetal.....	14
5.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	14
5.2.1 <i>Escherichia coli</i>	14
5.2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
5.3 Construcción de vectores de fusión a GFP.....	15

5.3.1 Clonamiento de secuencias.....	15
5.3.2 Construcción del vector de expresión.....	17
5.3.3 Construcción del control positivo PalFus.	19
5.4 Infiltración por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y preparación de las muestras vegetales.....	20
5.5 Microscopía confocal.....	20
6.- Resultados.....	22
6.1 Construcción de los vectores de expresión.	22
6.2 Expresión transitoria de los péptidos de fusión en tabaco.....	28
7.- Discusión.....	31
8.- Consideraciones finales.....	38
9.- Conclusiones.....	39
10.- Bibliografía citada.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema comparativo de lacasas y cresolasas y de la oxidación de difenoles que catalizan.....	6
Figura 2. Alineamiento del marco de lectura abierto descrito para PPO de chirimoya (Acppo-ORF) con otras PPOs descritas en otras especies.....	8
Figura 3. Análisis bioinformático comparativo de la zona N-terminal de AcPPO y de diferentes PPOs previamente descritas.....	9
Figura 4. Análisis de señales de destinación presentes en la región N-terminal de AcPPO	11
Figura 5. Representación esquemática de la ubicación de los partidores de PCR diseñados para el análisis de la región N-terminal de AcPPO.....	15
Figura 6. Representación esquemática de las construcciones de fusión entre los distintos segmentos N-terminal del gen Acppo y el gen de la proteína fluorescente verde (gfp).....	23
Figura 7. Amplificación y clonamiento direccional de los distintos fragmentos N-terminal de AcPPO en el vector de entrada pENTR/D-TOPO	24
Figura 8. Esquema de recombinación basada en el reconocimiento de zonas <i>attachment</i> (<i>att</i> , L y R) de fago lambda	25
Figura 9. Escrutinio para los posibles clones recombinantes transformados con un vector correcto de expresión.....	26
Figura 10. MAPA DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN CONSTRUIDOS.....	27

Figura 11. Sistema control para la expresión transitoria de GFP en tabaco.....	29
Figura 12. Análisis de fluorescencia para los distintos constructos de la zona N-terminal de AcPPO fusionados al ORF de GFP.....	30
Figura 13. Procedimientos que aumentarían la eficiencia del método de recombinación basado en secuencias de <i>attachment</i> LR de fago <i>lambda</i>.....	33
Figura 14. Análisis de topología para el ORF de AcPPO.....	35
Figura 15. Modelo propuesto para el pardeamiento enzimático causado por daño mecánico en chirimoya.....	37
Tabla: Partidores Utilizados.....	16

1 RESUMEN

Estudio de la destinación intracelular de la polifenol oxidasa de chirimoya (*Annona cherimola*) mediante la expresión transitoria de construcciones quiméricas con la proteína verde fluorescente.

La chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) es uno de los candidatos más atractivos para su procesamiento por corte fresco en la nueva industria alimenticia. Sin embargo, este fruto presenta una marcada tendencia al pardeamiento, proceso en el que se ha descrito estar involucrada la enzima polifenol oxidasa (PPO). Resultados recientes nos han permitido definir la secuencia génica completa responsable de la síntesis de PPO en chirimoyas (Acppo). La proteína deducida desde esta secuencia (AcPPO) presentó dos codones de inicio candidatos (ATG), lo que llevó a un complejo análisis bioinformático sobre el significado de los aminoácidos encontrados en el extremo N-terminal de la proteína predicha.

En este trabajo, se describe un análisis funcional detallado de las secuencias N-terminal de AcPPO y su importancia en los eventos post-traduccionales relacionados a la destinación sub-celular final de la proteína propuesta. Se fusionaron al gen reportero GFP, las dos zonas candidatas a señal (definidas por estas metioninas) encontradas en el extremo N-terminal de AcPPO, junto con la secuencia completa y los respectivos controles. Las construcciones desarrolladas se evaluaron por transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* e infiltración de plantas de *Nicotiana tabacum*, para evaluar la emisión de fluorescencia debido a GFP a través de microscopía confocal.

Los resultados indicaron que, efectivamente, el péptido definido como N-terminal de AcPPO posee la propiedad de dirigir GFP (y por lo tanto PPO) hacia cloroplastos, determinándose la existencia de una secuencia mínima necesaria para que esto ocurra (péptido CLORO). Esto demuestra experimentalmente, la idea previa de que AcPPO es destinada hacia cloroplasto.

2 ABSTRACT

STUDY OF CELL SORTING FOR ANNONA CHERIMOLA'S POLYPHENOL OXIDASE BY TRANSIENT EXPRESSION OF GFP-BASED FUSIONS.

Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) fruit is an attractive candidate for food processing applications as fresh cut. However, it has a marked susceptibility to browning and this condition is mainly attributed to polyphenol oxidase activity (PPO). Recent work has allowed us the cloning, sequencing and experimental analysis of the full length *Acppo* gene. The predicted protein (AcPPO) presented two candidates ATG starting codons, generating a complex N-terminal analysis about the real compartmentalization of the enzyme by simple bioinformatic processing of the sequences.

A detailed functional analysis of the post-translational events involved in the final AcPPO sorting and cell distribution, was carried out by fusion of the two putative N-terminal signals found in AcPPO, to the green fluorescent protein (GFP) gene. Constructs either with the full-length (first ATG) or the second-half (second ATG) segment of the N-terminal peptide, were separately studied in transient expression assays. *Agrobacterium tumefaciens* infections with clones harboring these constructs on *Nicotiana tabacum* leaves were then evaluated by confocal microscopy. The existence of a minimal sequence in this N-terminal segment of the gene needed to direct AcPPO into chloroplasts was well established, supporting the idea that the cloned gene generates a protein that is sorted into these organelles.

3 ABREVIATURAS UTILIZADAS

ACC: Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico.

AcPPO: Polifenol Oxidasa de *Annona cherimola*. (*Annona cherimola* Polyphenol Oxidase).

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineamiento local. (Basic local alignment search tool).

Cb: Carbenicillina.

CO: Catecol oxidasa.

dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato.

E.C.: Clasificación enzimológica.

EDTA: Ácido etilendinitrotetraacético.

GFP: Proteína fluorescente verde. (Green fluorescent protein).

Hyg: Hygromicina.

IPTG: isopropil- β -D-tio-galactósido.

Kan50: Kanamicina 50 mg \cdot L⁻¹.

L.B.: Caldo de lisogenia. (Lysogeny broth).

MACC: Malonil-ACC.

NTPP: Pro-péptido N-terminal. (N-terminal pro-peptide).

ORF: Marco de lectura abierto. (Open reading frame).

Pb: pares de bases.

PBS: amortiguador de fosfato amortiguado por salinidad. (Phosphate buffered saline buffer).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. (Polymerase chain reaction).

PMP: Productos mínimamente procesados.

PPO: Polifenol oxidasa. (Polyphenol oxidase).

S.O.C.: Caldo súper óptimo. (Super optimal culture).

SB: Amortiguador sodio-borato.

Xgal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosido.

4 INTRODUCCIÓN

La familia de *Annonaceae* comprende (un número de) 50 géneros (Brown et al., 1988). La chirimoya (*Annona cherimola* Mill.), dentro del grupo de anonáceas comestibles, es la que presenta las mejores características organolépticas (Alique, 1995). En nuestro país existen numerosas variedades de chirimoya, entre las cuales se destaca el cultivar Concha Lisa como el que más se prestaría para fines de exportación por su forma carente de papilas, minimizando daños en cosecha y postcosecha, y mayor tolerancia a las bajas temperatura (Gardiazábal and Rosenberg, 1993).

La chirimoya es un fruto atípico en su fisiología de maduración. Los frutos en general se dividen en climatéricos y no climatéricos dependiendo si presentan un alza en la respiración en su maduración (Wills et al., 1998). En chirimoya, se ha descrito una doble alza de la respiración (Brown et al., 1988; Alique and Oliveira, 1994), con un incremento único del etileno después de la primera (Alique and Oliveira, 1994). Asimismo, tras el alza inicial de CO₂, se produce un incremento en la pérdida de firmeza de la pulpa, la cual es dependiente de temperatura (Alique et al., 1994). Algunos autores describen que el ablandamiento en chirimoya se debe principalmente a la acción concertada de celulasas y poligalacturonasas, sin descartar la participación de otras enzimas (Sánchez et al., 1998).

Se ha reportado previamente que la síntesis de etileno en chirimoya es dependiente de la temperatura de almacenamiento y que pequeñas concentraciones de etileno podrían ser capaces de desencadenar el proceso de maduración (Lahoz et al., 1993). Estos mismos autores mencionan que los procesos de acumulación de sólidos solubles, cambios en la textura y degradación de almidón no estarían muy relacionados con la producción de etileno, aunque este sería necesario para completar la madurez de la chirimoya. Otros autores han escrito que, aun cuando el ablandamiento de la chirimoya puede iniciarse con muy bajos niveles de etileno, éste

último será necesario para una maduración completa (Alique and Oliveira, 1994). En cuanto al control de la síntesis de etileno, la chirimoya presenta particularidades en comparación a otras frutas. Existen reportes que describen una activa acción de la conjugación vía “malonización” del Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) a Malonil ACC (MACC) como material de reserva para una posterior utilización en síntesis de etileno, situación poco común en relación a MACC, el cual se considera un producto final del metabolismo de ACC (Imaseki, 1991; Martínez et al., 1993).

4.1 Productos mínimamente procesados (PMP)

El uso de productos en la modalidad mínimamente procesados (PMP) o “*fresh cut*” está creciendo en el mundo dado las conveniencias en ahorro de tiempo en su preparación, higiene y reducción de desechos. Estos productos son cortados o sometidos, como dice su nombre, a un proceso mínimo que facilita su uso por los consumidores (Wills et al., 1998). Dado lo anterior, las frutas u hortalizas PMP en esencia, son elementos vivos que interaccionan con su entorno. Por lo cual, para obtener productos de calidad es necesario realizar investigación orientada a conocer los efectos que la preparación de este tipo de comida pueda ejercer en el producto y sus implicancias en la calidad final del mismo. El análisis de los cambios en la fisiología de la fruta u hortaliza sometido a un procesamiento mínimo se ha abocado fundamentalmente a los efectos producidos por el estrés a que son sujetos, y es así que algunos autores han catalogado la investigación de PMP como el estudio de la fisiología de tejido dañado (Brecht, 1995).

Los frutos y hortalizas PMP son más perecibles que las materias primas (como sería un producto no cortado) que le dieron origen (Watada et al., 1990). Existe actualmente un resumen de los efectos sobre la fisiología de los PMP entre los cuales se incluye el incremento de la síntesis de etileno y respiración, la degradación de membranas, pérdida de agua, producción de nuevas sustancias y pardeamiento oxidativo, el cual es uno de los factores más limitantes en la producción de frutas y hortalizas mínimamente procesadas (Brecht, 1995). Cuando un tejido vegetal es dañado mecánicamente se produce la interacción de enzimas y sustrato, que

normalmente se localizan en estructuras separadas, pero dada la acción del daño y la presencia de oxígeno se hace posible el desarrollo de pardeamiento. El pardeamiento en la mayoría de los casos es el resultado de la acción de polifenol oxidasas (PPO) sobre un sustrato en presencia de oxígeno (Joslyn and Ponting, 1951). En plantas un sustrato probable para la oxidación correspondería a flavonoides ampliamente presentes en tejidos vegetales, aunque otros tipos de fenoles también son susceptibles a la acción de PPO (Mathew and Parpia, 1971). La actividad de PPO resulta en la producción de o-quinonas que forman parte de una serie de reacciones (oxidación, formación de complejos, polimerizaciones, condensaciones) que conducen a cambios de color que son propios del pardeamiento (Mathew and Parpia, 1971). La acción de PPO podría ser la responsable del pardeamiento a que está sujeta la cáscara de la chirimoya después de su cosecha (Martínez et al., 1993). Algunos autores describen que chirimoyas sometidas a 4 °C presentaron cambios en la coloración debido a la acción de actividad PPO, particularmente en períodos cercanos a la senescencia del fruto (Gutiérrez et al., 1994). Otros autores señalan que el uso de calor no es viable para disminuir la acción de las enzimas presentes en la pulpa por la generación de sabores extraños y que, por otra parte, la utilización de antioxidantes como los ácidos ascórbico y cítrico y EDTA ha mostrado buenos resultados (Gardiazábal and Rosenberg, 1993). Reportes anteriores han demostrado una mantención de actividad de PPO en chirimoya aún después de someter a frutos procesados y preservados por congelamiento (-38 °C), almacenamiento (-18°C) y posterior descongelamiento (Abufom, 1985). En consecuencia, aunque el uso de antioxidantes pueda enmascarar el efecto de PPO y ayudar a obtener una solución técnica al desarrollo de PMP, la fisiología de PPO no es detenida por la congelación. Para el caso del PMP de chirimoya la expresión y actividad de PPO es de trascendencia como un indicador de los procesos de respuesta frente al daño. Además es importante tener en mente que la industria de alimentos se mueve a la reducción de compuestos considerados aditivos, por lo cual es necesario establecer la dinámica de cambios para que exista información pertinente para la generación de nuevas estrategias de manejo, para cuando ya no puedan utilizarse las herramientas actualmente disponibles para reducir los problemas como la oxidación de compuestos.

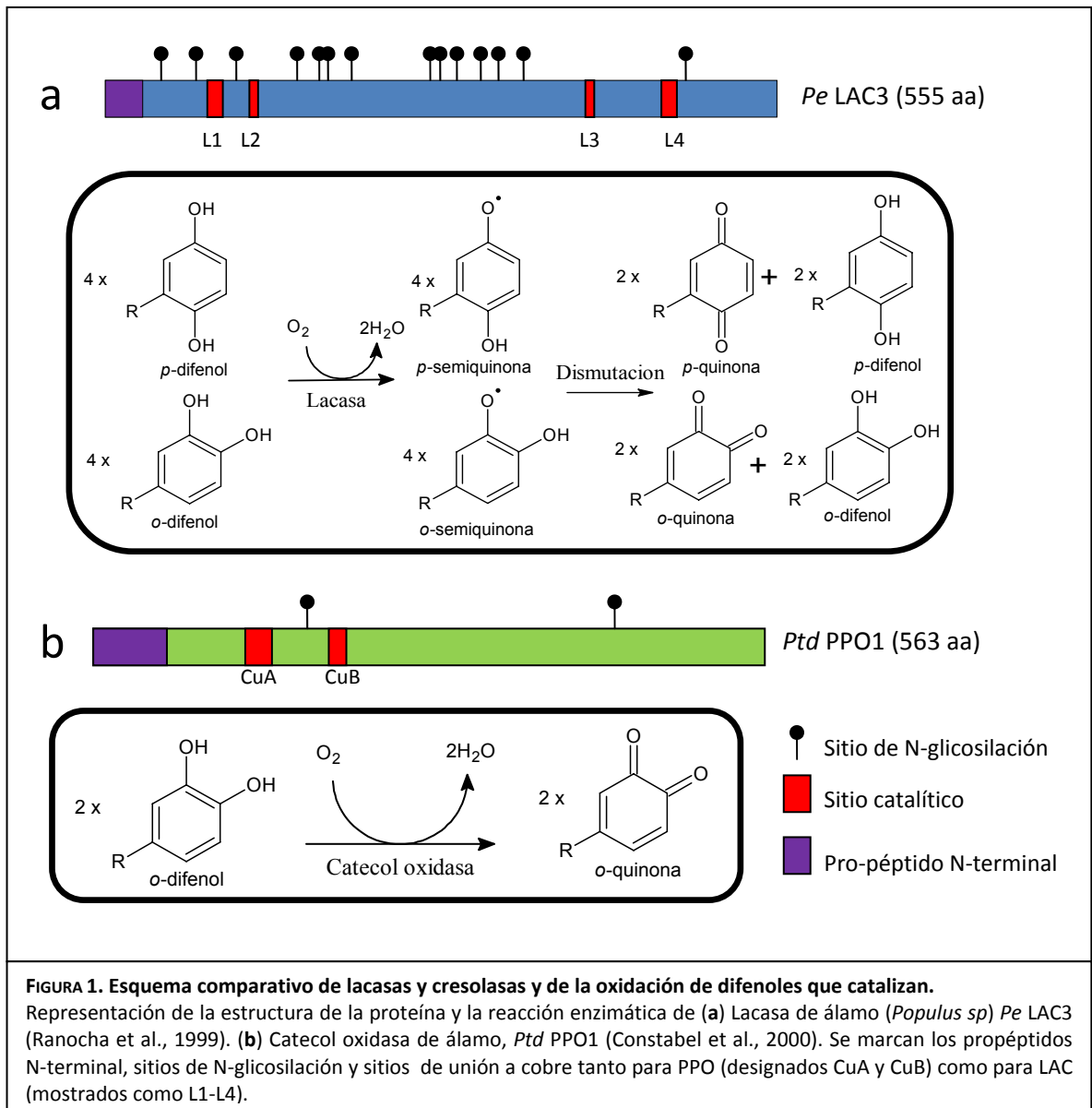
4.2 PPO de *Annona cherimola*.

Aunque el pardeamiento es una de las características más notorias de los cambios en PMP por ser fácilmente detectable, existe una serie de otros procesos que son gatillados por la confección de productos “*fresh cut*” que a su vez involucran la activación de múltiples genes asociados a diversos procesos como daño mecánico y deterioro, compuestos asociados a la pared celular y reparación (por ej. lignina), fenilpropanoides y aromas (Brecht, 1995); entre otros. La chirimoya es una fruta que, dada su condición de exótica, ha constituido material de estudio sólo para escasos grupos de investigación, implicando una información reducida en ciertas áreas, en especial en investigaciones a nivel molecular, con un limitado número de accesiones de genes en las bases de datos.

El pardeamiento enzimático es una reacción de oxidación en la que interviene como sustrato el oxígeno molecular, catalizada por un tipo de enzimas que se puede encontrar en prácticamente todos los seres vivos, desde las bacterias al hombre. En el hombre es la responsable de la formación de pigmentos del pelo y de la piel, en los cefalópodos produce el pigmento de la tinta, y en los artrópodos participa en el endurecimiento de las cutículas del caparazón. En los vegetales no se conoce muy bien el rol fisiológico del pardeamiento, sin embargo se ha reportado que forma parte del desarrollo de ciertas etapas como la muerte programada, la senescencia y las desecación de la semilla (Buchanan-Wollaston and Morris, 2000; Munné-Bosch and Alegre, 2004). También se ha descrito un rol en la defensa de la planta frente a estrés, tanto abiótico como biótico e impermeabilización de la semilla (Werker, 1979; Treutter, 2005).

El pardeamiento oxidativo se puede atribuir, por un lado, a la actividad de peroxidasas (EC 1.11.1.7), sin embargo, éste se debe principalmente a la actividad polifenol oxidasa (PPO), conocida también como fenolasa o tirosinasa (aunque este último caso se usa especialmente cuando se hace referencia a animales, ya que en ellos la tirosina es el principal sustrato). Esta actividad es realizada por dos enzimas, lacasas (EC 1.10.3.2) y catecol oxidasas (EC 1.10.3.1). Las lacasas (LAC) son o-

difenol y *p*-difenol dioxígeno oxidorreductasas pertenecientes a una familia de enzimas llamadas oxidasas multicobre azules y se caracterizan por tener al menos 4 sitios de unión a cobre y estar altamente glicosiladas (Ranocha et al., 1999) (Figura 1.a).



Las catecol oxidasas (CO) son metaloenzimas que catalizan la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (actividad catecolasa/difenolasa) (Figura 1.b) y generalmente tienen también asociada la actividad cresolasa/monofenolasa (EC 1.14.18.1) que cataliza la oxidación de monofenoles a *o*-difenoles (Marusek et al., 2006). Sin embargo no todas las plantas utilizan ambas enzimas para obtener actividad PPO (por ejemplo en *Arabidopsis thaliana* toda la actividad PPO está representada por lacasas (Pourcel et al., 2005)). En el caso de la chirimoya, estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo han permitido obtener la secuencia completa del único gen descrito hasta la fecha (*Acppo*), como responsable de codificar para la actividad PPO en chirimoya; la enzima (AcPPO) correspondería a una CO con actividad cresolasa (Prieto et al., 2007). Se ha postulado AcPPO como una proteína de 595 aminoácidos, con un punto isoelectrónico teórico de 6,43 y un peso molecular teórico de 67.811,18. La comparación del *Acppo*-ORF a través de BLASTn (Altschul et al., 1997), con genes previamente descritos en otras especies, demostró una muy baja similitud (Figura 2.a); sin embargo, el alineamiento de la secuencia aminoacídica predicha por BLASTx, demostró una alta homología entre AcPPO y otras PPOs de otras especies (Figura 2.b), tanto a nivel funcional como estructural. Este análisis también ha mostrado características típicas de una CO (van Gelder et al., 1997; Marusek et al., 2006) con los sitios activos CuA y CuB (sitios de unión a Cu^{2+}), típicos de una tirosinasa tipo 3, en los que existen tres residuos conservados de histidina (H). Este mismo análisis permitió apreciar la existencia de diferentes residuos conservados, con propiedades funcionales o estructurales (una cisteína (C) en CuA, que se ha descrito con un rol estructural al interactuar con las histidinas del centro del sitio activo mediante un enlace tioéster; un residuo de fenilalanina (F) dentro de CuB que se propone como regulador de las funciones; un “motivo tirosina” río abajo de CuB con dos tirosinas (Y) que deberían interactuar estéricamente, mediante enlaces puente de hidrógeno, con un ácido aspártico (D) ubicado a cuatro residuos de distancia de la tercera histidina de CuB). Además, en AcPPO se encontraron residuos de estabilización macromolecular, tal como un residuo de arginina (R) río arriba de CuA, el cual debería interactuar con el primer residuo Y del “motivo tirosina” (Cuff et al., 1998; Garcia-Borron and Solano, 2002; Gerdemann et al., 2002; Marusek et al., 2006) (Figura 3).



FIGURA 2. Alineamiento del marco de lectura abierto descrito para PPO de chirimoya (Acppo-ORF) con otras PPOs descritas en otras especies.

(a) Alineamiento derivado de la comparación de secuencias nucleotídicas, a través de BLASTn, demostrando la baja identidad de Acppo con otras PPOs previamente descritas y (b) Alineamiento derivado de la comparación a nivel peptídico, a través de BLASTx, demostrando una identidad muy alta.

FIGURA 3 (página siguiente). Análisis bioinformático comparativo de la zona N-terminal de AcPPO y de diferentes PPOs previamente descritas.

Se deducen dos sitios activos dependientes de cobre (CuA y CuB), mostrándose los residuos conservados de histidina (H); el residuo cisteína que generaría un puente tioéter estabilizador de la macromolécula (C) y un motivo de tirosina (cuadrado) con un par de residuos tirosina (Y) que definen el fin de esta zona de la proteína. También se indican residuos de arginina (R) y aspártico (D), que interactuarían con el motivo Y, a través de una interacción catión-nube electrónica π y puente de hidrógeno, respectivamente. De esta comparación también se deduce la existencia de péptidos N-terminal de tránsito (subrayada) para AcPPO y su sitio de corte putativo (flecha). En todas las secuencias incluidas, se postula que la proteína procesada comienza en el residuo 107, sin embargo, esto no se ha determinado para *A. cherimola*. En azul se indica el péptido predicho como de tránsito putativo, en naranja se indica el péptido predicho como de destinación a cloroplasto (Prieto et al., 2007).

10 20 30 40 50 60 70 80 90

Ananas comosus MAILSKLASQ PITPPLSPLP PLHAPSLTKS FTTTFLSVFG VFN----- --HPVIRS HANLRNKRKM PTLSLRAASFA ATYSWALGGL

Ipomea batatas -----

Lycopersicon esculentum MSSSTPNTLP LLSTNKLSS PFTNN--HST FLSPKPSQFL HGR----- -RQSFKVC NV--GEHDKN ---LDAVDR RNVLGLGGL

Nicotiana tabacum LLASSSSTLP -LCANKTPSS SFTMNTNNS FFAKPSQFL HGR----- -RNQFKFC NANSGBHDKN ---LDAVDR RNVLGLGGL

Oryza sativa MESINVAPGT TATPRMAPP P--PFCITN- ---LQSTLR YNN----- --LLLHRK TKGWKRNR- --VSCRVDRRD VLLGISGAA

Solanum tuberosum -MASLGN--- -SSSTSLKT PFTSSTSLSS SFFKFSQFLI HGR----- -RNQFKVC NV--GEHDKN QNVEINSVDR RNVLGLGGL

Spinacia oleracea -MPLSSPTL ITTTSILLAN PFLKTKPLLS AHHRGVRV NGKVS---C QIKNNNGNE NNQPLIQNF NTMTYLLDR RNLLGLGGM

Triticum aestivum ----- --MAAS ACLPRKFAV GAGKQGRSL LCK----- --CEA TSGRAGTDD DDVLRRLDR RDVLLGLGV

Trifolium pratense MISISSSPLS LMS-LNISSN FNTSSSLQYP FSKQHQHQS NRK-----P KHKIACIEN DITNNSPKQV EQSP--SFR RNVLGLGGL

Vicia faba MTSIS-ALS FISTINWSSN SKIHSVYVP FLQKHGSSK LRK-----P KRQ-VTCSN N-NQNPKEE QEISINRVR RNVLGLGGL

Vitis vinifera --MASLWFS LTIESTAANT TNISAFPEP LFRQASHVEV ARNRSRFP SKVSCNSANG DFNSDSTSDV RETSSGKLDL RNVLGLGGL

Annona cherimola --MGRPLQFS AISLAFCLVA VAFESNLIVS CCHAADQSVL LGE----- --NNN IYASNGFGL KNLIYEMGGG

Péptido de transto

100 110 120 130 140 150 160 170 180

Ananas comosus YGATTLGLLN -RRAAAAIL APDLSTCGFP A-DLPASARP T--VCCPPYQ S--TIIDEK LPPRS-APLR VEPAAHLV-- DADYLAKYK

Ipomea batatas ----- --APIQ APEISKCVPE PADLPPGAV D--NCCPPVA S--NIVDK IPVV--TMK VEPAAHTM-- IKDAIAKAFR

Lycopersicon esculentum YGAANLAPLA S-----APIP PFDIKSCGVA H--IDDKGIE VSYSCPPFV DDIISVFPYK FPFM--TKLR IEPHAAH-- DEEVAKYQL

Nicotiana tabacum YGAANLAPLA T-----APIP PFDIKSCGVA H--IDDKGIE VSYSCPPFV SMDSVFPYK FFSM--PKLR IEPHAAH-- DEEVAKYK

Oryza sativa MVVIQGGGG- ---ALAPIQ APDLGDCHQP V-DVEATAPA I--NCCPTYS AGT-VAVDEA PFPAS-SPLR VEPAAHLV-- IRAYLAKYER

Solanum tuberosum YGANAIFLA AS---AAPAP PFDLSSCSIA R--INENQV VPIYSCAPFK DIMKVPYK FFSM--TKLR VEPHAAH-- NEEYIAKYNL

Spinacia oleracea YAALGSEGAN YNNTLAAPII -PDEKCTLS D---ALWDS VGDHCCPPFP DIN-ITDKE FKNYHNVK VEPHAAH-- DQEVLDYKFR

Triticum aestivum GATGAINLGG LALATDRAVL ATCVTVPVTD K---VIRQVS ADGFCQGVY REB-DVVDES ALPPPNGLR VEPHAAH-- DEEVAKYK

Trifolium pratense YGAT-TLNN NSLAFGAVP I-PDITKCVIP ---PSGAVP P-INCCPPFS K--DIIDK YPSF--EKLR VEPAAHLV-- DDEYFAKYNK

Vicia faba YG--TLATN -PSALASPI S PFDIKSCVPE S-DLPSGTP PNINCCPPYS T--KIIDK FFSN--QPLR VEPAAHLV-- DNEFLEKYK

Vitis vinifera YGAGGLGAT KPLAFGAPIQ APDISKCGTA T--VDFGVP T--NCCPPVT T--KIIDK LPSG-SFMR VEPAAHLV-- SKELYAKYK

Annona cherimola WLSTHVFVAV GEAERTKSL APNLTTCNRS L---SDADR P-VCCPPKP ASEESVIDQ FFSFS-SPLR IEPHAAH-- DEEVAKYK

Señal a cloroplasto

190 200 210 220 230 240 250 260 270

Ananas comosus AVELMRALPA ---DDPRNFV QQAQICAYG DGAYDQIGFP ---GLEIQI NSWLFFFP RFYLYSNERI LGGLIGDPT ALPFWNDAP

Ipomea batatas AVELMRALPG ---DDPRNFY QQAQICAYG NGGYDQVNF ---DQEIQV NSWLFFFP RWLYFYERI LGGLIGDPS GLPFWNDAP

Lycopersicon esculentum ATSRMRELK -DPFDPLGFK QQAQICAYG NGAYKIGG- ---KELQV NSWLFFFP RWLYFYERI LGGLINDPT ALPFWNDAP

Nicotiana tabacum ATSRMRELK -DPFDPLGFK QQAQICAYG NGAYKIGG- ---KELQV NSWLFFFP RWLYFYERI LGGLINDPT GLPFWNDAP

Oryza sativa AVSLMKLPA ---DDPRSFQ QQAQICAYG DGAYDQVGF ---GLEIQI NSWLFFFP RWLYFYERI LGGLINDPT ALPFWNDAP

Solanum tuberosum A1SRMKLDLK TQPLNPIGFK QQAQICAYG NGAYRIGG- ---KELQV NSWLFFFP RWLYFYERI VGFIDPT ALPFWNDAP

Spinacia oleracea A1AIMKSLPM ---SDPRNSM QQAQICAYG DGSYPVLGHN ---DRLLEV NSWLFFFP RWLYFYERI LGGLIKDPF ALPFWNDAP

Triticum aestivum GVRMRDLDA S---GDPRSFK QQAQICAYG NFHYKVTAA SRTPEDFDV SSSIFAPW RMYIFYERI IGLIGDPT ALPFWNDAP

Trifolium pratense ALELMRALPD ---DDPRFS QQAQICAYG VGGYKQIGFP ---EILSV NSWLFLAE RWLYFYERI LGGLINDPT ALPFWNDAP

Vicia faba ATELKRALFS ---NDPRNF QQAQICAYG DGAYDQIGFP ---GLEIQV NSWLFFFP RWLYFYERI LGGLINDPT ALPFWNDAP

Vitis vinifera ATELQKALPD ---DDPRSEK QQAQICAYG QGAYDQVGT ---GLEIQV NSWLFLAE RWLYFYERI LAQLIDPT ALPFWNDAP

Annona cherimola AVKMKQLSY ---DHPHFM QQAQICAYG TGAYNQENST ---SL-LKI NSWLFFFP RMYIFYERI LGGLIGDPT ALPFWNDAP

Cu A

280 290 300 310 320 330 340 350 360

Ananas comosus GGMQFPSIYT DPSSSLDKL RDAHQPPTL IDLDYNGIDP TFSFE---- -EQINHNLAV MYRQVIS--- -SKTPELF MGSAYRAG--

Ipomea batatas GGMQLPFDLN DSTSSLDXSN RNQSHLPFVV VDLGNGADT DVTDQ---- -QRTDNLAL MYRQVMT--- -MAGTAEFL LGKAYRAG--

Lycopersicon esculentum KGRMIPPMFD REGSSLDXK RNQSHRNGTI IDLGHFGKDV RTPQL---- -QMTNNLIL MYRQVMT--- -NAPCFSGF FGAP--IG--

Nicotiana tabacum KGMIPPMFD REGSSLDXAR RNQSHRNGTI IDLGHFGTEV QTTQL---- -QMTNNLIT MYRQVMT--- -NAPCFELF FGQYFPLG--

Oryza sativa DGMFIPAMYA NRWSPLDXPR RNQSHLPFPP LDLDYSGIDT NLPKD---- -QLDQNLNI MYRQVIS--- -GARKALFL MGQYFRAG--

Solanum tuberosum KGMRFIPAMY REGTSLDVT RDQSHRNGAV IDLGHFGNEV ETTQL---- -QMSNNLIL MYRQVMT--- -NAPCFRPF FGQYDILG--

Spinacia oleracea DGMRIPELIF EMDSPLEDPN RNTNHLDM MNLSFVSEIE GSDVN---E DDQYENIIL MRKAMVYPSV SDEPNKAEFL LGSYFRAGD

Triticum aestivum DGMMLPPIFN NASSPLDAN RDQSHVTAVM DLNKGFGAEN DLPLCT--DD ACQKNNLIV YRQVAV--- -DIALQF HGKFCAG--

Trifolium pratense DGMQIPSIFT NPSSSLDLK RDSHQPPFRI IDLNYNKDIE DPGFNPPSA EQQIKDNLIL MHRQMIT--- -NKTCLIF HGSYFRAG--

Vicia faba DGMQLPPIYA DKASPLDEL RNASHQPPTL IDLNFCDIGS DIDRN---E ELIKTNLSI MYRQVIS--- -NKTSLRF LGNFRAG--

Vitis vinifera DGMMLPPIYA SSPSSLDXK RNASHLPFVV IDLDYDGTPE TLPDD---- -ELKTDNLAI MYRQVIS--- -GATPELFL LGYFRAG--

Annona cherimola PGMIPFAMY S--GSLREQ RDRHLRFRQA ADIDFDYVES GLGRE---- -QTSKVLAF MYRQVMS--- -GAKTELF MCKYFRAG--

Cu B

370 380 390 400 410 420 430 440 450

Ananas comosus -DQDPGAGS VEQKHEPV VWTG----- -DRNQPNRE DMGTLVSAAV DVFFFAHGN IFRMWWVR- NLG--KHEN FTD-PDWLNA

Ipomea batatas -DAPSPGAGS IETSEPII RVVG----- -DPRNTNNE DMGNFYSAGR DIAFYCHSN VDRMWAQW- GLGKPKRRD YTD-SDWLNA

Lycopersicon esculentum -SIEFPGMGT IENIFIPV IWTG----- -DS PRQG--HSE DMGNFYSAGL DELFYCHSN VDRMWEWK- LIGK--RRD LSN-KDWLNS

Nicotiana tabacum -TIEFPGMGT IENIFIPV IWTG----- -SR PDENNKHSE DMGNFYSAGL DELFYCHSN VDRMSEWK- ALGK--RRD LTH-KDWLNS

Oryza sativa -DQEPGAGT VESVNEPV RWTG----- -DPRQNSE DMGLFVSAAR DVFFFAHGN VDRMWHIR- GLFPE-GDT FTD-PDWLNA

Solanum tuberosum -VN-TELPGT IENIFIPV IWSGTVRGS LPGAISNGE NMGHFYSAGL DVFFCHSN VDRMSEWK- ATGK--RTD LTH-KDWLNS

Spinacia oleracea MEQVSGAGI LERMPENSV VWTG----- -SNTIKNQ DMGALWSAGR DELFYCHSN VDRMWSLWD VLGHNPKPT PEY-DDYRNA

Triticum aestivum -GTPGSPGS LENAATRAV IWTG----- --SNTIKNQ DMGALWSAGR DVFFYSHSN VDRMWSLWT ALNGDPLGT GTGGDWRDT

Trifolium pratense -QAPGKHGA LEMSPNNV IWSG----- -DAKQPIRE DMGNFYSAGR DELFYCHSN VDRMWSLWK- TLGK--RRD FTD-DWLENS

Vicia faba -DAEPGAGS IENVNEPV TWTG----- -DNTQTNIE DMGLFVSAAR DVFFYSHSN VDRMWSLWK- TLGK--RRD FTD-DWLENS

Vitis vinifera -DAIDPAGT LEHAFNLV KWTG----- -LADKFS-E DMGNFYSAGR DVFFYSHSN VDRMWSLWK- TIGK--RRD FTD-DWLENS

Annona cherimola -DQCDGPGT IELAFNAL TWTG----- --SDLNPERE NMGHFYSAGR DVFFYSHSN IFRMWWVR- KLGH--EPE YVD-PEWLNS

Motivo tirosina

460 470 480 490

Ananas comosus SEIFYDENAG LVRVKVDCFL EADNRVTHIQ DV-EIPLWKA

Ipomea batatas TFIYDENQG AVKVRIGDSL DNQRMGTHVA KT-ELPWLDS

Lycopersicon esculentum EFFFYDENRN PYRVKVRDCFL DSKRMGTHVA PM-PTPWRNF

Nicotiana tabacum EFFFYDENRN PYRVKVRDCFL DSKRMGTHVA PM-PTPWRNF

Oryza sativa SFFFYDEEAR LVRVKVRDTL DPSALRTHVA DV-GLPWLNA

Solanum tuberosum EFFFYDENEN PYRVKVRDCFL DTKRMGTHVA PI-ATPWRNF

Spinacia oleracea YFFYDENAN PYRVVVRDSE DTERLGRTHVA DQ-ELPWSMI

Triticum aestivum SFVYDEKRR PVKRSVRDVL DAGRLGTHVA EKETELEWLDK

Trifolium pratense EFLYDENKN LVKVKVDGL DGKLGTHVA KV-DI PWINS

Vicia faba GFIFYDENKN LVRKVRDCL DIDLGRTHVA DV-EIPLWKA

Vitis vinifera TFFYDENQO LVRVKVSDCV DTSKLRTHVA DI-EIPLWKA

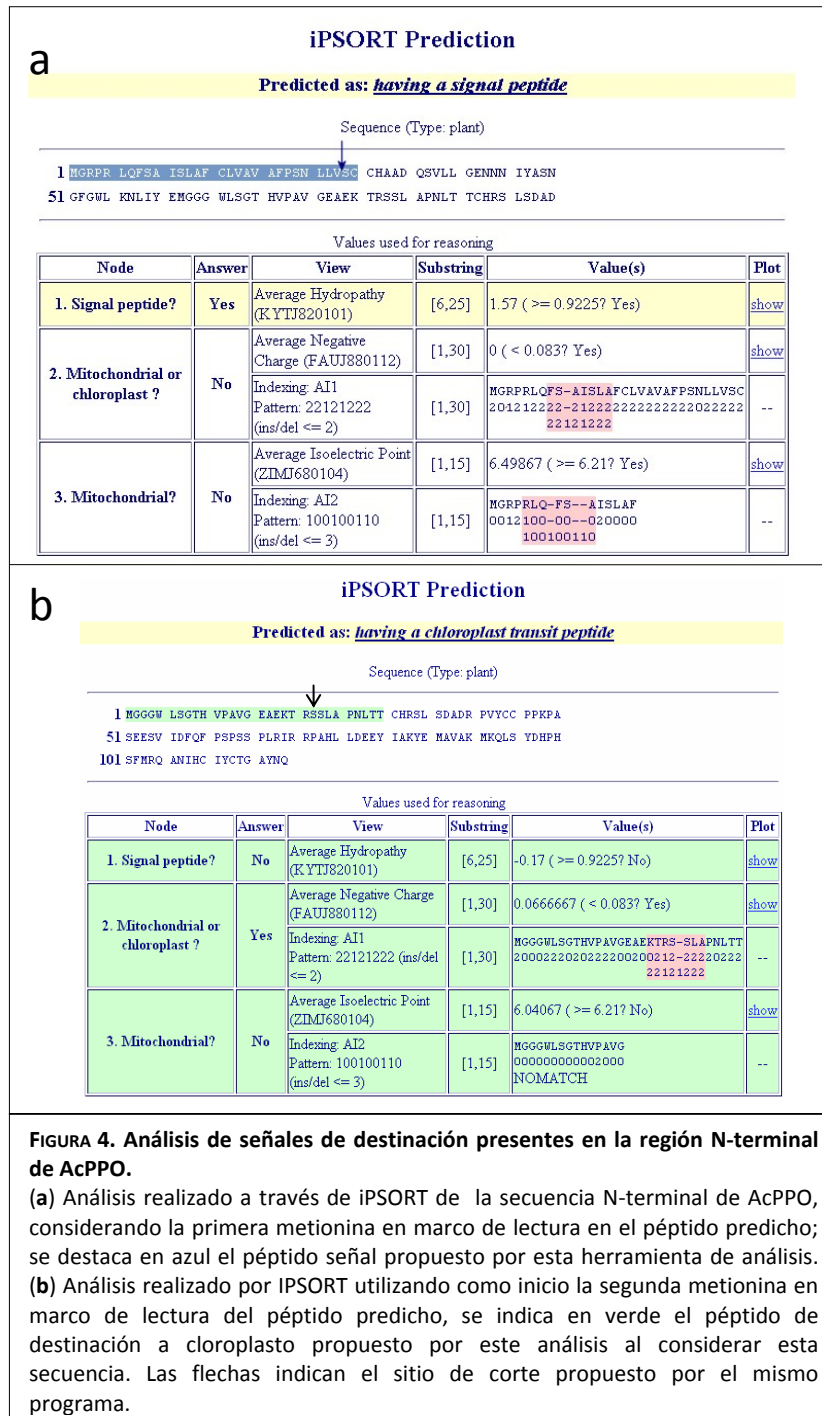
Annona cherimola YFFYDENAG LVRVRIROVL DFKSLRTHVA EA-DLPLWNA

Se ha descrito y postulado como modelo de acción de PPO en el pardeamiento, que la enzima estaría compartimentalizada en cloroplastos, mientras que sus potenciales sustratos estarían destinados a la vacuola. De esta forma, al producirse el daño mecánico, la destrucción de esta distribución celular pondría en contacto a la enzima y sus potenciales sustratos. A pesar de haberse clarificado estructuralmente AcPPO, ninguno de los análisis *in silico* efectuados permitió establecer claramente la existencia de señales de destinación celular en este ORF. El extremo N-terminal de AcPPO posee dos metioninas posibles para el inicio del péptido lo cual ha dificultado el análisis bioinformático para definir correctamente el inicio de ORF.

4.2.1 Análisis bioinformático del propéptido N-terminal de Ac-PPO (NTPP)

El análisis de la región N-terminal de AcPPO mostró la existencia de dos metioninas en el mismo marco de lectura adecuado, que no alteran ninguna de las características antes mencionadas en AcPPO. La primera metionina da lugar a un propéptido N-terminal de aproximadamente 29 residuos, con un sitio de corte predicho en LLVS/CR, que es identificado como un péptido de tránsito mediante análisis con iPSORT (Bannai et al., 2002) y targetP (Nielsen et al., 1997; Emanuelsson et al., 2000) (Figura 4.a). Al generar un ORF desde la segunda metionina, se da lugar a un propéptido N-terminal de aproximadamente 20 residuos, con un sitio de corte en KTRS/SL que se ha identificado como un péptido de destinación a cloroplasto mediante análisis por iPSORT y targetP (Figura 4.b). Sin embargo, cuando se realizó el análisis simultáneo de ambas metioninas (es decir toda la señal N-terminal), no se pudo obtener una evidencia clara de la destinación subcelular a la que dirige el NTPP, siendo sólo reconocida la señal que genera el péptido codificado por la segunda metionina, que se propone como de destinación a cloroplasto. Aunque esta predicción concuerda con lo reportado por la literatura para otras especies, y como es sabido que las PPOs normalmente son almacenadas en plastidios (Mayer and Harel, 1991; Sommer et al., 1994; Steffens et al., 1994), el péptido señal putativo generado desde la segunda metionina no sería del tamaño descrito en el estado del arte para este tipo de

señal peptídico, y el puntaje que devuelven los análisis bioinformáticos ha demostrado ser muy bajo y con predicciones dudosas.



En este trabajo se describen estudios moleculares dirigidos a dilucidar la real funcionalidad de estos pro-péptidos propuestos, para establecer experimentalmente la destinación subcelular de AcPPO debido a estas secuencias candidatas. Para cumplir esto, se desarrollaron diversas construcciones binarias, en las que se fusionó cada segmento del NTPP con la secuencia C-terminal de la proteína trazadora GFP (proteína fluorescente verde).

4.3 Hipótesis

“El gen Acppo posee secuencias N-terminales que generan una señal peptídica amino-terminal que define la compartimentalización de la proteína en el cloroplasto de la célula.”

4.3.1 Objetivo general

Establecer el rol funcional de las distintas señales encontradas en la región N-terminal de AcPPO, deducidas tras los análisis *in silico* de su ORF.

4.3.2 Objetivos específicos.

- Generar vectores binarios de fusión a GFP, con cada una de las señales identificadas mediante el análisis *in silico*.
- Utilizar estos vectores en experimentos de transformación genética de tabaco, para evaluar la destinación de los péptidos fusionados a GFP.
- Identificar la ubicación intracelular de la proteína recombinante.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material Vegetal

Se utilizaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabaccum*, variedad *Bright Yellow 2*), las cuales crecieron en cámara de cultivo en medio sólido a 25°C y 95% de humedad relativa, en ciclos de luz/oscuridad de 16/8 horas. De estas plantas se infiltraron, por separado, hojas jóvenes (de 4 semanas) con cada una de las construcciones diseñadas de fusión a GFP.

5.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

5.2.1 *Escherichia coli*

Para los diferentes clonamientos se utilizaron cepas comerciales de *E. coli* quimio-competentes (*TOP10*, *Invitrogen*, EE.UU.; *DH5 α Max Efficiency*, *Invitrogen*, EE.UU.; *JM109*, *Promega*, EE.UU.) las cuales fueron transformadas y recuperadas siguiendo los protocolos suministrados por los fabricantes. Como medios de recuperación, de transformación y de crecimiento se utilizaron medio SOC líquido (Hanahan, 1983) y LB (Bertani, 1951) líquido o en placas LB-agar (1,5%), los que se suplementaron con carbenicilina 100 mg/L (Cb100), kanamicina 50 mg/L (Kan50) o Hygromicina B 75 mg/L (Hyg75) según el vector utilizado. Para el análisis de clones recombinantes, se utilizó además isopropil- β -D-tio-galactósido (IPTG, 0,5 mM) + 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosido (Xgal, 80 μ g/placa) como suplemento de placas LB-agar previamente descritas. El crecimiento fue a 37°C para todos los protocolos.

5.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizó *A. tumefaciens* cepa GV3101, el cual se transformó con las construcciones de expresión por electroporación según se describió previamente

(Dower et al., 1988), con algunas modificaciones menores. Las células electrocompetentes obtenidas se electroporaron utilizando un electroporador *Genepulser II System* (Biorad, EE.UU.) y cubetas de 1x1 cm, bajo los siguientes parámetros: 1,25 V; 25 μ F y 400 Ω . Inmediatamente luego del pulso eléctrico, se les agregó 1 mL de medio LB y se dejaron recuperar en agitación por 4 horas a 28°C. Luego se sembraron en placas LB-agar (1,5%) suplementadas con Hygromicina B 75 mg/L, en donde se crecieron en oscuridad a 25°C por tres días.

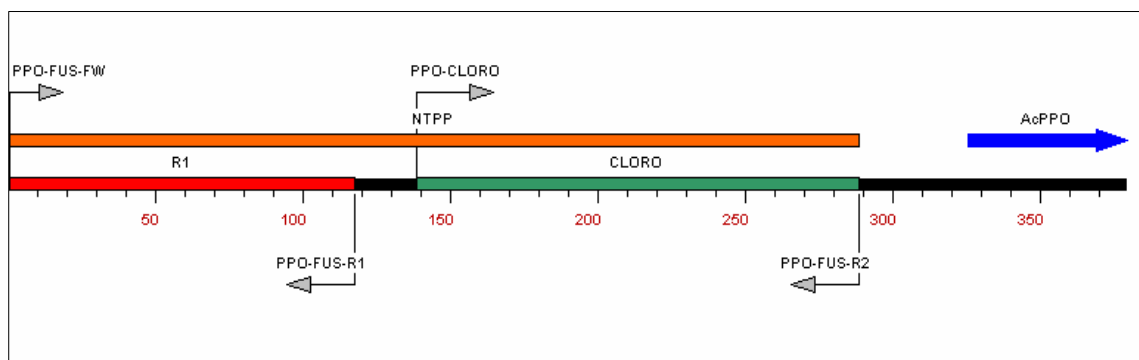


FIGURA 5. Representación esquemática de la ubicación de los partidores de PCR diseñados para el análisis de la región N-terminal de AcPPO.

Las flechas indican el sentido de polimerización y el nombre de cada uno de los partidores diseñados para amplificar específicamente las zonas del segmento N-terminal del gen. R1; fragmento comprendido por las bases 1 a RRR del ORF de Acppo, se obtuvo mediante la utilización de PPO-FUS-FW + PPO-FUS-R1 y amplifica el segmento comprendido entre el primer y segundo residuo metionina, zona en donde se ha predicho una secuencia señal. CLORO, fragmento comprendido por los nucleótidos EEE a TTT de Acppo, se obtuvo mediante la utilización de PPO-CLORO + PPO-FUS-R2 y amplifica la zona desde el segundo residuo metionina en dirección río abajo del ORF, generando una señal reconocida como te destinación a cloroplastos. NTPP, fragmento comprendido por el segmento completo desde la primera metionina en dirección río abajo del ORF, fue el resultado de la amplificación con PPO-FUS-FW + PPO-FUS-R2 y genera el fragmento N-terminal completo, incluyendo con ambas señales predichas computacionalmente.

5.3 Construcción de vectores de fusión a GFP

5.3.1 Clonamiento de secuencias

Para amplificar y clonar los diferentes segmentos de la región N-terminal de AcPPO se diseñaron los siguientes partidores: PPO-FUS-FW (5'-CACCAAATGGGAC GACCAAGGCTA-3'); PPO-FUS-R1 (5'-CAGCACGGATTGGTCTGCAGCAT-3'); PPO-CLORO (5'-CACCTACGCTTCTAATGGATTTGGATGGCT-3'); PPO-FUS-R2 (5'-GAGC GATCTGTGGCAGGTGGTAA-3') (ver tabla partidores). Estos partidores se utilizaron

en parejas según indica la Figura 5 y siguiendo el siguiente protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR): 0,8 μL de MgCl_2 25 mM, 4 μL de *Green GoTaq Reaction Buffer* 5x, 1 μL de *dNTP mix* 10 mM, 1 μL de partidores directo y 1 μL de reverso 10 μM cada uno, 0,12 μL de *GoTaq Flexi DNA Polymerase* 5 U/ μL (Promega, EE.UU.) y se utilizó como templado 50 ng del “*full length cDNA*” de AcPPO (Prieto et al., 2007) contenido en un vector *pGEM-T Easy* (Promega, EE.UU.). La reacción se realizó en un termociclador *Mastercycler* (Eppendorf, Alemania) programado con el siguiente perfil térmico: una desnaturalización inicial de 1 min a 95°C, seguido de 35 ciclos con una desnaturalización de 30 seg a 95°C, un apareamiento de 25 seg a 60°C y una extensión a 72°C por 30 seg. Al finalizar estos ciclos, se realizó una extensión final a 72°C por 7 min. El producto de cada reacción fue visualizado por electroforesis en geles de agarosa al 1% utilizando amortiguador de corrida SB 1x (Brody and Kern, 2004), para luego ser teñido con bromuro de etidio siguiendo protocolos descritos previamente (Sambrook et al., 1989).

Tabla: Partidores Utilizados		
Nombre de partidor	Secuencia (de 5' a 3')	Tm (°C)
PPO-FUS-FW	CACCAAATGGGACGACCAAGGCTA	59,21
PPO-FUS-R1	CAGCACGGATTGGTCTGCAGCAT	60,06
PPO-FUS-R2	GAGCGATCTGTGGCAGGTGGTAA	58,71
PPO-FUS-CLORO	CACCTACGCTTCTAATGGATTTGGATGGCT	60,55
GFP secuenciación	AACTTCAGGGTCAGCTTGCC	53,00
Pr_PalFus_F	CACCATGGCTGGTGTGCACAAAAT	59,00
GFP_R2	TCCATGCCGTGAGTGATCC	61,00
PalFus-F	CACCATGGCTGGTGTGCACAAAATGGTCACCAAGAAATGGATTTTGCATGAAAAGTG	N/A
PalFus-R	CACTTTCATGCAAAAATCCATTTCTGGTGACCATTTTGTGCAACACCAGCCATGGTG	N/A

Las bandas correspondientes al tamaño del fragmento deseado se cortaron y purificaron con *QiaexII Gel Extraction Kit* (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. De cada banda purificada se tomaron 0,5 μL y se ligaron, por separado, toda la noche en *pGEM-T Easy* según instrucciones del fabricante. Posteriormente se utilizaron 6 μL de esta mezcla de ligación, para transformar *E. coli TOP10* (Invitrogen, EE.UU.), siendo el producto de esta transformación sembrado en placas LB-agar, suplementadas con Cb100 y con IPTG+Xgal, para dejar crecer toda la

noche. De cada placa se seleccionaron colonias blancas candidatas (y una colonia azul como control negativo), las que se crecieron toda la noche en 5 mL de medio LB suplementado con Cb100, a 220 rpm.

A cada cultivo bacteriano se le realizó extracción de plásmido mediante *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Alemania), utilizando el protocolo suministrado por el fabricante. La correcta ligación de cada fragmento a su vector se confirmó por análisis de restricción enzimática, agregando 1 μL de *EcoRI* 20 U/ μL (New England Biolabs, EE.UU.) a una mezcla compuesta por 2 μL de plásmido, 3 μL de *EcoRI* NEBuffer 10x (New England Biolabs, EE.UU.) y 24 μL de H_2O . El resultado se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio. Los vectores que mostraron correcta liberación de un inserto de tamaño deseado se secuenciaron automáticamente (Macrogen Inc., Corea).

5.3.2 Construcción del vector de expresión

Utilizando los mismos partidores descritos en el punto 4.1, se volvió a amplificar los fragmentos de la región N-terminal de AcPPO, esta vez utilizando el siguiente protocolo de PCR: 5 μL *Accuprime Pfx Reaction Mix* 10x (Invitrogen, EE.UU.), 1,5 μL de cada partidor (directo y reverso 10 μM cada uno), 0,4 μL *AccuPrime Pfx DNA Polymerase* 2,5 U/ μL (Invitrogen, EE.UU.), como templado se utilizó 1 μL de vector *pGEM-T Easy* con el fragmento correspondiente diluido 1:1000 y 40,6 μL de H_2O . Para la reacción se utilizó el perfil térmico de: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos con una desnaturalización a 95°C por 15 seg, un apareamiento a 60°C por 25 seg y una extensión a 68°C por 30 seg. El resultado de las amplificaciones se visualizó por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y las bandas correspondientes al tamaño esperado, se cortaron y purificaron por *QiaexII Gel Extraction Kit*. Inmediatamente se tomó 1 μL de cada banda recuperada y se ligó direccionalmente al vector *pENTR/D-TOPO* (Invitrogen, EE.UU.), siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. Luego se utilizaron 3 μL de esta ligación para transformar *E. coli TOP10*, mezcla que fue sembrada en placas LB-agar suplementado con Kan50. De cada placa se tomaron algunas colonias para su análisis, se rayaron en

una placa réplica numerada y se cultivaron por 8 horas; en paralelo para cada colonia repicada, se realizó una reacción de PCR directo a colonias ("*colony-PCR*"), tocando las colonias candidatas desde la placa e inoculando un tubo para microcentrífuga de 0,6 μL (Eppendorf, Alemania) con 50 μL de H_2O . Luego estos tubos se calentaron a 95°C por 10 minutos y se centrifugaron, tomándose 2 μL del sobrenadante, el que se utilizó como templado para la reacción de PCR. Para ello, se realizó una mezcla de amplificación utilizando los partidores M13 Directo (-20) (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') y M13 Reverso (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (ver tabla Partidores Utilizados) los cuales flanquean el sitio de múltiple clonamiento y son capaces de amplificar el fragmento insertado. La mezcla de reacción se consistió de: 0,8 μL MgCl_2 25 mM, 4 μL *Green GoTaq Reaction Buffer* 5x, 1 μL *dNTP mix* 10 mM, 1 μL partidores M13 directo y reverso 10 μM cada uno, 0,12 μL *GoTaq Flexi DNA Polymerase* 5 U/ μL y 10,08 μL H_2O . La PCR se realizó en las mismas condiciones descritas previamente, con el siguiente el perfil térmico: desnaturalización inicial de 5 min a 95°C seguido de 40 ciclos con una desnaturalización de 30 seg a 95°C, un apareamiento de 30 seg a 57°C y una extensión a 72°C por 40 seg. Para finalizar se realizó una extensión a 72°C por 7 min. Los resultados se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las colonias que dieron resultado positivo en la PCR, se cultivaron toda la noche con agitación de 220 rpm, en 5 mL de medio LB líquido. Posteriormente se realizó extracción de plasmidio utilizando *QIAprep Spin Miniprep Kit*. Los plasmidios se secuenciaron para verificar la correcta orientación de cada inserto (Macrogen Inc., Corea).

El vector de entrada para cada fragmento, confirmado por secuenciación, se recombinó con el vector de destino pGWB5 (Nakagawa et al., 2007) mediante la siguiente reacción: 150 ng de pENTR/D-PPO; 150 ng de pGWB5; 2 μL de *LR Clonase II enzyme mix* 5x (Invitrogen, EE.UU.); tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) hasta completar un volumen final de 10 μL ; esta mezcla se dejó reaccionar por 16 h a 25°C y luego se detuvo agregando 1 μL de proteinasa K 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e incubando durante 10 min a 37°C. Previo a la recombinación, el vector pGWB5 se linearizó toda la noche, mediante digestión enzimática con 1 μL de *XhoI* 20 U/ μL (*New England Biolabs*,

EE.UU.), 4 μ L de *NEBuffer 2 10x* (*New England Biolabs*, EE.UU.), 0,4 μ L de BSA 100x (*New England Biolabs*, EE.UU.), 4 μ L de pGWB5 y 30,6 μ L de H₂Odd. Una vez terminada la incubación, el vector se purificó mediante el sistema comercial *QiaexII Gel Extraction Kit* y luego se concentró hasta 4 μ L finales. Una vez detenida la reacción de recombinación, se tomaron 5 μ L de ésta para transformar *E. coli* JM109. La mezcla se sembró en placas LB-agar suplementadas con Hyg75. En todas las placas se obtuvieron colonias pequeñas y colonias grandes, siendo estas últimas el fenotipo deseado (según indica el manual incluido con *LR Clonase II enzyme mix* de Invitrogen). De cada placa se tomó una gran cantidad de colonias de fenotipo grande y se pusieron en una placa de réplica numerada para análisis. En paralelo, se tomaron muestras de cada colonia para realizar una reacción de “*colony-PCR*” bajo parámetros idénticos a la reacción anteriormente descrita (al inicio de este mismo punto), con las siguientes excepciones: se utilizaron como partidores directos, aquellos específicos para cada fragmento y como partidador reverso, se diseñó un partidador para la secuencia de GFP de pGWB5, GFP_R2 (5'-TCCATGCCGTGAGTGATCC-3'). Adicionalmente, la etapa de extensión de la reacción de PCR fue de 70 seg. Los resultados de estas amplificaciones se evaluaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las colonias positivas se crecieron toda la noche en 5 mL de medio LB líquido con agitación de 200 rpm, a las que luego se les extrajo el plásmido utilizando el sistema comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit*. Los plasmidios binarios de expresión obtenidos se enviaron a secuenciar de modo de verificar la correcta fusión entre los fragmentos amino terminal y la proteína GFP.

5.3.3 Construcción del control positivo PalFus.

Para la construcción del control positivo se sintetizó una pareja de oligonucleótidos complementarios de DNA con la secuencia de las primeras 60 bases que codifican la proteína fenilalanina amonio-liasas (PAL) de tabaco (*N. tabaccum*). Estos se desnaturaron a 95°C durante 4 min e inmediatamente se pusieron en hielo. Luego se mezclaron en partes iguales y se dejaron 30 min a temperatura ambiente, para inducir apareamiento entre sí y la formación de doble hebra. Se tomaron 10 ng de

la doble hebra formada y se ligaron direccionalmente a pENTR/D, según el protocolo suministrado por el fabricante. Se tomaron 3 µL de la mezcla de ligación y se transformó *E. coli* MAX Efficiency DH5α y luego se sembró la mezcla en placas LB-agar suplementado con Kan50 y se dejó crecer toda la noche. Se escogieron algunas colonias y se cultivaron toda la noche con agitación de 220 rpm en medio LB líquido, luego se les extrajo el plásmido y se envió a secuenciar.

Se realizó la recombinación entre pENTR/D-PalFus y pGWB5 siguiendo los mismos procedimientos indicados en 4.3.2, para la obtención de los vectores de expresión. Para la reacción de PCR sobre colonias se utilizó Pr_PalFus_F (5'-CACCATGGCTGGTGTGCACAAAAT-3') como partidor directo.

5.4 Infiltración por *Agrobacterium tumefaciens* y preparación de las muestras vegetales.

Se utilizaron clones de *A. tumefaciens* GV3101 transformado con cada uno de los vectores binarios de expresión. Para esto, se prepararon cultivos de esta cepa crecidos toda la noche con agitación de 170 rpm y a 28°C con clones que contenían cada una de las construcciones generadas. Estos inóculos se utilizaron para infectar hojas jóvenes de tabaco BY-2 mediante infiltración (Sparkes et al., 2006). Se tomaron muestras de hoja infectada a las 24 y 48 horas, las que se trataron por 2 horas con solución de fijación (formaldehído 5%, ácido acético glacial 5%, etanol 60%); luego de esto se cortaron trozos de preparación de 5 mm x 1 cm, los que se montaron sobre portaobjetos en una mezcla de glicerol al 70% en PBS.

5.5 Microscopía confocal

Las muestras se observaron bajo un microscopio confocal de escaneo láser (LSM510, Carl Zeiss, Alemania). Para obtener imágenes de GFP se utilizó un láser de argón con líneas de excitación de 488 nm. Para obtener imágenes de clorofila se utilizó un láser de helio-neón con líneas de excitación de 543 nm. La fluorescencia se detectó utilizando HFT 488/543 (Carl Zeiss) como el difusor dicróico principal del rayo y NFT

545 (Carl Zeiss) como difusor dicróico secundario del rayo. Se utilizó un filtro de 560 nm para GFP y uno de 505/550 nm para clorofila. Las imágenes obtenidas se analizaron con el *software Zeiss LSM Image Examiner 4.0* (Carl Zeiss).

6 RESULTADOS.

6.1 Construcción de los vectores de expresión.

Se ha descrito previamente el gen *Acppo* como un ORF de 1785 pares de bases (pb), que originarían una proteína de 595 aminoácidos (Prieto et al., 2007). Los análisis *in silico* de este ORF no entregan información clara sobre la funcionalidad de los residuos aminoacídicos que estarían ubicados en el extremo N-terminal de la AcPPO propuesta (NTPP). Esto se ha debido básicamente a la existencia de un putativo segundo codón de inicio (segunda metionina), ubicada 184 pbs río abajo en este mismo ORF, el que no produce cambios de lectura global, pero sí produce la confusión de las distintas herramientas informáticas del estado del arte que permiten predecir la funcionalidad y destino final intracelular de AcPPO. Con el fin de evaluar funcionalmente las señales ubicadas en el NTPP, se ha procedido al análisis de los primeros 205 pb del ORF, mediante su división en dos zonas específicas: la primera zona se ha denominado R1 y comprendió los primeros 117 pbs (desde la primera metionina) y que codificaría para un péptido de 39 aminoácidos (Figura 6.a). El segundo fragmento, denominado CLORO, fue de un largo de 150 pb (50 aminoácidos) y correspondió a la secuencia comprendida desde el nucleótido 139 del ORF e incluyó completamente al péptido que comienza con la segunda metionina (Prieto et al., 2007) (Figura 6.b). Con el fin de poder comparar el rol de cada uno de estos segmentos de NTPP, también se estudió la funcionalidad de la secuencia completa de esta zona de la proteína, cubriendo sus primeros 96 aminoácidos, según predicción del ORF1 (es decir, desde la primera metionina), utilizando los primeros 288 pbs de *Acppo* (NTPP = R1 + CLORO, Figura 6.c). Estas tres “zonas señal”, fueron utilizadas en el desarrollo de construcciones quiméricas, en las que se ubicó en forma contigua a ellas (zona C-terminal) el ORF que codifica para GFP en el marco de lectura apropiado.

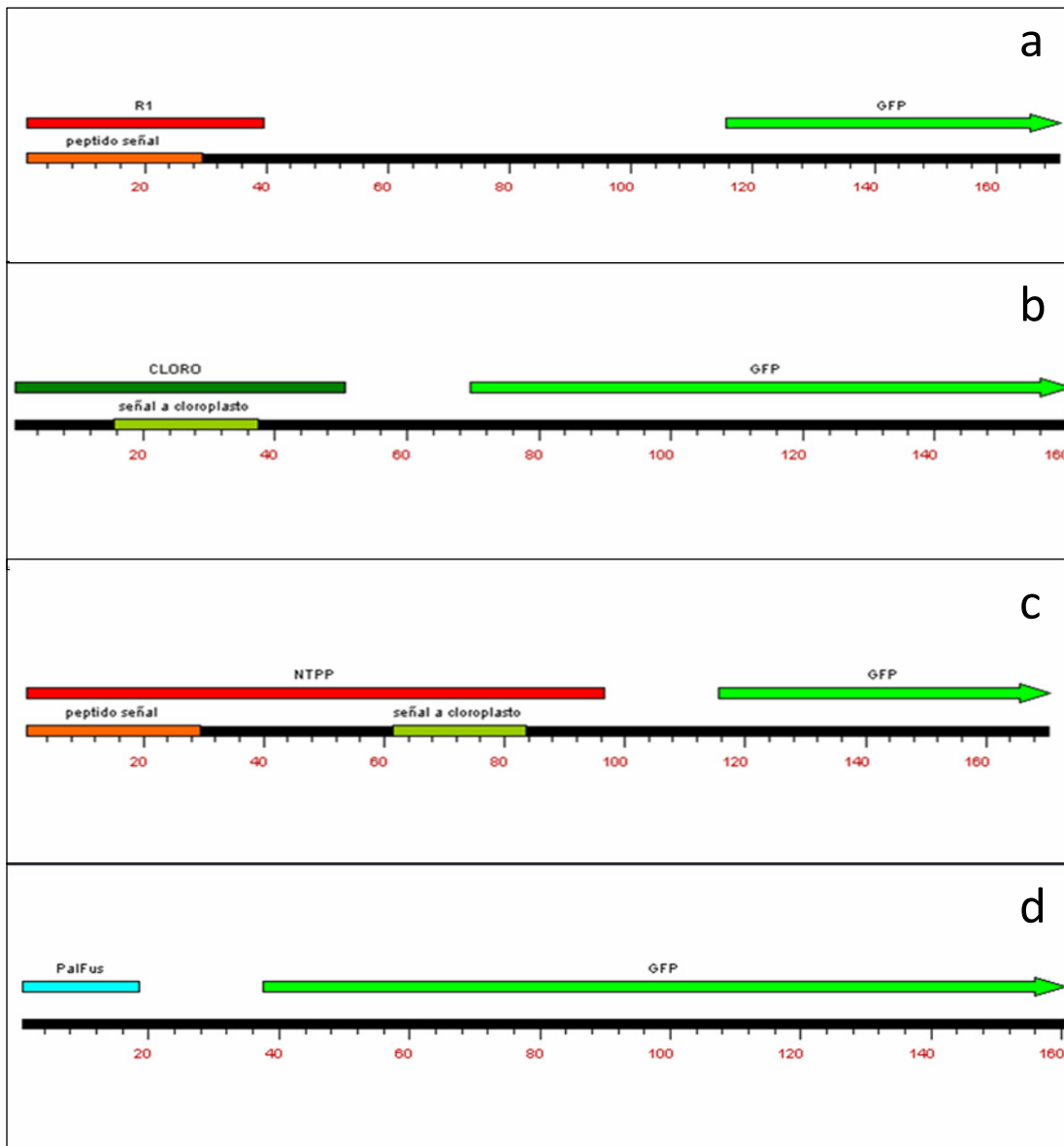
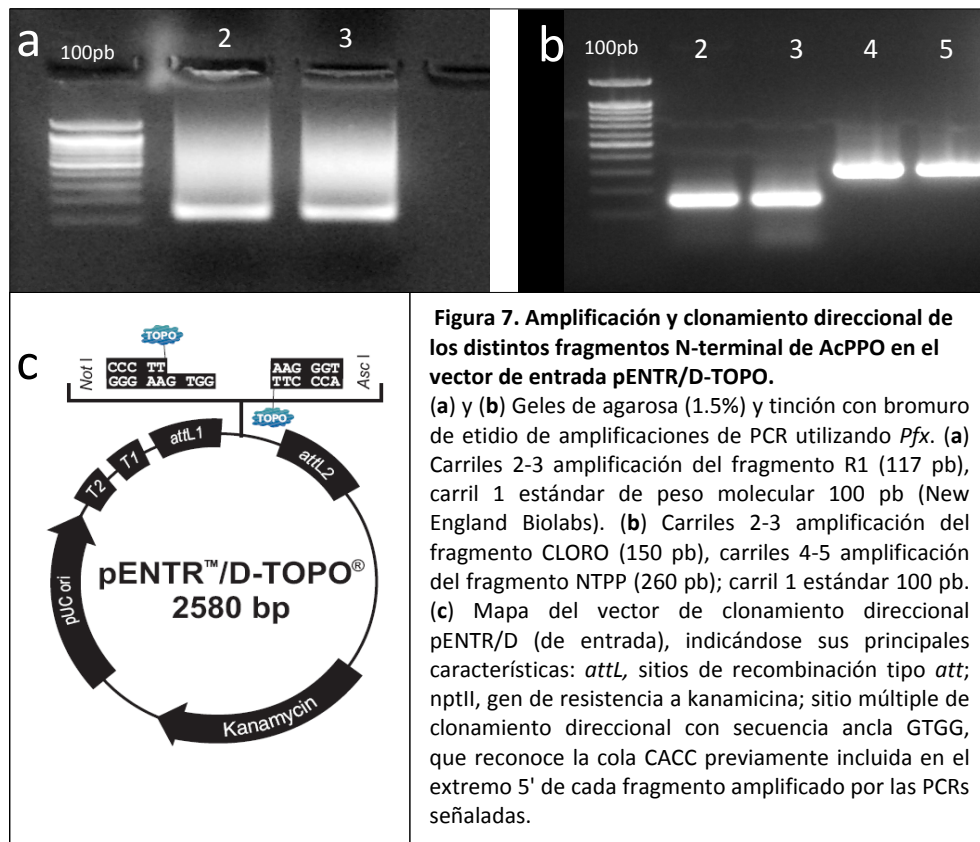


FIGURA 6. Representación esquemática de las construcciones de fusión entre los distintos segmentos N-terminal del gen *Acppo* y el gen de la proteína fluorescente verde (*gfp*).

(a) Esquema de la fusión entre el fragmento R1 (péptido señal deducido entre los dos residuos de metionina detectados en el ORF de *Acppo*) y la proteína GFP. (b) Esquema de la fusión entre el fragmento CLORO (péptido que comienza desde el segundo residuo metionina en dirección río abajo del ORF de *Acppo* y que está predicho como señalización a cloroplasto) la proteína GFP. (c) Esquema de la fusión entre el fragmento NTPP (ambas señales anteriores) y la proteína GFP. (d) Esquema del vector control de expresión de una proteína fusionada a GFP soluble, obtenida por la utilización los primeros 18 aminoácidos (54 pb del gen) fenilalanina amonio liasa (*pal*) de *N. tabaccum* (número de acceso D17467). La escala representa número de residuos aminoácidos.

Para poder diferenciar la destinación celular de las construcciones basadas en las señales candidatas encontradas en *Acppo*, se diseñó como construcción control una secuencia de 90 nucleótidos del gen de la fenilalanina amonioliasa (PAL) de la misma especie. De este modo, se utilizaron los primeros 30 aminoácidos de PAL (número de acceso D17467.1), fusionada también a GFP (vector PalFus::GFP) (Figura 6.d).



Dado que la estrategia de construcción de los vectores de fusión explotó la utilización de clonamiento por recombinación basada en zonas *att* (Bushman et al., 1985), los partidores utilizados para obtener estas regiones debieron incluir la secuencia CACC en el extremo 5' del partidor directo. Este gancho nucleotídico otorgó direccionalidad al fragmento amplificado en el momento de ser insertado hacia el vector de entrada pENTR/D. La Figuras 7.a y 7.b muestran los resultados de las

amplificaciones generadas utilizando estos partidores, y cDNAs de *A. cherimola* como templado en las reacciones de PCR, para los distintos segmentos descritos de la zona 5' de *Acppo*. Éstos se clonaron direccionalmente al vector de entrada mencionado (Figura 7.c), se purificaron y se secuenciaron de manera de confirmar el correcto ensamblaje como vectores dadores de las distintas zonas 5' de *Acppo* constituyentes del NTPP.

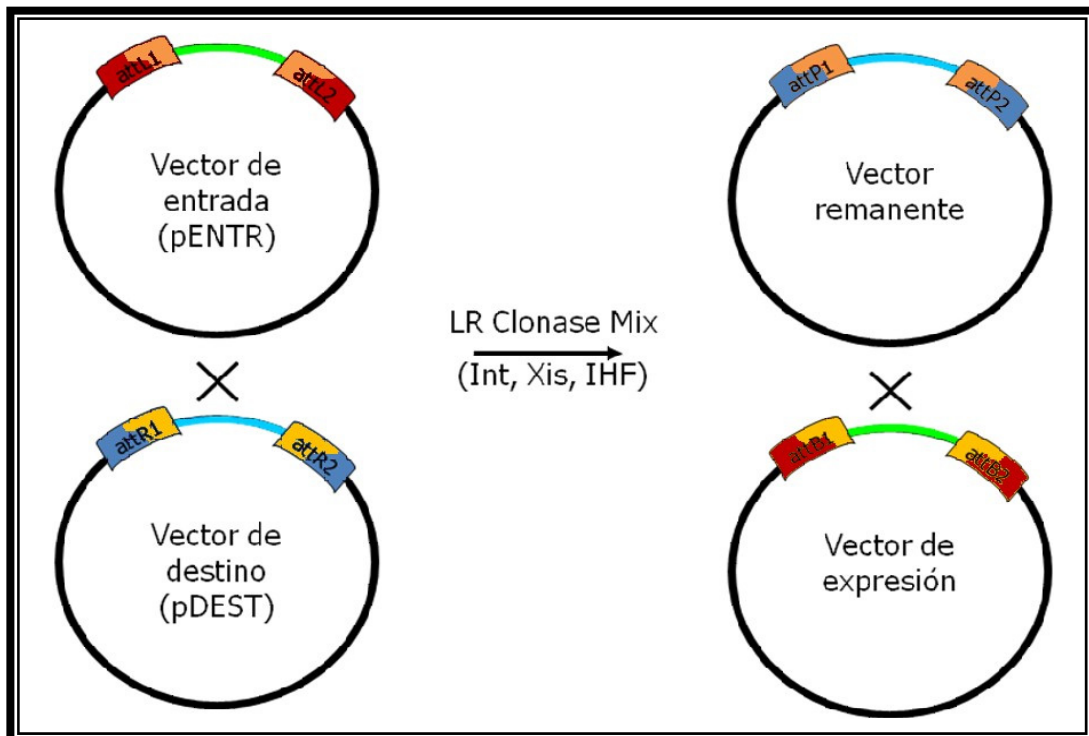


FIGURA 8. Esquema de recombinación basada en el reconocimiento de zonas *attachment* (*att*, L y R) de fago lambda.

Se indica la recombinación entre zonas flanqueadas por secuencias *att* ubicadas en un vector de entrada (pENTR/D) y un vector de destino (pGWB5) y el resultado de esta reacción biológica, generándose un vector remanente y un vector de expresión. La reacción de recombinación ocurre específicamente entre attR1 y attL1 (así mismo R2 con L2), las que al recombinar, generan como productos dos nuevos sitios (*attB* y *attP*), compuestos por la mitad de cada región de recombinación (representado por los colores). Esta reacción es mediada por las enzimas propias del fago λ (integrasa (INT), excionasa (XIS) y el factor de integración al huésped (IHF), éstas se comercializan como *LR Clonase MIX* (Invitrogen).

La estrategia de ensamblaje de los vectores binarios, que permitirían la expresión en plantas de los genes fusionados, se realizó por recombinación de secuencias *att* L-R entre pENTR/D y pGWB5 (Bushman et al., 1985; Hartley et al., 2000). En el caso de

nuestro vector de entrada (pENTR/D), este posee sitios “attL” flanqueando su sitio de múltiple clonamiento (attL1 y attL2). Estos sitios reconocen y se alinean específicamente con los sitios “attR” del vector de destino (pGWB5), intercambiando conservativamente el material flanqueado por ellos (Figura 8). Las mezclas de recombinación descritas arriba se utilizaron para transformar *E. coli* cepa DH5 α , el análisis de posibles clones positivos se realizó en primera instancia por *colony-PCR* utilizando un partidador directo específico para el fragmento insertado y un partidador reverso específico para el extremo 3’ del gen que codifica a GFP (Figuras 9.a, 9.b y 9.c). En una instancia confirmatoria, se analizaron los posibles clones positivos primero por restricción enzimática, utilizando para ello una doble digestión con las enzimas *Xba*I y *Not*I que cortan el inserto en sus extremos, liberándolo; por último, se recurrió a la secuenciación de los mejores clones candidatos. La secuencia de cada una de las construcciones obtenidas se muestra en la Figura 10, indicándose todos los componentes importantes de los vector binarios resultantes con cada fusión NTPP::GFP.

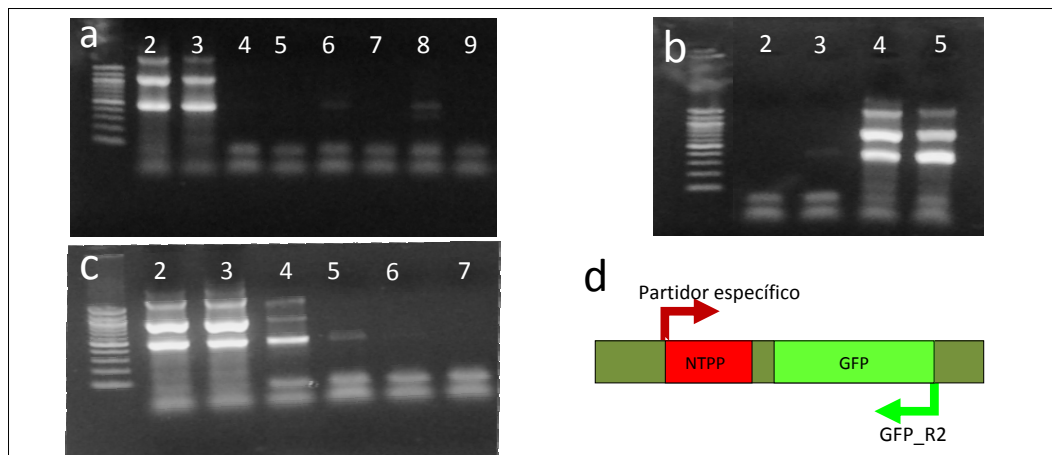


FIGURA 9. Escrutinio para los posibles clones recombinantes transformados con un vector correcto de expresión.

Para detectar los clones de expresión positivos de cada segmento N-terminal de AcPPO, se realizó amplificación directa desde colonias recombinantes de las zonas de fusión fragmento-gfp. Para esto se utilizó el partidador directo específico del segmento y GFP_R2. (a) Amplificación de NTPP-gfp, carriles 2-3 clones positivos (1000 pb), los carriles 4-9 muestran amplificaciones de colonias negativas, carril 1 estándar 100 pb. (b) Amplificación de R1-gfp, en carriles 4-5 (banda de 750pb), carril 1 estándar 100pb. (c) amplificación de CLORO, carriles 2-4 clones positivos (banda de 800 pb), carril 1 estándar 100 pb. (d) esquema representativo de la secuencia amplificada y los partidores utilizados.

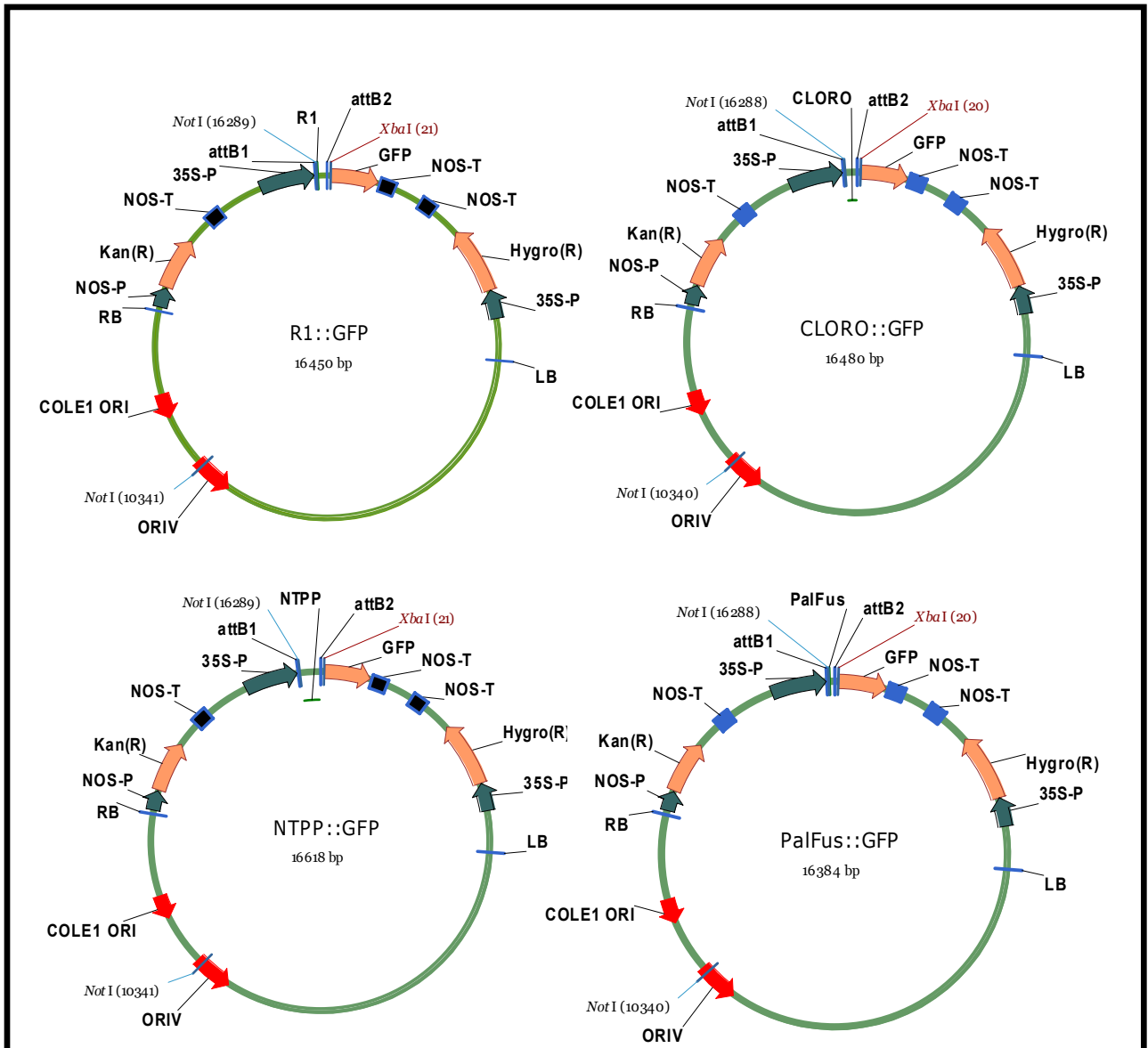


FIGURA 10. Mapa de los vectores de expresión construidos.

Cada fragmento se encuentra flanqueado por los sitios *att*, fusionado a *gfp* en su extremo 3', con su respectivo promotor (en este caso el promotor de la subunidad 35S del Virus del mosaico de la coliflor, CaMV 35S) y con su respectivo terminador (en este caso la región terminadora del gen de nopalina sintetas, NOS-T). Se incluyen en estas construcciones dos genes de resistencia a antibióticos (neomicina fosfotransferasa (*nptII*), para resistencia a kanamicina, Kan(R) e hygromicina B fosfotransferasa, que confiere a hygromicina, Hygro(R)), los cuales son trasplantados a la planta con el DNA de transferencia (T-DNA) vía *Agrobacterium tumefaciens*. ORIV, origen de replicación vegetativa; COLE1, origen de replicación del plasmidio colicina E1 de *E. coli*; LB, borde izquierdo T-DNA; RB, borde derecho T-DNA.

6.2 Expresión transitoria de los péptidos de fusión en tabaco.

Una vez confirmada la correcta fusión a GFP de las construcciones de expresión, éstas se utilizaron para transformar *A. tumefaciens* GV3101 mediante electroporación. Los clones recombinantes para cada una de las construcciones se utilizaron para infectar hojas jóvenes de tabaco BY-2 mediante infiltración *in planta*. Tras 24 horas de infección, se separaron las hojas de las plantas y se fijaron, para luego evaluar la expresión de cada proteína de fusión por la emisión de fluorescencia verde, detectada mediante microscopía confocal.

Al analizar la emisión de fluorescencia del constructo PalFus::GFP, se observó una emisión de la fluorescencia por GFP en toda la célula, sin observarse compartimentalización o acumulación discreta de puntos de emisión verde. Este vector permitió marcar claramente el contorno celular (Figura 11).

Cuando se infiltró con el vector NTPP::GFP, se pudo observar la generación de puntos discretos de emisión de fluorescencia verde, siendo éste un patrón de expresión puntual y compartimentalizado, el que además estuvo co-localizado completamente con la emisión roja correspondiente a clorofila (cloroplastos) (Figura 12.a-c). Al expresar CLORO::GFP se apreció nuevamente la fluorescencia puntual y co-localizada con la emisión de clorofila (Figura 12.d-f), tal como se había obtenido previamente con NTPP::GFP. Finalmente, cuando se observaron hojas infiltradas con R1::GFP, en todos los experimentos se observó una fluorescencia débil, sin localización subcelular clara y posiblemente co-localizada con la emisión de clorofila. Adicionalmente, la emisión obtenida con esta última construcción no fue de forma particulada ni compartimentalizada, como en los casos de las otras construcciones (Figura 12.g-i). También, en forma adicional a esta emisión difusa fluorescente verde, se observaron zonas que denotarían la formación de inclusiones de fluorescencia.

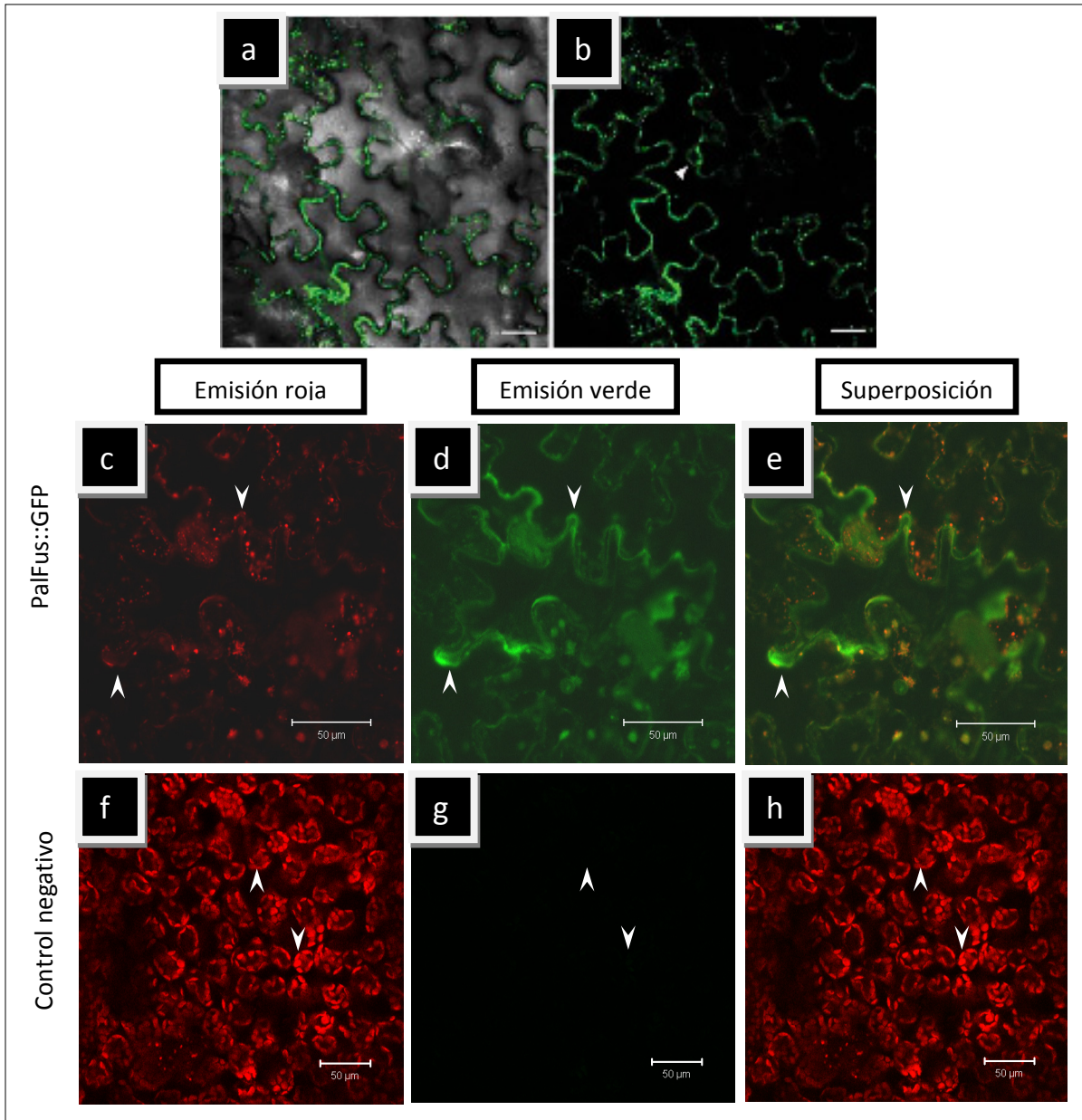


FIGURA 11. Sistema control para la expresión transitoria de GFP en tabaco.

En (a-b) se han insertado imágenes del trabajo realizado por Sparkes et al. (2006), en donde se ilustra la distribución intracelular de una construcción que expresa GFP en forma citoplasmática y se indica, además, el contorno de una célula epidermal de tabaco. De forma similar, la construcción de fusión PalFus::GFP desarrollada en este trabajo es mostrada en (c-d). (c) Campo de emisión roja, que corresponde a emisión de clorofila. (d) Campo de emisión verde para GFP. (e) Corresponde a la mezcla de ambos campos de emisión donde se puede apreciar, al igual que en las imágenes previas, el contorno de una célula epidermal de tabaco delineada por GFP según indicó Sparkes et al. (2006) esto está señalado por las flechas blancas. (f-h) Imágenes de la emisión de una hoja no infectada (control negativo, en el mismo orden: emisión roja, emisión verde y mezcla de canales), las flechas blancas indican lugares de concentración de clorofila, es decir cloroplastos. La barra indica 25μm para (a-b) y 50 μm para (c-h).

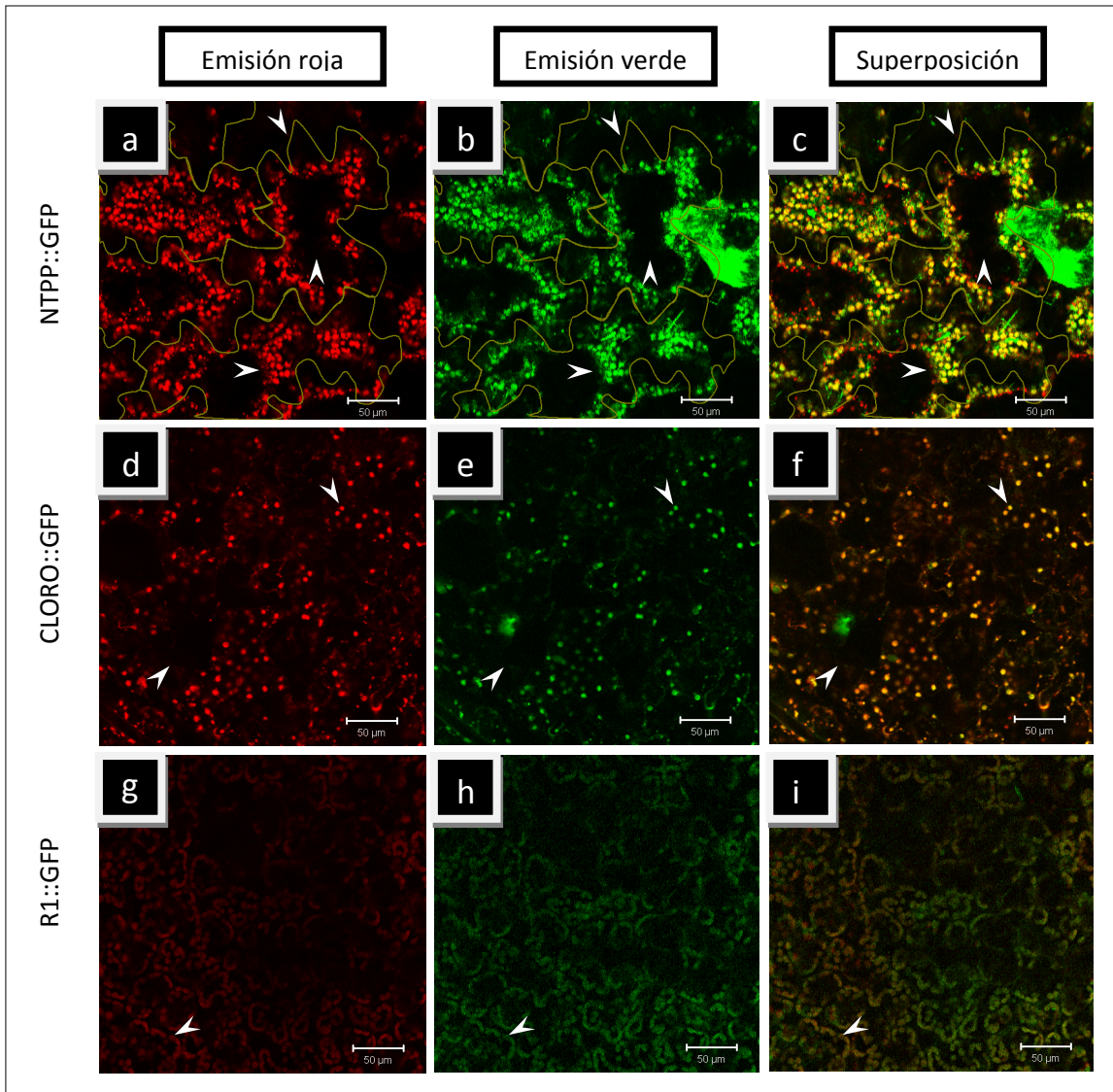


FIGURA 12. Análisis de fluorescencia para los distintos constructos de la zona N-terminal de AcPPO fusionados al ORF de GFP.

(a-c) Fragmento NTPP expresado en fusión con GFP mostrando una compartimentalización discreta o puntual de la fluorescencia y su co-localización con la emisión de clorofila. (d-f) Fragmento CLORO es expresado en fusión con GFP mostrando una compartimentalización y co-localización similar a la vista en (a-c) aunque con una menor intensidad comparativa (g-i) Fragmento R1 expresado en fusión con GFP mostrando una co-localización con la emisión roja de clorofila indicando una posible destinación a cloroplasto aunque con una baja intensidad lumínica. En estas imágenes se han dibujado los contornos celulares a modo de guía. Las flechas blancas indican lugares de alta emisión de clorofila, es decir cloroplastos. En (a-f) se indica también la posición de una vacuola (visualizada como una mancha negra).

7 DISCUSIÓN

El desarrollo de las herramientas bioinformáticas ha generado un gran avance en el entendimiento del funcionamiento de los genomas de las especies. Gracias al apoyo de complejas iteraciones y modelos, la información de los distintos programas de genómica funcional y de secuenciación de genomas, ha podido ser ordenada y sistematizada, de manera de poder presentarla en el contexto de su real rol para cada una de las especies. Sin embargo, en la actualidad estos grandes avances son limitados a especies modelo como *A. thaliana*, tabaco y tomate.

En el clonamiento y entendimiento del gen *Acppo*, el análisis lineal de las secuencias obtenidas predijo un ORF cuya proteína deducida pudo ser resuelta en base a homologías aminoacídicas y funcionales, con otras PPO descritas previamente en otras especies. Sin embargo, la gran divergencia a nivel nucleotídico generó una variabilidad aminoacídica extremadamente alta en la zona amino terminal de la proteína, lo que hizo imposible proponer la destinación y compartimentalización de PPO en chirimoya.

De la misma forma, la existencia de dos codones de inicio, ambos en el mismo marco de lectura, hicieron aún más complejo el análisis funcional de esta zona, dado que ningún programa o modelamiento disponible actualmente, fue capaz de reconocer exactamente la función de la zona N-terminal en esta PPO.

Así, la única alternativa para discernir correctamente el rol de esta zona hipervariable en PPOs fue el análisis funcional, lo que se abordó dividiendo el putativo péptido señal en las zonas que comprenden a ambas metioninas. De esta forma, se logró desarrollar exitosamente construcciones quiméricas adecuadas para su clonamiento en fase, precediendo el ORF para un gen reportero de gran utilidad como es GFP. Para la generación de estas construcciones se utilizaron sistemas de última generación para el clonamiento de ácidos nucleicos: la recombinación sitio específica

explotando secuencias *att*. Pese a la exactitud de los clonamientos resultantes utilizando este mecanismo, uno de los primeros problemas a resolver fue generar las mejores condiciones para la recombinación LR. Se ha descrito que para ésta clase de reacciones la topología de los vectores es uno de los factores fundamentales (Nakagawa et al., 2007), por lo que fue necesario realizar recombinaciones utilizando el vector de destino en forma linearizada (pGWB5). Esto se realizó en un punto entre los sitios *attR* y no fuera de éstos, permitiendo así que el vector de expresión resultante no pierda funcionalidad (Figura 13.a).

El vector de destino, por su parte, posee sus propios marcadores de selección, siendo el más importante el gen *ccdB*, el cual codifica una proteína que interfiere con la ADN girasa de *E. coli*, dificultando el crecimiento de la mayoría de las cepas de esta bacteria (por ejemplo DH5 α) (Bernard and Couturier, 1992); este gen se encuentra flanqueado por los sitios *attR*, lo que hace que se intercambie con el fragmento de interés al momento de recombinar (Figura 13.b).

Aún cuando el sistema parece ser muy eficiente, en la práctica no ha demostrado serlo, ya que para obtener un vector de expresión positivo se deben analizar un número considerable de colonias bacterianas (en nuestra experiencia al menos 50). Otro factor importante en el desarrollo de las construcciones fue el observar que la comprobación de la identidad de estos por digestión enzimática de restricción, genera resultados de difícil análisis y gran parte de las veces, muy sucias y poco claras. Pese a estos grandes desafíos técnicos, la metodología diseñada permitió generar todas las construcciones necesarias para poder analizar de forma más profunda, el real rol de la zona N-terminal de AcPPO.

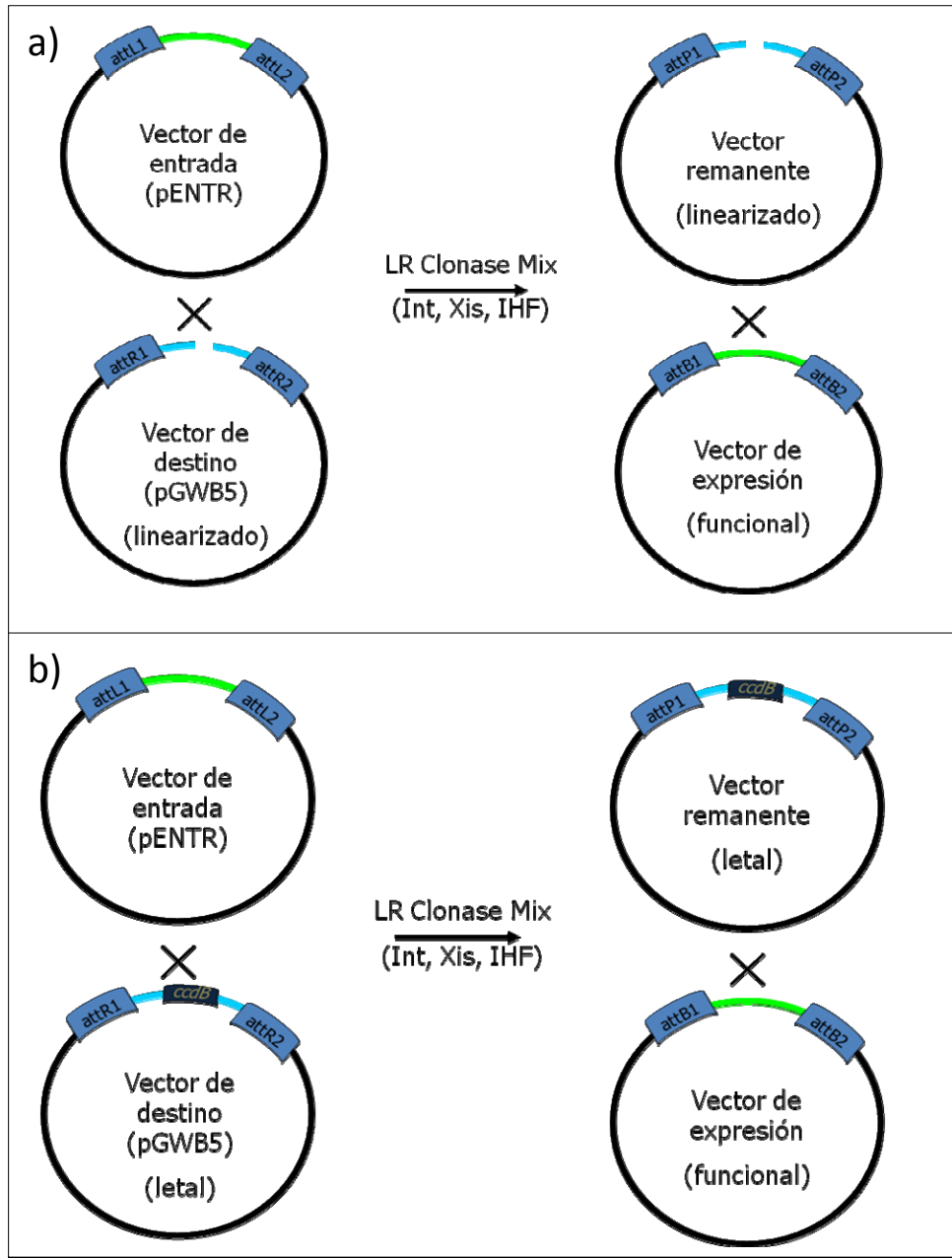
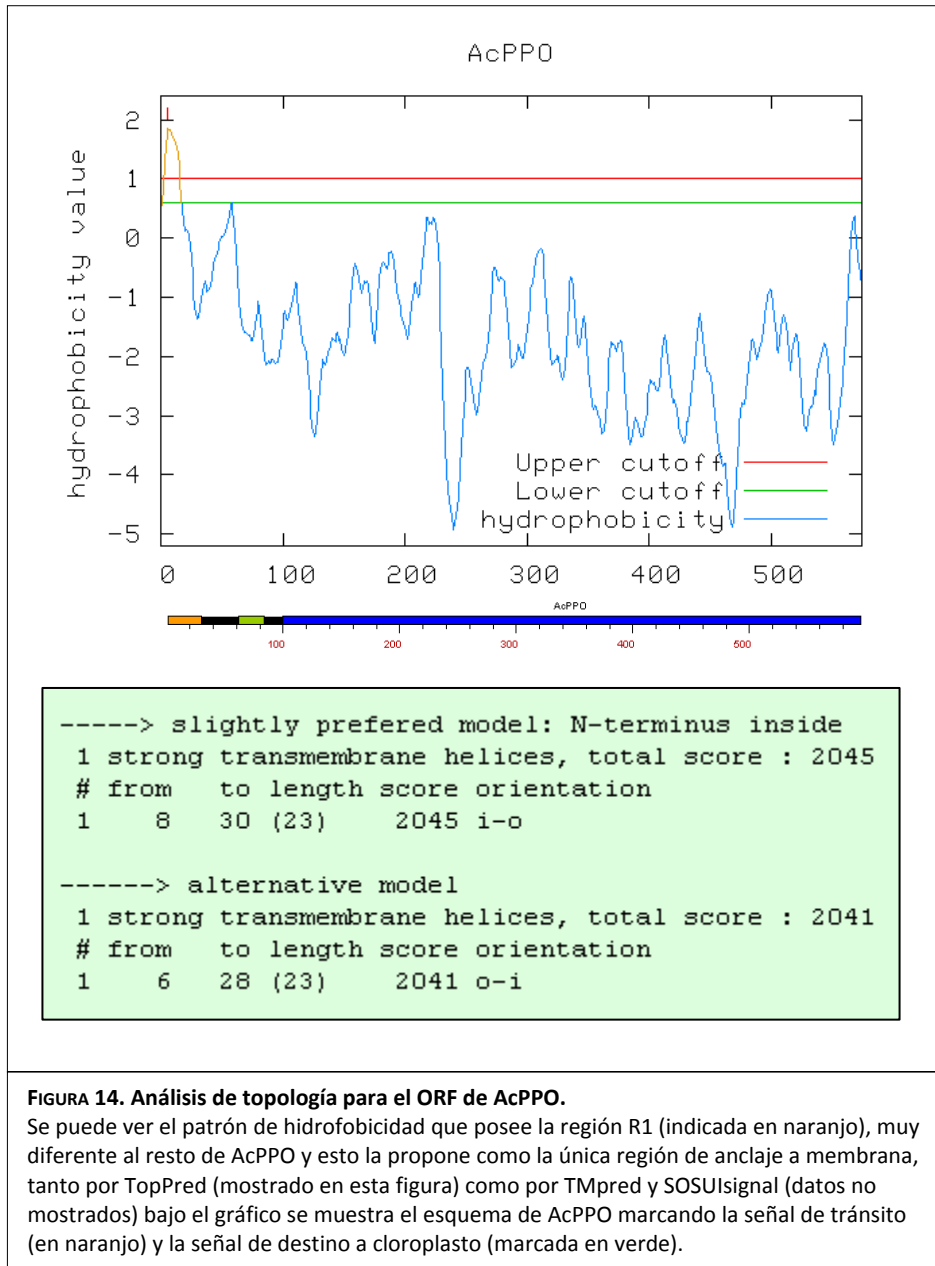


FIGURA 13. Procedimientos que aumentarían la eficiencia del método de recombinación basado en secuencias de *attachment* LR de fago *lambda*.

(a) linealización del vector de destino y/o el de entrada. El vector de destino al estar linealizado pierde su funcionalidad y sólo la recupera al recombinar correctamente con el vector de entrada. (b) El vector de destino debe recombinar correctamente para poder perder el gen letal *ccdB* (Bernard and Couturier, 1992). En ambos casos el vector remanente queda inoperante fisiológicamente.

La metodología ha permitido demostrar claramente que la destinación subcelular de AcPPO es el cloroplasto, lo que finalmente estaría en concordancia con el estado del arte para otras PPOs en otras especies, pero que no pudo ser definido anteriormente por vías bioinformáticas. Está ampliamente descrito y aceptado que la localización en cloroplastos es la preferente de almacenamiento para una gran cantidad de PPOs (Mayer and Harel, 1991; Sommer et al., 1994; Steffens et al., 1994). También se ha demostrado que la secuencia mínima necesaria para señalar esta destinación es la definida por el pro-péptido que comienza con la segunda metionina en el marco de lectura de la proteína predicha (fragmento CLORO), confirmando con esto la validez de las predicciones bioinformáticas realizadas para éste (al hacer análisis solo con CLORO). Asimismo, hemos demostrado que para la orientación a plastidios no es necesario el péptido formado a partir de la primera metionina en el marco de lectura con la proteína predicha (R1, Figura 6.a). Sin embargo, no hemos podido descartar la posible utilidad de este pro-péptido, ya que al analizar éste bioinformáticamente tanto por iPSORT y TargetP, es reconocido como un péptido señal putativo. Esto sí concordaría con reportes previos que demuestran la existencia de señales de destino compuestas para algunas PPOs, las cuales deben sufrir doble procesamiento para ingresar a su destino en el cloroplasto (Sommer et al., 1994; Joy et al., 1995; Chevalier et al., 1999). En el caso de esta investigación, al analizar las predicciones de topología para los tres pro-péptidos (dominios transmembrana e hidrofobicidad) mediante TMpred (Hofmann and Stoffel, 1993), TopPred (Claros and von Heijne, 1994) y SOSUisignal (Gomi et al., 2004) se encontró que la única región con un posible dominio transmembrana es el fragmento dado por la primera metionina (R1, Figura 14).



Con estos datos, se puede dar una posible función fisiológica de anclaje a la membrana para el pro-péptido R1. En el caso de AcPPO la propuesta es que R1 es la región de anclaje a la membrana interna del cloroplasto dejando la pre-proteína en el estroma (o lumen tilacoidal). Cuando ocurre su activación, se corta la región N-terminal y la proteína madura es exportada al citoplasma (Figura 15). Esta propuesta se basa

en el conocimiento de que la mayoría de las PPOs descritas están normalmente compartimentalizadas en forma de pre-proteína, que es inactiva hasta ser procesada. Cuando esto sucede, se desencadena una maduración del péptido, mediante un corte proteolítico de su extremo (N- o C- terminal, según sea el caso) y la proteína madura (y activa) se libera al citoplasma para entrar en contacto con el sustrato (Chevalier et al., 1999; Yoruk and Marshall, 2003; Jukanti, 2006).

Un aspecto importante a considerar en esta discusión, es que la gran mayoría de los programas “predictores” de destinación sub-celular, se apoyan en bases de datos generadas experimentalmente, donde la mayor parte de los ejemplos y datos específicos (señales reconocidas), se han determinado en especies modelo. A su vez, el hecho de haber determinado experimentalmente estas secuencias aminoacídicas como de destinación subcelular, representa un aporte *per se* a estas mismas bases de datos.

Un gran problema al llevar este trabajo ha sido el poder analizar los resultados de fluorescencia obtenidos con la construcción R1::GFP. Esta construcción normalmente generó una fluorescencia considerablemente menor que aquellas obtenidas con las otras construcciones. Adicionalmente, se observó repetidamente una emisión fuerte de fluorescencia en zonas que nosotros hemos identificado como agregados moleculares, los cuales fueron descartados inicialmente como errores de método. Sin embargo, la reproducibilidad de estos resultados y un análisis más detenido de la literatura, nos ha hecho pensar que, según se ha descrito en otras fusiones que utilizan GFP, estos agregados resultan tóxicos para la célula donde ésta se expresa. Recientemente se ha identificado un péptido C-terminal de 16 residuos que al ser fusionados a GFP, éste induce un mal plegamiento de la proteína reportera, formando agregados e induciendo toxicidad celular (Link et al., 2006). La formación de agregados en varias de nuestras evaluaciones microscópicas y la baja emisión de fluorescencia no solamente verde, sino también en la ventana de la clorofila, podría indicar que de forma similar a lo previamente descrito, R1::GFP puede inducir algún proceso de muerte celular. De forma similar, se han descrito señales peptídicas de ubiquitinación y destinación a proteasoma en este tipo de péptidos (Gilon et al., 1998). Aún cuando estos resultados

fueron obtenidos en mamíferos, no podemos descartar mecanismos similares en las plantas. De este modo, el siguiente paso a realizar sería una cinética de fluorescencia para R1::GFP y poder detectar el momento de mayor fluorescencia y menos toxicidad (si es que efectivamente este fuese el caso). Adicionalmente, se deberá realizar ensayos de la cinética de la liberación de AcPPO al citoplasma frente al daño mecánico (como un corte), utilizando las diferentes construcciones fluorescentes para así poder validar el modelo presentado en este trabajo.

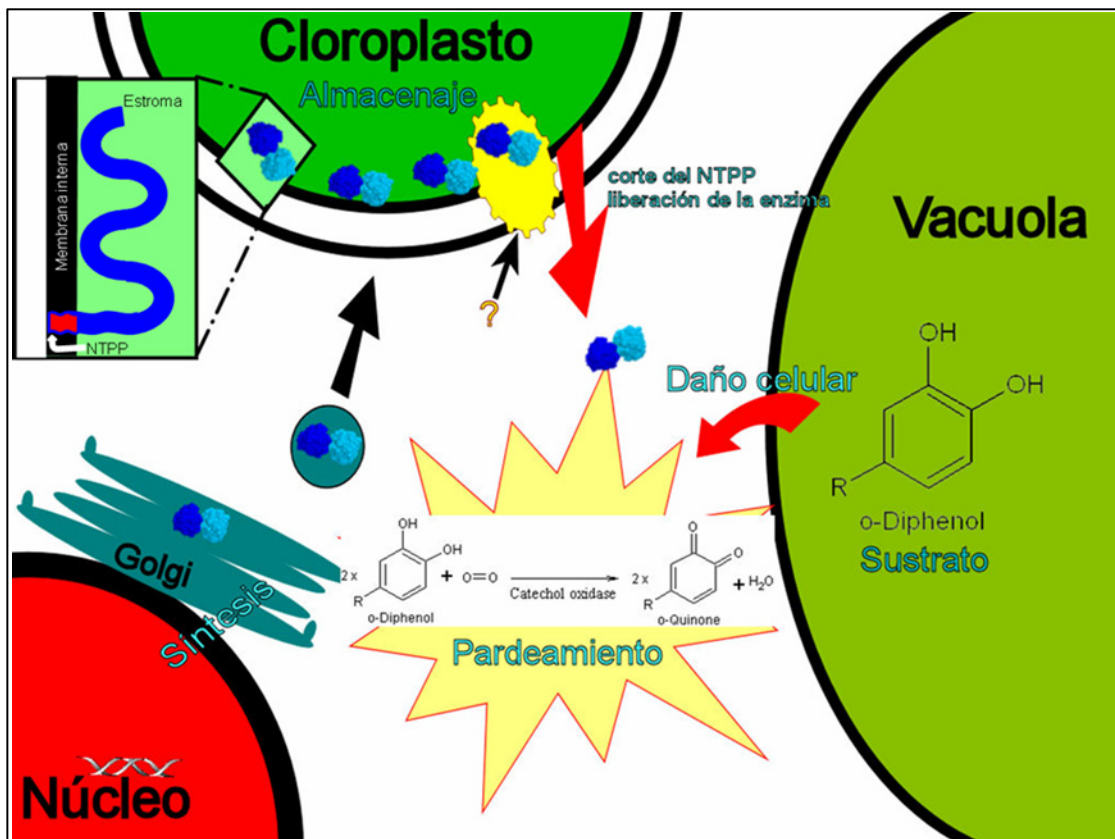


Figura 15. Modelo propuesto para el pardeamiento enzimático causado por daño mecánico en chirimoya. La pre-PPO se sintetiza en el núcleo y es exportada vía Golgi al cloroplasto, donde quedaría en el estroma anclada a la membrana interna, o en el lumen tilacoidal anclada a la membrana tilacoidal. Al producirse el estrés por daño mecánico (como sería el caso del daño por corte fresco), la pre-proteína sufriría el corte proteolítico de su NTPP y sería liberada, ya en su forma activa y madura, al citoplasma (sistema de transporte aún desconocido (signo de pregunta de la figura)), donde se encontraría con sus sustratos, los que pueden haber sido liberados de la vacuola frente al mismo estrés y como parte de la misma respuesta, todo esto generando el pardeamiento de los tejidos del fruto.

8 CONSIDERACIONES FINALES

El fenómeno del pardeamiento oxidativo, aún cuando es sabido que a nivel fisiológico es una respuesta de defensa de la planta frente a ataques, es una situación totalmente indeseada a nivel agroindustrial y sobretodo para los exportadores frutícolas. En la actualidad existe un gran número de grupos investigando las causas y efectos de la oxidación de flavonoides, sin embargo la mayoría presenta estudios sobre plantas modelo (tabaco, Arabidopsis, tomate, etc). El entender tanto molecular como fisiológicamente los fenómenos involucrados en el pardeamiento oxidativo es fundamental para poder desarrollar a futuro las herramientas biotecnológicas que nos lleven a controlar de manera exitosa estas rutas metabólicas y con esto poder posicionar en el mercado internacional productos de calidad competitiva. Aún así un punto importante para esto es trabajar con modelos vegetales comercialmente competitivos, como es el caso de frutos exóticos (chirimoya, mango, maracuyá, banana, etc.) y así no sólo obtener el conocimiento, si no que también un producto interesante de comercializar. En el trabajo aquí presentado se ha logrado dar un paso más en el conocimiento de los eventos moleculares y fisiológicos del fenómeno de pardeamiento oxidativo sufrido por la chirimoya frente a daño (como por ejemplo un corte). Este conocimiento engloba un importante fin comercial como es lograr, a futuro, un PMP de chirimoya (o chirimoya “*fresh cut*”) de buena calidad y así poder satisfacer las necesidades del exigente mercado frutícola actual.

9 CONCLUSIONES

1. Se construyó exitosamente, mediante herramientas moleculares, un vector binario en correcta fusión c-terminal con el marco de lectura de la proteína fluorescente verde para cada una de las señales identificadas mediante análisis bioinformático.
2. Se logró establecer un sistema de expresión transitoria para cada una de las construcciones de fusión generadas en el objetivo 1, mediante infección con *A tumefaciens* en *N. tabaccum*.
3. El péptido propuesto como secuencia N-terminal de AcPPO (R1 + CLORO) dirigió a GFP hacia cloroplastos, lo que indica que su rol sería efectivamente destinar AcPPO hacia estos organelos en chirimoya, lo que estaría de acuerdo a lo ya descrito para esta enzima en otras especies.
4. La señal CLORO, que parte desde la segunda metionina, fue *per se* suficiente para expresar fluorescencia verde en patrones discretos que co-emitieron con clorofila. Esto significaría que este péptido es suficiente para dirigir AcPPO hacia cloroplastos.
5. La señal comprendida por los residuos aminoacídicos entre las dos metioninas (R1), no presentó un patrón discreto de localización de fluorescencia verde cuando se comparó con CLORO, pero sí se observó una co-localización con la emisión de la clorofila. Esto podría indicar una señalización hacia cloroplastos, pero con un patrón distinto al que generaría CLORO, siendo este patrón menos definido o particulado.
6. La baja en la emisión de la clorofila y de GFP en los experimentos realizados con R1::GFP, podrían indicar que esta construcción pudo afectar la viabilidad celular.
7. Asumiendo un rol efectivo de PPO en el pardeamiento de chirimoya, un posible mecanismo de esto sería que la enzima efectivamente se encuentra separada de sus sustratos en condiciones normales, por encontrarse en distintos compartimientos celulares. Esta condición sería rota al

producirse daño mecánico (por ejemplo ante “fresh cut”), haciendo que PPO pueda interactuar con sus sustratos para producir el pardeamiento.

Bibliografía Citada

- Abufom, J.C.** (1985). Efectos de aditivos, mondados y tiempo de almacenaje en la calidad de pulpa y rodajas congeladas de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) cv. Concha Lisa y Bronceada. In Facultad de Agronomía. (Valparaíso: Universidad Católica de Valparaíso.), pp. 117.
- Alique, R.** (1995). Residual effects of short-term treatments with high-CO₂ on the ripening of chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) fruit. *Journal of Horticultural Science*. **70**, 609-615.
- Alique, R., and Oliveira, G.S.** (1994). Changes in sugar and organic acids in chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) fruit under controlled-atmosphere storage. *Journal of agricultural and food chemistry* **42**, 799-803.
- Alique, R., Zamorano, J.P., Calvo, M.L., Merodio, C., and De la Plaza, J.L.** (1994). Tolerance of chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) to cold storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **119**, 524-528.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* **25**, 3389-3402.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K., and Miyano, S.** (2002). Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics (Oxford, England)* **18**, 298-305.
- Bernard, P., and Couturier, M.** (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of molecular biology* **226**, 735-745.
- Bertani, G.** (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **62**, 293-300.
- Brecht, J.K.** (1995). Physiology of lightly processed fruits and vegetables. *HortScience* **30**, 18-22.
- Brody, J.R., and Kern, S.E.** (2004). Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *BioTechniques* **36**, 214-216.
- Brown, B.I., Wong, L.S., George, A.P., and Nissen, R.J.** (1988). Comparative studies on the postharvest physiology of fruit from different species of *Annona* (custard apple). *Journal of Horticultural Science*. **63**, 521-528.
- Buchanan-Wollaston, V., and Morris, K.** (2000). Senescence and cell death in *Brassica napus* and *Arabidopsis*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **52**, 163-174.
- Bushman, W., Thompson, J.F., Vargas, L., and Landy, A.** (1985). Control of directionality in lambda site specific recombination. *Science (New York, N.Y)* **230**, 906-911.
- Claros, M.G., and von Heijne, G.** (1994). TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput Appl Biosci* **10**, 685-686.
- Constabel, C.P., Yip, L., Patton, J.J., and Christopher, M.E.** (2000). Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant physiology* **124**, 285-295.

- Cuff, M.E., Miller, K.I., van Holde, K.E., and Hendrickson, W.A.** (1998). Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin. *Journal of molecular biology* **278**, 855-870.
- Chevalier, T., de Rigal, D., Mbeguie, A.M.D., Gaillard, F., Richard-Forget, F., and Fils-Lycaon, B.R.** (1999). Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant physiology* **119**, 1261-1270.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W.** (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic acids research* **16**, 6127-6145.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G.** (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of molecular biology* **300**, 1005-1016.
- Garcia-Borrón, J.C., and Solano, F.** (2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* **15**, 162-173.
- Gardiazábal, F.I., and Rosenberg, M.** (1993). El cultivo del chirimoyo. (Universidad Católica de Valparaíso Fac. de Agronomía.).
- Gerdemann, C., Eicken, C., and Krebs, B.** (2002). The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. *Accounts of chemical research* **35**, 183-191.
- Gilon, T., Chomsky, O., and Kulka, R.G.** (1998). Degradation signals for ubiquitin system proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* **17**, 2759-2766.
- Gomi, M., Sonoyama, M., and Mitaku, S.** (2004). High performance system for signal peptide prediction: SOSUlsignal. *Chem-Bio Info. J.* **4**, 142-147.
- Gutiérrez, M., Lahoz, J.M., Sola, M.D.M., Pascual, L., and Vargas, A.M.** (1994). Postharvest changes in total soluble solids and tissue pH of cherimoya fruit stored at chilling and non-chilling temperatures. *Journal of Horticultural Science.* **69**, 459-463.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**, 557-580.
- Hartley, J.L., Temple, G.F., and Brasch, M.A.** (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome research* **10**, 1788-1795.
- Hofmann, K., and Stoffel, W.** (1993). TMBASE - A database of membrane spanning protein segments. In *Biol. Chem., Hoppe-Seyler*, ed, pp. 166.
- Imaseki, H.** (1991). The biochemistry of ethylene biosynthesis. In *The Plant Hormone Ethylene*. (CRC Press), pp. 1-20.
- Joslyn, M.A., and Ponting, J.D.** (1951). Enzyme-catalyzed oxidative browning of fruit products. *Advances in Food Research.* **3**, 1-46.
- Joy, R.W.t., Sugiyama, M., Fukuda, H., and Komamine, A.** (1995). Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant physiology* **107**, 1083-1089.
- Jukanti, A.K.** (2006). Molecular and biochemical characterization of polyphenol oxidases in developing kernels and sensing leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *Funct. Plant. Biol.* **33**, 685-696.

- Lahoz, J.M., Gutiérrez, M., Sola, M.D.M., Salto, R., Pascual, L., Martínez-Cayuela, M., and Vargas, A.M.** (1993). Ethylene in cherimoya fruit (*Annona cherimola* Mill.) under different conditions. *Journal of agricultural and food chemistry* **41**, 721-723.
- Link, C.D., Fonte, V., Hiester, B., Yerg, J., Ferguson, J., Csontos, S., Silverman, M.A., and Stein, G.H.** (2006). Conversion of green fluorescent protein into a toxic, aggregation-prone protein by C-terminal addition of a short peptide. *The Journal of biological chemistry* **281**, 1808-1816.
- Martínez, G., Pretel, M.T., Serrano, M., and Riquelme, F.** (1993). Evolution of resistance to gas diffusion during cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) ripening. *HortScience* **28**, 204-206.
- Marusek, C.M., Trobaugh, N.M., Flurkey, W.H., and Inlow, J.K.** (2006). Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of inorganic biochemistry* **100**, 108-123.
- Mathew, A.G., and Parpia, H.A.** (1971). Food browning as a polyphenol reaction. *Advances in Food Research*. **19**, 77-145.
- Mayer, A.M., and Harel, E.** (1991). Phenoloxidase and their significance in fruit and vegetables. In *Food Enzymology*, P.F. Fox, ed (New York: Elsevier Science Publisher), pp. 373-398.
- Munné-Bosch, S., and Alegre, L.** (2004). Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Funct. Plant. Biol.* **31**, 203-216.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., 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* **104**, 34-41.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G.** (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein engineering* **10**, 1-6.
- Pourcel, L., Routaboul, J.M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L., and Debeaujon, I.** (2005). TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *The Plant cell* **17**, 2966-2980.
- Prieto, H., Utz, D., Castro, A., Aguirre, C., Gonzalez-Aguero, M., Valdes, H., Cifuentes, N., Defilippi, B.G., Zamora, P., Zuniga, G., and Campos-Vargas, R.** (2007). Browning in *Annona cherimola* Fruit: Role of Polyphenol Oxidase and Characterization of a Coding Sequence of the Enzyme. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 9208-9218.
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A.M., and Goffner, D.** (1999). Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases - a divergent gene family - in poplar. *European journal of biochemistry / FEBS* **259**, 485-495.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). Gel electrophoresis of DNA. In *Molecular Cloning - A laboratory manual*, C. Nolan, ed (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 6.2-6.65.
- Sánchez, J.A., Zamorano, J.P., and Alique, R.** (1998). Polygalacturonase, cellulose and invertase activities during cherimoya fruit ripening. *J. Hort. Sci. and Biotech.* **73**, 87-92.
- Sommer, A., Ne'eman, E., Steffens, J.C., Mayer, A.M., and Harel, E.** (1994). Import, targeting, and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant physiology* **105**, 1301-1311.

- Sparkes, I.A., Runions, J., Kearns, A., and Hawes, C.** (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature protocols* **1**, 2019-2025.
- Steffens, J.C., Harel, E., and Hunt, M.D.** (1994). Polyphenol oxidase. In *Genetic engineering of plant secondary metabolism*, B.E. Ellis and H.A. Stafford, eds (New York: Plenum), pp. 275-312.
- Treutter, D.** (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* **7**, 581-591.
- van Gelder, C.W., Flurkey, W.H., and Wichers, H.J.** (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* **45**, 1309-1323.
- Watada, A.E., Abe, K., and Yamuchi, N.** (1990). Physiological activities of partially processed fruits and vegetables. *Food Technol.* **44**, 112-116.
- Werker, E.** (1979). Relation between the anatomy of the testa, water permeability and the presence of phenolics in the genus *Pisum*. *Ann. Bot. (Lond.)* **43**, 765-771.
- Wills, R., McGlasson, B., Graham, D., and Joyce, D.** (1998). *Postharvest. An introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals.* (CAB International.).
- Yoruk, R., and Marshall, M.R.** (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J. Food Biochem.* **27**, 361-422.