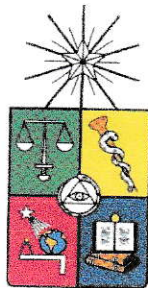


UCH-FC
MAG-BMCM
A 527
C. 1



Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

“Caracterización bioquímica y análisis del patrón de expresión de AtSDH, una poliol deshidrogenasa de *Arabidopsis thaliana*.”

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Biología Celular, Molecular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

Por

Diego Ignacio Ampuero Jadue

Septiembre, 2013

Director de Tesis: Dr. Michael Handford

Co-Director de Tesis: Dr. Ricardo Cabrera



INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, que la Tesis de Magíster en Ciencias presentada por el candidato.

Diego Ignacio Ampuero Jadue

Ha sido aprobado por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Biología Celular, Molecular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 02 de Mayo, 2013.

Director de Tesis:
Dr. Michael Handford

Co-Director de Tesis:
Dr. Ricardo Cabrera

Comisión de Evaluación de la Tesis

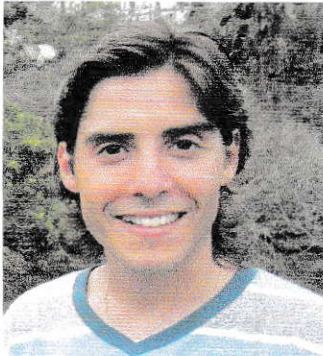
Dr. Francisco Chávez
(Presidente comisión)

Dra. Lorena Norambuena
(Evaluador comisión)

Este bloque contiene tres firmas manuscritas en tinta azul y un sello circular. El sello está ubicado en la parte superior derecha y contiene el texto: "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL" y "U. DE CHILE". Las firmas corresponden a los miembros de la comisión de evaluación y al director de tesis.

Santiago de Chile, Septiembre de 2013

Biografía



Nací un 29 de abril de 1986 en Santiago, producto de un 'chiripazo' como en muchas familias de este país. Menor de tres hermanos, crecí como todo 'conchito', regalón y sobre estimulado, en una gran familia aclanada con muchos tíos y primos donde los cumpleaños y convivencias eran pan de cada día. Mi educación partió en un colegio muy poco conocido llamado Renacimiento (no sé si aún existe) donde estuve sólo hasta kínder, ahí aprendí lo suficiente para adaptarme en mi próximo colegio, Saint Gaspar College, donde estuve hasta octavo básico. Muy característico de los colegios católicos, inculcando valores y lleno de actividades, viví grandes años de mi vida. Posteriormente, las vueltas de la vida me llevaron a convertirme en un 'pitutano'. Estuve en el Instituto Nacional toda mi educación media, donde pude aprender la otra cara de la moneda, salir de la burbuja, desarrollarme aún más como persona y valorar otras cosas de la vida. Compartí con gente muy variada, con experiencias de vida distintas, todos en un entorno competitivo, que por seguro trajo buenas consecuencias para cada uno de mis ex compañeros. A pesar de salir con buen rendimiento, las notas acumuladas en la media me jugaron una mala pasada y no pude ingresar a la U de inmediato. Gracias a eso terminé estudiando un año en el Preu Gustavo Molina (estilo colegio) donde conocí gente muy valiosa, gente que jamás pensé que perduraría en mi vida. Luego ese año de entrenamiento PSU valió la pena y terminé estudiando esta carrera que me tiene en este momento defendiendo mi título. La etapa vivida en la U, como todas las etapas de la vida, trajo consigo nuevas amistades y grandes experiencias, no sólo fueron noches de largo estudio si no también carretes por montones. Mi formación como Biotecnólogo me condujo al Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, bajo la tutela del Dr. Mike. Otra gran experiencia en mi vida, enriquecedora por completo con excelentes nuevos amigos. Actualmente sigo estudiando, me quedé en el lab haciendo el Magister en Ciencias Biológicas, así que próximamente tendré que escribir otra tesis, tesis que permitirá continuar con esta historia.....Y así fue.....ahora he terminado mi Tesis de Magister en Ciencias Biológicas en el mismo laboratorio donde desarrollé mi Seminario de Título. Durante este tiempo he conocido a la mujer más maravillosa, María Francisca Aguayo, mi compañera durante todo este proceso, la cual no sólo me acompañó en lo académico sino también en lo personal. En agosto de 2011 murió mi madre de cáncer, Elisabeth María Jadue Jadue, después de haber luchado 21 años contra esta enfermedad. Mujer valiosa que me enseñó grandes valores en la vida y quién me empujó a ser la persona en la que me he convertido hoy. A pesar de ser un momento doloroso en mi vida, debo agradecer a cada uno de los que me acompañaron, amigos, compañeros y familia que colaboraron en mi crecimiento.



Agradecimientos

...A mis amigos del condominio, al Christian, Pablo, Faby, Kika, Monse, Dany, por todas esas juntas que nos mantienen unidos hasta hoy. Los quiero...

...A mis amigos del preu Gustavo Molina, porque aunque sólo fue un año de estudio juntos, aún seguimos siendo amigos. En especial a mis compañeros de viaje, roommates por excelencia, la Pili y Juan Andrés...

...A todos mis compañeros de curso de pregrado!, en especial a la Vale, Moroco, Nacho, Ine y Chilo, donde la amistad aún se mantiene vigente, gracias por ser como son y les deseo el mejor de los éxitos en sus futuros!...A pesar que ya no están cerquita se les extraña demasiado Chilo (Alemania), Nacho (USA) y Pau (Alemania)...

...A todos los del lab de Biología Molecular Vegetal, en especial a mis compañeros de Team MH; Mike, Fran, Sofi, Joel, Panchi, Yu, Dany, Tito y Koke, por colaborar en el desarrollo de mi Tesis! Y por aguantarme en mis momentos de estrés!. Gracias a todos por acompañarme no sólo en lo académico sino también en los momentos duros que nos presenta la vida. Un gran agradecimiento a los cuatro profes del lab por cooperar en todo lo que fuese necesario para que este proyecto saliera adelante, Liliana Cardemil, Lorena Norambuena, Claudia Stange y sobre todo a mi tutor Michael Handford por recibirme en tu lab y enseñarme las herramientas que me han permitido desarrollarme como profesional... Gracias Ange y Seba por estar en todas...

...También agradezco a los que me apoyaron en el desafío de las proteínas fuera del lab!...a inmunología, BEM, genética y sobre todo bioquímica, en especial a mi cotutor Ricardo, el cual me estuvo apoyando constantemente para que este trabajo saliera adelante...

...A mi gorda exquisita, Francisca Aguayo, te amo infinitamente y estoy seguro que fue tu padre quien te puso en mi camino. Gracias por ser la mujer que eres, gracias por amarme y apoyarme tanto, gracias por estar conmigo en la buenas y en las malas, gracias por querer compartir tu vida conmigo, infinitas gracias por todo..... TE AMO!

...A mi familia, a mis hermanos Cristóbal y Francisco, a mis sobrinos Mateo, Ignacia y Agustina y a los 'gordos' Ely y Claudio que me acompañaron durante todo este proceso, estoy seguro madre que estás orgullosa de lo que he logrado, todo te lo debo a tí...

...Por último gracias a cada uno de ustedes que no fue nombrado, pero que de alguna manera fueron parte de mi desarrollo y me ayudaron a cumplir esta meta...

Financiamiento

Proyecto FONDECYT regular 1100129

“The role of sugar alcohols in non-sorbitol translocating plants”

Beca CONICYT Magíster Nacional 2010

22100522



Indice

Listado de Tablas	VI
Listado de Figuras	VII
Abreviaturas utilizadas	IX
Resumen	XI
Abstract	XIII
1. Introducción	01
1.1 Polioles en plantas.	01
1.1.1 Funciones de los polioles en plantas.	02
1.1.2 Metabolismo del sorbitol.	03
1.2 Sorbitol deshidrogenasa.	06
1.2.1 Sorbitol deshidrogenasas de plantas.	06
1.2.2 Metabolismo de sorbitol en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	12
1.2.3 Antecedentes de SDH en Arabidopsis.	13
2. Hipótesis	17
3. Objetivos	17
3.1 Objetivo General.	17
3.2 Objetivos Específicos.	17

4. Materiales y Métodos	18
4.1 Métodos comunes de Biología Molecular y Bioquímica.	18
4.1.1 Diseño de partidores.	18
4.1.2 Reacciones de PCR.	20
4.1.3 Electroforesis en geles de agarosa.	21
4.1.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE).	22
4.1.5 Inmunodetección mediante Western-Blot.	23
4.2 Generación del vector p426-GPD-AtSDH-myc-His.	25
4.2.1 Digestión de pCR8-AtSDH y p426-GPD.	25
4.2.2 Reacción de ligación con ADN ligasa T4.	26
4.2.3 Transformación de p426-GPD-AtSDH-myc-His en <i>E. coli</i> .	26
4.2.4 Purificación de ADN plasmidial desde células de <i>E. coli</i> .	26
4.2.5 Verificación de la construcción p426-GPD-AtSDH-myc-His mediante digestiones enzimáticas y secuenciaciones.	27
4.3 Trabajo con levaduras.	27
4.3.1 Crecimiento de levaduras <i>S. cerevisiae</i> .	27
4.3.2 Obtención de células electrocompetentes de <i>S. cerevisiae</i> .	28
4.3.3 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> mediante electroporación.	28
4.3.4 Análisis de la especificidad de sustrato de AtSDH mediante la expresión heteróloga en levadura.	29

4.3.5 Extracción de AtSDH-myc-His en <i>S. cerevisiae</i> .	29
4.3.6 Ensayos de actividad de AtSDH mediante zimogramas.	30
4.3.7 Purificación de AtSDH-myc-His por cromatografía de afinidad de iónmetálico (Ni) inmovilizado.	30
4.3.8 Ensayos de actividad de AtSDH mediante espectrofotometría.	32
4.4 Trabajo con bacterias.	32
4.4.1 Crecimiento de bacterias <i>E. coli</i> .	32
4.4.2 Expresión de His-AtSDH en <i>E. coli</i> .	33
4.4.3 Purificación de His-AtSDHpor cromatografía de afinidad de ión metálico(Ni) inmovilizado.	34
4.5 Trabajo con Plantas.	34
4.5.1 Esterilización y sembrado de semillas.	34
4.5.2 Extracciones de ARN de plantas.	36
4.5.3 Purificación de ARN vegetal.	38
4.5.4 PCR de Transcripción Reversa (RT-PCR).	38
4.5.5 PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).	40
5. Resultados	42
5.1 Determinación de la especificidad de sustrato de AtSDH.	42
5.1.1 Generación de la construcción p426-GPD-AtSDH-myc-His.	43
5.1.2 Ensayo de especificidad de sustrato en <i>S. cerevisiae</i> transformada con p426-GPD-AtSDH-myc-His en medio líquido.	47



5.1.3 Ensayo de la especificidad de sustrato en <i>S. cerevisiae</i> transformada con p426-GPD-AtSDH-myc-His en medio sólido.	51
5.1.4 Determinación de la especificidad de sustrato de AtSDH-myc-His mediante zimogramas.	54
5.2 Determinación de la actividad enzimática de AtSDH recombinante mediante el uso de los sistemas de expresión heteróloga en <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i> .	58
5.2.1 Inducción de la expresión de His-AtSDH en <i>E. coli</i> .	59
5.2.2 Purificación de His-AtSDH y AtSDH-myc-His.	62
5.2.3 Ensayos de actividad de His-AtSDH y AtSDH-myc-His.	66
5.3 Análisis de la expresión del gen AtSDH en los distintos órganos de <i>Arabidopsis silvestre</i> .	67
5.3.1 Evaluación de la expresión de AtSDH mediante datos públicos de microarreglos.	68
5.3.2 Análisis de los niveles de expresión de AtSDH, en los distintos órganos de <i>Arabidopsis</i> , mediante qRT-PCR.	70
6. Discusión	75
6.1 Determinación de la especificidad de sustrato de la enzima AtSDH, utilizando <i>S. cerevisiae</i> como sistema de expresión.	75
6.2 Determinación de la actividad enzimática de AtSDH recombinante, expresada en los sistemas de <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i> .	81
6.3 Análisis de los niveles de transcrito de AtSDH en diferentes órganos de <i>A. thaliana</i> mediante qRT-PCR.	84
7. Conclusiones	87
8. Referencias	89
Anexo 1	95

Listado de Tablas

Tabla I		07
	Porcentaje de identidad aminoacídica entre diferentes SDHs.	
Tabla II		10
	Características cinéticas de SDH de plantas.	
Tabla III		19
	Partidores utilizados en el desarrollo de esta Tesis.	
Tabla IV		20
	Programas de PCR utilizados para el desarrollo de la Tesis.	
Tabla V		24
	Anticuerpos utilizados en el desarrollo de esta Tesis.	
Tabla VI		39
	RT-PCR: Programa de PCR usado para la síntesis de todos los ADNc a partir de la retrotranscripción de los ARNm encontrados en una extracción de ARN.	
Tabla VII		41
	Programa de qPCR: Programa de PCR usado para la amplificación de los fragmentos de los genes <i>housekeepingPP2A</i> , <i>Ubq10</i> y <i>At4g26410</i> además de los fragmentos del gen <i>AtSDH</i> con los partidores <i>AtSDH1</i> y <i>AtSDH2</i> .	
Tabla VIII		
	Secuencia y descripción de los sitios de interés en la construcción p426-GPD-AtSDH-myc-His, que permitió la acumulación de AtSDH-myc-His en <i>S. cerevisiae</i> .	96

Listado de Figuras

Figura 01	Metabolismo del carbono en manzana.	04
Figura 02	Árbol filogenético de algunas SDHs de plantas conocidas	09
Figura 03	Sistema de purificación de AtSDH utilizando columna HisTrap.	31
Figura 04	Sistema de cultivo de plantas de Arabidopsis.	36
Figura 05	Esquema de la construcción p426-GPD-AtSDH-myc-His.	42
Figura 06	PCR de colonias de <i>E. coli</i> transformadas con p426-GPD-AtSDH-myc-His.	44
Figura 07	Digestión enzimática de la construcción p426-GPD-AtSDH-myc-His con las enzimas de restricción <i>BstEII</i> , <i>Clal</i> y <i>Sall</i> .	45
Figura 08	PCR de colonia de <i>S. cerevisiae</i> transformada con p426-GPD-AtSDH-myc-His.	46
Figura 09	Análisis de la acumulación de AtSDH-myc-His en <i>S. cerevisiae</i> .	48
Figura 10	Curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> .	50
Figura 11	Sistema de cultivo en placa para determinar la especificidad de sustrato de AtSDH en <i>S. cerevisiae</i> .	52
Figura 12	Verificación por PCR de posible contaminación de <i>S. cerevisiae</i> silvestres con levaduras transformadas con p426-GPD.	54
Figura 13	Determinación de la especificidad de sustrato de AtSDH-myc-His evaluado mediante zimogramas.	56
Figura 14	Esquema de la construcción pET28a-His-AtSDH.	58

Figura 15	Análisis de la inducción y expresión de His-AtSDH en <i>E. coli</i> .	60
Figura 16	Análisis de la inducción de AtSDH en células de <i>E. coli</i> transformadas con pET28a-His-AtSDH en distintos medios de crecimiento.	61
Figura 17	Purificación de His-AtSDH y AtSDH-myc-His.	62
Figura 18	Pictografía fluorescente electrónica absoluta de la expresión de AtSDH (At5g51970).	69
Figura 19	Imagen representativa de una planta de Arabidopsis.	71
Figura 20	ARN extraído de los distintos órganos de Arabidopsis	72
Figura 21	Amplificación de un fragmento de actina4 desde ADNc de distintos órganos de Arabidopsis silvestre.	72
Figura 22	Análisis de la expresión de AtSDH entre los distintos órganos de Arabidopsis.	74

Abreviaturas

aa	Aminoácidos
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
ADNg	Acido desoxirribonucleico genómico
AGI ID	<i>Arabidopsis</i> genome initiative identifier (Iniciativa de identificación del genoma de <i>Arabidopsis</i>)
Amp	Ampicilina
APS	Persulfato de amonio
ARN	Acido ribonucleico
AtSDH	<i>Arabidopsis thaliana</i> sorbitol deshidrogenase
B	Boro
BCIP	"5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt"
BMV	Laboratorio Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, U. de Chile
C	Carbono
°C	Grado Centígrado
d	Dias
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DO_{600nm}	Densidad óptica medida a 600 nm
DTT	Ditiotreitol
DTPA	Acido dietilen triamino pentaacético
dNTP	Desoxirribonucleótido Tri-fosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GFP	Green fluorescent protein (Proteína fluorescente verde)
GPD	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
h	Horas
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase
K_m	Constante de Michaelis-Menten.
LB	Medio Luria Bertani
LeSDH	Sorbitol deshidrogenasa de tomate
M	Molar
min	Minutos
mM	Milimolar

MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MS	Medio Murashige & Skoog
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NBT	"nitro-blue tetrazolium chloride"
ON	Over night
ORF	Open Reading Frame (marco de lectura abierto)
pb	Par de Bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
qRT-PCR	PCR cuantitativo en tiempo real
rms	root mean square
RT-PCR	PCR de transcripción reversa
s	segundos
S6PDH	Sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa
SDH	Sorbitol deshidrogenasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris-acetato EDTA
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TMD	Dominio transmembrana
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
V	Volt
Vol	Volúmen
YMM	Yeast minimum medium
YNB	Base nitrogenada de levadura
YPD	Yeast extract peptone dextrose

Resumen

Los alcoholes de azúcar o polioles, como el sorbitol, manitol y xilitol poseen una serie de funciones en plantas, incluyendo el transporte de carbono por el floema a grandes distancias, la redistribución del boro entre los distintos tejidos, y actúan como solutos compatibles. En Rosáceas, el sorbitol es producido en órganos fuentes como hojas maduras a través de la reducción de glucosa 6-fosfato por la acción de la sorbitol 6-fosfato deshidrogenasa. La acumulación de sorbitol conduce a su distribución por el floema hacia órganos sumideros como frutos y hojas jóvenes. Una vez alcanzados los órganos sumideros, el sorbitol es oxidado en el citosol por la sorbitol deshidrogenasa (SDH) a fructosa. También es posible encontrar actividad SDH en plantas no traslocadoras de sorbitol generando una interrogante sobre la acción de los alcoholes de azúcares en este grupo de plantas.

De esta manera surge la inquietud de comprender el papel de los polioles en plantas no traslocadoras de sorbitol, utilizando como modelo *Arabidopsis thaliana*. Por genética reversa ha sido identificada una secuencia (At5g51970) para una supuesta proteína SDH en *Arabidopsis* denominada AtSDH. Esta secuencia comparte más de un 75% de identidad aminoacídica con otras SDHs de plantas y un 36% con la SDH de *Saccharomyces cerevisiae*.

En esta Tesis de Magister primero se generó la proteína AtSDH recombinante en *E. coli* (His-AtSDH) y *S. cerevisiae* (AtSDH-myc-His), logrando expresarlas, extraerlas y purificarlas satisfactoriamente desde ambos sistemas. La especificidad de sustrato de AtSDH se determinó mediante zimogramas, donde fue posible observar una preferencia por sorbitol y xilitol y en menor medida por arabitol y manitol.

Además se intentó realizar análisis cinéticos desde proteínas purificadas. Sin embargo, en *E. coli*, la presencia de cuerpos de inclusión dificultó el proceso de renaturación proteica y en *S. cerevisiae* no fue posible obtener AtSDH-myc-His purificado y activo para análisis mediante espectrofotometría.

Finalmente, se determinó mediante qRT-PCR el patrón los niveles de transcrito de *AtSDH* en distintos órganos de *Arabidopsis*, observando una mayor expresión en semillas, y en menor medida en hojas caulinares y rosetas.

En conjunto, estos resultados sugieren la formación de una estructura proteica compleja de *AtSDH*, la cual es muy inestable en las condiciones evaluadas. Esta enzima es capaz de oxidar el sorbitol y xilitol en *Arabidopsis*. Esta actividad más la expresión ubicua de *AtSDH*, con mayor preponderancia en semillas y hojas, alude a una posible función en condiciones de estrés.

Abstract

Sugar alcohols or polyols such as sorbitol, mannitol and xylitol have a number of functions in plants, including long-distance transport of carbon through the phloem, boron redistribution between different tissues, and as compatible solutes. In Rosaceae species, sorbitol is produced in source organs such as mature leaves, through reduction of glucose 6-phosphate by the action of sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. The accumulated sorbitol is distributed via the phloem to sinks organs such as fruit and young leaves. After reaching sink organs, sorbitol is oxidised by sorbitol dehydrogenase (SDH) to fructose in the cytosol. SDH activity is also found in non-sorbitol translocating plants, generating a question about the action of the sugar alcohols in this group of plants.

There is interest in understanding the role of polyols in non-sorbitol translocator plants using *Arabidopsis thaliana* as a model. By reverse genetics, a sequence (At5g51970) has been identified as a putative SDH protein in *Arabidopsis* called AtSDH. This sequence shares more than 75% amino acid identity with other plant SDHs and 36% with SDH of *Saccharomyces cerevisiae*.

First, in this Master Thesis, we generated AtSDH recombinant protein in *E. coli* (His-AtSDH) and *S. cerevisiae* (AtSDH-myc-His), achieving successfully the expression, extraction and purification from both systems. AtSDH substrate specificity was determined by zymograms, where it was possible to observe a preference for sorbitol and xylitol, and to a lesser extent for arabitol and mannitol.

Also, kinetic analysis was attempted with purified proteins. However, in *E. coli* the presence of inclusion bodies impeded the renaturation of the protein, and from *S. cerevisiae* it was not possible to obtain purified and active fractions for spectrophotometric analysis.

1. Introducción

1.1 Polioles en plantas.

Los polioles, poli-alcoholes o alcoholes de azúcar corresponden a la forma reducida de azúcares de aldosa o cetosa, donde el grupo aldehído y cetona es reemplazado por un hidroxilo (-OH), respectivamente. Los polioles son moléculas de tres o más carbonos, y existen en formas lineales como glicerol (3 carbonos [3C]), eritritol (4C), ribitol (o adonitol, 5C), xilitol (5C), sorbitol (o glucitol, 6C), manitol (6C) y galactitol (o dulcitol 6C), y formas cíclicas como inositol (6C) y ononitol (6C) (Noiraud N, y col 2001). A pesar de que la mayoría de las especies vegetales transportan sacarosa o rafinosa desde los órganos fotosintéticos, a través del tejido vascular (floema), hacia los tejidos sumideros (flores, raíces, frutos), junto a cantidades menores de alguno de los poli-alcoholes mencionados (Zimmermann MH, y Ziegler H, 1975), existen familias de plantas en donde sacarosa o rafinosa se encuentran en cantidades minoritarias en comparación al poli-alcohol transportado.

En especies de la familia *Rosaceae* (Ej. cerezo, *Prunus cerasus*) y *Plantaginaceae* (Ej. llantén, *Plantago major*) el **sorbitol** es el principal fotosintato floema-translocado (Barker 1955; Webb and Burley 1962; Zimmermann MH, y Ziegler H, 1975). En especies de la familia *Apiaceae* (Ej. apio, *Apium graveolens*), *Oleaceae* (Ej. olivo, *Olea europaea*) y *Rubiaceae* (Ej. cafeto arábigo, *Coffea arabica*) **manitol** es el principal fotosintato translocado (Bielecki RL, 1982; Lewis DH, 1984) y en especies de la familia *Celastraceae* (Ej. *Euonymus* sp.; Pommerrenig B, y col., 2007) **galactitol** es translocado.

1.1.1 Funciones de los polioles en plantas.

El transporte de polioles como principal fuente de carbono, entrega ventajas frente a otros sustratos más comunes (sacarosa, rafinosa). Estos alcoholes de azúcar son moléculas químicamente estables que permiten el uso eficiente de carbono y entregan mayor potencialidad para generar coenzimas reducidas (NADH y NADPH), empleadas por las células para la síntesis de ATP (Pharr DM, y col, 1995; Stoop JMH, y col; 1996).

Otra ventaja está relacionada con el transporte de Boro (B). El B es un micronutriente esencial y finamente regulado por las plantas ya que la carencia de este, conlleva a pérdida en la elongación radicular, la expansión de las hojas, y la reducción de fertilidad, entre otros defectos (Dell B, y Huang L, 1997). En plantas transportadoras de alcoholes de azúcar como manitol y sorbitol, se ha reportado una rápida y significativa retranslocación de B desde órganos fotosintéticos hacia tejidos jóvenes, mediante la formación de complejos manitol-B-manitol en apio y sorbitol-B-sorbitol en durazno (*Prunus persica*) (Hu L y col, 1997). Además en una planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transgénica, capaz de incrementar significativamente el contenido de sorbitol, fue posible detectar una retranslocación de B hacia tejidos jóvenes, demostrando la funcionalidad de los polioles en el transporte de este elemento (Bellaloui N y col, 1999).

Además, los polioles actúan como solutos compatibles, importantes para la mantención de la conformación de las macromoléculas, bajando el potencial celular osmótico, facilitando la absorción de agua y restablecen la concentración de sal intracelular, dando un rol detoxificador frente a condiciones ambientales desfavorables, protegiendo a la célula contra los radicales libres (Xiong L, y Zhu JK, 2002; Smirnov N y Cumbers Q, 1989).

Finalmente, la acumulación de los polioles resulta en un incremento en la tolerancia a la salinidad o al estrés por sequía (Everard JD y col, 1994; Stoop JMH, y Pharr DM, 1994; Hu L, y col, 2005; Rejskova A, y col, 2007). Por ejemplo, *Mesembryanthemum crystallinum* (planta ornamental, "anémona de tierra"), que no transloca cantidades significantes de polioles en su floema bajo condiciones normales (sin estrés), sufre un incremento en la concentración de polioles cíclicos (myo-inositol y ononitol; Nelson DE, y col, 1998) en respuesta a tratamientos salinos, permitiendo una mejor incorporación de agua en estas condiciones.

1.1.2 Metabolismo del sorbitol.

Dentro de la gran variedad de polioles existentes en las plantas, el sorbitol ha sido ampliamente estudiado en plantas de la familia Rosácea (manzana, cerezas, durazno, pera, etc). Esto se debe principalmente a que el sorbitol comprende hasta un 80 % de los carbohidratos presentes en el floema (Loescher WH, y col, 1982). Cabe destacar la importancia económica de las especies pertenecientes a esta familia que comprenden un vasto espectro de los frutales más comercializados a nivel mundial y en Chile (ODEPA, 2011).

En manzanos (*Malus x domestica*) se ha reportado que las principales fuentes de carbono de la planta son el sorbitol, la sacarosa y el almidón (Figura 1, Modificado de Teo G y col, 2006). El sorbitol es sintetizado por la reducción de la glucosa-6-fosfato a sorbitol-6 fosfato por medio de la aldosa-6-fosfato reductasa (también llamada sorbitol-6-fosfato-reductasa, S6PDH), reacción metabolizada en órganos fuente fotosintéticamente activos (Bielski RL, y Redgwell RJ, 1985; hojas maduras).

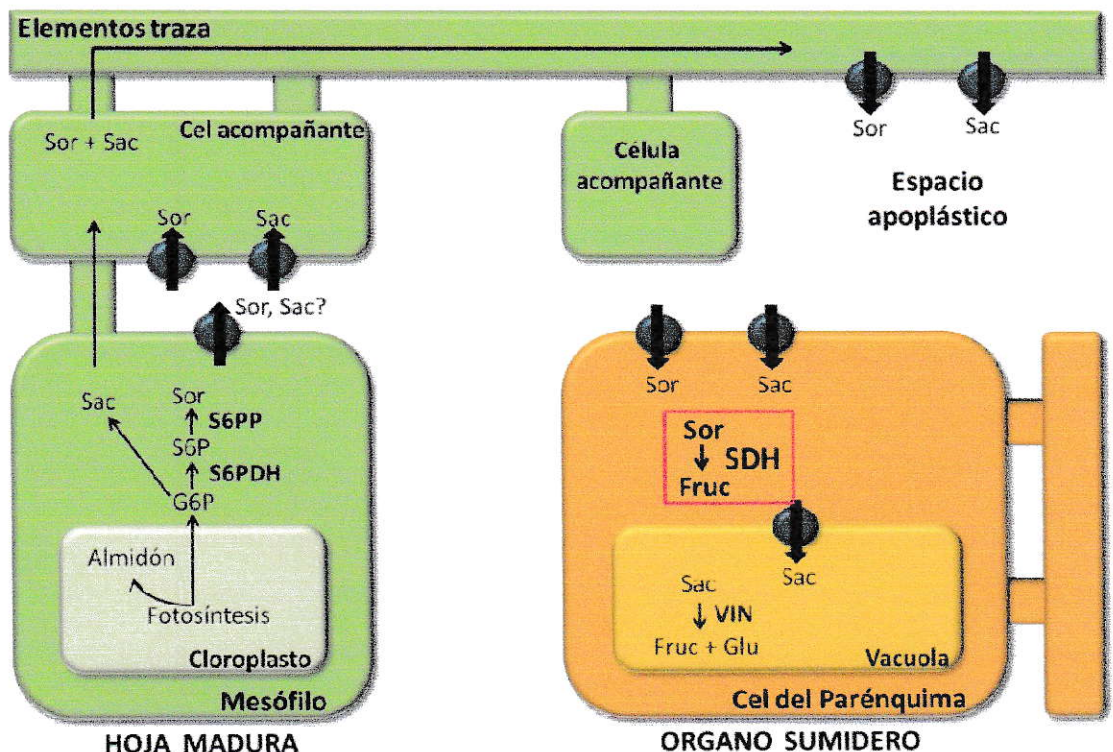


Figura 1. Metabolismo del carbono en manzana. El sorbitol (Sor) y la sacarosa (Sac) son sintetizadas en las hojas desde G6P. El sorbitol es sintetizado en un primer paso por la sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa (S6PDH) y luego por la sorbitol-6-fosfatasa (S6PP). Posterior a la translocación hacia el órgano sumidero, el sorbitol es catalizado a fructosa (Fruc) por la sorbitol deshidrogenasa (**SDH**, cuadro rojo) mientras que la sacarosa es convertida a fructosa y glucosa (Glu) por la invertasa (VIN).

Posteriormente, el sorbitol sintetizado es transportado a través del floema hasta alcanzar el apoplasto de los órganos sumideros. Hasta la fecha no hay transportadores identificados en la familia Rosácea, que realicen este paso de incorporación del poliol al apoplasto, pero ha sido fuertemente sugerida la presencia de estos transportadores, los que permitirían la acumulación del poliol en esa zona para ser posteriormente incorporado, al citoplasma de las células del fruto, durante las etapas tardías de desarrollo (Gao Z, y col, 2005). La incorporación del poliol al citoplasma de las células del fruto está mediado por transportadores selectivos para sorbitol, entre los que han sido identificados MdSOT1 y MdSOT2 (manzana; Gao Z, y col, 2005), PcSOT1 y PcSOT2 (guindas; Gao Z, y col, 2003) y PmPLT1 y PmPLT2 (llantén; Ramsperger-Gleixner M, y col, 2004). Una vez ingresado el sorbitol, es convertido a fructosa por la sorbitol deshidrogenasa (Beruter J, y col, 1997; SDH) donde finalmente ingresará a la vía glicolítica o será almacenada, entregando dulzor en los frutos.

Sin embargo, a pesar de ser ampliamente estudiada en Rosáceas, la actividad de S6PDH (Hirai M, 1981; Kanayama Y, y Yamaki S, 1993) y SDH han sido identificadas en otras familias de plantas no-Rosáceas, como soya (*Glycine max*; Kuo TM, y col, 1990), maíz (*Zea mays*; Doehlert DC, 1987), tomate (*Solanum lycopersicum*; Ohta K, y col, 2005), entre otras, generando una interrogante sobre el rol de los alcoholes de azúcar en estas familias de plantas que translocan mayoritariamente sacarosa y que no acumulan polioles como el sorbitol.

1.2 Sorbitol deshidrogenasa

La presencia y caracterización de SDHs ha sido evaluada en una amplia variedad de organismos en los distintos reinos. En el caso de los humanos (*Homo sapiens*), SDH ha sido clonada y purificada, llegando a obtener la estructura cristalográfica (PDB: 1PL7_A, 1PL7_B, 1PL7_C, 1PL7_D) que determina la formación de una proteína homotetramérica, con sitios de unión a Zn^{+2} en cada subunidad y utiliza NAD^+ como cosustrato (Maret W, y Auld DS, 1988; Pauly TA, y col, 2003). De manera análoga también se ha podido obtener un fragmento de la estructura cristalográfica de SDH de oveja (PDB: AAB25457, *Ovis aries*) compartiendo propiedades similares a la de humano (Jeffery J, y col, 1984). También ha sido identificada en rata (*Ratus norvegicus*; Blakley RL, 1951), insectos como la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*, Luque T, y col 1998), la mosquita blanca (*Besimia argentifolii*, Banfield MJ, y col, 2001), el gusano de la seda (*Bombix mori*; Rubio RO, y col, 2011), bacterias como *Rhodobacter sphaeroides* (Schauder S, y col, 1995), *Gluconobacter suboxydans* (Hoshino T, y col, 2003), *Escherichia coli* (Yamada M, y Saier MH, 1987) y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Sarchy AV, y col, 1994).

1.2.1 Sorbitol deshidrogenasas de plantas

Por análisis de alineamiento de secuencias con SDHs ya conocidas, se ha identificado sus homólogos en plantas, encontrando dentro de la familia Rosácea SDHs en; ciruela (*Prunus salicina* variedad *cordata*; Guo ZX, y col 2012), durazno (Lo Bianco R, y Rieger M, 1998), pera (*Pyrus pyrifolia*; Oura Y, y col, 2000; lida M, y col, 2004), níspero (*Eriobotrya japonica*; Bantog NA, y col, 2000) y manzana (Park SW, y col, 2002), entre otros. Además, y concordante con la presencia de actividad SDH en algunas especies

de familias no-Rosácea (sección 1.1.2), se ha identificado homólogos en; soya (Kuo TM, y col, 1990), maíz (Doehlert DC, 1987), tomate (Ohta K, y col, 2005), y *Arabidopsis thaliana* (Mandujano P, 2010; Nosarszewski M, y col, 2012). Tomando los datos recopilados de las secuencias nucleotídicas para las distintas SDHs de plantas, realicé un análisis *in silico* con el programa ClustalW2 el cual permitió detectar una alta identidad de SDHs entre organismos de una misma familia (Rosácea) como cereza, ciruela y durazno, obteniendo sobre un 95% de identidad entre ellas, mientras que la de *Arabidopsis* posee mayor identidad aminoacídica con la de tomate (84%) y por su parte, maíz con soya (75%), estas últimas cuatro especies de familias no-Rosáceas (Tabla I). Además, con las secuencias encontradas generé un árbol filogenético con el programa MEGA 5.2 (Tamura K, y col, 2011), donde se observa claramente tres grupos conformados por especies Rosáceas (Figura 2, paréntesis rojo; Grupos 1, 2 y 3).

Tabla I. Porcentaje de identidad aminoacídica entre diferentes SDHs. *Arabidopsis thaliana* (número de acceso AF370161), tomate (BAE47038), maíz (ABA70761), soya (XP_003548224), níspero (AB042810), pera (BAD91189), cereza (AAK71492), ciruela (ACL18054), durazno (BAA94084), cuatro isoformas de manzana (1: AAL37293; 2: AAL37294; 3: AAL37295 y 4: AAL37296).

% identidad	Arabidopsis	Tomate	Maíz	Soya	Níspero	Pera	Cereza	Ciruela	Durazno	Manzana1	Manzana2	Manzana3	Manzana4
Arabidopsis	-	84	75	83	75	71	80	80	81	76	76	75	78
Tomate		-	77	84	80	78	81	83	83	80	76	77	78
Maíz			-	75	68	68	72	74	75	68	71	71	72
Soya				-	79	76	82	81	82	78	76	78	78
Níspero					-	94	76	76	76	98	68	69	70
Pera						-	76	76	76	93	69	70	72
Cereza							-	95	97	75	80	80	83
Ciruela								-	97	75	81	80	83
Durazno									-	76	81	81	83
Manzana1										-	68	69	70
Manzana 2											-	91	92
Manzana 3												-	91
Manzana 4													-

La taxonomía de las plantas varía en el tiempo de acuerdo a la información disponible para su clasificación. Es por esto, que uno de los últimos estudios taxonómicos de las plantas Rosáceas mostró una nueva agrupación dentro de esta familia, basándose en la comparación de secuencias nucleotídicas de 6 regiones nucleares y 4 de cloroplastos (Potter D, y col, 2007). Al evaluar los tres grupos de plantas Rosáceas mostrados en la Figura 2 en comparación a la taxonomía de cada especie, podemos observar que el grupo 1 conformado por ciruela, cereza y durazno, se encuentran agrupadas en la misma Tribu denominada *Amygdaleae*, donde se encuentran los frutos del género *Prunus*. Por su parte el grupo 2, está conformado por tres isoformas de manzana (*Malus x domestica*) y finalmente el grupo 3 se encuentra conformado por especies del género *Pyrus* (pera), *Eriobotrya* (níspero) y *Malus* (manzana) todos pertenecientes a la subtribu de los *Pyrinae*.

Estos datos reflejan una divergencia evolutiva que muestra que a lo menos las SDHs de plantas Rosáceas se agrupan evolutivamente en clados que poseen secuencias aminoacídicas similares y a su vez comparten una taxonomía entre las distintas especies evaluadas. Por otro lado, las especies no-Rosáceas comprenden todo el resto de plantas que no sean Rosáceas de los distintos *filum* de las plantas (angiospermas, gimnospermas, pteridófitos y briófitos), por lo cual no se puede hablar de un grupo monofilético como son las Rosáceas (Morgan DR y col, 1994) y es por esta razón que se explica la divergencia entre los distintos clados observados en la Figura 2, para las especies de maíz (familia: *Poaceae*), tomate (familia; *Solanaceae*), *Arabidopsis* (familia; *Brassicaceae*) y soja (familia; *Fabaceae*). Por lo tanto, a través de este árbol filogenético es posible determinar una divergencia evolutiva entre las SDHs de plantas Rosáceas en comparación a las no-Rosáceas. Además un análisis más

detallado de las secuencias reveló la presencia del dominio de unión a Zn^{+2} (G-H-E-X(2)-G-X(5)-[G/A]-X(2)-[I/V/S/A/C]) característico de SDHs (Carr IM, y Markham AF, 1995), previamente identificado también en manzana (Park SW y col, 2002).

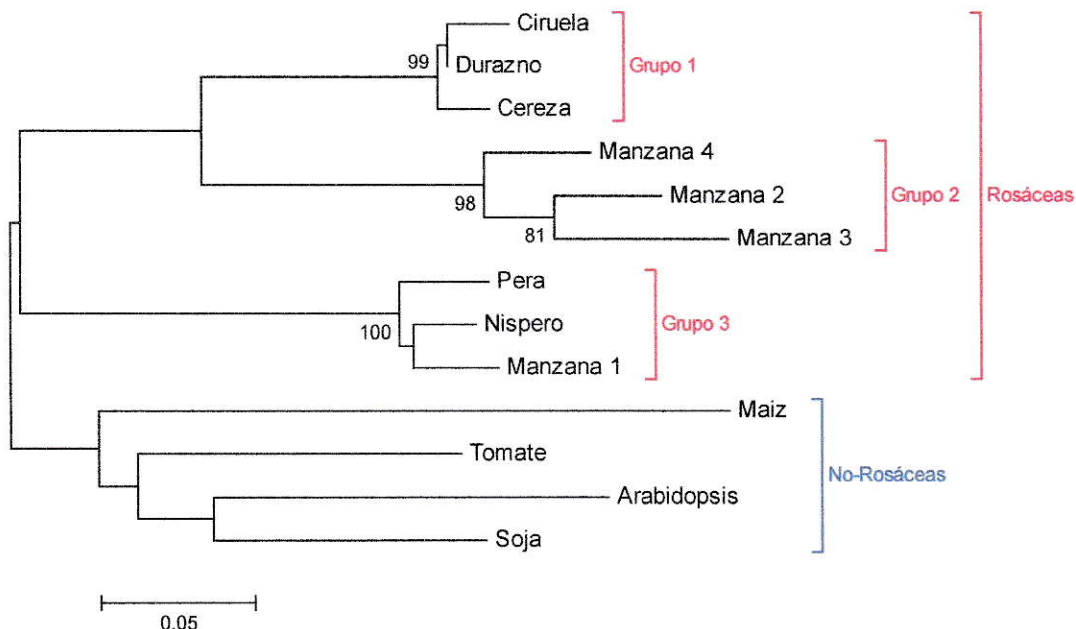


Figura 2. Arbol filogenético de algunas SDHs de plantas conocidas. El árbol filogenético fue generado usando el método de máxima verosimilitud basado en la matriz del modelo JTT. El análisis involucró 13 secuencias aminoacídicas correspondientes a las mostradas en la Tabla I. Todas las posiciones contienen huecos y los datos remanentes fueron eliminados. Hubo un total de 147 posiciones en el conjunto de datos finales. El porcentaje de los árboles en los cuales los taxones asociados se encuentran agrupados juntos, se muestra junto a las ramas (Sólo valores sobre el 70%). El árbol está dibujado a escala, y la longitud de las ramas miden el número de sustituciones por sitio. Los análisis evolutivos se realizaron con el programa MEGA5.

Los trabajos realizados en pera (Oura Y, y col, 2000) y durazno (Lo Bianco R, y Rieger M, 1998) revelaron que la proteína está conformada por cuatro subunidades de alrededor de 40 kDa, formando un homotetrámero en su estructura nativa. Además en todos los trabajos de plantas mencionadas se demostró que la actividad enzimática de SDH utiliza NAD^+ como co-sustrato en la reacción de oxidación de sorbitol a fructosa, indicando que estas características son conservadas entre los distintos reinos. Por otro

lado, la actividad registrada en algunos trabajos de plantas demuestra la preferencia por sorbitol frente a otros polioles como sustratos (Tabla II) y además es posible observar la Km para distintas especies que van desde 2,39 mM en tomate a 111,8 mM en ciruela, todas en un ambiente básico. Cabe destacar, que la reacción inversa (la reducción de D-fructosa a D-sorbitol) está desfavorecida en todas las enzimas caracterizadas. Específicamente, las Km publicadas de SDHs de plantas para las reacciones de reducción de las cetosas son entre 1 a 14 órdenes de magnitud superiores a las Km para las reacciones de oxidación de los polialcoholes, lo que reveló que las SDH de plantas son enzimas esencialmente unidireccionales.

Tabla II. Características cinéticas de SDH de plantas. Km y pH de reacción de oxidación de sorbitol a fructosa para SDH de tomate, maíz, pera, ciruela, durazno y manzana. La columna Fuente muestra el origen enzimático, ya sea desde extractos crudos de *E. coli* previamente transformados con las respectivas enzimas o desde extractos crudos de órganos de plantas enriquecidos con SDH. También, en algunos casos se informa el porcentaje de especificidad de sustrato para distintos polioles evaluados. nd; no detectable y recuadros en blanco; no evaluado.

Especie	Km [mM]	pH	Fuente	Especificidad de sustrato (%)										
				Sorbitol	L-iditol	Ribitol	Xilitol	Eritritol	Arabitol	Manitol	Myo-inositol	Glicerol	L-treitol	Galactitol
Tomate Ohta y col, 2005	2,39	10,5	<i>E. coli</i>	100	79	60	29	13	13	6	nd	nd		
Maiz Doehlert, 1987	8,4	9	Endosp erma	100		73	91			17			43	
Pera Oura y col, 2000	96,4	9	Fruto	100	88	13,7	76	0,75	1,5	nd		nd	40,5	nd
Ciruela Guo y col, 2012	111,8	9	<i>E. coli</i>	100		15	62	nd	nd	4	nd	nd		nd
Durazno LoBianco, 1998	37,7	9	Fruto											
Manzana Park y col, 2002	83	9,5	<i>E. coli</i>											

En cuanto a la localización subcelular, se ha demostrado que la actividad de SDH se encontraría ubicada en el citosol (Lo Bianco R, y col 1998; Ohta K, y col, 2005; Oura Y, y col, 2000; Park y col, 2002). La localización citosólica estaría fuertemente apoyada por la presencia de los transportadores de sorbitol previamente descritos en Rosáceas (sección 1.1.2). Sin embargo, en manzana el estudio en esta materia ha sido más profundo. Wang XL, y col (2009) determinaron mediante un antisuero policlonal anti-MdSDH, que SDHs de manzanos se encuentran en el citosol y en cloroplastos, en este último, posiblemente regulando la síntesis de almidón luego de producir fructosa. También en las hojas inmaduras observaron localización vacuolar, infiriendo un almacenaje enzimático y su liberación en momentos determinados, posiblemente frente a algún estrés abiótico.

Por último, estudios del patrón de expresión de SDHs de especies Rosáceas, muestran una principal expresión en órganos sumideros (Park SW, y col, 2002; Nosarszewski M, y cols, 2004; Gao Z, y cols, 2005; Wang XL, y cols, 2009). Sin embargo, en algunos casos (ej MdSDH1; Park SW, y col, 2002) y en especies no-Rosácea (tomate, Ohta K y col, 2005), hay expresión tanto en órganos sumideros como fuentes, indicando una función alternativa de las SDHs en plantas, la que podría estar relacionada fuertemente con respuesta frente a condiciones de estrés abiótico que permitieran a la planta responder rápidamente a fenómenos como pérdida de agua (Xiong L, y Zhu JK, 2002; Smirnov N, y Cumbers Q, 1989).

1.2.2 Metabolismo de sorbitol en *Arabidopsis thaliana*.

Hasta la fecha los estudios sobre SDH han sido llevados a cabo principalmente en plantas de la familia Rosácea, debido la acumulación de sorbitol en los frutos, siendo uno de los principales azúcares transportados en estos organismos. Sin embargo, en plantas no-Rosáceas se ha visto una menor acumulación de polioles, generando una interrogante sobre la función de los alcoholes de azúcar en estas plantas.

Para entender el metabolismo del sorbitol y caracterizar la SDH de plantas no-Rosáceas, en esta Tesis de Magister se propone el uso de *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) como organismo modelo. Esta planta entrega varias ventajas que simplifican el estudio, como su rápido crecimiento (8 semanas), rápida transformación genética, gran número de semillas por planta, posee un tamaño pequeño que facilita su manejo, fácil acceso a su genoma el que se encuentra completamente secuenciado y la disponibilidad de líneas transgénicas las cuales poseen distintos genes interrumpidos generando plantas knock-out y/o knock-down.

Además de sus características que la califican como una muy buena planta modelo, se han observado en *Arabidopsis* una serie de propiedades que la transforman en una atractiva planta no-Rosácea para el estudio de SDH. *Arabidopsis* transporta principalmente sacarosa en su floema con pequeñas cantidades de rafinosa, pero no polioles (Haritatos y col, 2000). Sin embargo estudios de perfiles metabólicos han determinado la presencia de distintos polioles; myo-inositol, glicerol, eritritol, xilitol, manitol, lactitol y ribitol (Fiehn O, y col, 2000; Kaplan K, y col, 2004, Rizhsky L, y col, 2004; Ebert B, y col, 2010). Además se han identificado 6 transportadores de ingreso de polioles de los cuales uno de estos (AtPLT5 [At3g18830]) posee una gran



preferencia por sorbitol (Klepek YS, y col, 2005; Reinders y col, 2005). A estos transportadores se les atribuye una función de reciclaje de los azúcares provenientes de la ruptura de la pared celular de células dañadas por patógenos (Klepek YS, y col, 2005). También, se ha identificado potenciales enzimas involucradas en la síntesis (S6PDH; Zamudio MS, 2010; Wurman J, 2013) y degradación de sorbitol (SDH; Mandujano P, 2010).

1.2.3 Antecedentes de SDH en Arabidopsis.

Utilizando secuencias ortólogas de SDHs ya conocidas en plantas, se identificó por genética reversa una sorbitol deshidrogenasa de *Arabidopsis thaliana* en el cromosoma 5, locus At5g51970 del genoma de esta especie (AtSDH; Mandujano P, 2010; Nosarzewski M, y col, 2012), la cual comparte más de un 80 % de identidad aminoacídica con otras SDHs de plantas (sección 1.2.1, Tabla I).

Una primera aproximación bioinformática, utilizando programas que permiten dilucidar la localización subcelular de AtSDH, mostraron ausencia de dominios transmembrana de la proteína y carencia de péptidos de señalización hacia alguna vía secretoria, arrojando una localización citosólica (Mandujano P, 2010). Estos antecedentes fueron posteriormente corroborados por microscopía confocal (previa transformación de hojas de tabaco con AtSDH-GFP) y western blot, utilizando un anticuerpo policlonal anti-AtSDH (Mandujano P, 2010).

Para entender el rol que desempeña AtSDH en Arabidopsis, es necesario determinar su actividad. Ensayos de actividad realizados a partir de extractos crudos de plantas silvestres y mutantes (*sdh-1*, 2 y 3) de Arabidopsis, mostraron que AtSDH es capaz de oxidar sorbitol y ribitol (Nosarzewski M, y col, 2012). Sin embargo, trabajos realizados

en tomate, pera y ciruela (Ohta K, y col, 2005; Oura Y, y col, 2000; Guo ZX, y col, 2012) entre otros, han mostrado que las SDHs de plantas son capaces de metabolizar otros sustratos además de sorbitol como L-idoitol, xilitol, arabitol y eritritol. Algunos de ellos están presentes en *Arabidopsis* (sección 1,2,2), por lo cual se torna relevante el estudio de la especificidad de sustrato de AtSDH utilizando diferentes polioles. Además, este tipo de ensayos de actividad desde extractos crudos de plantas silvestres, no permite caracterizar bioquímicamente AtSDH, sobretodo la obtención de los parámetros cinéticos de la enzima, ya que es necesaria una gran cantidad de proteína purificada.

Trabajos previos donde se utilizó *E. coli* como sistema de expresión heteróloga de AtSDH (His-AtSDH), mostró que la proteína acumulada en el organismo formaba cuerpos de inclusión, lo que dificultó los procesos de purificación y renaturación, donde se logró obtener una sola vez actividad desde un extracto crudo bacteriano. Estos ensayos informaron sobre la preferencia por sorbitol como sustrato entre otros polioles evaluados (xilitol, eritritol, arabitol, manitol y mio-inositol), y además el uso de NAD⁺ como cosustrato (Mandujano P, 2010). Es importante recalcar que el uso de *E. coli* como sistema de expresión heteróloga de proteínas recombinantes es ampliamente utilizado, donde han sido publicado trabajos donde se caracterizan SDHs de plantas como manzana, ciruela y tomate (Park SW, y col, 2002; Guo ZX, y col, 2012; Ohta K, y col, 2005.)

En esta Tesis de Magister se evaluarán las propiedades bioquímicas de la proteína, con el fin de obtener la especificidad de sustrato de la enzima y las constantes cinéticas de AtSDH. Para esto se utilizarán *E. coli* y *S. cerevisiae* como sistemas de expresión de AtSDH recombinante, donde se optimizarán y probarán nuevas

condiciones de inducción, extracción, purificación y renaturación de proteínas. De esta manera se emplearán tanto un sistema procarionte como uno eucarionte, permitiendo manejar distintas variables en la generación de AtSDH, como la posibilidad de adicionar modificaciones post-traduccionales, diferencias en el uso de codones y evitar la formación de cuerpos de inclusión para obtener la mayor cantidad de proteína de forma soluble en el caso de levadura u obtener una mayor concentración de proteína recombinante usando el sistema bacteriano (Celik E, y Calik P, 2012; secciones 5.3 y 5.4). Además, se trabajará en la obtención de proteína purificada para realizar los ensayos de actividad y obtener las constantes cinéticas, para evitar los errores asociados que puede traer un análisis desde extractos crudos.

Por otro lado, la determinación de la especificidad de sustrato también se evaluará mediante ensayos de crecimiento de *S. cerevisiae* transformadas con AtSDH, las que se crecerán en medios que usan polioles como única fuente de carbono, donde se espera encontrar diferencias en la tasa de crecimiento celular entre los distintos medios utilizados y entre las levaduras transformadas con las no transformadas (sección 5.1.3). Cabe destacar que este ensayo no es un experimento de complementación heteróloga, debido a la carencia de *S. cerevisiae* mutantes para los genes SOR1 (YJR159W; Sarthy AV, y col, 1994) y SOR2 (YDL246c; Gonzalez y col, 2000), caracterizados como sorbitoles deshidrogenasas de este organismo. Este tipo de experimento, ha sido montado en el laboratorio para la evaluación de genes involucrados en el metabolismo de metales de *Arabidopsis* en células de *S. cerevisiae* (Freire M, 2013). Además, se evaluará la especificidad de sustrato mediante ensayos de actividad en geles nativos (sección 5.1.4), utilizando extractos crudos de *S. cerevisiae* transformadas con AtSDH (de Sousa SM, y col, 2008).

Otra función importante en la caracterización de cualquier gen, es determinar el patrón de expresión, entregando información sobre los órganos y estadíos de desarrollo donde se estaría expresando el gen, permitiendo relacionar la expresión con alguna funcionalidad del gen en la planta. Anteriormente, se generó una construcción PromotorAtSDH::GUS y se evaluó la expresión mediante el ensayo histoquímico GUS obteniendo una expresión ubicua en la planta (Parada R, 2011). Para complementar los análisis realizados es necesario evaluar cuantitativamente la expresión *AtSDH* en todos los órganos de la planta, incluidas las semillas, trabajo que se realizará durante esta Tesis mediante qRT-PCR cuantitativo (sección 5.3.2). Es particularmente importante determinar los niveles de expresión de *AtSDH* en semilla, ya que en análisis de las bases de datos públicas de microarreglos se ha observado una mayor cantidad de niveles de transcrito en semillas que en el resto de los órganos de la planta (sección 5.3). Además en plantas no-Rosáceas como soja (Kuo TM, y col, 1990) y maíz (de Sousa SM, y col, 2008), se ha detectado actividad SDH en semillas. Todos estos antecedentes sugieren que *AtSDH* estaría cumpliendo un rol distinto en plantas Rosáceas en comparación a no-Rosáceas, tema que será discutido en sección 6.

2. Hipótesis

El locus At5g51970 de *Arabidopsis thaliana* codifica para una Poliol Deshidrogenasa (AtSDH) la cual cataliza la oxidación de sorbitol y se expresa mayoritariamente en semillas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Caracterizar bioquímicamente la enzima AtSDH y determinar su patrón de expresión en los distintos órganos de *Arabidopsis thaliana*.

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la especificidad de sustrato de la enzima AtSDH, utilizando *S. cerevisiae* como sistema de expresión.
2. Determinar la actividad enzimática de AtSDH recombinante, expresada en los sistemas de *E. coli* y *S. cerevisiae*.
3. Analizar la expresión de *AtSDH* en diferentes órganos de *A. thaliana* mediante qRT-PCR.

4. Materiales y Métodos

4.1 Métodos comunes de Biología Molecular y Bioquímica.

4.1.1 Diseño de partidores.

Para el diseño de los partidores, se utilizó la secuencia del ORF correspondiente al gen ubicado en el locus At5g51970 del genoma de *A. thaliana* que codifica para AtSDH (1095 nucleótidos, TAIR).

Los partidores 5´BamHI y 3´NotI fueron diseñados previamente por Mandujano P, (2010), para la clonación de *AtSDH* en pET28a (vector de bacteria), utilizándolos en esta Tesis para la selección de clones positivos de bacteria portadores de la construcción. El par 5´BamHI y 3´NotI_{p426} se usó para la clonación de *AtSDH* en p426-GPD (vector de levadura).

Los partidores Actina-F/R y p426-GPD-exSMC-5´/3´ fueron suministrados por el grupo de Dra. Lorena Norambuena (BMV) para los análisis de evaluación por contaminación en *S. cerevisiae* (Figura 8).

Los partidores 26410-F/R, PP2A-F/R y Ubq10-F/R, usados para la amplificación de los genes normalizadores del qRT-PCR fueron obtenidos de Czechowsky y col, (2005), mientras que AtSDH1-F/R y AtSDH2-F/R, utilizados para la amplificación de una región interna de *AtSDH* fueron diseñados por Francisca Aguayo (BMV). Toda la información de los partidores utilizados en esta Tesis se encuentra detallada en la Tabla III.

Tabla III. Partidores utilizados en el desarrollo de esta Tesis.

Partidor	Secuencia (5'- 3')	Descripción
26410-F	GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC	Junto con el partidor 26410-R amplifican una región interna del gen normalizador At4g26410, de 81 pb (qPCR).
26410-R	GGTCCGACATACCCATGATCC	Junto con el partidor 26410-F amplifican una región interna del gen normalizador At4g26410, de 81 pb (qPCR).
3'NotI	GGACGCGGCCGCTCAGAGATTGAAC ATAACTTTG	Junto con 5' BamHI amplifican el ADNc de <i>AtSDH</i> . Subrayado el sitio <i>NotI</i> y en rojo el codón de término (Bacteria).
3'NotI-p426	GGCAGCGGCCGCAAGAGATTGAACA TAACTTTGATG	Junto con 5' BamHI amplifican el ADNc de <i>AtSDH</i> . Subrayado el sitio <i>NotI</i> y en rojo el reemplazo del codón de término.
5'BamHI	GGACGGATCCATGGGAAAGGAGG GATG	Junto con 3'NotI-p426 amplifican el ADNc de <i>AtSDH</i> . Subrayado el sitio <i>BamHI</i> y en rojo el codón de inicio.
Actina-F	CACACTTTCTACAATGAGCT	Junto con Actina-R amplifican una región interna de <i>actina4</i> de 680 pb para el cDNA y 780 pb para ADNg
Actina-R	GCAGTGATCTCTTTGCTCAT	Junto con Actina-F amplifican una región interna de <i>actina4</i> de 680 pb para el cDNA y 780 pb para ADNg
AtSDH-int2	ACTCCACCGTTCATGGCTCTTTA	Partidor interno de <i>AtSDH</i> utilizado para la secuenciación del ADNc luego de la clonación en p426-GPD.
AtSDH1-F	CGGCAGCAGATGAGATTGTACAAGT	Junto con el partidor AtSDH1-R amplifican una región internade 62 pb del exón 3 de <i>AtSDH</i> (qPCR)
AtSDH1-R	GTTCAACCTCAGAACCAACATCCTCT A	Junto con el partidor AtSDH1-F amplifican una región internade 62 pb del exón 3 de <i>AtSDH</i> (qPCR)
AtSDH2-F	TGTGTCTTGAGTTCCTGACAAGTGGT	Junto con el partidor AtSDH2-R amplifican una región internade 119 pb del exón 5 de <i>AtSDH</i> (qPCR)
AtSDH2-R	ATTGCTCCCACGAGCACTGGTTTCA	Junto con el partidor AtSDH2-F amplifican una región internade 119 pb del exón 5 de <i>AtSDH</i> (qPCR)
Oligo-AP	CGCCACGCGTTCGACTAGTACTTTTTT TTTTTTTTTT	Se utiliza para sintetizar ADNc, a partir de ARN, ya que este partidor hibrida con todos los ARNm presentes.
p426-GPD exSMC 5'	CCTCAATGGAGTGATGCAACC	Partidor externo al sitio de clonamiento de <i>AtSDH</i> en el vector p426-GPD (314 pb río arriba de <i>BamHI</i>). Control de contaminación de levadura.
p426-GPD exSMC 3'	CACGACGTTGTAAAACGACGG	Partidor externo al sitio de clonamiento de <i>AtSDH</i> en el vector p426-GPD (495 pb río abajo de <i>NotI</i>). Control de contaminación de levadura.

PCR Actina: Programa de PCR usado para la amplificación del gen de expresión constitutiva *Actina4* de *Arabidopsis thaliana*. El tamaño del amplificado desde ADN genómico es de 780 pb y desde ADNc es de 680 pb.

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	95°C	5 min	1
2	1	94°C	30 seg	35
	2	57°C	45 seg	
	3	72°C	35 seg	
3	1	72°C	10min	1

PCR p426: Programa de PCR usado para la amplificación de un fragmento interno del vector p426-GPD sin (866 pb) y con AtSDH (1919 pb), usado como control de contaminación en experimentos con levaduras.

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	95°C	5 min	1
2	1	94°C	30 seg	40
	2	55°C	45 seg	
	3	72°C	2 min 10 seg	
3	1	72°C	10min	1

4.1.3 Electroforesis en geles de agarosa.

Para determinar la integridad de las extracciones de ARN, verificar las reacciones de PCR y analizar las digestiones enzimáticas de ADN plasmidial, se utilizó la electroforesis de geles de agarosa. El gel de agarosa al 1% (p/v) se preparó con tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA, pH 8) y bromuro de etidio 1 µg/mL. Se mezcló 1 µL de tampón de carga [azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilene cianol 0,25% (p/v) y glicerol 80% (v/v), preparada en TAE 1X] por cada 5 µL de muestra analizada. El gel se colocó en una cámara de electroforesis embebida con tampón TAE 1X al que se le aplicó un potencial (80 V a 100 V) durante 30 min aproximadamente. Los marcadores de peso molecular utilizados como patrón estándar en los geles,

comprendían un rango de 250 a 10.000 kb o de 100 a 1.000 pb (1 kb o 100 pb respectivamente, Fermentas®). Posteriormente, los geles de agarosa se tiñeron durante 15 min en una solución de Bromuro de etidio 1 µg/mL y visualizaron bajo luz UV en un transiluminador (SYNGENE).

En los casos que se debían cuantificar muestras de ADN plasmidial, se utilizó el programa ImageJ, calculando la relación correspondiente a la cantidad de ng y volumen del marcador de peso molecular estándar (Fermentas®) con el volumen cargado de la muestra a analizar.

4.1.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE).

Para los análisis de la eficiencia del anticuerpo monoclonal anti-AtSDH, extracciones y purificaciones de AtSDH-myc-His y His-AtSDH desde levadura y bacteria, respectivamente, se realizaron SDS-PAGE. Los geles fueron montados utilizando el sistema Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). El gel separador fue preparado al 12 % (p/v) usando 1,7 mL de agua desionizada, 2 mL de una solución de acrilamida 30 % (p/v) y bis-acrilamida 0,8 % (p/v); 1,3 mL de un tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 50 µL de SDS 10% (p/v), 30 µL de APS 10 % (p/v) y 5 µL de TEMED. El gel concentrador fue preparado al 4 % (p/v) usando 1,54 mL de agua desionizada, 0,335 mL de una solución de acrilamida 30 % (p/v) y bis-acrilamida 0,8 % (p/v); 0,625 mL de un tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 25 µL de SDS 10% (p/v), 25 µL de APS 10 % (p/v) y 3 µL de TEMED. El tampón de corrida fue preparado con 25 mM Tris-HCl pH 8,8, 192 mM glicina y 0,1 % (p/v) **SDS**.

Se mezclaron las muestras con una solución 2X de tampón de carga [125 mM Tris-HCl pH 6,8, glicerol 20 % (v/v), β-mercaptoetanol 2% (v/v), azul de bromofenol 0,1 % (p/v)

y 4 % (p/v) SDS] y se dejaron hervir por 10 min. Los geles corrieron 30 min a 80 Vseguido de 90 min a 100 V. Luego fueron revelados mediante tinción de Coomassie (Merril, 1990) o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para posteriores western blots. El tamaño de las proteínas se determinó utilizando marcadores de peso molecular pre-teñido y/o sin teñir (ThermoScientific).

4.1.5 Inmunodetección mediante Western-Blot.

Posterior a los SDS-PAGE, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (ThermoScientific) usando la cámara de transferencia Trans-Blot® SD "Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell" (Bio-Rad). Los filtros, gel y membrana fueron embebidos en un tampón de transferencia que consistía en 192 mM glicina, 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,1 % (p/v) SDS y 15 % (v/v) metanol. La transferencia se efectuó a 15 V por 20 min. Después de la transferencia, se lavó la membrana en TBS-T [20 mM Tris-HCl pH 7,5; 140 mM NaCl y 0,1 Tween-20 % (v/v)] y se determinó la presencia de proteínas en la membrana, incubándola en una solución de Rojo de Ponceau [Rojo de Ponceau 0,1 % (p/v), ácido acético 5 % (v/v)].

Se lavó la membrana con agua destilada hasta que la tinción desapareciera, luego se bloqueó con leche en TBS-T desde 1 al 5 % (p/v) (Tabla V), en agitación suave a 4 °C ON. Al día siguiente se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 min. Después, la membrana fue incubada en TBS-T con o sin agente de bloqueo al 3 % (p/v) más el anticuerpo primario (Tabla V) en agitación suave por 2-3 h a TA. Luego de la incubación, se lavó la membrana 3 veces con TBS-T durante 10 min. Después del último lavado la membrana fue incubada en TBS-T, con o sin agente de bloqueo al 3 % (p/v) más el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla V) en agitación suave por 2-

3 h a TA. Transcurrido el tiempo, la membrana se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 min.

La detección colorimétrica se realizó utilizando fosfatasa alcalina. Se lavó la membrana 2 veces con tampón alcalino (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl y 5 mM MgCl₂) durante 5 min y se reveló la membrana con 20 mL de tampón alcalino más 66 µL de NBT 50 % (p/v) en DMSO y 33 µL de BCIP 50 % (p/v) en DMSO a TA, hasta que las bandas se hicieran visibles (~1-10 min). Finalmente la reacción se detuvo con 20 mL de EDTA 20 mM. Por otro lado, la detección quimioluminiscente se realizó con peroxidasa, utilizando el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoScientific), utilizando una placa de autorradiografía (GE Healthcare) en oscuridad.

Tabla V. Anticuerpos utilizados en el desarrollo de esta Tesis

Anticuerpos primarios					
Nombre	Tipo	Concentración	Agente de bloqueo	Fuente	Uso
Anti-c-Myc (A-14)	conejo IgG policlonal	(1:2000)	Sin bloqueo	Santa Cruz Biotechnology®	Detección de AtSDH-myc-His producido en levadura
Anti-His	ratón IgG monoclonal	(1:3000)	5 % leche	Sigma-Aldrich®	Detección de His-AtSDH producido en bacteria

Anticuerpos secundarios					
Nombre	Tipo	Concentración	Agente de bloqueo	Fuente	Uso
Anti-ratón	ratón IgG	(1:5000)	5 % leche	KPL	Revelado con peroxidasa
Anti-conejo	conejo IgG policlonal	(1:5000)	Sin bloqueo	KPL	
Anti-ratón	ratón IgG policlonal	(1:30000)	5 % leche	Sigma-Aldrich®	Revelado con fosfatasa alcalina

4.2 Generación del vector p426-GPD-AtSDH-myc-His.

4.2.1 Digestión de pCR8-AtSDH y p426-GPD.

Como primer paso en la generación del vector p426-GPD-AtSDH-myc-His, se contaba con el ADNc de *AtSDH* clonado en el vector de entrada pCR8® (Invitrogen), realizado anteriormente (Mandujano P, 2010). Además, el vector p426-GPD fue suministrado por el grupo de la Dra. Lorena Norambuena (BMV) el cual posee el promotor constitutivo de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y adiciona el epítotope myc-His C-terminal para la expresión y detección de la proteína recombinante en *S. cerevisiae*.

Para la clonación de *AtSDH* en p426-GPD, 950 ng de pCR8-AtSDH y 1050 ng de p426-GPD fueron digeridos con 10 U de *BamHI* y 20 U de *NotI* (Fermentas) más 2X tampón BamHI completando con agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 20 µl. La mezcla se incubó por 150 min a 37, °C. La verificación de las reacciones de digestión se realizó por electroforesis de geles de agarosa (sección 4.1.3).

Después, se prosiguió con la purificación de los fragmentos de interés. En el caso de pCR8-AtSDH se purificó el fragmento de ~1 kb correspondiente al ADNc de *AtSDH*, y para p426-GPD se purificó el fragmento de mayor tamaño que corresponde al vector linealizado (6781 pb). Ambos fragmentos se aislaron desde el gel utilizando el kit de purificación de ADN, Wizard® PCR Preps Resin (Promega). Los fragmentos purificados fueron recuperados en 10 µL de agua libre de nucleasas.

4.2.2 Reacción de ligación con ADN ligasa T4

La reacción de ligación se llevó a cabo usando una relación molar 3:1 de p426-GPD linealizado y el ADNc de *AtSDH*, mezcla que fue calentada a 50 °C por 5 min y luego enfriada rápidamente a 4 °C en hielo. La reacción se comenzó agregando 1X de tampón ADN ligasa T4 y 1 U ADN ligasa T4 Fermentas[®]. Finalmente, se dejó incubar a 26 °C por 1 h.

4.2.3 Transformación de p426-GPD-AtSDH-myc-His en *E. coli*.

A una alícuota de 200 µL de *E. coli* mach1 (Invitrogen) quimiocompetente descongelada en hielo, se le adicionó 50-150 ng del vector p426-GPD-AtSDH-myc-His y se incubó en hielo por 10 min. Posteriormente se aplicó un golpe térmico a 42 °C durante 1 min para volver a incubar en hielo. Luego, se agregó 1 mL de LB a las células, incubando durante 1 h a 37 °C y posteriormente se sembraron en placas de LB-agar suplementado con 100 µg/mL ampicilina (Amp) como antibiótico de selección. Transcurrido un día desde el sembrado de las células, se procedió a repicar colonias para su evaluación por PCR (sección 4.1.1) utilizando los partidores 5'BamHI y 3'NotI-p426 (Tabla III).

4.2.4 Purificación de ADN plasmidial desde células de *E. coli*.

Las colonias seleccionadas fueron crecidas en 5 mL de LB líquido con el antibiótico de selección correspondiente (Amp 100 mg/mL, sección 4.4.1). De los 5 mL, 1 mL fue guardado en stock con glicerol 30% (v/v) a -80 °C. El vector fue aislado de los 4 mL restantes mediante mini-preparaciones con el kit AxyPrep Plasmid Miniprep Kit, Axygene[®], según especificaciones del fabricante. Finalmente, las muestras fueron

resuspendidas en 50 μ L de Tris-HCl 2,5 mM, pH 8,5 y almacenadas a -20 °C. La cuantificación se llevó a cabo según sección 4.1.3.

4.2.5 Verificación de la construcción p426-GPD-AtSDH-myc-His mediante digestiones enzimáticas y secuenciaciones.

Para corroborar la correcta inserción de *AtSDH* en p426-GPD, se realizaron tres digestiones simples. La primera para linealizar el vector con 10 U de *BstEII* más 1X tampón O (10 U/ μ L, Fermentas®), la segunda y tercera para corroborar la orientación del inserto, con 10 U de *ClaI* más 1X tampón Tango (10 U/ μ L, Fermentas®) o 10 U de *Sall* más 1X tampón O (10 U/ μ L, Fermentas®). Todas las reacciones se llevaron a cabo por 2 h a 37 °C. Además se procedió a secuenciar el ADNc clonado con los partidores M13F-pUC, M13R-pUC e *AtSDH-Int2* (Macrogen ®).

4.3 Trabajo con levaduras

4.3.1 Crecimiento de levaduras *S. cerevisiae*.

S. cerevisiae BY4743 (Genotipo: *MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0*) fue crecida a 28 °C, por 36 h, en agitación constante a 180 rpm. Las células silvestres fueron crecidas en medio completo [YPD: 1 % (p/v) extracto de levadura, 2 % (p/v) peptona, 2 % (p/v) glucosa]. Para el crecimiento en medio sólido, además se agregó 2 % (p/v) agar-agar a cada medio.

La selección de las células transformadas genéticamente se realizó por auxotrofia de uracilo. Para su cultivo se crecieron en medio mínimo (YMM) compuesto por 0,17 % (p/v) YNB sin aminoácidos (aa) y sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Difco), 0,5 % (p/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 % (p/v) glucosa, 0,07 % (p/v) mezcla 1 de aa y 0,045 % (p/v) mezcla 2 de aa. La mezcla 1

se preparó con 100 mg de adenina, arginina, cisteína, leucina, lisina, treonina y triptófano, mientras que la mezcla 2 fue preparado con 50 mg de ácido aspártico, histidina, isoleucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina y valina.

4.3.2 Obtención de células electrocompetentes de *S. cerevisiae*.

La competencia de las células de levadura se logró aislando una colonia y dejándola crecer en 100 mL de YPD ON, hasta una $DO_{600nm} \sim 1,5$. Posteriormente, las células fueron centrifugadas (3000 g, 6 min, 4 °C), se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 1 volumen de agua fría estéril (4 °C), agitando la suspensión suavemente. Se repitió este paso 2 veces. El sedimento fue resuspendido en 4 mL de sorbitol 1 M estéril y frío. Finalmente, se centrifugó la suspensión y se resuspendieron las células en 100 μ L de sorbitol 1 M, guardando alícuotas (40 μ L) a 4 °C por no más de 2 d.

4.3.3 Transformación de *S. cerevisiae* mediante electroporación.

A la alícuota de células de levadura electrocompetentes (sección 4.3.2) se le añadió 50 ng de ADN plasmidial [p426-GPD (control) y p426-GPD-AtSDH-myc-His, por separado] y 1 μ L de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM). Esta mezcla se dejó incubando en hielo por 10 min antes de ser traspasada a una cubeta de electroporación (o electropermeabilización) de 2 mm. El electroporador usado fue Gene Pulser Xcell[®] Electroporation System (Bio-Rad). Las condiciones usadas en la transformación fueron: una diferencia de potencial de 1.5 kV, 25 μ F y 200 Ω con una caída de 4,5 ms. Luego de electroporar las células, éstas fueron incubadas en 1 mL YPD durante 1 h a 28 °C. Se tomaron 100 μ L del cultivo y se sembró en placas de YMM sólido. Se dejó incubar a 28 °C por 2 a 3 d.

4.3.4 Análisis de la especificidad de sustrato de AtSDH mediante la expresión heteróloga en levadura.

Luego de la transformación de levadura con el vector p426-GPD-AtSDH-myc-His se procedió a realizar ensayos de crecimiento utilizando sorbitol como fuente de carbono. Para esto se disponía de 3 tipos celulares. *S. cerevisiae* sin transformar (BY4743 silvestre), transformada con el vector vacío (BY4743 p426-GPD) y la transformada con el vector más AtSDH (BY4743 p426-GPD-AtSDH-myc-His).

Ambas células transformadas fueron crecidas en medio mínimo líquido (YMM) y la silvestre en medio completo (YPD) de acuerdo a la sección 4.3.1. Las células se dejaron crecer hasta una D.O.₆₀₀ cercano a 3 y se centrifugaron a 5000 g por 5 min. Luego se resuspendieron en YMM hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 1 y se realizaron diluciones celulares de 10 y 100 veces.

Paralelamente, se prepararon placas de YMM e YMM con uracilo [0,01 % (p/v)], más sustrato al 2 % (p/v) en cada caso. En estas placas se sembraron los distintos tipos celulares y sus diluciones, depositando una gota de 5 µL de cada muestra (Figura 11). Finalmente, las células fueron incubadas en una cámara de cultivo a 28 °C durante 5 d.

4.3.5 Extracción de AtSDH-myc-His en *S. cerevisiae*.

Para extraer la proteína AtSDH-myc-His recombinante en levadura, se crecieron las células en 100 mL de YMM (sin uracilo, sección 4.3.1) hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ cercana a 7-8. Luego se centrifugaron (3000 x g, 5 min, 4 °C) y se lavaron en 10 mM de azida de sodio, almacenándolas en seco a -80 °C. Posteriormente, 100 mg de células fueron resuspendidas en 1 mL de tampón de lisis [5 mM DTT, 10 µL protease inhibitor cocktail (Sigma) más CelLytic (Sigma) hasta completar 1 mL] más 100 mg de perlas de vidrio de 500 µm. Luego, la suspensión de células fue sometida a 4 pulsos de

30 s cada uno, de agitación fuerte utilizando el equipo Bead beater intercalados por 1 min de incubación en hielo. Finalmente se centrifugó la suspensión (20000 x g, 5 min, 4 °C), y se rescató el sobrenadante almacenándolo a -80 °C.

4.3.6 Ensayos de actividad de AtSDH mediante zimogramas.

Se cargaron 75 µg de extracto crudo de proteína de levadura, previamente cuantificadas mediante el método de Bradford (Bradford MM, 1976), en un gel de poliacrilamida nativo al 12 %, al cual se le aplicó un voltaje de 80 V, por 6 h a 4 °C. El tampón de carga de las muestras y el buffer de corrida, corresponden a los mismos que se utilizaron para preparar SDS-PAGE, pero sin adicionar SDS a las soluciones (sección 4.1.4).

Inmediatamente finalizada la corrida del gel, se incubó en un buffer que contenía 50 mM Tris-HCl pH 9, 0,15 mM NAD⁺, 0,18 mM NBT, 0,06 mM fenazina metasulfato y 68 mM sustrato (sorbitol, xilitol, manitol, glicerol, arabitol, eritritol) por 30 min a 37 °C para la visualización de la actividad SDH (de Sousa SM y col, 2008). Las reacciones se detuvieron enjuagando los geles en una solución de ácido acético 9 % y metanol 45 %.

4.3.7 Purificación de AtSDH-myc-His por cromatografía de afinidad de ión metálico (Ni) inmovilizado.

Posterior a la expresión y extracción de extractos crudos de proteína de levadura (sección 4.3.5) se procedió a purificar AtSDH-myc-His, utilizando la columna HisTrap de GE Healthcare® de 5 mL. Para la purificación se montó un sistema de flujo continuo, para eluir la proteína en un gradiente de imidazol de 20 mM a 600 mM como se detallará a continuación (Figura 3).

Primero se ambientó la columna con 10 Vol de tampón de ambientación (20 mM imidazol, 20 mM tampón fosfato pH 7,4 y 100 mM NaCl). Luego se cargaron 10 Vol aproximadamente de la muestra y se lavó la columna con 5 Vol de tampón de ambientación para evitar cualquier unión inespecífica, después se inició el gradiente utilizando 20 Vol iniciales de tampón de ambientación y 20 Vol de tampón de elución (600 mM imidazol, 20 mM tampón fosfato pH 7,4 y 100 mM NaCl). Finalmente, se lavó la columna con 10 Vol de tampón de elución para eluir cualquier remanente proteico que pudiese haber quedado pegado a la columna.

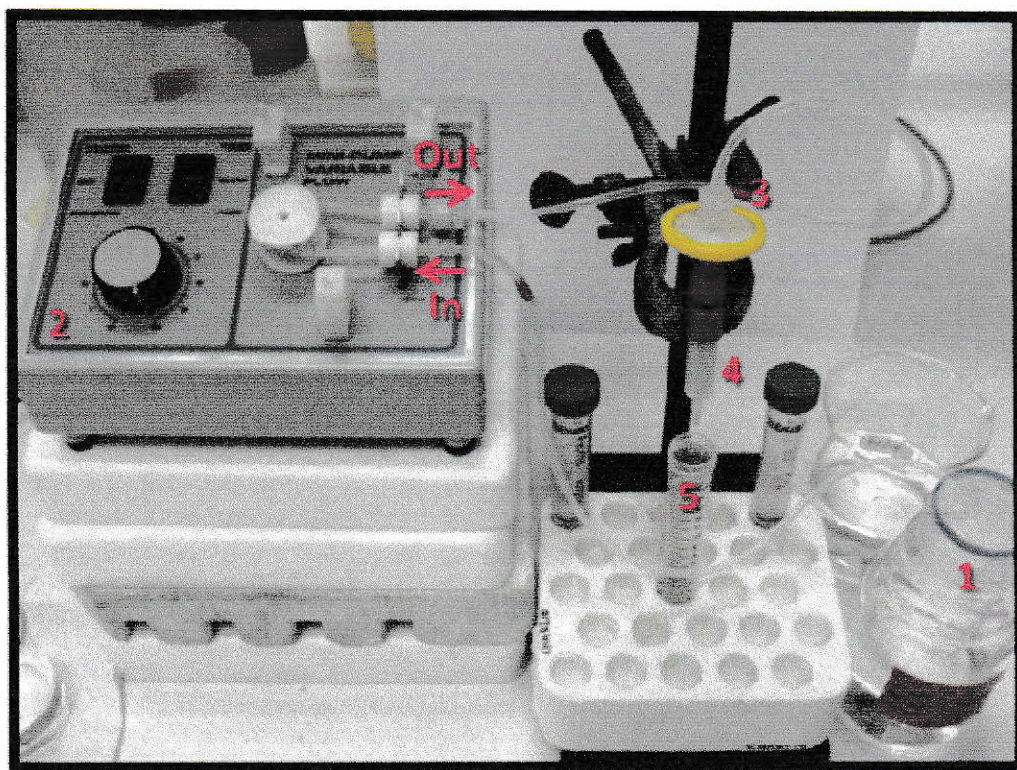


Figura 3. Sistema de purificación de AtSDH utilizando columna HisTrap. El tampón utilizado para la purificación (1) tiene un flujo continuo de 1 mL/min gracias al uso de una bomba peristáltica (2), la que regula la entrada (In) y salida (Out) de la solución. Después, el tampón pasa por un filtro de nylon de 0,22 μm (3) para evitar el ingreso de cualquier agente de mayor tamaño que pueda dañar la columna. De esa manera, la solución se incorpora directamente a la columna HisTrap (4) donde finalmente son recolectas las fracciones deseadas (5) para los posteriores análisis.

A todas las soluciones se les aplicó un flujo de 1 mL/min utilizando una bomba peristáltica VWR® Pumps, Variable Flow, y se recolectaron las distintas fracciones en volúmenes de 5 mL. La detección de la proteína de interés se llevó a cabo mediante el método de Bradford (Bradford MM, 1976) y SDS-PAGE (sección 4.1.4)

4.3.8 Ensayos de actividad de AtSDH mediante espectrofotometría.

Para detectar la actividad SDH de la enzima recombinante se usó una mezcla de reacción con un tampón Tris-HCl 100 mM pH 9,0, sorbitol 5 mM, NAD⁺ 1 mM en un volumen final 500 μ L. La reacción se iniciaba agregando la proteína recombinante (AtSDH-myc-His) en diferentes cantidades, ya sea de extractos crudos o de proteína purificada. Como control positivo de la reacción se usó la SDH de oveja (Sigma®), agregando 0,1 U por reacción. Como control negativo en los ensayos con extractos crudos, se utilizó el extracto de levadura transformada con el vector vacío (p426-GPD). La reacción se siguió en un espectrofotómetro como el aumento de absorbancia a 340 nm utilizando una cubeta de cuarzo. Para el análisis de otros sustratos (xilitol, eritritol, arabitol, manitol o myo-inositol, 68 mM), se reemplazó sorbitol en la solución de reacción.

4.4 Trabajo con bacterias

4.4.1 Crecimiento de bacterias *E. coli*.

Para el desarrollo de esta Tesis se contaba con células de *Escherichia coli* BL21 transformadas con el vector pET28a-AtSDH que permite la expresión de la proteína recombinante His-AtSDH, trabajo realizado anteriormente (Mandujano, 2010).

Las células de bacteria transformadas fueron cultivadas a 37 °C durante 16 h con

agitación a 250-300 rpm, en medio LB [1% (p/v) triptona, 1% (p/v) NaCl y 0,5% (p/v) extracto de levadura]. El antibiótico de selección utilizado fue kanamicina 100 µg/mL.

4.4.2 Expresión de His-AtSDH en *E. coli*.

La producción de la proteína recombinante His-AtSDH se realizó mediante un protocolo de inducción por IPTG. Los clones de *E. coli* cepa BL21 transformados con pET28a-His-AtSDH fueron crecidos en 5 mL de medio LB según sección 4.4.1. El cultivo fue diluido 50 veces con medio LB fresco, traspasado a un matraz de 250 mL e incubado (37 °C) hasta alcanzar una $DO_{600nm} \sim 0,8$. Se agregó IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se volvió a incubar a 37 °C por 4 h.

Posteriormente, se centrifugaron las células (3000 x g, 5 min, 4 °C), se resuspendieron en 20 mL de un tampón de lisis [Tris-HCl 100 mM pH 7.4, EDTA 1mM, NaCl 50 mM, Triton X-100 0.1% (v/v), DTT 1 mM y PMSF 0.1 mM] frío y estéril, traspasando la suspensión a un tubo de 50 mL. Las células fueron lisadas por un sonicador Misonix® Microson xl2000 Ultrasonic Cell Disruptor a 30 Watts rms. Se aplicaron 10 pulsos de 30 s cada uno en intervalos de 1 min en donde las células se mantuvieron continuamente en hielo. Cuando la suspensión celular se observó clarificada se centrifugó a 20000 x g por 35 min a 4 °C. His-AtSDH se expresó formando cuerpos de inclusión y se encontró en el precipitado de la centrifugación (sección 5.3.1). Por lo tanto, las proteínas se recuperaron solubilizándolas en 10 mL de un tampón que contenía Tris-HCl 100 mM pH 7.4, urea 6 M y DTT 1 mM a 4 °C por >12 h. Finalmente, se ajustó el volumen manteniendo una concentración de proteínas de ~0.5 mg/mL.

4.4.3 Purificación de His-AtSDH por cromatografía de afinidad de ión metálico (Ni) inmovilizado.

Al igual que en la sección 4.3.7 se procedió a purificar la proteína His-AtSDH desde extractos crudos de *E. coli*, utilizando el mismo sistema de purificación, pero se emplearon tampones distintos, los cuales contenían urea 6 M para permitir la solubilización proteica.

El tampón de ambientación estaba compuesto de 20 mM imidazol, 100 mM Tris-HCl pH 7,4, urea 6 M, 300 mM NaCl y 1 mM DTT. El tampón de elución se preparó con los mismos reactivos y concentraciones, excepto el imidazol que se encontraba a 600 mM.

A todas las soluciones se les aplicó un flujo de 1 mL/min, y se recolectaron las distintas fracciones en volúmenes de 5 mL. La detección de la proteína de interés se llevó a cabo mediante el método de Bradford (Bradford MM, 1976) y SDS-PAGE (sección 4.1.4).

4.5 Trabajo con Plantas.

4.5.1 Esterilización y sembrado de semillas.

Se sembraron semillas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (ecotipo Col-0). La esterilización de semillas se llevó a cabo agregando Triton X-100 0,1% por 30 min, luego Triton X-100 0,1% en etanol 70% por 5 min, seguido por Triton X-100 0,1% más cloro 1,5% por 10 min. Finalmente, se lavaron las semillas con agua destilada estéril 4 veces, siempre en agitación constante y se dejaron estratificar en agua ON a 4 °C.

Posteriormente, para la recolección de las raíces y hojas rosetas de plantas silvestres, las semillas fueron sembradas *in vitro* en placas MS sólido (Murashige T, y Skoog F, 1962) con 4,43 g/l MS, sacarosa 3%, myo-inositol 60 mg/l y agar 0,6% a pH 5,7.

En cambio, para la recolección de tallos, hojas caulinares, flores, silicuas y semillas secas, las semillas previamente esterilizadas fueron sembradas en un sistema de cultivo en medio hidropónico. El medio de cultivo hidropónico consistió en una solución nutritiva 100X a pH 5,0, la que contenía; KNO_3 125 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 150 mM, MgSO_4 75 mM, KH_2PO_4 50 mM, KCl 5 mM, H_3BO_3 5 mM, MnSO_4 1 mM, ZnSO_4 200 μM , CuSO_4 150 μM , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 7,5 μM , Na_2SiO_3 10 mM y Sprint 330 7,7 mM (Fe quelado en DTPA; ácido dietilen triamino penta acético). Para preparar 5 L de este medio, primero se disolvieron en 3 L, todas las sales en forma secuencial y en constante agitación, con las excepciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y Na_2SiO_3 . La primera debió ser disuelta previamente y una vez agregada a la solución se llevó a pH 5 con KOH 10 M. Una vez ajustado el pH, se agregó Na_2SiO_3 y se alcanzó un volumen final de 5 L (Gibeaut DM, y col, 1997). El soporte donde crecieron las plantas consistió en un sistema comercial denominado *AraHarvest set*, el cual optimiza la recolección de semillas y distribución de las plantas (Figura 4).

Las condiciones de crecimiento durante todo el desarrollo fueron en cámaras de cultivo a 22 °C con un fotoperíodo de 16 h luz (5500 - 8000 Lux) y 8 h de oscuridad. Raíces y hojas rosetas fueron colectadas desde las placas luego de 25 d de desarrollo, mientras que tallos, hojas caulinares, flor y silicuas desde plantas de 8 semanas y semillas secas colectadas de plantas de 12 semanas.

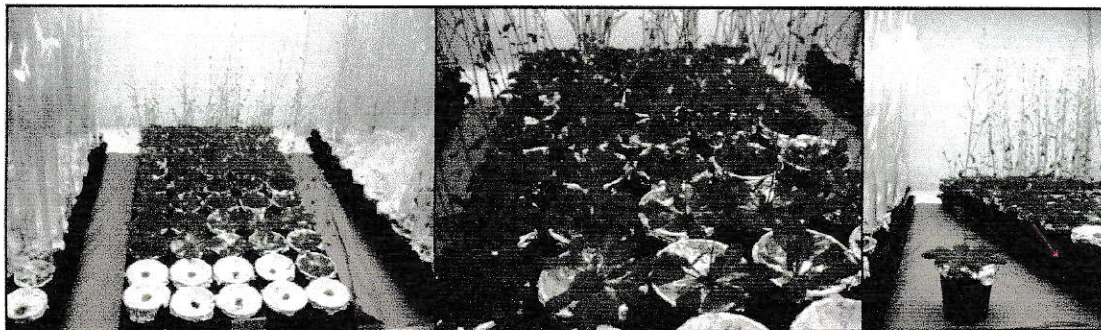


Figura 4. Sistema de cultivo de plantas de Arabidopsis. El cultivo de plantas de Arabidopsis se realizó utilizando el sistema AraHarvest. El sistema consta de pocillos individuales donde son sembradas las plantas en una base de lana de roca cubierta con papel aluminio. Cada pocillo es depositado en una bandeja común con una capacidad para 50 plantas. La flecha muestra el espacio donde se agrega el medio hidropónico en la bandeja. Las plantas fueron cultivadas con ciclo día largo (16 h Día/8 h Noche) a 22 °C.

4.5.2 Extracciones de ARN de plantas.

La extracción de ARN vegetal de raíces, hojas rosetas, tallos, hojas caulinares, flores y silicuas se realizó utilizando el kit de extracción UltraClean™ Plant RNA isolation kit (MOBIO Laboratories, Inc) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras fueron extraídas utilizando dos réplicas biológicas (2 sets de plantas de 25 unidades cada uno) y tres réplicas técnicas.

Para la extracción de ARN desde semillas secas se empleó el protocolo descrito por Meng y Feldman (2010) con algunas modificaciones. Aproximadamente 100 mg de cada tejido fueron pulverizados en morteros estériles, en presencia de nitrógeno líquido más 1,2 mL de solución de extracción (100 mM Tris HCl pH 9,5, 150 mM NaCl, 1% sarcosil y 5 mM DTT). El homogenizado fue traspasado a un tubo Eppendorf de 2 mL. Luego se centrifugó la mezcla por 10 min a 11.000 g y 4 °C. El sobrenadante fue colectado en un nuevo tubo de 2 mL y se agregó 0,5 mL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 30 s, después se agregó 0,5 mL de fenol ácido y se agitó nuevamente. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas por 15 min a 11.000 g

y 4 °C. Nuevamente fue colectada la fase acuosa, evitando la interfase, en un tubo de 1,5 mL y se agregó 90 µL de acetato de sodio 3 M pH 5,2 más 600 µL de isopropanol. La solución fue mezclada e incubada horizontalmente por 10 min en hielo. Después se centrifugó por 10 min a 11.000 g y 4 °C, y el sedimento fue secado por 5 min a TA. Luego, el sedimento fue resuspendido en 1 mL de reactivo TRIzol® (Invitrogen) y se aplicaron 4 pulsos de agitación vigorosa de 30 s cada uno intercalados por incubaciones en hielo de 1 min. En seguida se agregó 200 µL de cloroformo y se agitó la mezcla vigorosamente por 15 s. Se incubó por 2 min en hielo y se centrifugó por 15 min a 11.000 g y 4 °C. El sobrenadante fue traspasado a un nuevo tubo de 1,5 mL y se agregó 500 µL de isopropanol. Se incubó la mezcla durante 10 min en hielo. Después de centrifugar por 15 min a 11.000 g a 4 °C se lavó el sedimento con 1,2 mL de etanol 75 % y se repitió la centrifugación ahora por 10 min. Se retiró el sobrenadante, y el sedimento se dejó secar por 10 min a TA. Una vez seco, se agregó al sedimento 100 µL de agua DEPC, 10 µL 3 M acetato de sodio (pH 5,2) en agua DEPC y 250 µL de etanol 100 %, para dejar incubando por 20 min en hielo. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron las muestras por 10 min a 11.000 g a 4 °C y nuevamente se dejó secar el sedimento a TA. Finalmente las muestras fueron resuspendidas en 50 µL de agua libre de RNAsa y se procedió a verificar su integridad mediante electroforesis en geles desnaturantes de agarosa. También se determinó la concentración de ARN de las muestras y las razones 260/280 y 260/230, indicativas de la pureza del ARN con respecto a proteínas y a sales y solventes, respectivamente, en un espectrofotómetro NanoDrop3300 Fluorospectrometer (ThermoScientific). Las muestras fueron almacenadas a -80 °C.

4.5.3 Purificación de ARN vegetal.

En los casos en que las razones 260/280 y 260/230 observadas en el NanoDrop fueron insuficientes para considerar que el ARN extraído era de la pureza adecuada para la síntesis del ADNc (razones $\geq 1,6$), el ARN se limpió agregando un volumen de cloroformo frío y agitando vigorosamente durante 5 min. Luego de centrifugar a 10.000 g durante 5 min a 4 °C, la fase acuosa (que contiene el ARN) se precipitó con 3 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M, pH 4,8, a -20 °C ON. Luego de centrifugar a 10.000 g durante 30 min a 4°C, el precipitado de ARN se lavó con 1 mL de etanol 75% en agua libre de nucleasas y una vez seco se resuspendió en 30 μ L de agua libre de nucleasas y se procedió a verificar su integridad mediante electroforesis en geles desnaturantes de agarosay a medir su concentración y pureza mediante espectrofotómetro (NanoDrop).

Los geles denaturantes de ARN fueron preparados con 1,5 % agarosa, 1 X MOPS, 1 X formaldehído, todo mezclado en agua DEPC. Una vez enfriado y gelificado, el gel fue depositado en una cámara de electroforesis embebida en MOPS 1 X y además se prepararon las muestras, las que fueron calentadas a 70 °C por 10 min más el buffer de carga denaturante 1 X (Fermentas) y rápidamente enfriadas en hielo. Finalmente se aplicó una diferencia de potencial de 70 V por 45 min y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador (SYNGENE).

4.5.4 PCR de Transcripción Reversa (RT-PCR).

Para la síntesis de ADNc a partir de los ARNs extraídos de cada órgano de *Arabidopsis* primero se llevó a cabo el tratamiento con DNasal (Thermo Scientific), promoviendo la eliminación de remanentes de ADN genómicos. 6 μ g de ARN de alta pureza se



incubaron con 50 U de DNasaI, 40 U de Inhibidor de RNasa (Ribolock, ThermoScientific) y 1x de tampón de la DNasaI (ThermoScientific), en agua libre de nucleasas en un volumen de reacción de 20 μ L, durante 35 min en un baño termostático a 37 °C. Luego, la reacción se detuvo agregando 2 μ L de EDTA 25 mM y se incubó a 65 °C por 10 min para inactivar la DNasaI.

Para la síntesis del ADNc, se tomaron 9,5 μ L del RNA previamente tratado con DNasaI (3 μ g) y se incubaron con 3 μ L de oligo AP 10 mM (Tabla III) en tubos de 0,2 mL durante 5 min a 70 °C (Programa RT-PCR; Tabla VI). Luego, se detuvo el programa y los tubos se incubaron durante 5 min en hielo, tras lo cual se les agregó a cada uno 37,5 μ L de una mezcla de RT en agua libre de nucleasas compuesta por: 3 μ L de Improm-II™ (Promega), 40 U de Inhibidor de RNasa (Ribolock, ThermoScientific), 600 nM dNTPs (Fermentas), MgCl₂ 6,6 mM y 10 μ L de tampón 5X de Improm-II™ (Promega). Finalmente se continuó con el programa RT-PCR.

Previo al análisis por qRT-PCR de los ADNc sintetizados, se realizó un PCR para amplificar un fragmento de *actina4* de las distintas muestras para determinar si se encontraban sin restos de ADN genómico (sección 4.1.1).

Tabla VI: RT-PCR: Programa de PCR usado para la síntesis de todos los ADNc a partir de la retrotranscripción de los ARNm encontrados en una extracción de ARN.

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

4.5.5 PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR)

La cuantificación de la expresión de *AtSDH* en los órganos de *Arabidopsis* fue realizada mediante qRT-PCR, utilizando la sonda fluorescente SYBER green, contenida en el kit SensiMix™ SYBER Hi-Rox (Bioline) y se empleó el termociclador *Stratagene Mx3000P* (Agilent Technologies).

El mix de reacción consistió en 10 µL del Master Mix (que contiene la Taq DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y la sonda SYBR green), 250 nM del partidor en sentido y antisentido para la amplificación de fragmentos de los genes *PP2A*, *26410* y *AtSDH1* mientras que se usaron 350 nM de los partidores para *Ubq10* y *AtSDH2* (Tabla III), hasta completar un volumen final de 20 µL con agua libre de RNAsa. El programa utilizado fue el de qPCR (Tabla VII) para todas las reacciones y además cada una fue realizada con triplicado técnico. De los pares de partidores seleccionados *PP2A* (AGI: *At1g13320*), *Ubq10* (AGI: *At4g05320*) y *26410* (AGI: *At4g26410*) fueron elegidos por ser genes *housekeeping* confiables para la evaluación de expresión génica en distintos órganos de *Arabidopsis* (Czechowsky T y col., 2005), mientras que *AtSDH1* y *AtSDH2* se utilizaron como partidores para la amplificación de distintos fragmentos de *AtSDH*, fortaleciendo los datos obtenidos.

Dado que la sonda utilizada para la cuantificación fue SYBR® Green, luego de cada programa de amplificación se realizó una curva de disociación, consistente en la medición de la fluorescencia durante toda la denaturación y renaturación del producto de PCR (95 °C por 1 min, 60 °C por 30 s y 95 °C por 30 s, Tabla VII). La presencia de una sola señal en esta curva en un gráfico de Fluorescencia vs. T° es indicativo de la especificidad de la reacción.

Tabla VII: Programa de qPCR: Programa de PCR usado para la amplificación de los fragmentos de los genes *housekeeping PP2A*, *Ubq10* y *At4g26410* además de los fragmentos del gen *AtSDH* con los partidores *AtSDH1* y *AtSDH2*.

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	25°C	1seg	1
2	1	95°C	10min	1
3	1	95°C	15 seg	40
	2	55°C	15 seg	
	3	72°C	15 seg	
4	1	95°C	5 seg	1
	2	25°C	1 seg	
	3	55°C	15 seg	
	4	95°C	1 seg	

5. Resultados

5.1 Determinación de la especificidad de sustrato de AtSDH, utilizando *S. cerevisiae* como sistema de expresión.

Para determinar la especificidad de sustrato de la enzima AtSDH, se utilizó en esta Tesis de Magister, *S. cerevisiae* como sistema de expresión y acumulación de AtSDH recombinante. El primer paso en el desarrollo del objetivo 1 (sección 3.2), consistió en generar la construcción p426-GPD-AtSDH-myc-His (Figura 5), capaz de expresar y acumular la proteína recombinante AtSDH-myc-His en *S. cerevisiae*. Esta construcción consistió en la clonación de *AtSDH* mediante corte y ligación, donde se usaron los sitios de restricción *Bam*HI y *Not*I, sin embargo para fusionar un epítipo myc-His en el extremo carboxilo terminal, fue necesario clonar AtSDH sin codón de término (TGA reemplazado por TTG). Además el vector posee el promotor de expresión constitutiva GPD (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) y el casete Ura3 para la síntesis de orotidina 5-fosfato descarboxilasa como agente de selección por auxotrofia de uracilo (Figura 5).

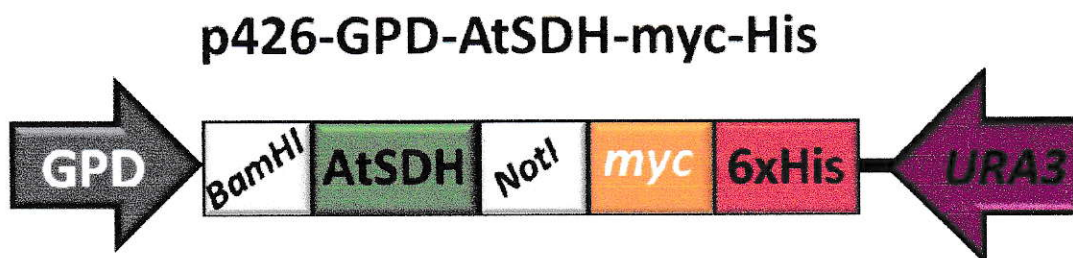


Figura 5. Esquema de la construcción p426-GPD-AtSDH-myc-His. Vector p426-GPD-AtSDH, usado para la generación y acumulación de la proteína recombinante AtSDH-myc-His en células de *S. cerevisiae*. GPD Prom: promotor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, *Bam*HI y *Not*I: sitios de clonamiento de AtSDH, myc: epítipo de reconocimiento, 6XHis: epítipo de 6 histidinas y URA3: Casete de regulación de la síntesis de Uracilo.

5.1.1 Generación de la construcción p426-GPD-AtSDH-myc-His.

Debido a los antecedentes entregados en la introducción (sección 1.2.3) relacionados con la formación de cuerpos de inclusión en bacteria utilizando el vector pET28a-His-AtSDH, se trabajó con la expresión de AtSDH en un sistema eucarionte como es *S. cerevisiae*. Este sistema presenta ventajas significativas comparado con uno procarionte en la expresión de AtSDH, en cuanto a la solubilidad proteica, uso de codones, plegamiento, entre otros (sección 1.2.3).

Primero, se generó un vector para la expresión recombinante de AtSDH en levadura. Para eso, simultáneamente se realizó una digestión de pCR8-AtSDH (Vector de entrada donde se clonó el ORF de AtSDH; Mandujano P, 2010) y del vector de destinación p426-GPD (Norambuena L, y col, 2002), con *Bam*HI y *Not*I (sección 4.2.1). Ambos fragmentos, tanto el ORF de AtSDH (1095 pb) como el vector de destinación linealizado (p426-GPD; 6606 pb), fueron liberados y purificados desde un gel de agarosa para su ligación con la enzima T4 ligasa (sección 4.2.2). Posteriormente se transformaron células de *E. coli* mach1 y se seleccionaron los clones positivos (portadores de la construcción p426-GPD-AtSDH-myc-His) al crecer las células en un medio de cultivo con kanamicina como agente de selección y luego se verificó por PCR (Figura 6). De 10 clones evaluados por PCR (Figura 6; clones 11 al 20), los clones 19 y 20 mostraron una banda correspondiente al amplificado de AtSDH (1095 pb), sin embargo aquellos clones que crecieron en un medio con kanamicina (clones del 11 al 18), pero no dieron amplificado por PCR, podría deberse a una transformación de células con vector p426-GPD autoligado pero sin inserto (*AtSDH*), lo que permite a las células crecer en un medio con kanamicina y no ser detectadas mediante PCR.

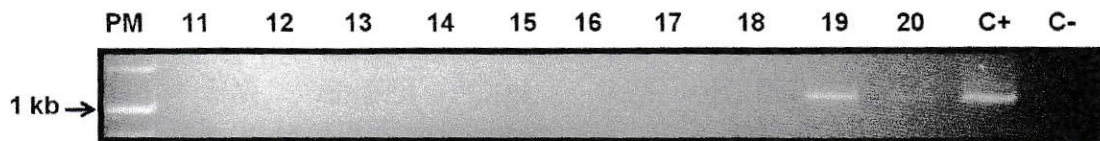


Figura 6. PCR de colonias de *E. coli* transformadas con p426-GPD-AtSDH-myc-His. La selección de los clones portadores de la construcción fue mediante la amplificación de *AtSDH* (~1100 pb). De 10 clones evaluados (11 al 20), los clones 19 y 20 mostraron la banda esperada. C+ (control positivo) corresponde a ADN plasmidial de pCR8-AtSDH. C- (control negativo) corresponde al mezcla de reacción de PCR usando agua como templado. PM: Estándar de peso molecular.

A los clones positivos (Colonias 19 y 20; Figura 6), portadores del vector de interés (p426-GPD-AtSDH-myc-His), se les realizó una purificación de su ADN plasmidial y se hizo una digestión enzimática para corroborar la correcta inserción de *AtSDH* en p426-GPD. La Figura 7 corresponde a un gel de agarosa donde se observa una sola banda en los carriles cargados con ADN plasmidial digerido con *BstEII*, enzima que corta una sola vez en el plasmidio (~7800 pb, tamaño esperado para vector lineal), mientras que los carriles *ClaI* y *SaII* corresponden a ADN plasmidial de ambas colonias digeridos con las enzimas de restricción mencionadas, las cuales cortan cada una en dos sitios de la construcción generada; un corte en la secuencia de *AtSDH* y otro corte en el vector p426-GPD. De esta manera se liberan dos fragmentos de ~500 y ~7300 pb en el caso que el inserto (*AtSDH*) se encuentre clonado en sentido al promotor GPD (*AtSDH* río abajo del promotor) o dos fragmentos de ~900 y ~6900 pb cuando el inserto está clonado en antisentido al promotor. Para ambos clones se detectó la banda de ~500 pb (Figura 7; flechas rojas) lo que indica que el inserto se encuentra clonado correctamente en el vector. Además, se secuenció el fragmento clonado para descartar posibles mutaciones y verificar la correcta inserción del transgén, obteniendo perfiles idénticos a lo reportado a la base de datos para el locus At5g51970 (Anexo 1).

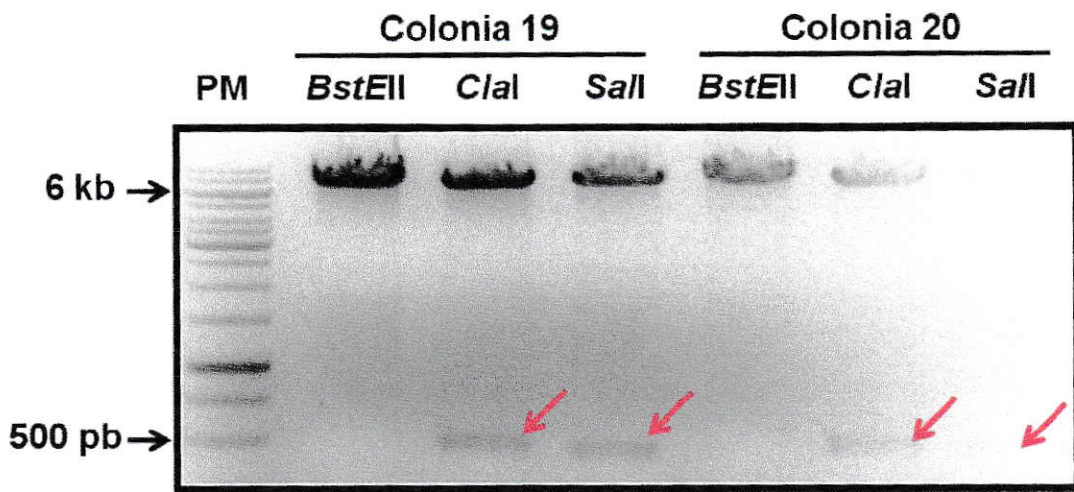


Figura 7. Digestión enzimática de la construcción p426-GPD-AtSDH-myc-His con las enzimas de restricción *BstEII*, *ClaI* y *SalI*. Las colonias 19 y 20 corresponden a ADN plasmidial de 2 colonias bacterianas portadoras de la construcción p426-GPD-AtSDH-myc-His. *BstEII* digiere una vez el vector obteniendo el vector lineal de ~7800 pb, y tanto *ClaI* como *SalI* cortan dos veces el plasmidio liberando un fragmento de ~500 pb y otro de ~7300 pb en caso de encontrar *AtSDH* clonado en sentido al promotor GPD, y un fragmento de ~900 pb más otro de ~6900 pb en caso que esté en antisentido al promotor. Tanto *ClaI* como *SalI* generan el mismo patrón de digestión. Las flechas rojas muestran los fragmentos de ~500 pb obtenidos en las digestiones, lo que indica la correcta clonación de *AtSDH* en el vector p426-GPD.

Una vez verificada la correcta inserción de *AtSDH* en el vector de destinación se transformaron células de *S. cerevisiae* (sección 4.2.3), seleccionando los clones positivos mediante crecimiento de células de levadura en un medio de selección por auxotrofia de uracilo y posterior PCR. De 9 clones evaluados (09 al 16) todos presentaron una banda para la amplificación de *AtSDH* (Figura 8). Sin embargo no todas las bandas migraron igual, lo que se explica por eventos técnicos frecuentes que suelen darse al correr geles de agarosa los que generan una corrida en forma de sonrisa entre las muestras. De esta manera se generó exitosamente un vector de expresión de *AtSDH*-myc-His en *S. cerevisiae*.

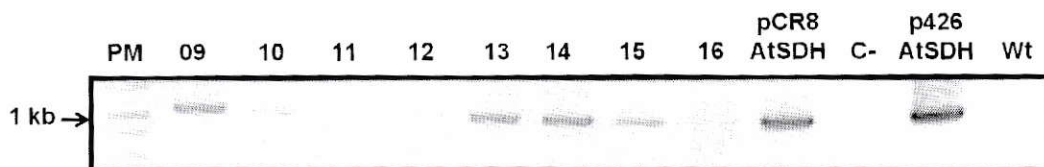


Figura 8. PCR de colonia de *S. cerevisiae* transformada con p426-GPD-AtSDH-myc-His. La selección de los clones portadores de la construcción fue mediante la amplificación de *AtSDH* (~1100 pb). Los 9 clones evaluados (09 al 16) mostraron la banda esperada. Los carriles de pCR8-*AtSDH* y p426-*AtSDH* corresponden a ADN plasmidial usados como control positivo de PCR. Los controles negativos corresponden a C- (mezcla de reacción de PCR usando agua como templado) y Wt: colonia de *S. cerevisiae* silvestre, sin transformar. PM: Estándar de peso molecular.

Con la generación de células de *S. cerevisiae* portadoras de la construcción p426-GPD-*AtSDH*-myc-His se continuó con el objetivo de determinar la especificidad de sustrato de *AtSDH* mediante tres ensayos experimentales. Dos de los ensayos están basados en determinar la tasa de crecimiento de las levaduras transformadas con *AtSDH* en comparación a grupos controles de *S. cerevisiae* sin transformar o transformadas con el vector sin inserto, donde las células fueron crecidas en un medio suplementado con distintos polioles como única fuente de carbono. Este tipo de ensayo ha sido desarrollado antes en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, donde se evaluó el crecimiento de *S. cerevisiae* transformada con vectores portadores de genes relacionados con el metabolismo de metales, cuantificando la tasa de crecimiento de las levaduras en medios con distintos metales, obteniendo resultados satisfactorios que validan la técnica (Freire, 2013). El tercer ensayo fue mediante zimogramas, que consiste en la preparación de geles nativos de proteínas (PAGE) donde se cargaron extractos crudos de *S. cerevisiae* transformadas con *AtSDH* y se realizaron ensayos de actividad utilizando distintos polioles como sustrato de reacción. Este tipo de experimento también ha sido utilizado anteriormente para la evaluación de SDH de plantas (de Sousa y col, 2008). Estos tres ensayos se explicarán en detalle en sección (5.1.2).

5.1.2 Ensayo de la especificidad de sustrato en *S. cerevisiae* transformada con p426-GPD-AtSDH-myc-His en medio líquido.

Se transformaron células de *S. cerevisiae* BY4743 con p426-GPD-AtSDH-myc-His (sección 5.1.1) y con el vector sin inserto (p426-GPD sección 4.3.3). Se evaluó el aumento en la proliferación celular de aquellas células transformadas con AtSDH sembradas en un medio mínimo, suplementado con distintos polioles como única fuente de carbono (un poliol por ensayo) y se comparó el crecimiento de las células transformadas con AtSDH con las células transformadas con el vector sin inserto. Además se comparó la tasa de crecimiento entre las células transformadas con AtSDH crecidas en los distintos polioles usados como única fuente de carbono.

Antes de realizar los ensayos de crecimiento de las células de *S. cerevisiae*, se corroboró que AtSDH-myc-His se estuviera expresando y acumulando en este organismo. Las células de levadura transformadas con la construcción generada en sección 5.1.1, fueron crecidas en medio mínimo (YMM, sin uracilo; sección 4.3.1) y luego se procedió a obtener los extractos crudos de levaduras los que fueron evaluados mediante western blot para determinar la presencia de AtSDH-myc-His (Figura 9). En el western blot anti-myc de la Figura 9 se observa una banda de mayor tamaño cercana a los (~45 kDa, flecha roja) que corresponde a AtSDH-myc-His y tres bandas de menor tamaño (~39, 36 y 25 kDa) donde se sugiere la presencia de degradado de la misma proteína recombinante, ya que estas bandas no están presentes en el extracto crudo de *S. cerevisiae* transformada con el vector sin inserto (p426-GPD).

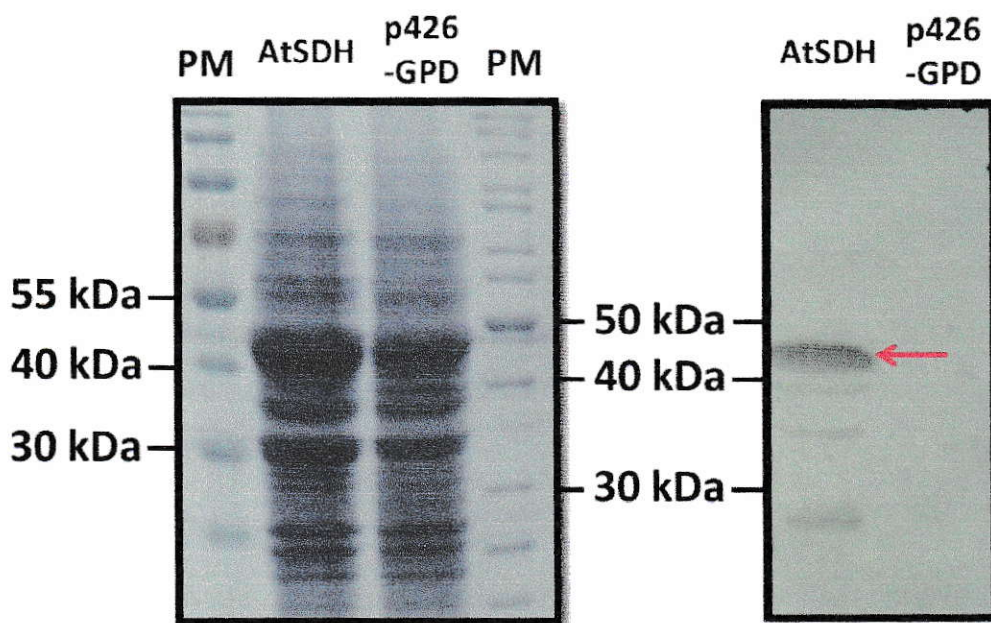


Figura 9. Análisis de la acumulación de AtSDH-myc-His en *S. cerevisiae*. Izquierda; SDS-PAGE de extractos crudos de *S. cerevisiae* transformada con p426-GPD-AtSDH-myc-His (AtSDH) y *S. cerevisiae* transformada con vector sin inserto (p426-GPD). Derecha; Western blot anti-myc (1:2000), donde se observa una banda de ~45 kDa correspondiente a AtSDH myc-His (flecha roja) y tres bandas de menor tamaño (~39, 36 y 25 kDa), posiblemente degradado de la proteína recombinante.

Evaluada la acumulación de AtSDH-myc-His en *S. cerevisiae* se procedió a realizar los ensayos de especificidad de sustrato mediante un análisis cuantitativo de la proliferación celular, donde se creció las células en medio mínimo líquido en placas de 96 pocillos, en constante agitación y se registró la cinética de crecimiento cada 2 h, evaluando la turbidez del cultivo como indicador del número de células, por medio de un lector de absorbancia durante 24 h. Luego de tres intentos no se detectó crecimiento en ninguna de las muestras suplementadas con polioles (sorbitol, xilitol, arabitol, manitol, glicerol, eritritol y myo-inositol al 2% p/v; Adams A, y col, 1997) como única fuente de carbono. Sin embargo, en las células cultivadas en glucosa (control positivo, 2 % p/v), fue posible observar crecimiento en las levaduras transformadas con

AtSDH (Figura 10, A; rombos azules) y en las transformadas con el vector sin inserto (Figura 10, A; p426-GPD, cuadrados rojos), mientras que en el control negativo (Figura 10, A; triángulos verdes), correspondiente al medio de cultivo sin ningún tipo celular (como control de contaminación), no se observó crecimiento celular, como era lo esperado (Figura 10, A). Por otro lado, se presenta como ejemplo la curva de crecimiento de sorbitol para los mismos tres tipos celulares, donde no hubo crecimiento utilizando este poliol como única fuente de carbono (Figura 10, B). Esta gráfica de tasa de crecimiento con sorbitol es un resultado representativo de lo obtenido con los otros polioles evaluados.

A pesar de optimizar las condiciones de respiración celular de levadura con el uso de membranas permeables al oxígeno (Breathe Easy, Diversified Biotech) y la evaluación de ausencia de contaminación en los ensayos realizados (control de medio de cultivo sin células, para evaluar si crece algún otro tipo de microorganismo), sólo fue posible observar crecimiento en las células cultivadas en glucosa, verificando que las condiciones de cultivo celular eran las óptimas para su desarrollo (control positivo). De esta manera, en cultivos líquidos, se determinó que las levaduras transformadas con AtSDH-myc-His no fueron capaces de crecer en medios suplementados con polioles, por lo que se procedió a implementar un sistema cualitativo de cultivo en medio sólido.

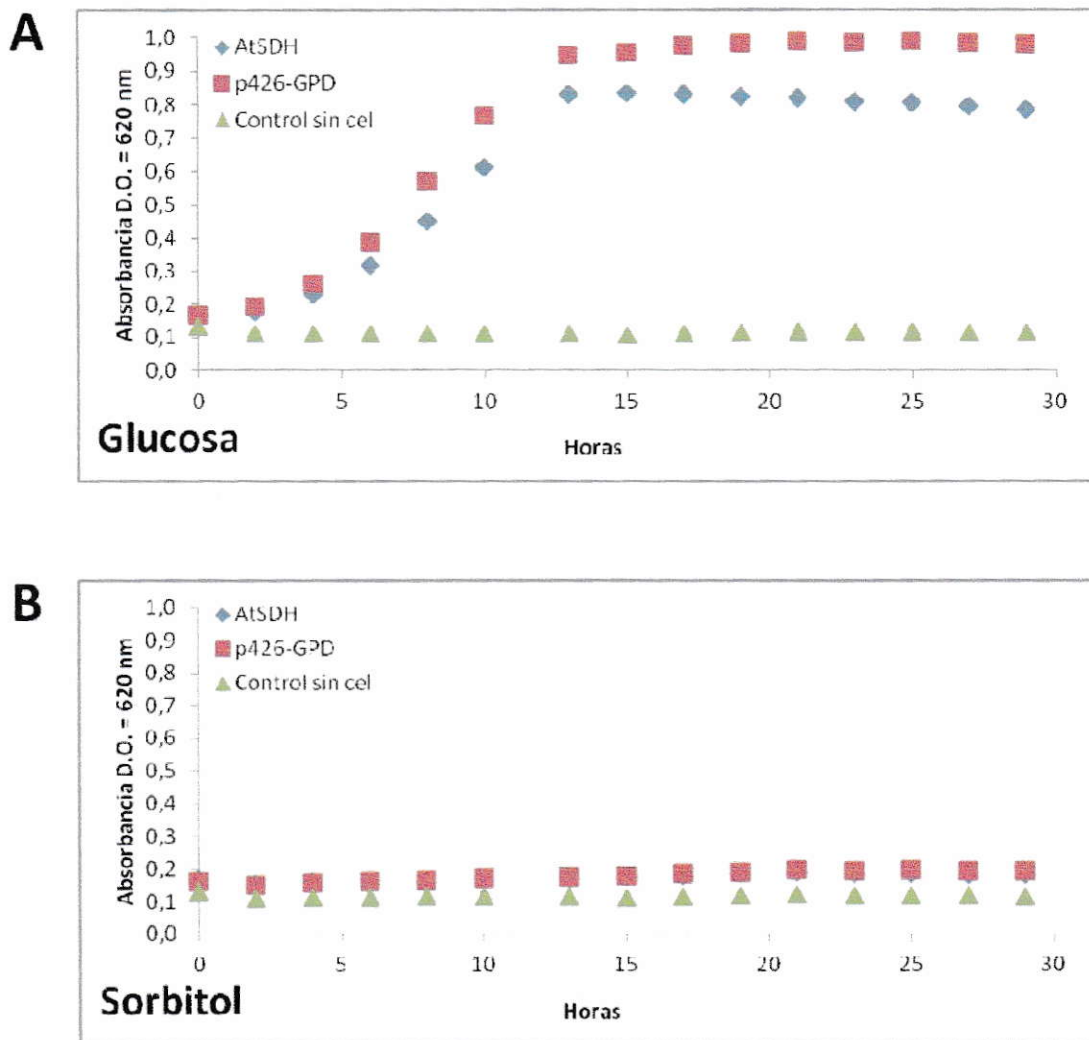


Figura 10: Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae*. Se muestra la cinética de crecimiento medida por absorbancia a 620 nm en el tiempo (horas), de las levaduras suplementadas con glucosa (**A**) y sorbitol (**B**) como única fuente de carbono. Los tipos celulares evaluados corresponden a *S. cerevisiae* transformada con p426-GPD-AtSDH-myc-His (AtSDH: rombos azules) y *S. cerevisiae* transformada con vector sin inserto (p426-GPD: cuadrados rojos). Los triángulos verdes corresponden a pocillos con medio sin células como control de contaminación celular durante el ensayo.

5.1.3 Ensayo de la especificidad de sustrato en *S. cerevisiae* transformada con p426-GPD-AtSDH-myc-His en medio sólido.

Otra de las técnicas empleadas, consistió en el cultivo de células en placas petri con medio sólido, donde se realizaron distintos cambios en el sistema de cultivo con el fin de mejorar la evaluación cualitativa del crecimiento de las células, hasta llegar al sistema descrito en la sección 4.3.4.

Como se muestra en la Figura 11, se realizaron 3 diluciones (D.O.₆₀₀ de 1, 0,1 y 0,01) de las células de levadura silvestre (Wt1 y Wt2), levaduras transformadas con el vector sin inserto (p426-GPD) y levaduras transformadas con AtSDH (p426-GPD-AtSDH-myc-His). Se inocularon 5 µL de cada dilución en medio mínimo (YMM) suplementados con distintos polioles como única fuente de carbono, y se incubaron las células a 28 °C por 5 d. Transcurrido el tiempo se evaluó visualmente si existía o no alguna diferencia en el crecimiento. Al observar las células silvestres, todas crecieron en YMM suplementado con uracilo (agente de selección). Sin embargo, sorprendentemente en las placas sin uracilo también fue posible observar el crecimiento de las células silvestres en medios suplementados con polioles y no así en el medio que contenía glucosa como fuente de carbono, que es el que típicamente se utiliza para la selección de uracilo.

En aquellas levaduras que poseían el vector p426-GPD (con o sin AtSDH) se observó crecimiento de células en todas las placas. Al evaluar la preferencia por algún poliol en particular, entre la levadura transformada con el vector vacío y la transformada con AtSDH-myc-His, no se observó ninguna diferencia de crecimiento aparente, fenómeno reiterativo en las tres réplicas técnicas (Figura 11).

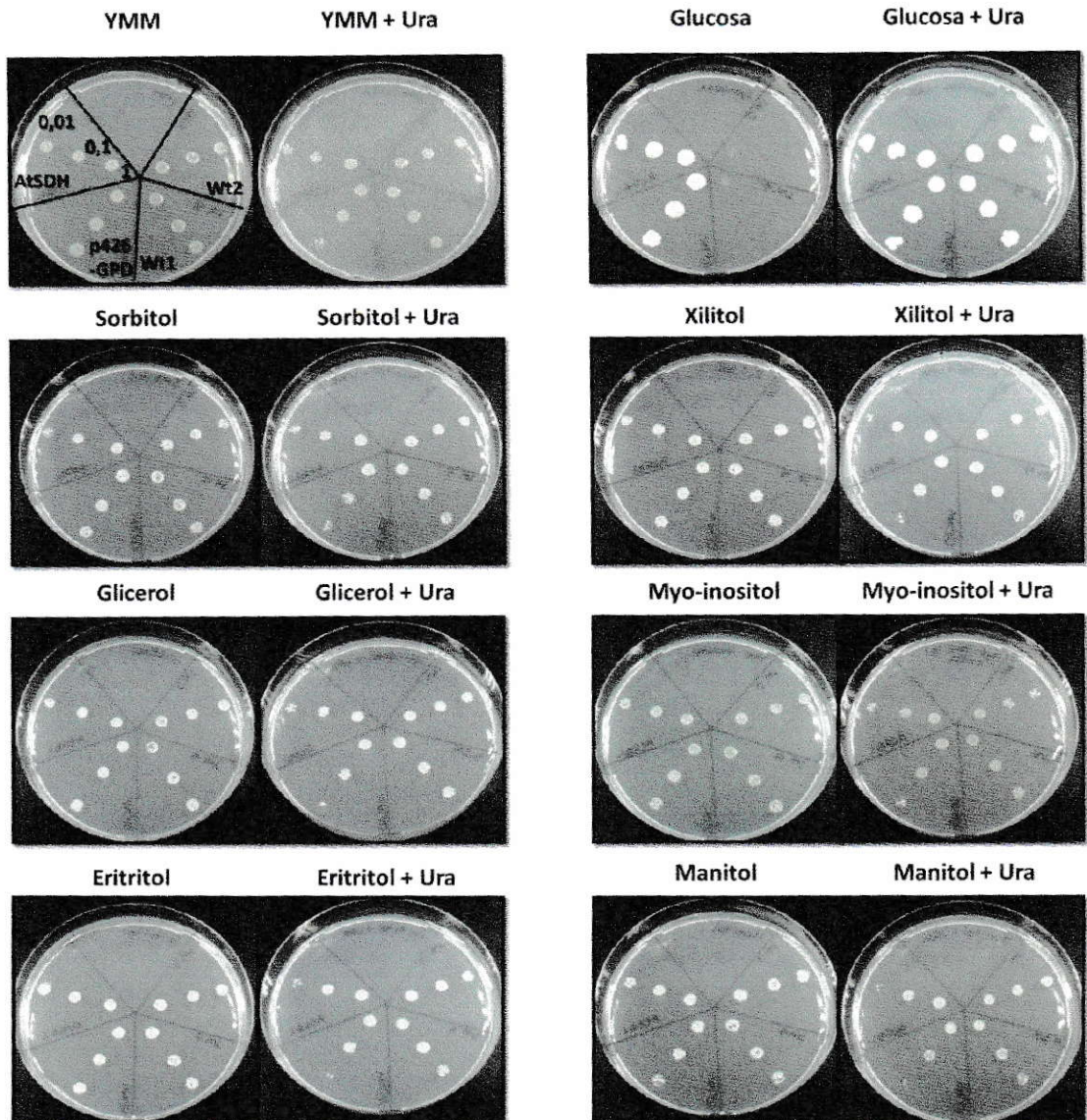


Figura 11. Sistema de cultivo en placa para determinar la especificidad de sustrato de AtSDH en *S. cerevisiae*. Sistema de cultivo en placas en medio mínimo de levadura (YMM), utilizando una única fuente de carbono indicada en la parte superior de cada placa. **YMM**, corresponde a placas de cultivo de *S. cerevisiae* con medio mínimo sin ninguna fuente de carbono. En la placa YMM se esquematiza los tipos celulares y diluciones realizadas. **AtSDH**; levadura transformada con p426-GPD-AtSDH-myc-His, expresora de la proteína recombinante AtSDH-myc-His. **p426-GPD**; corresponde a *S. cerevisiae* transformada con p426-GPD sin inserto, utilizada como control negativo. **Wt1** y **Wt2**; corresponden a células silvestres de *S. cerevisiae*, utilizadas como control negativo. Se inocularon 5 μ L de cada dilución celular (D.O.₆₀₀ de 1 - 0,1 - 0,01) y se incubaron las células a 28 °C por 5 d. Los nombres en la parte superior de cada imagen indican la única fuente de carbono utilizada en cada placa (1,5 %) y además si contenían o no uracilo (sustrato + Ura).

Por último, un análisis más exhaustivo en el punto de mayor dilución (0,01) de las células transformadas es posible determinar un mayor número celular en aquellas muestras sembradas en placas sin uracilo que las suplementadas con uracilo (Figura 11). Una posible causa que explicaría los fenómenos observados, sobre todo el crecimiento de las células silvestres en los medios sin suplemento de uracilo, pudo ser la contaminación de las células silvestres por las transformadas. Para descartar esta teoría, se procedió a evaluar por PCR (sección 4.1.1) una posible contaminación celular. Como se observa en Figura 12, los inóculos utilizados durante el ensayo no se encontraban contaminados con p426-GPD ya que no hay presencia de banda ya sea de 866 pb (vector vacío) o 1919 pb (p426-GPD-AtSDH) en las muestras silvestres (Wt1 y Wt2), descartando esa teoría.

Además, los resultados observados no muestran una diferencia cualitativa en el crecimiento de las células transformadas con AtSDH en comparación a las células transformadas con el vector sin inserto. Este fenómeno podría ser explicado por el hecho que a pesar de estar transformadas las células con p426-GPD-AtSDH-myc-His, no se esté expresando la proteína, teoría que fue descartada mediante western blot anti-myc, epítipo que sí está presente en la proteína recombinante, donde es posible observar la presencia de la proteína en los extractos de levadura transformados (Figura 9). Por lo tanto, a través de esta técnica no fue posible determinar la especificidad de AtSDH-myc-His por algún poliol, usando levaduras como sistema de expresión. Estos resultados serán discutidos en sección 6. Sin embargo, se continuó el trabajo con estas levaduras en la purificación de la proteína AtSDH-myc-His recombinante (sección 5.2.2).

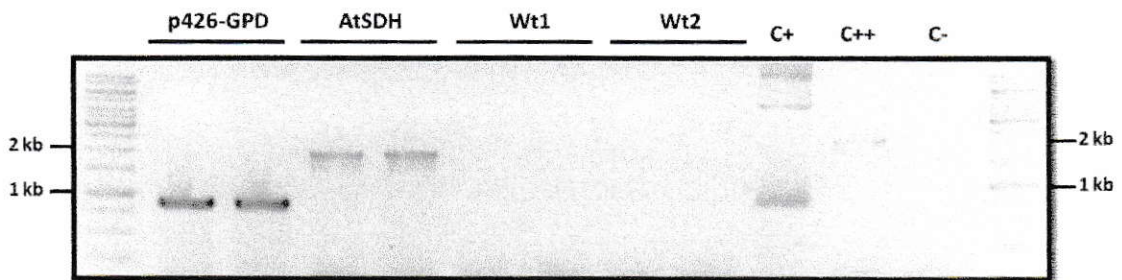


Figura 12. Verificación por PCR de posible contaminación de *S. cerevisiae* silvestres con levaduras transformadas con p426-GPD. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando partidores externos al sitio de inserción de *AtSDH* en el vector p426-GPD (p426-GPD exSMC 5'/3', Tabla III). Carriles **p426-GPD** corresponden a 2 colonias portadoras del vector sin inserto (*AtSDH*). Carriles **AtSDH** corresponde a 2 colonias portadoras del vector p426-GPD-*AtSDH*-myc-His. Carriles **Wt1** y **Wt2** corresponden a células silvestres de *S. cerevisiae*. C+ y C++; controles positivos de ADN plasmidial de los vectores p426-GPD y p426-GPD-*AtSDH*-myc-His, respectivamente. C-; control negativo de PCR correspondiente a agua como templado. PM: estándar de peso molecular.

5.1.4 Determinación de la especificidad de sustrato de *AtSDH*-myc-His mediante zimogramas.

Una manera cualitativa de realizar ensayos de actividad es mediante zimogramas. Esta técnica consiste en resolver las proteínas en un gel de poliacrilamida en condiciones nativas y determinar la actividad enzimática en el gel mediante una reacción colorimétrica. En este caso cuando ocurre la reacción de oxidación del sorbitol a fructosa, se produce la reacción acoplada de reducción del NAD^+ a NADH, luego el NADH reduce al metasulfato de fenazina y finalmente este reactivo reducido entrega un protón al NBT (amarillo) formando un precipitado llamado formazán (violeta). Esta reacción permite detectar bandas de color violeta en los geles que dan cuenta de la actividad enzimática de *AtSDH*. Este ensayo ha sido usado para detectar actividad de SDH de maíz (de Sousa SM, y col, 2008).

Se analizaron extractos crudos de levadura que expresan AtSDH-myc-His. Además se contaba con extractos crudos de His-AtSDH expresada por un sistema *in vitro* (Aguayo MF, datos no publicados). Ambos extractos fueron cargados en un gel nativo, y sometidos a electroforesis. Posteriormente se incubaron los geles en una mezcla de reacción con distintos polioles como sustratos (sorbitol, xilitol, manitol, glicerol, arabitol, eritritol). En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos luego de 30 min a 37 °C de incubación de los geles en la mezcla de reacción enzimática con los distintos polioles mencionados.

Los geles que fueron incubados en una solución con sorbitol o xilitol como sustrato, presentaron una banda intensa (Figura 13; flecha roja) tanto en muestras de levadura (AtSDH-myc-His) como en la proteína sintetizada *in vitro* (His-AtSDH), indicando la preferencia de la enzima AtSDH por esos sustratos, lo que corrobora la hipótesis planteada en esta Tesis, sobre la actividad poliol deshidrogenasa de la enzima AtSDH. También fue posible detectar actividad enzimática en los geles que fueron incubados en una solución con arabitol o manitol como sustrato al observar bandas más tenues (Figura 13; flechas rojas). Sin embargo no se detectó actividad enzimática en aquellos geles incubados en glicerol o eritritol. Además, al evaluar el control positivo (SDH oveja, Sigma®), es posible ver actividad en los mismos cuatro sustratos mencionados anteriormente (sorbitol, xilitol, arabitol y manitol), lo que sugiere que la enzima AtSDH de *Arabidopsis* es una sorbitol deshidrogenasa al igual que el control positivo de oveja, luego de observar el mismo patrón de especificidad de sustrato en ambas enzimas.

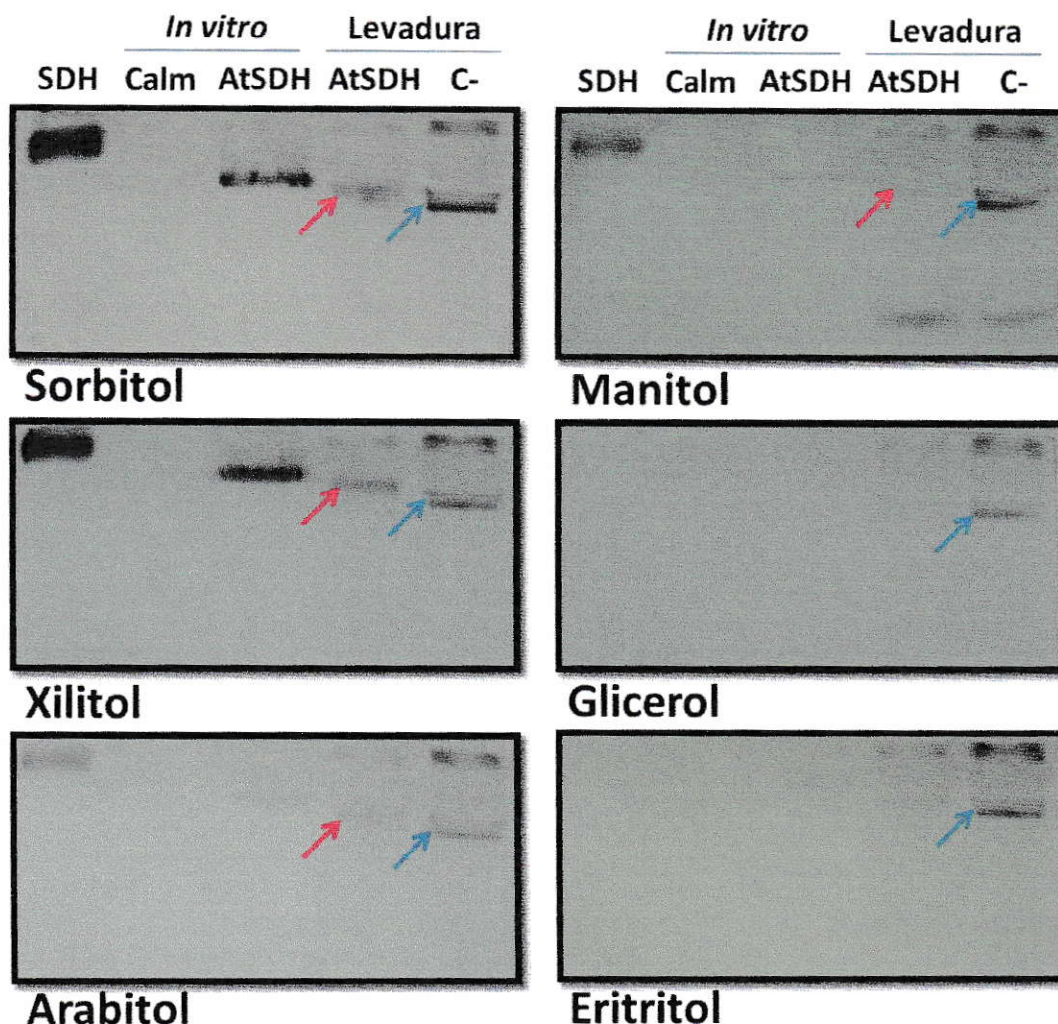


Figura 13. Determinación de la especificidad de sustrato de AtSDH-myc-His evaluado mediante zimogramas. Cada cuadro corresponde a PAGE en condiciones nativas donde fueron cargados extractos crudos de proteínas de *S. cerevisiae* que acumulan AtSDH-myc-His y extractos crudos del sistema *in vitro* que expresa His-AtSDH (Aguayo F, sin publicar), ambos sistemas de expresión utilizados para evaluar la especificidad de sustrato de AtSDH. **AtSDH**; corresponden a extractos crudos de proteína que poseen AtSDH recombinante, His-AtSDH (*in vitro*) y AtSDH-myc-His (*S. cerevisiae*). **Calm** (calmodulina), control de expresión del sistema *in vitro*. **C-**; Control negativo de expresión en *S. cerevisiae* y corresponde a el extracto crudo de proteínas de *S. cerevisiae* transformada con vector sin inserto (p426-GPD). **SDH**; Sorbitol deshidrogenasa de oveja (Sigma ®) utilizado como control positivo de actividad. En la parte inferior de cada gel se indica el sustrato (sorbitol, xilitol, arabitol, manitol, glicerol, eritritol) utilizado para cada reacción enzimática llevada a cabo por 30 min a 37 °C. Las flechas rojas muestran las bandas que indican la presencia de actividad poliol deshidrogenasa en los extractos crudos de *S. cerevisiae* transformada con AtSDH-myc-His y las flechas azules muestran las bandas que indican la presencia de actividad de polioles deshidrogenasas endógenas de *S. cerevisiae* transformada con el vector sin inserto.

También es importante recalcar que el patrón de migración de AtSDH recombinante es distinto en *S. cerevisiae* y en el sistema *in vitro*. Esta diferencia puede estar relacionada con el epítipo adicionado a cada proteína recombinante los cuales son de distintos tamaños (His-AtSDH [43 kDa] para sistema *in vitro* y AtSDH-myc-His [46 kDa] para *S. cerevisiae*). Además puede deberse a la formación de distintos oligómeros de proteínas en ambos sistemas de expresión, alguna modificación post traduccional a la proteína recombinante acumulada en *S. cerevisiae* o alguna diferencia de carga aminoacídica en la traducción de AtSDH recombinante en ambos sistemas, debido a que el sistema *in vitro* proviene de un extracto bacteriano (*E. coli*) y en el otro caso es una levadura. A pesar de que el patrón de migración de banda para ambas proteínas recombinantes es distinto, no está afectando el ensayo de especificidad de sustrato de AtSDH, obteniendo resultados similares.

Cabe destacar que los extractos crudos de proteína provenientes de levaduras transformadas con el vector sin inserto (p426-GPD) también poseen actividad endógena para todos los polioles evaluados (Figura 13; flechas azules). Lo curioso es que una banda correspondiente a la proteína endógena no está presente en los extractos que expresan AtSDH-myc-His, lo que sugiere que la expresión de la proteína recombinante AtSDH-myc-His estaría interfiriendo con la expresión, acumulación y/o actividad de las SDHs endógenas de levadura.

Por lo tanto, mediante los ensayos de zimogramas fue posible cumplir con el objetivo uno de la tesis, donde se determinó una especificidad de sustrato preferencial de AtSDH-myc-His por sorbitol y xilitol y en menor medida por arabitol y manitol, resultado que será discutido en sección 6.

5.2 Determinación de la actividad enzimática de AtSDH recombinante mediante el uso de sistemas de expresión heteróloga en *E. coli* y *S. cerevisiae*.

Con el objetivo de caracterizar bioquímicamente la proteína AtSDH, se utilizaron dos sistemas de expresión heteróloga, *S.cerevisiae* (sección 5.1) y *E. coli*. Para *E. coli*, se clonó AtSDH en el vector de expresión en bacteria pET28a, el cual permite la acumulación de la proteína recombinante His-AtSDH (Figura 14; Mandujano P, 2010). En esta construcción se clonó el marco de lectura abierto (ORF) de *AtSDH* mediante la técnica de corte y ligación, debido a la presencia de los sitios de restricción *Bam*HI y *Not*I, los que flanquean ambos extremos del gen. También el vector permite adicionar un epítotope 6xHis río arriba del gen lo que debería genera la posterior acumulación de la proteína His-AtSDH en las células de *E. coli*. Además el vector posee el promotor T7 inducible por IPTG (T7Prom), y el gen de resistencia a kanamicina (*Kan*^r) como factor de selección (Figura 14). El otro sistema, es en *S. cerevisiae*, en el cual se clonó AtSDH en el vector de expresión de levadura p426-GPD que permite la acumulación de la proteína recombinante AtSDH-myc-His (sección 5.1 y 5.2). De esta manera se contempló el uso de un sistema procarionte y otro eucarionte de expresión, además de la fusión de epítotope en los distintos extremos de AtSDH, albergando distintas variables en la generación de la proteína recombinante.

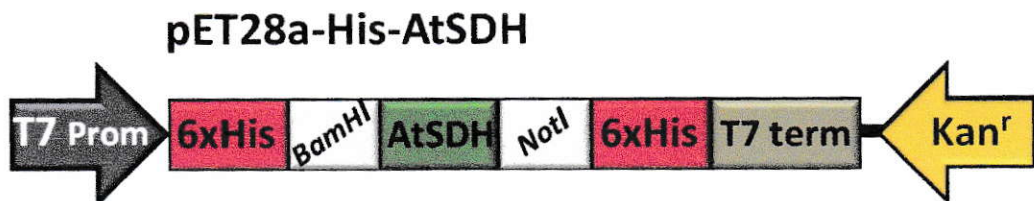
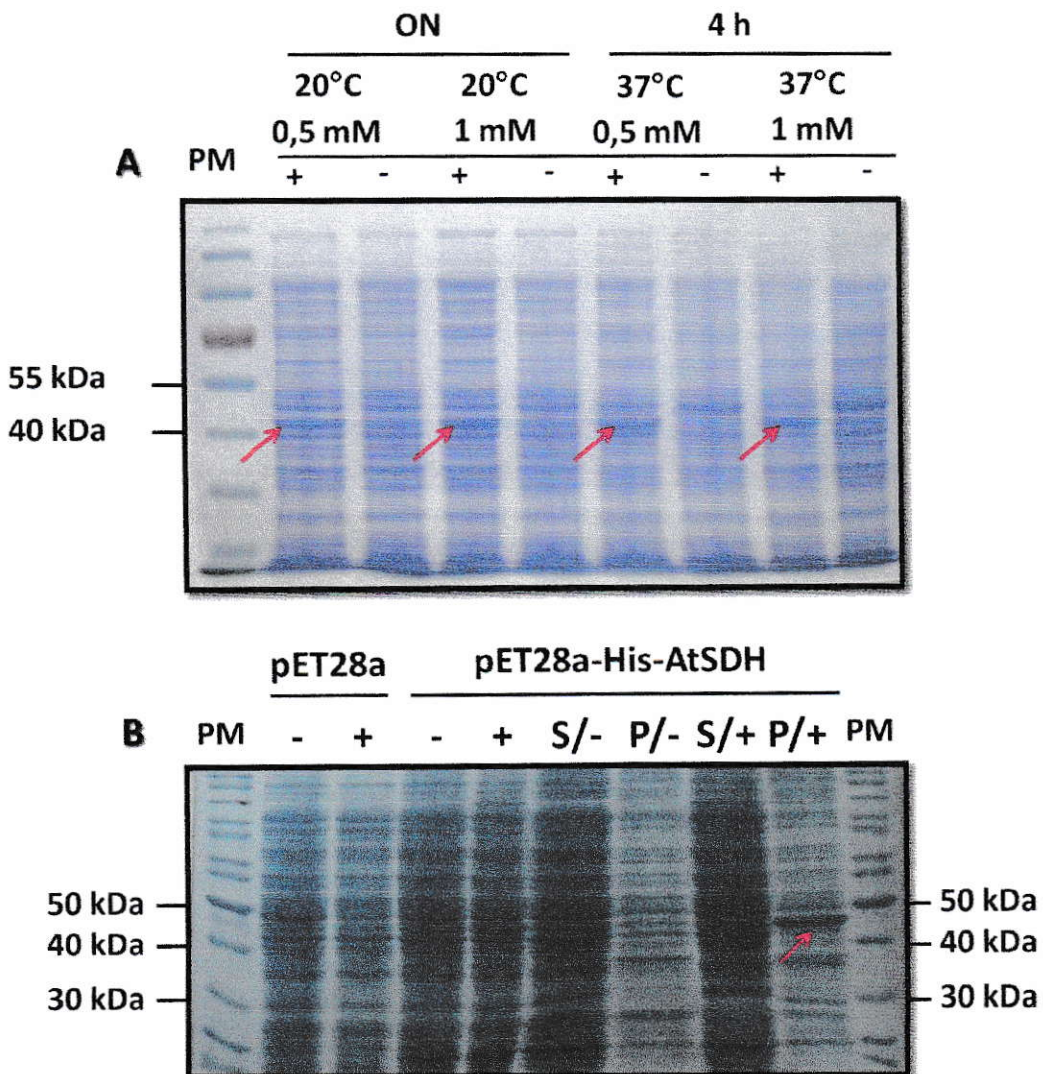


Figura 14. Esquema de la construcción pET28a-His-AtSDH. Vector pET28a-AtSDH usado para la generación y acumulación de la proteína recombinante His-AtSDH en células de *E. coli*. T7 Prom: promotor T7, 6XHis: epítotope de 6 histidinas, *Bam*HI y *Not*I: sitios de clonamiento de AtSDH, T7 term: T7terminador y *Kan*^r: resistencia a kanamicina

5.2.1 Inducción de la expresión de His-AtSDH en *E. coli*.

El primer paso en la estandarización de la expresión de His-AtSDH en *E. coli* consistió en determinar las variables de tiempo de inducción de la expresión, temperatura y concentración de IPTG para la óptima inducción de la proteína. Todas estas variables son necesarias de optimizar para obtener una cantidad suficiente de proteína para su posterior purificación, evitando la formación de cuerpos de inclusión. Por lo tanto, se evaluaron distintas condiciones de inducción con IPTG del vector pET28a-His-AtSDH, que permite la acumulación de la proteína His-AtSDH y se extrajeron las proteínas totales de *E. coli*, las que fueron evaluadas mediante SDS-PAGE donde se esperaba ver una migración de His-AtSDH cercana a los 43 kDa de acuerdo a los estándares de proteína utilizados. En la Figura 15, A, es posible observar una banda abultada cercana a los 43 kDa en todas las fracciones con IPTG (flechas), que corresponde al tamaño esperado de His-AtSDH. Modificaciones en las condiciones de inducción con IPTG (temperatura, tiempo, concentración) no afectaron la acumulación de esta banda; por consiguiente, se eligió la condición de 0,5 mM IPTG, 37 °C por 4 h para futuros experimentos (Figura 15, A). Los extractos fueron sonicados y luego centrifugados (20000 g) para obtener las fracciones solubles (S) y los sedimentos (P) (sección 4.4.2), observando una acumulación de proteína de interés en el sedimento de la fracción inducida (Figura 15, B, flecha). Para comprobar la expresión y acumulación de His-AtSDH se realizó un western blot utilizando el anticuerpo anti-His (Figura 15, C), donde se observa una gran acumulación de proteína en el extracto crudo inducido de células transformadas con pET28a-His-AtSDH y no así en los extractos transformados con el vector sin inserto (pET28a). También es posible observar, en ambos carriles de fracciones solubles, una banda de menor tamaño (~ 25 kDa), la que posiblemente

corresponda a His-AtSDH digerido. Esto se sugiere ya que la banda observada está presente sólo en las fracciones solubles de las bacterias transformadas con la construcción (S/+ y S/-; Figura 15, C) y no en el extracto crudo de las células transformadas con el vector sin inserto, descartando el marcaje por una proteína endógena de *E. coli*. Finalmente, se comprobó que el sedimento posee una gran acumulación de la proteína de interés lo que indica la formación de cuerpos de inclusión.



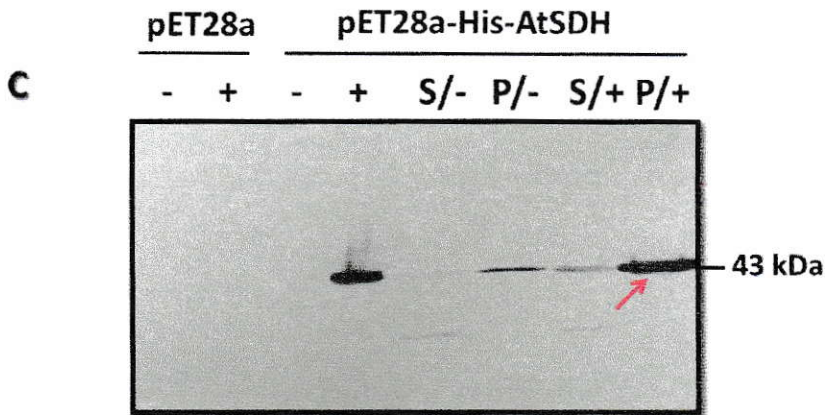


Figura 15. Análisis de la inducción y expresión de His-AtSDH en *E. coli*. A. SDS-PAGE de la evaluación de la inducción con IPTG de células de *E. coli* transformadas con pET28a-His-AtSDH. Cada carril contiene extractos crudos de proteína que provienen de células que fueron (+) o no inducidas (-) con IPTG 0,5 o 1 mM, a una temperatura de 20 o 37 °C, en un cultivo de noche (ON) o por 4 h. Las flechas rojas muestran una banda abultada de tamaño esperado para His-AtSDH (43 kDa). B. SDS-PAGE de extractos crudos de células transformadas con vector sin inserto (pET28a) o pET28a-His-AtSDH. Posterior a la inducción es posible determinar la acumulación de His-AtSDH en la fracción soluble (S) y en el sedimento (P). La flecha roja muestra la banda más abultada en la fracción insoluble inducida con IPTG correspondiente al tamaño esperado para His-AtSDH (43 kDa). C. Western blot anti-His (1:3000) del SDS-PAGE mostrado en B, donde es posible observar que la mayor acumulación de His-AtSDH se encuentra en la fracción insoluble. PM: estándar de peso molecular.

Para evitar la formación de cuerpos de inclusión y fomentar la acumulación de la His-AtSDH en la fracción soluble de *E. coli*, se crecieron las células en medio LB con sorbitol 1 M y en LB con sorbitol 1 M y betaína 2 mM, sustratos que actúan como inductores y estabilizadores de las chaperonas en bacteria, fomentando el correcto plegamiento de las proteínas (Blackwell JR, 2001). Luego de obtener todas las fracciones de proteínas desde células crecidas en los distintos medios, se realizó un SDS-PAGE y se tiñó con Coomassie para la visualización de las proteínas. Los resultados mostraron que al igual que en las condiciones basales estandarizadas anteriormente, utilizando ambos medios (sorbitol 1 M y sorbitol 1 M con betaína 2 mM), se obtuvo una mayor proporción de proteína recombinante en los sedimentos (Figura 16, flechas rojas).

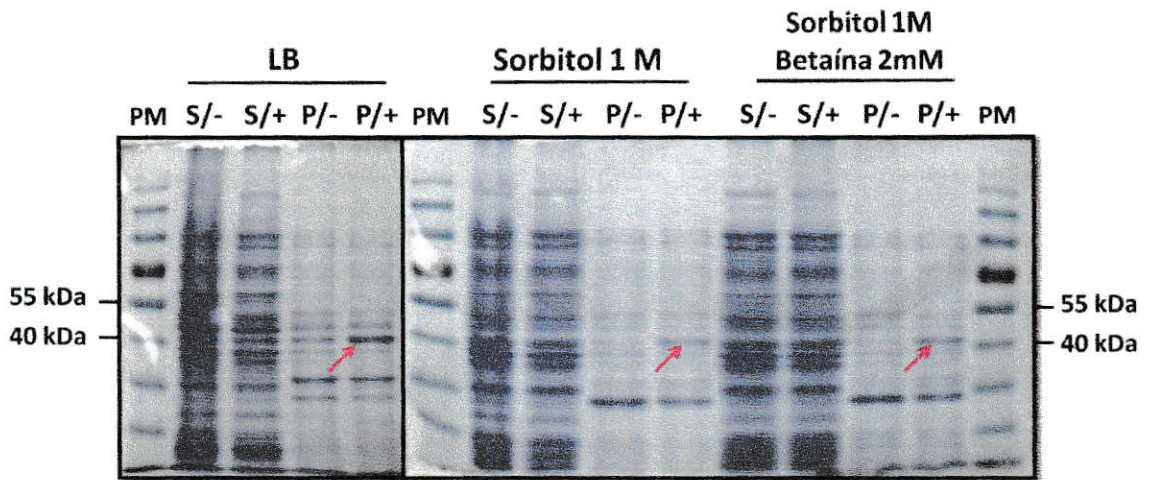


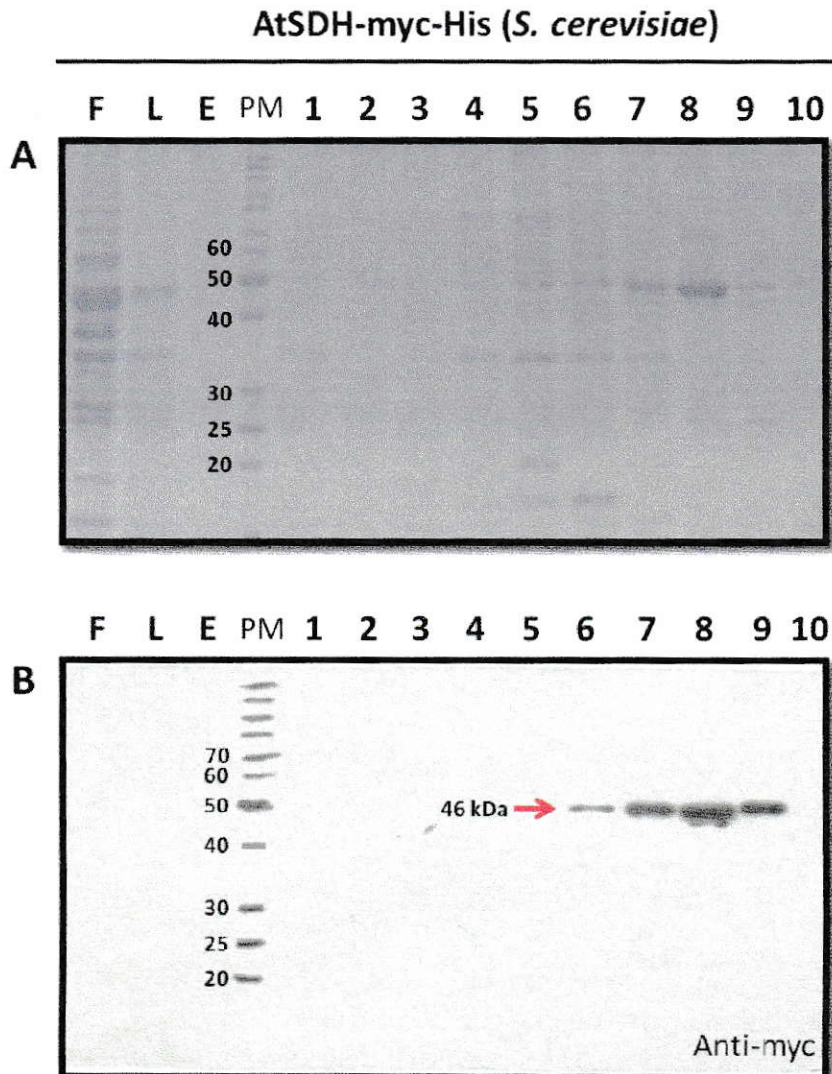
Figura 16. Análisis de la inducción de AtSDH en células de *E. coli* transformadas con pET28a-His-AtSDH en distintos medios de crecimiento. SDS-PAGE, donde se muestran las fracciones solubles (S) y sedimento (P) inducidos con (+) o sin (-) IPTG. Los medios de cultivo corresponden a LB, LB con sorbitol 1 M y LB con sorbitol 1 M y betaína 2 mM. Las flechas rojas muestran la banda cercana a los 43 kDa, tamaño esperado para His-AtSDH en la fracción insoluble. PM, estándar de peso molecular.

De esta manera fue posible expresar y acumular exitosamente His-AtSDH en *E. coli*. Como fue mostrado en la sección 5.1.2, también fue posible expresar y acumular la proteína recombinante AtSDH-myc-His en *S. cerevisiae*. Con ambos extractos se procedió a purificar las respectivas proteínas recombinantes (sección 5.2.2).

5.2.2 Purificación de His-AtSDH y AtSDH-myc-His.

Luego de comprobar satisfactoriamente la acumulación de His-AtSDH y AtSDH-myc-His desde *E. coli* y *S. cerevisiae* respectivamente, se procedió a la purificación de ambas proteínas desde extractos crudos, utilizando una columna comercial (HisTrap, GE) la cual permite la selección de aquellas proteínas recombinantes que posean el epítipo His (6 histidinas). La purificación desde *E. coli*, se realizó a partir de la fracción insoluble en condiciones desnaturalantes utilizando urea 6 M como agente caotrópico (sección 4.4.3). Las fracciones obtenidas se generaron a partir de un gradiente

continuo desde 20 mM a 600 mM de imidazol, observando las bandas esperadas en las fracciones 6, 7, 8 y 9, las que fueron posteriormente corroboradas mediante western blot utilizando el anticuerpo anti-His (Figura 17, A y B). De manera similar se procedió a la purificación de AtSDH-myc-His desde extractos crudos de *S. cerevisiae*, empleando un gradiente continuo al igual que en bacteria (sección 4.3.7), observando las bandas esperadas en las fracciones 6, 7, 8 y 9, las que fueron confirmadas por western blot utilizando el anticuerpo anti-myc (Figura 17, C y D).



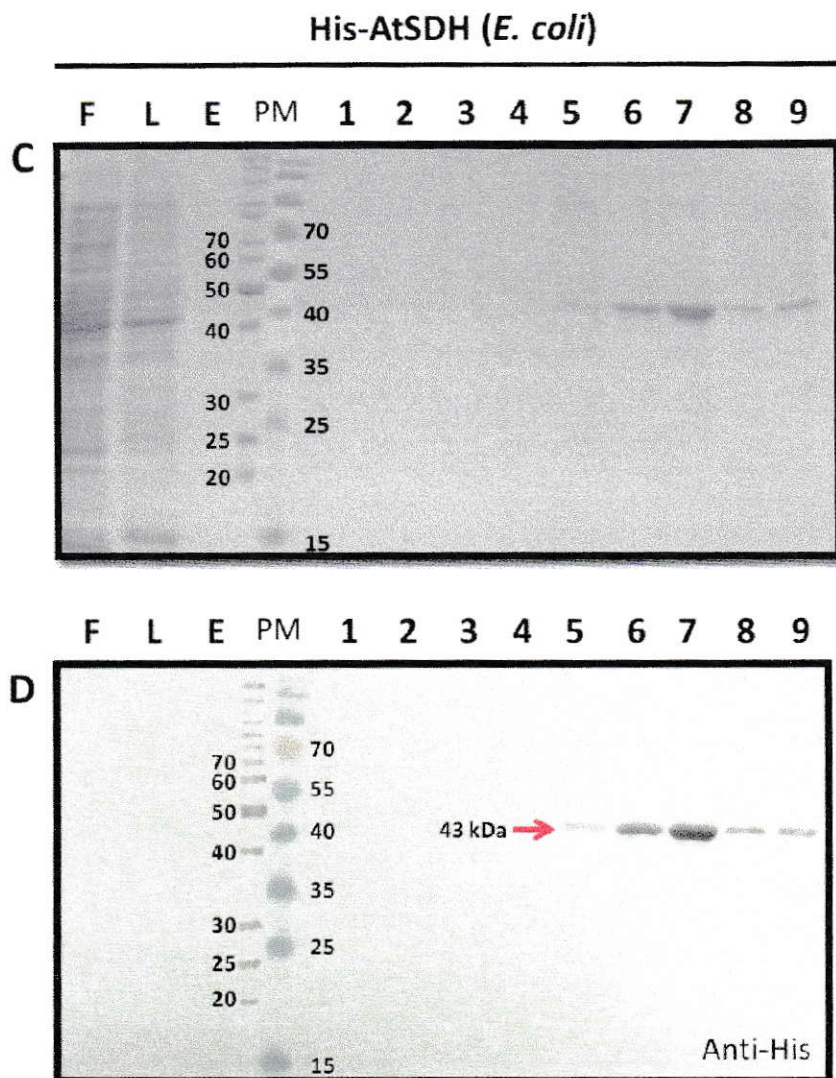


Figura 17. Purificación de His-AtSDH y AtSDH-myc-His. A y C corresponden a SDS-PAGE de las distintas fracciones eluidas en la purificación de AtSDH-myc-His (46 kDa) desde *S. cerevisiae* y His-AtSDH (43 kDa) desde *E. coli*, respectivamente. Ambas purificaciones fueron realizadas mediante gradiente continuo de imidazol, donde se obtienen las distintas fracciones. **F**; frente de elusión, que corresponde al eluido de la columna luego de cargar la muestra. **L**; lavado, que corresponde a eluido de la columna luego de lavar con imidazol 20 mM para quitar cualquier proteína que se pegue inespecíficamente a la columna. **E**; Elusión, que corresponde al tampón final, luego de colectar las muestras, que es usado a una concentración de 600 mM de imidazol para eluir absolutamente cualquier proteína remanente. Fracciones de **1 a 10**; corresponden a las fracciones de proteínas obtenidas en el gradiente continuo de imidazol de 20 mM a 600 mM. **PM**; marcador de peso molecular. **B** y **D** corresponden a los western blot anti-myc y anti-His, respectivamente, de las fracciones analizadas en A y B. Las flechas rojas indican las bandas del tamaño esperado reconocidas por los anticuerpos.

De los datos obtenidos es posible observar que en ambos casos la proteína purificada eluyó en fracciones similares (entre 5 y 9), sin embargo se detectó la aparición de otras bandas de distinto tamaño en las fracciones 5, 6, 7 y 8 de levadura. En la fracción 8, eluyó la mayor cantidad de proteína, donde además se observa una banda tenue cercana a los 70 kDa con una baja representatividad en el total extraído. Además, en la fracción 9, a pesar de tener una menor cantidad de proteína recombinante, no se detectaron otras bandas en el SDS-PAGE teñido con Coomassie, siendo la fracción con AtSDH-myc-His de mayor pureza (Figura 17, A). Cabe destacar que a pesar de existir otras bandas en menor cantidad, en el western blot anti-myc, el anticuerpo sólo reconoció las bandas de tamaño esperado (Figura 147 B, flecha, 46 kDa), pero en la fracción 8 se presenta una banda de menor tamaño e intensidad que sugiere la presencia de AtSDH-myc-His digerido.

Por otro lado, en las fracciones eluidas desde extracto crudo de bacteria, la fracción 6 es la que presenta la mayor cantidad de proteína, además de carecer de otras bandas contaminantes (Figura 17, C), lo que fue confirmado por western blot anti-His, marcando una banda cercana a los 43 kDa en todas las fracciones, banda de menor tamaño que la de levadura debido a la diferencia del epítipo fusionado.

Por lo tanto, con estos resultados se logró purificar ambas proteínas recombinantes de manera satisfactoria, con las que se continuó su análisis en ensayos de actividad.

5.2.3 Ensayos de actividad de His-AtSDH y AtSDH-myc-His

Con el fin de determinar la actividad enzimática y lograr obtener uno de los parámetros cinéticos de AtSDH (K_m), se realizaron ensayos de actividad mediante espectrofotometría.

En primera instancia, como se mostró en las secciones 5.1.2 y 5.2.1 fue posible expresar satisfactoriamente las proteínas recombinantes AtSDH-myc-His y His-AtSDH en los sistemas de expresión de *S. cerevisiae* y *E. coli*, respectivamente. Primero se evaluó la actividad enzimática a partir de los extractos crudos de *S. cerevisiae* sin obtener resultados positivos. Específicamente, los extractos crudos de proteína de *S. cerevisiae* nunca mostraron una actividad consistente entre las réplicas realizadas, observando fenómenos en los cuales el control sin sustrato mostraba mayor actividad que al realizar ensayos utilizando distintos polioles, sugiriendo una inactivación por sustrato, resultado que no siempre se repitió entre las distintas muestras evaluadas. Además al realizar las réplicas técnicas y biológicas de las muestras bajo las mismas condiciones, las curvas siempre dieron distintas. Sin embargo, sí fue posible detectar actividad del control positivo utilizado (SDH oveja, Sigma®), lo que sugiere que las condiciones de reacción eran las adecuadas. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la falta de actividad de extractos crudos que contienen AtSDH-myc-His estaría relacionada con el extracto proteico en el cual la proteína recombinante no se encontraba estable, perdiendo actividad durante el transcurso del tiempo de medición, observando grandes diferencias entre las réplicas técnicas, tema que será discutido en sección 6. Por otro lado, los extractos proteicos obtenidos desde *E. coli* no pudieron ser evaluados mediante espectrofotometría debido a que la extracción proteica se realizó en condiciones desnaturantes.

Posteriormente se continuó con la purificación de ambas proteínas recombinantes (sección 5.2.2), las que fueron satisfactoriamente purificadas. En el caso de la proteína His-AtSDH, debido a que la purificación se realizó en condiciones desnaturalantes, se procedió a dializar la proteína contra distintos tampones que permitieran el correcto repliegamiento. Se dializó His-AtSDH contra tampones con agentes reductores como DTT o β -mercaptoetanol y con componentes que permitieran la estabilización de la proteína como glicerol, sorbitol y Zn^{+2} , sin obtener actividad en ninguna de las condiciones de renaturación evaluadas. Los ensayos de actividad de la proteína purificada AtSDH-myc-His desde levadura, se realizaron directamente con las fracciones colectadas desde la purificación (Figura 17, fracciones 6, 7, 8 y 9), sin observar actividad para ninguna de las fracciones colectadas, pero sí para el control positivo de SDH de oveja, tema que será discutido en sección 6.

Por lo tanto no se pudo cumplir con el objetivo dos de la Tesis que consistía en determinar la actividad enzimática de AtSDH, obteniendo parámetros bioquímicos que permitan caracterizar esta proteína de Arabidopsis. Sin embargo queda abierta la propuesta de utilizar otros sistemas de expresión que permitan obtener la proteína recombinante de manera estable y así poder realizar los ensayos cinéticos planteados.

5.3 Análisis de la expresión del gen *AtSDH* en los distintos órganos de Arabidopsis silvestre.

Para determinar el patrón de expresión de *AtSDH*, se ha analizado múltiples líneas de plantas de Arabidopsis transformadas establemente con promAtSDH::GUS (sección 1.2.3, Parada R, 2011). Los ensayos colorimétricos de GUS entregan resultados sobre la distribución de la expresión de *AtSDH* en los distintos órganos y tejidos de



Arabidopsis, sin embargo no proveen datos cuantitativos de la expresión, útiles para los posteriores análisis de la funcionalidad de la proteína en la planta. Por lo tanto, para complementar los experimentos realizados previamente, en esta Tesis se realizó una evaluación de datos bioinformáticos públicos y cuantificación de los niveles de transcrito de *AtSDH* en los distintos órganos mediante qRT-PCR.

5.3.1 Evaluación de la expresión de *AtSDH* mediante datos públicos de microarreglos.

Una de las bases de datos ampliamente usadas para la interpretación de microarreglos de Arabidopsis corresponde a una herramienta denominada "Electronic Fluorescent Pictograph" (eFP-Browser) desarrollada por Winter D y col (2007). Esta herramienta fue creada para explorar datos de microarreglos de Arabidopsis que permitan visualizar intuitivamente los datos de expresión génica de más de 22.000 genes de este organismo, representados en el GeneChip ATH1 de *Affymetrix*, donde *AtSDH* está incluido. Utilizando el AGI ID (*Arabidopsis Genome Initiative Identifier*) de *AtSDH* (At5g51970), se obtuvo el patrón absoluto de expresión de *AtSDH* en los distintos órganos de Arabidopsis. Este patrón de expresión es representado por una escala de color, señalando de este modo los niveles bajos de expresión con coloración amarilla y los niveles altos de expresión en rojo (Figura 18). Para *AtSDH*, los 4 mayores niveles de expresión en órganos se encontraron en semillas secas, cotiledones, hojas caulinares y hojas rosetas (Figura 18, círculos rojos), mientras que los 4 menores niveles de expresión se observaron en flores, silicuas con semillas en estadio "corazón", tallo y raíz (Figura 18, círculos azules).

De esta manera, se obtuvo una aproximación de la expresión de *AtSDH* en los órganos de *Arabidopsis*. A partir de los datos evaluados, surgió la inquietud de analizar los niveles de expresión en semilla, debido a la alta expresión encontrada en los análisis *in silico*, además que este órgano no pudo ser evaluado mediante GUS por la complejidad del tratamiento (Parada R, 2011). Por lo tanto, se procedió a realizar qRT-PCR de semillas y los otros órganos de la planta.

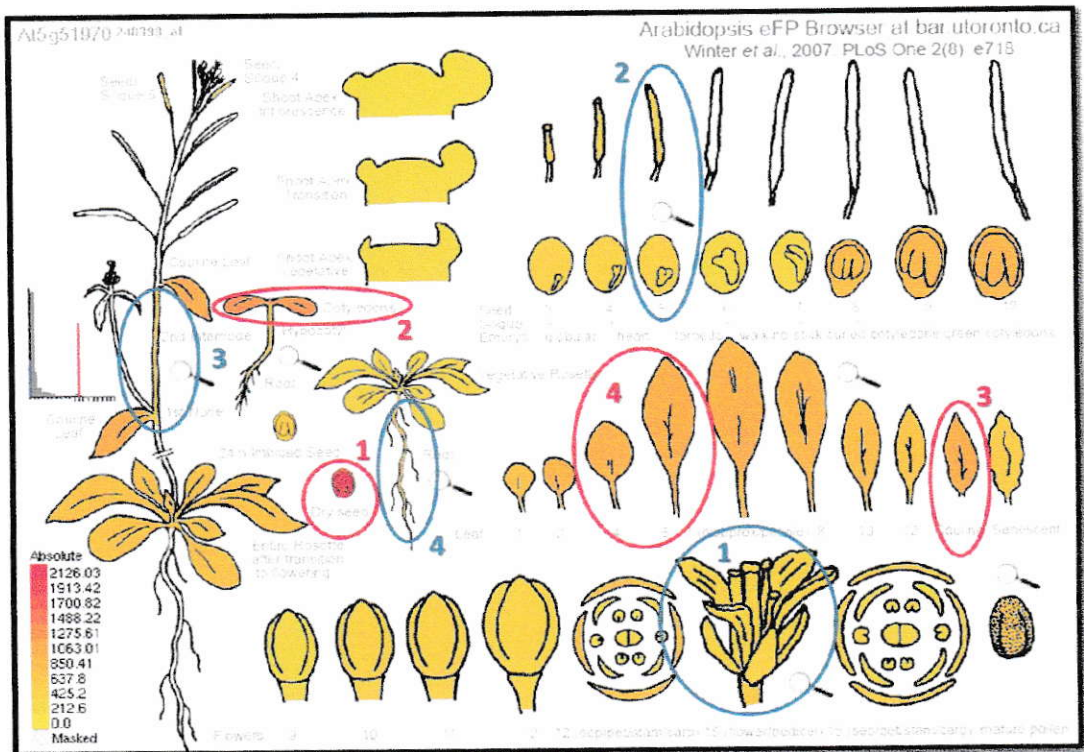


Figura 18. Pictografía fluorescente electrónica absoluta de la expresión de *AtSDH* (At5g51970). En la figura se muestran los órganos o tejidos de *Arabidopsis* coloreados en una escala de amarillo a rojo que representan las variaciones en la expresión de *AtSDH*. Los órganos marcados por un círculo rojo representan aquellos que poseen los mayores niveles de expresión en forma descendente; 1 semilla seca, 2 cotiledón, 3 hoja caulinar y 4 hojas rosetas. Los órganos marcados con un círculo azul representan aquellos que poseen los menores niveles de expresión en forma descendente; 1 flor, 2 silicuas con semillas en estadio "corazón", 3 tallo y 4 raíz.

5.3.2 Análisis de los niveles de transcrito de *AtSDH*, en los distintos órganos de *Arabidopsis*, mediante qRT-PCR.

Como análisis complementario del patrón de expresión de *AtSDH* realizado mediante GUS (Parada R, 2011), y la aproximación mediante microarreglo (sección 5.7.1), se procedió a cuantificar los niveles de expresión en los distintos órganos de *Arabidopsis* mediante qRT-PCR.

El primer paso consistió en la extracción de ARN de raíces, hojas rosetas, tallos, hojas caulinares, flores y silicuas (Figura 19). La extracción de ARN desde todos los órganos se realizó con Ultra Clean™ Plant RNA isolation kit (MOBIO Laboratories, Inc). Sin embargo, no fue posible obtener ARN de una calidad suficiente de las semillas con este kit, por lo que se procedió a utilizar otro reactivo denominado Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen®) con el cual tampoco se pudo obtener ARN limpio (datos no mostrados). Finalmente se empleó un protocolo descrito por Meng y Feldman (2010), con algunas modificaciones (sección 4.5.2). De esta manera fue posible obtener ARN de alta calidad e integridad de todos los órganos de *Arabidopsis* (Figura 20).



Figura 19. Imagen representativa de una planta de Arabidopsis. Izquierda; planta de Arabidopsis completa de 6 semanas de desarrollo, donde se señalan los distintos órganos de la planta. Derecha superior; esquema detallado de los distintos tejidos de una flor. Derecha inferior; imagen de una plántula de Arabidopsis de una semana de desarrollo (extraída de www.biologie.uni-ulm.de/bio2/anita/Archaea.htm).

Posterior a la extracción de ARN, se realizó RT-PCR convencional. En la Figura 21 se ilustra la amplificación correcta y homogénea de un fragmento de *actina4*, indicativo de la calidad y uniformidad en los ADNc sintetizados para los distintos órganos de Arabidopsis. Además es posible observar que ninguna de las muestras se encuentra contaminada con ADN genómico ya que el tamaño del amplificado para muestras con ADNg es superior (~780 pb, muestra DNA), en comparación a la de los ADNc observados (~680 pb) utilizando el mismo par de partidores para Actina4 (Figura 21).

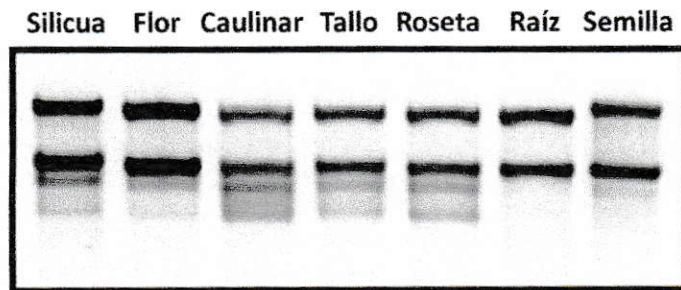


Figura 20. ARN extraído de los distintos órganos de Arabidopsis. Gel de agarosa en condiciones desnaturalantes donde se observa la integridad del ARN extraído de los distintos órganos de Arabidopsis. El patrón de bandeado corresponde a los distintos ARN ribosomales obtenidos luego de una extracción de ARN.

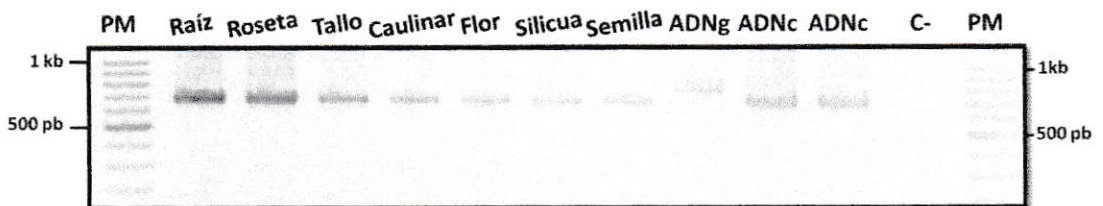


Figura 21. Amplificación de un fragmento de *actina4* desde ADNc de distintos órganos de Arabidopsis silvestre. ADNc y ADNg: ADN complementario y ADN genómico respectivamente como controles positivos de amplificación, obtenido de hojas rosetas de plantas silvestres. C-: agua como control negativo de PCR. PM: estándar de peso molecular.

Luego de la verificación de la correcta síntesis de los ADNc, se procedió a cuantificar los niveles de expresión de *AtSDH* en los distintos órganos de Arabidopsis. Como primer análisis se realizó la selección de un gen normalizador, que no presente variación en la expresión, entre los distintos órganos de Arabidopsis. Los genes seleccionados *PP2A* (AGI: *At1g13320*), *Ubq10* (AGI: *At4g05320*) y *26410* (AGI: *At4g26410*) fueron elegidos por ser genes *housekeeping* confiables para la calibración de expresión génica en distintos órganos de Arabidopsis (Czechowsky T y col., 2005). Al utilizar el programa Normfinder, se concluyó que *At4g26410* era el mejor normalizador, al presentar las menores variaciones en la expresión entre los distintos órganos (Andersen CL y col, 2004).

Una vez seleccionado el mejor normalizador se procedió a realizar el qRT-PCR. Se usaron dos pares de partidores que amplifican distintas regiones de *AtSDH* (Tabla III; *AtSDH1* y *AtSDH2*), obteniendo resultados similares con ambos pares de partidores, sin embargo los resultados finales mostrados en la Figura 22 se realizaron con el par de partidores para *AtSDH2* ya que su eficiencia es mayor que para *AtSDH1*. La eficiencia calculada para todos los partidores fue la siguiente: PP2A, 102,6 %; Ubq10, 96,1 %; 26410, 93,6 %; *AtSDH1*, 91,7 % y *AtSDH2*, 98,1 %. En la Figura 22, se muestra la gráfica de los resultados obtenidos con el par de partidores *AtSDH2*, donde es posible distinguir una mayor expresión de *AtSDH* en semilla seca, esto corresponde, por ejemplo, a unas 8 veces más que silicua, 7,2 veces más que tallo y 1,6 veces más que hojas caulinares. También es posible observar que la segunda mayor expresión de *AtSDH* entre los órganos evaluados corresponde a hojas caulinares, expresándose 5 veces más que silicua, 4,6 veces más que tallo y 3,5 veces más que raíz. Aunque la expresión es menor, hojas rosetas también presentan diferencias significativas con los otros órganos, mostrando una diferencia de expresión de 1,4 y 1,3 con silicua y tallo respectivamente.

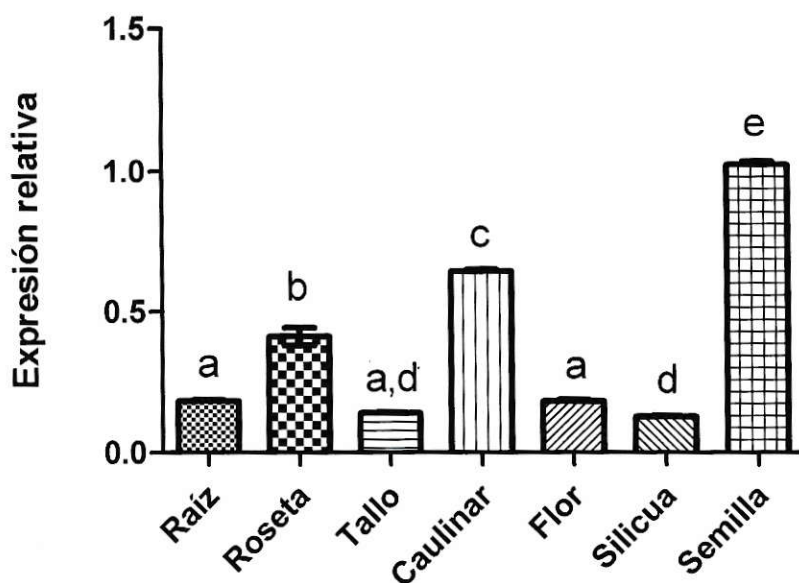


Figura 22. Análisis de la expresión de *AtSDH* entre los distintos órganos de *Arabidopsis*. Todos los valores corresponden a duplicados biológicos de un pool de 50 plantas cada uno y triplicados técnicos. Todos los valores fueron normalizados frente al gen *At4g26410* y calibrados contra el órgano demayor retardo en la amplificación (semilla). Las letras denotan diferencias significativas de la expresión entre los distintos órganos, determinadas por Test de ANOVA de una vía y usando como post-test Bonferroni ($p < 0,05$)

6. Discusión

6.1 Determinación de la especificidad de sustrato de la enzima AtSDH, utilizando *S. cerevisiae* como sistema de expresión.

Los antecedentes entregados en la introducción (sección 1.2.3), revelaron la dificultad en la obtención de AtSDH en forma soluble, la cual facilitaría las evaluaciones bioquímicas de la proteína. Por esta razón, en esta Tesis, el primer paso en determinar la especificidad de sustrato de AtSDH consistió en la generación de un vector de expresión de AtSDH en *S. cerevisiae*. A diferencia de *E. coli*, al ser un sistema eucarionte confiere diferencias metabólicas que podrían facilitar la expresión de la proteína, evitando la formación de cuerpos de inclusión, ya sea por el sistema de repliegamiento o por el uso de codones (Celik E, y Calik P, 2012). De esta manera se clonó satisfactoriamente *AtSDH* en el vector **p426-GPD** (Norambuena L, y cols, 2002), el cual genera la proteína recombinante **AtSDH-myc-His** (sección 5.1.1).

Además trabajos preliminares realizados por Mandujano P. (2010) permitieron generar **His-AtSDH** (pET28a-His-AtSDH) en bacteria, sin embargo, la proteína recombinante presentó problemas de solubilidad, obteniendo cuerpos de inclusión, impidiendo realizar finalmente ensayos de actividad. Con ambas construcciones disponibles, se generaron satisfactoriamente proteínas recombinantes con epítopes fusionados en ambos extremos de la proteína. Análisis *in silico* de AtSDH, revelaron la carencia de algún péptido de señalización hacia alguna vía secretoria (Mandujano P, 2010). Sin embargo, al realizar modelamientos sobre la posible conformación estructural de AtSDH, utilizando la estructura cristalográfica de la SDH de mosquita blanca (Protein Database code: 1E3J) y de humano (Protein Database code: 1PL8) como plantados,

se observó la presencia de una cola N-terminal de 11 aa sin estructura aparente, la que podría estabilizar la proteína al interactuar con las otras subunidades u otra proteína del medio, o simplemente desestabilizarla (Maldonado, sin publicar). Más aún, en los geles realizados en condiciones desnaturantes (Figura 9) se observaron bandas cercanas a los 43 kDa, sin embargo, el análisis en condiciones nativas desde extractos crudos de *S. cerevisiae* (Figura 13) mostró la presencia de una banda sobre 100 kDa, lo que indicaría una conformación oligomérica de AtSDH. Esta observación estaría respaldada por los trabajos de pera y durazno (Oura Y, y col, 2000; lo Bianco R, y Rieger M, 1998) donde se identificó la formación de un homotetrámero en condiciones nativas, conformada por cuatro subunidades de alrededor de 40 kDa. Por lo tanto, se sugiere que la cola N-terminal podría estar implicada en la formación de la estructura homotetramérica de AtSDH. En conjunto, los antecedentes sobre la supuesta estructura de AtSDH, revelan la formación de una estructura compleja, la que podría desestabilizarse fácilmente en los distintos medios utilizados para la obtención y purificación de la proteína.

Con estos antecedentes, se hace relevante el estudio de la adición de epítopes en ambos extremos de AtSDH, los cuales podrían interferir o no en la estabilidad de la proteína, explicando de alguna manera la escasa solubilidad de la proteína recombinante His-AtSDH expresada en *E. coli*, donde se vería interrumpida la cola mencionada en el extremo N-terminal.

La caracterización bioquímica de una enzima requiere determinar la especificidad de sustrato de la proteína. La manera más precisa de evaluar esta característica es mediante la purificación de la proteína y posterior evaluación de su actividad utilizando distintos sustratos (Guo ZX, y col, 2012; Oura Y, y col, 2000). Sin embargo, es posible

montar otro tipo de experimentos preliminares, como zimogramas desde extractos crudos de bacteria o levadura que expresan la proteína recombinante de AtSDH (Sarchy AV, y col, 1994; de Sousa SM, 2008; sección 5.5.1), o mediante complementación heteróloga de levaduras mutantes para el gen.

Por lo tanto, a partir de la construcción generada (sección 5.1), se procedió inicialmente a evaluar el desarrollo de *S. cerevisiae* expresora de AtSDH-myc-His crecida en medios suplementados con distintos polioles como única fuente de carbono, donde se esperaba observar diferencias en el crecimiento de aquellas células transformadas con AtSDH versus las transformadas con el vector vacío. Sin embargo los análisis realizados mostraron sorprendentes resultados, los que serán discutidos a continuación. Cabe recalcar que el ensayo realizado no consiste específicamente en un experimento de complementación heteróloga, ya que no existen hasta la fecha cepas mutantes de levadura para los genes SOR1 (YJR159W; Sarchy AV, y col, 1994) y SOR2 (YDL246C; Persson B, y col, 1999), los cuales codifican para proteínas con actividad SDH en este organismo (<http://www.yeastgenome.org/>). A pesar de no contar con cepas mutantes, se analizó el desarrollo de cepas silvestres (BY4743) transformadas con AtSDH-myc-His crecidas en distintos polioles como medio de sustrato (Sarchy AV, y col, 1994).

Como se mostró en la sección 5.2, la primera evaluación de la especificidad de sustrato se determinó a través del montaje de un ensayo en medio líquido, donde se realizaron tres réplicas biológicas con duplicado técnico cada uno, sin observar crecimiento de las células cultivadas en medios suministrados con polioles, pero sí en las con glucosa (control positivo, Figura 10), demostrando que el experimento se encontraba montado en condiciones óptimas para el crecimiento de las células.

Además este tipo de ensayos ha sido validado, ya que se ha implementado anteriormente para el análisis de levaduras crecidas en medios con distintos cationes, evaluando la tolerancia a distintos metales de levaduras transformadas con genes de *Arabidopsis* (Freire M, 2013). Cabe destacar que en los ensayos de crecimiento de levaduras transformadas con un vector promotor-constitutivo (al igual que en este trabajo), se observó sensibilidad celular al crecerlas en medios con distintos metales y no así cuando se evaluaron células transformadas con promotores inducibles (Freire M, 2013), lo que avalaría de alguna manera la baja tasa de crecimiento en aquellas células transformadas con el promotor constitutivo; GPD, empleado en esta Tesis. Además se ha reportado que la incorporación de un transgén en *S. cerevisiae*, puede generar una disminución en el ritmo de crecimiento, cambios en el rendimiento de biomasa y en la capacidad respiratoria, asociado principalmente a una toxicidad proteica que podría estar generada por la formación de inclusiones de proteínas, un efecto del ADN foráneo durante la replicación o una distribución desigual de los recursos celulares durante la replicación (Contador CA, y col, 2011). Por otro lado, hasta la fecha no se ha reportado la presencia de transportadores de polioles que permitan la incorporación de estos sustratos al interior de la levadura, pudiendo responder a la ausencia de crecimiento de las células crecidas en estos medios. Sin embargo, esta teoría no descarta que la incorporación de los alcoholes de azúcar sea mediante simple difusión, fenómeno que se vería ampliamente dificultado debido a la hidrofobicidad de los polioles.

Consecutivamente, se procedió a realizar el mismo experimento en medio sólido (sección 5.2.1), visualizando de manera cualitativa diferencias en el crecimiento entre los distintos tipos celulares (Figura 11). En este experimento se observaron una serie

de fenómenos inesperados. El control realizado con glucosa, mostró el resultado esperado, donde todas las levaduras fueron capaces de crecer en un medio suplementado con el agente de selección (uracilo), mientras que las levaduras silvestres (no-transformadas) no crecieron en medios sin uracilo. Ahora bien, al evaluar las placas que fueron suplementadas con los distintos polioles como única fuente de carbono, no se apreció diferencias en el crecimiento entre células transformadas con AtSDH-myc-His y las transformadas con el vector vacío, fenómeno que podría estar relacionado con la presencia del promotor constitutivo, discutido anteriormente en el experimento en sistema líquido. También se puede agregar que la acumulación de una proteína recombinante en levadura podría estar provocando un desequilibrio metabólico en la zona de acumulación de AtSDH (citoplasma), generando una disminución en la síntesis de la proteína endógena de levadura (SOR1 o SOR2), pudiendo afectar negativamente el crecimiento celular.

Pero lo curioso radica en las células silvestres, capaces de crecer en medio sin uracilo al crecerlas en polioles como única fuente de carbono. Lo primero que fue descartado es la contaminación celular por otra levadura capaz de crecer en medio sin uracilo, comprobándolo por PCR (Figura 12). Sin embargo, este resultado no descarta la posibilidad que las levaduras silvestres hayan sido transformadas con otro vector Ura+, aunque si esta última hipótesis fuese cierta, consecuentemente no se explicaría la ausencia de crecimiento de células silvestres en la placa suplementada con glucosa y sin uracilo, tomando en cuenta que el ensayo se realizó a partir de un mismo inóculo y todas las placas fueron tratadas simultáneamente. De esta manera se sugiere una represión en el crecimiento de las levaduras mediado por la glucosa y que no está

dado por los polioles, fenómeno que debe ser analizado con mayor profundidad en estudios futuros.

Otro fenómeno inusual se dio en las placas donde se sembraron células de levadura sin ninguna fuente de carbono, observando crecimiento de todos los tipos celulares, o sea de células transformadas con AtSDH-myc-His, con vector vacío y levaduras silvestres. En este caso, lo más probable es que el preinóculo crecido en un medio con sacarosa durante 2 d, haya permitido el desarrollo de colonias luego de haber sido transferidas al medio sólido sin fuente de carbono, a través de un uso de carbono remanente en la célula.

Finalmente, a pesar de la existencia de antecedentes que corroboran que la clonación de una SDH en levadura aumenta la actividad de esta enzima (Sarchy y col, 1994), con este trabajo se demostró que la clonación de AtSDH en levadura no funciona como el mejor método empleado para los análisis de especificidad de sustrato enzimático, posiblemente debido a la baja actividad que presenta AtSDH frente a SOR1 (SDH endógena de levadura), camuflando de alguna forma la diferencia en crecimiento. Alternativamente, a pesar de observar una expresión y actividad de AtSDH en levadura (Figuras 9 y 13), la acumulación de la proteína no fue la suficiente como para desencadenar variaciones en el crecimiento celular. Por estas razones, se propone un estudio en *S. cerevisiae* que consista en la generación de levaduras knock out para SOR1 para realizar ensayos de complementación heteróloga.

6.2 Determinación de la actividad enzimática de AtSDH recombinante, expresada en los sistemas de *E. coli* y *S. cerevisiae*.

En el sistema bacteriano se logró inducir, expresar, extraer y purificar exitosamente His-AtSDH. Sin embargo, el proceso completo involucró el uso de agentes caotrópicos (Urea 6 M), debido a la formación de cuerpos de inclusión, dificultando los pasos para la obtención de proteína purificada. Cabe destacar que no toda la proteína recombinante (His-AtSDH) se acumuló como cuerpos de inclusión, sino que fue posible obtener una pequeña fracción de proteína en la fracción soluble (Figura 15), sin embargo, a pesar de optimizar los protocolos de inducción (Figura 16), la mayor cantidad de proteína His-AtSDH siguió acumulándose en la fracción insoluble por lo que se continuó trabajando en condiciones desnaturantes. Posteriormente, se aplicó el método de diálisis realizado por Ohta y col (2005), con el cual se logró solubilizar la proteína, pero no fue posible encontrar actividad en las muestras evaluadas. Tal vez, la formación de un intermediario estructural sin actividad o la dificultad en encontrar experimentalmente las condiciones óptimas para el replegamiento de la enzima, podrían explicar la carencia de actividad de las muestras. Cabe destacar que trabajos realizados por Aguayo (Aguayo MF, y col, 2013), lograron expresar His-AtSDH desde un sistema comercial *in vitro* (generado desde maquinaria traduccional bacteriana), obteniendo actividad con sorbitol y NAD⁺ en las muestras preparadas. A pesar que ambos sistemas de expresión son bacterianos, es probable que el uso de células completas genere modificaciones en la proteína que podrían interferir con la actividad e induzcan la formación de los cuerpos de inclusión.

La expresión recombinante de AtSDH en levadura se realizó con la intención de generar la proteína en un ambiente más similar al de la planta y así evitar los cuerpos

de inclusión. En levadura, se pudo expresar, extraer y purificar exitosamente AtSDH-myc-His, sin observar la presencia de los cuerpos de inclusión. Ensayos de actividad de extractos crudos mediante zimogramas, determinaron la actividad de AtSDH en el metabolismo de sorbitol. Además fueron analizados otros posibles sustratos presentes en Arabidopsis, encontrando una similar actividad para xilitol, menor para arabitol y sin actividad para glicerol, eritritol y manitol donde no fue posible distinguir una banda en los geles nativos (Figura 13). Estos resultados concuerdan con las especificidades de sustratos para otras SDHs de plantas (Tabla II), observando una preferencia por sorbitol y en segundo lugar por xilitol, tanto para plantas No-Rosáceas como el tomate y maíz (al igual que Arabidopsis) y en plantas Rosáceas como la ciruela. Además una publicación reciente de la SDH de Arabidopsis (Nosarzewski M, y cols., 2012) reveló que AtSDH además de tener una gran preferencia por sorbitol, también metaboliza ribitol, ambos sustratos muy similares en su configuración. De esta manera se podría sugerir una cierta selectividad enzimática por sorbitol y xilitol, sin embargo estos análisis cualitativos deben ser corroborados por ensayos enzimáticos mediante espectrofotometría.

Cabe destacar que ha sido estudiada la configuración de los sustratos en relación a la actividad enzimática, esto quiere decir que los polioles que tengan una configuración S en el C-2 (carbono 2) y R en C-4, como el sorbitol (6C; 6 carbonos) y xilitol (5C) son sustratos que presentan mayor especificidad por la enzima SDH (Oura Y, y col, 2000; Lindstad RI, y col, 1998), mientras que manitol (6C) posee una configuración R en C-2 y R en C-4, arabitol (5C); S en C-2 y S en C-4, y finalmente para glicerol (3C) y eritritol (4C), la nula actividad podría estar dada por el largo de la cadena, lo que no permitiría

a estos sustratos tener la conformación requerida en los carbonos 2 y 4 que estarían generando la especificidad enzimática.

Sin embargo los análisis por espectrofotometría arrojaron resultados incongruentes entre las réplicas técnicas y además el control sin sustrato siempre presentó mayor actividad que las muestras analizadas con los distintos polioles evaluados, infiriendo una inhibición por sustrato y una pérdida de actividad de la enzima en el transcurso del tiempo de medición experimental. Una posible explicación para la poca reproducibilidad de los experimentos realizados mediante espectrofotometría a diferencia de los zimogramas puede estar dado por el medio en el cual se realizan los ensayos. Es decir, que los extractos crudos al ser cargados en un gel de poliacrilamida en condiciones nativas, a 4 °C y durante 6 h, probablemente permite una mejor estabilidad proteica, ayudando a la proteína a permanecer en su estructura nativa. Además el revelado de los geles ocurre en un lapsus de tiempo de 30 min y todas las muestras se revelaron de manera simultánea, evitando una pérdida de actividad en el tiempo como ocurrió con los ensayos espectrofotométricos los cuales fueron realizados secuencialmente (6 h aproximadamente).

Finalmente en las muestras purificadas no fue posible observar actividad de AtSDH. Este punto está estrechamente relacionado con lo discutido en 6.1, donde se recalca la dificultad en la obtención de proteína purificada activa, debido a la complejidad estructural de AtSDH (multimérico putativo), que estaría altamente ligado a las propiedades de los medios utilizados para la purificación y renaturación proteica, generando un desafío en el desarrollo del medio óptimo para la obtención de la proteína purificada y activa.

6.3 Análisis de los niveles de transcrito de *AtSDH* en diferentes órganos de *A. thaliana* mediante qRT-PCR.

Para el análisis de la expresión de *AtSDH* en los distintos órganos de Arabidopsis, se contaba preliminarmente con la información obtenida mediante el ensayo histoquímico GUS, el cual arrojó una expresión ubicua en la planta (Parada, 2011). Sin embargo, al evaluar la expresión de *AtSDH* desde datos de microarreglo, fue posible observar una gran expresión en la semilla seca (sección 5.7.1), órgano que no fue evaluado mediante GUS. Por esta razón, se quiso analizar cuantitativamente los niveles de transcrito de *AtSDH* mediante qRT-PCR. Los resultados de la expresión transcripcional de *AtSDH* en distintos órganos (sección 5.7.2; semilla seca, raíz, tallo, hoja caulinar, hoja roseta, silicuas), arrojaron una mayor expresión en semilla seca, al igual que lo observado en microarreglo, llegando a expresarse 8 veces más que silicua, 7,2 veces más que tallo y 1,6 veces más que hoja caulinar.

Hasta la fecha no ha sido reportada la presencia de sorbitol, xilitol o arabitol (sustratos con actividad evaluados en zimogramas) en las semillas secas de Arabidopsis. Otros trabajos de plantas no-Rosáceas han podido identificar actividad SDH en semillas de maíz y soya. En maíz se sugiere que la sacarosa, para ser almacenada en la semilla, debe entrar como monosacáridos de glucosa más fructosa. Posteriormente una fracción de la fructosa es metabolizada a sorbitol (reacción reversa de SDH) posiblemente para compensar el estado de bajo oxígeno/altos niveles de azúcar de la endosperma de semilla. De esta manera con la reacción reversa de la SDH se oxida el NADH a NAD⁺, manteniendo la disponibilidad de aceptores de electrones en la célula, mientras que el sorbitol producido podría volver a fructosa, ser metabolizado por una aldosa reductasa o ser transportado a zonas más oxigenadas de la semilla como es el

embrión (de Sousa SM, y col, 2008). En el caso de las semillas de soya, sorbitol es el intermediario en la inter-conversión de glucosa a fructosa y viceversa, en donde juega un papel modulador en el metabolismo de los azúcares (Kuo TM y col, 1990), debido a la inhibición que sufren algunas fructosas kinasas de plantas por exceso de fructosa (Copeland y Morell, 1985). Posiblemente, el rol de *AtSDH* en semilla está relacionado con las funciones mencionadas anteriormente, aunque no existen estudios vinculados a este tema en semillas de *Arabidopsis*.

Es importante recalcar que a pesar de obtener una mayor cantidad de transcritos de *AtSDH* en semilla, también fue posible distinguir en los ensayos de qRT-PCR una cantidad elevada en hojas caulinares y hojas rosetas, con un 70 y 50 % de la expresión en semillas, respectivamente. Esta tendencia concuerda estrechamente con los datos publicados en la base de datos de microarreglos donde las hojas caulinares tienen una cantidad de transcrito de *AtSDH* un 50 % menor a la de semilla y un 40% para hojas rosetas. Los estudios realizados en el laboratorio han relacionado la actividad enzimática de *AtSDH* frente a condiciones de estrés abiótico, como el estrés salino y por sequía (Aguayo y col, 2013). De esta manera se ha visto que este tipo de estrés provoca una respuesta en una baja del potencial hídrico de la planta, siendo estos órganos los primeros en responder, promoviendo el cierre estomático entre otros fenómenos que deben ser estudiados con mayor detención, y por consecuencia explicaría la alta expresión de *AtSDH* en las hojas. Mientras que, la expresión en el resto de los órganos, como tallo, raíz, flor y silicua es bastante menor que lo reportado para semilla en ambos sistemas evaluados (qRT-PCR y microarreglos), dando cuenta de una expresión basal que sugiere una respuesta temprana de la planta frente a cualquier condición de estrés, ya que se sabe que una de las propiedades de los

polioles es funcionar como solutos compatibles, permitiendo la retención del agua (sección 1.1.1).

Ahora bien, si se comparan los datos obtenidos en *Arabidopsis* (especie no-Rosácea) con los análisis de expresión de manzana (Rosácea), en este último se ha visto expresión en todos los órganos, pero de manera diferencial, la cual estaría dada por distintas isoformas de MdSDH (SDH de manzana; Park SW, y col, 2002). Esto quiere decir que la presencia de varias isoformas está siendo regulada en los distintos órganos de manzana, donde se ha visto que *MdSDH1* se expresa exclusivamente en órganos fuente y hoja jóvenes, mientras que las isoformas *MdSDH2-4* se expresan en órganos sumideros como tallos, raíces y frutos (Park SW, y col, 2002). Este fenómeno es distinto al observado en este Trabajo, donde hasta la fecha se ha podido identificar sólo una secuencia aminoacídica (**AtSDH**; Mandujano P, 2010; Nosarzewski M, y col, 2012) que comparte una alta identidad con otras SDHs previamente caracterizadas, sin distinguir alguna isoforma de AtSDH.

7. Conclusiones

En este trabajo fue posible generar de manera satisfactoria la construcción p426-GPD-AtSDH-myc-His, obteniendo clones de levadura portadores del vector, los cuales fueron capaces de expresar AtSDH-myc-His en este organismo. Sin embargo, se demostró que el uso de esta levadura transformante no fue la mejor herramienta para determinar la especificidad de sustrato de AtSDH, ya sea mediante cultivo en medio líquido (cuantitativo) o en los modelos donde se utilizó medio sólido (cualitativo), donde no fue posible observar diferencias en el crecimiento de las levaduras utilizando distintos polioles como únicas fuentes de carbono.

Con las levaduras transformadas, se logró expresar, extraer y purificar AtSDH-myc-His. Mediante zimogramas, con los extractos crudos de proteína de levadura fue posible determinar la especificidad de AtSDH por sorbitol y xilitol y en menor medida por arabitol y manitol, demostrando la selectividad de la enzima por estos polioles.

Además se estandarizó la inducción y expresión de His-AtSDH desde un sistema bacteriano, logrando obtener extractos crudos de proteína portadores de His-AtSDH en la fracción insoluble, lo que presentó complicaciones en los pasos posteriores de purificación y replegamiento. En ninguno de los sistemas utilizados para la expresión heteróloga de AtSDH recombinante se pudo obtener proteína purificada y activa. Tampoco fue posible obtener extractos crudos activos desde bacteria debido a la formación de cuerpos de inclusión, y finalmente ensayos de actividad de espectrofotometría utilizando extractos crudos de levadura no presentaron concordancia entre las réplicas realizadas. Por lo tanto, el empleo de estos sistemas de expresión no permitió determinar los patrones bioquímicos de AtSDH como son la *K_m*

y la V_{max} , sugiriendo para trabajos futuros el empleo de otros sistemas de expresión como las plantas, *Pichia pastoris*, embriones de pez cebra o algún sistema *in vitro*.

Finalmente, los análisis de qRT-PCR realizados en distintos órganos de *Arabidopsis*, mostraron una mayor expresión de *AtSDH* en semillas secas, igual a lo observado en los análisis de bases de datos de microarreglos. Además fue posible determinar que existe expresión en el resto de los órganos evaluados, de la misma manera que los ensayos realizados mediante GUS, observando una expresión ubicua en la planta, sugiriendo una posible expresión sistémica de *AtSDH* en la planta.

Los resultados obtenidos en esta Tesis, junto con los obtenidos por nuestro grupo de investigación, permitirán entregar información sobre el rol de *AtSDH* en *Arabidopsis* y posteriormente evaluar una posible aplicación biotecnológica en cultivos de interés comercial.

8. Referencias

- Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, Stearns T.** (1997). *Methods in yeast genetics: a cold spring harbor laboratory course manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Aguayo, Ampuero, Mandujano, Parada, Muñoz, Gallart, Altabella, Cabrera, Stange y Handford.** (2013). Sorbitol dehydrogenase is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 205–206; 63–75.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF.** (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*. 64(15):5245-50.
- Banfield MJ, Salvucci ME, Baker EN y Smith CA.** (2001). Crystal structure of the NADP(H)-dependent ketose reductase from *Bemisia argentifolii* at 2.3Å resolution. *J.Mol.Biol.* 306; 239-250.
- Bantog NA, Yamada K, Niwa N, Shiratake K, Yamaki S.** (2000). Gene expression of NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase and NADP⁺-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase during development of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit. *J. Jpn. Soc.Hort. Sci.* 69:231–236.
- Barker SA.**(1955) Acyclic sugar alcohols. In K Peach, MV Tracey, eds, *Modern Methods of Plant Analysis*. Springer Verlag, Berlin, 158–192.
- Bellaloui N, Brown P H, Dandekar A M.** (1999) Manipulation of in vivo sorbitol production alters boron uptake and transport in tobacco. *Plant Physiol* 119: 735–742.
- Beruter J, Feusi MES, Rueedi P.** (1997). Sorbitol and sucrose partitioning in the growing apple fruit. *J Plant Physiol* 151:269–276.
- Bieleski RL.**(1982) Sugar alcohols. In FA Loewus, W Tanner, eds, *Plant Carbohydrates I. Intracellular Carbohydrates, Encyclopedia of Plant Physiology, Vol 13A, New Series*. Springer-Verlag, New York, 158-192.
- Bieleski RL, Redgwell RJ.** (1985). Sorbitol versus sucrose as photosynthesis and translocation products in developing apricot leaves. *Aus J Plant Physiol* 12:657–668.
- Blackwell JR, Horgan R.** (1991). A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS letters*. 295(1-3):10-2
- Blakley RL.** (1951).The metabolism and antiketogenic effects of sorbitol. Sorbitol dehydrogenase. *Biochem J.* 49: 257-271.
- Bradford M M.**(1976).A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.*Anal.Biochem.*72: 248-254.
- Carr IM, Markham AF.** (1995). Molecular genetic analysis of the human sorbitol dehydrogenase gene.*Mammalian Genome.* 6:645-652.
- Çelik E, Çalik P.** (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances* 30: 1108–1118.

- Contador CA, Andrews BA, Liao JC, Asenjo JA.** (2011). Identification of Transcription Factors Perturbed by the Synthesis of High Levels of a Foreign Protein in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Systems Biology*. doi:10.1002/btpr.616
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR.** (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 139(1):5-17.
- de Sousa SM, Paniago MG, Arruda P, Yunes JA.** (2008) Sugar levels modulate sorbitol dehydrogenase expression in maize. *Plant molecular biology*. 68(3):203-13.
- Dell B and Huang L** (1997) Physiological response of plants to low boron. *Plant Soil* 193: 103–120.
- Doehlert DC.** (1987). Ketose reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol*. 84: 830–834.
- Ebert B, Zöller D, Erban A, Fehrlé I, Hartmann J, Niehl A, Kopka J, Fisahn J.** (2010). Metabolic profiling of *Arabidopsis thaliana* epidermal cells. *Journal of Experimental Botany*. 61(5): 1321–1335.
- Everard JD, Gucci R, Kann SC, Flore JA, Loescher WH.** (1994) Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity. *Plant Physiol* 106: 281–292.
- Fiehn O, Kopka J, Trethewey RN and Willmitzer L.** (2000) Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chem.* 72: 3573-3580.
- Gao Z, Maurousset L, Lemoine R, Yoo S-D, van Nocker S, Loescher W.** (2003). Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. *Plant Physiol* 131: 1566–1575.
- Gao Z, Jayanty S, Randolph Beaudry, Loescher W.** (2005). Sorbitol Transporter Expression in Apple Sink Tissues: Implications for Fruit Sugar Accumulation and Watercore Development. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130(2):261–268.
- Gibeaut DM, Hulett J, Cramer GR, y Seemann JR.** (1997). Maximal Biomass of *Arabidopsis thaliana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. *Plant Physiol*. 115: 317-319.
- Guo ZX, Pan TF, Li KT, Zhong FL, Lin L, Pan DM, Lu LX.** (2012). Cloning of NAD-SDH cDNA from plum fruit and its expression and characterization. *Plant Physiol. Biochem.* 57: 175-180.
- Haritatos E, Medville R and Turgeon R.** (2000) Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211: 105-111.
- Hirai M.** (1981) Purification and characteristics of sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from loquat leaves. *Plant Physiol*. 67:221-224.
- Hoshino T, Sugisawa T, Shinjoh M, Tomiyama N, Miyazaki T.** (2003). Membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*IFO 3255—enzymatic and genetic characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1647: 278-288.

- Hu H, Penn SG, Lebrilla CB and Brown PH.** (1997) Isolation and characterization of soluble boron complexes in higherplants. The mechanism of phloem mobility of boron. *Plant Physiol.* 113: 649–655.
- 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 Physiol* 25: 1273–1281.
- Iida M, Bantog NA, Yamada K, Shiratake K, Yamaki S.** (2004). Sorbitol- and Other Sugar-induced Expressions of the NAD⁺-dependent Sorbitol Dehydrogenase Gene in Japanese Pear Fruit. *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 129(6):870–875.
- Jeffery J, Cederlund E, Jörnvall H.** (1984). Sorbitol dehydrogenase: The primary structure of the sheep-liver enzyme. *Eur. J. Biochem.* 140:7-16.
- Kanayama Y, Yamaki S.** (1993). Purification and Properties of NADP-Dependent Sorbitol-6-Phosphate Dehydrogenase from Apple Seedlings. *Plant Cell Physiol.* 34(6): 819-823.
- Kaplan F, Kopka J, Haskell D, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung DY y Guy CL.** (2004). Exploring the Temperature-Stress Metabolome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol:* 136, 4159–4168.
- Klepek YS, Geiger D, Stadler R, Klebl F, Landouar-Arsivaud L, Lemoine R, Hedrich R, Sauera N.** (2005). Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER 5, a New Member of the Monosaccharide Transporter-Like Superfamily, Mediates H⁺-Symport of Numerous Substrates, Including myo-Inositol, Glycerol and Ribose. *The Plant Cell:*17, 204 - 218.
- Kuo TM, Doehlert DC y Crawford CG.** (1990). Sugar metabolism in germinating soybean seeds. Evidence for the sorbitol pathway in soybean axes. *Plant Physiol.* 93: 1514–1520.
- Larkin R.** (2007). Extraction of total protein from Arabidopsis. *Cold Spring Harb Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot4680
- Lewis DH.** (1984) Physiology and metabolism of alditols. Storage carbohydrates in vascular plants, DH Lewis, ed Cambridge, UK: Cambridge University Press), 157–179.
- Lindstad RI, Köll P y Mckinley-Mckee JS.** (1998). Substrate specificity of sheep liver sorbitol dehydrogenase. *Biochem. J.* 330: 479–487.
- Lo Bianco R y Rieger M y Sung SJS.** (1998). A simple, rapid extraction and assay procedure for NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase (SDH) in peach. *J Am Soc Hortic Sci.* 123:1065–1068.
- Loescher WH, Marlow GC, Kennedy RA.** (1982). Sorbitol Metabolism and Sink-Source Interconversions in Developing Apple Leaves. *Plant Physiol.* 70:335-339.
- Luque T, Hjelmqvist L, Marfany G, Danielsson O, El-Ahmad M, Persson B, Jörnvall H, Gonzáles-Duarte R.** (1998) Sorbitol Dehydrogenase of Drosophila: gene, protein, and expression data show a two-gene system. *The Journal of Biological Chemistry.* 273(51): 34293-34301.
- Mandujano P.** (2010). Localización sub-celular y caracterización bioquímica de AtSDH una putativa sorbitol deshidrogenasa. Tesis de Magister, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Maret W y Auld DS.(1988).Purification and Characterization of Human Liver Sorbitol Dehydrogenase. *Biochemistry* 27(5): 1622-1628.

Meng L, Feldman L. (2010). A rapid TRIzol-based two-step method for DNA-free RNA extraction from *Arabidopsis* siliques and dry seeds.*Biotechnology journal.* 5(2):183-6.

Merril CR. (1990). Gel-staining techniques.In Deutscher MP (Ed) Guide to protein purification.*Methods in Enzymology.*Academic press Inc. volume 182: 50–68.

Murashige T. and Skoog F. (1962).A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.*Phys Plant* 15:473-497.

Morgan DR, Soltis DE, Robertson KR. (1994). Systematic and evolutionary implications of *rbcL* sequence variation in Rosaceae. *Amer. J. Bot.* 81: 890–903.

Nelson DE, Rammesmayr G, Bohnert HJ.(1998) Regulation of cell-specific inositol metabolism and transport in plant salinity tolerance. *Plant Cell* 10: 753–764.

Noiraud N, Maurousset L, Lemoine R. (2001). Transport of polyols in higher plants.*Plant Physiol. Biochem.* 39: 717–728.

Norambuena L, Marchant L, Berninsone P, Hirschberg CB, Silva H, Orellana A. (2002). Transport of UDP-galactose in plants.Identification and functional characterization of AtUTr1, an *Arabidopsis thaliana* UDP-galactose/UDP-glucose transporter.*J Biol Chem.* 277(36):32923-9.

Nosarszewski M, Clements AM, Downie AB, Archbold DD.(2004). Sorbitol dehydrogenase expression and activity during apple fruit set and early development. *Physiol Plant.* 121: 391–398.

Nosarszewski M, Downie B, Wu B, Archbold DD. (2012).The role of SORBITOL DEHYDROGENASE in *Arabidopsis thaliana*.*Functional Plant Biology.* 39:462–470.

ODEPA (2011). Estadística de frutales. Superficie plantada y producción estimada (país)

Ohta K, Moriguchi R, Kanahama K, Yamaki S, Kanayama Y. (2005). Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant.*Phytochem.* 66: 2822–2828.

Oura Y, Yamada K, Shiratake K y Yamaki S. (2000). Purification and characterization of a NAD⁺ dependent sorbitol dehydrogenase from Japanese pear fruit.*Phytochemistry* 54:567–572.

Parada R. (2011). Análisis del patrón de expresión de AtSDH, una posible sorbitol deshidrogenasa en *Arabidopsis thaliana*. Seminario de Título, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Park SW, Song KJ, Kim MY, Hwang JH, Shin YU, Kim WC y Chung WI.(2002). Molecular cloning and characterization of four cDNAs encoding the isoforms of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from the Fuji apple. *Plant Sci.* 162: 513–519.

Patrick, JW.(1997) Phloem unloading: Sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 191–222.

Pauly T A, Ekstrom J L, Beebe D A, Chrnyk B, Cunningham D, Griffor M, Kamath A, Lee S E, Madura R, Mcguire D, Subashi T, Wasilko D, Watts P, Mylari B L, Oates P J, Adams P D y Rath1V L. (2003). X-Ray Crystallographic and Kinetic Studies of Human Sorbitol Dehydrogenase. *Structure*, Vol. 11, 1071–1085.

Persson B, Nordling E, Kallberg Y, Lundh D, Oppermann UC, Marschall HU, Jörnvall H. (1999). Bioinformatics in studies of SDR and MDR enzymes. *Adv Exp Med Biol.* 463:373-7.

Pharr D M, Stoop J M H, Williamson J D, Studer-Feusi M E, 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 y Sauer N.(2007). Differential Regulation of Sorbitol and Sucrose Loading into the Phloem of *Plantago major* in Response to Salt Stress. *Plant Physiol* 144:1029-1038.

Potter D, Eriksson T, Evans RC, Oh S, Smedmark JEE, Morgan DR, Kerr M, Robertson KR, Arsenault M, Dickinson TA, Campbell CS. (2007). Phylogeny and classification of Rosaceae. *Pl. Syst. Evol.* 266: 5-43.

Ramsperger-Gleixner M, Geiger D, Hedrich R y Sauer N.(2004). Differential expression of sucrose transporter and polyol transporter genes during maturation of common plantain companion cells. *Plant Physiol*:134, 147–160.

Rejskova A, Patkova L, Stodulkova E, Lipavska H. (2007). The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions. *J Plant Physiol* 164: 174–184.

Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R. (2004). When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiol* 134: 1683–1696.

Rubio RO, Suzuki A, Mitsumasu K, Homma T, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T. (2011). Cloning of cDNAs encoding sorbitol dehydrogenase-2a and b, enzymatic characterization, and up-regulated expression of the genes in *Bombyx mori* diapause eggs exposed to 5 °C. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 41:378-387.

Sarthy AV, Schopp C, Idler KB.(1994) Cloning and sequence determination of the gene encoding sorbitol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 140(1):121-6

Schauder S, Schneider KH, Giffhorn F. (1995). Polyol metabolism of *Rhodobacter sphaeroides*: biochemical characterization of a short-chain sorbitol dehydrogenase. *Microbiology.* 141:1857-1863.

Smirnoff N, Cumbers Q. (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28: 1057–1060.

Stoop JMH, Pharr DM. (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.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Teo G, Suzuki Y, Uratsu S L, Lampinen B, Ormonde N, Hu W K, DeJong T M y Dandekar A M. (2006). Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. *PNAS.* 103:18842–18847.

Vlasak J, y Ionescu R. (2008). Heterogeneity of Monoclonal Antibodies Revealed by Charge-Sensitive Methods. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 9:468-481.

Wang XL, Xu YH, Peng CC, Fan RC, Gao XQ.(2009). Ubiquitous distribution and different subcellular localization of sorbitol dehydrogenase in fruit and leaf of apple. *J Exp. Bot.* 60: 1025–1034.

Webb KL and Burley JWA.(1962) Sorbitol translocation in apple. *Science* 137: 766.

Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ.(2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE*. 8:718.

Wurman J. (2013). Seminario de Título, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Xiong L, y Zhu JK. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*. 25:131–139

Yamada M y Saier MH, Jr.(1987). Physical and Genetic Characterization of the Glucitol Operon in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 169(7):2990-2994.

Zimmermann M H y Ziegler H.(1975). List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, M. H. Zimmermann and J. A. Milburn, Eds. (Berlin: Springer Verlag), pp. 480–503.

Páginas web (fecha última revisión; 23 de noviembre de 2012):

- **Figura X:** www.biologie.uni-ulm.de/bio2/anita/Archaea.htm
- **TAIR:** www.arabidopsis.org
- **SGD:** <http://www.yeastgenome.org/>

Anexo 1

Fragmento secuenciado de la construcción p426-GPD-AtSDH-myc-His, usado para la expresión y acumulación de la proteína AtSDH-myc-His en levadura. En la secuencia se muestran en amarillo y calipso los partidores utilizados para la secuenciación (M13pUC Reverse y T7 promotor respectivamente), dando un 100 % de identidad nucleotídica entre la secuencia *in silico* y el ADN plasmidial de los clones evaluados (clones 19 y 20, Figura X). Los colores verde petróleo y verde musgo muestran los sitios de clonamiento de *AtSDH*, BamHI y NotI respectivamente. En verde se muestra el marco de lectura abierto (ORF) de *AtSDH* con el codón de término mutado (TTG, morado) el cual permitió la fusión de los epítopes myc (gris) y His (rosado) en el extremo carboxilo terminal de *AtSDH*.

```
AGCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCCTCACTA
AAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCAGTTTATCATTATCAATACTCGCCATTTCAAAGAATACGTAATAATTA
ATAGTAGTGATTTTCCTAACTTTATTTAGTCAAAAAATTAGCCTTTTAATTCTGCTGTAACCCGTACATGC
CCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATATAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCCTGGCA
TCCACTAAATATAATGGAGCCCCTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAAAAGAATCCCAGCACCAAAATA
TTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGTCCATTCTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAA
CAGGCAAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAAT
TGACCCACGCATGTATCTATCTCATTTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTGATTTGGAAAAA
GCTGAAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCTGAAATATTCCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGG
TAGGTATTGATTGTAATCTGTAAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTCTACTTTTATAGTTAGTCTTTT
TTTTAGTTTTTAAACACCAGAACTTAGTTTTGACGGATTCTAGAAGTAGTGGATCCAAATGGGGAAAGGAG
GGATGTCTCAAGGAGAAGGCTCAAAGGTTGAAGAAGAAAACATGGCTGCTTGGTTGGTTGGTATCAATACC
CTCAAGATCCAACCTTTTCTTCTTCTTCCGTTGGTCTCATGATGTGAGAGTTAGGATGAAAGCTGTTGG
TATTTGTGGAAGTGATGTTTACCTTAAGACCATGAGATGTGCGGATTTTGTGGTGAAGAGCCGATGG
TGATTTGGACATGAATGTGCTGGGATCATTGAAGAAGTAGGTGAAGAAGTGAACATTTAGTGGTTGGTGAC
CGTGTAGCTCTTGAACCTGGGATTAGTTGTTGGAGATGCAATCTCTGCAGGGAAGGACGATACAACCTTTG
TCCAGAAATGAAGTTCTTTGCAACTCCACCGGTTTCATGGCTCTTTAGCTAACCAAGTGGTACACCCTGCGG
ACCTATGCTTCAAATTGCCCTGAGAATGTGAGTTTGGAGGAAGSAGCAATGTGTGAACCACTTAGTGTGGT
GTCCATGCTTGTGCGCGAGCTGAGGTTGGTCTGAAACAAACGTTTTGGTAATGGGAGCTGGACCTATTGG
CCTTGTTACAATGTTGGCTGCTCGGGCTTTTCAAGTGTGCTTAGAATGTTATTGTGGATGTTGATGAGAACC
GTTTAGCCGTAGCAAAACAGCTCGGCGCAGATGAGATTGTACAAGTGACAACAACTTAGAGGATGTTGGT
TCTGAGGTTGAACAGATTCAGAAAAGCTATGGGGTCAAACATCGATGTAACATTCGACTGTGCGGGTTTTAA
CAAAACCATGTGCAGACGATTAGCAGCCACTCGTGTGGCGGTAAAGTCTGTCTTGTGCGGAATGGGTACG
GTATAATGACTGTCCCTCTCACTCCTGCAGCTGCAAGGGAGGTAGATGTGGTGGGTGTGTTTCAAGGTACAAG
AACACATGGCCATTGTGTCTTGAGTTCTTGACAAGTGGTAAGATTGATGTAAGCCACTCATAACCCACAG
```

ATTTCGGTTTCTCTCAAAAAGGAAGTGGAAAGATGCCTTTGAAACCAGTGCTCGTGGGAGCAATGCCATCAAAG
 TTATGTTCAATCTCTTG TGGCCCTCGAGTCTAGAGGGCCCTTCGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGAT
 CTGAATATGCATACCGGT CATCATCAGCATCAGCATGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCC
 TTCTAGCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTTCGACCTCGAGTCATGTAATTAGTT
 ATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCAGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGA
 AGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTC
 TTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTGGGA
 CGCTCGAAGGCTTTAATTTGCGGCCGGTACCCAATTTCGC CCTATAGTGAGTCGTATTA

Tabla VIII: Secuencia y descripción de los sitios de interés en la construcción p426-GPD-AtSDH-myc-His, que permitió la acumulación de AtSDH-myc-His en *S. cerevisiae*.

Secuencia	Nombre	Descripción
AGCGGATAACAATTTACACAGG	M13pUC Reverse	Partidor universal utilizado para secuenciación
CCTATAGTGAGTCGTATTA	T7 promotor	Partidor universal utilizado para secuenciación
GGATCC	<i>Bam</i> HI	Sitio de clonamiento de <i>AtSDH</i>
GCGGCCGC	<i>Not</i> I	Sitio de clonamiento de <i>AtSDH</i>
TTG	Reemplazo codón de término	Codón de término de <i>AtSDH</i> TGA fue reemplazado por TTG para la fusión de myc-His C-terminal
ATG.....TCTCTTG	ORF de <i>AtSDH</i>	ORF completo
GAACAAAACTCATCTCAGAAGA GGATCTG	Myc	Epítotope myc fusionado a <i>AtSDH</i> en extremo C-terminal
CATCATCAGCATCAGCAT	Poli His (x6)	Epítotope de 6 His fusionado a <i>AtSDH</i> en extremo C-terminal
TGA	Terminador	Codón de término de <i>AtSDH</i> recombinante