

H-FC  
16-BMCM  
282  
1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

# **Caracterización bioquímica y rol *in vivo* de AtSDH, una supuesta sorbitol 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**

**María Francisca Aguayo Arévalo**

**Agosto, 2013**

Director de Tesis: Dr. Michael Handford.



## 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 la candidata.

**María Francisca Aguayo Arévalo**

Ha sido aprobada 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 03 de Mayo, 2013.

Director de Tesis:

**Dr. Michael Handford**

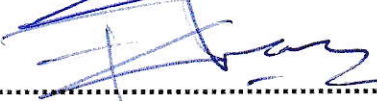
  
.....  


Comisión de Evaluación de la Tesis

**Dra. Lorena Norambuena**  
(Presidente comisión)

  
.....

**Dr. Francisco Chávez**  
(Evaluador comisión)

  
.....

Santiago de Chile, Agosto de 2013



A mi mamá y papá. A mis abuelos. A mi gordito...  
y a todas las personas que creyeron en mí y me apoyaron en este proceso.

*"No te rindas que la vida es eso, continuar el viaje, perseguir tus sueños..."*  
Mario Benedetti

---

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a mi tutor, guía, profesor y jefe, Dr. Michael Handford. Gracias por su inmenso apoyo, por sus siempre buenos y alentadores consejos y por sobretodo su cariño y confianza. Sin duda profe Mike, mis logros son en gran parte fruto de su trabajo. Siempre será para mí el mejor profesor!.

Quisiera agradecer a mi querido team MH por su constante colaboración, en particular a mis queridos compañeros Panchi, Sofi y Joel, quienes me acompañaron, ayudaron y alegraron muchísimo cada día de trabajo.

Muchas gracias a cada uno de los integrantes del laboratorio BMV por acogerme y por hacer de nuestro lab. un lugar de gran compañerismo y alegría. He aprendido mucho de cada uno de ustedes, son maravillosas personas. Gracias Profe Claudia y Profe Lore por su enseñanza en estos cinco años y su gran disposición para responder cualquier duda. Gracias Profe Liliana por sus sabias palabras, su cariño y preocupación, siempre será un ejemplo a seguir. Agradezco también a Sebi, por su gran ayuda diaria en nuestro lab, y a Ange por ayudarme en el trabajo, escucharme y compartir conmigo.

También quisiera agradecer al Laboratorio de Bioquímica de nuestra Facultad, en particular al Profesor Ricardo Cabrera y a Rodrigo Muñoz, por su gran colaboración con nuestro trabajo, infinita ayuda y por darme la oportunidad de conocer y aprender sobre cinética y proteínas. Gracias Daddy y Yessi por acompañarme y animarme cada agotadora tarde de medición.

Gracias a la Dra. María Teresa Altabella por acogerme en su laboratorio de Fisiología Vegetal (Universidad de Barcelona). Sin dudas, la pasantía realizada fue una de las mejores oportunidades que he tenido en mi vida. Me permitió aprender nuevas técnicas, obtener resultados y conocer personas y lugares increíbles. Gracias en particular a mi querida compañera y amiga "Martíña" por ayudarme a llevar a cabo cada uno de los experimentos propuestos y por tan buenos momentos compartidos. A mi maravillosa familia española por hacer de ese tiempo de trabajo un conjunto de momentos muy felices. Tía Pepa, Jony, Marise, Nizar y Sergio, nunca podré agradecerles lo mucho que hicieron por mí, los quiero no se imaginan cuanto!.

También quisiera agradecer a mis grandes amigos de la vida: Pauli, Juank, Cinthia, Yu, Gi, Fefi, Nelly, Darius, Nacho, Kathy y Pauli E. Con cada uno de ustedes he vivido los más lindos momentos, gracias por su apoyo constante, su confianza en mí, sus excelentes consejos, por su alegría y compañía en tantas ocasiones, sé que a pesar de las distancias, nos queremos infinitamente y lograremos mantener nuestra amistad hasta que seamos muy viejitos.

Infinitas gracias a mi bella familia, las personas que más quiero en este mundo. Gracias por su incondicional apoyo, amor y maravillosa compañía. Gracias en especial a ti mamá, por tu imedible esfuerzo por hacernos feliz. Admiro tu gran valor, fuerza y esfuerzo. Gracias a mis dos hermanitas, en especial a ti Feñis, por alegrarme y mostrarme la vida de una manera diferente. Gracias por quererme, a pesar de lo indiferente que soy en momentos de estrés.



Gracias a mi queridos abuelitos, por su inmenso esfuerzo, cariño, comprensión y apoyo incondicional. Agradezco a Dios tenerlos todos conmigo. En particular agradezco a abuelita "nana" por cuidarnos, acompañarnos y regalarnos en todos los momentos, eres y serás siempre mi segunda madre, te adoro!.

Gracias a mi papito por tan lindos recuerdos. Sé que desde donde estas, ayudas y diriges mi camino. No te imaginas cuanto te extraño, papá. Espero te sientas orgulloso de mí y de la persona que me he convertido.

También quisiera agradecer a mi "nueva familia". Tío Claudio y Tía Ely gracias por su infinito cariño y por hacerme sentir parte de ustedes desde el primer día. Nunca olvidaré sus palabras Tía Ely, sé que desde donde esta nos guía (al igual que mi padre) y nos apoya, la quiero y recuerdo por siempre.

Por último, y más importante, quisiera agradecer a mi gordo Diego, la personita más maravillosa de este mundo. El conocerte ha sido una de las cosas más hermosas de mi vida. Gracias infinitas, por tu apoyo, tu incondicional ayuda y por creer en mi, incluso muchas veces más que yo misma. Admiro tu inteligencia, tu eficiencia y perseverancia en lo que te propones, y tu forma de ver la vida, que espero acompañar y compartir por siempre. Gracias mi amor porque me enseñaste a amar y a ser más feliz de lo que nunca había sido. Este logro es también en gran parte por ti. Te amo!.

Finalmente, Gracias Beca CONICYT por financiar mis estudios.

## INDICE

<b>Listado de Figuras.</b>	<b>V</b>
<b>Listado de Tablas.</b>	<b>VI</b>
<b>Listado de ecuaciones.</b>	<b>VII</b>
<b>Abreviaturas y definiciones.</b>	<b>VIII</b>
<b>Resumen.</b>	<b>X</b>
<b>Abstract.</b>	<b>XII</b>
<b>I. Introducción.</b>	<b>01</b>
1. Carbohidratos y su forma de transporte en plantas.	<b>02</b>
2. Función de polioles en plantas.	<b>03</b>
3. Metabolismo de Sorbitol en especies Rosáceas.	<b>06</b>
4. Enzimas Sorbitol Deshidrogenasas.	<b>08</b>
5. Identificación de polioles en especies no-Rosáceas.	<b>12</b>
6. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.	<b>13</b>
7. Evidencias del metabolismo y transporte de polioles en <i>Arabidopsis</i> .	<b>14</b>
8. Sorbitol deshidrogenasa en <i>Arabidopsis</i> .	<b>15</b>
9. Trabajo propuesto.	<b>17</b>
<b>II. Hipótesis y Objetivos.</b>	<b>19</b>
1. Hipótesis.	<b>20</b>
2. Objetivos.	<b>20</b>
2.1. Objetivo General.	<b>20</b>
2.2. Objetivos Específicos.	<b>20</b>
<b>III. Materiales y Métodos.</b>	<b>21</b>
<b>1. Reactivos.</b>	<b>22</b>
<b>2. Material Biológico.</b>	<b>22</b>
<b>3. Métodos de Biología Molecular.</b>	<b>22</b>
3.1. Extracciones de ácidos nucleicos.	<b>22</b>
3.1.1 Purificación de ADN genómico desde <i>Arabidopsis thaliana</i> .	<b>22</b>
3.1.2. Purificación de ARN desde <i>Arabidopsis Thaliana</i> .	<b>23</b>
3.1.3. Purificación de ADN plasmidial desde <i>Escherichia coli</i> .	<b>23</b>
3.2. Cuantificación y análisis de ácidos nucleicos.	<b>24</b>
3.2.1. Cuantificación y análisis mediante espectrofotómetro.	<b>24</b>
3.2.2. Electroforesis en geles de agarosa y purificación desde geles.	<b>24</b>
3.2.3. Electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturantes.	<b>25</b>
3.3. Partidores.	<b>25</b>
3.3.1 Diseño de partidores específicos para <i>AtSDH</i> .	<b>25</b>

3.4. Reacciones de PCR.	28
3.4.1. Amplificación del ADNc de <i>AtSDH</i> mediante PCR.	28
3.4.2. Reacción de Transcripción Reversa (RT-PCR).	28
3.4.3. Reacciones de PCR en Tiempo Real o RT-PCR cuantitativo.	29
3.5. Construcciones genéticas.	33
3.5.1. Clonación de <i>AtSDH</i> en vector pEXP5/TOPO®.	33
3.5.1.1. Digestiones enzimáticas para la selección de clones positivos pEXP5- <i>AtSDH</i> .	34
3.5.2. Clonación de fragmentos de ADN en el sistema pCR®8.	34
3.6. Secuenciación.	35
<b>4. Trabajo con Bacterias.</b>	<b>35</b>
4.1. Crecimiento de bacterias.	35
4.2. Transformación de <i>E. coli</i> por golpe térmico.	35
<b>5. Trabajo con Proteínas.</b>	<b>36</b>
5.1. Cuantificación de proteínas.	36
5.2. Síntesis <i>in-vitro</i> de His- <i>AtSDH</i> .	36
5.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS- PAGE).	37
5.3.1. Tinción de Coomassie.	38
5.3.2. Inmunodetección mediante Western-Blot.	38
5.4. Purificación de His- <i>AtSDH</i> por cromatografía de afinidad.	39
5.4.1. Sistema tradicional de purificación mediante columnas HisTrap.	39
5.4.2. Sistema de purificación alternativo para pequeñas cantidades.	40
5.4.2.1. Proceso de purificación.	40
5.4.2.2. Mantenimiento de las minicolumnas de purificación.	41
5.5. Medición de actividad sorbitol deshidrogenasa.	41
5.5.1. Ensayos de actividad cualitativos mediante geles nativos (zimogramas).	41
5.5.2. Ensayos de actividad cuantitativos mediante espectrofotometría.	42
5.6. Determinación de las constantes cinéticas aparentes.	43
<b>6. Trabajo con Plantas.</b>	<b>44</b>
6.1. Obtención de líneas insercionales homocigotas en <i>AtSDH</i> .	44
6.1.1. Determinación de la ubicación del ADN-T en líneas <i>sdh-</i> .	45
6.2. Condiciones de crecimiento para <i>Arabidopsis</i> .	45
6.2.1. Crecimiento en tierra.	45
6.2.2. Crecimiento en cultivo hidropónico.	46
6.2.3. Crecimiento <i>in-vitro</i> .	46
6.2.3.1. Esterilización de semillas.	46
6.2.3.2. Crecimiento de plántulas en placas de Petri.	47
6.3. Tratamientos de estrés abiótico.	47
6.3.1. Tratamientos de inducción en estrés por frío.	47
6.3.2. Tratamiento de estrés osmótico, salino y en medios suplementados con Sorbitol.	48

6.3.3. Experimentos de Deshidratación o sequía.	48
6.3.3.1 Medición del contenido relativo de agua (RWC).	49
6.3.3.2. Medición del contenido gravimétrico de agua en el suelo (SGWC).	49
<b>IV. Resultados.</b>	<b>50</b>
1. Determinación de la actividad y especificidad de sustrato de AtSDH.	51
1.1. Construcción del vector de expresión <i>in-vitro</i> pEXP5-AtSDH.	51
1.2. Síntesis <i>in-vitro</i> de la proteína de fusión His-AtSDH.	52
1.3. Mediciones de actividad en productos de reacción de síntesis <i>in-vitro</i> .	54
1.4. Purificación de His-AtSDH.	57
1.5. Constantes cinéticas de His-AtSDH.	60
1.6 Especificidad de sustrato.	62
2. Identificación y análisis molecular de líneas mutantes insercionales homocigotas en <i>AtSDH</i> de <i>Arabidopsis</i> .	65
3. Análisis fenotípico de líneas mutantes insercionales.	75
3.1. Estrés por frío.	75
3.2. Estrés osmótico y salino.	77
3.3. Crecimiento de líneas mutantes en medios suplementados con sorbitol.	78
3.4. Estrés por deshidratación.	80
<b>V. Discusión.</b>	<b>83</b>
1. Caracterización bioquímica de AtSDH.	84
2. Determinación del rol fisiológico de AtSDH.	91
2.1. Identificación y análisis molecular de líneas insercionales en <i>AtSDH</i> .	91
2.2. Análisis fenotípicos de líneas de <i>Arabidopsis sdh-</i> .	93
2.2.1. Estrés por frío.	94
2.2.2. Estrés Salino.	95
2.2.3. Estrés osmótico.	96
2.2.4. Medio MS sorbitol.	99
2.2.5. Estrés por sequía.	100
<b>VI. Conclusiones.</b>	<b>103</b>
<b>VII. Difusión.</b>	<b>106</b>
1. Colaboraciones.	107
2. Producción científica.	107
3. Participación en congresos.	107
<b>VIII. Referencias.</b>	<b>109</b>



## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Metabolismo de sorbitol en especies Rosáceas.	8
<b>Figura 2.</b> Reacción catalizada por sorbitol deshidrogenasa (SDH).	9
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo del locus At5g51970 y sus respectivas regiones nucleotídicas.	26
<b>Figura 4.</b> Esquema del vector de expresión pEXP5-NT/TOPO®.	33
<b>Figura 5.</b> Protocolo software Gen5.	43
<b>Figura 6.</b> Generación y análisis del vector pEXP5- <i>AtSDH</i> .	52
<b>Figura 7.</b> Análisis de western blot del producto de la reacción obtenido luego de la síntesis <i>in-vitro</i> de la proteína recombinante His- <i>AtSDH</i> .	53
<b>Figura 8.</b> Análisis de actividad mediante zimogramas del producto de la reacción <i>in-vitro</i> de His- <i>AtSDH</i> .	55
<b>Figura 9.</b> Mediciones espectrofotométricas a partir de productos de reacción de síntesis <i>in-vitro</i> .	56
<b>Figura 10.</b> Análisis mediante Western blot de la elución de la proteína recombinante His- <i>AtSDH</i> usando distintas concentraciones de imidazol en el proceso de purificación.	58
<b>Figura 11.</b> Purificación de la proteína His- <i>AtSDH</i> mediante mini-columns.	60
<b>Figura 12.</b> Parámetros cinéticos de His- <i>AtSDH</i> .	62
<b>Figura 13.</b> Especificidad de sustrato de His- <i>AtSDH</i> .	63
<b>Figura 14.</b> Genotipificación de plantas <i>sdh</i> -.	68
<b>Figura 15.</b> Análisis molecular mediante RT-PCR convencional de líneas insercionales en <i>AtSDH</i>	70
<b>Figura 16.</b> Eficiencia de los partidores utilizados para amplificar <i>AtSDH</i> en experimentos de PCR en tiempo real.	72
<b>Figura 17.</b> Análisis molecular mediante PCR en tiempo real de líneas insercionales en <i>AtSDH</i> .	74
<b>Figura 18.</b> Niveles de expresión relativa de <i>AtSDH</i> y <i>AtA6PR</i> en estrés por frío.	76
<b>Figura 19.</b> Fenotipos de crecimiento de líneas <i>sdh</i> - comparadas con plantas silvestres.	79
<b>Figura 20.</b> Tolerancia a estrés por deshidratación de líneas <i>sdh</i> - comparadas con plantas silvestres de Arabidopsis.	81

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Porcentaje de identidad aminoacídica de AtSDH con diferentes enzimas SDHs vegetales.	<b>16</b>
<b>Tabla II.</b> Partidores utilizados en el desarrollo de la tesis.	<b>27</b>
<b>Tabla III.</b> Programas de PCR utilizados en el desarrollo de la tesis.	<b>31</b>
<b>Tabla IV.</b> Composición de la Solución nutritiva tipo Hoaglands y cols 1938 (0,5X) utilizada en Servei de Camps Experimentals (Universidad de Barcelona, España).	<b>46</b>
<b>Tabla V.</b> Composición (mM) de la Solución nutritiva (100X) para cultivo hidropónico.	<b>46</b>
<b>Tabla VI.</b> Detalle de las soluciones utilizadas para los procesos de purificación de His-AtSDH.	<b>59</b>

## LISTADO DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> Eficiencia de partidores para PCR en tiempo real.	<b>30</b>
<b>Ecuación 2.</b> Cuantificación de niveles relativos de transcrito por PCR en tiempo real.	<b>30</b>
<b>Ecuación 3.</b> Actividad específica.	<b>42</b>
<b>Ecuación 4.</b> Velocidad inicial ( $v_0$ ): Modelo cinético de Michaelis-Menten.	<b>43</b>
<b>Ecuación 5.</b> Constante catalítica $k_{cat}$ .	<b>43</b>
<b>Ecuación 6.</b> Contenido relativo de agua (RWC).	<b>49</b>
<b>Ecuación 7.</b> Contenido gravimétrico de agua (SGWC).	<b>49</b>



## ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

$\Psi_w$	Potencial hídrico del agua.
$A_{(230, 260, 280)}$	Absorbancia medida a 230, 260 o 280 nm
<b>A6PR</b>	Aldosa 6 fosfato reductasa (síntesis de sorbitol)
<b>Agua NP</b>	Agua nano pura (libre de nucleasas)
<b>ADN</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>ADNg</b>	Acido desoxirribonucleico genómico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>ADN-T</b>	Acido desoxirribonucleico de transferencia (inserción líneas SALK)
<b>ARN</b>	Acido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>cols</b>	colaboradores
<b>C</b>	carbono
<b>C-</b>	Control negativo de reacción
<b>cv</b>	Variedad cultivada
<b>CTAB</b>	Cetil trimetil amonio bromuro
<b>cm<sup>3</sup></b>	centímetros cúbicos
<b>d</b>	días
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótido Tri-fosfato
<b>dT</b>	Desoxitimidina
<b>DW</b>	dry weight (peso seco).
<b>ej.</b>	ejemplo
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>FW</b>	fresh weight (peso fresco).
<b>g</b>	Gramo (s)
<b>gpf</b>	gramos de peso fresco
<b>h</b>	hora (s)
<b>his</b>	Histidina
<b>kb</b>	Kilo base
<b>L</b>	Litro
<b>Lab</b>	Laboratorio
<b>LB</b>	Medio Luria Bertani
<b>LeSDH</b>	Sorbitol deshidrogenasa de tomate
<b>M</b>	Molar



<b>min</b>	minuto (s)
<b>MdSDH</b>	Sorbitol deshidrogenasa de manzano
<b>mg</b>	mili gramos
<b>mM</b>	mili Molar
<b>mm</b>	mili metros
<b>ml</b>	mili litros
<b>MS</b>	Medio Murashigue & Skoog
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrógeno
<b>NCBI</b>	Centro Nacional de Información Biotecnológica.
<b>ng</b>	nano gramo
<b>NP</b>	nano pura
<b>OD</b>	Densidad óptica
<b>pb</b>	Par de Bases
<b>p/v</b>	peso / volumen
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PVP</b>	Poli vinil pirrolidona
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Reacción de transcriptasa reversa
<b>RWC</b>	Contenido relativo de agua
<b>SDH</b>	Sorbitol deshidrogenasa
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TAE</b>	Tris-acetato EDTA
<b>T-Nos</b>	Terminador de nopalina sintasa
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil) aminometano
<b>TW</b>	turgid weight (peso humedo).
<b>U</b>	unidad enzimática
<b>UTR</b>	Untranslated region (Región no traducible)
<b>UV</b>	Ultra violeta
<b>V</b>	Voltaje
<b>°C</b>	Grado Centígrado
<b>µg</b>	Micro Gramo
<b>µl</b>	Micro Litro
<b>µM</b>	Micro Molar

## RESUMEN

Los carbohidratos cumplen importantes funciones en plantas, siendo su transporte y translocación por el floema fundamental para crecimiento y desarrollo de los distintos órganos y tejidos. En la mayoría de las especies vegetales la principal forma de carbohidrato transportado es la sacarosa. Sin embargo existen familias de plantas en que la cantidad de sacarosa es reducida en comparación a otros carbohidratos transportados, como es el caso de la rafinosa y alcoholes de azúcares o polioles. Polioles son el producto primario de la fotosíntesis en diversas y económicamente importantes familias de plantas superiores. El sorbitol, uno de estos alcoholes de azúcar, es sintetizado y translocado a través del floema en especies de las familias Rosáceas y Plantagináceas, en las cuales las enzimas encargadas de su síntesis (aldosa 6-fosfato reductasa) y degradación (sorbitol deshidrogenasa, SDH) han sido ampliamente estudiadas. En plantas no-Rosáceas, que no transportan ni acumulan sorbitol, se han encontrado genes ortólogos a las SDH ya descritas, como es el caso del tomate, soya y maíz. En un reciente estudio (Nosarzewski y cols, 2012) y en nuestro grupo de investigación, se identificó mediante genética reversa un marco de lectura abierto que podría codificar para una enzima SDH de *Arabidopsis thaliana* (*AtSDH*). La secuencia aminoacídica de la proteína codificada por *AtSDH* tiene una identidad mayor al 75% con las SDHs ya descritas, y presenta los motivos y dominios conservados propios de enzimas SDH. La identificación de una enzima relacionada con el metabolismo de polioles en *Arabidopsis*, genera la gran inquietud de cuál es el rol fisiológico que cumplen alcoholes de azúcar en esta especie vegetal, como modelo de especies que no acumulan ni transportan polioles como principales fotosintatos.

Utilizando *Arabidopsis* como modelo de estudio y en el marco de la caracterización bioquímica de *AtSDH*, en el presente trabajo de tesis se realizaron ensayos cinéticos que permitieron confirmar actividad SDH de la proteína recombinante His-*AtSDH* sintetizada *in-vitro*. En presencia de  $\text{NAD}^+$ , pero no de  $\text{NADP}^+$ , His-*AtSDH* fue capaz de oxidar una amplia gama de

alcoholes de azúcar con una clara preferencia por sorbitol, ribitol y xilitol como sustratos frente a otros polioles presentes en Arabidopsis. La actividad con sorbitol de la proteína fue analizada en sus parámetros cinéticos  $K_M$ ,  $V_{MAX}$  y  $k_{cat}$ , obteniéndose valores similares a las constantes publicadas para otras enzimas SDH descritas en especies no-Rosáceas.

Para determinar el rol *in-vivo* de AtSDH en Arabidopsis, fueron identificadas y caracterizadas 3 líneas mutantes insercionales homocigotas en las cuales la inserción de ADN-T interrumpió la secuencia transcrita del gen en distintas regiones, disminuyendo los niveles relativos de expresión en más de un 97% con respecto a plantas silvestres. Análisis morfométricos de las distintas líneas, permitieron observar que bajo condiciones estándar de crecimiento la carencia de AtSDH no afecta el desarrollo de Arabidopsis. Sin embargo, este desarrollo se vio alterado cuando las distintas líneas fueron sometidas a condiciones de estrés. En medios de crecimiento suplementados con sorbitol, las tres líneas mutantes exhibieron una reducción del peso seco y la longitud de la raíz principal en comparación a plantas silvestres. Mientras, que bajo condiciones de estrés por deshidratación, plantas carentes de AtSDH son más resistentes a la presión que plantas silvestres, reflejado en una disminución en la pérdida del contenido de agua en sus hojas al ser eliminado el riego y una mayor tasa de sobrevivencia una vez que el riego fue reanudado en condiciones control. Estas importantes evidencias sugieren que limitaciones en el metabolismo de polioles endógenos y exógenos afectan el crecimiento de Arabidopsis y alteran su respuesta a sequía, incrementando su tolerancia.

## ABSTRACT



Carbohydrates play important roles in plants, and their transport and translocation through the phloem are essential for growth and development of organs and tissues. In most plant species, the major form of carbohydrate transported is sucrose. However, there are families of plants in which the quantity of sucrose is reduced compared to other carbohydrates transported, such as raffinose and sugar alcohols or polyols. Polyols are the primary product of photosynthesis in several important families of higher plants. Sorbitol, one of these sugar alcohols, is synthesized and translocated through the phloem in species of the Rosaceae and Plantaginaceae family, in which the enzymes involved in the synthesis (aldose 6-phosphate reductase) and degradation (sorbitol dehydrogenase, SDH) have been extensively studied. In non-Rosaceae species, that do not transport or accumulate sorbitol, orthologous genes to previously-described SDHs have been found (tomato, soybean and maize). In a recent study (Nosarzewski et al, 2012) and in our research group, an open reading frame encoding a potential SDH enzyme of *Arabidopsis thaliana* (AtSDH) was identified by reverse genetics. The amino acid sequence of the protein encoded by AtSDH has an identity of more than 75% with previously-described SDHs, and presents conserved motifs and domains proper of SDH enzymes. The identification of an enzyme involved in polyol metabolism in *Arabidopsis*, generates significant interest concerning the physiological role of sugar alcohols in this species, as a model for species that do not accumulate or transport polyols as primary photosynthate.

Using *Arabidopsis* as a model system, in this Thesis, kinetic assays were performed to determine SDH activity of recombinant His-AtSDH protein synthesized *in vitro*. In the presence of NAD<sup>+</sup>, but not NADP<sup>+</sup>, His-AtSDH was able to oxidize a wide range of sugar alcohols with a clear preference for sorbitol, ribitol and xylitol as substrates, against other polyols present in *Arabidopsis*. Sorbitol activity of the protein was analyzed in detail, and the values of the kinetic



parameters ( $K_M$ ,  $V_{MAX}$  y  $k_{cat}$ ) obtained were similar to those published for other SDH enzymes described in non-Rosaceae species.

To determine the role *in-vivo* of AtSDH in Arabidopsis, three homozygous insertional mutants lines were identified and characterized in which the insertion of a T-DNA interrupted the coding sequence of the gene in different regions, reducing the relative levels of expression by >97 % compared to wild type plants. Morphometric analysis of these lines, revealed that under standard growth conditions, AtSDH deficiency did not affect Arabidopsis development. However, development was altered in the mutants when subjected to stress conditions. In growth media supplemented with sorbitol, the mutant lines showed a reduction in dry weight and primary root length compared to wild type plants. Under dehydration stress, AtSDH-deficient plants were more resistant than wild type plants, reflected by a decrease in the relative water content of the leaves once irrigation ceased, and increased survival rates once irrigation was resumed under control conditions. These results suggest that limitations in the metabolism of endogenous and exogenous polyols affect Arabidopsis growth and alter its response to drought, increasing their tolerance.

## I. Introducción

---

## 1. Carbohidratos y su forma de transporte en plantas.

Los carbohidratos son los componentes más abundantes en los organismos vivos. Sin embargo su importancia no sólo se debe a su gran abundancia, sino más bien, a los importantes papeles que desempeñan en el funcionamiento y mantenimiento celular. En plantas, los carbohidratos son utilizados para la síntesis de varios componentes estructurales, como es el caso de la celulosa. Presentan un rol central en el metabolismo energético de las células a través de su participación en reacciones de glicólisis y oxidación de pentosas, procesos que permiten generar los intermediarios necesarios para la síntesis de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Además, constituyen la principal reserva y forma de transporte de carbono por el organismo (Pessaraki y cols, 2010).

El transporte de carbohidratos a largas distancias ocurre entre los distintos tejidos y órganos de las plantas mediante el floema, desde aquellos órganos capaces de realizar fotosíntesis llamados tejidos fuentes (hojas maduras) a aquellos tejidos u órganos que debido a su estadio de desarrollo o fisiología no son capaces de fotoasimilar suficientes carbohidratos, llamados tejidos sumideros (raíces, flores, frutos y hojas en estadio juvenil). En tejidos sumideros, la incorporación de carbohidratos exógenos permite el desarrollo de éstos, siendo fundamental para su crecimiento (Leegood y cols, 2000).

En plantas superiores, la principal forma de carbohidrato fotoasimilado y transportado mediante el floema es la **sacarosa**. Sin embargo, existen familias de plantas en las cuales la cantidad de sacarosa transportada se encuentra en cantidades minoritarias en comparación a otras formas de carbohidratos transportados, como son la rafinosa (en la familia de las Cucurbitáceas; Kandler y Hopf, 1982) y alcoholes de azúcar.

Alcoholes de azúcar, también llamados polioles o poli-alcoholes, corresponden a la forma reducida de azúcares de aldosa o cetosa, donde el grupo aldehído y cetona, respectivamente, es reemplazado por un grupo hidroxilo (-OH). Estudios sistemológicos indican que la translocación de polioles ocurre en el ~12% de las especies descritas (Leegood y cols, 2000), entre las cuales se destacan especies de gran importancia económica y de amplia distribución, como es la familia de las Rosáceas que incluye

especies frutícolas como el manzano (*Malus x domestica*), peral (*Pyrus communis*), especies del género *Prunus* (cerezo, ciruelo y durazno), entre otros frutales. En esta familia y en especies de la familia Plantaginácea (ej. llantén, *Plantago major*) el principal fotosintato translocado es el **sorbitol**, un poliol lineal de 6 carbonos (6C), el cual constituye cerca del 80% de los carbohidratos presentes en el floema de estas especies (Loescher y cols, 1982). El **manitol**, poliol lineal de 5C, forma parte del 60% de los carbohidratos floema translocados en miembros de la familia Apiácea (ej. apio, *Apium graveolens*), Oleácea (ej. olivo, *Olea europaea*) y Rubiácea (ej. café, *Coffea arabica*). Mientras que en especies Celastráceas, el **galactitol** (6C) constituye su principal fuente de carbono (especies *Celastrus* y *Euonymus*).

## 2. Función de polioles en plantas

El uso de polioles como principal fuente de carbono en las especies mencionadas presenta varias ventajas. Al ser compuestos no-reductores, los polioles son químicamente más estables que azúcares no-reducidos como la sacarosa, por lo que sólo son metabolizados una vez ingresados en los órganos sumideros, siendo adecuados para transportar carbono a largas distancias (Dinant y Lemoine, 2010). Además, estos carbohidratos tienen mayor potencialidad para generar coenzimas reducidas tales como NADPH y NADH que a su vez pueden ser usadas en reacciones de síntesis o producción de ATP, respectivamente (Pharr y cols, 1995; Stoop y cols, 1996).

Otra ventaja asociada al uso de polioles está relacionada con el transporte de Boro en especies que fotoasimilan sorbitol o manitol, como principal fuente de carbohidratos. Ambos polioles, forman complejos poliol-borato-poliol facilitando el transporte de este micronutriente esencial a través del floema de estas especies, permitiendo su redistribución por todo el organismo. La mayor eficiencia en la movilidad de Boro contribuye a la capacidad de las plantas a tolerar suelos deficientes en Boro, evitando los importantes defectos en el desarrollo asociados a su déficit. Dos especies, que normalmente no fotoasimilan sorbitol y



en las cuales el Boro es inmóvil en el floema como es tabaco (*Nicotiana tabacum*) y caqui (*Diospyros kaki* Thunb. cv Jiro), fueron transformadas genéticamente con la enzima aldosa 6 fosfato reductasa (A6PR) involucrada en la síntesis de sorbitol. Plantas transgénicas fueron capaces de movilizar boro exógeno a través de sus floemas y fueron más tolerantes a la deficiencia de Boro en el medio de crecimiento (Bellaloui y cols, 1999; Brown y cols, 1999; Gao y cols, 2001).

Además, los polioles son **solutos compatibles** y como tales, pueden ser acumulados en altas concentraciones sin afectar el metabolismo celular contribuyendo a la protección de estructuras biológicas en condiciones de estrés ambiental (Pessarakli y cols, 2010; Stoop y cols, 1996). Hasta la fecha diferentes explicaciones han sido propuestas para comprender el efecto protector que se atribuye a solutos compatibles. La hipótesis más aceptada es que estos compuestos, y en particular polioles al presentar grupos –OH libres, son capaces de sustituir a las moléculas de agua en la hidratación de proteínas y membranas biológicas, permitiendo de esta manera que ocurra actividad enzimática aún cuando las concentraciones de agua sean extremadamente bajas (Webb y Bhorjee, 1968). Por esta razón, la acumulación de solutos compatibles, en particular polioles, ha sido relacionada con un incremento en la tolerancia de plantas a resistir a varios tipos de estrés abiótico, como condiciones extremas de bajas temperaturas, altos niveles de sales y estrés por sequía.

Varios estudios relacionan el estrés por frío con la acumulación de polioles en especies Rosáceas. Por ejemplo, se observó que la concentración de sorbitol en el floema incrementa con la senescencia de las hojas y bajas temperaturas en manzanas (*Malus sylvestris* Mill.; Williams y Raese, 1974). Cambios similares han sido descritos en ciruela, donde altos niveles de sorbitol fueron encontrados en la savia después de exponer las plantas a temperaturas bajo cero (Loescher y cols, 1990). Más evidencias fueron obtenidas por Hirai (1983) quien reportó un drástico aumento de sorbitol y un incremento en los niveles de expresión de la enzima involucrada en su síntesis (A6PR) en hojas de níspero durante las estaciones de invierno.

La acumulación de polioles también ocurre en condiciones de estrés por sequía. El sorbitol fue el principal carbohidrato soluble presente en árboles de cereza (*Prunus genus*)

sometidos a deshidratación, aumentando al doble su concentración (Ranney y cols, 1991). En manzanos, el estrés por sequía resultó en la acumulación preferencial de sorbitol y glucosa a expensas de sacarosa y almidón (Wang y cols, 1995). Cuando plantas de tabaco fueron transformadas genéticamente, se demostró que el incremento en la habilidad para sintetizar alcoholes de azúcar solubles promovió la tolerancia a estrés por deshidratación y salino. Tal es el caso de plantas de tabaco transformadas con aldosa reductasa (ALDRXV4) proveniente de *Xerophyta viscosa* Baker (planta tolerante a la desecación), las cuales presentaron elevados niveles de sorbitol, y reducidos niveles de methylglyoxal, componente citotóxico que incrementa en condiciones de estrés abiótico. En condiciones de estrés por sequía y salino, el contenido de sorbitol aumentó tanto en plantas silvestres como transgénicas. Sin embargo, el incremento de sorbitol en líneas transgénicas comparadas con silvestres fue 1,8 veces más en condiciones de estrés por sequía y 1,3 veces más en estrés salino, reflejado en una mayor sobrevivencia a largos periodos de deshidratación y mejor recuperación a estrés salino de tabacos transgénicos en comparación a plantas silvestres (Kumar y cols, 2012).

Otros antecedentes relacionan la acumulación de polioles con estrés salino. En llantén, una especie que produce sorbitol naturalmente, la síntesis de este poliol aumenta bajo estrés salino así como la expresión de genes que codifican para transportadores de sorbitol en el floema (Pommerrenig y cols, 2007). Por otro lado, un estudio realizado con caqui japonés (planta que no produce alcoholes de azúcar) transformadas con el gen codificante para la A6PR de hojas de manzana (síntesis de sorbitol), se encontró un aumento en la tolerancia a estrés salino en aquellas líneas transgénicas capaces de acumular sorbitol (Gao y cols, 2001).

La acumulación de polioles, en particular de sorbitol, también ha sido relacionada con estrés de tipo biótico en especies Rosáceas. La infección "Fire blight" causada por el patógeno bacteriano *Erwinia amylovora* (Burrill), es una infección devastadora que se propaga en manzanas y otras especies de la familia. Dado que sorbitol es la principal forma de carbono en las especies infectadas por *E. amylovora*, investigaciones proponen que este alcohol de azúcar es un importante factor que determina la especificidad del patógeno por el

hospedador (Aldridge y cols, 1997). En estudios realizados en manzanas cv Gala por Jensen y cols. (2012) se correlacionó la susceptibilidad a la infección bacteriana con el patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos. Mediante microarreglos se observó que la expresión de la enzima MdSDH (catálisis de sorbitol; más detalles ver sección 3) fue elevada en aquellos árboles de manzana menos susceptibles a la infección. Los autores concluyen que altos niveles de SDH reducen la disponibilidad de sorbitol para *E. amylovora*, explicando la mayor resistencia de estos árboles a la infección. Como se puede inferir de los múltiples casos mencionados, el metabolismo de polioles y principalmente su acumulación en especies Rosáceas está fuertemente relacionada al crecimiento y a una mayor tolerancia al estrés en plantas que los metabolizan y acumulan. Así, el comprender y conocer sobre las enzimas claves involucradas en las diferentes rutas metabólicas de polioles en plantas es relevante para evaluar la potencial adaptación de estos organismos a diferentes ambientes. A la fecha, la investigación relacionada con el metabolismo de polioles ha sido limitada y dirigida principalmente al metabolismo del sorbitol, debido a las importantes especies que naturalmente lo fotoasimilan y transportan como fuente de carbono.

### **3. Metabolismo de Sorbitol en especies Rosáceas**

En especies Rosáceas, la biosíntesis de sorbitol ocurre en el citoplasma de células de hojas maduras (tejido fotosintético) por la acción de la aldosa 6 fosfato reductasa dependiente de NADPH (A6PR). Esta enzima cataliza la reducción del producto de fotosíntesis glucosa-6-fosfato en sorbitol-6-fosfato (Figura 1), el cual es convertido a sorbitol por la subsecuente acción de una fosfatasa (S6PP; Zhou y cols, 2003). Una vez sintetizado, el sorbitol es transportado a través de la membrana plasmática y traslocado por el floema en dirección a órganos sumideros (Teo y cols, 2006). Varias proteínas transportadoras han sido identificadas involucradas en el traslocamiento de polioles hacia el floema. Por ejemplo, PmPLT1 y PmPLT2, proteínas de membrana plasmática descritas en llantén se encuentran

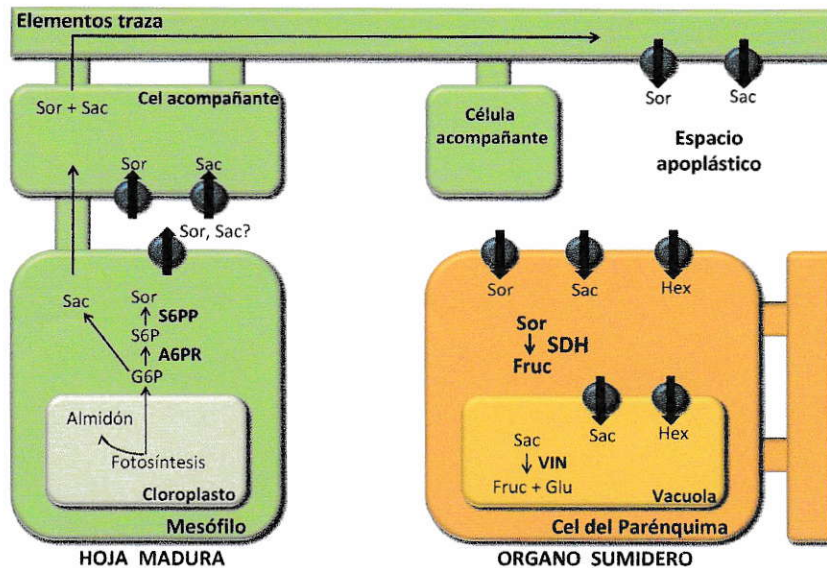


específicamente localizadas en células acompañantes de hojas maduras (Ramsperger y cols, 2004). En manzanas también ha sido identificada una familia de transportadores de alcoholes de azúcar involucrada en la descarga de sorbitol desde hojas maduras hacia el floema (Watari y cols, 2004).

Translocado por el floema, el sorbitol es ingresado a órganos sumideros a través de la vía apoplástica en forma activa mediante transportadores específicos (Gao y cols, 2005; Figura 1). Varias proteínas transportadoras involucradas en este proceso han sido clonadas y caracterizadas. En cerezas fueron identificadas las proteínas transportadoras PcSOT1 y PcSOT2, cuya expresión heteróloga en levadura indicó que ambas proteínas son capaces de transportar sorbitol (Gao y cols, 2003). En manzana se han identificado dos proteínas capaces de transportar sorbitol, MdSOT1 y MdSOT2, altamente expresadas en órganos sumideros (Gao y cols, 2005).

Una vez incorporado el poliol en los órganos sumideros, su oxidación es llevada a cabo en el citoplasma generalmente por deshidrogenasas y oxidasas NAD<sup>+</sup> dependientes (Teo y cols, 2006). En Rosáceas, las enzimas sorbitol deshidrogenasa (SDH) y sorbitol oxidasa (SOX) están involucradas en la conversión de sorbitol a fructosa y glucosa, respectivamente. Dependiendo de la especie, estos carbohidratos pueden ser almacenados, proporcionando dulzor al órgano en el caso de los frutos o pueden ser fosforilados e ingresados a la vía glicolítica. Actividad SOX ha sido detectada en tejidos sumideros de manzanas (Yamaki, 1980) y duraznos (*P. persica*; Lo Bianco y cols, 1999; Maurel y cols, 2004). Sin embargo, hasta la fecha no existen datos disponibles con respecto a la clonación del ADNc correspondiente a esta proteína. A diferencia de SOX, un gran número de publicaciones evidencian y caracterizan enzimas SDHs. Durante el proceso de maduración de frutos se ha demostrado que la actividad SDH incrementa drásticamente. En manzanas se registró un claro aumento de actividad SDH (~7 veces más) durante la 2<sup>o</sup> y 3<sup>o</sup> semana después de la floración (Yamada y cols, 2001), tendencia que también ha sido observada en frutos de durazno (Lo Bianco y cols, 1999), pera japonesa (*Pyrus pyrifolia*; Oura y cols, 2000) y níspero (*Eriobotrya japonica*; Bantog y cols, 2000), y en los últimos años varios ADNc correspondientes a enzimas SDH han sido clonados de especies Rosáceas; (Yamada

y cols, 1998, 1999; Park y cols, 2002; Nosarszewski y cols, 2004; Wang y cols, 2009; Oura y cols, 2000; Bantog y cols, 2000; Guo y cols, 2012). Debido a estos antecedentes, se considera a SDH como la principal enzima del metabolismo del sorbitol en frutos.



**Figura 1: Metabolismo de sorbitol en especies Rosáceas:** El sorbitol (Sor) y la sacarosa (Sac) son sintetizados en hojas maduras desde G6P (glucosa 6 fosfato). El sorbitol es sintetizado mediante la enzima aldosa 6 fosfato reductasa (A6PR) y sorbitol 6 fosfato fosfatasa (S6PP). Translocado hacia el floema, el sorbitol es egresado hacia la vía apoplástica de órganos sumideros mediante transportadores específicos. En el fruto, sorbitol es convertido a fructosa (Fruc) por la enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH) y almacenada en la vacuola mediante transportadores de hexosas (Hex). La sacarosa es convertida a fructosa y glucosa (Glu) por invertasas (VIN). Modificado y traducido de Teo y cols, 2006.

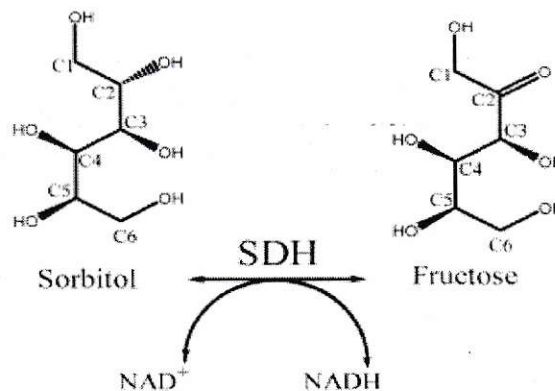
#### 4. Enzimas Sorbitol Deshidrogenasas

Enzimas sorbitol deshidrogenasas (SDH, EC 1.1.1.14) han sido identificadas y caracterizadas en una gran variedad de organismos fuera del reino vegetal, incluyendo mamíferos (humanos, oveja y bovino; Pauly y cols, 2003; Lindstad y cols, 1998; Marini y cols, 1997); insectos (mosca de la fruta y mosquita blanca; Luque y cols, 1998; Banfield y cols, 2001) y microorganismos (bacterias y levaduras; Ng y cols, 1992; Sarthy y cols, 1994). La mayoría de las enzimas SDH identificadas hasta la fecha presentan regiones conservadas en su secuencia, incluyendo un dominio de unión a zinc, sitio de unión a la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) y los residuos involucrados en el sitio



catalítico de unión preferente a sorbitol. Actualmente, se cuenta con 3 estructuras cristalográficas obtenidas de SDH de humano (PDB 1pl6; Pauly y cols, 2003), rata (estructura no disponible en formato PDB; Johansson y cols, 2001) y oveja (PDB 3QE3; Yennawar y cols, 2011) en las cuales se evidencia la conformación de una estructura homotetrámera de la proteína, con sitios de unión a  $Zn^{+2}$  en cada subunidad.

Enzimas SDH catalizan la reacción reversible de oxidación que convierte sorbitol a fructosa con la concomitante reducción del cofactor  $NAD^+$  (Figura 2). Sin embargo, se ha observado que otros polioles presentes en los distintos organismos también son sustratos de reacción para SDH, exhibiendo en la mayoría de los casos una menor afinidad catalítica que con su sustrato preferente, sorbitol. Así, por ejemplo, la enzima SDH de humano es capaz de oxidar varios polioles incluyendo sorbitol, xilitol, ribitol y L-threitol (Maret y Auld, 1987).



**Figura 2: Reacción catalizada por sorbitol deshidrogenasa (SDH).** La reacción favorece la oxidación de un grupo alcohólico secundario presente en el carbono 2 del sorbitol a un grupo cetona, convirtiendo sorbitol en fructosa. Para catalizar esta reacción SDH requiere  $NAD^+$  como cofactor (Pauly y cols, 2003)

Dependiendo del organismo, SDH cumple diferentes papeles. En humanos el rol de enzimas SDH está involucrado con el metabolismo de varios polioles, cuya des-regulación ha sido asociada a algunos síntomas de diabetes y formación de cataratas (Srivastava y cols, 2005). Mientras que en insectos, la actividad de SDH ha sido relacionada con el desarrollo del embrión durante las últimas etapas de hibernación del huevo (Yaginuma y cols, 1990). En plantas, SDH cumple un importante rol en el metabolismo de sorbitol en los frutos de especies Rosáceas, su alta actividad en órganos sumideros permite generar el

gradiente de concentración necesario para la translocación de sorbitol a través del floema, siendo fundamental para el desarrollo de estas especies (Nosarszewski y cols, 2004).

Debido a su importante función en plantas de la familia Rosáceas, la caracterización de enzimas SDHs en estas especies ha sido blanco de estudio de numerosos trabajos. En manzana, cuyo genoma ha sido liberado recientemente (año 2010) se han identificado 17 genes putativos que podrían codificar para enzimas SDH, cuyas secuencias comparten los dominios conservados propios de enzimas SDHs (Velasco y cols, 2010). Hasta la fecha, 9 putativos genes han sido clonados a partir de manzana, cuyo transcrito fue identificado principalmente en frutos durante las primeras 5 semanas de desarrollo (Nosarszewski y cols, 2004). De estas secuencias, 4 isoformas identificadas como *MdSDH2,3,5* y *6* han sido parcialmente caracterizadas en sus propiedades bioquímicas, de las cuales *MdSDH5* presenta la mayor actividad específica ( $V_{MAX}$ ) usando sorbitol como sustrato;  $0,78 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína (*MdSDH1-4*, Park y cols, 2002; *MdSDH 5-6*, Wang y cols, 2009). En pera (*Pyrus serotina*) se han aislado parcialmente 5 genes putativos para SDH, cuya secuencia aminoacídica comparte entre un 94%-98% de identidad con las isoformas descritas en manzana (Ito y cols, 2005) de los cuales, una secuencia ha sido clonada a partir de frutos y evaluada en sus parámetros cinéticos (*JpSDH*: Oura y cols, 2000). En níspero, durazno y recientemente en ciruela, se ha logrado clonar el ADNc correspondiente a SDH, cuyas secuencias comparten alta identidad con las isoformas SDHs identificadas ( $\geq 70\%$ ; Bantog y cols, 2000; Lo Bianco y Rieger, 1998; Guo y cols, 2012).

Sin embargo, la identificación de enzimas SDH no ha sido limitada sólo a especies de la familia Rosácea. En especies no-Rosáceas en las cuales no ocurre acumulación de sorbitol también ha sido identificada actividad SDH, tal es el caso de maíz (*Zea mays*; Doehlert, 1987), tomate (*Solanum lycopersicum*; Ohta y cols, 2005), soya (*Glycine max*; Kuo y cols, 1990) y *Arabidopsis thaliana* (Nosarszewski y cols, 2012). En tomate, el gen responsable de codificar para una enzima con actividad SDH, llamada *LeSDH*, presenta  $\geq 77\%$  de identidad aminoacídica con secuencias SDHs de especies Rosáceas. Mientras que en maíz, se logró caracterizar parcialmente a SDH purificada a partir del endospermo de la semilla.

La caracterización bioquímica realizada hasta la fecha demuestra que enzimas SDHs vegetales, proveniente de especies Rosáceas como no-Rosáceas, son capaces de catalizar la **conversión de sorbitol a fructosa con mayor eficiencia** que la reacción reversa (reducción de D-fructosa a D-sorbitol). Las cuatro isoformas caracterizadas en manzana (MdSDH2,3,5 y 6) exhibieron una tasa de oxidación de sorbitol 4 a 6 veces mayor que la registrada en la reacción inversa (Park y cols, 2002; Wang y cols, 2009). Mientras que los parámetros cinéticos obtenidos de JpSDH revelaron la mayor afinidad que presenta esta enzima por sorbitol ( $K_M$ : 96,4 mM) que por fructosa ( $K_M$ : 4239 mM). En especies no-Rosáceas (LeSDH), la tendencia se mantuvo, registrándose valores de  $K_M$  para sorbitol cercano a 2 ordenes de magnitud menor que para la catálisis de fructosa ( $K_M$  2,39 mM vs 99,5 mM; Ohta y cols, 2005). Estos antecedentes sugieren que SDHs vegetales, son enzimas esencialmente unidireccionales en cuanto a su constante catalítica  $K_M$ .

Análisis cinéticos demostraron además que enzimas **SDHs caracterizadas son capaces de oxidar otros polioles**, en presencia del co-sustrato  $NAD^+$  con menor preferencia que con su sustrato preferente, sorbitol. Análisis de especificidad de sustrato de SDH de ciruela revelan actividad deshidrogenasa con los polioles xilitol y ribitol con una eficiencia con respecto a sorbitol del 62,5% y 15% respectivamente, mientras que con otros polioles usados como sustratos (arabitol, galactitol y eritritol) no se detectó actividad aparente (Guo y cols, 2012). En pera, actividad SDH fue registrada al usar L-iditol (83%), xilitol (77%), L-treitol (41%) y ribitol (14%) como sustratos. En tomate y maíz, especies no-Rosáceas, SDH fue capaz de oxidar sorbitol con mayor eficiencia que otros polioles como L-iditol, xilitol, y ribitol. Los autores concluyen de éstos y otros análisis, que la estereoquímica quiral específica en el C-2 (S) y C-4 (R) de la molécula podría ser la clave para una mayor actividad catalítica de SDHs. Esta hipótesis explica que otros poli-alcoholes evaluados a modo de sustratos para las distintas enzimas, como manitol (C-2(R), C-4(R)) y galactitol (C-2(S), C-4(S)) no sean catalizados o presenten un porcentaje de actividad muy bajo con respecto a sorbitol (<7%; Ohta y cols, 2000; Ohta y cols, 2005).



En cuanto a la configuración estructural de SDHs vegetales, poca información se dispone hasta la fecha, sin embargo la investigación realizada por Oura y cols (2000) determina que en condiciones nativas la proteína JpSDH está conformada por cuatro subunidades de ~40 KDa, formando un estructura homo-tetrámera, al igual que en SDHs mamíferas (Pauly y cols, 2003; Johansson y cols, 2001; Yennawar y cols, 2011).

Finalmente, con respecto al patrón de expresión de enzimas SDH vegetales, una importante diferencia puede ser apreciada entre especies Rosáceas y no-Rosáceas. En plantas que acumulan sorbitol, la expresión de SDHs ha sido reportada como órgano específica, siendo su expresión confinada principalmente a tejidos sumideros (Nosarszewski y cols, 2004). Aún cuando la mayoría de las enzimas SDHs caracterizadas de esta familia presentan el patrón de expresión descrito, en manzanas se ha identificado que una de sus isoformas, *MdSDH1*, también registra expresión en órganos fuentes (Park y cols, 2002). En tomate, transcritos de *LeSDH* han sido identificados de forma ubicua, tanto en órganos fuentes como sumideros al igual que *MdSDH1*, sugiriendo un papel diferente de estas enzimas al descrito en forma general para SDHs vegetales.

## **5. Identificación de polioles en especies no-Rosáceas**

La presencia de enzimas SDH en especies vegetales no-Rosáceas, en las cuales la fotoasimilación y el transporte de carbohidratos ocurren en forma de sacarosa, genera la inquietud de cuál es el rol de estas enzimas y el metabolismo general de polioles en especies que naturalmente no acumulan alcoholes de azúcar.

Hasta la fecha algunos antecedentes revelan la presencia de polioles en especies no-Rosáceas, aún cuando la concentración es sustancialmente menor a la registrada en especies transportadoras de polioles. En plantas no-Rosáceas, se ha observado un incremento en los niveles de varios poli-alcoholes principalmente en condiciones de estrés,

lo cual se relaciona posiblemente con el carácter soluto compatible que caracteriza estos compuestos.

En tomate las concentraciones de sorbitol en frutos son bajas (1,75  $\mu\text{mol/gpf}$ ; Roessner y cols, 2003). Sin embargo, arabitol se acumula en concentraciones considerables en hojas de tomate infectadas con *Cladosporium fulvum*, un patógeno fúngico (Clark y cols, 2003). La acumulación de arabitol es fundamental para la patogenicidad del *C. fulvum*, por lo tanto, el catabolismo de arabitol por LeSDH podría cumplir una función antifúngica en esta especie (Ohta y cols, 2005).

En *Arabidopsis*, utilizando perfiles metabolómicos, se determinó que el sorbitol presente en bajos niveles en hojas, aumentó su concentración considerablemente al aplicar un golpe de frío (Kaplan y cols, 2004). En condiciones de estrés por deshidratación otros polioles fueron identificados en *Arabidopsis* (glicerol, lactitol, inositol, maltitol, manitol y xilitol) de los cuales los niveles de xilitol aumentaron  $\sim 4$  veces su concentración en hojas rosetas luego de ser sometidas al estrés (Rizhsky y cols, 2004). En condiciones similares de estrés por sequía, un reciente estudio revela la acumulación de sorbitol y ribitol en hojas de plantas de *Arabidopsis*, cuya concentración basal aumento  $\sim 1,5$  y  $\sim 3,8$  veces más, respectivamente, transcurridos 14 días eliminado el riego (Nosarzewski y cols, 2012). De esta forma, los polioles mencionados, en particular sorbitol, xilitol y ribitol podrían cumplir un papel osmoprotector en *Arabidopsis*, siendo posibles sustratos de actividad SDH.

Aún cuando los antecedentes mencionados vinculan el metabolismo de polioles en especies no-Rosáceas con la función de protección atribuida a solutos compatibles, la información sigue siendo escasa hasta la fecha. En este contexto, la función y caracterización de enzimas SDH en especies no-Rosáceas permitiría dilucidar cuál es el rol de poli-alcoholes en estas especies, constituyendo un foco interesante de estudio en el área de la fisiología vegetal.





## **6. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio**

Para estudiar el rol de SDH en especies vegetales no traslocadoras de sorbitol, se requiere un modelo adecuado que se encuentre caracterizado genéticamente y propicio a la manipulación genética.

Usar tomate como planta modelo presenta dificultades, debido al desconocimiento de su genoma y su ciclo de vida anual. Aún cuando la enzima SDH de esta especie ha sido clonada y caracterizada en sus principales parámetros cinéticos (Ohta y cols, 2005) la función fisiológica de LeSDH podría ser aclarada mediante la investigación y evaluación morfológica de plantas de tomate transformadas genéticamente con secuencias *LeSDH* en antisentido, por ejemplo, proceso que sin duda compromete un periodo extenso de tiempo.

Sin embargo, como modelo de especies no-Rosáceas, *Arabidopsis* (angiosperma dicotiledónea de la familia Brassicácea) presenta varias ventajas, debido a su rápido crecimiento en comparación a la mayoría de las plantas (8-12 semanas), a su genoma completamente secuenciado y al corto tiempo que implica su transformación genética. Además, existen numerosas líneas transgénicas disponibles de *Arabidopsis* con genes específicos interrumpidos por inserciones de ADN-T, como la colección SALK (<http://www.arabidopsis.org/>; Wienkoop y cols, 2010).

## **7. Evidencias del metabolismo y transporte de polioles en *Arabidopsis*.**

*Arabidopsis* utiliza sacarosa como principal fotosintato floema-translocado con pequeñas cantidades de rafinosa y no acumula poli-alcoholes, salvo en ciertas condiciones de estrés como fue descrito previamente (sección 5; Haritatos y cols). Estudios de perfiles metabólicos mediante GC-MS han determinado la presencia de distintos polioles en sus hojas, tales como myo-inositol, glicerol, eritritol, xilitol, manitol, lactitol, maltitol, ribitol y sorbitol (Kaplan y cols, 2004; Nosarzewski y cols, 2012; Rizhsky y cols, 2004; Ebert y cols, 2010). Mediante genética reversa se ha identificado una familia de seis genes,

estrechamente relacionados con transportadores de alcoholes de azúcar, los cuales comparten sobre un 75% de identidad aminoacídica con proteínas transportadoras caracterizadas en especies que translocan polioles como cerezas, apio y llantén (Keplek y cols, 2005). Una detallada caracterización ha sido realizada en un miembro de esta familia, *AtPLT5*. Ensayos de transporte en ovocitos de *Xenopus* y en levadura que sobre-expresaban *AtPLT5* mostraron que podía importar tanto sorbitol en simporte con  $H^+$ , como también otros polioles (xilitol, eritritol e inositol) y hexosas (glucosa y fructosa; Keplek y cols, 2005; Reinders y cols, 2005). Además, una investigación más reciente caracteriza dos nuevos transportadores de polioles en *Arabidopsis*, *AtPMT1* y *2*, los cuales se localizan principalmente en membrana plasmática de células de polen y xilema, con una alta preferencia para el transporte de xilitol y fructosa (Klepek y cols, 2010).

Mediante genética reversa ha sido posible además identificar secuencias que comparten alta homología con enzimas involucradas en la biosíntesis de sorbitol en especies Rosáceas, como sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa, cuya expresión es ubicua en los distintos órganos de *Arabidopsis* (*AtS6PDH*; Zamudio, 2010). Además, en el cromosoma 5 de esta especie, se encuentra una secuencia que codifica para una potencial SDH, como será presentado a continuación.

## 8. Sorbitol deshidrogenasa en *Arabidopsis*.

En un reciente estudio (Nosarzewski y cols, 2012) y en nuestro grupo de investigación, se identificó mediante genética reversa un marco de lectura abierto en el locus *At5g51970* que codifica para una enzima SDH en *Arabidopsis thaliana*, la que hemos llamado **AtSDH**. La secuencia aminoacídica de la proteína codificada por *AtSDH* tiene una identidad cercana al 75% con SDHs caracterizadas en especies vegetales (Tabla 1), siendo la única secuencia en el genoma de *Arabidopsis* con potencial actividad SDH ya que el segundo ortólogo más cercano (locus *At5g63620*) comparte un ~23 % de identidad con enzimas SDHs. *AtSDH* posee los dominios conservados propios de enzimas SDH como los residuos claves de

unión a zinc, el sitio de unión a NAD<sup>+</sup> y los residuos involucrados en el sitio catalítico de unión preferente a D-sorbitol (Mandujano, 2010).

**Tabla I. Porcentaje de identidad aminoacídica de AtSDH con diferentes enzimas SDHs vegetales.** *Arabidopsis thaliana* (número de acceso AF370161) presenta alta homología con SDHs caracterizadas en especies no Rosaceas como tomate (BAE47038) maíz (ABA70761), y soya (XP\_003548224), y en especies Rosaceas como níspero (AB042810), pera (BAD91189), cereza (AAK71492), ciruela (ACL18054), durazno (BAA94084) y la isoforma 5 de manzana (AAW33813).

% identidad	Tomate	Maíz	Soya	Níspero	Pera	Cereza	Ciruela	Durazno	Manzana 5
<i>Arabidopsis thaliana</i>	84	75	83	75	71	80	80	81	76

Análisis de expresión por RT-PCR en tiempo real indica que AtSDH, se expresa en los distintos órganos de *Arabidopsis*, al igual que LeSDH en tomate, registrándose una mayor expresión en semilla y hojas caulinares (Ampuero, 2012). Esta expresión ubicua ha sido corroborada a nivel proteico utilizando un antisuero policlonal anti-AtSDH (Mandujano, 2010).

Análisis *in-silico* revelan que AtSDH correspondería a una proteína citoplasmática dado la ausencia de dominios transmembrana en la secuencia y carencia de péptidos de señalización hacia vías secretorias. Tales predicciones bioinformáticas fueron confirmadas usando fraccionamiento sub-celular mediante el cual se logró detectar la presencia de AtSDH endógena sólo en la fracción enriquecida en citoplasma (Mandujano, 2010).

Estudios de los elementos regulatorios en el promotor putativo de *AtSDH* mediante herramientas bioinformáticas revelaron la presencia de elementos de respuesta a hip-osmolaridad (PREATPROD) y la sobre-representación del motivo de respuesta a luz/oscuridad (L-box) sugiriendo que AtSDH podría ser regulado por tales condiciones fisiológicas (Parada, 2010).



Finalmente, estudios *in-silico* sobre la conformación estructural de AtSDH mediante modelamiento por homología utilizando como molde estructuras de SDHs resueltas por cristalografía (sección 4) revelaron que AtSDH une preferentemente NAD<sup>+</sup> en vez de NADP<sup>+</sup>, en presencia de zinc (Mandujano, 2010). Estudios recientes, revelan la presencia de una cola N-terminal de 11 aa sin estructura aparente en el modelo, la que podría estabilizar la proteína al interactuar con otras subunidades, sugiriendo una posible conformación multimérica de AtSDH en condiciones nativas, al igual como ha sido descrito en otras SDHs (Maldonado, 2012).

## 9. Trabajo propuesto

La información obtenida a la fecha constituye importantes antecedentes que permiten caracterizar a AtSDH, siendo fundamental corroborar tales resultados obtenidos *in-silico* mediante diseños experimentales *in-vivo*. Para entender el rol que desempeña AtSDH en Arabidopsis, un aspecto fundamental a evaluar es su actividad. Tanto los parámetros cinéticos como la especificidad de sustrato que presenta la proteína son herramientas esenciales que permiten dilucidar en qué papeles fisiológicos podría estar involucrada la enzima en plantas.

Para caracterizar bioquímicamente una proteína es necesario disponer de un sistema adecuado de síntesis. Tradicionalmente se utilizan sistemas *in-vivo* de expresión heteróloga, en los cuales se usufructa de la maquinaria metabólica de bacterias y levaduras, para llevar a cabo la síntesis de proteínas de interés. Hasta la fecha varios han sido los intentos por purificar y caracterizar la proteína AtSDH a partir de sistemas de expresión *in-vivo* (*Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*; Mandujano, 2010; Ampuero, 2012). Mediante estos sistemas se ha logrado sintetizar la proteína recombinante en grandes cantidades pero debido a la formación de cuerpos de inclusión imposibles de re-naturar (expresión en *E. coli*) y la obtención de formas inactivas de la enzima (expresión en levaduras) no se ha logrado la caracterización bioquímica de la proteína. Dado estos antecedentes en el

presente trabajo se propone como una nueva alternativa, la síntesis *in-vitro* de AtSDH. Antecedentes indican que la síntesis de proteínas *in-vitro* provee potenciales ventajas en la producción de proteínas citotóxicas, inestables e insolubles (Kim y Swarts, 1999) constituyendo una adecuada posibilidad para la obtención de AtSDH en forma activa y soluble a partir de reacciones de síntesis *in-vitro*, cuya posterior purificación y evaluación bioquímica permitirá disponer de fundamentales antecedentes para dilucidar el rol que desempeña AtSDH en Arabidopsis.

Con igual fin, la evaluación fenotípica de plantas incapaces de sintetizar AtSDH permitiría determinar *in-planta* qué proceso fisiológico podría estar siendo alterado en Arabidopsis debido a la ausencia de SDH. En el presente trabajo se propone la identificación, caracterización y evaluación morfométrica de líneas insercionales de la colección del SALK Institute, en las cuales la región transcrita de *AtSDH* es interrumpida por un ADN-T de un tamaño suficientemente extenso para impedir la correcta transcripción del gen (4,5 kb, <http://arabidopsis.info>; Alonso y col. 2003).

Con las herramientas propuestas en el presente trabajo de tesis de Magister, se espera proveer de antecedentes que contribuyan a la investigación realizada en el marco de la caracterización de enzimas SDH y el rol de polioles en especies no-Rosáceas y en particular en Arabidopsis.



## II. Hipótesis y Objetivos

---

## **1. HIPÓTESIS.**

El locus At5g51970 codifica para una sorbitol deshidrogenasa de *Arabidopsis thaliana* que cataliza la reacción de oxidación de sorbitol con mayor eficiencia que otros polioles y una disminución en los niveles de transcrito de este gen afecta la respuesta de la planta en condiciones de estrés abiótico.

## **2. OBJETIVOS.**

### **2.1. Objetivo general**

Caracterizar bioquímicamente y determinar el rol *in vivo* de AtSDH.

### **2.2. Objetivos específicos.**

1. Determinar la actividad y especificidad de sustrato de AtSDH.
2. Identificación y análisis molecular de líneas mutantes insercionales homocigotas en *AtSDH* de *Arabidopsis*.
3. Análisis fenotípico de líneas mutantes insercionales en *AtSDH*.

## III. Materiales y Métodos

---

## 1. REACTIVOS

Se utilizaron reactivos de calidad apropiada para las técnicas empleadas de biología molecular, bioquímica y cultivo de plantas. Estos productos fueron fabricados principalmente por Fermentas, Promega, Invitrogen, Axygen, Merck y Phyto Technology Laboratories. El proveedor de los reactivos claves utilizados será indicado a medida que se presenta la metodología relacionada.

## 2. MATERIAL BIOLÓGICO

Para la realización del presente trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col-0), silvestres e insercionales (SALK, de línea parental N60000), estas últimas adquiridas de Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC).

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Escherichia coli* quimiocompetentes DH5 $\alpha$  y One Shot® TOP10 (Invitrogen) con genótipo: *supE44*,  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1* y F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*, respectivamente.

## 3. METODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 3.1 EXTRACCIONES DE ÁCIDOS NUCLEICOS

#### 3.1.1 Purificación de ADN genómico desde *Arabidopsis thaliana*.

Para evaluar la homocigosis de líneas SALK (sección 6.1) se extrajo ADN genómico de hojas rosetas de plántulas de 15 días de crecimiento post-siembra mediante una variante al protocolo descrito por Doyle y Doyle (1987). Para llevar a cabo la extracción, se molieron 100 mg de tejido con pistilos plásticos estériles en presencia de N<sub>2</sub> líquido y 700  $\mu$ L de

tampón CTAB 2X [CTAB 2% p/v; NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1% v/v (agregado antes de usar)]. La mezcla se incubó a 65 °C durante 1 h, mezclando por inversión cada 10 min. Se eliminaron los restos de hoja mediante centrifugación (20.000 g, 5 min) y se rescató el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga. Posteriormente, se agregaron 700  $\mu$ L de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (en proporción 24:1) y se agitó por 5 min. Una vez disuelta la muestra, se centrifugó (7.000 x g, 5 min) y se transfirió el 70% del volumen de la fase superior a un nuevo tubo de microcentrífuga (~500  $\mu$ l). Se repitió una vez más la extracción con cloroformo:alcohol isoamílico y la separación de fases por centrifugación. Posteriormente, a la fase acuosa recuperada se agregaron 250  $\mu$ l de isopropanol, la mezcla se incubó a -20 °C durante 30 min y se centrifugó (20.000 x g, 15 min) para luego descartar el sobrenadante. Al precipitado se le agregó 700  $\mu$ L de etanol 70% frío, se centrifugó (5 min, 15.000 x g) y se eliminó el sobrenadante. El ADN se secó a TA, durante 20 min y se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua NP.

### **3.1.2. Purificación de ARN desde *Arabidopsis thaliana*.**

Se siguió el protocolo y se usaron los reactivos proporcionados por el kit PowerPlant® RNA isolation (MO-BIO). Las muestras de ARN obtenidas fueron cuantificadas y analizadas (sección 3.2) de manera previa a ser utilizadas como templado en reacciones de retrotranscripción (RT-PCR, sección 3.4.2), siendo almacenadas a -80 °C hasta el momento de su uso.

### **3.1.3. Purificación de ADN plasmidial desde *Escherichia coli*.**

Para la extracción de ADN plasmidial desde *E. coli*, se dejó crecer en agitación durante 16 h un cultivo de 5 ml con el antibiótico de selección correspondiente (sección 4.1). Posteriormente, se extrajo el ADN plasmidial utilizando el kit AxyPrep™ plasmid miniprep (Axygen Biosciences) según las especificaciones del fabricante, el cual fue almacenado a -20 °C.

De forma excepcional se utilizó el kit comercial Wizard® Plus Midipreps DNA Purification



System de Promega para obtener mayor cantidad de ADN plasmidial del vector de expresión *in-vitro* pEXP5-AtSDH (sección 3.5.1).

## **3.2. CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### **3.2.1. Cuantificación y análisis mediante espectrofotómetro.**

Las extracciones de ARN total de Arabidopsis (sección 3.1.2) y de ADN plasmidial para expresión *in-vitro* (sección 3.1.3) fueron cuantificadas ( $A_{260}$ ) y analizadas para constatar su pureza usando un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis). El valor de la relación  $A_{260}/A_{280}$  aceptada para extracciones puras de ADN y ARN es entre 1.8 y 2.0, respectivamente, mientras que para la relación  $A_{260}/A_{230}$  los valores para muestras puras de ADN o ARN se encuentran en el rango de 1.8 y 2.2. Las muestras que presentaron valores diferentes a lo mencionado en ambos parámetros revelaron la presencia de solventes orgánicos, algunas sales y proteínas, siendo descartadas.

### **3.2.2. Electroforesis en geles de agarosa y purificación desde geles**

Las muestras de ADN (productos de PCR y digestiones enzimáticas de ADN plasmidial) fueron visualizadas y analizadas en geles de agarosa de concentración variable (0,5% a 1,5%) según el tamaño del producto esperado. Como marcador de peso molecular se usó Gene Ruler™ (Fermentas®). Las muestras fueron mezcladas con tampón de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilene cianol 0.25% y glicerol 80%) en proporción 4:1 previo a ser cargadas. Todos los geles fueron preparados con tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) y una vez cargadas las muestras fueron resueltas en el gel a 80 - 100 V durante 30 a 40 min. Realizada la electroforesis, los geles fueron incubados durante 15 min en bromuro de etidio 1 µg/mL y visualizados con un trans-iluminador UV (GeneGenius Classic de SynGene®). Las imágenes proporcionadas fueron cuantificadas mediante Image J, calculando la relación correspondiente a la cantidad de ng en el volumen de marcador utilizado con el volumen cargado de la muestra a analizar. Para clonar alguna de las bandas

visualizadas, ésta se escindió del gel utilizando un bisturí para ser purificada mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.2.3. Electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalantes.**

Luego de constatar la pureza y concentración de purificaciones de ARN, se verificó su calidad mediante geles de agarosa desnaturalantes. Los geles fueron preparados con 1,5 % agarosa, 1 X MOPS y 1 X formaldehído en agua DEPC. Una vez enfriado, el gel fue depositado en una cámara de electroforesis embebida en MOPS 1 X. Las muestras de ARN fueron mezcladas en proporción 2:1 con buffer de carga desnaturalante con bromuro de etidio (2X Fermentas) e incubadas durante 10 min a 70 °C. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron rápidamente enfriadas en hielo, cargadas en el gel y sometidas a electroforesis durante 45 min a 70 V. Finalmente las bandas fueron visualizadas en un trans-iluminador UV (GeneGenius Classic de SynGene®).

## **3.3. PARTIDORES**

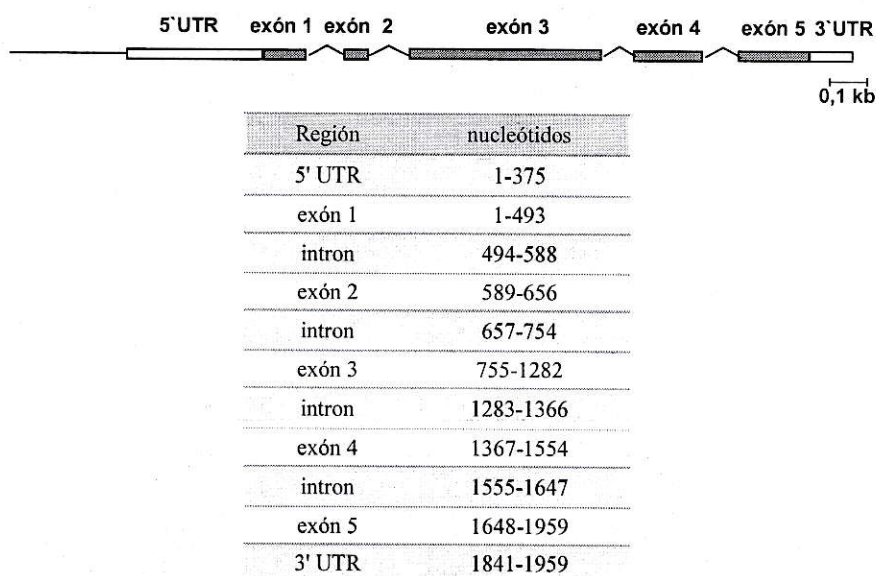
La descripción de los partidores utilizados en el presente trabajo se encuentra en Tabla II.

### **3.3.1 Diseño de partidores específicos para *AtSDH*.**

Para el diseño de los partidores específicos se usó la secuencia del locus At5g51970 del genoma de *Arabidopsis*, que codifica para una potencial sorbitol deshidrogenada (*AtSDH*; Genbank acceso: NM\_124576; TAIR Accession locus 2173093; Nosarzewski y cols 2012). El tamaño del ADN<sub>g</sub> de *AtSDH* es de 1959 pb, situándose el codón de inicio y de término de traducción en los nucleótidos 376 y 1840, respectivamente. La secuencia se compone de una región 5' no traducible (5'UTR), 5 exones y una región 3' no traducible (3'UTR; Figura 3).

Se diseñaron partidores específicos que permiten amplificar el marco de lectura completo de

gen (AtSDH-F y AtSDH-R, Tabla II) para llevar a cabo la clonación de *AtSDH* en el vector pEXP5-NT/TOPO (sección\_3.5.1). Los partidores se diseñaron a partir del codón de inicio para el partidor sentido y el último codón codificante (Leucina, CTC), en el caso del partidor anti-sentido. En estos partidores, no se incorporaron nucleótidos adicionales ni sitios de corte de endonucleasas de restricción, con el fin de no intervenir en la distancia óptima a la secuencia de unión a ribosoma (Shine-Dalgano), presente en el vector pEXP5-NT/TOPO.



**Figura 3:** Esquema representativo del locus *At5g51970* y sus respectivas regiones nucleotídicas.

Con el fin de analizar los niveles de transcrito de *AtSDH* en líneas mutantes insercionales de *Arabidopsis* (sección 3.4.3) se diseñaron partidores específicos en la región 3' del gen (exón 5 de la secuencia, Figura 3). Los partidores sentido y antisentido fueron diseñados utilizando el programa *AmplifX* a partir del nucleótido 1694 y 1788 de la secuencia genómica, respectivamente. Ambos pares de partidores diseñados para *AtSDH* fueron analizados mediante la Herramienta de Búsqueda y Alineamiento Local Básica, BLAST para confirmar informáticamente su especificidad.

Los otros partidores utilizados en este trabajo de tesis fueron diseñados o bien publicados por miembros de laboratorio de Biología Molecular Vegetal (Tabla II).



Tabla II: Partidores utilizados en el desarrollo de la tesis.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Aplicación	Referencia
Oligo-AP	CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTT TTTTT	Síntesis de ADNc a partir de ARN	Promega, Madison, USA.
Actina-F Actina-R	CACACTTTCTACAATGAGCT GCAGTGATCTCTTTGCTCAT	Control de calidad de la síntesis de ADNc. Amplifican una región interna del gen <i>actina4</i> de 680 pb para ADNc y 800 pb para ADNg	(Tittarelli y cols, 2009)
LBB1.3	ATTTTGCCGATTTCCGAAC	Borde izquierdo T-DNA pROK2 en líneas Salk	(Alonso y cols, 2003; <a href="http://signal.salk.edu">http://signal.salk.edu</a> )
UBI10-F UBI10-R	GGCCTTGATAATCCCTGATGAATAAG AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT	Normalizador en reacciones de qRT-PCR. Juntos amplifican una región interna de 61 pb de <i>At4g05320</i> .	(Czechowsky T y cols, 2005)
26410-F 26410-R	GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC GGTCCGACATACCCATGATCC	Normalizador en reacciones de qRT-PCR. Juntos amplifican una región interna de 81 pb del gen <i>At4g26410</i>	(Czechowsky T y cols, 2005)
RD29A-F RD29A-R	GAAGTTTGCTTCAATGCTAGGTTACTC TCGTCACGGCAGACTCTGTT	Utilizado en reacciones de qRT-PCR como control en tratamientos de inducción por frío. Juntos amplifican una región interna de <i>At5g52310</i>	(Cuevas y col, 2008)
AtA6PR-F AtA6PR-R	AGTTGTCCTGAGGTGGGGAAT TGGTTGGTTCGTGCGGTAT	Utilizado en reacciones de qRT-PCR. Juntos amplifican una región interna de 170 pb de <i>At2g21250</i> , locus que codifica una potencial aldose-6-phosphate reductase (síntesis de sorbitol)	(Zamudio S, 2013)
pAtSDH-F pAtSDH-R	GACGGATCCTTCTCTTTGTCTTTCCGG GGACCCATGGAACCTTCTCTGCTATGCTC	Amplificación del promotor de <i>AtSDH</i> . Juntos amplifican un fragmento de 692 pb ubicado río arriba desde el sitio de inicio de la traducción.	(Severin D, 2008)
AtSDH-F AtSDH-R	ATGGGGAAAGGAGGGATGTCTCAAG TCAGAGATTGAACATAACTTTGATG	Amplificación del marco de lectura completo de <i>AtSDH</i> . Juntos amplifican 1095 pb a partir de muestras de ADNc y ~1,5 kb a partir de ADNg.	Este trabajo
Q-AtSDH-F Q-AtSDH-R	TGTGTCTTGAGTTCCTGACAAGTGGT ATTGCTCCCACGAGCACTGGTTTCA	Utilizados en reacciones de qRT-PCR para evaluar los niveles de transcrito de <i>AtSDH</i> . Juntos amplifican un fragmento de 94 pb.	Este trabajo
T7-F T7-R	TAATACGACTCACTATAGGG TAGTTATTGCTCAGCGGTGG	Secuenciación vector pEXP5- <i>AtSDH</i>	Macrogen Co. (USA)
M13-F M13-R	GTA AACGACGGCCAG CAGGAAACAGCTATGAC	Secuenciación vectores pCR8	Macrogen Co. (USA)



### 3.4. REACCIONES DE PCR.

#### 3.4.1. Amplificación del ADNc de *AtSDH* mediante PCR

La reacción de PCR realizada con el objetivo de amplificar el ADNc de *AtSDH* utilizó como molde una minipreparación plasmidial del vector pCR8-*AtSDH*(ADNc) (Mandujano, 2010) y los partidores *AtSDH*-F y *AtSDH*-R (Tabla II). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l utilizando Pfu polimerasa, la cual exhibe actividad exonucleasa en sentido 3'→5' impidiendo la incorporación de nucleótidos erróneos durante la polimerización. La mezcla contenía 1 X tampón de reacción suplementado con  $MgSO_4$ , 0,2 mM dNTPs, 0,5  $\mu$ M de los partidores sentido y antisentido, 1  $\mu$ l del molde de ADN plasmidial sin diluir y 1 U de Pfu polimerasa recombinante (Fermentas). El programa de reacción utilizado se detalla en Tabla III, con el nombre *AtSDH* clonación.

El protocolo general para las otras reacciones de PCR realizadas utilizó la enzima Taq™ DNA polimerasa (Sigma) debido a su mejor rendimiento. La mezcla general se compuso de la siguiente manera: 1X tampón de reacción suministrado con 2 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM dNTPs, 0,5  $\mu$ M de los partidores sentido y antisentido, 1 U de Taq polimerasa, ADN como molde o lo que corresponda a repicar una colonia de templado (PCR de colonia) y agua NP suficiente para completar un volumen final de reacción de 20  $\mu$ L. Los programas de PCR se muestran en la Tabla III.

#### 3.4.2. Reacción de Transcripción Reversa (RT-PCR)

Las muestras de ARN obtenidas con óptima calidad (sección 3.2) fueron tratadas con DNasa para eliminar posibles remanentes de ADN producto de la extracción. Cada reacción se realizó con 6  $\mu$ g de ARN total en un volumen de reacción de 20  $\mu$ l en agua DEPC. La composición final de cada reacción fue: 1 X Tampón DNasa I con  $MgCl_2$ ; 1 U DNasa I; 1,2 U de inhibidor de RNasa RiboLock™ (Fermentas). La mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C, luego fue mantenida en hielo (5 min) y se agregó EDTA a una concentración final de 2,5 mM.

Para la síntesis de ADNc se utilizó el sistema ImProm-II® Reverse Transcription de

Promega. Se mezcló 9,5 µl del volumen de ARN tratado con DNasa con 1,5 µM de partidor antisentido Oligo-AP (Tabla II). Se sometieron las muestras al programa RT-PCR el cual comienza con una incubación de 5 min a 70 °C. Transcurrido este tiempo se detuvo el programa momentáneamente para incubar los tubos en hielo (5 min) y se agregó 34,5 µl de la mezcla de transcripción reversa (1X tampón ImProm-II<sup>®</sup>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM dNTPs, 1,5 U de inhibidor de RNasa RiboLock, agua DEPC). Finalmente, se añadió 1 µl de la enzima Transcriptasa Reversa a cada tubo. El programa continuó según lo detallado en Tabla III.

Se confirmó la calidad del ADNc obtenido mediante la amplificación por PCR de un fragmento de *actina*, utilizando partidores específicos y el programa del mismo nombre (Tabla II y III). Confirmada la integridad del ADNc, se realizaron reacciones de PCR cuantitativo (sección 3.4.3).

### 3.4.3. Reacciones de PCR en Tiempo Real o RT-PCR cuantitativo

Para evaluar la expresión del transcrito de *AtSDH* en líneas insercionales (sección 6.1) y en plantas silvestres de *Arabidopsis* sometidas a estrés por frío (sección 6.3.1) se realizaron experimentos de RT-PCR cuantitativo, utilizando la sonda fluorescente SYBR green, contenida en el kit SensiMix<sup>™</sup> SYBR Hi-Rox (Bioline) y se empleó el termociclador *Stratagene Mx3000P* (Agilent Technologies).

Para llevar a cabo la técnica, se diseñaron partidores específicos para *AtSDH* (sección 3.3.1) y se utilizaron partidores descritos en la literatura para *Ubq10* (AGI: *At4g05320*) y *26410* (AGI: *At4g26410*) descritos como adecuados genes de mantenimiento (*housekeeping*) en *Arabidopsis* (Czechowsky y cols, 2005). De forma excepcional se utilizaron partidores específicos diseñados para amplificar *AtA6PR* (aldosa 6 fosfato deshidrogenasa; Zamudio, datos sin publicar) para evaluar de manera complementaria los niveles de transcrito de este gen en plantas silvestres sometidas a estrés por frío (sección 6.3.1).

Un vez obtenidos todos los partidores a utilizar, se determinó la eficiencia de cada par, salvo los descritos para *AtA6PR* (previamente evaluados; Zamudio, datos sin publicar). Para esto, se realizó una reamplificación mediante PCR en tiempo real para cinco diluciones (desde

1/100 hasta  $1/1 \cdot 10^6$ ) de una amplificación realizada previamente por PCR convencional, utilizando cada par de partidores independientemente. Luego, la eficiencia de cada partidador (E) se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$E = 10^{(-1/pendiente)} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde la pendiente se obtiene de la recta en un gráfico del ciclo umbral (Ct) v/s el número de la dilución.

Una vez obtenida las eficiencias de los partidores, se realizaron las reacciones de PCR en tiempo real siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando 250 nM del partidador en sentido y antisentido para la amplificación del fragmento de 26410, mientras que se usaron 350 nM de los partidores para *Ubq10* y *AtSDH* (concentraciones en que se obtuvo mejor eficiencia). El programa utilizado fue qRT-PCR (Tabla III) para todas las reacciones. Luego de cada programa de amplificación se realizó una curva de disociación, que consistió en la medición de la fluorescencia durante la denaturación del producto de PCR (95 °C por 1 min, 60 °C por 30 s y 95 °C por 30 s). La presencia de un único pico en un gráfico de Fluorescencia vs. T° fue indicativo de la presencia de un solo amplificado en la reacción.

La metodología utilizada requiere de una condición que sirve como "calibrador", la cual corresponde a las condiciones normales o sin tratamiento. En esta tesis, el calibrador correspondió a una planta silvestre para evaluaciones de líneas mutantes SALK, y condiciones de tratamiento T0 para evaluar la inducción de frío.

La cuantificación se realizó utilizando los datos de Ciclo Umbral obtenidos mediante el programa *MxPro Software*. Los datos se ingresaron a la Ecuación 2 (Pfaffl, 2001), junto a los valores de eficiencia de cada par de partidores, que fue determinado previamente.

$$Razón = \frac{(1 + E_{gen..objetivo}) \times e^{(Ct_{gen..objetivo} - Ct_{calibrador.objetivo})}}{(1 + E_{gen..normalizador}) + e^{(Ct_{gen..normalizador} - Ct_{calibrador.normalizador})}}$$

(Ecuación 2)



Los datos obtenidos fueron graficados mediante el programa GraphPad Prism. Se utilizó un test de ANOVA de una vía para determinar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los promedios de cada conjunto de datos, seguido de un post-test de Bonferroni de comparación múltiple, para evaluar si las diferencias entre el promedio de las réplicas era significativo ( $p < 0,05$ ). En general, cada medición fue realizada en triplicado a partir de dos replicas biológicas.

**Tabla III. Programas de PCR utilizados en el desarrollo de la tesis.**

**AtSDH clonación:** Programa de PCR usado para la amplificación del gen *AtSDH* mediante Pfu polimerasa usando los partidores AtSDH-F y AtSDH-R.

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	94	5 min	1
2	1	94	30 s	33
	2	52	1 min	
	3	72	1 min 45 s	
3	1	72	10 min	1
		10	∞	

**AtSDH chequeo:** Programa de PCR usado para la amplificación de *AtSDH* mediante Taq polimerasa a partir de colonias transformadas de *E. coli* con el vector pEXP5-*AtSDH*, usando los partidores AtSDH-F y AtSDH-R.

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	94	5 min	1
2	1	94	30 s	33-35
	2	52	1 min	
	3	72	40 s	
3	1	72	10 min	1
		10	∞	

**Homocigosis chequeo:** Programa de PCR usado para la amplificación de los fragmentos gen-inserto en líneas insercionales de *Arabidopsis* (sección 6.1.1) usando los partidores AtSDH-F, AtSDH-R, pAtSDH-F, pAtSDH-R y Lb1.3, según corresponda (ver resultados sección IV 2)

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	94	5 min	1
2	1	94	30 s	35
	2	51	1 min	
	3	72	35 s	
3	1	72	10 min	1
		10	∞	



**Actina:** Programa de PCR utilizado para comprobar la integridad del ADNc mediante la amplificación de un fragmento interno del *actina 4*, usando los partidores Actina-F y R.

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	95	5 min	1
2	1	95	30 s	35
	2	50	45 s	
	3	72	30 s	
3	1	72	10 min	1
		10	∞	

**RT-PCR:** Programa para obtener ADNc mediante transcriptasa reversa usando partidores Oligo-AP

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	1	70	5 min
	2	hielo	7 min
2	1	25	5 min
	2	42	60 min
	3	70	15 min
3	1	4	∞

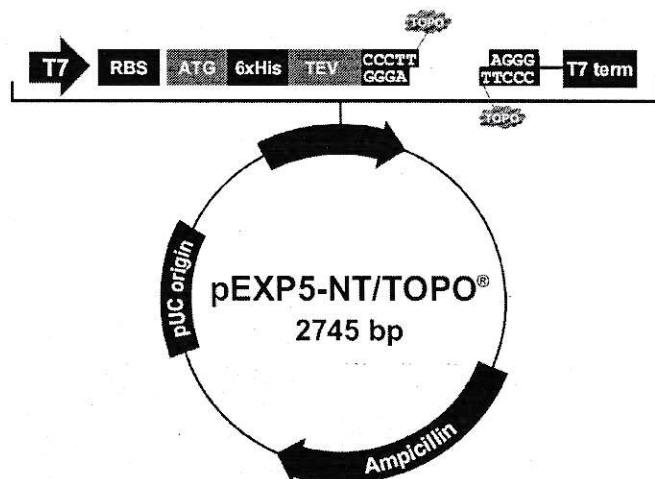
**qRT-PCR:** Programa de PCR cuantitativo usado para la amplificación de los fragmentos de los genes normalizadores *Ubg10*, *At4g26410* y *AtSDH* con los partidores detallados en Tabla II.

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

### 3.5. CONSTRUCCIONES GENÉTICAS.

#### 3.5.1. Clonación de *AtSDH* en vector pEXP5/TOPO®.

Para producir la proteína de fusión His-*AtSDH* *in-vitro* fue necesario disponer de un plásmido recombinante compatible con el sistema de expresión utilizado (Expressway™ Cell-Free; Invitrogen). El vector pEXP5-NT/TOPO® (Invitrogen; Figura 4) posee el promotor T7, un sitio de unión a ribosoma (RBS) y confiere un epítipo (6xHis) en el extremo N-terminal de la secuencia, características que lo hacen apropiado para la síntesis de proteínas *in-vitro*.



**Figura 4. Esquema del vector de expresión pEXP5-NT/TOPO®:** Vector compatible con el sistema de síntesis *in-vitro* Expressway™ Cell-Free; **T7**, promotor inducible; **RBS**, sitio de unión a ribosoma (secuencia Shine-Dalgano); **ATG**, inicio de transcripción y traducción; **6xHis**, región de polihistidinas (epítipo His6x); **TEV**, sitio de reconocimiento de la proteasa de Tobacco Etch Virus; **TOPO**, sitio de reconocimiento y ligación del ADN de interés mediante topoisomerasa I; **T7 term**, terminador de la transcripción; **pUC origin**, origen de replicación de alto número de copias, **ampicillin**, gen de resistencia a ampicilina ( $\beta$ -lactamase).

El vector pEXP5-NT/TOPO® permite clonar productos de PCR que contengan en su extremo terminal 3' deoxyadenosina (A) debido al apareamiento de bases que ocurre con la timina desapareada que posee el vector en su sitio de clonamiento. Para utilizar este sistema, fue necesario agregar en forma previa una adenina terminal en los extremos 3' del producto de PCR correspondiente a la amplificación del ADNc de *AtSDH* mediante Pfu polimerasa (sección 3.4.1) purificado desde gels de agarosa. Con este objetivo, se realizó

una mezcla que contenía: 1X tampón NH<sub>4</sub>, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dATP, 0.5 U de Taq ADN polimerasa Biolase (Bioline) y 100 ng de producto PCR purificado. La mezcla se incubó a 72 °C durante 30 min.

Obtenido el inserto, se realizó la reacción de ligación con pEXP5-NT/TOPO<sup>®</sup> en una mezcla que contenía 1 µl de vector y de solución salina, en un volumen final de 6 µl. La mezcla se incubó a 4 °C durante 2 h y luego se transformó *E. coli* One Shot<sup>®</sup> TOP10 (sección 4.2). Los clones resistentes a ampicilina fueron analizados mediante ensayos de PCR (sección 3.4.1), digestiones enzimáticas (sección 3.5.1.1) y finalmente por secuenciación del ADN plasmidial (secciones 3.1.3 y 3.6) para confirmar la fidelidad del inserto clonado.

#### **3.5.1.1. Digestiones enzimáticas para la selección de clones positivos pEXP5-*AtSDH***

Para confirmar la identidad y orientación de *AtSDH* en el vector pEXP5 se realizaron ensayos de restricción con *Ava*I (Eco881, Fermentas). Esta enzima corta una vez en la secuencia codificante de *AtSDH* (nucleótido 668) y en el vector de clonamiento pCR8 (nucleótido 2577). La mezcla se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía 1X tampón Tango, 1 U de *Ava*I y 500 ng de ADN plasmidial, siendo incubada (37 °C, ~2 h) y luego visualizada en geles de agarosa (sección 3.2.2).

#### **3.5.2. Clonación de fragmentos de ADN en el sistema pCR<sup>®</sup>8**

Con el fin de identificar la exacta ubicación del T-DNA en líneas insercionales de *Arabidopsis*, se clonaron fragmentos de ADN “gen-inserto” (sección 6.1.1), utilizando el sistema pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> de Invitrogen. Este sistema de clonación cuenta con la enzima Topoisomerasa I covalentemente unida en la secuencia CCCTT del vector, favoreciendo la clonación de los productos de PCR que poseen una adenosina libre en cada extremo de forma muy eficiente.

Para utilizar este sistema, 50-100 ng de producto de PCR previamente purificado desde geles de agarosa (sección 3.2.2) se mezcló con el vector pCR<sup>®</sup>8 en una reacción que contenía 1 µl de vector y de solución salina según lo recomendado por sus fabricantes, en

un volumen final de 6 µl. La mezcla se incubó a TA durante 2 h y luego se transformó *E. coli* (sección 4.2). Los clones resistentes a espectinomicina fueron analizados mediante ensayos de PCR (sección 3.4) y por secuenciación (sección 3.6) para confirmar la fidelidad del inserto clonado.

### **3.6. SECUENCIACIÓN.**

La secuenciación de los ADN plasmidiales fue realizada en MacroGen Co. (USA), usando los partidores M13F y M13R para clonaciones en vector pCR8, y T7F y T7R para el vector pEXP5-*AtSDH* (Tabla II, sección 3.5).

## **4. TRABAJO CON BACTERIAS**

### **4.1. CRECIMIENTO DE BACTERIAS**

Bacterias *E. coli* (sección 2) fueron cultivadas durante 16-20 h a 37 °C en medio LB líquido (1% triptona, 1% extracto de levadura, 0,8 % NaCl, pH 7.0 a 25 °C) y sólido (mezcla anterior suplementada con 1,5% de agar), agitadas a 200-250 rpm en el caso del cultivo en medio líquido.

Los antibióticos de selección utilizados para *E. coli* fueron espectinomicina (100 mg/L) para las cepas transformadas con el vector de clonación pCR8 y ampicilina (100 mg/L) para las cepas transformadas con el vector de expresión *in-vitro* pEXP5-NT/TOPO® (sección 3.5).

### **4.2. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* POR GOLPE TÉRMICO**

A alícuotas de *E. coli* quimiocompetente DH5α y One Shot (100 µl con O.D. 1,0) se les agregó 50-100 ng de la construcción de ADN deseada, incubando la mezcla en hielo durante 20 min. Luego, las muestras fueron sometidas a un golpe de calor (42 °C durante 30 s) tras lo cual, fueron ubicadas rápidamente en hielo (~10 min). Una vez transformadas, las células fueron incubadas en 1 ml de LB (1 h, 37 °C, 200-250 rpm) y sembradas en LB-



agar suplementado con el antibiótico de selección correspondiente (sección 4.1). Colonias capaces de crecer en medio con antibiótico fueron analizadas mediante PCR (sección 3.4.1)

## **5. TRABAJO CON PROTEÍNAS**

### **5.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

El método de cuantificación por Bradford (Bradford, 1976) se basa en la capacidad de las proteínas de interaccionar con una solución ácida de azul Coomassie G-250 y modificar la longitud de onda de su absorbancia máxima, que pasa de 465 nm a 595 nm. Para cuantificar las proteínas, una alícuota del extracto proteico se llevó a 800 µl con agua, y se añadieron 200 µl de reactivo de Bradford ("Protein Assay Concentrated Dye", BioRad). La mezcla se incubó durante 10 min a TA para estabilizar el color, y se determinó su absorbancia a 595 nm mediante espectrofotómetro (Jenway 6300, Equilab). La absorbancia es directamente proporcional a la concentración de proteína. Esta relación lineal se determinó empíricamente mediante el uso de un estándar de albúmina sérica bovina (Sigma) a diferentes concentraciones y obteniendo una recta patrón.

### **5.2. SÍNTESIS *IN-VITRO* DE His-AtSDH**

Para llevar a cabo la síntesis de la proteína de fusión His-AtSDH se utilizó el sistema de transcripción y traducción *in-vitro*, Expressway™ Maxi Cell-Free *E. coli* Expression System, (Invitrogen). Para la síntesis se utilizó el vector de expresión pEXP5-AtSDH (sección 3.5.1), siguiendo las instrucciones recomendadas por sus fabricantes, con una modificación en la temperatura de incubación (30 °C) y utilizando una mayor concentración de vector (1,5 µg, sección\_3.1.3).

### 5.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DENATURANTES (SDS- PAGE).

Para evaluar la correcta síntesis *in-vitro* de la proteína de fusión His-AtSDH y el tamaño y nivel de pureza de la proteína en las distintas etapas de purificación (sección 5.4) se realizaron electroforesis en condiciones denaturantes utilizando una cámara vertical Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). Según el tamaño esperado de His-AtSDH (42 kDa) se prepararon geles SDS-PAGE al 12%, los cuales permiten la separación adecuada de proteínas en el rango de 37-75 kDa.

El gel separador se preparó 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  $\mu$ L de SDS 10% (p/v), 30  $\mu$ L de APS 10 % (p/v) y 5  $\mu$ L 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  $\mu$ L de SDS 10% (p/v), 25  $\mu$ L de APS 10 % (p/v) y 3  $\mu$ L de TEMED. Las muestras de proteínas se mezclaron en proporción 2:1 con un tampón de carga 2X [125 mM Tris-HCl pH 6,8, glicerol 20 % (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 2% (v/v), azul de bromofenol 0,1 % (p/v) y 4 % (p/v) SDS] y se incubaron a 75 °C durante 15 min. Una vez cargadas las muestras, los geles corrieron por media hora a 80 V seguido de aproximadamente 2 h a 100 V (hasta el momento antes de la caída del frente). El tampón de corrida fue preparado con 25 mM Tris-HCl pH 8,8, 192 mM glicina y 0,1 % (p/v) SDS.

Realizada la electroforesis, los geles fueron revelados mediante tinción de Coomassie (sección 5.3.1) o transferidos a membranas de nitrocelulosa para posteriores Western blots (sección 5.3.2). La masa molecular relativa de las proteínas se determinó a partir de su migración electroforética con respecto al estándar de peso molecular Prestained Protein Ladder (Fermentas) el cual contiene 10 proteínas patrón de una masa molecular: 10, 17, 26, 34, 43, 55, 72, 95, 130, 170 kDa, siendo dos de ellas coloreadas: banda de 10 kDa (verde) y 72 kDa (naranja).

### **5.3.1. Tinción de Coomassie.**

Los geles SDS-PAGE fueron revelados con azul brillante Coomassie R-250 0,3 % p/v disuelto en una mezcla de metanol 50 % v/v, ácido acético 10 % v/v. Los geles fueron incubados en esta mezcla durante 2 h con agitación constante y luego fueron desteñidos con la misma mezcla sin azul brillante Coomassie, hasta obtener un contraste claro de las bandas.

### **5.3.2. Inmunodetección mediante Western-Blot.**

Una vez corridas las muestras de proteínas en geles SDS-PAGE, éstas fueron transferidas 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 durante 15 min, luego de la cual 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, incubando la membrana en una solución de Rojo de Ponceau (Rojo de Ponceau 0,1 % (p/v), ácido acético 5 % (v/v)). Luego se lavó la membrana con agua destilada hasta que la tinción desapareciera y se incubó en una mezcla de TBS-T y leche 3% (p/v) con agitación suave a 4 °C durante toda la noche (bloqueo). Al día siguiente la membrana se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 min y fue incubada en TBS-T, leche 3 % (p/v) y anticuerpo primario Anti-His a una concentración 1:3000 (Mouse IgG monoclonal, Sigma) en agitación suave por 2-3 h a TA. Transcurrida la incubación, se lavó la membrana con TBS-T durante 10 min (3 veces) y fue mantenida en TBS-T, leche al 3 % (p/v) más el anticuerpo secundario Anti-mouse en concentración 1:30.000 (Mouse IgG policlonal, Sigma) en agitación suave por 2-3 h a TA. Transcurrido el tiempo, la membrana se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 min.

El revelado se realizó utilizando fosfatasa alcalina. Para esto, se lavó la membrana 2 veces con tampón alcalino (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl y 5 mM MgCl<sub>2</sub>) durante 5 min y se reveló la membrana con 20 ml de tampón alcalino más 66 µl de NBT 50 % (p/v) y 33 µl de BCIP 50 % (p/v) a TA, hasta que las bandas se hicieran visibles (~1-10 min). Finalmente la reacción se detuvo con 20 ml de EDTA 20 mM.



## 5.4. PURIFICACIÓN DE His-AtSDH POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.

### 5.4.1. Sistema tradicional de purificación mediante columnas HisTrap.

Posterior a la síntesis *in-vitro* de la proteína de fusión His-AtSDH (sección 5.2), la proteína fue purificada utilizando la columna HisTrap de GE Healthcare® de 1 ml. Para la purificación se montó un sistema que conectó la muestra y los tampones utilizados mediante una manguera a la columna, previo paso de las soluciones por un filtro (poro 22 µm; conectado a la manguera) con el fin de mantener condiciones estériles. Mediante este sistema, se utilizó un flujo continuo para eluir la proteína en un gradiente de imidazol de 20 mM a 600 mM como se detallará a continuación.

Se ambientó la columna con 5 vol (equivalente a 5 ml) de tampón de ambientación (20 mM imidazol, 20 mM tampón fosfato pH 7,4 y 100 mM NaCl). Una vez ambientada la columna se cargaron ~3 mg de proteínas totales del producto de reacción de síntesis (300 µl; sección 5.2) previamente diluida en 5 vol de tampón de ambientación y luego, se lavó la columna con 5 vol del mismo tampón para evitar uniones proteicas inespecíficas a la resina; esta fracción fue recolectada para posteriores análisis (llamada frente de purificación). Posteriormente se inició el gradiente de elución, para esto se conectaron 10 vol iniciales de tampón de ambientación y 10 vol de tampón de elución (600 mM imidazol, 20 mM tampón fosfato pH 7,4 y 100 mM NaCl) mediante una manguera fina, usada como puente entre ambas soluciones, permitiendo un flujo continuo desde la solución más concentrada a la con menor concentración de imidazol. En este paso de purificación se recolectaron las distintas fracciones en volúmenes de 2 ml. Finalmente, se lavó la columna con 10 vol de tampón de elución para eliminar de la columna cualquier remanente proteico que pudiese haber interactuado con la resina.

Durante todo el proceso de purificación se aplicó un flujo continuo de 1 ml/min a las soluciones por medio de una bomba peristáltica (VWR). Las distintas fracciones recolectadas fueron analizadas mediante el método de Bradford (sección 5.1), SDS-PAGE (sección 5.3), western blot y análisis cinéticos (sección 5.5) con el fin de identificar la fracción en que fue eluida His-AtSDH.



#### **5.4.2. Sistema de purificación alternativo para pequeñas cantidades**

Se implementó un sistema casero de purificación para pequeños volúmenes mediante cromatografía de afinidad a Ni<sup>+2</sup> utilizando una micro-columna IMAC con 250 µL de resina, similar al sistema comercializado His-Spin Protein Miniprep (Zymo-Research). Este sistema permite obtener proteínas de fusión a His purificadas en menor tiempo al involucrado en un sistema convencional (sección 5.4.1) y a una mayor concentración al utilizar pequeños volúmenes de elución.

##### **5.4.2.1. Proceso de purificación**

Para llevar a cabo la purificación mediante este sistema, el producto de reacción obtenido mediante síntesis *in-vitro* (200 µl; sección 5.2) fue centrifugado a 12.000 x g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante recuperado fue suspendido en un volumen equivalente de buffer de resuspensión 2X compuesto por el amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8,2, imidazol 20 mM, NaCl 1M y glicerol 20% v/v, la mezcla fue homogenizada mediante vortex durante 30 s e incubada a TA durante 5 min. El sobrenadante resuspendido se ubicó en la columna IMAC, se homogenizó con la resina mediante vortex, se incubó a TA (5 min) y se centrifugó durante 30 s a 8.000 x g. Posteriormente, la proteína His-AtSDH unida a la resina, fue sometida a una serie de lavados con el fin de eluir las demás proteínas que forman parte de la reacción de síntesis, unidas de manera inespecífica y no covalente a la resina. Para esto, se realizó un primer lavado con 500 µl de buffer de resuspensión 1X y luego dos lavados consecutivos usando el mismo buffer suplementado con 50 mM de imidazol (buffer lavado: Tris-HCl 10 mM pH 8,2, imidazol 50 mM, NaCl 500 mM y Glicerol 10% v/v). Luego se procedió a eluir la proteína His-AtSDH utilizando el mismo buffer a una concentración de imidazol a 250 mM. Las distintas fracciones obtenidas mediante este sistema fueron analizadas de igual manera a la descrita en sección 5.4.1.

#### **5.4.2.2 Mantención de las minicolumnas de purificación**

Cada dos purificaciones utilizando las minicolumnas IMAC, la resina fue recargada con  $\text{Ni}^{+2}$ . A cada columna se agregó 500  $\mu\text{l}$  de buffer 1 de stripping (amortiguador Fosfato pH 7,4 20 mM, NaCl 500 mM, EDTA 500 mM), se homogenizó la resina con el buffer mediante vortex durante 30 s, se incubó durante 2 min a TA y luego se centrifugó por 30 s a 10.000 x g. Este procedimiento se repitió 3 veces. Posteriormente se agregó buffer 2 de stripping (amortiguador Fosfato pH 7,4 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 40 mM), la mezcla se homogenizó, incubó y centrifugó de la misma manera antes mencionada, repitiendo el procedimiento 3 veces. Luego se recargó la resina, agregando un volumen de  $\text{NiSO}_4$  0,1 M, repitiendo 3 veces el procedimiento antes mencionado. Para finalizar se lavó la resina con dos volúmenes de agua NP.

### **5.5. MEDICIÓN DE ACTIVIDAD SORBITOL DESHIDROGENASA.**

#### **5.5.1. Ensayos de actividad cualitativos mediante geles nativos (zimogramas)**

Mediante la técnica de zimogramas descrita por De Sousa y cols (2008) se evaluó la actividad deshidrogenasa en el producto de reacción de síntesis *in-vitro* de His-AtSDH. Para esto, se cargaron 20 ng de la reacción en geles de poliacrilamida nativo al 12 %, a los cuales se le aplicó un voltaje de 80 V, durante 5 h a TA. Tanto el tampón de carga de las muestras como el buffer de corrida utilizado, poseen la misma composición que la utilizada en la preparación de geles SDS-PAGE, pero sin la adición de SDS a las soluciones (sección 5.3). Inmediatamente finalizada la corrida del gel, se incubó en un buffer que contenía: 50 mM Tris-HCl pH 9, 0,15 mM  $\text{NAD}^+$ , 0,18 mM NBT, 0,06 mM fenazina metasulfato y 68 mM sorbitol por 30 min a 37 °C, para la visualización de la actividad SDH. Con el objetivo de evaluar cualitativamente la actividad deshidrogenasa con otros polioles como posibles sustratos para AtSDH, los geles nativos fueron incubados en las mismas condiciones mencionadas, reemplazando la concentración de sorbitol descrita, por la de otros polioles presentes en Arabidopsis. Como control positivo de reacción se utilizó la enzima comercial SDH de oveja (Sigma, S3764) y como control negativo, productos de reacción *in-vitro* sin la

expresión de His-AtSDH. Todas las reacciones se detuvieron incubando los geles en una solución de ácido acético 9 % y metanol 45 % durante 5 min, siendo luego fotografiados.

### 5.5.2 Ensayos de actividad cuantitativos mediante espectrofotometría.

La actividad enzimática se determinó en un mezcla de reacción que contenía: Tris-HCl pH 9,0 100 mM, sorbitol 50 mM, NAD<sup>+</sup> 2 mM. Durante la reacción enzimática, se monitoreó la formación de NADH a 25 °C por medio del aumento en la A<sub>340</sub>. Se calculó la actividad de la enzima en μmoles de NADH formados por min y por volumen de enzima (ml) lo que equivale a una unidad de enzima (U), mediante la siguiente ecuación:











$$Act..específica = \left( \frac{Pendiente}{\epsilon_{NADH} \times \ell \times V_e} \times V_c \right) \div C_e$$

(Ecuación 3)

Donde la pendiente corresponde a la variación de la absorbancia con respecto al tiempo (min) debido a la formación de NADH producto de la reacción SDH obtenida mediante espectrofotometría,  $\epsilon_{NADH}$  es el coeficiente de extinción molar para NADH (6220 UA M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>),  $\ell$  corresponde al largo de la cubeta utilizada en la medición, V<sub>e</sub> y V<sub>c</sub> son el volumen de enzima y de reacción (μl) respectivamente y finalmente C<sub>e</sub> concentración de la enzima purificada (sección 5.1).

Los ensayos cinéticos se realizaron en un espectrofotómetro Biotek Synergy 2 UV-visible a 25 °C, con dos inyectores utilizando placas Nunc® de 96 pocillos (modelo 269620), las cuales tienen propiedades adecuadas de transmitancia y baja adsorción de proteínas.

Para realizar las mediciones cinéticas se generó un protocolo a través del software Gen5 del espectrofotómetro (Figura 5). En todos los casos, la reacción fue desencadenada con la adición de la proteína purificada o producto de reacción *in-vitro*. Se realizaron 3 o 4 réplicas para cada concentración, con cinéticas de 1 min a una tasa de adquisición de datos, que resultaba en 300 observaciones totales: una cada 20 centésimas de s. Adicionalmente, el espectrofotómetro midió la longitud del paso óptico de cada pocillo para normalizar las mediciones a una longitud de paso óptico de 1 cm.

Description	Comments
 Temperature: Setpoint 25 °C	
 Shake: Medium for 0:10	
 Well Mode	
 Dispense 20 µL using dispenser 1	D1..E8
 Shake: Fast for 0:05	
 Start Kinetic [Run 1:00.00, Interval 0:00.20]	
 Read: (A) 340	D1..E8
 End Kinetic	
 End Mode	
 Read: (A) 340	D1..E8

**Figura 5. Protocolo software Gen5.** Instrucciones creadas en el software del espectrofotómetro para realizar las mediciones cinéticas. Los iconos pequeños representan los diferentes pasos efectuados para cada medición. En el dispensador 1 se coloca la enzima, la cual es inyectada al pocillo que contiene la mezcla para desencadenar la reacción, seguido de un paso de agitación por 5 segundos. Finalmente se mide la cinética. Esta secuencia se repite para cada pocillo de la placa.

## 5.6. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS APARENTES.

Las constantes cinéticas se calcularon a partir de mediciones de velocidad inicial ( $v_0$ ) a diferentes concentraciones de sustrato (S) manteniendo la concentración del co-sustrato constante y saturante (ver resultados; sección IV.1.5), ajustando a los datos el modelo cinético de Michaelis-Menten descrito por la ecuación:

$$V_0 = \frac{V_{MAX} \times [S]}{K_M + [S]} \quad \text{(Ecuación 4)}$$

En esta ecuación, la  $K_M$  es la constante de Michaelis, cuyo significado corresponde a la concentración de sustrato a la cual  $v_0 = \frac{1}{2} V_{MAX}$ . La  $V_{MAX}$  por su parte, es la velocidad máxima que puede alcanzar la reacción catalizada por la enzima ( $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de enzima) y a su vez, equivale al producto de la constante catalítica  $k_{cat}$  por la concentración de enzima total  $[E]_T$ . Específicamente, la  $k_{cat}$  se calcula por medio de la ecuación:

$$k_{cat} = \frac{V_{MAX} \times PM_{(ASDL)} \times 0,001}{60} \quad \text{(Ecuación 5)}$$



en donde, PM es el peso molecular de His-AtSDH expresado en g/mol; 0,001 es el factor de conversión para convertir los g/mol en mg/ $\mu$ moles y 60 es el factor de conversión para convertir los minutos a segundos. Finalmente, la  $k_{cat}$  se expresa en  $s^{-1}$ .

## 6. TRABAJO CON PLANTAS

### 6.1. OBTENCIÓN DE LÍNEAS INSERCIONALES HOMOCIGOTAS EN AtSDH

La colección de mutantes del SALK Institute (Alonso y cols, 2003) cuenta con líneas mutantes insercionales que interrumpen la secuencia transcrita de la mayoría de los genes descritos en el genoma de Arabidopsis, por medio de un ADN-T de 4,5 kb. En esta colección se predice el lugar de inserción del ADN-T, por lo que, mediante una búsqueda en la base de datos del Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) (<http://arabidopsis.info>), fue posible seleccionar 3 líneas mutantes en las que la inserción había sido designada en la región transcrita de *AtSDH* (At5g51970), específicamente en la región 5'UTR (SALK\_020855), exón 3 (SALK\_023456) y exón 5 del gen (SALK\_077335), las que designamos como *sdh1-3*, *sdh1-1* y *sdh1-4* respectivamente. Cabe mencionar, que el nombre atribuido a cada mutante insercional sigue la designación de una reciente publicación en que fueron caracterizadas dos líneas *sdh-* (*sdh1-1*, común en ambos estudios, y *sdh1-2*; Nosarzewski y cols, 2012)

Una vez adquiridas las distintas líneas, fueron evaluadas a nivel molecular para verificar la presencia y ubicación correcta del inserto mediante PCR. Para esto, semillas de cada línea fueron sembradas y crecidas en medio hidropónico (sección 6.2.2). Transcurridos 15 días de crecimiento desde su siembra, se extrajo el ADNg de hojas rosetas (sección 3.1.1) de 10 plántulas de manera independiente y fue usado como templado en reacciones de PCR para identificar posibles líneas homocigotas. Con este fin, se utilizaron partidores específicos para el gen y el inserto (Tabla II) siguiendo el protocolo descrito en <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html> y utilizando plantas silvestres como control de reacción (para más detalles ver Resultados; sección IV.2). Con el fin de verific

ar el estado homocigoto de las líneas ya analizadas, la progenie (T2) de cada línea insercional seleccionada por PCR fue evaluada mediante el mismo sistema (10 plantas por cada posible homocigota).

#### **6.1.1. Determinación de la ubicación del ADN-T en líneas *sdh*-**

Con el objetivo de verificar la ubicación del inserto en líneas homocigotas para cada mutante insercional (*sdh1-3*, *sdh1-1* y *sdh1-4*), la región amplificada por PCR correspondiente a parte del gen y del inserto fue ligada a vectores de clonación (sección 3.5.2). Luego de la transformación de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes con la mezcla de ligación, se seleccionaron clones de interés en medio de selección y por PCR. Aquellos clones positivos fueron secuenciados (sección\_3.6) permitiendo identificar la ubicación precisa del inserto en el genoma de las 3 líneas mutantes analizadas.

### **6.2. CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA ARABIDOPSIS.**

#### **6.2.1. Crecimiento en tierra.**

Las semillas de cada línea a evaluar, fueron sembradas directamente en tierra (sin esterilizar) en contenedores de 7 x 7 cm con una mezcla de tierra Turba rubia (neutralizada a pH 6 con 3 kg CaCO<sub>3</sub>/m<sup>3</sup> turba; nombre comercial Balticpit, distribuida por PRODEASA®), perlita y vermiculita en proporción 2:1:1 y se mantuvieron en condiciones de humedad elevada durante 3 días a 4 °C en oscuridad, cubriéndolas con un film de plástico transparente (estratificación). Transcurrido ese tiempo, se fue perforando el plástico, y se eliminó totalmente al cabo de 7 días. Las plantas fueron crecidas bajo condiciones estándar de crecimiento para Arabidopsis en fotoperíodo corto (ciclos de 8 horas luz/ 16 horas de oscuridad, con una intensidad de luz de 9000 lux) y regadas 2 veces por semana con una solución nutritiva descrita por Hoaglands y cols (1938), diluida a 0,5x (Tabla IV).



**Tabla IV:** Composición de la Solución nutritiva tipo Hoaglands y cols 1938 (0,5X) utilizada en Servei de Camps Experimentals (Universidad de Barcelona, España).

Macronutrientes (mM)						
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>-x</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>
7,0	1,0	1,0	3,0	2,0	0,5	0,5

Micronutrientes (µM)						
Fe	Mn	Zn	B	Cu	Mo	Co
19	15	5	9	5	0,9	0,3

### 6.2.2. Crecimiento en cultivo hidropónico.

Para la obtención de semillas de *Arabidopsis*, con el fin de evaluar la progenie (T2) de líneas insercionales, se utilizó un sistema de cultivo hidropónico. Para ello, se preparó una solución nutritiva al 100X descrita por Gibeaut y cols (1997; Tabla V), la cual fue ajustada a pH 6,0 y diluida a 1X para su uso. 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. En este sistema, la solución nutritiva se mantuvo constante mediante el riego una vez por semana. Las condiciones de crecimiento durante todo el desarrollo de las plantas fueron en cámaras de cultivo a 22 °C con un fotoperíodo largo de ciclos de 16 h luz (5500 - 8000 Lux). Las semillas fueron recolectadas de manera independiente transcurridas 12 semanas desde su sembrado.

**Tabla V:** Composición (mM) de la Solución nutritiva (100X) para cultivo hidropónico.

KNO <sub>3</sub>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	MgSO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Si	Fe/DTPA	KCl	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	MmSO <sub>4</sub>	ZnSO <sub>4</sub>	CuSO <sub>4</sub>
125	150	75	50	10	10	5	5	1	0,2	0,15

### 6.2.3. Crecimiento *in-vitro*.

#### 6.2.3.1. Esterilización de semillas.

La esterilización de semillas de *Arabidopsis* se llevó a cabo mediante un método de desinfección en líquido para lo cual fueron mantenidas en agitación durante 5 min en 1 ml

de etanol 95% previamente filtrado (filtros Millipore 22  $\mu\text{m}$ ). Luego de descartar el líquido, fueron mantenidas en agitación durante 15 min en una solución de Tritón X-100 0,1% y etanol 70% (filtrada), seguido de 5 lavados con agua destilada estéril.

### **6.2.3.2. Crecimiento de plántulas en placas de Petri**

Para el cultivo *in-vitro* de plantas se utilizó el medio MS (Murashige y Skoog 1962), cuya composición fue la siguiente: medio basal MS 4,43 g/L, mio-inositol 60 mg/L, con o sin la adición de sacarosa (Sigma). El pH del medio se ajustó a 5,7 - 5,8 con KOH 2M y se añadieron 0,6 % de agar (Duchefa, Holanda). El medio se autoclavó durante 30 min a 120 °C, y fue vertido en placas cuadradas de 15 cm de diámetro. Una vez gelificado el medio se procedió al sembrado de semillas estériles, dejándolas en oscuridad a 4 °C durante 48 h para sincronizar su germinación (estratificación), y luego transfiriéndolas a una cámara de cultivo a  $21 \pm 2$  °C en fotoperíodo de día largo (ciclos de 16 h luz/ 8 h oscuridad), con una intensidad de luz de ~5.000 lux.

## **6.3. TRATAMIENTOS DE ESTRÉS ABIÓTICO**

### **6.3.1. Tratamientos de inducción en estrés por frío.**

Con el objetivo de evaluar la transcripción de 2 genes involucrados en el metabolismo de sorbitol, locus At5g51970 (*AtSDH*) y At2g21250 (*AtA6PR*) se realizaron tratamientos de estrés por frío en plantas silvestres de *Arabidopsis*. Para esto, semillas fueron sembradas en condiciones *in-vitro* utilizando medio MS (sección 6.2.3) suplementado con sacarosa al 1% y crecidas durante 18 d en condiciones control a fotoperíodo neutro (ciclos de 12 h luz/ 12 h oscuridad). Transcurrido este tiempo, las placas fueron transferidas a una cámara de incubación que permitió mantener las condiciones de fotoperíodo a 4 °C. Se tomaron muestras de tejido vegetal de 30 plántulas completas a 0, 1, 3, 6, 12 y 24 h iniciado la inducción de estrés por frío. El material recogido, se congeló inmediatamente en  $\text{N}_2$  líquido y se conservó a -80 °C hasta la purificación de ARN (sección 3.1.2).



### **6.3.2. Tratamiento de estrés osmótico, salino y en medios suplementados con sorbitol.**

Semillas de *Arabidopsis* (*sdh-* y silvestres) y plántulas de 7 días crecidas en placas petri en medio MS (sección 6.2.3.2) suplementado con 2% de Sacarosa, fueron sembradas y transferidas, respectivamente, a medios de cultivo MS suplementado con distintas concentraciones de manitol (100, 150 y 200 mM; estrés osmótico), NaCl (100, 150 y 200 mM; estrés salino) y sorbitol (30 mM) siendo mantenidas en condiciones habituales de crecimiento de fotoperíodo de día largo durante 10-35 días, en placas inclinadas (70°) para poder determinar la longitud de la raíz principal mediante análisis fotográfico con el programa Image J (NCBI).

En el caso particular de plantas de *Arabidopsis* sembradas en medios suplementados con sorbitol, también se evaluó el número de raíces laterales utilizando una lupa (Olympus MVX10) y el peso fresco y seco de hojas roseta, obtenido luego de mantener las hojas a 70 °C durante 48 h.

En general, se evaluaron entre 20-60 plantas en los distintos tratamientos mencionados, los cuales fueron repetidos en más de una ocasión.

### **6.3.3. Experimentos de deshidratación o sequía.**

Las plantas de *Arabidopsis*, (*sdh-* y silvestres) fueron crecidas durante 4 semanas en tierra (sección 6.2.1) y luego fueron sometidas a estrés por deshidratación al eliminar el riego durante 14 días. Después de este periodo de privación de agua, las plantas fueron rehidratadas manteniendo las condiciones iniciales de crecimiento. La tolerancia a la deshidratación fue determinada como la capacidad de las plantas de reanudar el crecimiento transcurridos 14 días de recuperación bajo condiciones control (*recovery*; Alcazar y cols, 2010).

La tolerancia a deshidratación fue evaluada en tres replicas biológicas, cada una compuesta de 25-30 plantas para cada línea evaluada.

### 6.3.3.1 Medición del contenido relativo de agua (RWC)

Durante el tiempo en que fueron privadas de agua las plantas sometidas a estrés por deshidratación, se midió el contenido relativo de agua en sus hojas los días: 0 (inicio), 4, 7, 11 y 14 de tratamiento. Para llevar a cabo esta medición, hojas rosetas fueron extirpadas (5 hojas por cada línea evaluada), determinando inmediatamente su peso fresco (FW). Luego, las hojas fueron ubicadas en contenedores con agua desionizada, con su superficie adaxial en contacto con el agua en condiciones de oscuridad durante 24 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, las hojas fueron retiradas del agua, puestas en contacto con papel absorbente y pesadas inmediatamente, obteniendo el peso correspondiente a la hoja re-hidratada (turgid weight, TW). Finalmente, las hojas fueron mantenidas a 70 °C durante 24 h y pesadas para determinar su correspondiente peso seco (dry weight, DW). Obteniendo los distintos valores de pesos (FW, TW y DW) para cada día evaluado, el contenido relativo de agua (RWC) fue calculado a partir de la siguiente formula:

$$RWC = \frac{(FW - DW)}{(TW - DW)} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

### 6.3.3.2. Medición del contenido gravimétrico de agua en el suelo (SGWC)

El contenido de agua de cada contenedor (SGWC) fue medido durante el transcurso del tratamiento de deshidratación. Se registró el peso de cada maceta durante el tiempo de privación de agua (días: 0, 4, 7, 11 y 14) y una vez transcurridos los 14 días de recuperación bajo condiciones control (recovering). Esta última medición correspondió al peso seco del contenedor, obtenido luego de mantener todas las macetas a 70 °C durante 48 h. El contenido gravimétrico de agua fue calculado dividiendo el contenido de agua en el suelo por el peso del suelo seco (Alcázar y cols, 2010) a través de la siguiente relación:

$$SGWC = \frac{(\text{Peso.maceta}_{\text{día evaluado}} - \text{Peso.seco})}{\text{Peso.seco}} \quad \text{(Ecuación 7)}$$

## IV. Resultados

---

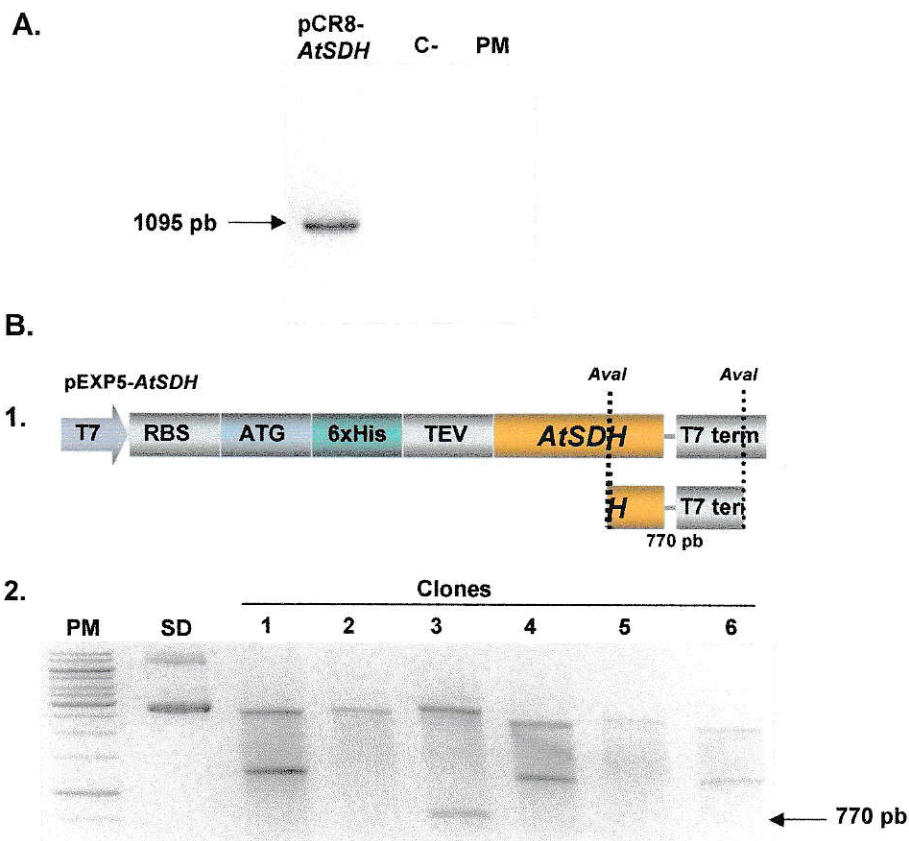
## 1.DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE AtSDH

### 1.1 Construcción del vector de expresión *in-vitro* pEXP5-AtSDH.

Para producir la proteína de fusión His-AtSDH *in-vitro* fue necesario clonar el marco de lectura abierto de *AtSDH* en pEXP5-NT/TOPO<sup>®</sup>, vector compatible con el sistema de expresión *in-vitro* utilizado para la síntesis de proteínas. En su Tesis de Magíster, Patricio Mandujano (2010) amplificó *AtSDH* a partir de ADNc obtenido de purificaciones de ARN de diversos órganos de *Arabidopsis*. Además, clonó el ADNc de *AtSDH* en el vector de entrada pCR<sup>®</sup>8, vector que fue utilizado en el desarrollo de esta tesis.

A partir de ADN plasmidial del vector pCR8-*AtSDH* (ADNc) se amplificó mediante PCR un fragmento de 1095 pb correspondiente al tamaño esperado para el marco de lectura abierto de *AtSDH* (Figura 6A). Esta banda fue purificada desde geles de agarosa para ser ligada en el vector de expresión pEXP5, transformando posteriormente *E. coli* One Shot<sup>®</sup> TOP10. De las colonias que crecieron en el medio de selección (ampicilina), 6 fueron seleccionadas al azar y analizadas mediante la amplificación de *AtSDH* por PCR (sección III.3.4.1). El ensayo indicó que 4 de los 6 clones analizados contenían la construcción pEXP5-AtSDH (datos no mostrados). La presencia y orientación del inserto en el vector fue corroborado a través de ensayos de restricción con *Ava*I, la cual presenta un sitio de corte en el vector y otro en el inserto. De esta manera, se esperaba la liberación de una banda de 770 pb si el inserto se encontraba en la orientación sentido respecto al promotor T7 presente en el vector de expresión (Figura 6B). Como se observa en Figura 6C, un clon de los 6 analizados por digestión presentó el patrón deseado de inserción en sentido de la secuencia de *AtSDH* en pEXP5. Este clon fue secuenciado utilizando los partidores T7F y T7R (Tabla II, sección III.3.6). La secuencia obtenida fue comparada con la secuencia de *AtSDH* depositada en la base de datos (Genbank acceso: NM\_124576). El alineamiento entre ambas secuencias dio como resultado un 100% de identidad a nivel nucleotídico.



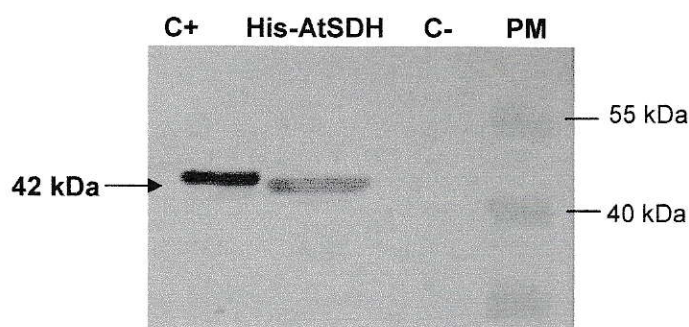


**Figura 6. Generación y análisis del vector pEXP5-*AtSDH*:** **A.** Amplificación por PCR de *AtSDH* a partir de ADN plasmidial del vector pCR8-*AtSDH* (ADNc; Mandujano, 2010) Se observa la banda de 1095 pb correspondiente al tamaño esperado para *AtSDH*. Como control negativo de la reacción (C-) se utilizó una mezcla de reacción sin templado. **B.** Ensayos de restricción con *Aval* para confirmar presencia y sentido de *AtSDH* en clones transformantes resistentes a antibiótico: **1.** Esquema de digestión del vector recombinante con *AtSDH* ligado en sentido; **2.** En el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio se observa la banda de 770 pb esperada para el patrón de digestión en sentido con *Aval*. De los 6 clones evaluados, el clon 3 presenta el patrón deseado. **SD:** ADN plasmidial sin digerir de uno de los clones seleccionado al azar; **PM:** estándar de peso molecular.

## 1.2. Síntesis *in-vitro* de la proteína de fusión His-*AtSDH*.

Siguiendo las instrucciones recomendadas por sus fabricantes se sintetizó la proteína de fusión *in-vitro* His-*AtSDH* mediante el sistema Expressway cell Free y el vector de expresión pEXP5-*AtSDH*, generado previamente. La síntesis de la proteína fue evaluada mediante Western blot usando el anticuerpo comercial Anti-His el cual reconoce el epítipo 6xHis agregado a la secuencia aminoacídica de *AtSDH* en su extremo N-terminal. Mediante esta

metodología fue posible observar una banda de peso molecular poco mayor a los 40 kDa sólo en productos de reacción *in-vitro* de proteínas sintetizadas con el vector de expresión y no así en aquellas reacciones en donde no se incorporó el vector de expresión al proceso de síntesis de proteínas, es decir, reacción *in-vitro* sin síntesis de His-AtSDH (control negativo de reacción). El peso molecular observado mediante western blot para la proteína de fusión coincide con el peso teórico calculado *in-silico* (41,7 kDa; Figura 7) el cual corresponde a la suma de los pesos moleculares teóricos para la proteína AtSDH (39,225 kDa) y el epítipo 6xHis (2,5 kDa). Como control positivo de inmunodetección, se utilizó la proteína recombinante AtSDH-His producida en bacterias (sistema heterólogo de expresión) trabajo que ha sido realizado en forma previa en nuestro laboratorio (Ampuero D, 2012). La presencia de una banda en el control positivo de peso molecular cercano a la observada en la muestra de síntesis *in-vitro*, nos permitió confirmar que la técnica de Western blot había sido realizada correctamente y corrobora la eficacia del sistema *in-vitro* en la síntesis de His-AtSDH.



**Figura 7. Análisis de Western blot del producto de reacción obtenido luego de la síntesis *in-vitro* de la proteína recombinante His-AtSDH.** Mediante la técnica de Western blot anti-His se logró observar una banda cercana a los 42 kDa en el producto de reacción de síntesis *in-vitro*. **C+**, proteína His-AtSDH producida en bacterias (Ampuero, 2012), **C-** producto de reacción de síntesis *in-vitro* sin utilizar vector de expresión. **PM**, Estándar de peso molecular (kDa).

Este resultado nos permitió confirmar que mediante el sistema de expresión seleccionado fue posible transcribir y traducir correctamente la proteína de fusión His-AtSDH.

### 1.3. Mediciones de actividad en productos de reacción de síntesis *in-vitro*.

Una vez confirmada la síntesis de His-AtSDH, un aspecto requerido para lograr caracterizar bioquímicamente la proteína de interés fue evaluar si las condiciones seleccionadas de síntesis *in-vitro* permitían obtener una proteína en conformación nativa y activa.

Para ello, la técnica de zimogramas permite analizar de manera cualitativa y colorimétrica en geles nativos de proteína la actividad de enzimas que en su reacción tengan asociada la liberación de  $H^+$ , como es el caso de enzimas deshidrogenasas. Mediante esta técnica y utilizando condiciones descritas para evaluar enzimas sorbitol deshidrogenasas (De Sousa y col, 2008) se observó un precipitado de color azul en geles nativos revelados utilizando sorbitol como sustrato (Figura 8A). La presencia de este precipitado se observó sólo en la muestra correspondiente al producto de reacción de la síntesis de His-AtSDH *in-vitro* y no así, en muestras de reacción sin síntesis de His-AtSDH (C-). Como control positivo de la reacción se utilizó la caracterizada enzima comercial SDH de oveja, la cual presenta actividad deshidrogenasa con otros polioles además de sorbitol (Lindstad y cols, 1998). Al cargar 2 U de SDH de oveja en geles nativos se logró observar una intensa banda de similares características a la observada en el producto de reacción *in-vitro* de His-AtSDH recombinante, validando de esta manera la técnica utilizada y confirmando actividad SDH de la proteína de interés, His-AtSDH.

Aplicando esta técnica, fueron evaluados otros polioles presentes en Arabidopsis como posibles sustratos de la enzima. Con este fin, se reemplazó el sorbitol en la solución de revelado con la misma concentración de los polioles: xilitol, manitol, glicerol y eritritol (68 mM). Se observó la formación de producto en geles revelados con xilitol como sustrato (Figura 8B) y no así con los otros polioles evaluados (datos no mostrados), indicando que His-AtSDH también presenta actividad xilitol deshidrogenasa.

Como es posible observar en Figura 8, el desplazamiento electroforético de His-AtSDH en condiciones nativas fue similar al desplazamiento de la enzima SDH de oveja (C+) la cual en estas condiciones ha sido descrita con un peso cercano a los 115 kDa. Mediante el uso



de un marcador de peso molecular coloreado, fue posible confirmar el peso descrito en la literatura para la enzima comercial, y un tamaño cercano a 100 kDa para nuestra proteína de interés (datos no mostrados). Este resultado junto al obtenido en la sección anterior nos indican que el peso molecular observado en condiciones nativas para His-AtSDH difiere al peso molecular observado en condiciones denaturantes mediante ensayos de inmunoblot (42 kDa, sección 1.2), lo cual sugiere una conformación multimérica de His-AtSDH.

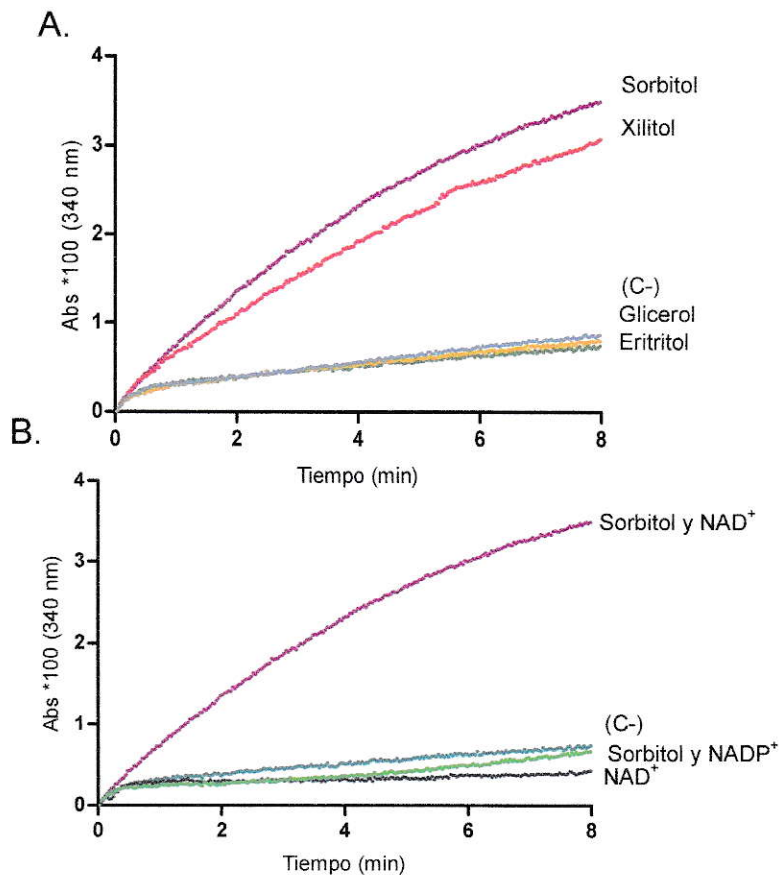


**Figura 8: Análisis de actividad mediante zimogramas del producto de la reacción *in-vitro* de His-AtSDH.** En los gels se observa el precipitado de color azul característico de actividad deshidrogenasa usando como sustratos los polioles sorbitol (A) y xilitol (B). Utilizando manitol, glicerol y eritritol como sustrato no se observó actividad aparente (imágenes no mostradas). Como control positivo (C+) de reacción se utilizó SDH de oveja (2U Sigma, 115 kDa) y como control negativo (C-) producto de reacción *in-vitro* sin síntesis de proteína. Todos los gels nativos fueron cargados con igual concentración de proteínas (10 µg de producto de reacción), incubados con sus respectivos sustratos por 30 minutos y tratados de igual manera en su revelado para visualización colorimétrica. Las imágenes son representativas de lo observado en 3 replicas del experimento.

Como ha sido mencionado en la Introducción (sección\_1.4), las enzimas sorbitol deshidrogenasas oxidan diferentes polioles a sus respectivas cetosas, siendo en general su sustrato preferente el sorbitol. La reacción de oxidación está acoplada en todos los casos a la concomitante reducción del co-sustrato  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ , siendo este producto de la reacción fácilmente cuantificable mediante espectrofotometría siguiendo su tasa de cambio a una absorbancia 340 nm. De esta forma, para confirmar la actividad observada de manera cualitativa en gels nativos, se realizaron mediciones cuantitativas de actividad usando espectrofotometría. Para esto, se midió actividad a partir de mezclas de reacción de igual concentración a las utilizadas para revelar zimogramas de actividad. Como control negativo de reacción se utilizó una mezcla de igual composición, en donde se reemplazó el producto de reacción en la que se indujo la síntesis de His-AtSDH por una reacción en la cual no se indujo la síntesis de la proteína (C-).



En Figura 9 se presentan los registros de absorbancia con respecto al tiempo obtenidos al utilizar los distintos polioles previamente evaluados como sustratos de reacción. En estos gráficos se observó un mayor cambio en la absorbancia al utilizar sorbitol como sustrato, seguido por el poliol xilitol. Al utilizar como sustratos eritritol, manitol y glicerol se observó un pequeño delta de absorbancia, similar al obtenido en el control negativo de reacción. Estos resultados corroboran lo observado en zimogramas indicando que tanto sorbitol como xilitol son sustratos para la proteína recombinante, siendo sorbitol su sustrato preferente, dentro de los 5 polioles evaluados.

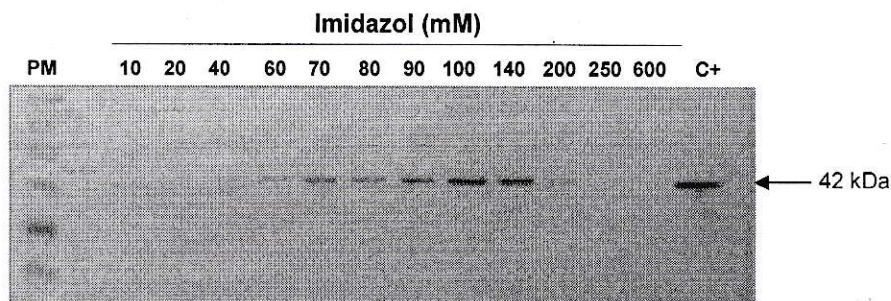


**Figura 9: Mediciones espectrofotométricas a partir de productos de reacción de síntesis *in-vitro*.** Gráficos de Absorbancia (Abs) con respecto al tiempo (min) de mediciones espectrofotométricas a 340 nm utilizando: **A.** Distintos polioles como sustrato **B.** NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> como co-sustrato. El mayor cambio en la absorbancia se observa en productos de reacción *in-vitro* de His-AtSDH usando sorbitol y NAD<sup>+</sup> como sustratos, seguidos por el poliol xilitol. Este registro fue 4 veces menor al utilizar el producto de reacción sin síntesis de proteínas (**C-**). El cambio de Abs. obtenido para los otros polioles evaluados como sustratos, mezclas de reacción sin sorbitol o utilizando NADP<sup>+</sup> como co-sustrato son de igual o menor magnitud que el C-.

Mediante espectrofotometría se realizaron otras mediciones de absorbancia que permitieran confirmar la actividad SDH de His-AtSDH, descartando que ésta se debiera a otros componentes o artificios del sistema de expresión *in-vitro*. Como se observa en Figura 9B el cambio de absorbancia registrado para mezclas de reacción en que no se agregó sorbitol y en mezclas que se utilizó NADP<sup>+</sup> como co-sustrato en reemplazo a NAD<sup>+</sup> es similar al cambio registrado para el control negativo de reacción, indicando que tanto sorbitol como NAD<sup>+</sup> son necesarios y dependientes para actividad SDH, mientras que NADP<sup>+</sup> no es un co-sustrato para la enzima.

#### 1.4. Purificación de His-AtSDH

Para lograr caracterizar bioquímicamente His-AtSDH en sus parámetros cinéticos ( $K_M$ ,  $V_{MAX}$  y  $k_{cat}$ ) fue necesario disponer de un sistema de purificación que permitiera obtener muestras de proteína a un nivel de pureza adecuada, manteniendo su actividad estable en el tiempo. Una vez registrada actividad SDH en productos de síntesis *in-vitro*, se procedió a estandarizar el proceso de purificación de la enzima mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas His-Trap, disponibles comercialmente. En estas columnas, el ión metálico (Ni) inmovilizado en la resina de sepharosa permite retener a proteínas con tag de histidinas en su secuencia, como es el caso de His-AtSDH. Esto se debe a que el aminoácido histidina es capaz de enlazarse con iones metálicos quelados, como el níquel. Esta interacción se ve debilitada al adicionar una concentración adecuada de imidazol en la solución permitiendo eluir la proteína de interés. Para identificar la concentración necesaria de imidazol que permitiera eluir adecuadamente His-AtSDH de la columna, se realizó un proceso de purificación siguiendo las instrucciones recomendadas por sus fabricantes en la cual, la elución de la proteína se llevó a cabo usando un gradiente de imidazol (10-600 mM). Los resultados obtenidos mediante Western blot indican que 200 mM de imidazol son suficientes para eluir gran parte de la proteína recombinante unida a la columna (Figura 10). En futuros ensayos de purificación se optó por utilizar una concentración levemente mayor de imidazol (250 mM) con el fin de asegurar la completa elución de His-AtSDH de la resina.



**Figura 10: Análisis mediante Western blot de la elución de la proteína recombinante His-AtSDH usando distintas concentraciones de imidazol en el proceso de purificación.** Mediante la técnica de Western blot anti-His se logró observar la banda de 42 kDa correspondiente a His-AtSDH en fracciones eluidas con concentraciones de imidazol desde 60 mM hasta 200 mM. Cada carril fue cargado con igual volumen de muestra. C+, producto de reacción de síntesis *in-vitro* de His-AtSDH. PM, Estándar de peso molecular coloreado (kDa).

Las condiciones de síntesis *in-vitro* utilizadas permiten obtener pequeños volúmenes de producto de reacción conteniendo una baja concentración de proteína recombinante. Este hecho trajo como consecuencia la obtención de una proteína purificada mediante columnas HisTrap de baja concentración (~0,007 µg/µl a partir de 300 µl de producto de reacción). Para solucionar este problema se implementó un sistema de purificación alternativo para pequeñas cantidades (sección III 5.4.2), en el cual se utilizaron minicolumnas centrifugables en lugar de las tradicionales columnas empacadas acopladas a un flujo continuo de solvente. Este nuevo sistema de purificación permitió obtener una mayor concentración de proteína purificada, con un valor casi 10 veces mayor a partir de un mismo volumen de producto de reacción *in-vitro* (~0,06 µg/µl).

En primera instancia, el proceso de purificación de His-AtSDH en minicolumnas se realizó utilizando las soluciones recomendadas de manera estándar para purificaciones de proteínas con tag de histidinas (sección III 5.4.1). Mediante esta metodología, se obtuvo una proteína de pureza aceptable (~90%) según cuantificación de densidad de banda por Image J, sin embargo se observó que la actividad registrada una vez eluida la proteína disminuía con el transcurso del tiempo, registrándose su completa inactividad dos horas luego de ser purificada. Con el objetivo de obtener una proteína pura y activa de manera estable por un tiempo suficiente para llevar a cabo los análisis bioquímicos correspondientes a su caracterización, se realizaron una serie de purificaciones utilizando diferentes soluciones, en



las cuales se varió la concentración de sal, el tipo de amortiguador, y se incorporó como agente estabilizador al glicerol (10%), poliol descartado como posible sustrato de AtSDH (sección 1.3). Cada purificación fue realizada con iguales concentraciones de imidazol, estandarizadas previamente y una vez eluida la proteína fue cuantificada su actividad cada una hora mediante espectrofotometría, siendo mantenida la alícuota de proteína a TA entre cada medición. En Tabla VI se indica el detalle de las soluciones utilizadas en 4 purificaciones realizadas independientemente a partir de un mismo volumen de producto de reacción de His-AtSDH *in-vitro* y el tiempo en que se logró detectar actividad SDH sin variación a partir de la primera medición (100% actividad registrada a tiempo 0).

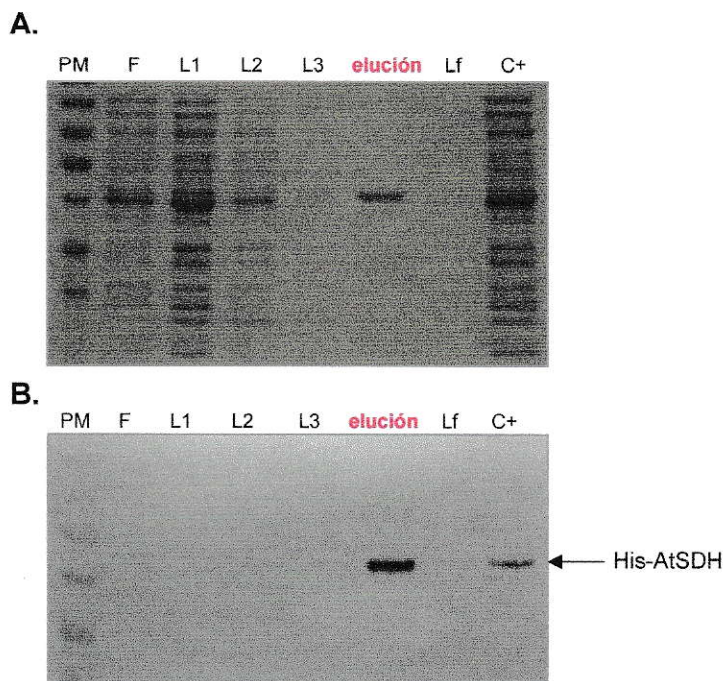
**Tabla VI: Detalle de las soluciones utilizadas para los procesos de purificación de His-AtSDH.** A, B y C son las soluciones utilizadas para resuspender la muestra y equilibrar la columna, lavar la resina y eluir la proteína, respectivamente. El tiempo de estabilidad corresponde al tiempo en que se logró detectar actividad SDH sin variación a partir de la primera medición realizada una vez eluida la proteína de la columna (100% de actividad a tiempo 0).

	Purificación 1	Purificación 2	Purificación 3	Purificación 4
<b>A. Resuspensión y Equilibrio</b>	Sodium Fosfato 10 mM pH 7,4; Imidazol 20 mM; NaCl 100 mM	TrisHCl 10 mM pH 8,2; MgCl 2 mM; Imidazol 10 mM; NaCl 300 mM	TrisHCl 10 mM pH 9,0; Imidazol 10 mM; NaCl 300 mM	TrisHCl 20 mM pH 8,2; Imidazol 10 mM; NaCl 500 mM; <b>Glicerol 10%</b>
<b>B. Lavado</b>	Sodium Fosfato 20 mM pH 7,4; Imidazol 20 mM; NaCl 100 mM	TrisHCl 10 mM pH 8,2; MgCl 2 mM; Imidazol 50 mM; NaCl 300 mM	TrisHCl 10 mM pH 9,0; Imidazol 50 mM; NaCl 300 mM	TrisHCl 20 mM pH 8,2; Imidazol 50 mM; NaCl 500 mM; <b>Glicerol 10%</b>
<b>C. Elución</b>	Sodium Fosfato 20 mM pH 7,4; Imidazol 250 mM; NaCl 100 mM	TrisHCl 10 mM pH 8,2; MgCl 2 mM; Imidazol 250 mM; NaCl 300 mM	TrisHCl 10 mM pH 9,0; Imidazol 250 mM; NaCl 300 mM; <b>Glicerol 10%</b>	TrisHCl 20 mM pH 8,2; Imidazol 250 mM; NaCl 500 mM; <b>Glicerol 10%</b>
<b>Tiempo de estabilidad</b>	1 hora	1 hora	4 horas	9 horas

Como se observa en Tabla VI, el mayor tiempo de estabilidad enzimática se obtuvo al realizar purificaciones con las condiciones descritas para “purificación 4”, en las cuales no se registró cambio en la actividad SDH de His-AtSDH durante 9 horas. En estas condiciones se obtuvo a la proteína recombinante con un 95,2% de pureza en la fracción de elución



analizada mediante geles de proteínas teñidos con azul de Coomassie (cuantificación por Image J), sin ser detectada en otras fracciones recolectadas durante el proceso de purificación (Western blot; Figura 11).



**Figura 11. Purificación de la proteína His-AtSDH mediante mini-columnas.** En el proceso de purificación se utilizaron las condiciones descritas en Tabla VI (purificación 4) las que permitieron obtener una mayor estabilidad enzimática de la proteína recombinante. **A:** Gel SDS-PAGE de proteínas teñido con azul de Coomassie, **B:** Western Blot (anti-His). Los geles se cargaron con las distintas fracciones recolectadas en el proceso de purificación: **F**, frente; **L1-3**, lavados consecutivos de la resina, **elución**, fracción de proteína purificada (250 mM imidazol); **Lf**, lavado final de la resina (600 mM imidazol). En todos los casos se cargó el mismo volumen de muestra. **C+:** producto de reacción de His-AtSDH *in-vitro* (12 µg), **PM:** Estándar de peso molecular coloreado.

### 1.5. Constantes cinéticas de His-AtSDH

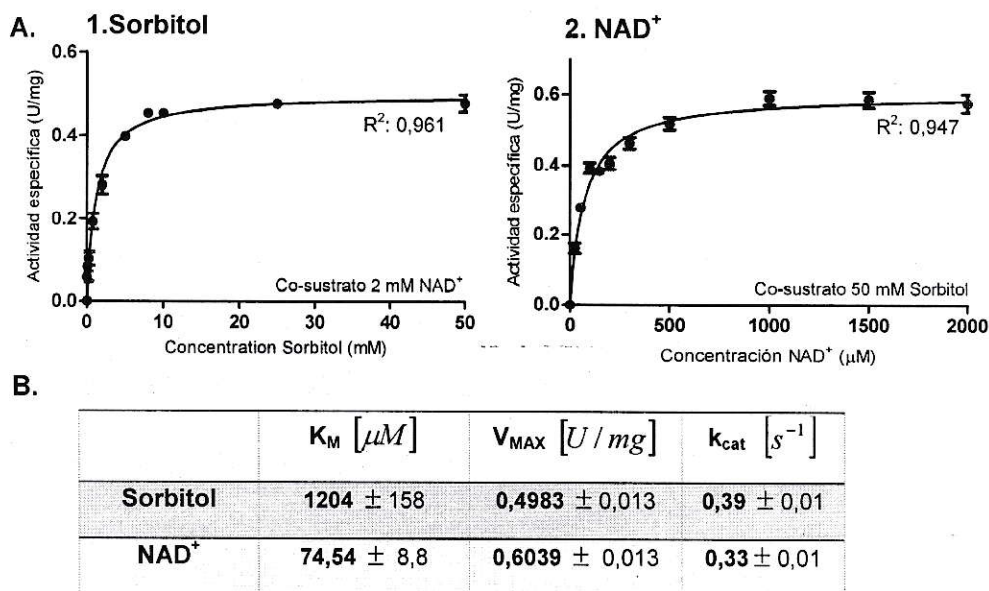
Obtener muestras de proteína purificada con actividad estable fue un paso clave para lograr caracterizar bioquímicamente His-AtSDH, primer objetivo de esta tesis. Para ello, se evaluaron las constantes cinéticas  $K_M$ ,  $V_{MAX}$  y  $k_{cat}$  para los dos principales sustratos asociados con actividad SDH; sorbitol y  $NAD^+$ . Con este fin, se realizaron una serie de mediciones espectrofotométricas en las cuales se utilizaron diferentes concentraciones del sustrato a evaluar, manteniendo el co-sustrato a una concentración constante y saturante en

cada medición. Para el caso de  $\text{NAD}^+$  se observó el curso temporal del incremento de la absorbancia a 340 nm a concentraciones crecientes (0 a 2 mM), manteniendo constante la concentración de sorbitol (50 mM). Para evaluar los parámetros cinéticos con respecto a sorbitol, se registraron los valores de absorbancia utilizando concentraciones del poliol comprendidas entre 0 mM a 50 mM, manteniendo al co-sustrato  $\text{NAD}^+$  a una concentración constante y saturante de 2 mM. Cada medición fue realizada en triplicado, desencadenada por la adición de His-AtSDH a la mezcla de reacción (1,5 ng de proteína).

Para dar mayor robustez a los datos generados, se realizaron mediciones utilizando muestra de la enzima obtenida en procesos de purificación independientes y se verificó su estabilidad a través del monitoreo periódico de su actividad durante el tiempo de realización del experimento (datos no mostrados).

Los valores de absorbancia obtenidos para cada medición fueron registrados y normalizados mediante la fórmula de actividad específica (Ecuación 3, sección III.5.5.2) en la cual la pendiente de la curva se calculó para el intervalo de tiempo entre los 10 y 60 segundos de actividad. Obtenido estos valores, se realizaron gráficos de actividad específica con respecto a la concentración de sustrato evaluada. Como se observa en Figura 12A, las curvas obtenidas presentaron la forma característica de curvas hiperbólicas, cuyo ajuste (cercano a 1 en ambos casos) permitió obtener los valores de la constante de afinidad ( $K_M$ ) y velocidad máxima ( $V_{MAX}$ ) para cada sustrato, correspondientes al modelo cinético de Michaelis-Menten descrito por la Ecuación 4 (sección III.5.6).

Siguiendo la metodología descrita, los valores de  $V_{MAX}$  y  $K_M$  obtenidos para sorbitol fueron 0,498 U/mg y 1,2 mM, respectivamente y 0,6 U/mg y 74,5  $\mu\text{M}$  para  $\text{NAD}^+$  (Figura 12B). Para obtener el parámetro de eficiencia catalítica,  $k_{cat}$ , se utilizó la fórmula descrita en Ecuación 5 (sección III.5.6), la cual corresponde al producto de la  $V_{MAX}$  y el peso molecular teórico de His-AtSDH (41,7 kDa). Los resultados obtenidos de este parámetro fueron 0,39  $\text{s}^{-1}$  para sorbitol y 0,33  $\text{s}^{-1}$  para  $\text{NAD}^+$ .



**Figura 12. Parámetros cinéticos de His-AtSDH.** A: Gráficos de actividad específica (U/mg) con respecto a la concentración de los sustrato: sorbitol y NAD<sup>+</sup>. En ambos casos los valores de actividad específica corresponden al incremento de absorbancia registrado a distintas concentraciones del sustrato a evaluar, manteniendo el co-sustrato a una concentración constante y saturante. Ambas curvas se ajustan de manera cercana a una hipérbola ( $R^2 \sim 1$ ). Las barras representan la desviación estándar de los valores obtenidos,  $n=3$ . B. Parámetros cinéticos  $K_M$ ,  $V_{MAX}$  y  $k_{cat}$  obtenidos para ambos sustratos con su respectiva desviación estándar.

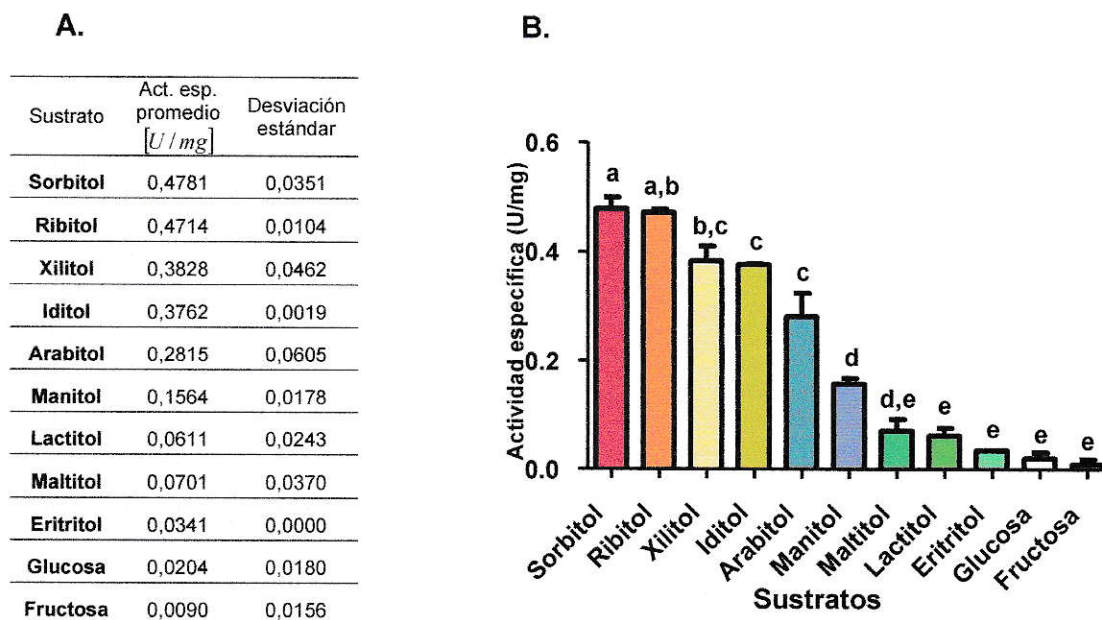
## 1.6 Especificidad de sustrato

Como ha sido mencionado anteriormente, las SDHs caracterizadas presentan actividad deshidrogenasa con otros polioles además de sorbitol. Aunque mediciones en zimogramas y espectrofotométricas utilizando reacciones de síntesis *in-vitro*, indicaron actividad de His-AtSDH con xilitol (sección 1.3); fue de nuestro interés evaluar y cuantificar la especificidad de sustrato de la proteína recombinante a partir de muestras de enzima purificada. De esta manera, se evaluó su especificidad utilizando un rango más amplio de posibles sustratos (presentes en Arabidopsis) y condiciones de actividad ya estandarizadas, con concentraciones saturantes. Para esto, de manera independiente se registró el curso temporal del incremento de la absorbancia a 340 nm utilizando 2 mM de NAD<sup>+</sup> y 50 mM de los sustratos disponibles: sorbitol, ribitol, xilitol, manitol, eritritol, iditol, arabitól, maltitol, lactitol, fructosa y glucosa. Cada medición fue realizada en duplicado a partir de una



muestra purificada de His-AtSDH, corroborando los resultados a través de la medición también en duplicado de una segunda muestra purificada de manera independiente. La estabilidad enzimática fue verificada a través del tiempo en que se realizaron los experimentos para todos los casos.

Obtenidas las curvas de cinética para cada medición, se procedió a calcular la actividad específica de igual manera antes descrita (sección 1.5). Los valores obtenidos fueron promediados e indicaron que la mayor actividad de His-AtSDH se alcanzó con sorbitol, como su sustrato preferente, seguido estrechamente por el poliol ribitol, con el cual se obtuvieron valores de actividad específica muy similares. En la Figura 13, se presentan los resultados obtenidos para todos los sustratos evaluados, los cuales al ser ordenados según los valores de actividad específica calculada, se obtiene: sorbitol (100%), ribitol (98%), xilitol (80%), iditol (78%), arabitol (59%), manitol (32%), maltitol (14%), lactitol (13%), eritritol (7%), glucosa (4%) y finalmente fructosa con 1% de la actividad específica alcanzada con sorbitol.



**Figura 13. Especificidad de sustrato de His-AtSDH.** A. Valores promedio de actividad específica (Act. esp. U/mg) obtenidos de 4 mediciones realizadas usando 2 mM de  $\text{NAD}^+$  y 50 mM de sustrato. En la tabla también se indica la desviación estándar de los datos. B. Grafico de Act. esp. con respecto al sustrato utilizado en las mediciones, en los cuales se observa con mayor claridad la especificidad de sustrato de la enzima en estudio. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los datos, obtenido mediante análisis estadístico utilizando ANOVA de una vía y Bonferroni como post-test ( $p < 0.05$ ).



Con los resultados obtenidos se cumplió el primer objetivo propuesto en este trabajo de tesis, al determinar los parámetros cinéticos de His-AtSDH con respecto a sorbitol y la preferencia de sustrato de la enzima purificada.

## 2. IDENTIFICACIÓN Y ANALISIS DE DE LÍNEAS MUTANTES INSERCIONALES HOMOCIGOTAS EN *AtSDH* DE ARABIDOPSIS

Una vez identificada actividad deshidrogenasa de la proteína recombinante His-AtSDH con sorbitol y otros polioles como sustratos, fue de nuestro interés lograr identificar cual es el rol fisiológico de esta proteína en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Para esto, fueron seleccionadas tres líneas mutantes insercionales de la colección SALK, en las cuales se predice la inserción de un ADN-T de 4,5 kb en la región transcrita de *AtSDH*, específicamente en la región 5'UTR, exón 3 y exón 5 del locus, líneas que hemos llamado *sdh1-3*, *sdh1-1* y *sdh1-4*, respectivamente. Se predice que una inserción de ADN foránea de tal magnitud disminuiría los niveles de transcrito de este gen.

Debido a que la información disponible de estas líneas sólo *predice* la ubicación del ADN-T, la cual puede estar ubicada hasta 300 pb río abajo de la inserción (<http://arabidopsis.info>), fue necesario en primera instancia verificar la presencia y precisa ubicación del inserto en *AtSDH*. Para esto, se realizaron evaluaciones moleculares mediante PCR siguiendo el protocolo descrito en <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html> y utilizando partidores específicamente diseñados para hibridar con regiones del gen y el inserto (ADN-T; Figura 14A).

La metodología utilizada para llevar a cabo el análisis molecular, llamado genotipificación, se basa en el producto de amplificación de dos reacciones de PCR realizadas de manera independiente: una primera reacción, que permite amplificar el gen o un fragmento de éste y una segunda reacción, que permite amplificar un fragmento que corresponde a parte del gen y del inserto, presente sólo en líneas insercionales. Mediante este análisis, reacciones de PCR en las que se utiliza ADNg de plantas silvestres como templado, se espera observar sólo un amplificado correspondiente a parte del gen (primera reacción descrita), mientras que en líneas insercionales es posible observar dos fenómenos. Un primer caso corresponde a líneas insercionales heterocigotas en las cuales la inserción del ADN-T se encuentra sólo en uno de los dos alelos del genoma de *Arabidopsis*, por lo cual se esperaba observar tanto el producto de amplificación correspondiente a parte del gen (debido al alelo

que no presenta inserción) como también el amplificado correspondiente a parte del gen y el inserto (alelo con inserción). El segundo patrón de amplificado correspondiente a líneas homocigotas, con la inserción en sus dos alelos, se espera observar sólo el producto de amplificación correspondiente a parte del gen y del inserto.

Siguiendo esta metodología, el análisis molecular de las líneas adquiridas se llevó a cabo utilizando como templado el ADN<sub>g</sub> extraído a partir de hojas rosetas de plántulas silvestres (WT, control) y de 10 plántulas independientes de cada línea insercional crecidas en medio hidropónico durante 15 días (sección III 6.2.2). Una vez confirmada la calidad del ADN<sub>g</sub> obtenido en todas las muestras (sección III.3.2), se realizaron las 2 reacciones de PCR descritas previamente.

En el caso de plantas *sdh1-3*, en las cuales se predice la inserción del ADN-T en la región 5'UTR de *AtSDH*, se utilizaron los partidores específicos 1 y 2 para obtener el fragmento correspondiente a parte del gen, los cuales permiten amplificar parte del promotor y de la región 5' UTR de *AtSDH* con un tamaño esperado de ~0,7 kb. Para amplificar el fragmento "gen-inserto" correspondiente a la segunda reacción de PCR se utilizaron los partidores 1 y Lb1.3 indicados en la Figura 14 con los cuales se esperó un tamaño de amplificado de ~0,5 kb, si la ubicación del inserto era la predicha por la base de datos. Como era esperado, en líneas silvestres de *Arabidopsis* (WT) solo se observó la banda de 0,7 kb como producto de PCR, mientras que los resultados de líneas insercionales indicó que de 10 plántulas evaluadas, 4 de ellas presentaron el patrón de amplificado correspondiente a líneas homocigotas (producto de PCR de 500 pb) y el resto de las plantas evaluadas presentó el amplificado descrito para plantas silvestres.

Para plantas *sdh1-1*, con probable inserción en el exón 3 de *AtSDH*, se utilizaron los partidores 3 y 4 para obtener el fragmento "gen", los cuales permiten amplificar el marco de lectura completo de *AtSDH* con un tamaño esperado de 1,5 kb. Para amplificar el fragmento "gen-inserto" se utilizaron los partidores Lb1.3 y 4 con los cuales, si la ubicación del ADN-T era la predicha, se esperó un tamaño de amplificado de aproximadamente 0,9 kb (Figura 14B). Los resultados indicaron que la ubicación de la inserción en plantas *sdh1-1* era la descrita, al observar la banda de ~0,9 kb en líneas insercionales, de las cuales 2 plantas

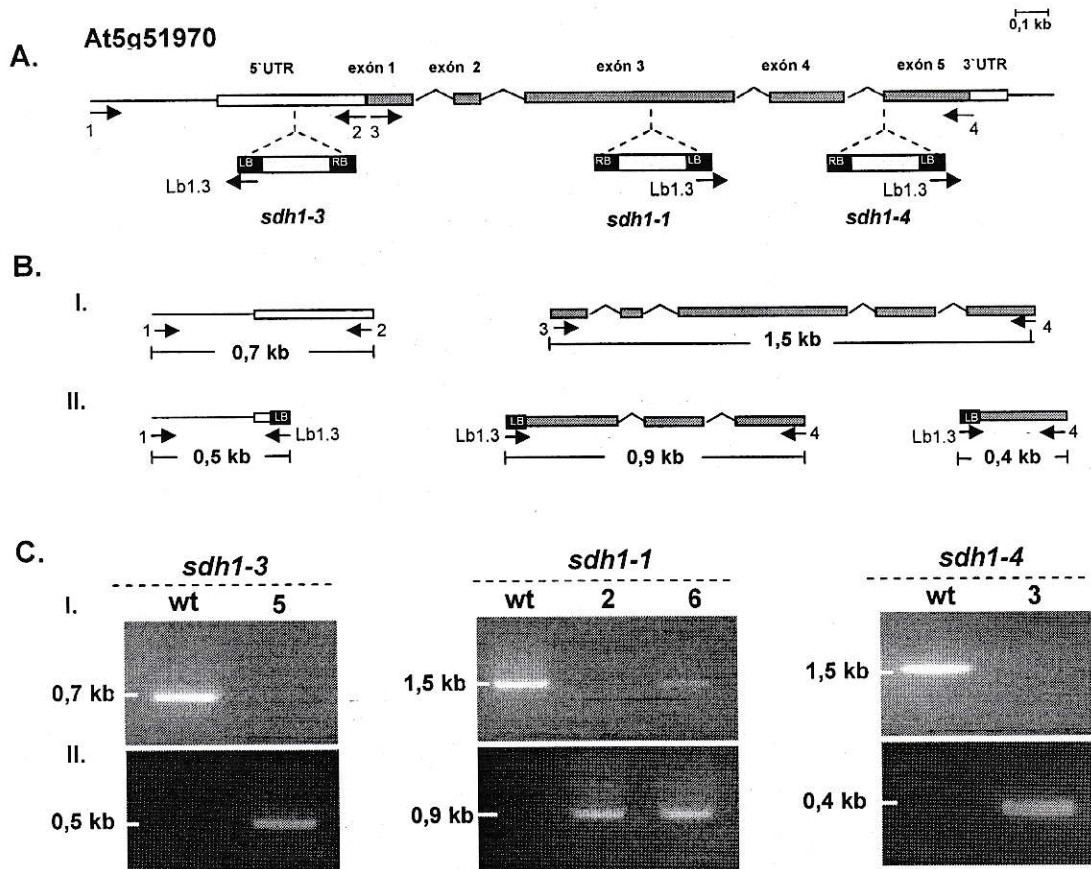
presentaron el amplificado esperado para líneas homocigotas, 1 planta el patrón descrito para heterocigotas, mientras que las 7 restantes correspondieron a líneas silvestres, sin inserción.

Con respecto a la tercera línea, *sdh1-4*, con probable inserción en el quinto exón de *AtSDH* se utilizaron combinaciones de partidores de igual manera a la descrita para líneas *sdh1-1*. En este caso sin embargo, se esperó un amplificado de ~0,4 kb para el fragmento correspondiente a parte del gen y del inserto, considerando la inserción descrita (Figura 14B). De la evaluación realizada se obtuvo que 4 plantas de las 10 analizadas presentaron el amplificado correspondiente a líneas homocigotas.

Como es posible observar, los resultados obtenidos en la amplificación del fragmento "gen-inserto" en las tres líneas analizadas permitió obtener un amplificado del tamaño esperado para la ubicación del ADN-T predicha en la base de datos para cada caso, confirmando de esta manera que la inserción en las líneas *sdh1-3*, *sdh1-1* y *sdh1-4* se encuentra posicionada en las regiones 5' UTR, exón 3 y exón 5 de la secuencia de *AtSDH*, respectivamente.

Para identificar la ubicación exacta, los distintos fragmentos "gen-inserto" fueron purificados desde geles de agarosa y ligados a vectores de clonación de manera independiente (sección III 6.1.1). El resultado de la secuenciación del ADN plasmidial obtenido de bacterias transformadas con la mezcla de ligación, y su posterior análisis indicó que en líneas *sdh1-3*, *sdh1-1* y *sdh1-4* la ubicación del ADN-T se encuentra en la secuencia de *AtSDH* específicamente en los nucleótidos -250, 1280 y 1688 respectivamente, tomando como referencia +1, el sitio de inicio de la traducción del gen. Los resultados de secuenciación permitieron verificar y corroborar la ubicación del ADN-T en las tres líneas mutantes analizadas, previamente confirmada mediante genotipificación.





**Figura 14. Genotipificación de plantas *sdh*.** **A:** Esquema representativo de la ubicación del ADN-T para líneas insercionales *sdh1-1*, *sdh1-3* y *sdh1-4*, en el cual se indica la ubicación de los partidores utilizados para la genotipificación de las distintas líneas analizadas. Los partidores designados con los números 1, 2, 3 y 4 corresponden a los partidores descritos en Tabla II con los nombres: pAtSDH-F, pAtSDH-R, AtSDH-F y AtSDH-R, respectivamente. **B:** Esquema representativo de los amplificadores esperados para las dos reacciones de PCR realizadas para cada línea insercional mediante genotipificación, I. producto esperado en kb para la amplificación del fragmento "gen"; II. Producto esperado (kb) del fragmento "gen-inserto". Para ambos casos, los tamaños esperados se obtienen si la ubicación del ADN-T predicha en la base de datos es la correcta. **C.** Geles de agarosa representativos de los productos de PCR obtenidos luego del análisis de 10 plantas para cada línea: I. amplificado correspondiente al fragmento gen; II. Producto de PCR correspondiente al fragmento "gen-inserto" presente sólo en líneas mutantes. Líneas 5, 2 y 3 presentan el patrón de amplificado de líneas homocigotas, mientras que línea 6 (*sdh1-1*) corresponde a una línea heterocigota.

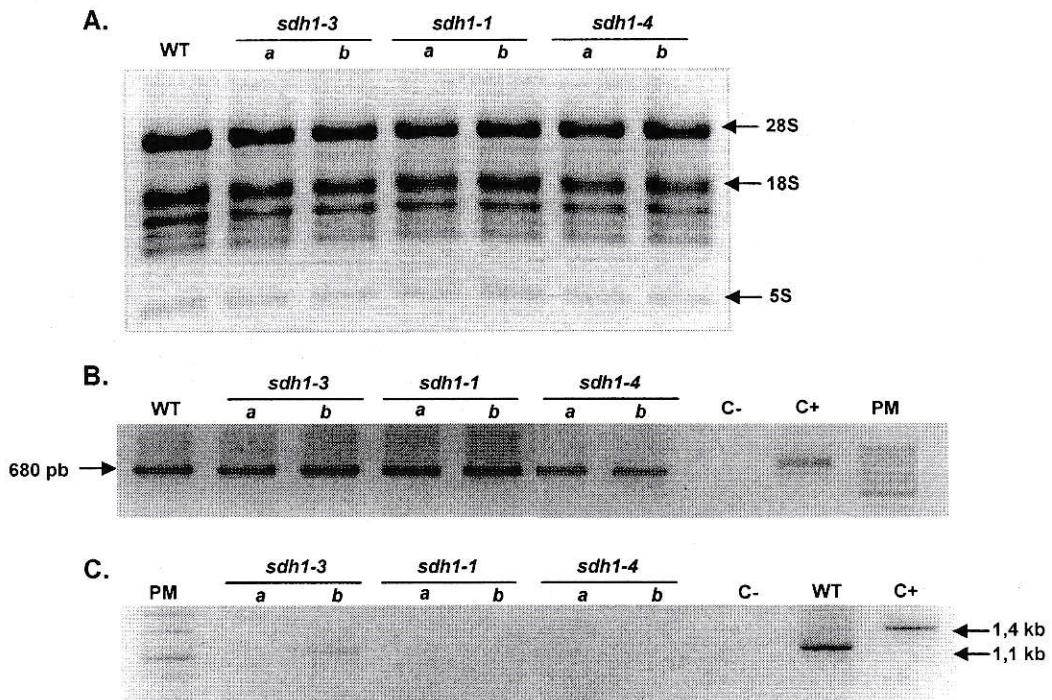
Una vez identificada la posición del inserto, se corroboró la homocigocis de las plantas seleccionadas mediante la genotipificación de su progenie. Para esto, se continuó la propagación en medio hidropónico de aquellas plantas identificadas como homocigotas para cada línea mutante, hasta lograr recolectar sus semillas (12 semanas, sección III 6.2.2). Las semillas obtenidas de cada planta fueron sembradas en las mismas condiciones descritas y una vez que las hojas rosetas se desarrollaron lo suficiente (15 días) se extrajo ADNg, el

cual fue evaluado mediante PCR, utilizando las mismas reacciones detalladas anteriormente (método de genotipificación). Se evaluaron 8-10 plántulas de manera independiente para cada mutante homocigota y fueron seleccionadas aquellas líneas en que toda su descendencia (progenie; T2) presentó el patrón de amplificación correspondiente a homocigocis.

Confirmada la homocigocis y ubicación del inserto en las tres líneas *sdh-*, fue nuestro propósito evaluar los niveles del transcrito de *AtSDH* presente en cada una de ellas con el fin de identificar aquellas líneas en que la expresión de ARNm fuese prácticamente nula. Para esto, en un primer análisis se realizaron reacciones de RT-PCR convencional y luego para cuantificar los niveles de ARNm se llevaron a cabo reacciones de PCR en tiempo real. Para ambas metodologías realizadas fue fundamental extraer muestras de ARN de calidad e integridad adecuadas para llevar a cabo la síntesis de ADNc en igual concentración para todas las muestras analizadas.

Todas las extracciones de ARN fueron realizadas a partir de 10 plántulas crecidas en condiciones *in-vitro* durante 8 días, de líneas insercionales y plantas silvestres de *Arabidopsis* (sección III 3.1.2). Por electroforesis desnaturante, se observó el patrón de bandas correspondientes a ARN ribosomal (Figura 15A) en todas las muestras obtenidas, y mediante espectrofotometría, se determinó que los ARNs eran de alta pureza y concentración ( $A_{260}/A_{280} \sim 2,0$ ; 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Todas las muestras de ARN fueron tratadas con DNAsas (sección III 3.4.2) con el fin de descartar posibles remanentes de ADNg que pudiesen interferir con los resultados. Una vez obtenido el ADNc de cada muestra, se amplificó con éxito un fragmento de 680 pb correspondiente al ADNc del gen de expresión constitutiva *actina* (Figura 15B; Tabla III). Mediante esta amplificación se confirmó la integridad del ADNc generado y se verificó que no existía contaminación con trazas de ADNg ya que en muestras con remanentes, también es posible observar un amplificado de mayor tamaño ( $\sim 800$  pb, C+ en Figura 15) debido a la presencia de intrones en la secuencia amplificada de *actina*. Luego de verificar la calidad de las muestras obtenidas, se amplificó mediante PCR el ADNc de *AtSDH* utilizando partidores específicos (*AtSDH-F* y *AtSDH-R*, Tabla II) y condiciones de reacción previamente estandarizadas (Tabla III).





**Figura 15. Análisis molecular mediante RT-PCR convencional de líneas insercionales en *AtSDH*:** **A.** Gel de agarosa en condiciones desnaturalantes en donde se observa la integridad de las muestras de ARN extraído al evidenciar el patrón característico de ARN ribosomal (28S, 18S y 5S). **B.** gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en donde se observa una banda de tamaño cercano a los 0,8 kb correspondiente al ADNc de *actina* amplificado por RT-PCR en todas las muestras de ADNc sintetizado. **C.** Amplificación del marco de lectura completo de *AtSDH* usando 40 ciclos de amplificación en reacciones de PCR: en gels de agarosa se observa producto de amplificado correspondiente al ADNc de *AtSDH* (1095 pb) sólo en plantas *sdh1-3* (a y b; banda muy tenue) y en WT. En todos los casos **C+** y **C-** correspondieron respectivamente a ADNc de plantas WT y agua, utilizado como templado. **PM**, peso molecular (100 pb panel B y 1 kb panel C).

Como era esperado en muestras de ADNc obtenido de plantas de *Arabidopsis silvestres* se observó un amplificado de ~1,1 kb correspondiente al marco de lectura completo del gen sin intrones. En muestras de ADNc obtenido de líneas mutantes no se observó amplificado correspondiente a *AtSDH* al realizar reacciones de PCR con 33 ciclos de amplificación. Sin embargo, cuando las reacciones de amplificación se realizaron con 40 ciclos de extensión se observó una tenue banda de ~1,1 kb sólo en muestras de ADNc obtenidas de plantas *sdh1-3* (inserción en región 5'ÚTR). Como se puede observar en Figura 15C, la banda observada en *sdh1-3* es de una intensidad mucho menor a la observada en plantas silvestres (~90% menor intensidad, cuantificación por Image J). Los resultados obtenidos indican que existe una menor expresión del transcrito de *AtSDH* en líneas mutantes

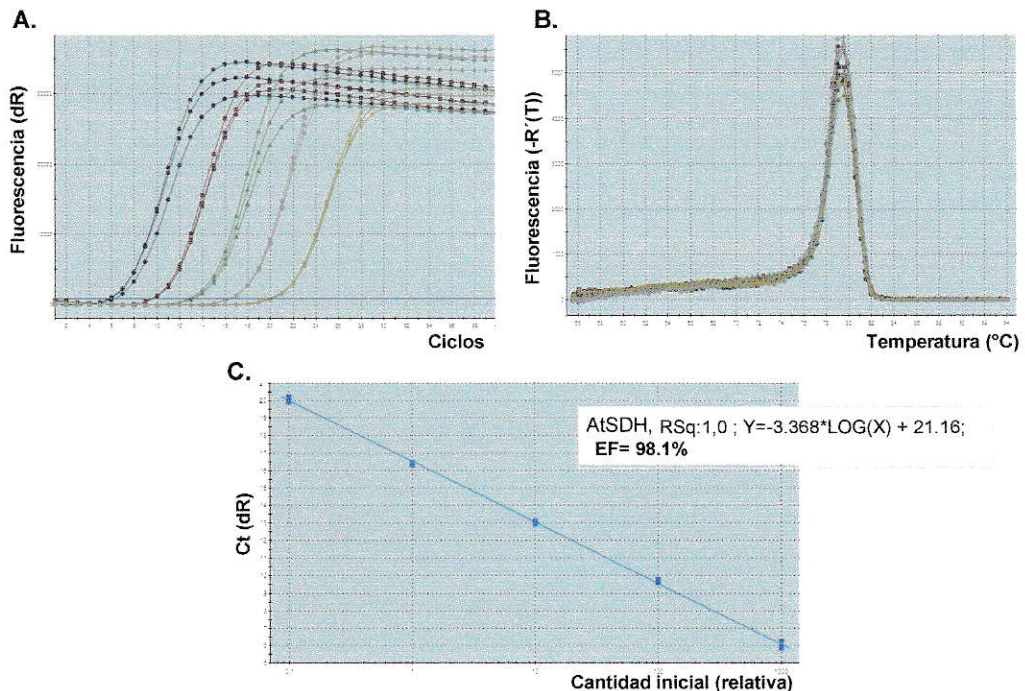
insercionales, siendo posiblemente nula en líneas *sdh1-1* y *sdh1-4*, al no presentar amplificado del transcrito.

Con el objetivo de verificar los resultados obtenidos mediante RT-PCR convencional, se realizaron reacciones de PCR en tiempo real para cuantificar de manera certera los niveles relativos de transcrito en las tres líneas insercionales analizadas. Para llevar a cabo esta técnica fue necesario en primera instancia evaluar la eficiencia y la especificidad de los partidores diseñados para la reacción. Para amplificar un fragmento del gen en estudio, se utilizaron partidores específicos diseñados en el extremo 3' de la secuencia (Q-AtSDH-F y Q-AtSDH-R; Tabla II). Como se describe en sección III 3.3.1, y con el objetivo de no interferir en los resultados obtenidos de expresión relativa, estos partidores permiten amplificar un fragmento de 94 pb de la región ubicada río abajo del sitio previamente identificado para la inserción del ADN-T en plantas *sdh1-4*. Con el objetivo de asegurar la especificidad de estos partidores, el producto de PCR obtenido utilizando como templado ADNc de plantas silvestres fue ligado a vectores de clonación y secuenciado; los resultados indicaron un 100% de identidad con la secuencia esperada de amplificación. Para calcular la eficiencia de estos partidores se realizaron cinco diluciones seriadas (1/100, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000 1/1.000.000) del fragmento amplificado previamente por PCR (utilizado para la clonación). En la Figura 16 se ilustran las curvas de amplificación de cada una de las cinco diluciones seriadas realizadas (panel A) y la curva de disociación obtenida, correspondiente a los productos de amplificación de cada dilución (panel B). Como es posible observar, las curvas de amplificación presentaron la forma sigmoidea característica de este tipo de experimentos, mientras que la curva de disociación presentó un único pico, confirmando la especificidad de los partidores diseñados. En base a las curvas de amplificación en diluciones seriadas se definió la eficiencia de amplificación del par de partidores. Para ello se graficó el Ct (ciclo en el cual la fluorescencia sobrepasa el nivel basal) obtenido para cada dilución. En el panel C de la Figura 16 se ilustra el gráfico resultante de este análisis, con cuya pendiente se calculó la eficiencia del par de partidores utilizados mediante ecuación 1 (sección III 3.4.3). El resultado indicó una eficiencia de



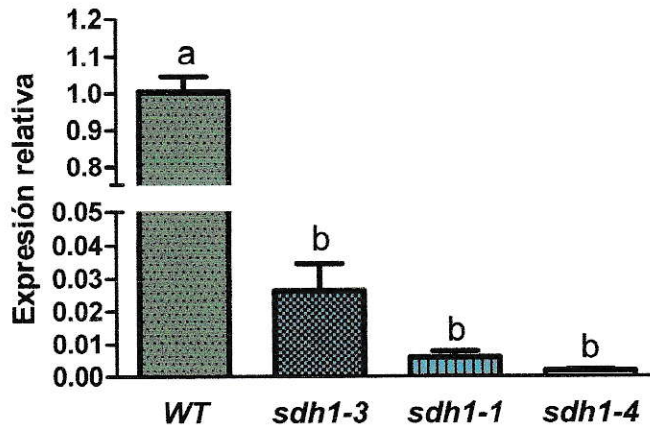
98,1% o 1,981, valor que se encuentra en el rango teórico aceptado (1,6-2,1) según lo descrito por Bustin (2004).

Para llevar a cabo la cuantificación de los niveles relativos de transcrito mediante RT-PCR en tiempo real se requiere amplificar de manera paralela genes cuya expresión no varíe en la especie analizada, llamados genes de mantenimiento o housekeeping. En este trabajo se utilizaron los genes *Ubq10* y *26410* descritos por Czechowsky y cols (2005) como adecuados genes de mantenimiento en *Arabidopsis*. Los pares de partidores adquiridos para amplificar cada gen (Tabla II) fueron evaluados de la misma manera antes descrita, obteniendo una eficiencia de amplificación de 96,1% y 93,6%, respectivamente.



**Figura 16. Eficiencia de los partidores utilizados para amplificar *AtSDH* en experimentos de PCR en tiempo real:** **A.** Curvas de la amplificación del fragmento de 94 pb de *AtSDH*. En azul se ilustran tres curvas (réplicas técnicas) para la dilución 1/100 del fragmento. Las curvas sucesivas hacia la derecha corresponden a réplicas técnicas de las siguientes diluciones seriadas (1/1000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000). La línea horizontal corresponde al nivel de fluorescencia basal. **B.** Se ilustra la curva de disociación de los productos de amplificación de cada dilución del PCR; se observa un único pico a una temperatura ~79°C. **C.** Curva estándar de eficiencia de los partidores entregada por el programa MxPro. En este panel, se indica la recta obtenida del ajuste con un  $R^2 \sim 1$  y con un valor de eficiencia (EF) para los partidores de 98,1%. Todas las imágenes fueron obtenidas del programa utilizado para el análisis de datos de experimento de PCR en tiempo real (software MxPro). **Ct:** ciclo umbral en el cual se sobrepasa la fluorescencia basal.

Luego de obtener las eficiencias de cada par de partidores, se realizaron los experimentos de PCR en tiempo real para cuantificar la abundancia relativa del RNAm de *AtSDH* en plántulas silvestres y líneas insercionales de *Arabidopsis*, utilizando las muestras de ADNc obtenidas previamente. Los resultados obtenidos arrojaron valores promedios de Ct muy similares entre las muestras para los distintos genes de mantenimiento utilizados: *Ubq10* ( $14,8 \pm 0,43$ ) y *26410* ( $22 \pm 0,54$ ). Estos valores corroboran los niveles de transcrito constante de estos genes en *Arabidopsis* (validando su utilización como genes normalizadores) además de verificar que la cantidad de ADNc presente en todas las muestras analizadas era similar. Como era esperado, al evaluar los niveles de transcrito de *AtSDH* los valores promedio de Ct de muestras correspondientes a plantas silvestres ( $18 \pm 0,06$ ) fueron mucho menores a los obtenidos en líneas insercionales ( $24,9 \pm 1,2$ ), indicando una menor expresión del transcrito en estas últimas muestras. En todos los casos no se registró amplificación en los controles negativos. Obtenidos los valores de Ct para cada grupo de datos, estos fueron trasladados a una tabla en hoja de cálculo para aplicar la fórmula descrita por Pfaffl (Ecuación 2, sección III 3.4.3). Los resultados indicaron que los niveles de expresión relativa de *AtSDH* en plantas *sdh1-3*, *sdh1-1* y *sdh1-4* eran respectivamente, cercano al 3%, 1% y 0,5% con respecto a los niveles de transcrito registrado en plantas silvestres (WT, 100%), utilizando el gen normalizador *26410* (Figura 17). Estos resultados fueron validados al obtener valores muy similares de expresión relativa al utilizar *Ubq10* como normalizador y al realizar una réplica biológica del experimento con iguales valores en los niveles de expresión (datos no mostrados). Los resultados obtenidos nos permiten dar por finalizado el objetivo específico N°3 al determinar los niveles de expresión del transcrito *AtSDH* en líneas mutantes insercionales de *Arabidopsis* homocigotas en el gen en estudio.



**Figura 17. Análisis molecular mediante PCR en tiempo real de líneas insercionales en *AtSDH*:** El gráfico muestra los resultados de la expresión relativa de los niveles de transcrito de *AtSDH* en líneas mutantes homocigotas (*sdh1-3*, *sdh1-1* y *sdh1-4*) y plantas silvestres de *Arabidopsis* (8 días). Para cada inserción se evaluaron dos líneas homocigotas identificadas de manera independiente (a y b) con mediciones realizadas en duplicado técnico. Los valores corresponden a la media entre 4 determinaciones usando los niveles de transcrito del gen 26410 como normalizador. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los niveles de expresión relativa, determinados por el test de una vía ANOVA y por el post-test de Bonferroni ( $p < 0.05$ ).



### 3. ANALISIS FENOTIPICO DE LÍNEAS MUTANTES INSERCIONALES

El último propósito de esta tesis fue determinar en qué proceso fisiológico está involucrada la actividad SDH de *AtSDH*. En los primeros análisis fenotípicos realizados se evaluaron las tres líneas mutante homocigotas identificadas (objetivos 2) en condiciones normales de crecimiento (en medio hidropónico y condiciones *in-vitro*). Este análisis morfométrico fue de tipo cualitativo. Se observó que el desarrollo, tamaño, forma y número de hojas rosetas y caulinares en líneas mutantes, comparando con lo observado con el desarrollo normal de una planta silvestre, no presentaba diferencias significativas. De igual manera, tanto el desarrollo de otros órganos (raíces, tallos y flores) y características propias como el tiempo de floración no se observaron afectadas en líneas mutantes, carentes del transcrito de *AtSDH* (datos no mostrados).

Debido a que no se observaron diferencias entre líneas mutantes y silvestres de *Arabidopsis* en condiciones estándar de crecimiento, se prosigió su evaluación en condiciones de estrés. Como fue mencionado en la introducción, el transporte de sorbitol y otros polioles contribuye a la capacidad de las plantas para resistir a presiones ambientales. El sorbitol, en particular, debido a su carácter de osmolito ha sido relacionado con varios tipos de estrés abiótico, como es frío, salinidad, estrés osmótico y sequía. Por esta razón, fue de nuestro interés evaluar los niveles de transcrito de *AtSDH* en plantas silvestres sometidas a estrés por frío, con el fin de observar cambios a nivel de ARNm, como antecedente para futuros estudios, además de evaluar como respondían líneas mutantes a distintos tipos de estrés abióticos (osmótico, salino, en medios con sorbitol y estrés por sequía) como será descrito a continuación.

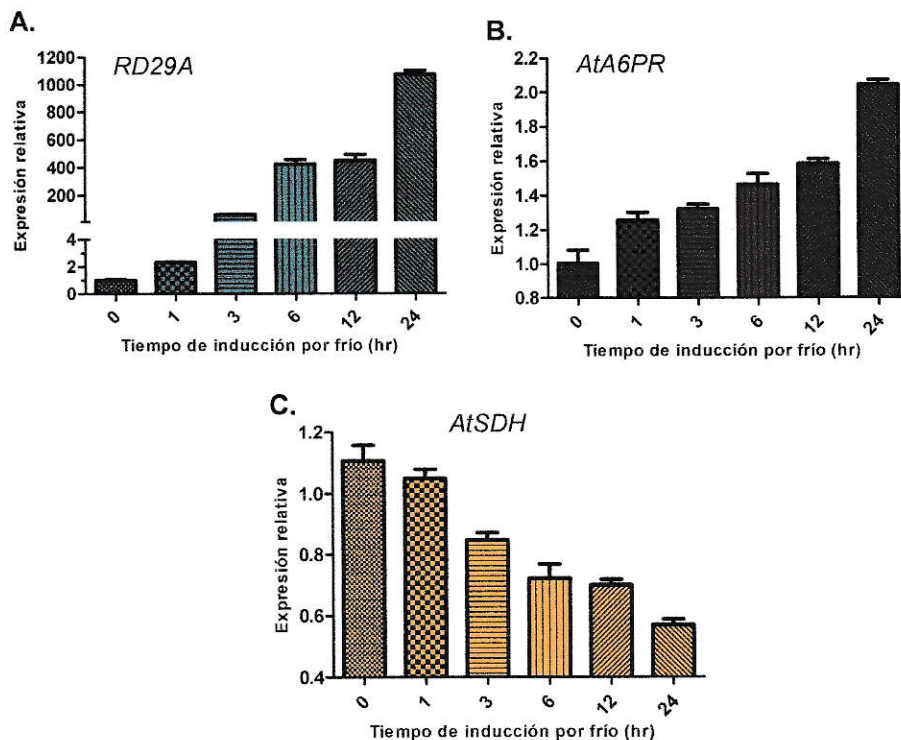
#### 3.1. Estrés por frío

Se evaluó la expresión de *AtSDH* en tratamientos de inducción por frío en plantas silvestres de *Arabidopsis*. Para esto se realizaron experimentos de PCR en tiempo real de muestras de ARN extraídos de plantas silvestres sometidas a una temperatura de 4 °C durante 0, 1, 3, 6, 12, y 24 h en condiciones de fotoperíodo neutro (más detalles en sección



III.6.3.1). Para llevar una evaluación más completa, se analizó en forma paralela la expresión relativa de un gen involucrado directamente en la síntesis de sorbitol, *aldosa 6 fosfato reductasa*, previamente identificado en el genoma de *Arabidopsis* (*AtA6PR*, locus At2g21250, Zamudio, 2010).

La cuantificación de los niveles de expresión relativa de los dos genes analizados mediante PCR en tiempo real fue realizado utilizando como calibrador el grupo de plantas evaluadas a tiempo 0 de inducción del estrés y como normalizador *Ubq10*, (objetivo 2). Como control de inducción del estrés, se evaluaron los niveles de transcrito de *RD29A*, debido a que su expresión aumenta drásticamente en el curso del tiempo en plantas sometidas a frío (Cuevas y cols, 2008). El resto de la metodología usada para llevar a cabo el experimento de RT-PCR cuantitativo fue similar a la detallada en objetivo 2 (para el análisis de líneas mutantes).



**Figura 18. Niveles de expresión relativa de *AtSDH* y *AtA6PR* en estrés por frío.** Los gráficos muestran los resultados de la expresión relativa de los niveles de transcrito de *RD29A* (panel A, control positivo), *AtA6PR* (B, síntesis de sorbitol) y *AtSDH* (C, catálisis de sorbitol). Las muestras correspondieron a plantas silvestres de *Arabidopsis* mantenidas a 4 °C durante 0, 1, 3, 6, 12 y 24 horas. Los valores corresponden a la media entre 3 replicas técnicas y su error asociado (SE) usando los niveles de transcrito del gen *Ubq10* como normalizador.

Los resultados indican que las condiciones de inducción por frío fueron las adecuadas, al observar el aumento drástico de los niveles de transcrito de *RD29A* (~1000 veces su expresión basal) en el período de tiempo evaluado (Figura 18A). Con respecto a la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de sorbitol, se observó que los niveles del transcrito de *AtSDH* disminuyen a la mitad de su expresión basal (condiciones control, T0) en tratamientos de estrés por frío, mientras que los niveles de ARNm correspondientes a *AtA6PR* aumentaron al doble de su expresión a T0 durante el periodo de tiempo evaluado (Figura 18). El cambio observado en la expresión de *AtSDH* en condiciones de estrés por frío, indica que posiblemente este gen esté involucrado en algún proceso fisiológico que permita la respuesta de las plantas a tales condiciones, como la adaptación.

### 3.2. Estrés osmótico y salino

Para identificar un posible rol de *AtSDH* en procesos fisiológicos involucrados con estrés abiótico, del tipo salino y osmótico, se evaluó el crecimiento *in-vitro* de líneas mutantes insercionales y plantas silvestres de *Arabidopsis* en medios suplementados con sal (NaCl, estrés salino) y manitol (agente osmótico) a 3 diferentes concentraciones: 100 mM, 150 mM y 200 mM. Tanto las condiciones como concentraciones analizadas han sido generalmente utilizadas para evaluar la tolerancia de las plantas sometidas a estos dos tipos de estrés (Huh y cols, 2002; Munns, 2002; Xiong y cols, 2011). Para los distintos tratamientos, se observó y comparó el crecimiento de las 3 líneas mutantes con respecto al desarrollo de plantas silvestres, transcurridos 7 y 14 días desde su traspasó a estos medios (más detalles en sección III.6.3.2). Nuestras observaciones se focalizaron principalmente al tamaño y peso de hojas rosetas junto con la longitud y desarrollo de la raíz principal de las plantas sometidas a estos dos tipos de estrés. En plantas silvestres crecidas en medios suplementados con 100 mM de NaCl y manitol se observó un retardo en el crecimiento tanto de la parte radicular como aérea de las plantas en comparación al crecimiento registrado en medios sin suplemento. En el caso de medios suplementados con manitol en los cuales

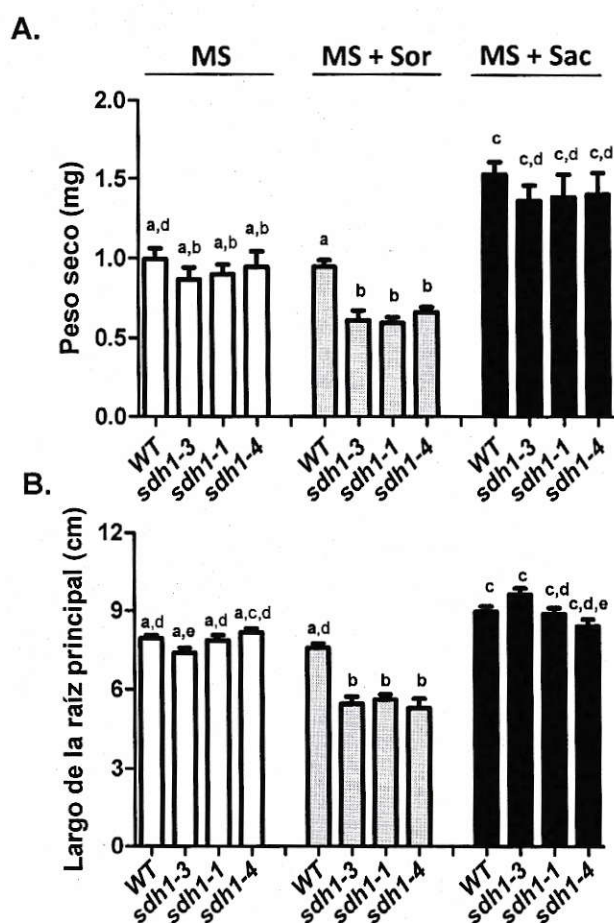
fueron sembradas directamente las semillas, se observó además una disminución en la tasa de germinación (~90%). El retardo en el crecimiento observado fue más severo al aumentar la concentración de sal y manitol, provocando un daño evidente a concentraciones de 200 mM, en donde se observó además la disminución en la pigmentación de hojas rosetas (clorosis) en el caso de estrés salino. Las tres líneas mutantes insercionales presentaron el mismo fenotipo descrito en plantas silvestres, sin observarse diferencias significativas en los análisis morfométricos realizados (datos no mostrados). Estas observaciones nos sugieren que AtSDH no estaría involucrado en procesos fisiológicos relacionados con estrés salino ni osmótico bajo estas condiciones de análisis.

### **3.3. Crecimiento de líneas mutantes en medios suplementados con sorbitol.**

Dado que sorbitol es el sustrato preferente para actividad deshidrogenasa de AtSDH (sección 1), fue de nuestro interés evaluar si existían diferencias en el desarrollo de líneas carentes de transcrito con respecto a plantas silvestres de *Arabidopsis* en medios suplementados con este poliol. Para el análisis se sembraron directamente las distintas líneas insercionales, incluyendo plantas WT, en medios suplementados con 30 mM de sorbitol. Las observaciones realizadas se focalizaron principalmente en el peso de hojas rosetas (fresco y seco), la longitud de la raíz principal y la densidad de raíces laterales que desarrollaron las plantas en estas condiciones de crecimiento. Según lo descrito por Laby y cols. (2000) a concentraciones bajas de poliol, como es el caso de 30 mM, el crecimiento de plantas silvestres no se ve afectado. Este resultado fue corroborado, al no observar diferencias significativas tanto en el peso de hojas rosetas como en el largo de la raíz principal de plantas silvestres crecidas en medios suplementados con sorbitol con respecto a medios suplementados con sacarosa y medios sin suplemento (barras grises en Figura 19). Sin embargo estos parámetros de crecimiento fueron afectados significativamente en las tres líneas mutantes insercionales propagadas en medios de crecimiento suplementados con sorbitol. Los resultados indican que el peso seco en líneas mutantes fue reducido aproximadamente un 35% con respecto a plantas silvestres, mientras que el desarrollo de la



raíz principal fue inhibido en un 26 a 30%. La densidad de raíces registrada no presentó diferencias con los valores obtenidos en plantas silvestres (datos no mostrados). La inhibición del crecimiento de líneas mutantes en medios con sorbitol no se observó cuando las distintas líneas fueron crecidas en medios con sacarosa (30 mM) o sin suplementos (barras blancas y negras en Figura 19). De esta manera, los resultados en su conjunto demuestran que las distintas líneas mutantes carentes de AtSDH tienen afectada su capacidad de crecer en medios con sorbitol como única fuente de carbono exógena.



**Figura 19. Fenotipos de crecimiento de líneas *sdh-* comparadas con plantas silvestres.** Plantas silvestres (WT) y líneas mutantes insercionales para *AtSDH* (*sdh-*) fueron sembradas y crecidas en condiciones *in-vitro* en medios MS, sin suplemento (barras blancas), medio MS suplementado con 30 mM de sorbitol (barras grises) y medios suplementados con 30 mM de sacarosa (barras negras). Después de 15 d de crecimiento, las plántulas fueron medidas en cuanto al peso seco de sus hojas rosetas (A) y el largo de su raíz principal (B). Los datos mostrados en ambos gráficos corresponden al promedio de las mediciones realizadas junto a su error estándar (peso seco,  $n = 13-44$ ; largo raíz,  $n = 13-60$ ). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los datos, con respecto a un mismo o distintos medios de crecimiento, obtenido mediante análisis estadístico utilizando ANOVA de dos vías y Bonferroni como post-test ( $p < 0.05$ ).

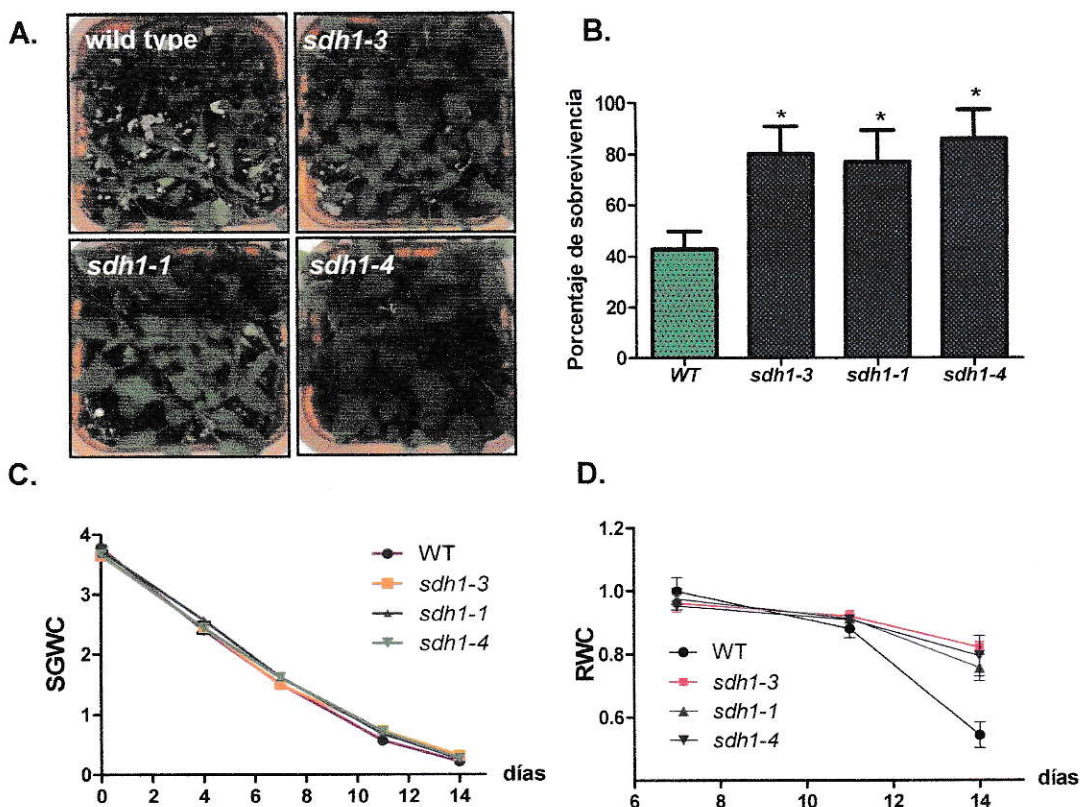


### 3.4. Estrés por deshidratación

Con el objetivo de identificar un posible rol de AtSDH en estrés por deshidratación o sequía, se evaluó el crecimiento y tolerancia frente al estrés de líneas mutantes insercionales y plantas silvestres de *Arabidopsis*. Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la Universidad de Barcelona, bajo la asesoría de la Dra. Teresa Altabella, quien posee gran experiencia en experimentos de estrés abiótico, especialmente en estrés por deshidratación (Alcázar y cols, 2010).

Para llevar a cabo la evaluación, se organizaron 3 grupos de plantas, cada uno compuesto de 25-30 individuos de las 3 líneas insercionales y plantas silvestres. Los tres grupos fueron mantenidos en iguales condiciones de crecimiento, siendo considerado cada grupo como una replica biológica del experimento. Todas las plantas fueron crecidas en tierra hasta alcanzar un tamaño adecuado (4 semanas) en condiciones reguladas de fotoperíodo con ciclo de día corto con el fin de mantener el crecimiento vegetativo de las plantas, impidiendo el desarrollo de brotes. Durante el periodo de crecimiento en estas condiciones, las plantas fueron regadas regularmente, y es importante mencionar que no se registraron diferencias en el fenotipo observado entre líneas mutantes y silvestres. Luego de transcurridas las 4 semanas de crecimiento en condiciones normales, las plantas fueron sometidas a estrés por deshidratación al eliminar el riego durante 14 días. Transcurrido este período de tiempo, las plantas presentaron síntomas de deshidratación, lo cual se observó como la pérdida de turgor de sus hojas (principalmente en hojas maduras). Como se puede observar en Figura 20A, los síntomas de deshidratación fueron mucho más severos y evidentes en plantas silvestres que lo observado en las tres líneas mutantes. Para lograr cuantificar las diferencias observadas, se determinó el número de plantas que fueron capaces de reanudar el crecimiento al ser re-hidratadas y mantenidas en condiciones normales de crecimiento, luego del periodo de privación de agua (proceso de recuperación). El número de plantas "recuperadas" para cada línea se expresó como porcentaje de supervivencia. En los tres grupos evaluados, las plantas mutantes fueron significativamente más tolerantes a la deshidratación que plantas silvestres (Figura 20B). Específicamente, las tasas de

supervivencia en las tres líneas mutantes fueron cercanas al 80%, mientras que en plantas silvestres se registró una tasa promedio de supervivencia de un 43%.



**Figura 20. Tolerancia a estrés por deshidratación de líneas *sdh-* comparadas con plantas silvestres de *Arabidopsis*:** **A.** Fenotipo de líneas mutantes insercionales y plantas silvestres trascurridos los 14 días de privación de agua (periodo de deshidratación). **B.** Porcentajes de supervivencia obtenidos después de 14 d de haber sido re-hidratadas las plantas sometidas al estrés por deshidratación. **C.** Contenido gravimétrico de agua en el suelo (SGWC) medido en los distintos contenedores de líneas insercionales y plantas silvestres durante el periodo de deshidratación. **D.** Valores del contenido relativo de agua (RWC) obtenidos de hojas rosetas de líneas *sdh-* y plantas silvestres los últimos 7 días del periodo de privación de agua. El incremento en los valores de RWC durante la deshidratación se correlaciona con el aumento a la tolerancia del estrés observada en los porcentajes de supervivencia. En todos los gráficos los datos mostrados corresponden al promedio de tres grupos independientes de plantas evaluadas y el error estándar asociado. Cada grupo se compuso de 25-30 plantas por línea. En el panel B, los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre los porcentajes de supervivencia entre líneas *sdh-* y wt ( $p < 0.05$ , t-test).

Para asegurarse que todas las plantas sometidas al estrés fueron efectivamente expuestas al mismo grado de privación de agua, durante todo el periodo sin riego se realizaron mediciones del contenido gravimétrico de agua en el suelo, SGWC (sección III 6.3.3.2).

Como era esperado, el cálculo de este parámetro permitió obtener valores decrecientes durante el transcurso del período. En Figura 20C se puede observar que los valores obtenidos no presentaron diferencias significativas entre las distintas líneas evaluadas (insercionales y silvestres), lo que sugiere que la tasa de pérdida de agua, debido a transpiración o evaporación, era similar en todas las plantas analizadas. Esto indica que el estrés por sequía aplicado a las distintas líneas fue comparable.

Otra medición realizada a las plantas durante el periodo de privación de agua fue el contenido relativo de agua en sus hojas, RWC (sección III 6.3.3.1). Durante los primeros días, los valores calculados de RWC fueron similares tanto en líneas insercionales como silvestres sometidas a estrés. Sin embargo, una importante diferencia se observó entre las líneas *sdh-* y plantas silvestres en la última medición realizada de este parámetro (d14). Como se puede observar en Figura 20D, en plantas silvestres el valor de RWC en el día 14 disminuyó a un valor de 0,54, mientras que en las tres líneas mutantes este valor disminuyó ligeramente a un valor cercano a 0,8, indicando que el contenido de agua en hojas de líneas mutantes es significativamente mayor al contenido en plantas silvestres. Como podemos observar, este resultado se condice con las tasas de supervivencia obtenidas para las distintas líneas mutantes en comparación con plantas silvestres. En conjunto, los resultados obtenidos indican que plantas mutantes son capaces de tolerar de mejor manera la deshidratación que líneas silvestres de *Arabidopsis*.



## V. Discusión

---



En *Arabidopsis*, la enzima sorbitol deshidrogenasa (*AtSDH*, locus At5g51970) recientemente identificada, presenta los dominios conservados propios de enzimas SDH previamente caracterizadas en plantas de la familia de las Rosáceas. Debido a que *Arabidopsis* es una especie no-Rosácea que normalmente no sintetiza ni acumula polioles, la identificación de una enzima involucrada en el metabolismo del sorbitol en esta especie vegetal, genera la gran inquietud de cuál es el rol fisiológico de *AtSDH* en *Arabidopsis*, como modelo de especies no-translocadoras de sorbitol. En el presente trabajo de tesis se desarrollaron estrategias que permitieron caracterizar bioquímicamente *AtSDH*, confirmando su actividad e identificando su preferencia de sustrato, además de evaluar a nivel morfométrico líneas mutantes con niveles reducidos del transcrito (*sdh-*) en distintos medios de crecimiento y condiciones de estrés. Los aspectos abordados en el presente trabajo evidencian importantes antecedentes, que ligado a nuevas investigaciones permitirán dilucidar el rol de polioles en plantas que no translocan sorbitol. A continuación se presenta la discusión de los principales resultados obtenidos.

## 1. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE *AtSDH*.

Para caracterizar bioquímicamente una proteína es necesario disponer de un sistema adecuado de síntesis. En trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación, se utilizaron sistemas de expresión *in-vivo* (en bacterias y levaduras) mediante los cuales no se logró obtener la proteína recombinante en condiciones nativas impidiendo su caracterización bioquímica. Dado estos antecedentes, en el presente trabajo se propuso como una nueva alternativa la síntesis *in-vitro* de *AtSDH* utilizando el sistema de expresión Expressway cell Free, mediante el cual otras proteínas vegetales han sido sintetizadas y analizadas bioquímicamente (glutación-S-transferasa y dihidroflavonol 4-reductasa de naranja: Lo Piero y cols, 2006; Avenaud y cols, 2006). Usando este sistema de expresión *in-vitro* y la previa síntesis de un vector de expresión compatible, pEXP5-*AtSDH*, fue posible transcribir y traducir la proteína recombinante His-*AtSDH* con relativa facilidad y en corto tiempo en comparación con sistemas *in-vivo* (Kim y cols, 1996). La traducción de la proteína sin

embargo, no aseguraba que la conformación funcional que podría haber adoptado la secuencia proteica en este sistema pudiese corresponder a la forma nativa y activa de la enzima. Mediante zimogramas de actividad y mediciones espectrofotométricas fue posible detectar actividad sorbitol deshidrogenasa en productos de reacción de His-AtSDH *in-vitro*, evidenciando que la síntesis mediante este sistema de expresión permitía obtener la proteína en forma nativa, soluble y activa. Este importante resultado confirmó además las predicciones bioinformáticas realizadas, las cuales postulaban que la secuencia codificada por el locus At5g51970 en Arabidopsis correspondía a una enzima SDH capaz de metabolizar sorbitol. Debido a que en condiciones *in-vitro* de síntesis, no es posible la modificación postraduccional de proteínas, la identificación de actividad SDH en el producto de reacción nos permite deducir que no existen tales modificaciones en AtSDH que sean fundamentales para su actividad catalítica. Sin embargo esto no implica que tales modificaciones no ocurran en condiciones fisiológicas. Es probable que al igual que muchas otras enzimas, la actividad de AtSDH pueda ser regulada en ciertas condiciones, frente a estrés por ejemplo, mediante modificaciones post-traduccionales (Dixon y cols, 2005; ver sección 2.2). Debido a que la técnica de zimogramas permite analizar de manera cualitativa (colorimétrica) la actividad de enzimas deshidrogenasas, se evaluaron también otros polioles presentes en Arabidopsis como posibles sustratos de reacción para AtSDH. De cuatro polioles analizados (xilitol, glicerol, eritritol, manitol) sólo xilitol presentó el precipitado azul característico de actividad deshidrogenasa, indicando que His-AtSDH también presenta actividad xilitol deshidrogenasa. Estos resultados fueron confirmados mediante espectrofotometría, al observar un cambio de absorbancia significativo para sorbitol y xilitol, mientras que los demás polioles evaluados no presentaron un cambio atribuible a actividad SDH. El carácter cuantitativo de mediciones espectrofotométricas permitió además determinar que entre ambos sustratos, sorbitol era el sustrato preferente para AtSDH y que el uso de NADP<sup>+</sup>, como co-sustrato de reacción en reemplazo a NAD<sup>+</sup>, no desencadenaba actividad aparente, al igual que la mayoría de las enzimas SDH descritas en la literatura (Lindstad y cols, 1998; Guo y cols, 2012).

Identificada actividad SDH fue nuestro propósito lograr caracterizar bioquímicamente His-

AtSDH en sus parámetros cinéticos ( $K_M$ ,  $V_{MAX}$  y  $k_{cat}$ ) para lo cual fue indispensable obtener la proteína altamente purificada y activa, en concentraciones adecuadas para realizar los ensayos cinéticos pertinentes. La estandarización del proceso de purificación fue realizado utilizando columnas His-trap (por flujo continuo de solvente) y mediante la implementación de un sistema casero de purificación para pequeñas cantidades. Este último sistema de purificación permitió mejorar sustancialmente la concentración de proteína AtSDH en la fracción de elución, además de facilitar el proceso y disminuir los tiempos empleados en llevar a cabo la técnica. Mediante esta metodología se obtuvo una proteína de alta pureza (~90%), sin embargo se observó que la actividad registrada una vez purificada la proteína disminuía con el transcurso del tiempo, alcanzando su completa inactividad luego de dos horas. La obtención de una proteína inestable no generó desconcierto, ya que se disponía de varios antecedentes que vaticinaban tal posibilidad. Entre estos antecedentes, la conformación tetramérica de enzimas SDH caracterizadas sugiere una mayor complejidad estructural de la proteína, la cual puede ser fácilmente dissociada en ciertos solventes o condiciones no apropiadas (Jeffery y cols, 1984; Lindstad y cols, 1998). Además, modelamientos *in-silico* sobre la posible conformación estructural de AtSDH evidencian la presencia de una cola N-terminal de 11 aa sin estructura aparente, termodinámicamente desfavorable que desestabiliza la subunidad estructural de la proteína y que sugiere la interacción con otras subunidades (posible conformación multimérica) u otras proteínas del medio (Maldonado, 2012). En este trabajo, la observación de un patrón de migración diferente en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (42 kDa, sección IV.1.2) y en condiciones nativas (~100 kDa; sección IV.1.3) sugiere que la proteína AtSDH nativa presenta una conformación estructural asociada a más de una subunidad. Para lograr estabilizar estructuralmente la proteína His-AtSDH durante el proceso de purificación, se evaluaron cuatro condiciones en las cuales se modificaron las soluciones empleadas en cuanto a la concentración de sal y el tipo de amortiguador utilizado. En todas estas soluciones se incorporó glicerol en alta concentración (10%) como agente "aglutinador" y estabilizador de proteínas que permitiera aumentar la densidad de las soluciones impidiendo la disociación de la estructura proteica. El uso de glicerol para estos fines ya ha sido



utilizado en procesos de purificación de enzimas SDH caracterizadas en plantas. En el reciente trabajo de Guo y cols (2012) se purificó la enzima SDH de ciruela (*P. salicina*, especie Rosácea) la cual una vez eluida perdió rápidamente actividad. En su investigación ellos observaron que al incorporar glicerol a las soluciones de purificación se lograba retener el 68% de la actividad durante 4 semanas al ser almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En nuestro caso, la evaluación de actividad usando el producto de reacción *in-vitro* de His-AtSDH permitió descartar a glicerol como posible sustrato para la proteína por lo cual su uso en el proceso de purificación no alteraría de modo alguno las mediciones de actividad a partir de proteína purificada. De las condiciones evaluadas de purificación, en aquella en que se utilizó glicerol, TrisHCl (pH 8,2) como amortiguador y alta concentración de sal (500 mM), se logró mantener la estabilidad enzimática de la proteína por mayor tiempo (100% actividad durante 9 horas) que la registrada en otras condiciones. El obtener muestras de proteína purificada con actividad estable por un periodo de tiempo fue un paso clave para lograr caracterizar bioquímicamente His-AtSDH. En este trabajo, fueron evaluadas las constantes cinéticas  $K_M$ ,  $V_{MAX}$  y  $k_{cat}$  para los dos principales sustratos asociados con actividad SDH; sorbitol y  $\text{NAD}^+$ . Los valores de  $K_M$  obtenidos fueron 1,2 mM para el sustrato sorbitol y 74,5  $\mu\text{M}$  para el co-sustrato de reacción  $\text{NAD}^+$ . Con respecto a sorbitol, los datos de  $K_M$  publicados de enzimas SDH vegetales abarcan un amplio rango de concentraciones (2-112 mM; Guo y col, 2012), entre las cuales, la  $K_M$  de His-AtSDH es la menor hasta la fecha, seguida por la enzima SDH de tomate (LeSDH,  $K_M$  2,39 mM; Ohta y cols, 2005), ambas especies no Rosáceas. Debido a que el parámetro  $K_M$  de una enzima corresponde a la concentración de sustrato en la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima de reacción, no es sorprendente observar que en especies no-Rosáceas, como tomate y Arabidopsis, se identifiquen valores más bajos de  $K_M$  que los registrados en especies Rosáceas, ya que la disponibilidad de sustrato (concentración de polioles presente) en estas especies es mucho menor que en especies Rosáceas, las cuales naturalmente acumulan polioles. Con respecto al valor de  $K_M$  del co-sustrato  $\text{NAD}^+$  poca información se dispone en la literatura de enzimas SDH caracterizadas en especies vegetales, a diferencia de la información disponible en microorganismos. En plantas, los valores publicados de  $K_M$  asociados a  $\text{NAD}^+$  son 0,35 mM y 0,17 mM



correspondientes a las enzimas SDH de ciruela y pera, respectivamente (Guo y cols, 2012; Oura y cols, 2000). El valor obtenido en este trabajo (0,75 mM) aunque levemente mayor a las  $K_M$  mencionadas, es del mismo orden de magnitud que los datos publicados en especies Rosáceas.

Con respecto al parámetro  $V_{MAX}$ , los valores obtenidos en este trabajo fueron 0,498 U/mg y 0,6 U/mg, para los sustratos sorbitol y  $NAD^+$ , respectivamente. Dado que ambos sustratos son dependientes y necesarios para la reacción catalizada por His-AtSDH, estos valores en teoría deberían ser iguales. Las diferencias obtenidas en nuestras mediciones pueden ser atribuidas a errores experimentales asociados a cada medición realizada de manera independientemente. Según el Dr. Ricardo Cabrera, experto en el tema, y quien constantemente monitoreó y dirigió los ensayos cinéticos realizados en este trabajo de tesis, la pequeña diferencia observada en los valores de  $V_{MAX}$  se encuentra dentro del margen de error asociado a este tipo de experimentos. Estos valores obtenidos se encuentran dentro del amplio rango de valores de  $V_{MAX}$  publicados en enzimas SDH caracterizadas en especies vegetales (0,3 – 65 U/mg). En especies no-Rosáceas, como el tomate este parámetro fue evaluado con un valor de 0,378 U/mg, similar al obtenido en este trabajo para AtSDH (Ohta y cols, 2005). Mientras que en especies Rosáceas, como pera este parámetro es mayor en tres ordenes de magnitud al observado en especies no-translocadoras de polioles ( $V_{MAX}$  SDH pera: 64,8 U/mg, Oura y cols, 2000).

Con respecto al último parámetro cinético calculado en este trabajo,  $k_{cat}$  o constante catalítica, se obtuvo un valor de  $0,33\text{ s}^{-1}$  para sorbitol y  $0,39\text{ s}^{-1}$  para el co-sustrato  $NAD^+$ . No existen antecedentes disponibles que permitan comparar este parámetro evaluado en otras enzimas SDHs vegetales. Sin embargo es muy importante mencionar, que en el cálculo realizado (ecuación 5, sección III.5.6) se utilizó el peso molecular de una subunidad estructural de la enzima (42 kDa), especulando de antemano que la conversión de una molécula de sorbitol con la consecuente reducción de  $NAD^+$  es realizado en cada subunidad como centro activo. Sin duda, para confirmar que estos valores de  $k_{cat}$  sean certeros, es necesario probar tal hipótesis.

Debido que enzimas sorbitol deshidrogenasa caracterizadas en plantas presentan actividad deshidrogenasa con otros polioles además de sorbitol, nuestro último propósito en este objetivo fue determinar y confirmar la especificidad de sustrato de la enzima, a partir de muestras purificadas. La evaluación realizada fue utilizando un amplio rango de posibles sustratos presentes en *Arabidopsis* según antecedentes bibliográficos y condiciones de actividad ya estandarizadas, con concentraciones saturantes. De los sustratos evaluados, la mayoría de los polioles fueron metabolizados por AtSDH presentando un amplio rango de actividades específicas, mientras que las hexosas, glucosa y fructosa, no presentaron actividad evidente (<1%) constatando la actividad poliol deshidrogenasa de AtSDH. Dentro del grupo de alcoholes de azúcar testeados, sorbitol fue el sustrato preferente de actividad, al igual que para la gran mayoría de enzimas SDH caracterizadas a nivel bioquímico. Los polioles ribitol, xilitol e iditol también fueron sustratos preferentes para la enzima, al presentar un 98%, 80% y 78%, respectivamente, de la actividad enzimática registrada para sorbitol (100%). El xilitol se reduce a xilulosa mediado por la enzima xilitol deshidrogenasa (XDH, EC 1.1.1.9), cuyo gen ha sido clonado a partir *S. cerevisiae* (Richard y cols, 1999). En *Arabidopsis* la secuencia que presenta mayor identidad con la secuencia XDH descrita en levaduras es AtSDH (35% de identidad). Por esta razón, se propone que el locus At5g51970 corresponde también a una XDH en esta especie. Recientes investigaciones revelan que AtSDH corresponde a una enzima ribitol deshidrogenasa en *Arabidopsis* (RDH, Nosarzewski y cols, 2012). Cuando sorbitol, ribitol, xilitol e iditol son oxidados a sus respectivas cetosas, la oxidación ocurre específicamente en el C-2 de la molécula ([www.genome.jp / KEGG / ruta](http://www.genome.jp/KEGG/ruta)). Estructuralmente, tanto ribitol como xilitol son moléculas de 5 C a diferencia de sorbitol e iditol (6 C), sin embargo, los cuatro polioles presentan la misma configuración estereoquímica quiral específica en su C-2 (S) y C-4 (R). Los polioles analizados con una configuración diferente en estos dos átomos de C fueron metabolizados con menor velocidad por AtSDH, como es el caso de L-arabitol (C-2 (S), C-4 (S); 59%) y D-manitol (C-2 (R), C-4 (R); 32%). Estas observaciones sugieren que la configuración esteroisómera de la molécula, principalmente en su C-2 y C-4, podría ser la clave para la preferencia de sustrato por AtSDH, al igual que en otras SDHs descritas en plantas y en

mamíferos (Oura y cols, 2000; Maret y Auld, 1988; Marini y cols, 1997). Algunos antecedentes proponen que tanto la configuración estero-isómera de el C-3 y C-5 como el número de átomos de C de los polioles también influyen en la especificidad de sustrato de enzimas SDH (Maret y Auld, 1988; Marini y cols, 1997; Lindstad y cols, 1998). Sin embargo esta influencia sobre la actividad ha sido considerada como limitada, con respecto a la configuración del C-2 y C-4, y podría explicar las pequeñas diferencias de actividad obtenidas entre los cuatro polioles preferentes de actividad AtSDH (sorbitol, ribitol, xilitol e iditol). Con respecto a los otros polioles evaluados en este trabajo, la estructura disacárida de maltitol y lactitol podría explicar su baja actividad con respecto a sorbitol (14 y 13%, respectivamente), ya que posiblemente el mayor tamaño de la estructura de estos polioles no permite un adecuado encaje en el sitio catalítico de la enzima.

Con respecto a dos de sus sustratos preferentes, ribitol y xilitol, se ha demostrado que son sustratos de enzimas SDHs vegetales. En maíz, la enzima SDH oxida ribitol y xilitol con un 73% y 91% de eficiencia con respecto a la oxidación de sorbitol, respectivamente (Doehler, 1987). La enzima SDH caracterizada en tomate, LeSDH, también cataliza la oxidación del ribitol y xilitol (60% y 29%, respectivamente; Ohta y cols, 2005). Sin embargo, es interesante notar que enzimas SDHs caracterizadas en especies Rosáceas tienen una capacidad significativamente menor para metabolizar ribitol. En manzana se ha identificado entre un 7% a 12% de actividad al usar ribitol como sustrato de reacción, con respecto a su sustrato preferente sorbitol (Negm y Loescher, 1979; Yamaguchi y cols, 1994). Similares porcentajes de actividad han sido publicados para SDH descritas en pera y ciruela, las cuales oxidan ribitol con un porcentaje de actividad respecto a sorbitol de un 14% y 15%, respectivamente (Oura y cols, 2000; Guo y cols, 2012). Tal tendencia observada, parece mostrar que SDHs de especies no-Rosáceas alcanzan mayor actividad con respecto a ribitol que especies Rosáceas, lo cual podría ser atribuido a cambios sutiles en la configuración de los aminoácidos presentes en los sitios activos de estas enzimas. Dada su relevancia, sería interesante e informativo evaluar en un futuro trabajo las constantes cinéticas ( $K_M$ ,  $V_{MAX}$  y  $k_{cat}$ ) que presenta AtSDH con ribitol como sustrato, al igual que con los otros polioles evaluados en que se obtuvo una alta actividad enzimática (xilitol e iditol).



## 2. DETERMINACIÓN DEL ROL FISIOLÓGICO DE *AtSDH*.

### 2.1. Identificación y análisis molecular de líneas insercionales en *AtSDH*.

Para identificar qué procesos fisiológicos podrían estar involucrados con la expresión de un gen desconocido en plantas, a menudo se utilizan líneas que sobre-expresan o interrumpen la secuencia codificante del gen en estudio. En este trabajo fueron seleccionadas 3 líneas de *Arabidopsis* mutantes insercionales de la colección del SALK Institute, en las cuales la secuencia transcrita de *AtSDH* es interrumpida por la inserción de un ADN-T en distintas regiones. En estas líneas, el ADN-T insercionado posee un tamaño lo suficientemente extenso (4,5 kb) para impedir la correcta transcripción del gen, sin embargo su ubicación y número de copias no es precisa y puede ser localizado hasta 300 pb río abajo de la inserción predicha en la base de datos de la colección (<http://arabidopsis.info>; Alonso y cols, 2003). Por esta razón, una vez adquiridas las líneas, fue de nuestro interés evaluar e identificar en primera instancia la ubicación del ADN-T en líneas posiblemente insercionales en *AtSDH*. Mediante genotipificación y secuenciación fue posible confirmar y verificar la ubicación del inserto en las regiones 5'UTR, exón 3 y exón 5 de la secuencia transcrita de *AtSDH*, específicamente en los nucleótidos -250, 1280 y 1688 respectivamente, tomando como referencia +1, el sitio de inicio de la traducción. Utilizando esta metodología fue posible además, identificar líneas homocigotas para cada región, en las cuales la inserción del ADN-T se encuentra en ambos alelos del genoma de *Arabidopsis*. La ubicación de la inserción y la homocigocidad de las líneas sin embargo no aseguran la expresión nula del transcrito de *AtSDH* en cada mutante, en particular en líneas cuya inserción no se ubica en la región codificante del gen como es el caso de la línea *sdh1-3* (inserción en región 5'UTR). Por esta razón, el tercer objetivo del presente trabajo fue el análisis molecular de las líneas insercionales previamente identificadas para *AtSDH*. Mediante RT-PCR convencional se registró una nula expresión del transcrito en las tres líneas mutantes, al utilizar las condiciones previamente estandarizadas de amplificación para el gen (PCR de 33 ciclos de amplificación). Sin embargo, cuando se realizaron reacciones de PCR con una mayor



cantidad de ciclos de amplificación del producto (40 ciclos) se observó una tenue banda del tamaño correspondiente al ADNc de *AtSDH* en líneas *sdh1-3*. Al comparar el producto de amplificación obtenido en iguales condiciones de reacción para líneas *sdh1-3* con plantas silvestres, se obtuvo una diferencia de intensidad del 91%. Este resultado indicó que líneas *sdh1-3* presentan menores niveles de transcrito de *AtSDH*, de alrededor del 10% del nivel de expresión registrado en plantas silvestres. Con el objetivo de confirmar y cuantificar de manera precisa estos resultados, se midieron los niveles relativos de transcrito de *AtSDH* en las distintas líneas mutantes y plantas silvestres mediante PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos indicaron que líneas *sdh1-3*, *sdh1-1* y *sdh1-4* presentaban el 3, 1 y 0,5% de la expresión de *AtSDH* registrada en plantas silvestres, respectivamente. La precisión de estos resultados, fue confirmada al realizar replicas biológicas del experimento y al utilizar dos genes normalizadores descritos en la literatura de manera independiente.

En líneas insercionales en la región codificante del gen (líneas *sdh1-1* y *sdh1-4*) se esperó una nula expresión del transcrito debido al tamaño del ADN-T, lo cual fue evidenciado en reacciones de RT-PCR convencional. Los niveles de expresión relativa del 1 y 0,5% obtenidos mediante PCR en tiempo real para estas líneas, son niveles de expresión del transcrito suficientemente bajos que podrían ser asociados a errores metodológicos (por ej. asociado al cálculo de la eficiencia de los partidores) formando parte del margen de error esperado de la técnica en sí. A diferencia de lo que se esperaba para líneas *sdh1-1* y *sdh1-4*, en líneas *sdh1-3* se obtuvo mayor expresión del transcrito debido al lugar de inserción del ADN-T en el gen (región UTR5'). La obtención de un 10% de expresión del transcrito mediante RT-PCR y un 3% por PCR en tiempo real, evidenciaron tal fenómeno, aun cuando los niveles de transcrito siguen siendo suficientemente reducidos en comparación a plantas silvestres, presentando un fenotipo similar al observado en líneas con menor expresión del transcrito (*sdh1-1* y *sdh1-4*) como será discutido más adelante (sección 2.2). Las diferencias observadas en los niveles de expresión al usar una u otra técnica, pueden ser asociados tanto a errores metodológicos como de precisión de la misma técnica. Debido a que mediciones mediante RT-PCR convencional suelen presentar menor exactitud, los mayores niveles de expresión de *AtSDH* obtenidos mediante esta técnica pueden ser asociados al

mayor número de variables que afectan el manejo experimental de esta metodología. Por esta razón, los resultados obtenidos mediante PCR en tiempo real son los valores de expresión relativa para cada línea insercional considerados en este trabajo.

Los niveles de expresión sin duda nos informan la cantidad de transcrito presente en líneas mutantes. Sin embargo, más allá de este resultado, lo interesante es conocer si la traducción de la proteína está siendo efectivamente afectada en estas líneas. Mediante Western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-AtSDH previamente generado en nuestro grupo de investigación (Mandujano, 2010) fue posible confirmar la ausencia de proteína AtSDH en las 3 líneas mutantes insercionales, a diferencia de plantas silvestres, en donde se observa el tamaño esperado de ~42 kDa correspondiente a AtSDH (Parada, datos sin publicar). Este resultado, nos permite asegurar que las tres líneas mutantes, *sdh1-3*, *sdh1-1* y *sdh1-4*, son efectivamente líneas carentes de AtSDH, al no identificar la presencia de la proteína (42KDa) ni fragmentos de esta (proteínas trucas).

Identificar líneas mutantes *sdh-* fue considerado un aspecto crucial en esta investigación para lograr detectar que proceso fisiológico podría estar siendo alterado en Arabidopsis debido a la ausencia de AtSDH, como parte del tercer y último objetivo propuesto en este trabajo. Disponer de una cantidad adecuada de líneas independientes permite atribuir de forma certera la identificación de una respuesta fisiológica a los niveles reducidos del transcrito, si el fenotipo es observado de igual manera en las tres líneas mutantes, como será discutido a continuación.

## **2.2. Análisis fenotípicos de líneas de Arabidopsis *sdh-***

En condiciones normales de crecimiento, las tres líneas independientes *sdh-* presentaron un fenotipo similar al observado en plantas silvestres. En este trabajo de tesis, no se lograron detectar diferencias visibles en el desarrollo, tamaño, forma y número de hojas, raíces, tallos, flores y cantidad de semillas en líneas mutantes, comparando con el desarrollo normal de una planta silvestre. Esta observación nos sugiere que el metabolismo de sorbitol

y de posiblemente otros polioles no es esencial para el desarrollo de *Arabidopsis*, lo cual se condice con las bajas concentraciones registradas de todos los alcoholes de azúcar presentes en esta especie, y en general en especies no-acumuladoras de polioles en condiciones estándar de crecimiento.

Debido que varios antecedentes relacionan la acumulación de sorbitol y otros polioles con un aumento en la tolerancia de las plantas, especialmente Rosáceas, para resistir a presiones ambientales tales como estrés por bajas temperaturas, salinidad, estrés osmótico y sequía, en este trabajo se evaluó la respuesta fisiológica de líneas *sdh-* frente a tales condiciones de estrés. Aún cuando los diferentes tipos de estrés presentan mecanismos propios de respuesta, varios antecedentes indican que existe un conjunto de respuestas comunes en todos ellos, como es el estrés oxidativo provocado por un aumento en la formación de radicales libres (Kaplan y cols, 2004).

En el trabajo de Dixon y cols (2005) se identifica a AtSDH como una proteína susceptible a s-glutationilación, modificación post-traducciona que inactiva proteínas en condiciones de estrés oxidativo. Tal antecedente, que relaciona la regulación de actividad SDH con estrés oxidativo en *Arabidopsis*, nos hace concebir una posible respuesta diferencial de líneas *sdh-* al ser sometidas a los distintos tipo de estrés mencionados. Las principales observaciones obtenidas serán discutidas a continuación, de manera independiente para cada condición de estrés analizada.

### **2.2.1. Estrés por frío**

El proceso de aclimatación a bajas temperaturas es muy complejo y lleva consigo numerosos cambios fisiológicos y bioquímicos. Entre los más importantes podemos señalar los cambios en la composición lipídica de las membranas (Zhang y cols, 2009), en los niveles de  $Ca^{+2}$  citosólico, y en la concentración de hormonas y solutos compatibles, como polioles (Cuevas, 2007). Debido a que la mayoría de estos cambios son controlados al nivel de la expresión génica (Shinozaki y cols 2003) en este trabajo se evaluó los niveles de



transcrito de los dos genes involucrados directamente con el metabolismo de sorbitol; *AtA6PR* y *AtSDH*. En tratamientos de inducción por frío se observó un aumento en los niveles de transcrito de *AtA6PR* al doble de su expresión basal y una disminución cercana a la mitad del transcrito *AtSDH*. El aumento en la expresión del gen responsable de la síntesis de sorbitol (*AtA6PR*) y la disminución del gen implicado en su catálisis o conversión (*AtSDH*), sugiere que en condiciones de bajas temperaturas existe una regulación transcripcional en plantas silvestres de *Arabidopsis* que permite la acumulación de polioles, en particular de sorbitol. Los resultados obtenidos, concuerdan con los antecedentes publicados por Kaplan y cols (2004). En su estudio, se registró un incremento en la concentración de sorbitol en plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés por frío, utilizando GC-MS y empleando una metodología de inducción de estrés muy similar a la llevada a cabo en este trabajo. Los autores consideran a sorbitol como un metabolito de respuesta específica a frío debido a que no se identifican cambios en su concentración al evaluar estrés por altas temperaturas en *Arabidopsis*. Los resultados obtenidos, junto con los antecedentes mencionados indican que la acumulación de sorbitol es una respuesta adaptativa a bajas temperaturas, razón por la cual sería interesante evaluar en futuros estudios el fenotipo de líneas *sdh-*, acumuladoras de polioles, en tratamientos de estrés por frío y por congelación.

### **2.2.2. Estrés Salino**

Altos niveles de sal pueden causar varios tipos de estrés en las plantas, incluyendo una alterada absorción de nutrientes, acumulación de iones tóxicos ( $\text{Na}^+$ ), estrés osmótico y estrés oxidativo (Verslues y cols, 2006). El estrés salino difiere de otros tipos de estrés debido principalmente al desbalance iónico que se genera a partir de 7 días en plantas sometidas a altos niveles de sal (Huh y cols, 2002; Munns, 2002). Varios antecedentes relacionan la acumulación de polioles con un aumento en la tolerancia al estrés salino (Gao y cols, 2001). Tales antecedentes sugirieron una posible respuesta diferencial de líneas *sdh-*, potenciales acumuladoras de polioles, con respecto a plantas silvestres de *Arabidopsis*.



Los resultados obtenidos en este trabajo indican que tanto plantas *sdh-* como WT presentan un fenotipo similar al ser sometidas a altas concentración de sales (100, 150 y 200 mM), lo cual fue evidenciado en el largo de su raíz principal y el fenotipo asociado a la región aérea (hojas rosetas) de plántulas transferidas durante 7-14 días a los distintos medios suplementados con sal. La inhibición del crecimiento tanto de la parte radicular como aérea en ambos grupos de plantas sometidas a estrés fue evidente al utilizar 100 mM de NaCl como ha sido descrito en otras investigaciones (Verslues y cols, 2006), lo cual se atribuye al efecto tóxico, dosis dependiente, del ión  $\text{Na}^+$  incorporado principalmente en raíces y distribuido a todo el organismo. Los resultados obtenidos sugieren que AtSDH no estaría involucrado en procesos fisiológicos relacionados con estrés salino bajo las condiciones experimentales empleadas.

### **2.2.3. Estrés osmótico**

Para generar estrés osmótico en plantas y evaluar su tolerancia, tradicionalmente se utilizan medios suplementados con compuestos osmóticos como manitol, sorbitol y PEG, los cuales permiten disminuir el potencial hídrico del agua ( $\psi_w$ ) en los medios de crecimiento (Verslues y cols, 2006; Rapala y cols, 2012; Kim y cols, 2012). El manitol en particular ha sido ampliamente utilizado en un gran número de investigaciones, debido a su fácil uso y bajo costo (Xiong y cols, 2011). Debido a que el estrés osmótico ha sido uno de los tipos de estrés relacionados con la acumulación de polioles en especies Rosáceas, en este trabajo se evaluó el crecimiento de plantas *sdh-* en medios suplementados con altas concentraciones de manitol, como agente desencadenante del estrés. El retardo del crecimiento tanto de la zona radicular como aérea, fue la respuesta generalizada y observada en plantas silvestres, como ha sido descrito en la literatura (Xiong y cols, 2006). Los resultados obtenidos indicaron que no existían diferencias significativas en la inhibición del crecimiento de líneas *sdh-* con respecto a WT, sugiriendo que la actividad AtSDH no está involucrada en la respuesta fisiológica desencadenada por estrés osmótico en

Arabidopsis. Para confirmar esta observación, sería interesante evaluar si la similitud de la respuesta a estrés osmótico se mantiene al utilizar menores concentraciones de manitol en los medios de crecimiento a las ya evaluadas en este trabajo (100, 150 y 200 mM). En su investigación, Xiong y colaboradores (2006) evalúan la sensibilidad al estrés de mutantes *dig*, las cuales presentan alterada respuesta en el desarrollo de raíces laterales, utilizando concentraciones de 50 – 75 mM (consideradas concentraciones moderadas de manitol). Estos autores, además de corroborar la inhibición del largo de la raíz principal confirman la inhibición del crecimiento de raíces laterales en medios con manitol, mediciones que podrían ser consideradas para futuros estudios.

Como fue mencionado, el uso de manitol y sorbitol como agentes osmóticos han sido hasta la fecha ampliamente utilizados. Sin embargo, su uso como desencadenantes de estrés osmótico, genera controversias. En la naturaleza, cuando el contenido de agua del suelo disminuye y se desencadena estrés osmótico, el agua es absorbida desde la célula resultando en citorrhis, un proceso en el cual tanto la pared celular como la célula se encogen (Verslues y cols, 2006). Este fenómeno contrasta con la respuesta desencadenada al utilizar solutos de bajo peso molecular como es caso de manitol y sorbitol. Evidencias indican, que ambos polioles son capaces de penetrar libremente los poros de la pared celular y causar plasmólisis, proceso en que se genera pérdida de agua y de volumen celular sin afectar el contenido de agua o volumen de la pared celular (Verslues y cols, 2006). El ingreso de estos compuestos al medio intracelular podría ser mediado por transportadores multi-específicos ( $H^+$ -symporters) para polioles y monosacaridos descritos en la membrana plasmática de células de Arabidopsis (AtPMT1 y 2, Klepek y cols, 2010; AtPMT5 Klepek y cols, 2005; Reinders y cols, 2005). La plasmólisis provocada por el ingreso de sorbitol y manitol no corresponde a la respuesta típica observada en la naturaleza y puede causar un daño celular que es percibido con una respuesta fisiológica distinta a lo que realmente ocurre. Debido a esto, la plasmólisis debiera evitarse en estudios de bajo potencial hídrico por estrés osmótico (Munns, 2002). Además, los resultados obtenidos en el presente trabajo con respecto a la caracterización bioquímica de AtSDH confirman que existe un metabolismo de polioles en Arabidopsis. Tanto sorbitol (100%)

como manitol (32%), son sustratos de AtSDH (objetivo 1), por lo cual no son compuestos inertes para Arabidopsis y su catabolismo podría estar asociado a una respuesta fisiológica diferencial en plantas sometidas a estrés osmótico usando estos compuestos. Esta importante observación desvalida su uso como agentes osmóticos y corrobora que su utilización no es adecuada para este tipo de experimentos. Por otro lado, PEG es un compuesto inerte que no se metaboliza en Arabidopsis, y en su forma de alto peso molecular (mayor a 6000 g/mol) no es capaz de ingresar a la célula provocando citotoxicidad al ser utilizado como agente osmótico. Hasta ahora, todos los antecedentes indican que PEG es el mejor soluto existente para imponer un estrés de bajo  $\psi_w$  que refleje el tipo de presión ambiental impuesta por la naturaleza (Verslues y cols, 1998; van der Weele y cols, 2000). Sin embargo, la utilización de este compuesto en experimentos *in-vitro* no es de fácil aplicación. La molécula PEG impide la polimerización del agar utilizado comúnmente en medios de crecimiento en condiciones estériles. Actualmente se dispone de protocolos estandarizados que permiten obtener placas de agar infundidas en PEG con distintos potenciales osmóticos (Verslues y cols, 2006). Esta metodología fue implementada durante la realización de este trabajo de tesis con la asesoría del Dr. Herman Silva Robledo (Lab. Relación Agua-planta-suelo, Fac. Agronomía, U. de Chile) quien dispuso para nuestro uso un osmómetro, equipo que permitió confirmar el potencial osmótico de placas preparadas e infundidas con PEG a distintas concentraciones. En futuros experimentos sería útil evaluar la fuga de electrolitos de plantas crecidas en placas infundidas con PEG (Verslues y cols, 2006), con el fin de confirmar los resultados obtenidos en esta tesis, los cuales sugieren que el metabolismo de polioles en Arabidopsis no estaría relacionado con el estrés osmótico (evaluado con manitol).



#### 2.2.4. Medio MS sorbitol

En medios de crecimiento *in-vitro* suplementados con 30 mM de sorbitol y en medios sin suplemento, se observó que el crecimiento de plantas silvestres fue similar, sin registrar diferencias significativas con respecto al peso seco de hojas rosetas y el largo de su raíz principal transcurridos 15 días de crecimiento en condiciones de día largo. Como previamente fue demostrado (Laby y cols, 2000), *Arabidopsis* no presenta efectos inhibitorios en su crecimiento en medios suplementados con sorbitol en concentraciones menores a 300 mM. Sin embargo, importantes diferencias fueron observadas en el desarrollo de líneas mutantes insercionales *sdh-* al ser crecidas en medios suplementados con sorbitol 30 mM, lo cual se evidenció en una significativa reducción del peso seco (~ 33%) y en el largo de la raíz principal (~ 28%). Este resultado podría indicar que debido a que líneas *sdh-* son incapaces de catalizar de manera intracelular el sorbitol exógeno presente en el medio de crecimiento, estas líneas son más afectadas en condiciones de estrés osmótico que plantas silvestres debido a una excesiva acumulación de sorbitol, inhibiendo de esta forma su desarrollo. El mismo fenómeno ha sido observado en plantas de tabaco que sobre-expresan la enzima A6PR de manzana, involucrada en la síntesis de sorbitol. Cuando los niveles de sorbitol fueron menores que ~5  $\mu\text{mol/g}$  de peso fresco, las líneas transgénicas de tabaco presentaron un fenotipo similar a líneas silvestres (Tao y cols, 1995; Sheveleva y cols, 1998). Sin embargo, cuando este umbral fue sobrepasado en líneas transformantes, las plantas de tabaco presentaron una menor tasa de crecimiento y una disminución en su capacidad de enraizamiento (Sheveleva y cols, 1998). Como soluto compatible, sorbitol y otras moléculas, pueden ser acumuladas en altas concentraciones sin alterar el normal funcionamiento celular (Pessarakli y cols, 2010). Sin embargo, estas y otras investigaciones, evidencian que existen niveles críticos para la acumulación de estos compuestos (Alcázar y cols, 2010; Deguchi y cols, 2004). Es posible entonces, que líneas *sdh-* presenten un umbral de acumulación de sorbitol menor que plantas silvestres al ser incapaces de realizar su normal conversión a fructosa. Por lo tanto, sería muy informativo medir (por HPLC) los niveles de sorbitol en las plantas sometidas a estas condiciones.



### 2.2.5. Estrés por sequía

Las líneas *sdh-* fueron significativamente más resistentes a estrés por deshidratación que plantas WT, reflejado por un alto porcentaje de sobrevivencia y un incremento en el contenido relativo de agua en sus hojas (RWC). Esta mayor sobrevivencia se debe probablemente a un incremento en la concentración de solutos compatibles en líneas mutantes, como resultado de su incapacidad de remover algunos alcoholes de azúcar, sustratos de AtSDH. Hasta la fecha, dos estudios evidencian el aumento en los niveles de varios polioles en plantas de *Arabidopsis* al ser sometidas a estrés por sequía (Rizhsky y cols, 2004; Nosarzewski y cols, 2012). En su investigación Rizhsky y cols (2004) identificaron los polioles glicerol, lactitol, inositol, maltitol, manitol y xilitol mediante GC-MS en hojas rosetas de *Arabidopsis silvestre* luego de ser eliminado el riego durante 7 d (plantas con RWC ~70%). Entre estos polioles, xilitol aumentó 3,59 veces su concentración en tales condiciones, siendo este aumento uno de los más altos registrados entre los metabolitos identificados impuesto el estrés. A diferencia de lo observado con xilitol, sorbitol no fue sintetizado bajo condiciones de sequía, y tampoco fue registrado en las condiciones control en esta investigación. Los demás polioles evaluados, en general disminuyeron su concentración (~0,5) en condiciones de estrés, salvo inositol que aumento 0,5 veces su concentración basal (Rizhsky y cols, 2004). Si bien recordamos, AtSDH presenta actividad con la mayoría de estos polioles, siendo xilitol uno de sus preferentes sustratos (80% de actividad con respecto a sorbitol). Estos antecedentes nos infieren que el fenotipo de mayor tolerancia a estrés por sequía observado en líneas *sdh-* podría deberse a una acumulación, menor a la umbral de los polioles mencionados, en particular de xilitol.

En discrepancia a los metabolitos identificados por Rizhsky y cols (2004), una reciente investigación registró altos niveles de sorbitol y ribitol en *Arabidopsis* bajo condiciones de estrés por deshidratación. En este estudio, Nosarzewski y cols (2012) utilizaron condiciones experimentales similares a las que se utilizaron en nuestra investigación (crecimiento en tierra con 14 días de eliminación del riego), las cuales difieren a las utilizadas en la investigación realizada por Rizhsky y cols (2004), explicando posiblemente las diferencias

en los metabolitos registrados impuesto el estrés. Dado estos antecedentes, sería muy interesante evaluar en un futuro trabajo los niveles de los polioles mencionados en ambas investigaciones en líneas *sdh-*, sometidas a estrés por deshidratación mediante la técnica de HPLC.

La reciente publicación de Nosarzewski y cols (2012) tiene gran relevancia para nuestra investigación, ya que evaluaron al igual que en nuestro trabajo, la resistencia a estrés por sequía de líneas mutantes insercionales de *Arabidopsis sdh-*, de las cuales *sdh1-1* es común en ambos estudios. En contraposición a lo que se observó en nuestro trabajo, el grupo liderado por Nosarzewski registró una menor tolerancia al estrés en líneas *sdh-*, lo cual fue reflejado en una menor tasa de sobrevivencia. Estos discordantes resultados, nos hicieron cuestionar y comparar el diseño experimental con que había sido ejecutado el estrés por ambos grupos de investigación. En nuestro trabajo el estrés por deshidratación fue realizado en condiciones de día corto (8 h luz/16 h oscuridad) con el fin de mantener el **crecimiento vegetativo** de las líneas evaluadas durante las 8 semanas en que se realizó el estudio. En el trabajo publicado por Nosarzewski, el crecimiento de los distintos grupos de plantas fueron realizados bajo condiciones de fotoperíodo largo (16 h luz/8 h oscuridad), condiciones que inducen el **crecimiento reproductivo** de las plantas transcurridos ~26 d desde su siembra (Boyes y cols, 2001). Ellos evidencian este fenómeno en su publicación al indicar que las inflorescencias se retiraron periódicamente de las plantas durante el tratamiento de estrés. Este aspecto es muy importante, ya que el cambio de fase de crecimiento vegetativo a reproductivo tiene un profundo efecto sobre el metabolismo de la planta. Varias investigaciones relacionan los cambios en perfiles de transcripción, actividad enzimática, concentración de solutos, y el metabolismo del nitrógeno y carbono con los ciclos de luz/oscuridad al cual son sometidas las plantas (Gibon y cols, 2006; Bieniawska y cols, 2008). En tratamientos de deshidratación, los cambios dinámicos observados en el transcriptoma de *Arabidopsis* son acotados por factores mitigantes como el tiempo de duración del ciclo diurno (horas de luz; Wilkins y cols, 2010). En este mismo contexto, es interesante observar que en plántulas silvestres de *Arabidopsis* (ecotipo Ler) la expresión de SDH es 37% mayor al ser cultivadas en condiciones de fotoperíodo corto en comparación

con ciclos de días largos (Michael y cols, 2008). Esta información se condice con la sobre-representación del motivo de respuesta a luz/oscuridad, L-box, identificado 260 veces sobre el promedio en el promotor de *AtSDH* (Parada, 2011). Todos estos antecedentes nos indican que las condiciones de fotoperíodo al que fueron sometidas las plantas son un factor crucial que podría haber alterado la respuesta de plantas silvestres y líneas mutantes *sdh*- al estrés por sequía, explicando los diferentes resultados obtenidos en este trabajo con respecto a los ya publicados.

La menor tolerancia a estrés por sequía de mutantes *sdh*- en condiciones de fotoperíodo largo descritas por Nosarzewski, fueron atribuidas principalmente a altas concentraciones de sorbitol y ribitol, superiores a un umbral crítico, que desfavorece el crecimiento de *Arabidopsis*, avalando lo que fue discutido previamente en medios suplementados con sorbitol.

## VI. Conclusiones

---



En el presente trabajo de tesis fue posible sintetizar de manera satisfactoria la proteína recombinante His-AtSDH a través de un sistema de expresión *in-vitro* y la previa generación de un vector compatible, pEXP5-AtSDH. Mediante este sistema de síntesis se obtuvo la proteína His-AtSDH de manera soluble y activa en el producto de la reacción *in-vitro*, lo cual permitió confirmar bioquímicamente, utilizando zimogramas y espectrofotometría, la actividad sorbitol y xilitol deshidrogenasa de la proteína.

En este trabajo la implementación de un sistema de purificación para pequeñas cantidades permitió purificar de forma adecuada y en mayor concentración la proteína en estudio. El uso de agentes estabilizadores y altas concentraciones de sal en las soluciones utilizadas para llevar a cabo el proceso de purificación implementado, permitieron obtener una fracción de proteína altamente purificada (~92%) y activa de manera estable durante un período de 9 h. En estos periodos de tiempo fueron realizados ensayos cinéticos que permitieron caracterizar en sus parámetros  $K_M$ ,  $V_{MAX}$  y  $k_{cat}$  dos de los principales sustratos de actividad SDH, sorbitol y NAD<sup>+</sup>. Los valores obtenidos en las constantes cinéticas  $K_M$  y  $V_{MAX}$  para sorbitol fueron 1,2 mM y 0,498 U/mg, respectivamente, similares a los parámetros identificados en SDHs caracterizadas en otras especies No-Rosáceas, como tomate y maíz.

La especificidad de sustrato de His-AtSDH también fue evaluada. Los resultados indicaron que sus sustratos preferentes de actividad deshidrogenasa son sorbitol (100%), ribitol (98%) y xilitol (80%), los cuales comparten similitudes estructurales que podrían ser atribuidas a la preferencia de His-AtSDH por estos y no por otros sustratos, tales como arabitol y manitol.

Para determinar el rol fisiológico de AtSDH en plantas, se identificaron 3 líneas mutantes insercionales de Arabidopsis en la secuencia transcrita de AtSDH, designadas como *sdh1-3*, *sdh1-1* y *sdh1-4*. Mediante genotipificación fue posible confirmar la ubicación de la inserción (ADN-T) en el gen, específicamente en la región 5'UTR, exón 3 y exón 5 de líneas *sdh1-3*, *sdh1-1* y *sdh1-4*, respectivamente. Utilizando esta metodología fue posible además identificar aquellas líneas homocigotas para cada mutación, en las cuales la inserción había sido incorporada en ambos alelos del genoma. Como era esperado, debido a la inserción los niveles de transcrito de AtSDH en las distintas líneas fueron drásticamente

reducidos en comparación a la expresión del gen en plantas silvestres (<3%) permitiendo disponer de líneas prácticamente knock-out para *AtSDH*.

El análisis fisiológico de líneas *sdh-* permitió observar que la falta de función de *AtSDH* no afecta el desarrollo de *Arabidopsis* en condiciones estándar de crecimiento. Sin embargo la carencia de *AtSDH* fue determinante en la respuesta fisiológica de las tres líneas mutantes en ciertas condiciones de estrés abiótico. La inhibición de la expresión de *AtSDH* (0,5 veces) en condiciones de estrés por frío infieren un posible rol de este gen en la adaptación a bajas temperaturas en plantas de *Arabidopsis*. Por otra parte, la inhibición del crecimiento de líneas *sdh-* en medios suplementados con sorbitol (30 mM) permite deducir que existe una mayor susceptibilidad al aumento de la concentración intracelular del poliol en plantas incapaces de metabolizarlo, evidenciando la existencia de una concentración crítica de acumulación, que una vez superada genera efectos adversos en el desarrollo. Finalmente, se observó una mayor resistencia de líneas *sdh-* en condiciones de estrés por deshidratación, presentando una mayor sobrevivencia y un incremento en el contenido relativo de agua en hojas.

Finalmente, podemos concluir que los objetivos propuestos en este trabajo de tesis fueron todos satisfactoriamente cumplidos y que la hipótesis postulada "El locus *At5g51970* codifica para una sorbitol deshidrogenasa de *Arabidopsis thaliana* que cataliza la reacción de oxidación de sorbitol con mayor eficiencia que otros polioles y una disminución en los niveles de transcrito de este gen afecta la respuesta de la planta en condiciones de estrés abiótico", ha sido confirmada.

## VII. Difusión

---

## 1. COLABORACIONES..

El presente trabajo fue realizado en colaboración con:

- **Laboratorio de Bioquímica**, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Bajo la asesoría de Dr. Ricardo Cabrera. (Purificación y caracterización Bioquímica de AtSDH).

- **Laboratorio de Biología Vegetal**, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. Bajo la asesoría de Dra. Teresa Altabella. Pasantía de 2 meses (Evaluaciones en plantas, experimentos de estrés por deshidratación e inducción por frío)

## 2. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.

Los principales resultados obtenidos en este trabajo de tesis forman parte de la publicación recientemente aceptada (15 Enero 2013), disponible on-line y próxima a publicación (Mayo 2013) en revista Plant Science:

**SORBITOL DEHYDROGENASE is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism  
in *Arabidopsis thaliana***

María Francisca Aguayo, Diego Ampuero, Patricio Mandujano, Roberto Parada, Rodrigo Muñoz, Marta Gallart, Teresa Altabella, Ricardo Cabrera, Claudia Stange, Michael Handford.  
Plant Science, Volumes 205–206, May 2013, Pages 63–75.

## 3. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS.

### 3.1. Presentaciones orales:

**Francisca Aguayo**, Diego Ampuero, Roberto Parada, Patricio Mandujano, Michael Handford (2011). EXPRESSION AND BIOCHEMICAL ANALYSIS OF AtSDL, A PUTATIVE SORBITOL DEHYDROGENASE IN *ARABIDOPSIS THALIANA*. XXXIV Reunión Anual



Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, Valdivia, Chile. Desde el 27 al 30 de Septiembre 2011.

Diego Ampuero, Roberto Parada, Patricio Mandujano, **Francisca Aguayo**, Michael Handford (2010). METABOLISMO DE SORBITOL EN PLANTAS NO ROSACEAS. 61° Congreso Agronómico de Chile, 56th ISTH Annual Meeting – SIHT Reunión Anual, 11° Congreso Sociedad Chilena de Fruticultura. Santiago, Chile. Desde el 26 al 29 de Septiembre.

### 3.2. Comunicaciones libres (poster)

Roberto Parada, **Francisca Aguayo**, Sofia Zamudio, Diego Ampuero, Michael Handford (2012). SORBITOL METABOLISM IN *ARABIDOPSIS THALIANA*, A NON-TRANSLOCATING SORBITOL SPECIES. XXXV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, Puerto Varas, Chile. Desde el 25 al 28 de Septiembre 2012.

Roberto Parada, Diego Ampuero, **Francisca Aguayo**, Valentina Castillo, Michael Handford (2011) CHARACTERISATION OF AtSDL, A PUTATIVE SORBITOL DEHYDROGENASE IN *ARABIDOPSIS THALIANA*. VI Reunión Biología Vegetal. 30 Nov-2 Dic, Pucón, Chile.

Diego Ampuero, **Francisca Aguayo**, Roberto Parada, Patricio Mandujano, Michael Handford (2011). EXPRESSION AND BIOCHEMICAL ANALYSIS OF AtSDL, A PUTATIVE SORBITOL DEHYDROGENASE IN *ARABIDOPSIS THALIANA*. Annual Main Meeting Society for Experimental Biology. Scottish Exhibition and Conference Centre, Glasgow, Escocia. Desde el 1- 4 de Julio.

Parada, R., Ampuero, D., Mandujano, P., **Aguayo, F.**, Handford, M. (2010). ANALISIS DE LA EXPRESION DE AtSDL, UNA POSIBLE SORBITOL DESHIDROGENASA EN *ARABIDOPSIS THALIANA*. V Reunión Anual de la Sociedad de Biología Vegetal, Centro de convenciones El copihue, Olmue, Chile. Desde el 1 al 3 de Diciembre.

Diego Ampuero, Roberto Parada, Patricio Mandujano, **Francisca Aguayo**, Michael Handford (2010). CARACTERIZACIÓN DE UNA SUPUESTA SORBITOL DESHIDROGENASA EN *ARABIDOPSIS THALIANA*. XXXIII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Hotel Termas de Chillan, Chillan, Chile. Desde el 28 de Septiembre al 01 de Octubre.

## VII. Referencias

---

**Alcázar R, Planas J, Saxena T, Zarza X, Bortolotti C, Cuevas J, Bitrián M, Tiburcio AF, Altabella T** (2010) Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic Arabidopsis plants over-expressing the homologous Arginine decarboxylase 2 gene. *Plant Physiol Biochem.* 48: 547-552.

**Aldridge P, Metzger M, Geider K.** (1997) Genetics of sorbitol metabolism in *Erwinia amylovora* and its influence on bacterial virulence. *Molecular & General Genetics.* 256(6):611-619.

**Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR.** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653–657.

**Ampuero D.** (2012). Caracterización bioquímica y análisis del patrón de expresión de AtSDH, una poliol deshidrogenasa de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Biología Celular, Molecular y Neurociencias. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

**Avenaudo P, Castroviejo M, Claret S, Rosenbaum J, Mégraud F, Ménard A.** (2004) Expression and activity of the cytolethal distending toxin of *Helicobacter hepaticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318: 739–745.

**Banfield MJ, Salvucci ME, Baker EN y Smith CA.** (2001). Crystal structure of the NADP(H)-dependent ketose reductase from *Bemisia argentifolii* at 2.3 resolution. *J.Mol.Biol.* 306; 239-250.

**Bantog NA, Yamada K, Niwa N, Shiratake K and 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. Jap. Soc. Hortic. Sci.* 69: 231-236.

**Bellaloui N, Brown P, Dandekar A.** (1999). Manipulation of in vivo sorbitol production alters boron uptake and transport in tobacco. *Plant physiology*, 119: 735-42.

**Bieniawska Z, Espinoza C, Schlereth A, Sulpice R, Hinch DK, Hannah MA.** (2008). Disruption of the Arabidopsis Circadian Clock Is Responsible for Extensive Variation in the Cold-Responsive Transcriptome. *Plant Physiology*, 147: 263–279.

**Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KE, Görlach J.** (2001) Growth Stage–Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *The Plant Cell.* 13:1499–1510.

**Bradford MM.** (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.

**Brown P, Bellaloui N, Hu H, Dandekar A.** (1999). Transgenically enhanced sorbitol synthesis facilitates phloem boron transport and increases tolerance of tobacco to boron deficiency. *Plant physiology*, 119: 17-20.

**Bustin SA.** (2004). A-Z of Quantitative PCR. Capítulo 3: Quantification strategies in real-time PCR. 1-23. International University Line.



- Clark, A.J., Blissett, K.J., Oliver, R.P.** (2003). Investigating the role of polyols in *Cladosporium fulvum* during growth under hyper-osmotic stress and in planta. *Planta* 216, 614–619.
- Cuevas JC.** (2007). Implicación de las poliaminas en las respuestas a frío en *Arabidopsis*. Tesis de Doctorado en farmacia, Facultat de Farmàcia. Dept. Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia. Universitat de Barcelona.
- Cuevas JC, Lopez-Cobollo R, Alcázar R, Zarza X, Konez C, Altabella T, Salinas J, Tuburcio A, Ferrando A.** (2008). Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant physiology* 148; 1094-1105.
- 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.
- Deguchi M, Koshita Y, Gao M, Tao R, Tetsumura T, Yamaki S and Kanayama Y.** (2004) Engineered sorbitol accumulation induces dwarfism in Japanese persimmon. *J. Plant Physiol.* 161: 1177-1184.
- Dixon DP, Skipsey M, Grundy NM, Edwards R.** (2005) Stress-Induced Protein S-Glutathionylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138: 2233-2244.
- Dinant S, Lemoine R.** (2010). The phloem pathway: new issues and old debates. *Comptes rendus biologiques*, 333: 307-19.
- Doehlert DC.** (1987). Ketose reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol.* 84: 830-834.
- Ebert B, Zöller D, Erban A, Fehrle 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.
- Gao M, Tao R, Miura K, Dandekar AM, Sgiura A** (2001) Transformation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant Science* 160; 837-845.
- Gao ZF, Maurousset L, Lemoine R, Yoo SD, 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 ZF, Jayanty S, Beaudry R, Loescher W** (2005) Sorbitol transporter expression in apple sink tissues: Implications for fruit sugar accumulation and watercore development. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 130: 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.
- Gibon Y, Usadel B, Blaesing OE, Kamlage B, Hoehne M, Trethewey R, Stitt M.** (2006) Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in *Arabidopsis* rosettes. *Genome Biology* 7:R76.
- Guo ZX, Pan TF, Li KT, Zhong FL, Lin L, PanDM, Lu LX.** (2012). Cloning of NAD-SDH cDNA from plum fruit and its expression and characterization. *Plant Physiol. Biochem.* 57:175-180.



**Hirai M.** (1983). Seasonal changes in sorbitol-6-phosphate dehydrogenase in loquat leaf. *Plant Cell Physiol.* 24: 925-931.

**Hoagland DR, Arnon DI.** (1938). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agric. Exp. Station circular.* 347: 1-39.

**Huh, G.H., Damsz, B., Matsumoto, T.K., Reddy, M.P., Rus, A.M., Ibeas, J.I., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M.** (2002) Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J.* 29: 649-659.

**Ito A, Hayama H, Kashimura Y.** (2005) Partial cloning and expression analysis of genes encoding NAD<sup>+</sup>-dependent sorbitol dehydrogenase in pear bud during flower bud formation. *Scientia Horticulturae* 103: 413-420.

**Jeffery J, Cederlund E, Jornvall H.** (1984) Sorbitol dehydrogenase The primary structure of the sheep-liver enzyme. *Eur. J. Biochem.* 140: 7-16.

**Jensen PJ, Halbrendt N, Fazio G, Makalowska I, Altman N, Praul C, Maximova SN, Ngugi HK, Crassweller RM, Travis JW, McNellis TW.** (2012) Rootstock-regulated gene expression patterns associated with fire blight resistance in apple. *BMC Genomics* 13:9.

**Johansson K, El-Ahmad M, Kaiser C, Jornvall H, Eklund H, Hoog J and Ramaswamy S.** (2001) Crystal structure of sorbitol dehydrogenase. *Chem. Biol. Interact.* 130-132: 351-358.

**Kandler O, Hopf H** (1982) Oligosaccharides based on sucrose (sucrosyl oligosaccharides). In Loewus FA, Tanner W (eds), *Encyclopedia of Plant Physiology: Plant Carbohydrates I, Intracellular Carbohydrates New Series.* 13a. 348-383. Springer-Verlag, Berlin.

**Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung DY, Guy CL.** (2004) Exploring the Temperature-Stress Metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136: 4159-4168.

**Kim DM, Ktgawa T, Choi C-Y, Yokoyama S.** (1996) A highly efficient cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 239: 881-886.

**Kim DM, Swartz JR.** (1999) Prolonging Cell-Free Protein Synthesis with a Novel ATP Regeneration System. *Biotechnology and bioengineering* 66: 180-188.

**Kim H, Ahn J, Choi J, Hwang B, y Choi D.** (2007). Expression and cloning of the full-length cDNA for sorbitol-6-phosphate dehydrogenase and NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from pear (*Pyrus pyrifolia* N.). *Scientia Horticulturae*, 112: 406-412.

**Kim JM, Woo D-H, Kim S-H, Lee S-Y, Park H-Y, Seok H-Y, Chung WS, Moon Y-H.** (2012). *Arabidopsis* MKKK20 is involved in osmotic stress response via regulation of MPK6 activity. *Plant Cell Rep* 31: 217-224.

**Klepek YS, Geiger D, Stadler R, Klebl F, Landouar-Arsivaud L, Lemoine R, Hedrich R and Sauer N.** (2005) *Arabidopsis* POLYOL TRANSPORTER5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H<sup>+</sup>-symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. *Plant Cell* 17: 204-218.

**Klepek YS, Volke M, Konrad KR, Wippel K, Hoth S, Hedrich R and Sauer N.** (2010) *Arabidopsis thaliana* POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTERS 1 and 2: fructose and xylitol/H<sup>+</sup> symporters in pollen and young xylem cells. *J Exp Bot.* 61: 537-550.

**Kumar D, Singh P, Yusuf MA, Upadhyaya CP, Roy SD, Hohn T, Sarin NB.** (2012) The xerophyta viscosa aldose reductase (ALDRXV4) confers enhanced drought and salinity tolerance to transgenic tobacco plants by scavenging methylglyoxal and reducing the membrane damage. *Mol Biotechnol*. Publicado online 8 jun 2012.

**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.

**Laby RJ, Kincaid SM, Kim D and Gibson SI.** (2000) The Arabidopsis sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *The Plant Journal* 23, 587-596.

**Leegood RC, Sharkey TD, Von Caemmerer S.** (2000) Photosynthesis: Physiology and Metabolism. En Loescher WH y Everard JD (eds), *Regulation of sugar alcohol biosynthesis*. 275-293. Kluwer Academic Publishers.

**Lindstad R, Koll P, McKinley-McKee J.** (1998) Substrate specificity of sheep liver sorbitol dehydrogenase. *Biochem.J.* 330: 479-487.

**Lo Bianco R, Rieger M, Sung SJ.** (1999) Carbohydrate metabolism of vegetative and reproductive sinks in the latematuring peach cultivar 'Encore'. *Tree Physiol*. 19: 103-109.

**Lo Piero AR, Puglisi I, Petrone G.** (2006) Gene characterization, analysis of expression, and in vitro synthesis of dihydroflavonol 4-reductase from [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Phytochemistry* 67: 684-695.

**Loescher WH, Marlow G C y Kennedy R A.** (1982). Sorbitol metabolism and source-sink interconversions in developing apple leaves. *Plant Physiol* 70: 335–339.

**Loescher WH, McCamant T, Keller JD.** (1990) Carbohydrate reserves, translocation, and storage in woody plant roots. *HortScience* 25: 274-281.

**Luque T, Hjelmqvist L, Marfany G, Danielsson O, El-Ahmad M, Persson B, Jörnvall H, González-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.

**Maldonado J.** (2012). Estructura y dinámica molecular de AtSDL. Unidad de Investigación I. Doctorado en Biología Molecular, Celular y Neurociencias. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

**Mandujano P.** (2010). Localización sub-celular y caracterización bioquímica de AtSDH una putativa sorbitol deshidrogenasa. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas, con Mención en Biología Celular, Molecular y Neurociencias. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

**Maret W, Auld DS.** (1988) Purification and characterization of human liver sorbitol dehydrogenase, *Biochemistry*. 27: 1622–1629.

**Marini I, Bucchioni L, Borella P, Corso A, Mura U.** (1997) Sorbitol dehydrogenase from bovine lens: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys*. 340: 383-391.

**Maurel K, Leite GB, Bonhomme M, Guilliot A, Rageau R, Petel G and Sakr S.** (2004) Trophic control of bud break in peach (*Prunus persica*) trees: a possible role of hexoses. *Tree Physiol*. 24: 579-588.



**Michael TP, Mockler TC, Breton G, McEntee C, Byer A, Trout JD, Hazen SP, Shen R, Priest HD, Sullivan CM, Givan SA, Yanovsky M, Hong F, Kay SA and Chory J. (2008)** Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS Genet.* 4: e14.

**Munns, R. (2002)** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25, 239–250.

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

**Negm FB and, Loescher WH. (1979)** Detection and characterization of sorbitol dehydrogenase from apple callus tissue. *Plant Physiol.* 64: 69-73.  
**Ng K, Ye R, Wu X, Wong S (1992)** Sorbitol dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 267: 24989-24994.

**Nosarzewski M, Clements A M, Downie A B y Archbold D D (2004).** Sorbitol dehydrogenase expression and activity during apple fruit set and early development. *Physiologia Plantarum.* 121: 391–398.

**Nosarzewski M, Downie AB, Wu B and Archbold DD. (2012)** The role of sorbitol dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology* 39: 462–470.

**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<sup>+</sup> 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, 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.

**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.

**Pessarakli M, Tan KH. (2010)** Books in Soils, Plants, and the Environment : Handbook of Plant and Crop Stress (3rd Edition). En Figueroa CM, Iglesias AA, Podestá FA (eds), Carbon metabolism and plant stress. 447-463. CRC Press, London.

**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.

**Pfaffl MW. (2001)** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.

**Pommerrenig B, Papini-Terzi FS, Sauer N. (2007).** Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. *Plant physiology*, 144: 1029-1038.

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

**Ranney TG, Bassuk NL, Whitlow TH.** (1991). Osmotic adjustment and solute constituents in leaves and roots of water-stressed cherry (*Prunus*) trees. *J. Am.Soc.Hor.Sci.* 116: 684-688.

**Rapala-Kozik M, Wolak N, Kujda M, Banas AK.** (2012). The upregulation of thiamine (vitamin B1) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings under salt and osmotic stress conditions is mediated by abscisic acid at the early stages of this stress response. *BMC Plant Biology*, 12:2

**Reinders A, Panshyshyn JA, Ward JM.** (2005) Analysis of transport activity of *Arabidopsis* sugar alcohol permease homolog AtPLT5. *Journal of Biological Chemistry* 280: 1594-1602.

**Richard P, Toivari MH and Penttilä M.** (1999) Evidence that the gene YLR070c of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase. *FEBS Lett.* 457: 135-138.

**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 Physiology* 134: 1683–1696.

**Roessner-Tunali, U., Bjorn, H., Lytovchenko, A., Carrari, F., Brueddiagam, C., Granot, D., Fernie, A.R.** (2003). Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpression hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiol.* 133, 84-99.

**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

**Sheveleva EV, Marquez S, Chmara W, Zegeer A, Jensen RG and Bohnert HJ.** (1998) Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco. High amounts of sorbitol leads to necrotic lesions. *Plant Physiology* 117: 831-839.

**Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M.** (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr.Opin.Plant Biol.* 6: 410-417.

**Srivastava SK, Ramana KV and Bhatnagar A.** (2005) Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr. Rev.* 26: 380-392

**Stoop JMH, Williamson JD, Pharr DM.** (1996) Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends Plant Sci* 1: 139–144

**Tao R, Uratsu SL and Dandekar AM.** (1995) Sorbitol synthesis in transgenic tobacco with apple cDNA encoding NADPdependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant Cell Physiol.* 36 (3): 525–532.

**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.

**van der Weele, C.M., Spollen, W.G., Sharp, R.E. and Baskin, T.I.** (2000) Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *J. Exp. Bot.* 51, 1555–1562.



- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A.** (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 1-9.
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu J-K.** (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* 45: 523-539.
- Verslues, P.E., Ober, E.S. and Sharp, R.E.** (1998) Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. *Plant Physiol.* 116, 1403-1412.
- 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.
- Wang Z, Quebedeaux B, Stutte GW.** (1996) Partitioning of [<sup>14</sup>C] glucose into sorbitol and other carbohydrates in apple under water stress. *Funct. Plant Biol.* 23: 245-251.
- Watari J, Kobae Y, Yamaki S, Yamada K, Toyofuku K, Tabuchi T, Shiratake K** (2004) Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves. *Plant Cell Physiol.* 45: 1031-1041.
- Webb SJ, Bhorjee JS.** (1968) Infrared studies of DNA, water, and inositol associations. *Can. J. Biochem* 46: 691-695.
- Wienkoop S, Baginsky S, Weckwerth W.** (2010) *Arabidopsis thaliana* as a model organism for plant proteome research. *Journal of proteomics* 73: 2239-48.
- Williams MW, Raese JT.** (1974) Sorbitol in tracheal sap of apple as related to temperature. *Physiol. Plant.* 30: 49-52.
- Wilkins O, Bräutigam K, Campbell MM.** (2010) Time of day shapes *Arabidopsis* drought transcriptomes. *The Plant Journal* 63: 715-727.
- Xiong L, Wang R-G, Mao G, Koczan JM.** (2006). Identification of Drought Tolerance Determinants by Genetic Analysis of Root Response to Drought Stress and Abscisic Acid. *Plant Physiology*, 142: 1065-1074.
- Yaginuma T, Kobayashi M and Yamashita O.** (1990) Distinct effects of different low temperatures on the induction of NADsorbitol dehydrogenase activity in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Comp. Physiol. B* 160: 277-285.
- Yamada K, Niwa N, Shiratake K and Yamaki S.** (2001) cDNA cloning of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from peach fruit and its expression during fruit development. *J. Hort. Sci. Biotech.* 76: 581-587
- Yamaguchi H, Kanayama Y and Yamaki S.** (1994) Purification and properties of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit. *Plant Cell Physiol.* 35: 887-892.
- Yamaki S** (1980) Properties and functions of sorbitol-6-phosphate dehydrogenase, sorbitol dehydrogenase, sorbitol oxidase in fruit and cotyledon of apple (*Malus domestica* Mill. var. *domestica* Schneid). *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 49: 429-434.
- Yennawar H, Møller M, Gillilan R, Yennawar N.** (2011) X-ray crystal structure and small-angle X-ray scattering of sheep liver sorbitol dehydrogenase. *Acta Cryst. D67:* 440-446.

**Zamudio S.** (2010). Determinación de la localización subcelular y la expresión de AtS6PDH, una potencial sorbitol-6-fosfato Deshidrogenasa en *Arabidopsis thaliana*. Seminario de título para Ingeniería en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

**Zhang Q, Fry J, Rajashekar Ch, Bremer D.** (2009) Membrane Polar Lipid Changes in Zoysiagrass Rhizomes and Their Potential Role in Freezing Tolerance. J. AMER. SOC. HORT. SCI. 134(3): 322-328.

**Zhou R, Cheng L, Wayne R** (2003) Purification and characterization of sorbitol-6-phosphate phosphatase from apple leaves. Plant Sci. 165: 227-232.