

UCH-FC
MAG-B
Z-26
C.1



ESCUELA DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**Estudios Bioquímicos y Fisiológicos de *AtA6PR*,
una posible Aldosa-6-fosfato Reductasa 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

Por

M. SOFÍA ZAMUDIO CAÑAS

Director de Tesis: Michael Handford, Ph. D

Julio, 2014

Santiago – Chile

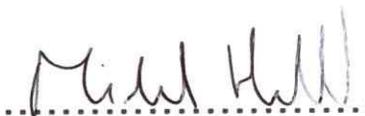
**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

MARIA SOFIA ZAMUDIO CAÑAS

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 11 de Junio del año 2014.

Michael Handford, Ph. D
Director de Tesis



Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Victoria Guixé
Presidenta



Dra. Lorena Norambuena



BIOGRAFIA

En el mes de mayo, en un momento de gran actividad, se firmó el convenio de colaboración entre la Universidad de Chile y el Centro de Estudios de la Mujer, en el marco del cual se estableció un programa de actividades conjuntas. Después de esto, se inició el trabajo de campo en la Universidad de Chile, donde se formó un grupo de trabajo con el fin de investigar las condiciones de vida de las mujeres que trabajan en el sector privado. Este grupo de trabajo se reunió varias veces durante ese tiempo, para discutir los resultados de las investigaciones y planificar las actividades futuras. En el mes de mayo, se realizó un taller de trabajo con las mujeres que trabajan en el sector privado, con el fin de conocer sus condiciones de vida y sus necesidades. Este taller se realizó en la Universidad de Chile, y contó con la participación de un grupo de mujeres que trabajan en el sector privado. Durante el taller, se discutieron los resultados de las investigaciones y se planificaron las actividades futuras. En el mes de mayo, se firmó el convenio de colaboración entre la Universidad de Chile y el Centro de Estudios de la Mujer, en el marco del cual se estableció un programa de actividades conjuntas. Después de esto, se inició el trabajo de campo en la Universidad de Chile, donde se formó un grupo de trabajo con el fin de investigar las condiciones de vida de las mujeres que trabajan en el sector privado. Este grupo de trabajo se reunió varias veces durante ese tiempo, para discutir los resultados de las investigaciones y planificar las actividades futuras. En el mes de mayo, se realizó un taller de trabajo con las mujeres que trabajan en el sector privado, con el fin de conocer sus condiciones de vida y sus necesidades. Este taller se realizó en la Universidad de Chile, y contó con la participación de un grupo de mujeres que trabajan en el sector privado. Durante el taller, se discutieron los resultados de las investigaciones y se planificaron las actividades futuras.

Un poco para todos

BIOGRAFIA



Nací la menor de tres hermanos un 16 de Mayo, en el ruidoso Santiago de Chile. Desde muy chica, tuve un gran interés por la naturaleza, además de ser muy curiosa y querer saber cómo funcionaba todo (molestando frecuentemente a todo el mundo con mis preguntas). Después de salir del Colegio de la Salle, donde conocí a algunas de las personas que marcaron mi vida, entré a Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile, donde formamos un grupo único de amigos, con quienes compartí los mejores años de carretes, colapsos, risas, noches de estudio, paseos, viajes, estrés, acampadas, etc. Durante ese tiempo, incursioné en varios laboratorios, hasta que llegué a BMV, donde realicé mi Seminario de Título y Tesis de Magister rodeada de un gran grupo de personas, siempre dispuestos a apoyarse, ayudar y celebrar. Que en los años venideros se mantenga ese espíritu.

Un beso para todos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia por siempre estar ahí para escucharme, apoyarme y celebrar conmigo cada vez. A mis hermanos, por tratar de entender lo inentendible y a mi papá por siempre estar listo para sufrir conmigo. Especialmente a mi mamá, por escucharme hasta el cansancio y mas allá, compartiendo mis frustraciones, angustias y éxitos.

También a mis compañeros y amigos de la carrera y del laboratorio, por compartir conmigo los momentos más increíbles desde el primer día y hacer de estos años la experiencia más fantástica. También a mis amigos de la vida, por su cariño y preocupación.

Agradezco en especial a mi tutor de Tesis, el Dr. Michael Handford por su paciencia, guía, confianza y buena disposición ante cualquier duda o petición.

Se agradece especialmente al laboratorio de Bioquímica del Dr. Ricardo Cabrera (Facultad de Ciencias, Universidad de Chile) y Rodrigo Muñoz por la orientación y equipamiento para los ensayos enzimáticos de esta Tesis y a la Unidad de Postcosecha (INIA – CRI La Platina) por facilitar el equipo para los análisis de azúcares realizados.

INDICE DE MATERIAS

1	Introducción	1
1.1	Papel y metabolismo de poli-alcoholes en plantas.	1
1.2	Aldosa-6-fosfato reductasas (A6PR)	3
1.2.1	Estructura y actividad.....	3
1.2.2	Expresión y rol de A6PR en el metabolismo de rosáceas.	5
1.3	A6PR y sorbitol en no-rosáceas y no-plantagináceas.....	6
1.4	Sorbitol en <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
1.5	Investigación propuesta y estrategia desarrollada.	10
2	Hipótesis	12
3	Objetivos.....	12
3.1	Objetivo General	12
3.2	Objetivos Específicos	12
4	Materiales y Métodos.....	13
4.1	Material Biológico.....	13
4.1.1	Cultivos de bacterias	13
4.1.2	Preparación de <i>A. tumefaciens</i> GV3101 quimiocompetentes.....	13
4.1.3	Preparación de <i>E. coli</i> BL21 y BL21 pLysS quimiocompetentes.	13
4.1.4	Cultivo de plantas en medio hidropónico.....	14
4.1.5	Cultivo de plantas en placa.....	14
4.2	Extracción de ácidos nucleicos.....	15
4.2.1	DNA genómico	15
4.2.2	DNA plasmidial	15
4.2.3	RNA total	15
4.3	Cuantificación y comprobación de la calidad de ácidos nucleicos.	16
4.3.1	Cuantificación	16
4.3.2	Integridad y calidad.....	16
4.4	Diseño de partidores.	16
4.5	Generación de cDNA	19
4.5.1	Tratamiento con DNasa	19

4.5.2	RT-PCR.....	19
4.6	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	19
4.7	PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).....	21
4.7.1	Curva de eficiencia de partidores.....	22
4.7.2	PCR cuantitativo.....	23
4.8	Vectores utilizados.....	24
4.8.1	pCR®8/GW/TOPO®.....	24
4.8.2	pEXP5-NT/TOPO®.....	24
4.8.3	pGWB2 y pGWB8.....	25
4.8.4	pET28a-AtA6PR y pET19b-MdA6PR.....	26
4.9	Clonación de AtA6PR.....	26
4.9.1	Vectores pEXP5-NT/TOPO® y pCR®8/GW/TOPO®.....	26
4.9.2	Vectores pGWB2-AtA6PR y pGWB8-AtA6PR.....	28
4.10	Análisis molecular de vectores.....	28
4.10.1	pEXP5-NT-AtA6PR.....	28
4.10.2	pCR8-AtA6PR.FL y pCR8-AtA6PR.ss.....	29
4.10.3	pGWB2-AtA6PR.....	29
4.10.4	pGWB8-AtA6PR.....	29
4.11	Transformación genética de material biológico.....	29
4.11.1	<i>Escherichia coli</i> quimiocompetentes.....	29
4.11.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> quimiocompetentes.....	30
4.11.3	<i>Nicotiana tabacum</i> – transformación transitoria.....	30
4.11.4	<i>Arabidopsis thaliana</i> – transformación estable.....	30
4.12	Análisis de plantas.....	31
4.12.1	Transformación transitoria – <i>N. tabacum</i>	31
4.12.2	Transformación estable – <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
4.12.3	Mutantes insercionales SALK.....	32
4.13	Extracción y análisis de azúcares.....	32
4.13.1	Extracción de azúcares.....	32
4.13.2	Análisis de azúcares.....	33
4.14	Extracción de proteínas.....	33
4.14.1	Extracción desde plantas – SDS-PAGE.....	33
4.14.2	Extracción desde plantas – Actividad.....	34

4.14.3	Extracción desde microorganismos.....	34
4.15	Expresión <i>in vitro</i> de proteínas.....	35
4.16	Análisis de proteínas.....	35
4.16.1	SDS-PAGE.....	35
4.16.2	Western-blot.....	36
4.16.3	Purificación de proteínas.....	36
4.17	Ensayos de actividad.....	37
5	Resultados.....	38
5.1	Formación de los vectores pGWB2-AtA6PR, pGWB8-AtA6PR y pEXP5-NT-AtA6PR.....	38
5.2	AtA6PR obtenida por transformación transitoria de <i>N. tabacum</i>	39
5.2.1	Expresión de AtA6PR y AtA6PR-His.....	39
5.2.2	Purificación y actividad.....	41
5.3	His-AtA6PR obtenida por sistema de expresión <i>in vitro</i>	42
5.4	His-AtA6PR obtenida por expresión en bacteria.....	43
5.4.1	Expresión en bacteria.....	43
5.4.2	Purificación.....	46
5.4.3	Actividad de His-AtA6PR.....	47
5.5	Obtención de plantas con menores niveles de expresión de <i>AtA6PR</i>	51
5.5.1	Transformantes con pMDC43-AtA6PR.....	51
5.5.2	Mutantes SALK.....	54
5.6	Caracterización de líneas <i>ata6pr-1</i> , <i>ata6pr-2</i> , L4 y L5 en condiciones de crecimiento estándar.....	57
5.6.1	Niveles de transcrito de <i>AtA6PR</i>	57
5.6.2	Fenotipo de <i>ata6pr-1</i> y <i>ata6pr-2</i>	60
5.7	Caracterización de líneas <i>ata6pr-1</i> y <i>ata6pr-2</i> bajo estrés.....	61
5.7.1	Niveles de transcrito de <i>AtA6PR</i>	61
5.7.2	Fenotipo de <i>ata6pr-1</i> y <i>ata6pr-2</i>	66
6	Discusión.....	72
6.1	Obtención de His-AtA6PR y actividad enzimática.....	72
6.1.1	Actividad de AtA6PR.....	74
6.2	Obtención y análisis de líneas mutantes SALK y pMDC43-AtA6PR.....	75
6.2.1	<i>ata6pr-</i> bajo condiciones estándar de crecimiento.....	78

6.2.2	<i>ata6pr</i> - bajo estrés salino.....	80
7	Conclusiones	82
8	Proyecciones	84
9	Bibliografía.....	86

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo del sorbitol en hojas y órganos sumidero	2
Figura 2: Modelo tridimensional de A6PR de manzana.....	4
Figura 3: Niveles de transcrito de AtA6PR y At2g21260 en Arabidopsis.....	9
Figura 4: Formación de vectores por sistema TOPO	26
Figura 5: Formación de vectores por recombinación	27
Figura 6: Expresión de AtA6PR en hojas de tabaco	41
Figura 7: Purificación parcial de AtA6PR producida en plantas.....	42
Figura 8: Expresión <i>in vitro</i> de His-AtA6PR a diferentes temperaturas	12
Figura 9: Optimización de las condiciones de inducción de His-AtA6PR y His-MdA6PR	46
Figura 10: Purificación de 6xHis-AtA6PR por columnas de Níquel	48
Figura 11: Optimización de la obtención His-AtA6PR	50
Figura 12: Actividad de His-AtA6PR y His-MdA6PR en extractos crudos de proteína	51
Figura 13: Análisis molecular de Arabidopsis transformadas con pMDC43-AtA6PR....	12
Figura 14: Mutantes insercionales SALK	56
Figura 15: Genotipificación de plantas de la colección SALK.....	57
Figura 16: Localización de T-DNA en líneas mutantes SALK.....	58
Figura 17: Niveles de transcrito de <i>AtA6PR</i> en las líneas analizadas	60
Figura 18: Expresión relativa de <i>AtA6PR</i> y <i>At2g21260</i> en <i>ata6pr-1</i> y <i>ata6pr-2</i>	61
Figura 19: Fenotipo de Arabidopsis de tipo silvestre (WT), <i>ata6pr-1</i> y <i>ata6pr-2</i> en condiciones estándares de crecimiento	62
Figura 20: Expresión de <i>AtA6PR</i> en plantas bajo estrés abiótico.....	64
Figura 21: Expresión de <i>AtA6PR</i> , <i>At2g21260</i> y <i>RD29A</i> en plantas tipo silvestre y líneas mutantes sometidas a estrés salino durante 15 días	67
Figura 22: Tasa de germinación de semillas tipo silvestre, <i>ata6pr-1</i> y <i>ata6pr-2</i> bajo estrés salino	68
Figura 23: Supervivencia de plántulas tipo silvestre, <i>ata6pr-1</i> y <i>ata6pr-2</i> bajo estrés salino.....	69

Figura 24: Crecimiento de plántulas tipo silvestre, <i>ata6pr-1</i> y <i>ata6pr-2</i> bajo estrés salino	71
Figura 25: Principales sacáridos encontrados en <i>Arabidopsis</i> de tipo silvestre y en las líneas <i>ata6pr-1</i> y <i>ata6pr-2</i>	73

INDICE DE TABLAS

Tabla I: Partidores utilizados.....	18
Tabla II: Protocolos de termociclador para PCR	21
Tabla III: Mezclas utilizadas para PCR s.....	22
Tabla IV: Vectores utilizados.....	28
Tabla V: Análisis de segregación de plantas T2 resistentes y sensibles a higromicina en las líneas transformadas.....	55
Tabla VI: Eficiencia de los partidores utilizados	59

ABREVIATURAS

6xHis: Epítoto de 6 histidinas.

6xHis-MdA6PR: A6PR de *Malus x domestica* fusionada a un epítoto de 6 histidinas N-terminal.

A6PR: Aldosa-6-fosfato Reductasa.

AGI: Código de identificación para un gen particular entregado por el Arabidopsis Genome Initiative.

APS: Amonio persulfato.

BCIP: 5-bromo-4-chloro-3'-indolifosfato.

BME: β -mercaptoetanol.

CDS: Secuencia codificante del DNA (Coding DNA Sequence).

C_t: Número de ciclos en el cual se alcanza el límite de detección de fluorescencia de un equipo de Real Time PCR.

D.O.₆₀₀: Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm.

DTT: Ditiotreitól.

EDTA: Ácido etilendiamintetraacético (Ethylenediaminetetraacetic Acid).

F6P: Fructosa-6-fosfato.

GFP: Proteína fluorescente verde (Green Fluorescent Protein).

G6P: Glucosa-6-fosfato.

IMAC: Cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography).

IPTG: Isopropiltio- β -galactosido.

K_i: Constante de inhibición. Corresponde a la mitad de la concentración necesaria para producir la inhibición máxima.

K_m: Constante de Michaelis-Menten. Corresponde a la mitad de la concentración de sustrato con la cual una enzima alcanza su V_{max} .

MS: Murashige & Skoog.

NBT: Nitro blue tetrazolium.

O.N.: Over Night (período de tiempo entre 16 – 24 hrs).

ORF: Marco de lectura abierto (Open Reading Frame).

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reaction).

P_i: Fosfato inorgánico.

PMSF: Fenil-metil-sulfonil fluoride.

qRT-PCR: PCR cuantitativo en Tiempo Real.

RT-PCR: PCR de Transcripción Reversa.

S6P: Sorbitol-6-fosfato.

SGPT: Silenciamiento génico post-transcripcional.

TEMED: N,N,N,N tetrametiletilendiamina.

V_{max}: Es la velocidad máxima de una reacción enzimática cuando el sitio de fijación se encuentra saturado con sustrato.

RESUMEN

Los polioles son carbohidratos que pueden ser transportados a través del floema de las plantas, aportando varias ventajas al metabolismo – incluyendo mayor tolerancia a estrés abiótico – y constituyendo en algunas familias la principal forma de carbono translocado. El sorbitol es el poli-alcohol de mayor presencia en plantagináceas y rosáceas (por ejemplo manzana), siendo sintetizado a partir de glucosa-6-fosfato por la aldosa 6-fosfato reductasa (A6PR), la enzima clave de esta vía. En estas familias, esta proteína se ha asociado al metabolismo de carbohidratos – produciendo alteraciones importantes en los azúcares solubles (glucosa, fructosa, sacarosa) y sorbitol cuando su expresión es modificada – y con una mayor tolerancia al estrés abiótico. En no-rosáceas y no-plantagináceas, se han encontrado numerosas proteínas similares a A6PR y otras enzimas relacionadas al metabolismo de polioles, también participando en la tolerancia a estrés abiótico, especialmente salino. En una de estas especies, *Arabidopsis thaliana*, se ha detectado sorbitol y se ha descrito previamente una sorbitol deshidrogenasa (SDH, capaz de oxidar sorbitol así como otros polioles). Adicionalmente, esta especie presenta dos posibles ortólogos a A6PR que comparten las principales características moleculares de estas enzimas, de los cuales uno presenta niveles de transcrito considerablemente mayores en la planta. Este ortólogo, conocido como AtA6PR, corresponde a una proteína citosólica expresada en tallos, hojas y flores.

El objetivo de esta Tesis de Magister fue determinar la actividad enzimática y posible rol metabólico de AtA6PR. Para ello, se expresó la proteína en diversos sistemas, y se estudiaron plantas mutantes con menores niveles de transcritos de *AtA6PR*. Como resultado, se obtuvo que la expresión de AtA6PR recombinante fusionada a un epítipo de 6 histidinas (His-AtA6PR) en *Escherichia coli* fue el sistema más eficiente para realizar los ensayos enzimáticos posteriores. En éstos, se comprobó que His-AtA6PR corresponde a una enzima capaz de reducir NADP⁺ en presencia de sorbitol-6-fosfato con aproximadamente la mitad de la actividad reportada para His-MdA6PR de manzana (utilizada como control positivo); sin embargo no fue posible determinar oxidación de NADPH en presencia de glucosa-6-fosfato. De las dos

estrategias realizadas para obtener mutantes con menor nivel de transcrito de *AtA6PR*, las mutantes insercionales de la colección SALK cumplieron los requisitos para los posteriores análisis de fenotipo y tolerancia a estrés salino. Si bien no se observaron grandes cambios morfológicos en las líneas mutantes en estos experimentos, sí se distinguieron efectos metabólicos, con plántulas mutantes con menor acumulación de azúcares solubles bajo condiciones estándar de crecimiento, diferencias que desaparecieron en plántulas crecidas bajo altas concentraciones de sal (75 y 125 mM). Futuros estudios podrían profundizar en la relación entre *AtA6PR* y el metabolismo de carbohidratos, respuesta a estrés, fotosíntesis y ritmo circadiano a través de diversas estrategias, así como también intentar determinar, a través de métodos directos o indirectos, la actividad enzimática de *AtA6PR* nativa.

ABSTRACT

Polyols are carbohydrates that can be transported through the phloem of plants, which provide several metabolic advantages – including improved tolerance to abiotic stress – and are the main form of carbon translocated in some families. Sorbitol is the main polyol in Plantaginaceae and Rosaceae (such as apple), and is synthesised from glucose-6-phosphate by aldose 6-phosphate reductase (A6PR), the key enzyme of this pathway. In these families, the enzyme has been associated with carbohydrate metabolism – causing major changes in soluble sugar (glucose, fructose, sucrose) and sorbitol content when its expression is modified – and with improved tolerance to abiotic stress. In non-Rosaceae and non-Plantaginaceae, many A6PR-like and other polyol-related like proteins have been found to be involved in abiotic stress tolerance, especially saline stress. In one of these species, *Arabidopsis thaliana*, sorbitol has been found and a sorbitol dehydrogenase (SDH, able to oxidise sorbitol and other polyols) has been described previously. Additionally, two A6PR orthologs are present in this species. These share the main molecular features of A6PRs and one of them presents significantly higher transcript levels. This ortholog named AtA6PR is a cytosolic protein which is expressed in different organs.

The aim of this Master's degree thesis was to determine the enzymatic activity and possible metabolic role of AtA6PR. To accomplish this aim, the protein was expressed in various biological systems and expression-deficient mutants were obtained. Results reveal that expression of recombinant AtA6PR fused to an N-terminal 6-histidine tag (His-AtA6PR) in *Escherichia coli* proved to be the most efficient system adequate for subsequent enzyme assays. In these, AtA6PR was proven to be a NADP⁺ - reducing enzyme – in the presence of sorbitol-6-phosphate – with approximately half of the activity reported for apple His-MdA6PR (used as positive control). However, NADPH oxidation in the presence of glucose-6-phosphate was not observed. Of the two strategies to obtain mutants with reduced *AtA6PR* transcript levels, the SALK collection insertional mutants fulfilled this requirement, and were thus used in phenotypic and saline stress tolerance tests. Although no great morphological changes in mutant lines were seen in these experiments, metabolic effects were observed: mutant seedlings

showed lower soluble sugar accumulation under standard growth settings but this difference disappeared in seedlings grown under high salt (75 and 125 mM). Future work could focus on the relation of AtA6PR to sugar metabolism, stress responses, photosynthesis and circadian rhythms and also try to establish native AtA6PR enzymatic activity through direct or indirect means.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Papel y metabolismo de poli-alcoholes en plantas.

Los poli-alcoholes o alcoholes de azúcar (productos reducidos de azúcares lineales) como manitol, galactitol y sorbitol se encuentran ampliamente distribuidos entre angiospermas, siendo el manitol el de más amplia distribución (Lewis y Smith, 1967). Son los únicos carbohidratos, además de la sacarosa y rafinosa, que se transportan por el floema de las plantas superiores, constituyendo en algunas familias la principal forma de carbono translocado (manitol en las *Apiaceae*, *Oleaceae*, *Combretaceae* y *Plantaginaceae*, galactitol en las *Celastraceae* y sorbitol en las *Plantaginaceae* y *Rosaceae*) y pudiendo llegar a formar 50-90% del carbono en el floema (Watari y cols, 2004). Numerosas especies de interés económico utilizan poli-alcoholes como principal producto fotosintético, que les otorgan mayor tolerancia al estrés abiótico – están involucrados en la adaptación osmótica ya que actúan como osmorreguladores endógenos, además estabilizan macromoléculas como membranas y proteínas ante el estrés por frío, sequía, salino y oxidativo – y facilitan la movilización de boro por el floema (Oberschall y cols., 2000; Bellallouie y cols., 2003; Hinch y Hagemann, 2004; Pommerrenig y cols, 2007; Taravati y cols, 2007; Kanayama, 2009). Además son carbohidratos altamente solubles, químicamente estables (Ahmad y cols, 1979, Deguchi y cols, 2002), participan en la interacción planta-patógeno y actúan como osmoreguladores endógenos y sumideros de poder reductor (Kanayama, 2009; Reidel y cols, 2009).

Debido a estas características, estas moléculas han sido ampliamente estudiadas en diferentes especies. Uno de los que suscita mayor interés es el sorbitol, la forma reducida de glucosa. Este poliol es el carbohidrato de mayor presencia en las familias *Plantaginaceae* (por ejemplo, llantén y *Plantago maritima*) y *Rosaceae* (que incluye especies como manzano, durazno, damasco, níspero, almendro, etc. Kanayama, 2009). En estas especies, el sorbitol se sintetiza como producto primario de la fotosíntesis en hojas fuente a partir de glucosa-6-fosfato (G6P, **Figura 1**). Este compuesto se transforma en sorbitol-6-fosfato (S6P) por la acción de la aldosa-6-fosfato reductasa (A6PR; también llamada sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa, S6PDH, E.C. 1.1.1.200) y luego es desfosforilado por la sorbitol-6-fosfato fosfatasa (S6PP, E.C.

3.1.3.50). Además, una vía menor de síntesis (activa sólo en hojas jóvenes) usa la NADP-sorbitol deshidrogenasa (NADP-SDH E.C. 1.1.1.14) para reducir directamente glucosa en sorbitol (Yamaki, 1984). Luego, el sorbitol es transportado al floema gracias a transportadores de poli-alcoholes (MdSOT3, MdSOT4 y MdSOT5; Watari y cols, 2004), viajando por él para ser transportado en forma apoplásmica a los órganos sumidero (raíces, hojas inmaduras y frutos), donde se acumula en las vacuolas de las células del parénquima, pudiendo ser oxidado a fructosa por la NAD-SDH o a glucosa por la sorbitol oxidasa (SOX) (Yamaki, 1995; Teo y cols., 2006; Ohkawa y cols., 2008), para su posterior metabolismo, por ejemplo en la glicólisis.

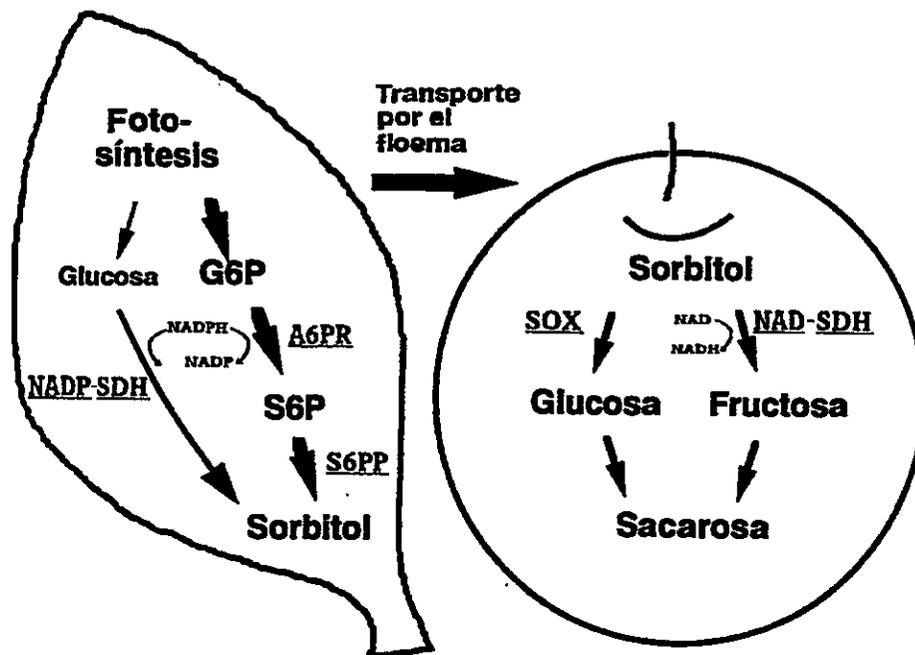


Figura 1: Metabolismo del sorbitol en hojas y órganos sumidero. El sorbitol es sintetizado por A6PR y S6PP en hojas maduras y también por NADP-SDH en hojas jóvenes. En frutos y otros órganos sumideros, el sorbitol se acumula y puede ser convertido a fructosa y glucosa por las SDH y SOX, respectivamente. A6PR: aldosa-6-fosfato reductasa. S6PP: sorbitol-6-fosfato fosfatasa. NADP-SDH: NADP-sorbitol deshidrogenasa. NAD-SDH: NAD-sorbitol deshidrogenasa. SOX: sorbitol oxidasa. (Modificado de Kanayama y Odanaka, 2000).

Otras enzimas capaces de metabolizar sorbitol son la sorbitol-6-fosfato 2-deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.140), capaz de convertir sorbitol-6-fosfato en fructosa-6-fosfato, con NAD/NADH como cofactor, la aldosa reductasa (E.C. 1.1.1.21), que convierte polioles en aldosas utilizando el cofactor NADP/NADPH y la alcohol deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.1), que cataliza la conversión de alcoholes en aldehídos con NAD/NADH. Sin embargo, estas enzimas han sido descritas principalmente en animales y microorganismos y las dos últimas tienen un amplio rango de especificidades (Base de datos BRENDA, Schomburg y cols., 2002).

1.2 Aldosa-6-fosfato reductasas (A6PR)

1.2.1 Estructura y actividad

Las enzimas del metabolismo de sorbitol que presentan mayor actividad son A6PR (en hojas maduras) y SDH (en frutos), y se les considera clave para su síntesis y degradación, respectivamente (Teo y cols., 2006; Kim y cols., 2007). La A6PR es una proteína de la familia de las aldo-ceto reductasas, formada por un homodímero de ~65 kDa (~36 kDa y ~310 aa cada subunidad; Zhou y cols., 2003), que cataliza la conversión reversible de G6P a S6P. Si bien se desconoce la estructura cristalográfica de esta enzima, el modelamiento molecular en 3D de 6xHis-MdA6PR (A6PR de manzana, *Malus x domestica*, fusionada a un epítipo de 6 histidinas N-terminal, **Figura 2**) posee el patrón de plegamiento de barril (β/α)₈ común de las aldo-ceto reductasas (Simpson y cols., 2009), con el dominio C-terminal de cada subunidad interactuando para formar el dímero (**Figura 2**, destacado en rojo) (Figuroa e Iglesias, 2010).

Estudios previos de A6PR de manzana (Negm y Loescher, 1981; Kanayama y Yamaki, 1993; Zhou y cols., 2003; Figuroa e Iglesias, 2010) y níspero (*Eriobotrya japonica*, Hirai, 1981), han indicado que esta enzima posee una Km entre 13,9 y 20 mM para la unión con G6P, y entre 2,22 y 3 mM para la unión con S6P (Hirai, 1981; Negm y Loescher, 1981; Tari y cols., 2010), utilizando NADPH como cofactor para la reducción de G6P y NADP para la oxidación de S6P (Yamaki, 1995; Kanayama y Odanaka, 2000). En estos estudios, la actividad detectada a pH 8 para la reducción de G6P por A6PR se encuentra entre 1,25 U/mg (*M.domestica*, Figuroa e Iglesias, 2010)

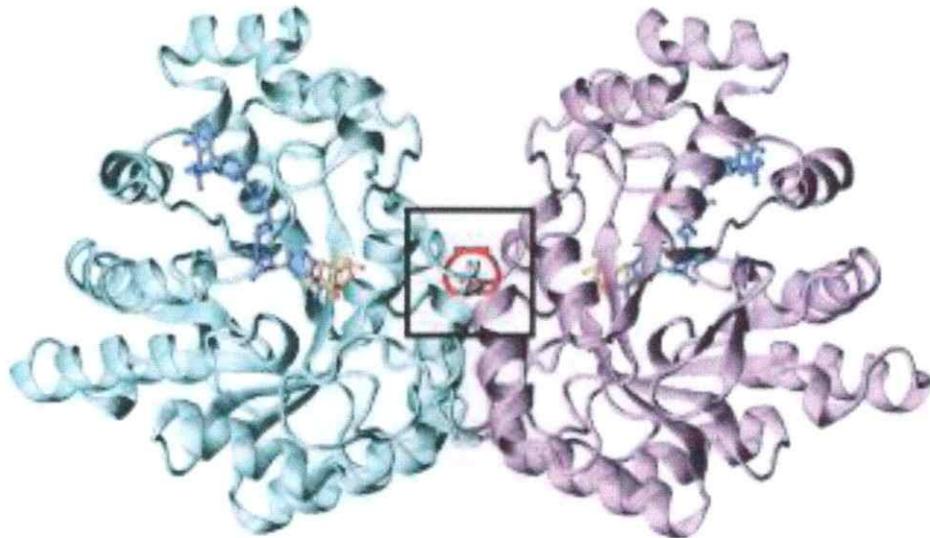


Figura 2: Modelo tridimensional de A6PR de manzana. En este modelo, se muestran las dos subunidades de A6PR, unidas a NADP (en azul) y G6P (en naranja). La caja negra destaca el dominio C-terminal de ambas subunidades (en rojo), involucrado en la formación del dímero (imagen tomada de Figueroa e Iglesias, 2010).

y ~ 3 U/mg de proteína purificada (*E. japonica*, Hirai, 1981), mientras que para la oxidación de S6P la actividad corresponde a ~ 1 U/mg de proteína purificada (*E. japonica*, Hirai, 1981). De acuerdo a estos trabajos, el pH óptimo para la reducción de G6P se registra entre 7 y 9, mientras que para la oxidación de S6P este valor se encuentra alrededor de 9,5 (Hirai, 1981; Negm y Loescher, 1981). Estudios posteriores *in vitro* indicaron también que la actividad de esta enzima puede ser afectada por cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+}) y P_i (Zhou y cols., 2003). Los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} presentan un efecto mixto: a concentraciones bajas tanto de G6P (menor a 10 mM) como del ión (0,5–2,5 mM) la K_m por G6P disminuye y la actividad de la enzima aumenta, mientras que a mayor concentración de G6P (50 mM), la actividad de la enzima disminuye. Por otra parte, tanto los iones Zn^{2+} y Cu^{2+} como el P_i disminuyen su actividad, habiéndose observado que el P_i disminuye la V_{\max} y aumenta la K_m para la G6P (Zhou y cols., 2003). De igual manera, se presenta inhibición competitiva por ATP ($K_i = 0,18$ mM) y ADP ($K_i = 0,30$ mM) (Kanayama y Yamaki, 1993, Matsumoto, 2008).

1.2.2 Expresión y rol de A6PR en el metabolismo de rosáceas.

En rosáceas y plantagináceas, la expresión de A6PR y su actividad se dan principalmente en órganos fuente (hojas maduras), aunque también se han reportado en frutos de algunas especies (Sakanishi y cols., 1998; Bantog y cols., 2000; Yamada y cols., 2006; Kim y cols., 2007). La evidencia indica que la regulación de esta enzima ocurre mayormente a nivel transcripcional, con una correlación positiva y fuerte entre los niveles de transcrito, proteína y actividad detectada en las A6PR de durazno (Sakanishi y cols., 1998), manzana (Kanamaru y cols., 2004), níspero (Bantog y cols., 2000) y pera japonesa (Deguchi y cols., 2002). A nivel celular, A6PR se ha detectado en cloroplastos y citoplasma en manzana (Yamaki, 1981; Liang y cols., 2012).

En estas familias, la síntesis de sorbitol comparte el sustrato (G6P, **Figura 1**) con la vía de síntesis de sacarosa (ya que aún en plantas que transportan principalmente poli-alcoholes, se mantiene la síntesis y utilización de sacarosa y almidón), por lo que modificaciones en la expresión de A6PR pueden alterar la tasa de partición entre sacáridos en la planta. El silenciamiento génico de A6PR en manzana produce acumulación de sacarosa y almidón en las hojas, niveles más altos de G6P y F6P (Kanamaru y cols, 2004; Cheng y cols, 2005), incremento de glucosa y disminución de fructosa en los frutos (Teo y cols, 2006) y aumento de sacarosa en ápices meristemáticos (Zhou y cols, 2006); mientras que líneas con sobre-expresión de A6PR muestran aumento en el nivel de sacarosa foliar (Kanamaru y cols, 2004). Estas alteraciones, que no afectaron el crecimiento vegetativo de la planta, indican que la tasa de partición de carbono entre sacarosa y polioles se encuentra bajo un estricto control metabólico, variando de acuerdo a la especie y a las condiciones ambientales (Everard y cols, 1997).

Adicionalmente a su rol en la fotosíntesis, la expresión de A6PR, se ha relacionado en rosáceas y plantagináceas con el estrés abiótico. Ante bajas temperaturas, estrés osmótico o presencia de ácido abscísico (ABA), la expresión y actividad de esta enzima se incrementa y se acumula sorbitol (Lo Bianco y cols, 2000; Deguchi y cols., 2002; Kanayama y cols., 2007; Matsumoto, 2008). Se ha propuesto que la acumulación de este metabolito retiene agua en situaciones de estrés hídrico (Sheveleva y cols., 1998), y la alta concentración de sorbitol puede proveer protección a proteínas y membranas celulares bajo estrés oxidativo, salino, por frío y sequía

(Oberschall y cols., 2000; Deguchi y cols., 2002; Hinch y Hagemann, 2004; Pommerrenig y cols, 2007; Taravati y cols, 2007). En llantén de mar (*Plantago maritima*), altas concentraciones de sal inducen la acumulación de sorbitol en el citoplasma, menor expresión de SDH y mayor expresión de transportadores de sorbitol en el floema para igualar el potencial osmótico con la vacuola, que acumula NaCl para incrementar la tolerancia a salinidad de esta halófito (Ahmad y cols, 1979, Pommerrenig y cols, 2007). De igual manera, en manzana el estrés osmótico induce una mayor expresión de transportadores de sorbitol en raíces, floema y hojas, asociada a un incremento de sorbitol en la planta, un incremento en la actividad de A6PR y a una mayor tolerancia en tejidos vegetativos (Li y cols., 2012).

1.3 A6PR y sorbitol en no-rosáceas y no-plantagináceas

Debido a su relación con el estrés abiótico, se ha introducido A6PR en especies que no producen ni acumulan sorbitol. En plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*, una *solanaceae*) y caqui japonés (*Diospyros kak*, una *ebenaceae*; ambas translocan sacarosa) transformadas para expresar A6PR de rosáceas, se ha observado presencia de sorbitol entre 0,2 y 130 $\mu\text{mol/g}$ peso fresco – demostrando que la enzima es suficiente para la síntesis de esta molécula – acompañada de un incremento en la tolerancia al estrés osmótico (Sheveleva y cols., 1998; Gao y cols, 2001). Otro efecto de la síntesis introducida de sorbitol en no-rosáceas y no-plantagináceas es un incremento en la resistencia de las plantas a la deficiencia de boro (Bellallouie y cols., 1999; Brown y cols., 1999) debido a que este micronutriente se une al poliol, formando complejos que le permiten ser transportado por el floema, aumentando su movilidad (Blevins y Lukaszewski, 1998).

Se han encontrado proteínas similares a las enzimas de la vía de síntesis y degradación del sorbitol en plantas no-rosáceas y no-plantagináceas que acumulan sacarosa. Por ejemplo, se ha encontrado actividad SDH en semillas de soya (*Glycine max*, familia *fabaceae*), endosperma de maíz (*Zea mays*, familia *poaceae*) y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*, familia *solanaceae*; Ohta y cols., 2005; Matsumoto, 2008). También se ha encontrado expresión de aldosa reductasa (ALR), con producción de sorbitol directamente a partir de D-glucosa, en mijo menor (*Setaria italica*), una de las gramíneas de mayor cultivo en Asia (Veeranagamallaiah y cols.,

2009) y en tomate (Tari y cols, 2010) y existen numerosos EST con similitud a SDHs o A6PRs en bases de datos de plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas divergentes entre sí (Matsumoto, 2008).

La acumulación de sorbitol y el aumento de actividad de estas enzimas en plantas no-rosáceas o no-plantagináceas se asocia principalmente a la tolerancia al estrés abiótico, participando en las relaciones osmóticas de diversos organismos bajo condiciones adversas (Hincha y Hagemann, 2004). Por ejemplo, en cultivos *in vitro* de células de hojas de tomate cultivadas con NaCl 100 mM durante 7 días, la acumulación de sorbitol se incrementó alrededor de 3 veces respecto a los cultivos de control (Tari y cols, 2010). En mijo menor se detectó incremento de actividad ALR y acumulación de sorbitol ante estrés salino, dependientes ambos de la concentración de NaCl aplicada. Adicionalmente, los niveles de sorbitol y actividad ALR detectados fueron mayores en un cultivar tolerante al estrés salino que los medidos en un cultivar con menor tolerancia a este tipo de estrés (Veeranagamallaiah y cols., 2009). En el endosperma de maíz, la presencia de SDH también se correlaciona con la regeneración de NAD⁺ y la mantención del estado redox de la célula, que incrementa la expresión de SDH ante concentraciones altas de azúcar y bajas de oxígeno (Morais de Sousa y cols., 2008).

1.4 Sorbitol en *Arabidopsis thaliana*

En *Arabidopsis thaliana*, una *Brassicaceae* tolerante al frío y al estrés salino (Jarillo y cols., 1993) y el organismo más utilizado como modelo de estudio en plantas, se ha detectado presencia e incremento de sorbitol en plantas expuestas a estrés por frío (Kaplan y cols., 2004), el cual disminuye la fluidez de las membranas, interrumpiendo la respiración aeróbica (Christie y cols., 1991). En estas condiciones, también aumentan los niveles de ABA, que induce expresión de genes de tolerancia al frío, incluyendo el mRNA de la alcohol deshidrogenasa (ADH), que cataliza la reducción reversible de aldehídos a alcoholes (Jarillo y cols., 1993).

En común con la gran mayoría de especies vegetales, *Arabidopsis* transporta sacarosa y, a menor grado, rafinosa en el floema (Haritatos y cols., 2000). Sin embargo, estudios recientes han descrito una SDH citoplasmática propia de esta especie, presente tanto en órganos fotosintéticos como sumidero (raíz, hojas, tallo, flores y silicuas). Esta enzima, llamada AtSDH, oxida sorbitol, ribitol y xilitol, siendo

capaz también de oxidar otros alcoholes de azúcar (arabitol, manitol, maltitol, lactitol y eritritol) presentes en la especie, pero con menor eficiencia. El rol de AtSDH en el metabolismo de *Arabidopsis* parece relacionarse con la tolerancia al estrés por sequía: su expresión y actividad aumentan al rehidratar plantas sometidas a este tipo de estrés, acompañadas por una disminución del nivel de sorbitol acumulado (Nosarzewski y cols., 2012). Mutantes *sdh-* muestran defectos de crecimiento en presencia de sorbitol 30 mM, y al ser sometidas a estrés por sequía, se observa un comportamiento diferencial: bajo fotoperíodo de día largo (16 hrs de luz, 8 hrs de oscuridad), las plantas fueron incapaces de sobrevivir al ser rehidratadas, mientras que bajo fotoperíodo de día corto (8 hrs de luz y 16 hrs de oscuridad) se presentó un aumento en la tolerancia a este tipo de estrés, asociada a una mayor retención de agua respecto a las plantas de tipo silvestre (Aguayo y cols., 2013, Nosarzewski y cols., 2012).

A la fecha, sólo 2 aldosa reductasas (AKR4C8 y AKR4C9) se han caracterizado en *Arabidopsis*. Ambas se expresan principalmente bajo estrés y presentan alta afinidad por NADP(H), siendo capaces de reducir un amplio rango de sustratos, de los cuales la glucosa no forma parte (AKR4C8) o presenta baja afinidad (AKR4C9, con un Km de 760 mM para glucosa y de 2,8 mM para eritrosa) (Simpson y cols., 2009). No se han detectado aldosa-6-fosfato reductasas (A6PR), alcohol deshidrogenasas (ADH), ni sorbitol-6-fosfato 2-deshidrogenasas en el genoma de esta planta, por lo que se desconoce el mecanismo responsable de la formación de sorbitol observada en los experimentos descritos previamente. Sin embargo, al realizar un BLAST de la secuencia nucleotídica de la A6PR de manzana (código GenBank Accesion D11080) contra el genoma completo de *Arabidopsis*, se consiguen 2 ORF con altos puntajes (AGI: At2g21250 y At2g21260), con scores de 109 y 92 bits, E_{values} de $2e^{-23}$ y $2e^{-17}$ y 69 y 70% de identidad aminoacídica, respectivamente. El siguiente hit en la lista corresponde a una proteína de la superfamilia de transposones hAT, con un score de 36 bits, un E_{value} de 0,76 y 19% de identidad aminoacídica. Estos valores sugieren que sólo los 2 hits iniciales corresponden a secuencias ortólogas de A6PR.

En un trabajo previo realizado en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal (Zamudio, 2010), se estudiaron estas posibles aldosa-6-fosfato reductasas, que poseen un porcentaje de identidad aminoacídica mayores al 65% respecto a A6PR de rosáceas (que presentan un porcentaje de identidad aminoacídica ~70% entre ellas) y

mayores al 79% respecto a la A6PR putativa de *Zea mays* (maíz). Adicionalmente, presentan sobre 78% de identidad aminoacídica con la A6PR de arroz (*Oryza sativa*), actualmente bajo estudio estructural y de actividad en el Instituto Indio de Tecnología (Rajbala Yadav y Ramasre Prasad, resultados no publicados). Además de encontrarse adyacentes en el genoma, ambos ORF poseen un 93% de identidad aminoacídica entre sí y presentan las características moleculares de las aldo-ceto reductasas: 3 sitios altamente conservados característicos de la familia, donde los sitios 1 y 3 podrían estar involucrados en la unión a NADP/NADPH, y la secuencia IPKS presente en el sitio 3, supuesto sitio activo de la proteína.

Ensayos de PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) realizados en el Laboratorio de Biología molecular Vegetal en plántulas de 10 días demostraron que el nivel de transcrito de *At2g21260* es significativamente menor (aproximadamente un 1%) que el de *At2g21250* (Figura 3). Además, el último posee una región 5'UTR de mayor extensión y con mayor número de elementos regulatorios *cis* comunes en promotores que *At2g21260*. Por estas razones, se estudió *At2g21250*, denominándole *AtA6PR*. Se demostró que *AtA6PR* corresponde a una proteína citoplasmática que se expresa tanto en órganos fuente (hojas caulinares y rosetas) como en órganos sumidero (tallos, flores) de la planta (Zamudio, 2010), a diferencia de lo descrito en la literatura para A6PR de rosáceas, donde A6PR se localiza tanto en citoplasma como en cloroplastos (Yamaki, 1981) y se distribuye principalmente en órganos fuente. Sin embargo, se desconoce su actividad enzimática y su rol biológico en el metabolismo de *Arabidopsis*.

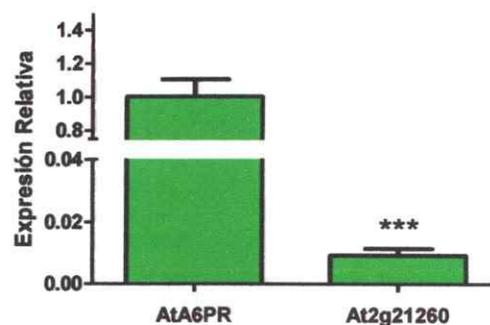


Figura 3: Niveles de transcrito de *AtA6PR* y *At2g21260* en *Arabidopsis*. Datos obtenidos de plántulas completas de *Arabidopsis* de 15 días de edad. Cada barra corresponde al promedio entre 3 extracciones de RNA, cada una con 2 repeticiones de la reacción de qPCR. Las barras de error corresponden a la desviación estándar obtenida. *** = $p < 0,001$. Test t de Student. Normalizador utilizado: PP2A.

1.5 Investigación propuesta y estrategia desarrollada.

En esta tesis de Magíster, se estudió el rol de AtA6PR en el metabolismo de Arabidopsis. Para ello, se investigó su actividad enzimática y se observó el efecto provocado por su ausencia en plantas mutantes. Para lograr el primero de estos objetivos, la estrategia planteada consistió en clonar el CDS de AtA6PR en diversos sistemas de expresión, para observar la actividad de la enzima nativa y/o recombinante bajo las condiciones previamente establecidas para las A6PR de otros organismos (manzana, níspero) (Hirai, 1981; Negm y Loescher, 1981; Kanayama y Yamaki, 1993; Zhou y cols., 2003; Figueroa e Iglesias, 2010). Si bien se disponía de un cDNA de AtA6PR clonada previamente (Zamudio, 2010), se descartó el uso directo de este fragmento debido a que incluye parte de las regiones 5' UTR y 3' UTR (regiones no traducidas 5' y 3') del gen, que debido a la estructura del vector serían incluidos en la traducción al clonarse directamente en vectores que fusionan el fragmento a un epítipo. Este producto no sería conveniente para el propósito de este trabajo, ya que se ha demostrado que pequeñas diferencias en los extremos de A6PR pueden afectar su actividad: cuando se agregó un epítipo de 6xHis C-terminal a A6PR de manzana, su actividad fue severamente afectada (respecto a la enzima con el mismo epítipo en N-terminal y a la actividad reportada para la enzima nativa), disminuyendo su K_{cat} en 2 órdenes de magnitud: de $0,7 \text{ s}^{-1}$ a $0,009 \text{ s}^{-1}$ para la reducción de G6P y de $0,22 \text{ s}^{-1}$ a $0,001 \text{ s}^{-1}$ para la oxidación de S6P (Figueroa e Iglesias, 2010). Por esta razón, en esta tesis, se subclonó únicamente el CDS de AtA6PR para así obtener una proteína más similar a la nativa.

Otro objetivo de este trabajo consiste en esclarecer el rol de esta enzima en el metabolismo de Arabidopsis. Para lograrlo, se obtuvo mutantes *knock-out* o *knock-down*, a través de líneas de la colección SALK y de mutantes con menor expresión obtenidas por silenciamiento génico post-traducciona (SGPT). Este último es un mecanismo de respuesta de las plantas ante estrés biótico, que permite suprimir la acumulación de RNA endógeno, viral o transgénico (Fagard y Vaucheret, 2000). Este mecanismo se aprovecha en la biología vegetal para producir líneas transgénicas con menores niveles de transcrito de un blanco específico, disminuyendo la acumulación del producto génico sin eliminarlo por completo. Esto evita la aparición de fenotipos letales o inviábiles que puede ocurrir al interrumpir una secuencia (por ejemplo, por una

inserción de un transposón o T-DNA, como ocurre con las líneas SALK). Por otro lado, las mutantes SALK corresponden a líneas de *Arabidopsis* transformadas establemente con el plásmido pROK 2- (Baulcombe y cols., 1986), que inserta aleatoriamente un fragmento de ~4,5 kb en el genoma de la planta, interrumpiendo diferentes loci lo que impide la correcta formación de su producto génico. Ya que estas líneas se encuentran parcialmente genotipificadas, es posible adquirir líneas mutantes *knock-down* y/o *knock-out* para un locus específico (Alonso y cols., 2003).

El uso de estas mutantes permite observar las alteraciones producidas por la ausencia de una enzima, lo que facilita inferir los procesos del metabolismo en los que dicho componente está involucrado, aclarando su función. En el caso de este trabajo, las líneas mutantes permitieron analizar su desempeño en condiciones estándares y su tolerancia al estrés salino – que fue seleccionado debido a que muchos de los genes involucrados en él también responden ante estrés osmótico o por frío, pudiendo aplicarse el estrés salino con mayor precisión y reproducibilidad que los dos últimos (Zhu, 2000) –, comparando su fenotipo y metabolitos acumulados respecto a plantas de tipo silvestre.

2 HIPÓTESIS

"El locus At2g21250 codifica una aldosa-6-fosfato reductasa dependiente de NADP⁺, capaz de reducir glucosa-6-fosfato y oxidar sorbitol-6-fosfato, que participaría en la respuesta a estrés salino de *Arabidopsis thaliana*".

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar si At2g21250 corresponde a una A6PR y caracterizar líneas mutantes para este gen bajo estrés salino.

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la capacidad de AtA6PR de reducir glucosa-6-fosfato y oxidar sorbitol-6-fosfato.
2. Obtener líneas de *Arabidopsis* con menores niveles de transcrito de AtA6PR.
3. Analizar morfológica y bioquímicamente las líneas mutantes obtenidas bajo condiciones estándar de crecimiento y bajo estrés salino.

4 MATERIALES Y MÉTODOS



4.1 Material Biológico

4.1.1 Cultivos de bacterias

Se sembraron células de *Escherichia coli* cepas OneShot Mach1, BL21 y BL21 pLysS en medio LB líquido [NaCl 1% p/v, triptona 1% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v] o sólido [el anterior más agar-agar 1,6% p/v] durante 16-18 hrs, a 37 °C con agitación (220 rpm, sólo para cultivos líquidos). A este medio se agregaron antibióticos adecuados para la selección de las cepas y vectores de interés.

Agrobacterium tumefaciens cepa GV3101 se creció en medio LB suplementado con antibióticos (rifampicina 10 µg/mL, gentamicina 100 µg/mL y antibiótico para la selección del vector) a 28 °C durante 36-48 hrs, con agitación (220 rpm) para los cultivos líquidos.

4.1.2 Preparación de *A. tumefaciens* GV3101 quimiocompetentes.

Se creció hasta saturación un pre-inóculo de células (500 µL) en 25 mL de LB (sección 4.1.1) con rifampicina 10 µg/mL y gentamicina 25 µg/mL. Se dejó a 28 °C con agitación durante 16-18 hrs. Posteriormente, se llevó el cultivo a 100 mL de LB (con los mismos antibióticos) y se incubó a 28 °C, hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,5. Se incubó en hielo (10 min) y se centrifugó (3000 g, 4 °C, 20 min). Se resuspendieron las células en 1 mL CaCl₂ estéril 20 mM y se separaron en alícuotas de 200 µL, que fueron congeladas en N₂ líquido y almacenadas a -80 °C.

4.1.3 Preparación de *E. coli* BL21 y BL21 pLysS quimiocompetentes.

Se creció hasta saturación un pre-inóculo (100 µL de células) en 5 mL de medio LB (sección 4.1.1) y 0,9 µL de ácido nalidíxico 100 µg/mL a 37 °C durante 16-18 hrs con agitación. Luego se tomó 1 mL de células y se pasó a 100 mL de medio LB con 30 µL de ácido nalidíxico. Se dejó crecer (3 hrs, 37 °C) con agitación, hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,4-0,5. Se centrifugó (1600 g, 4 °C, 10 min) y se resuspendieron las células en 10 mL de CaCl₂ 0,1 M estéril. Se centrifugó nuevamente (1100 g, 4 °C, 5 min) y se resuspendió en 10 mL de CaCl₂ 0,1 M. Se incubó en hielo por 30 min y

nuevamente se centrifugó (1100 g, 4 °C, 5 min). Finalmente, se resuspendieron las células en 2 mL de CaCl₂ 0,1 M y se agregó 600 µL de glicerol estéril. Para finalizar, se separaron las células en alícuotas de 200 µL y se almacenaron a -80 °C.

4.1.4 Cultivo de plantas en medio hidropónico.

Se sembraron semillas de *Arabidopsis* o *N. tabacum* en cultivo hidropónico con el método descrito por Gibeaut (Gibeaut y cols., 1997), pero utilizando el sistema AraHarvest (de SPL Life and Sciences) como soporte para las plantas y para la recolección de semillas. Se dejaron crecer 6–8 semanas, a 23 °C y 4500–6500 lux, con fotoperíodo de día largo (16 hrs de luz – 8 hrs oscuridad) y con NaCl a distintas concentraciones (sólo para experimentos de tolerancia a estrés).

4.1.5 Cultivo de plantas en placa.

Se esterilizó la superficie de semillas de *Arabidopsis* sumergiéndolas por 1 min en etanol 70% estéril, luego por 1 min en etanol absoluto estéril y dejándolas secar al aire (bajo campana). Las semillas se sembraron en placa estéril con medio MS [Murashige & Skoog basal salt mixture (*PhytoTechnology Laboratories*) 1X, sacarosa 3% p/v], se estratificaron (4 °C en oscuridad por 48 hrs) y luego se dejaron crecer en una cámara de incubación a 22 °C y aproximadamente 5000 lux, con un fotoperíodo de día largo (16 hrs de luz – 8 hrs oscuridad).

Para los experimentos de selección de mutantes, se suplementó el medio MS con antibiótico (higromicina 25 µg/mL), mientras que para realizar los experimentos de tolerancia a estrés salino, se agregó NaCl a distintas concentraciones. En algunos de estos experimentos, primero se sembraron las semillas en medio MS sin NaCl y luego de 7 días se transplantaron las plántulas a medio MS salino para observar el efecto del estrés en el crecimiento de éstas.

Los experimentos de evaluación de germinación se llevaron a cabo observando cada 24 hrs las semillas estratificadas a través de un microscopio óptico (aumento de 40 veces, objetivo 4X). La germinación se consideró completada cuando la radícula de cada embrión atravesó el endosperma y la testa, según lo definido por Bewley (1997).

4.2 Extracción de ácidos nucleicos

4.2.1 DNA genómico

Se utilizó una variante del método CTAB (Doyle y Doyle, 1987). Se congelaron 100 mg de hojas de *Arabidopsis* en N₂ líquido, se molieron con un pistilo plástico y se agregaron 700 µL de buffer CTAB 2X [CTAB 2% p/v; NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM; β-mercaptoetanol 0,1% v/v]. Se incubó a 65 °C durante 1 hr, mezclando por inversión cada 5 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. Luego se agregaron 700 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por 5 min. La mezcla fue centrifugada (6900 g, 5 min) y se rescató 500 µL de la fase superior a un nuevo tubo. Se repitió la extracción con cloroformo:alcohol isoamílico y la separación de fases por centrifugación, y se rescató 300 µL de la fase superior. Posteriormente, se agregaron 250 µL de isopropanol, se incubó (-20 °C, 20 min) y se centrifugó a 20.000 g por 15 min. Se lavó el sedimentado de DNA con 500 µL de etanol 70%, se centrifugó brevemente (~ 1 min) y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se secaron las muestras al aire y se resuspendió el DNA en agua nanopura para ser almacenado a -20 °C hasta su uso.

4.2.2 DNA plasmidial

Se extrajo el DNA plasmidial desde cultivos celulares de *E. coli* portadoras del vector de interés por minipreparación, utilizando el kit AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit de Axygen Bioscience y siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2.3 RNA total

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se utilizó el kit UltraClean® Plant RNA Isolation kit de MoBio Laboratories Inc., que permite aislar el RNA total desde tejidos de plantas. Éste une el RNA a una matriz de sílica y elimina los contaminantes – como los polisacáridos – que pueden afectar futuras reacciones de biología molecular.

4.3 Cuantificación y comprobación de la calidad de ácidos nucleicos.

4.3.1 Cuantificación

Para cuantificar las muestras de DNA y RNA extraído, se utilizó un espectrofotómetro (NanoDrop®ND-1000 UV-Vis) para medir la A_{260} . Además, se determinó la pureza de las muestras a través de las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . Para que una muestra se considere pura, el ratio A_{260}/A_{280} debe ser cercano a 1,8 (si la muestra es de DNA) o a 2 (si la muestra es de RNA). Valores más bajos que éstos indican contaminación por proteínas o fenoles. El ratio A_{260}/A_{230} debe encontrarse entre 1,8 y 2,2 para una muestra pura, ya que valores más bajos se deben a la presencia de solventes orgánicos, algunas sales y proteínas.

4.3.2 Integridad y calidad

Se determinó la integridad del DNA y RNA por electroforesis en geles de agarosa 1% p/v. El gel fue preparado en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8). Se mezclaron 5 μ L de cada muestra con 1 μ L de buffer de carga (6X DNA Loading Dye de Fermentas®) y se colocó el gel en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X a una diferencia de potencial de 100 V durante 30 min para muestras de DNA. Para las muestras de RNA se cargaron 3 μ L de muestra y se utilizó una diferencia de potencial de 65 V durante 15 min. Se visualizaron las bandas en una cámara oscura equipada con un transiluminador UV y se utilizaron los software GeneGenius Classic (SynGene®) e ImageJ 1.47 para captar y analizar las imágenes.

Además, se comprobó la calidad del DNA por PCR, mediante la amplificación de los genes *GAPA* (*gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa*) o *18S*, utilizando las mezclas y programas de termociclador del mismo nombre detalladas en las Tablas II y III (sección 4.6).

4.4 Diseño de partidores.

Se utilizaron varios pares de partidores (Tabla I) durante el transcurso de la tesis. Para el diseño de los partidores AtA6PR.intF, AtA6PR.intR, 21260.intF y 21260.intR, se utilizó el programa AmplifX 1.5.4 y se evaluaron *in silico* con la aplicación OligoAnalyzer disponible en el servidor online del IDT (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>).

Tabla 1: Partidores utilizados.

Nombre	Secuencia	Descripción
GAPA F GAPA R	5'-GGTAGGATCGGGAGAAC-3' 5'-GATAACCTTCTTGGCACCAG-3'	Hibridan con una región interna del gen y/o cDNA de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Juntos, amplifican un producto de 300 pb en plantas.
18S 5' 18S 3'	5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3' 5'-ACAATGATCCTTCCGCAGGT-3'	Hibridan con una región interna del gen y/o cDNA del rRNA 18S. Juntos, amplifican un producto de 200 pb en plantas.
S6F S6R	5'-ATGGAGATAACACTGAAC-3' 5'-TCAAGCGTAGAGATCAAT-3'	Contienen el codón de inicio (azul) y detención (rojo) de la traducción de AtA6PR. Juntos, amplifican un producto de 930 pb.
S6R.ss	5'-AGCGTAGAGATCAAT-3'	No contiene el codón de detención de traducción de AtA6PR. Junto con S6F, amplifica un producto de 930 pb.
35S.F(2)	5'-AGAAGTCCCGTAAAGACTG-3'	Hibrida con una región interna del promotor 35S.
His3	5'-GCATGATGATGATGATGGCTG-3'	Hibrida con el epítipo 6xHis cuando éste se encuentra río abajo de la secuencia a amplificar.
oligoAp	5'-CGCCACGGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	Hibrida con la cola poli-A en la región 3' de los mRNA. Se utiliza para retrotranscribir mRNA a cDNA
LBb1.3	5'-ATTTTGGCCGATTTCGGAAC-3'	Hibrida a ~110 pb del left border (LB) del T-DNA presente en plantas de la colección SALK.
S6.salkF	5'-ATGTGGCCGAGAAGTACAA-3'	Hibrida con una zona interna del último exón del locus At2g21260.

AtA6PR.intF AtA6PR.intR	5'-AGTTGTCCTGAGGTGGGGAAT-3' 5'-TGGTTGGTTCGTGCGGTAT-3'	Hibridan con una región interna del 5° exón de AtA6PR. Juntos, amplifican una región de 162 pb.
21260.intF 21260.intR	5'-CAAACAGACAGTGGCACAGAT-3' 5'-TTTGGTGC GTGCGGTAATTC-3'	Hibridan con una región interna del 5° exón del gen AtAg21260. Juntos, amplifican una región de 178 pb.
GFP 5'	5'-GAGGGTGAAGGTGATGCAAC-3'	Hibrida con una región interna al inicio de la secuencia codificante de la proteína GFP.
26410F 26410R	5'-GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC-3' 5'-GGTCCGACATACCCATGATCC-3'	Hibridan con una región interna del gen At4g26410. Juntos, amplifican un fragmento de 81 pb, y se utilizan como normalizadores en reacciones de qRT-PCR.
PP2AF PP2AR	5'-GATACTTTGTCGTGTTGTC-3' 5'-CAAATACGCCCAACGAACAA-3'	Hibridan con una región interna de la subunidad PDF2 de la fosfatasa 2A (AGI At1g13320). Juntos, se utilizan como normalizadores en reacciones de qRT-PCR, amplificando un fragmento de 61 pb.
UBQ10F UBQ10R	5'-GGCCTTGATATAATCCCTGATGAATAAG-3' 5'-AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT-3'	Hibridan con una región interna de la poliubiquitina 10 de Arabidopsis (AGI: At4g05320). Juntos, se utilizan como normalizadores en reacciones de qRT-PCR, amplificando un fragmento de 61 pb.
G12240F G12240R	5'-AGCGGCTGCTGAGAAGAAGT-3' 5'-TCTCGAAAGCCTTGCAAAATCT-3'	Hibridan con una región interna del gen At5g12240. Juntos, se utilizan como normalizadores en reacciones de qRT-PCR, amplificando un fragmento de 63 pb.
RD29AF RD29AR	5'-GAAGTTGCTTCAATGCTAGGTTACTC-3' 5'-TCGTCACGGCAGACTCTGTT-3'	Hibridan con una región interna del gen RD29A (AGI: At5g52310). Juntos, se utilizan como genes control de respuesta a estrés abiótico en reacciones de qRT-PCR.

4.5 Generación de cDNA

4.5.1 Tratamiento con DNasa

Se eliminaron posibles restos de DNA en las muestras de RNA por tratamiento con DNasa. Se preparó una mezcla que consistió en 3,5 µg de RNA total, 1 U de DNasa I Fermentas, Buffer DNasa I 1X Fermentas y 10 U de RiboLock™ RNase Inhibitor de Fermentas en un volumen de 10 µL. Se incubó la mezcla (37 °C, 30 min), luego se dejó en hielo y se agregó 1 µL de EDTA 25 mM para detener la reacción.

4.5.2 RT-PCR

Se generó cDNA por Transcripción Reversa (RT-PCR), utilizando el sistema RT-Improm-II™ Reverse Transcription System (Promega). En un volumen de 50 µL, se mezcló 1,5 µg del RNA tratado con DNasa I, 1X Improm-II™ Reaction Buffer, 1 µL de Improm-II™ RT, MgCl₂ 5 mM, dNTPs 0,5 mM y 0,6 µM de partidor oligoAp. La mezcla final está separada en dos volúmenes, el primero contiene el RNA y el partidor mientras que el segundo contiene el resto de la mezcla.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador, que ejecutó el siguiente programa: 70 °C por 5 min para desenrollar las hebras de RNA (durante los cuales se incubó la mezcla de RNA y partidor). Luego se dejaron las muestras en hielo y se añadió el resto de la mezcla de la reacción. Se continuó el programa con 25 °C por 5 min que permitieron el apareamiento del partidor con el RNA, seguidos por un paso de extensión del cDNA (42 °C, 60 min) y finalizando con la inactivación de la enzima (70 °C por 15 min).

4.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En este trabajo se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa con diversos propósitos, como clonación, verificación de vectores y mutantes o análisis de expresión. Para ello, se utilizaron diferentes protocolos y mezclas de reacción (mix), dependiendo de los partidores y el fragmento a amplificar, las que se resumen en las **Tablas II y III** (respectivamente).

Tabla II: Protocolos de termociclador para PCR

Protocolo	T (°C)	Tiempo	nº ciclos
AtA6PR Pfu	94	4'	1
	94	45"	34
	57	1' 30"	
	72	3'	
	72	10'	1
GAPA	95	5'	1
	95	30"	35
	52	40"	
	72	40"	
	72	10'	1
18S	95	5'	1
	95	30"	35
	51	50"	
	72	30"	
	72	10'	1
T7-AtA6PR	94	4'	1
	94	45"	35
	57	1'	
	72	1' 10"	
	72	10'	1
M13-AtA6PR	94	4'	1
	94	45"	35
	55	1'	
	72	1' 15"	
	72	10'	1

Protocolo	T (°C)	Tiempo	nº ciclos
35S-AtA6PR	94	4'	1
	94	45"	38
	62	1'	
	72	1' 30"	
	72	10'	1
AtA6PR	94	4'	1
	94	45"	33
	57	1'	
	72	1' 15"	
	72	10'	1
SALK	94	4'	1
	94	45"	37
	60	1'	
	72	1' 30"	
	72	10'	1
GFP-AtA6PR	94	4'	1
	94	45"	35
	58	1'	
	72	2'	
	72	10'	1
qPCR	94	4'	1
	94	30"	35
	55	30"	
	72	30"	
	72	10'	1

Tabla III: Mezclas utilizadas para PCR

Mix	Partidores	Enzima	Buffer	[dNTP] (μM)	[Partidores] (μM)
Clonación AtA6PR	S6F y S6R	Pfu DNA Polimerasa, Fermentas	Buffer Pfu + MgSO_4 , Fermentas	200	0,5
	S6F y S6R.ss				
GAPA	GAPAF y GAPAR	Taq DNA Polimerasa, Sigma	PCR Buffer, Sigma	200	0,5
18S	18SF y 18SR	Taq DNA Polimerasa, Sigma	PCR Buffer, Sigma	200	0,5
T7-AtA6PR	T7F y S6R	Biolase™ Taq DNA Polimerasa, Boline	1X NH_4 Reaction Buffer, Boline	100	0,15
M13-AtA6PR	M13F y S6R	Biolase™ Taq DNA Polimerasa, Boline	1X NH_4 Reaction Buffer, Boline	200	0,5
35S-AtA6PR	35SF(2) y S6R	Biolase™ Taq DNA Polimerasa, Boline	1X NH_4 Reaction Buffer, Boline	200	0,3
AtA6PR	S6F y S6R	Biolase™ Taq DNA Polimerasa, Boline	1X NH_4 Reaction Buffer, Boline	200	0,5
SALK	S6.salkF y LBb1.3	Taq DNA Polimerasa, Sigma	PCR Buffer, Sigma	200	0,3
GFP-AtA6PR	GFPF y S6R	Taq DNA Polimerasa, Sigma	PCR Buffer, Sigma	200	0,5
qPCR	12240F y 12240R	Taq DNA Polimerasa, Sigma	PCR Buffer, Sigma	200	0,3
	AtA6PR.intF y AtA6PR.intR	Taq DNA Polimerasa, Sigma	PCR Buffer, Sigma	200	0,3
	21260.intF y 21260.intR	Taq DNA Polimerasa, Sigma	PCR Buffer, Sigma	200	0,3
	RD29AF y RD29AR	Taq DNA Polimerasa, Sigma	PCR Buffer, Sigma	200	0,5

4.7 PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR)

Esta técnica se usó para analizar los niveles de transcrito de genes específicos en plantas crecidas bajo diferentes condiciones. Se utilizó la sonda fluorescente contenida en el kit SensiMix™ SYBR Hi-ROX de Boline para obtener la eficiencia de los partidores y realizar la reacción de PCR. El equipo termociclador y detector utilizado fue el Stratagene Mx3005P de Agilent Technologies, que analiza y entrega los resultados con el programa Stratagene MxPro 4.1d. Se diseñaron partidores específicos para amplificar fragmentos de los genes *AtA6PR* (AGI: At2g21250) y *21260* (AGI: At2g21260) y se utilizaron partidores descritos en la literatura (Msanne y cols., 2011) para *RD29A* (AGI: At5g52310, utilizado como control en tratamientos de inducción por estrés salino), *Ubq10* (AGI:At4g05320), *PP2A* (AGI: At1g13320), *26410* (AGI: At4g26410) y *12240* (AGI: At5g12240). Los cuatro últimos, utilizados como

normalizadores de la reacción de PCR, se obtuvieron de la lista de genes de mantenimiento (housekeeping) en Arabidopsis seleccionados por Czechowski y cols (2005) para validación de reacciones de qPCR.

4.7.1 Curva de eficiencia de partidores.

Una vez obtenidos los partidores descritos previamente, se evaluó la eficiencia de cada par (con excepción de 26410, Ubq10 y PP2A, evaluados previamente por Francisca Aguayo, Tesis de magíster, 2013). Para ello, se realizaron reacciones de PCR convencional con cada set de partidores (mix qPCR, Tabla III y protocolo qPCR, Tabla II). Se realizaron diluciones seriadas de los amplicones (hasta 10^{-8}) y se mezclaron 2 μ L de las diluciones 10^{-4} – 10^{-8} en una mezcla que también contenía 1X SensiMix™ mastermix y 0,25 – 0,4 μ M del par de partidores (ver Tabla VI) correspondientes al amplicón en un volumen total de 20 μ L. Se sometieron las muestras a PCR en tiempo real con el siguiente programa: 10 min a 95 °C, luego 40 ciclos de: 95 °C por 15 segundos, 55 °C por 15 segundos y 72 °C por 15 segundos, luego de cada cual el equipo mide la fluorescencia emitida por los fragmentos amplificados.

La eficiencia de cada par de partidores (E) se determinó utilizando la ecuación (1), donde la pendiente se obtiene de la recta entre el ciclo umbral de detección vs. la dilución del amplicón.

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

(Ecuación 1)

Una vez terminado, el termociclador obtiene una curva de disociación de los fragmentos amplificados para determinar la temperatura a la cual se denaturan y así confirmar un único fragmento amplificado (caracterizado por una única cúspide en un gráfico de fluorescencia vs. temperatura). El protocolo de la curva de disociación consistió en 5 segundos a 95 °C, 15 segundos a 55 °C – durante los cuales se midió la fluorescencia emitida por las muestras – y finalmente 1 segundo a 95 °C.

4.7.2 PCR cuantitativo

Se analizaron los niveles de transcrito de los genes *AtA6PR* y *At2g21260* en plantas mutantes y/o bajo tratamiento de estrés salino respecto a las condiciones normales (condición que funciona como un “calibrador”), que en este trabajo correspondieron a plantas de tipo silvestre y/o sin tratamiento de estrés.

La mezcla de reacción consistió en 2 µL de cDNA, 1X SensiMix™ mastermix y entre 0,25 – 0,4 µM de los partidores correspondientes (ver *Tabla VI*) en un volumen total de 20 µL. El programa utilizado en el termociclador se describe en la sección anterior. Para cuantificar los resultados, se utilizaron los datos de ciclo umbral (entregados por el programa indicado en la sección anterior) y eficiencia de partidores determinada previamente, que se ingresaron a la ecuación 2 (Pfaffl, 2001)

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

(Ecuación 2)

El método utilizado requiere el uso de un gen “normalizador”, cuya expresión debe mantenerse constante en las condiciones que se realiza el experimento. La elección del normalizador se realizó con el software “Normfinder 0.953” (Andersen y cols., 2004), un algoritmo que identifica el normalizador óptimo de un grupo de 3 genes candidatos, comparando la variación de los datos de expresión obtenidos para cada gen. Para los experimentos de expresión en condiciones estándares de crecimiento, se evaluaron como normalizadores los pares de partidores PP2A, UBQ10 y 26410 (*Tabla I*), mientras que para los experimentos de crecimiento en estrés salino, se evaluaron los partidores PP2A, UBQ y 12240. Para todos los casos evaluados, el normalizador a utilizar correspondió al gen PP2A. Las figuras obtenidas fueron realizadas con el programa GraphPad Prism, y se utilizó un test de ANOVA para detectar diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los conjuntos de datos. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cada conjunto de datos se obtuvieron gracias al post-test de comparación múltiple de Bonferroni. Cada medición fue realizada por duplicado a partir de tres réplicas técnicas provenientes de un pool de 100 mg de réplicas biológicas (≥ 20 plántulas).

4.8 Vectores utilizados

Luego de amplificar el CDS de *AtA6PR* por PCR convencional (con y sin codón de detención según las especificaciones del vector de destinación: *AtA6PR.FL* y *AtA6PR.ss* respectivamente; ver sección 4.9), éste se clonó en varios vectores comerciales, cada uno con diferentes características y posibles aplicaciones.

4.8.1 pCR®8/GW/TOPO®.

Es un vector de entrada, con el gen de resistencia a espectinomicina, que permite la clonación de fragmentos de DNA utilizando la tecnología TOPO TA Cloning® System de Invitrogen. Este sistema aprovecha la actividad transferasa terminal independiente del molde de las Taq Polimerasas (que agrega un sobresaliente A 3' al fragmento amplificado) para la clonación rápida y eficiente de productos de PCR. El vector contiene sobresalientes T 3' que hibridan con los sobresalientes A 3' ya mencionados, mientras una Topoisomerasa I (unida covalentemente al vector) forma el enlace fosfodiéster entre el vector y el extremo 5' del fragmento a insertar (Figura 4).

Además, este vector es compatible con la tecnología GATEWAY™ (Karimi y cols., 2002), es decir, la secuencia clonada queda flanqueada por sitios de recombinación (sitios *attL* o *attachment*) que por recombinación homóloga permiten transferir con alta eficiencia el fragmento de interés desde el vector de entrada hasta vectores que contengan sitios de recombinación compatibles (*attR*) a través de una reacción mediada por el LR Clonase™ Enzyme Mix de Invitrogen.

4.8.2 pEXP5-NT/TOPO®.

Este vector pertenece al Expressway™ Cell-Free Expression System de Invitrogen, que permite la transcripción y traducción *in-vitro* de la secuencia de DNA clonada. El vector contiene el promotor del bacteriófago T7, río abajo del cual se encuentra un sitio para la unión del ribosoma (RBS) y un epítipo de 6 histidinas (6xHis). El último es escindible, gracias a un sitio de reconocimiento para la proteasa del virus del grabado del tabaco (Tobacco Etch Virus, TEV). Río abajo de este sitio se inserta el fragmento a clonar, al cual sigue el terminador T7 (Tabla IV).

Para clonar el fragmento de interés en el vector, éste utiliza también la tecnología TOPO TA Cloning® System detallada en la sección anterior (Figura 4). Como antibiótico de selección, utiliza ampicilina.

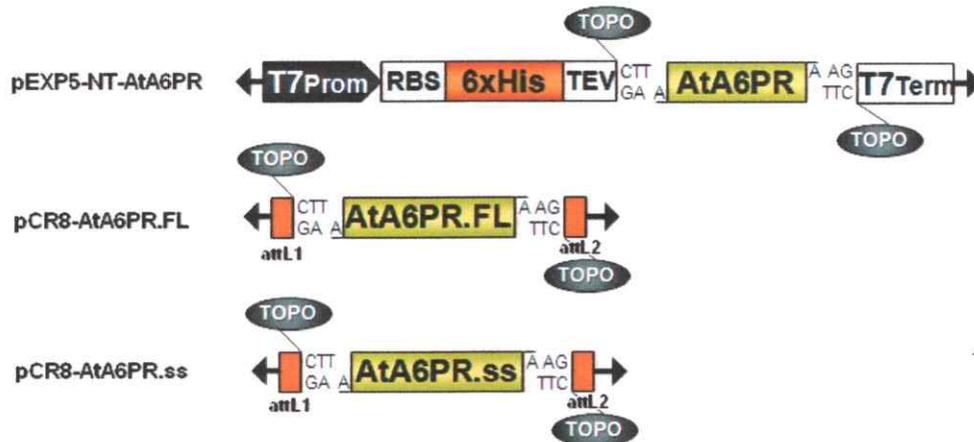


Figura 4: Formación de vectores por sistema TOPO. Para detalles, consultar secciones 4.8.1 y 4.8.2.

4.8.3 pGWB2 y pGWB8.

Son vectores binarios (es decir, tienen orígenes de replicación para *E. coli* y *A. tumefaciens*) pertenecientes a la tecnología GATEWAY™ – que permite transferir con alta eficiencia un fragmento de DNA flanqueado por sitios de recombinación (sitios *attL*) desde un vector de entrada como pCR®8 hasta vectores que contengan sitios de recombinación compatibles (*attR*) a través de una reacción mediada por el LR Clonase™ Enzyme Mix de Invitrogen (Karimi y cols., 2002) – creados para la transformación transitoria o estable de plantas al poseer las regiones RB y LB (Figura 5). Estos vectores contienen el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S), que logra altos niveles de expresión de la secuencia de interés. Contienen también el gen de resistencia a kanamicina (*NPTII*) bajo el control del promotor constitutivo Nos (para selección en bacterias y plantas) y el gen de resistencia a higromicina (*HPT*) bajo el control del promotor CaMV35S para selección en plantas. Entre los sitios *attR1* y *attR2* se encuentra el gen *ccdB*, que codifica la toxina CcdB. Ésta elimina las células transformadas con el vector sin recombinar, permitiendo que crezcan sólo aquellas transformadas con el vector deseado. El vector pGWB8, además, agrega un epítipo 6xHis en el extremo C-terminal de la proteína, permitiendo su posterior purificación por columnas de níquel, por lo que requiere que el fragmento a insertar no posea el codón de término (Tabla IV).

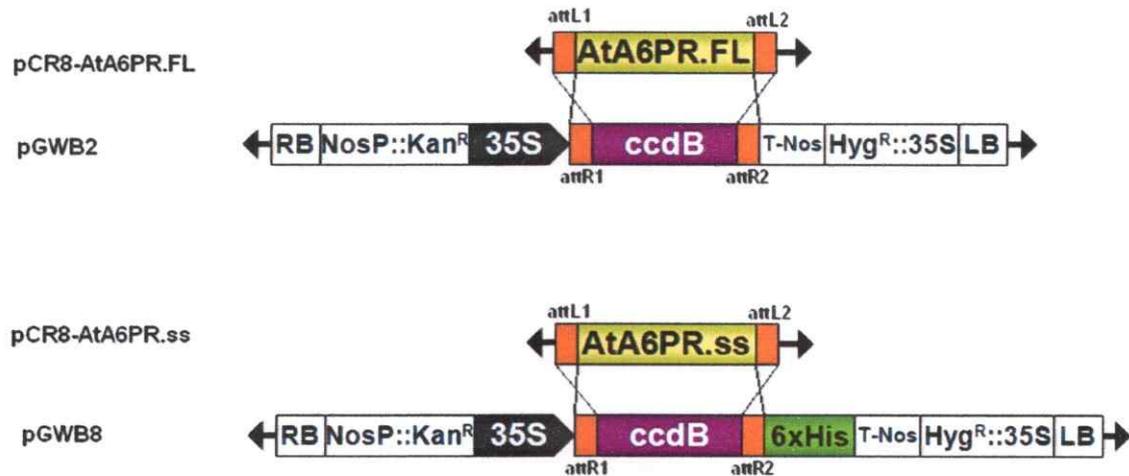


Figura 5: Formación de vectores por recombinación. Para detalles, consultar sección 4.8.3.

4.8.4 pET28a-AtA6PR y pET19b-MdA6PR

Otros vectores utilizados fueron pET28a-AtA6PR (Wurman, seminario de título Ing. Biotecnología Molecular, 2013) y pET19b-MdA6PR (Figuroa e Iglesias, 2010). Éstos son vectores adecuados para la sobreexpresión de AtA6PR y MdA6PR (A6PR de manzana) respectivamente, en bacterias como *E. coli*. Ambos vectores poseen el promotor T7 – inducible por IPTG – para controlar la acumulación de la proteína y añaden un epítipo 6xHis N-terminal, que en el caso de pET28a es escindible. Este vector, además, incorpora un epítipo T7 N-terminal no-escindible (Tabla IV).

4.9 Clonación de AtA6PR

4.9.1 Vectores pEXP5-NT/TOPO® y pCR®8/GW/TOPO®.

Se amplificó el CDS de *AtA6PR* por PCR desde el vector pCR8-AtS6PDH (Zamudio, 2010) utilizando la mezcla Clonación AtA6PR y el protocolo AtA6PR Pfu (Tablas II y III respectivamente). Se cargó el producto de PCR en un gel de agarosa 1% y se resolvió la banda de interés (930 pb) por electroforesis (sección 4.3.2). Se purificó el DNA de esta banda mediante el kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se agregaron al fragmento los sobresalientes A 3' (reacción llevada a cabo separadamente debido a que la Pfu DNA Polimerasa no presenta actividad

Tabla IV: Vectores utilizados.

Nombre	Esquema	Promotor	Antibiótico para selección	Descripción
pCR8-AtA6PR.ss		No tiene	Espectinomina	Contiene AtA6PR sin codón de stop, permitiendo la creación de proteínas de fusión C-terminal
pCR8-AtA6PR.FL		No tiene	Espectinomina	Contiene el CDS completo de AtA6PR
pEXP5-NT-AtA6PR		T7	Ampicilina	Fusión AtA6PR a epítipo 6xHis N-terminal
pGWB2-AtA6PR		CaMV35S	Kanamicina en bacterias, Higromicina en plantas	Permite la expresión de AtA6PR en forma nativa en plantas.
pGWB6-AtA6PR		CaMV35S	Kanamicina en bacterias, Higromicina en plantas	Permite la sobre-expresión de AtA6PR fusionada a epítipo de 6xHis C-terminal en plantas.
pET19b-MdA6PR		T7	Ampicilina	Permite la sobre-expresión de MdA6PR fusionada a un epítipo 6xHis N-terminal en bacterias. (Figueroa e Iglesias, 2010)
pET28a-AtA6PR		T7	Kanamicina	Permite la sobre-expresión de AtA6PR fusionada a un epítipo 6xHis N-terminal en bacterias. (Wurman, 2013)
pMDC43-AtA6PR		2x CaMV35S	Kanamicina en bacterias, Higromicina en plantas	Permite la sobre-expresión del mRNA de GFP-AtA6PR, posiblemente produciendo SGPT de AtA6PR. (Zamudio, 2010)

transferasa terminal). Para esta reacción, la mezcla contenía, en un volumen de 10 µL: 200 ng de cDNA purificado, 1X NH₄ Reaction Buffer, MgCl₂ 3 mM, dATP 0,2 mM y 0,5 U de Biolase™ DNA Polymerase de Bionline. Se incubó (72 °C, 30 min) y luego se almacenó el producto a -20 °C.

Finalmente, los fragmentos AtA6PR se clonaron en cada vector siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubaron las mezclas por 2 hrs a temperatura ambiente y posteriormente se utilizaron para transformar *E. coli* quimiocompetentes One Shot® Mach1™, por golpe térmico (sección 4.11.1).

4.9.2 Vectores pGWB2-AtA6PR y pGWB8-AtA6PR

Se utilizó la tecnología Gateway para transferir AtA6PR (fragmentos con y sin codón de detención según las especificaciones del vector de destino) por recombinación homóloga desde el vector pCR@8 (pCR8-AtA6PR.FL y pCR8-AtA6PR.ss respectivamente, Tabla IV) a los vectores pGWB2 y pGWB8, utilizando el LR Clonase™ Enzyme Mix de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se utilizaron los vectores para transformar *E. coli* (sección 4.11.1) y *A. tumefaciens* (sección 4.11.2) quimiocompetentes por golpe térmico.

4.10 Análisis molecular de vectores

Se analizaron todos los vectores creados por PCR, digestión enzimática y secuenciación. Los análisis *in-silico* de las secuencias se realizaron con los programas Vector NTI Advance 10 de Invitrogen y Bioedit version 7.0.0.

4.10.1 pEXP5-NT-AtA6PR.

Se comprobó la presencia de AtA6PR por PCR, amplificando un fragmento de 1070 pb con el protocolo T7-AtA6PR y el mix homónimo (Tablas II y III). La orientación del fragmento se determinó por digestión enzimática con las enzimas de restricción Nco I y Ssp I (reacción realizada según las indicaciones del fabricante). La fidelidad de la clonación se determinó por secuenciación (Macrogen, USA) con los partidores T7 incluidos en el kit de clonación del vector. Se utilizó este vector para realizar la expresión *in-vitro* de 6xHis-AtA6PR (sección 4.15)

4.10.2 pCR8-AtA6PR.FL y pCR8-AtA6PR.ss.

La presencia de AtA6PR se demostró por PCR con el protocolo M13-AtA6PR y el mix del mismo nombre (Tablas II y III), esperándose un fragmento de 1076 pb. La orientación del mismo fue determinada por digestión enzimática con las enzimas de restricción Nco I y BstE II (reacción realizada según las indicaciones del fabricante). La fidelidad de la clonación se determinó por secuenciación (Macrogen, USA) con los partidores universales M13 forward y reverse. Se utilizaron estos vectores para transferir AtA6PR a los vectores pGWB (sección 4.9.2).

4.10.3 pGWB2-AtA6PR.

Este vector se analizó por PCR con el protocolo y mix 35S-AtA6PR, que amplifican un fragmento de 1504 pb. También se linearizó el vector con la enzima de restricción SacI y se secuenció (Macrogen, USA) con los partidores 35S.F(2) y S6R (Tabla I). Se utilizó este vector para transformar *A. tumefaciens* y posteriormente hojas de *N. tabacum* en forma transitoria para expresar AtA6PR nativo (secciones 4.11.2 y 4.11.3).

4.10.4 pGWB8-AtA6PR.

Se analizó la correcta formación de este vector por PCR con el protocolo y mix 35S-AtA6PR, que amplifican un fragmento de 1504 pb. Adicionalmente, se linearizó el vector con la enzima de restricción Xba I y se secuenció (Macrogen, USA) con los partidores 35S.F(2) y His3 (Tabla I). Se utilizó este vector para transformar *A. tumefaciens* y posteriormente hojas de *N. tabacum* en forma transitoria para expresar 6xHis-AtA6PR (sección 4.11.3).

4.11 Transformación genética de material biológico

4.11.1 Escherichia coli quimiocompetentes.

Se agregó 5-10 ng de vector a las células competentes (cepas BL21 y/o BL21 pLYss para los vectores pET, cepa OneShot Mach1 para los otros vectores). Se incubó en hielo por 30 minutos y se dió un pulso de golpe térmico (30 segundos a 42 °C). Se transfirieron las células transformadas a hielo nuevamente, se agregó 1 mL de medio

LB y se incubó a 37 °C por 1 hr. Se sembraron las células en placa con antibióticos de selección (sección 4.8) a 100 µg/mL.

4.11.2 *Agrobacterium tumefaciens* quimiocompetentes.

Se agregaron 200 ng de vector a las células competentes. Se incubaron en N₂ líquido durante 5 minutos y luego se agregó 1 mL de medio LB. Se incubó a 28 °C durante 10-16 hrs y luego se sembraron las células transformadas en placa con antibióticos para la selección del vector (sección 4.8), del plásmido Ti (Gentamicina 100 µg/mL) y de la cepa (Rifampicina 10 µg/mL).

4.11.3 *Nicotiana tabacum* – transformación transitoria.

Se transformaron hojas de tabaco por Agroinfiltración. Se creció *A. tumefaciens* en 5 mL de medio LB líquido (sección 4.1.1), se centrifugaron las células y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en medio de infiltración [MS (Murashige & Skoog Basal Salt Mixture) 4,43 g/L, mio-inositol 0,56 mM y acetosiringona 0,6 mM] hasta alcanzar una DO₆₀₀ 0,5-0,8. Con una jeringa de 5 mL sin aguja, se infiltró la parte inferior de hojas de tabaco de 10 semanas de edad, que fueron mantenidas en condiciones ambientales controladas (sección 4.1.4).

4.11.4 *Arabidopsis thaliana* – transformación estable.

Se transformó *A. thaliana* Col-0 por el método de inmersión floral (Bent, 2006). Se creció *A. tumefaciens* portadora del vector pMDC43-AtA6PR¹ (Zamudio, 2010) en 100 mL de medio LB líquido (sección 4.1.1) hasta alcanzar una DO₆₀₀ = 2. Se centrifugaron las células y se resuspendieron en medio de inmersión [sacarosa 5% p/v, Silwett L-77 0,05% v/v] hasta una DO₆₀₀ = 0,5-0,8. Luego, se sumergió la parte aérea de plantas adultas de *A. thaliana* (4-5 semanas aprox) en esta solución – 3-5 veces durante 5 segundos – y se mantuvo la planta en oscuridad por 10-16 hrs.

¹ El vector pMDC43-AtA6PR fusiona GFP N-terminal a AtA6PR, sin embargo durante la clonación se incorporó un codón de término entre las dos secuencias, produciendo que la planta sobre-exprese el mRNA de GFP-AtA6PR pero no la proteína de fusión (sin embargo, sí se produce GFP). Dadas estas características, podría provocar silenciamiento génico de AtA6PR por co-supresión (Voinnet, 2008)

Se dejaron madurar las semillas, se eliminaron nuevas flores (que no sufrieron el proceso de transformación) y se recolectaron las semillas maduras para selección por antibióticos (sección 4.1.5).

4.12 Análisis de plantas

4.12.1 Transformación transitoria – *N. tabacum*

Se demostró la expresión de AtA6PR y 6xHis-AtA6PR en las hojas transformadas por RT-PCR. 3 días después de la transformación, se cosecharon las hojas de tabaco para extraer el RNA total de las hojas transformadas (sección 4.2.3) y a partir de éste generar cDNA (sección 4.5). Utilizando éste como templado, se realizó una reacción de PCR con el mix y protocolo AtA6PR (Tablas II y III).

Paralelamente, se realizó una extracción de proteínas, que se analizaron por SDS-PAGE (sección 4.16.1) y western blot (sección 4.16.2) para demostrar la expresión de AtA6PR-His y AtA6PR.

4.12.2 Transformación estable – *Arabidopsis thaliana*

Se seleccionaron las plantas transformadas por resistencia al antibiótico higromicina (sección 4.1.5). Las plantas resistentes fueron crecidas en medio hidropónico, para a las 6 semanas de edad, analizar su DNA por PCR (protocolo y mix GFP-AtA6PR), amplificando desde el codón de inicio de la secuencia que codifica la proteína GFP hasta el extremo 3' de AtA6PR para confirmar la incorporación del T-DNA al genoma de la planta. A las mutantes encontradas se les permitió completar su ciclo de vida y se recolectaron las semillas luego de su maduración.

Posteriormente, se sembraron las semillas obtenidas (T₂) de cada línea en medio de selección (MS suplementado con higromicina 25 µg/mL, sección 4.1.5). Se analizó la proporción de individuos resistentes y sensibles al antibiótico para verificar la segregación mendeliana de la resistencia (indicio de una inserción única en el genoma de la planta). Se dejaron crecer en medio hidropónico y se identificaron mutantes homocigotas de cada línea analizando la proporción de semillas T₃ resistentes a antibiótico, ya que el 100% de las semillas provenientes de una planta homocigota presentan resistencia al antibiótico. Posteriormente, se analizó la expresión génica de las mutantes obtenidas por qRT-PCR (sección 4.7).

4.12.3 Mutantes insercionales SALK

Se obtuvieron plantas de la colección SALK (Alonso y cols., 2003) del Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto SALK (SIGnAL). Éstas corresponden a *A. thaliana* tipo Col-0, transformadas establemente con el plásmido pROK 2- (Baulcombe y cols., 1986). Éste inserta aleatoriamente un fragmento de ~4,5 kb en el genoma de la planta, interrumpiendo diferentes loci. Ya que estas líneas se encuentran parcialmente genotificadas, es posible comprar semillas de líneas mutantes knock-down y/o knock-out para un locus específico. En este trabajo, se adquirieron las líneas SALK 084572, SALK 021705, SALK 028553 y SALK 012061; en ellas la inserción de T-DNA se encuentra supuestamente en el promotor de *AtA6PR*, y en los exones 3, 4 y 5, respectivamente.

Se analizó el genoma de las plantas T₁ por PCR (sección 4.6), utilizando los protocolos y mix GAPA – como control de calidad del DNA –, SALK – para demostrar la presencia del T-DNA y la interrupción del gen *AtA6PR* en las plantas transformadas – y *AtA6PR* – para descartar las plantas heterocigotas – (Tablas II y III). Se secuenció el amplicón (Macrogen, USA) para identificar con precisión el sitio de inserción del T-DNA y se determinaron los niveles de transcrito de *AtA6PR* y *At2g21260* por qRT-PCR (sección 4.7). En forma complementaria, se analizaron datos de microarreglos de la expresión de *AtA6PR* bajo diferentes condiciones de estrés abiótico, utilizando el recurso Arabidopsis eFP Browser del servidor del Botany Array Resource (BAR, <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Éste, a su vez, utiliza datos de microarreglos (Affymetrix ATH1 array) obtenidos por Schmid y cols (2005) y del AtGenExpress Consortium Data (<http://igr0.psc.riken.jp/AtGenExpressJPN/>).

Además, se analizó la germinación, crecimiento (sección 4.1.5) y perfil de azúcares (sección 4.13) de mutantes sometidas a distintos grados de estrés salino.

4.13 Extracción y análisis de azúcares

4.13.1 Extracción de azúcares

Para cada muestra, se homogenizaron 300 mg de plántulas congeladas en N₂ líquido con 1 mL de etanol 95% (calidad analítica) por 3-5 minutos. Se centrifugó la mezcla a 10000 rpm por 10 minutos y se rescató el sobrenadante. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol 80% (calidad analítica), se agitó vigorosamente por 3-5

minutos y se repitió la centrifugación. Se rescató este sobrenadante y después de unirlo al anterior, se filtró con 2 capas de papel Whatman 1. Se ajustó el volumen final de la extracción a 2 mL y se mantuvo a -20 °C durante 16 hrs, para luego evaporar el etanol incubando a 50 °C bajo nitrógeno gaseoso. Se redisolvió el residuo en 300 µL de solución de resuspensión [H₂SO₄ 0,2 N y EDTA 0,05%], que se pasó por una columna Sep-Pak C18 Plus (filtro de sílica de alta hidrofobicidad, se utilizan para adsorber analitos hidrofóbicos de soluciones acuosas), previamente activada con 10 mL de metanol seguidos por 10 mL de agua y 10 mL de aire. Se recuperó el eluido y se filtró con un filtro de nylon de 0,45 µm Millex® de Millipore. Se congelaron las muestras a -20 °C hasta el momento del análisis.

4.13.2 Análisis de azúcares

Se separó la mezcla de azúcares presentes en plántulas de Arabidopsis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) realizada en el Laboratorio de Postcosecha del INIA – CRI La Platina. Para ello, se inyectaron 20 µL de cada muestra a un cromatógrafo Jasco LC-NetII/ADC, que mantuvo un flujo constante (1,5 mL/min) de la fase móvil – consistente en un 82% de acetonitrilo y un 18% de agua – corriendo a través de una columna amino Kromasil 100 – 5NH₂ (250 mm x 4,6 mm) durante aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente y una presión de 15 kPa. La detección se realizó a través de un detector ELSD (Evaporative Light Scattering Detectors) SEDEX 60 LT, Sedere, y los datos obtenidos se visualizaron y cuantificaron utilizando el software Chrompass. Los datos obtenidos se graficaron y analizaron con el programa GraphPad Prism, el cual utilizó un test de ANOVA para detectar diferencias significativas (p<0,05) entre los conjuntos de datos. Las diferencias significativas (p<0,05) entre cada conjunto de datos se obtuvieron gracias al post-test de comparación múltiple de Bonferroni. Cada medición fue realizada por duplicado a partir de cuatro réplicas técnicas provenientes de un pool de réplicas biológicas.

4.14 Extracción de proteínas

4.14.1 Extracción desde plantas – SDS-PAGE

Se congeló 1 g de tejido en N₂ líquido y se homogenizó con 2 mL de buffer sodio-fosfato [NaH₂PO₄ (pH 6,8) 100 mM; NaCl 150 mM; EDTA 10 mM; Tiourea 10

mM; DTT 10 mM; Tween-20 0,3% v/v; Tritón X-100 0,05% v/v]. Se centrifugó a 15.000 g por 5 minutos y se rescató el sobrenadante con proteína para cargar geles de poliacrilamida (Tao y cols., 1995).

4.14.2 Extracción desde plantas – Actividad

Se homogenizó en mortero 1 g de hojas de tabaco con 5 mL de buffer PVPP [Tris-HCl (pH 8) 100 mM; polivinilpolipirrolidona (PVPP) 4% p/v y β -mercaptoetanol 10 mM]. Se centrifugó a 15.000 g por 20 minutos y se pasó la muestra por una columna de Sephadex G-100 de 11 cm de altura y 50 mL de volumen, previamente equilibrada con Tris-HCl (pH 9,3) 100 mM y β -mercaptoetanol 10 mM. Se concentró la fracción rica en proteínas por ultracentrifugación (10 minutos a 14000 g, a 4 °C) con Centricon-30 y se utilizó para los ensayos de actividad (sección 4.17; Tao y cols., 1995).

4.14.3 Extracción desde microorganismos.

Se crecieron células de *E. coli* en 200 mL de cultivo líquido (sección 4.1.1) a 37 °C hasta una D.O.₆₀₀ de 0,5. Se probaron varias condiciones para inducir la expresión de las proteínas de interés agregando IPTG hasta una concentración final de 0,05 o 0,5 mM. Se incubó a 37 o 25 °C durante 4 hrs u O.N. (16-24 hrs) con agitación (220 rpm), luego de lo cual se centrifugaron y se congelaron las células a -80 °C hasta su uso.

Para extraer las proteínas, se utilizaron dos métodos para obtener proteínas desde cultivos líquidos de *E. coli*. En el primero, modificado del trabajo de Figueroa e Iglesias. (2010), se resuspendieron las células inducidas en buffer A [Tris-HCl pH 8 25 mM; NaCl 300 mM, glicerol 10%; PMSF 0,1 mM; BME 1 mM] y se lisaron las células por sonicación (1 pulso de 10 segundos cada 30 segundos por 3 minutos a 40% de amplitud), utilizando un sonicador Misonix® Microson xl2000 Ultrasonic Cell Disruptor. En algunos experimentos, se agregó G6P 20 mM a la suspensión celular antes de sonicar. Posteriormente, se separó la fracción soluble de la insoluble de la suspensión celular por centrifugación (15 minutos a 10.000 g) a 4 °C.

El segundo método consistió en lisar las células a través del reactivo B-PER® (Bacterial Protein Extraction Reagent) de Thermo Scientific, que utiliza detergentes no iónicos y enzimas – lisozimas y DNasa I – para lisar las células y solubilizar proteínas. Se utilizó este método siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.15 Expresión *in vitro* de proteínas.

Se utilizó el kit Expressway™ Cell-Free Expression System de Invitrogen, el cual permite la transcripción y traducción *in-vitro* de una secuencia de DNA en una sola reacción, produciendo una proteína recombinante de fácil detección y purificación al agregar un epítipo 6xHis escindible en el extremo N-terminal de la proteína (www.invitrogen.com). La reacción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando 1 µg del vector pEXP5-NT-AtA6PR como DNA templado y 1 µg del vector pEXP5-NT/CALML3 como control positivo de la reacción.

4.16 Análisis de proteínas

Las proteínas obtenidas se cuantificaron por método de Bradford, utilizando el reactivo comercial Protein Assay Dye Reagent Concentrate (de Bio-Rad) y luego se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) y western blot.

4.16.1 SDS-PAGE

Se cargaron muestras de proteínas en geles de poliacrilamida 15% p/v [1,2 mL de agua destilada; 2,5 mL de solución de acrilamida 30 % (p/v) y bis-acrilamida 0,8 % (p/v); 1,25 mL de buffer Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 25 µL de SDS 20% (p/v); 25 µL de APS 10 % (p/v) fresco y 2,5 µL de TEMED]. El gel compresor fue preparado al 4 % (p/v) [1,539 mL de agua destilada; 335 µL de una solución de acrilamida 30 % (p/v) y bis-acrilamida 0,8 % (p/v); 625 µL buffer Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 12,5 µL de SDS 20% (p/v); 25 µL de APS 10 % (p/v) fresco y 5 µL de TEMED].

Se realizó la electroforesis con los geles sumergidos en buffer de corrida [Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 200 mM y SDS 0.1 % (p/v)]. Se mezclaron las muestras con una solución 5X de tampón de carga [Tris-HCl 60 mM pH 6,8; glicerol 25 % (v/v), BME 28,8 mM, azul de bromofenol 0,1 % (p/v) y SDS 2 % (p/v)] y se incubaron a 90 °C por 10 min. Se cargaron entre 25 µg de proteínas de cada muestra y se corrió por 30 minutos a un potencial de 85 V y luego por 1 hora y media a un potencial de 120 V. Los geles fueron revelados mediante tinción de Coomassie. Las bandas obtenidas fueron analizadas con el software ImageJ 1.47.

4.16.2 Western-blot

Una vez resuelto el gel SDS-PAGE, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa usando Trans-Blot® SD "Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell" de Bio-Rad. La transferencia se efectuó a 15 V por 20 min y luego se comprobó incubando la membrana con una solución de Rojo de Ponceau [Rojo de Ponceau 0,1 % (p/v), ácido acético 5 % (v/v)] que se eliminó posteriormente lavando la membrana con agua destilada. Luego de la transferencia se incubó la membrana O.N. a 4 °C, con agitación suave, en una solución de leche marca Svelty 4% (p/v) en TBS-T [Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 140 mM y Tween-20 0,1 % (v/v)] para evitar la unión inespecífica de anticuerpos a la membrana. Posteriormente, ésta se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 mín para después incubarla, con agitación suave, durante 3 horas a temperatura ambiente en la solución de anticuerpo primario ["Monoclonal Anti-polyHistidine antibody produced in mouse" de Sigma®, disuelto 1:3000 en solución de leche 4% (p/v) en TBS-T o en suero sanguíneo anti-AtA6PR generado en ratón (Wurman, seminario de título Ing. Biotecnología Molecular, 2013) 1:4000 en solución leche 2% (p/v) en TBS-T]. Luego, se lavó la membrana 3 veces con TBS-T durante 10 min y se incubó con agitación suave durante 2 horas a temperatura ambiente en solución de anticuerpo secundario ["Anti-Mouse IgG (whole molecule) alkaline phosphatase conjugate", de Sigma®] disuelto 1:25000 en solución de leche 5% (p/v).

Para revelar el western blot, se lavó la membrana 3 veces con TBS-T durante 10 min y 2 veces con buffer alcalino [Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM] durante 5 min. Luego, se incubó la membrana a temperatura ambiente con 30 mL de buffer Alcalino, 198 µL de NBT 50 % (p/v) en DMSO y 99 µL de BCIP 50 % (p/v) en DMSO, hasta que las bandas se hicieran visibles (~ 5 min). Finalmente la reacción se detuvo con 20 mL de EDTA 20 mM.

4.16.3 Purificación de proteínas

Se purificó 6xHis-MdA6PR y 6xHis-AtA6PR desde los lisados de células por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC), utilizando columnas His-trap™ HP de GE Healthcare Life Sciences de 1 mL. Estas columnas contienen una matriz de sefarosa unida a iones de Níquel (Ni²⁺), al que se une el epítipo de histidinas presentes en la proteína recombinante, siendo ésta retenida mientras el resto de las proteínas presentes en la mezcla son eluidas en las primeras fracciones. Se cargó el

sobrenadante del lisado de células en la columna (previamente equilibrada con 10 volúmenes de buffer A). Se eluyeron las proteínas unidas débilmente a la columna con buffer A suplementado con imidazol 40 mM y las proteínas unidas fuertemente a la columna con buffer A suplementado con imidazol 300 mM, recolectando aproximadamente 10 fracciones de 2 mL. La proteína recombinante se obtuvo generalmente en la primera fracción eluida con imidazol 300 mM. La proporción de proteína purificada se calculó a través del software de análisis de imagen ImageJ, con el cual se evaluó la cantidad de proteína contenida en cada banda de cada carril, lo que permitió establecer qué proporción de la proteína total corresponde a AtA6PR.

4.17 Ensayos de actividad

Se realizaron ensayos de actividad enzimática *in vitro*, midiendo el aumento o disminución de la absorbancia a 340 nm de λ (A_{340}) en la mezcla de reacción a medida que se oxida NADPH o se reduce NADP^+ . La medición se realizó con un espectrofotómetro Unicam UV4-100, donde se llevó a cabo la reacción en cubetas plásticas de 500 μL de capacidad, a temperatura ambiente.

Se probaron diversas mezclas de reacción para medir la actividad de la proteína, utilizando como modelo las mezclas de reacción utilizadas por varios autores. Para las proteínas extraídas desde tabacos transformados, las mezclas utilizadas consistieron en buffer Tris-HCl 45 mM (pH 9,3), NADP^+ 0,91 mM, S6P 18 mM y entre 10 y 20 μg de preparación enzimática concentrada (sección 4.14.2) en un volumen final de 200 μL (para la oxidación de S6P), según lo descrito para A6PR de *Malus domestica* (manzana) por Tao y cols. (1995). Para la reducción de G6P a S6P, la mezcla de reacción se compuso de Tris-HCl 100 mM (pH 8), NADPH 0,2 mM, G6P 50 mM, y entre 10 y 20 μg de enzima concentrada (sección 4.14.2) en un volumen final de 200 μL . En los ensayos donde se utilizó proteína proveniente de *E. coli*, las mezclas utilizadas fueron variantes de la reacción llevada a cabo por Figueroa e Iglesias (2010), donde se mezclaron Tris-HCl 100 mM (pH 8), NADP^+ 1 mM, S6P 20 mM y entre 10 y 100 μg de preparación enzimática o enzima purificada en un volumen final de 500 μL para la oxidación de S6P o Tris-HCl 100 mM (pH 8), NADPH 0,2 mM, G6P 50 mM, y entre 10 y 100 μg de preparación enzimática o enzima purificada en un volumen final de 500 μL (para la reducción de G6P).

5 RESULTADOS

5.1 Formación de los vectores pGWB2-AtA6PR, pGWB8-AtA6PR y pEXP5-NT-AtA6PR.

Uno de los objetivos de este trabajo consiste en determinar la actividad enzimática de AtA6PR. Para ello, lo ideal es obtener la enzima purificada, tarea que se facilita enormemente al expresar la enzima fusionada a un epítipo que permita su unión a una matriz. Con este propósito, se creó el vector pEXP5-NT-AtA6PR (Tabla IV), el cual permite la expresión *in-vitro* de AtA6PR fusionado a un epítipo de 6 histidinas (6xHis) en el extremo N-terminal.

Dado que se busca dilucidar la actividad de la proteína, que puede depender de modificaciones post-traduccionales que el sistema *in vitro* descrito no realiza, se decidió expresarla en forma paralela en plantas de tabaco. Para ello, se crearon los vectores pGWB2-AtA6PR y pGWB8-AtA6PR (Tabla IV) para la expresión *in planta* de la proteína de interés. Mediante el vector pGWB8, se añade el epítipo (6xHis) en la región C-terminal a la proteína; por lo tanto el CDS de *AtA6PR* fue clonado en este vector sin codón de término, a diferencia de su clonación en pGWB2, un vector que no agrega epítopos a la proteína.

Se obtuvo por PCR (sección 4.6) los fragmentos AtA6PR.FL y AtA6PR.ss (que contienen la región codificante de *AtA6PR* con y sin codón de término, respectivamente, sección 4.8.3), utilizando como templado el vector pCR8-AtS6PDH (Zamudio, 2010). El fragmento AtA6PR.FL se clonó en los vectores pEXP5-NT y pCR@8 (Figura 4), mientras que AtA6PR.ss fue clonado sólo en el vector pCR@8 (sección 4.9.1); obteniéndose así los vectores de entrada pCR8-AtA6PR.FL y pCR8-AtA6PR.ss y el vector de expresión *in vitro* pEXP5-NT-AtA6PR (Tabla IV).

Cada vector se propagó en células de *E. coli*. En cada uno de ellos se comprobó la presencia del fragmento *AtA6PR*, su orientación respecto al promotor (T7; pEXP5-NT-AtA6PR) o los sitios *att* (pCR8-AtA6PR.FL y pCR8-AtA6PR.ss) por PCR y digestión enzimática (sección 4.10, datos no mostrados) y la fidelidad de la clonación por secuenciación (100% de identidad nucleotídica respecto al CDS de *AtA6PR* depositada en www.arabidopsis.org).

Posteriormente, se utilizó el vector pEXP5-NT-AtA6PR para la reacción de transcripción y traducción *in vitro* (sección 4.15). Los vectores pCR8-AtA6PR.FL y pCR8-AtA6PR.ss, por su parte, fueron utilizados para transferir por recombinación el fragmento a los vectores pGWB2 y pGWB8 respectivamente, formando así los vectores pGWB2-AtA6PR y pGWB8-AtA6PR (sección 4.9.2, Figura 5), que también fueron evaluados por PCR, digestión con enzimas de restricción y secuenciación (donde también se obtuvo un 100% de identidad nucleotídica, datos no mostrados). Éstos se utilizaron para transformar *A. tumefaciens* (sección 4.11.2), con la cual se transformó transitoriamente hojas de tabaco por agroinfiltración (sección 4.11.3).

5.2 AtA6PR obtenida por transformación transitoria de *N. tabacum*.

5.2.1 Obtención de AtA6PR y AtA6PR-His.

Tres días luego de la transformación, se cosecharon las hojas de tabaco transformadas y se realizó una reacción de RT-PCR para verificar la expresión del mRNA de *AtA6PR* (sección 4.12.1). En la Figura 6.A se puede observar una banda del tamaño esperado (poco menor a 1 kb) tanto en las muestras transformadas para expresar *AtA6PR* como en el control positivo, la que no se observa en ninguno de los controles negativos (muestras de RNA – carriles sin RT– y hoja infiltrada con medio de infiltración). Se comprueba que la falta de amplicón de *AtA6PR* en los controles negativos se debe a la falta de cDNA de este gen en particular y no a una baja calidad del cDNA, ya que en esta misma muestra el fragmento del gen *18S* sí es amplificado al igual que en las muestras transformadas (Figura 6.B)

Una vez verificada la expresión de *AtA6PR*, se extrajeron las proteínas de las muestras para analizarlas por SDS-PAGE y Western Blot (secciones 4.14.1 y 4.16). En el gel teñido con azul de Coomassie (Figura 6.C) se observa una gran banda de ~50 kDa, que corresponde a la subunidad grande de la proteína RuBisCo (Maier y cols., 2012). Sin embargo no se distingue mayor presencia de bandas a ~35-38 kDa (los tamaños esperados para *AtA6PR* y *AtA6PR-6xHis*, respectivamente). En la Figura 6.D (Western blot) se observa la presencia de *AtA6PR-6xHis* en el carril correspondiente a la hoja infiltrada con el vector pGWB8-*AtA6PR*, la cual migra de manera semejante al control positivo utilizado (*MdA6PR*, Figueroa e Iglesias, 2010). Sin embargo, no se observa una banda similar correspondiente a *AtA6PR* ya que el anticuerpo utilizado

([“Monoclonal Anti-polyHistidine antibody produced in mouse” de Sigma®, sección 4.16.2) reacciona específicamente con el epítipo 6xHis. Esto confirma la construcción de los vectores, indicando que pGWB2-AtA6PR y pGWB8-AtA6PR son adecuados para la expresión de *AtA6PR* *in planta* y que el último es adecuado para la síntesis *in planta* de *AtA6PR*-6xHis en *N. tabacum*.

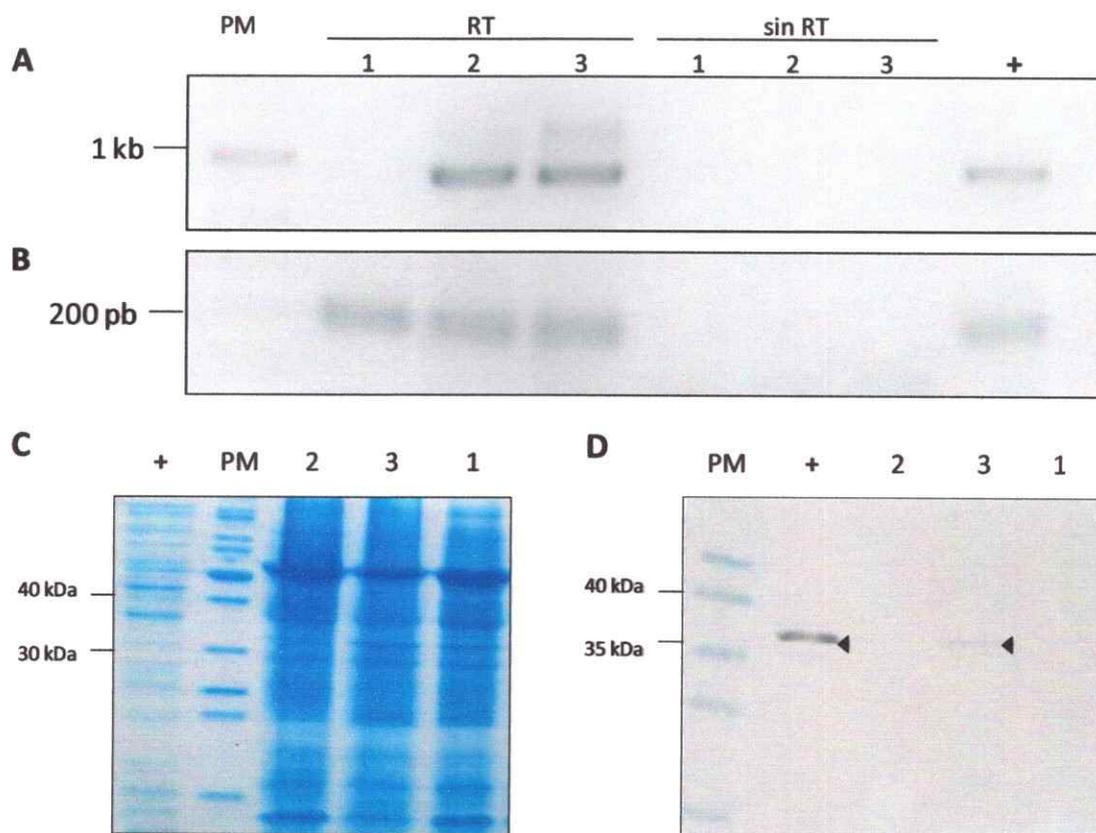


Figura 6: Expresión de *AtA6PR* en hojas de tabaco. A: RT-PCR del CDS de *AtA6PR*. B: RT-PCR de un fragmento interno de *18S*. C: Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. D: Western Blot realizado con antisuero α -6xHis. PM: Estándar de peso molecular. RT: muestras de mRNA tratadas con Transcriptasa Reversa. sin RT: muestras de mRNA sin tratamiento con Transcriptasa Reversa (Controles Negativos de la reacción de RT-PCR). +: Control positivo de la reacción (vector pCR8-*AtA6PR*.FL en A, DNA de tabaco de tipo silvestre en B, mix de proteínas solubles de *E. coli* transformadas para expresar Md-A6PR-His en C y D) 1: cDNA (en A y B) o proteínas (en C y D) extraídas desde hojas infiltradas sólo con medio de infiltración (control negativo de la transformación). 2: cDNA (en A y B) o proteínas (en C y D) extraídas desde hojas de tabaco transformado con pGWB2-*AtA6PR* (proteína sin epítipo, actúa como control negativo del western-blot). 3: cDNA (en A y B) o proteínas (en C y D) extraídas desde hojas de tabaco transformadas con pGWB8-*AtA6PR* (*AtA6PR*-6xHis). Las cabezas de flecha marcan las bandas correspondientes a His-*AtA6PR* (carril +) y *AtA6PR*-6xHis (carril 3).

5.2.2 Purificación y actividad de AtA6PR y AtA6PR-His

Una vez confirmada la acumulación del transcrito de *AtA6PR* y *AtA6PR-6xHis* y de la proteína AtA6PR-6xHis en las hojas transformadas, se realizaron extracciones de proteínas totales para examinar su actividad con G6P, manosa-6-P y S6P, respecto a las provenientes de hojas no transformadas (secciones 4.14.2 y 4.17). Para eliminar posibles impurezas que pudieran interferir con la reacción, se purificó parcialmente el extracto de proteína (sección 4.14.2, **Figura 7**) por cromatografía de exclusión molecular, utilizando una columna de Sephadex G-100, obteniéndose 18 fracciones de 1,5 mL que se analizaron por SDS-PAGE (**Figura 7**). Como se observa en la **Figura**

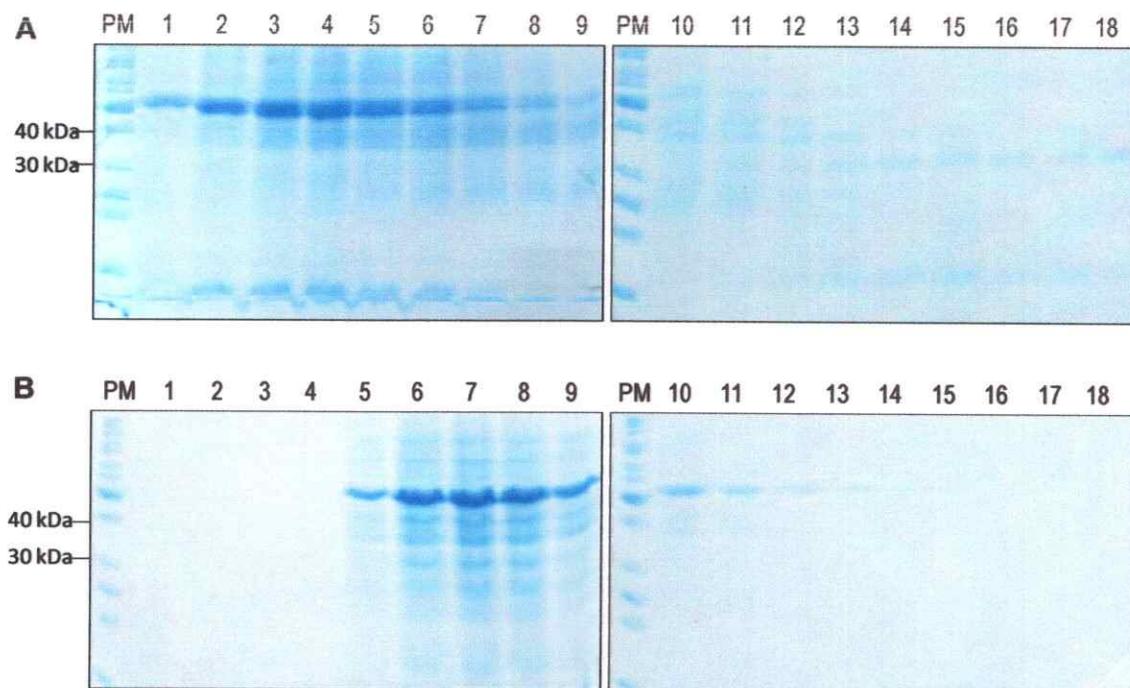


Figura 7: Purificación parcial de AtA6PR y AtA6PR-His producida en plantas. A: Fracciones 1-18 (carriles 1-18) obtenidas al separar cromatográficamente proteínas extraídas desde hojas de tabaco transformadas con el vector pGWB2-AtA6PR por una columna de Sephadex G-100 de 11 cm de altura y 50 mL de volumen. **B:** Fracciones 1-18 (carriles 1-18) obtenidas al pasar proteínas extraídas desde hojas de tabaco transformadas con el vector pGWB8-AtA6PR por una columna de Sephadex G-100 de 6 cm de altura y 12 mL de volumen. La diferencia en la altura y volumen de las columnas explica las diferencias entre el patrón de bandeo de las figuras A y B. **PM:** Estándar de peso molecular.

7.A (correspondiente a extractos con presencia de AtA6PR), se obtuvo proteína en todas las fracciones recolectadas, con las proteínas de mayor tamaño en las fracciones iniciales y las de menor tamaño en las fracciones finales. En la **Figura 7.B** (extractos con presencia de AtA6PR-His) se observaron resultados similares pero con una menor separación de proteínas ya que se utilizó una columna de menor tamaño. Ya que el tamaño esperado de AtA6PR y AtA6PR-His corresponde a ~35 kDa, se tomaron las fracciones con mayor presencia de proteínas entre 30 y 40 kDa (fracciones 7-18 para AtA6PR y 6-10 para AtA6PR-His), que se utilizaron para los ensayos de actividad.

Inicialmente, no se encontró actividad en ninguna de las muestras examinadas (provenientes de las hojas transformadas con los vectores pGWB2-AtA6PR y pGWB8-AtA6PR), por lo que la mezcla de proteína se concentró con columnas Centricon-30 y se repitieron los ensayos de actividad. Si bien en estas condiciones se obtuvo actividad enzimática (se detectó reducción de NADP⁺ al utilizar S6P como sustrato) con el extracto proteico concentrado obtenido de las hojas transformadas con el vector pGWB2-AtA6PR, las réplicas biológicas no reprodujeron los datos obtenidos, por lo que se detuvieron los experimentos para determinar la actividad de AtA6PR *in planta*.

5.3 His-AtA6PR obtenida por sistema de expresión *in vitro*.

Una vez realizada la reacción de transcripción y traducción *in vitro* a 37 °C (siguiendo las instrucciones del fabricante), se analizó la mezcla de reacción por SDS-PAGE y Western Blot (sección 4.16). En el gel teñido con azul de Coomassie (**Figura 8.A**), se observó gran número de proteínas involucradas en la reacción, sin destacarse bandas de gran grosor a ~38 kDa (el tamaño esperado de His-AtA6PR). En el western blot (**Figura 8.B**), sin embargo, se observa la presencia de la proteína de fusión, indicando que el sistema es capaz de sintetizar His-AtA6PR. Se intentó optimizar la eficiencia de la reacción variando la temperatura (según indicaciones del fabricante), sin obtenerse síntesis de proteína a 33 °C o 30 °C (**Figura 8.B**). Sin embargo, a 37 °C la mayoría de His-AtA6PR se encuentra en la fracción insoluble (datos no mostrados). Se realizaron ensayos de actividad con la mezcla obtenida después de la transcripción y traducción *in vitro*. Lamentablemente, las proteínas involucradas en el sistema de transcripción y traducción también presentaron actividad redox en presencia de NADP⁺ y NADPH, impidiendo obtener resultados claros de actividad (datos no mostrados).

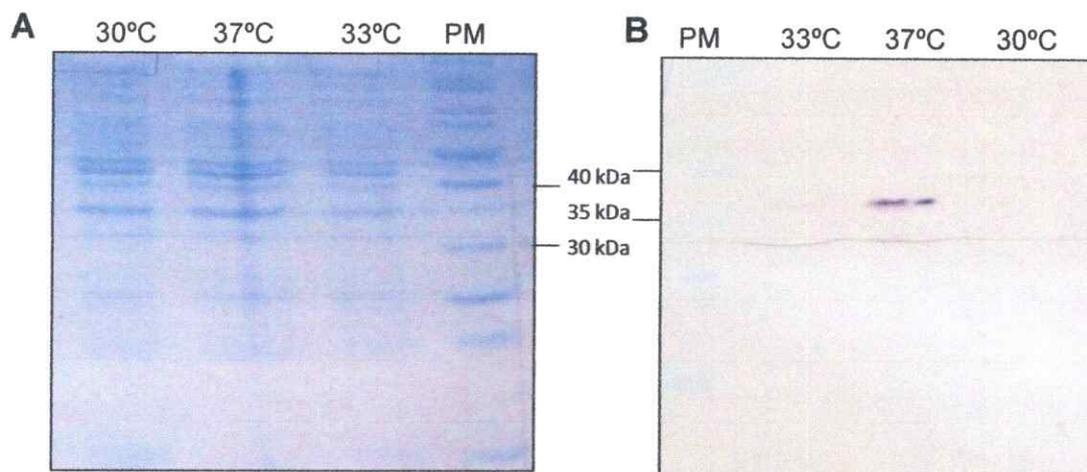


Figura 8: Expresión *in vitro* de His-AtA6PR a diferentes temperaturas. A: gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. B: Western-blot realizado con anticuerpo α -6xHis. PM: Estándar de peso molecular. Las temperaturas señaladas indican a que temperatura se incubó cada reacción durante la transcripción y traducción *in vitro*.

Por esta razón, y debido a que el propósito de este sistema de expresión fue la obtención de His-AtA6PR pura (lo que fue impedido por la pequeña cantidad de proteína soluble obtenida) se optó por expresar la enzima utilizando un sistema heterólogo en *E. coli*, desarrollado en paralelo en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal durante el transcurso de este trabajo para la síntesis de un antisuero α -His-AtA6PR (Wurman, 2013).

5.4 His-AtA6PR obtenida por expresión en bacteria.

5.4.1 Expresión en bacteria de His-AtA6PR.

Durante el desarrollo de este trabajo, en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal se creó el vector pET28a-AtA6PR para la producción de un antisuero α -His-AtA6PR (Tabla IV; Wurman, 2013) que permite la sobreexpresión de His-AtA6PR en *E. coli*. Debido a que en ambos sistemas de expresión analizados previamente (*in planta* e *in vitro*, secciones 5.2 y 5.3 respectivamente) no se logró purificar la enzima ni detectar actividad, acompañado de una baja cantidad y/o volumen de proteína producida, se decidió purificar la proteína recombinante de fusión a partir de la sobreexpresión inducible por IPTG en *E. coli*.

Se optimizó la producción de His-AtA6PR utilizando diferentes condiciones de inducción (**Figura 9**): se probaron 2 temperaturas (25 °C y 37 °C), 2 concentraciones de IPTG (500 µM y 50 µM) y 2 tiempos de inducción (4 y 16 hrs). Estos ensayos también se realizaron en la proteína 6xHis-MdA6PR de manzana (*Malus x domestica*, **Figura 9.B**) clonada en el vector pET19b (**Tabla IV**) y expresada en *E. coli* por Figueroa e Iglesias (2010), la cual se utilizó en este trabajo como control positivo.

Para poder analizar las condiciones de la inducción, fue necesario primero lisar las células obtenidas. Para ello, se probaron 2 métodos de lisis celular. Inicialmente, se utilizó la sonicación (sección 4.14.3), sin embargo, se comprobó que este método afectó la actividad de la enzima (sección 5.4.3), la cual se recuperó parcialmente al realizar el sonificado en presencia de uno de sus sustratos (G6P, datos no mostrados). Además, se probó el método de lisis por detergentes del reactivo B-PER® (Bacterial Protein Extraction Reagent), con el cual se obtuvieron cantidades de proteínas similares a las obtenidas por sonicación, y se evitaron pérdidas de actividad sin necesidad de añadir G6P, por lo que el resto de los análisis se realizaron utilizando este método.

Ya lisadas las células, se realizó SDS-PAGE para analizar el efecto de las condiciones de inducción probadas (**Figura 9**). En las **Figuras 9.A.i** y **ii**, se observa presencia de un gran número de proteínas, sin destacarse 6xHis-AtA6PR por su mayor nivel de expresión. Sin embargo, al realizarse un Western Blot α-6xHis se observó la presencia de una única banda entre 30 y 40 kDa (que corresponde al tamaño esperado para 6xHis-AtA6PR) en todas las muestras inducidas por IPTG. Dado que AtA6PR es una proteína citoplasmática (Zamudio, 2010), se espera encontrar proteína activa en la fracción soluble del lisado de células. En las **Figuras 9.iii** y **iv**, se destaca una banda de mayor intensidad en las fracciones solubles (**carriles S**), que en las insolubles (**carriles P**). Esta diferencia es más evidente en la muestra inducida con IPTG 500 µM por 4 hrs a 25 °C (**cabezas de flecha negra**), indicando una mayor proporción de proteína soluble.

En las **Figuras 9.B i** y **ii**, se puede observar una gran sobreexpresión de 6xHis-MdA6PR con la mayor parte de ésta en la fracción insoluble (**carriles P**), indicando que la proteína forma cuerpos de inclusión. Sin embargo, en el ensayo de Western Blot (**Figuras 9.B.iii** y **iv**) se logra observar presencia de proteína en las fracciones solubles (**carriles S**), con una menor presencia de proteína insoluble en la muestra inducida con

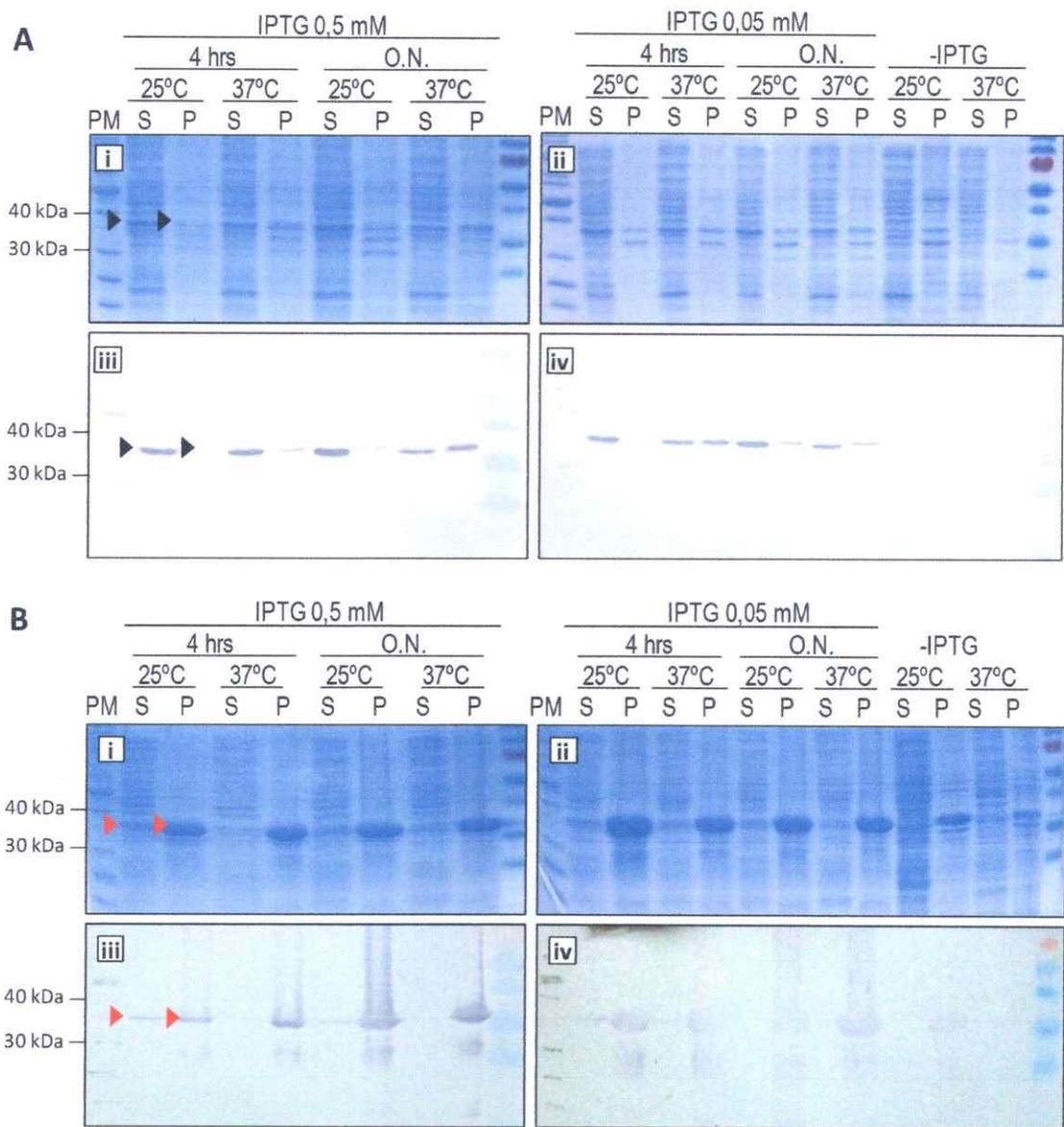
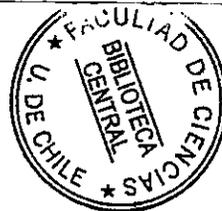


Figura 9: Optimización de las condiciones de inducción de His-AtA6PR y His-MdA6PR. **A:** Inducción de His-AtA6PR en *E. coli* BL21-pLysS transformada con pET28a-AtA6PR. **B:** Inducción de His-MdA6PR en *E. coli* BL21 transformada con pET19b-MdA6PR. **i, ii:** Proteínas totales (tinción: azul de Coomassie). **iii, iv:** Western blot realizado con anticuerpo α -6xHis. **4 hrs:** Muestras inducidas por 4 horas a las temperaturas y [IPTG] indicadas. **O.N.:** Muestras inducidas por 16 hrs a las temperaturas y [IPTG] indicadas. **-IPTG:** Muestras sin inducción de IPTG, incubadas a las horas y temperaturas indicadas. **PM:** Estándar de peso molecular. **S:** Fracción soluble del lisado de células. **P:** Fracción insoluble del lisado de células. **Cabezas de flecha negra:** Condiciones con mayor acumulación de His-AtA6PR. **Cabezas de flecha roja:** Condiciones con mayor acumulación de His-MdA6PR soluble.



IPTG 0,5 mM por 4 hrs a 25 °C (cabezas de flecha roja). Éstas se consideraron las condiciones óptimas de inducción para ambas proteínas y fueron utilizadas en los experimentos posteriores. Se puede observar en las Figuras 9.B.iii y iv que existe una ligera expresión de 6xHis-MdA6PR cuando no hay inducción por IPTG (carriles - IPTG). Esto se debe a que el vector pET19b-MdA6PR fue transformado en la cepa BL21(DE3) de *E. coli*, la cual permite la expresión basal de proteínas recombinantes reguladas por el promotor T7, mientras que el vector pET28a-AtA6PR fue transformado en la cepa BL21(DE3)pLysS, que al contener la lisozima T7 disminuye los niveles basales de expresión de proteínas bajo el control del promotor homónimo. Para aumentar los niveles de expresión de 6xHis-AtA6PR, se transformaron también con este vector células de la cepa BL21(DE3), con la que se utilizaron las mismas condiciones de expresión determinadas anteriormente (datos no mostrados)

5.4.2 Purificación de His-AtA6PR.

En este trabajo se buscó determinar los parámetros cinéticos de His-AtA6PR, para lo cual fue indispensable contar con la enzima purificada. Para ello, y una vez obtenidos los extractos crudos de proteínas solubles – donde His-AtA6PR representa un 41,3% de la proteína total en la muestra (según lo calculado con el software de análisis de imagen ImageJ) –, se purificó 6xHis-AtA6PR por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC) (sección 4.16.3). De acuerdo a lo esperado, la proteína recombinante fue retenida mientras el resto de las proteínas presentes en la mezcla resultaron eluidas en las primeras fracciones (Figura 10.A y 10.B, carriles 1-5). Para optimizar la purificación y la actividad enzimática de la proteína purificada (sección 5.4.3), se probaron algunas modificaciones a la solución buffer descrita por Figueroa e Iglesias (2010): se disminuyó la concentración de NaCl en el buffer de 300 mM a 20 mM (ya que se ha reportado que esta sal puede disminuir la actividad de la enzima, Figueroa e Iglesias, 2010), se agregó Tween-20 y se eliminó el EDTA (ya que otras deshidrogenasas de *Arabidopsis* como AtSDH contienen sitios de unión a zinc, Aguayo y cols., 2013). Sin embargo, no se observaron cambios considerables en el grado de purificación o actividad obtenidos con todas las variaciones del buffer utilizado, por lo que finalmente se utilizó el buffer A descrito en la sección 4.14.3 [Tris-

HCl pH 8 25 mM; NaCl 300 mM, glicerol 10%; PMSF 0,1 mM; BME 1 mM]. De esta manera, se logró purificar His-AtA6PR, obteniéndola como un 99,27% de la proteína total contenida en la muestra purificada (**Figura 10.A y 10.B, carril 6**).

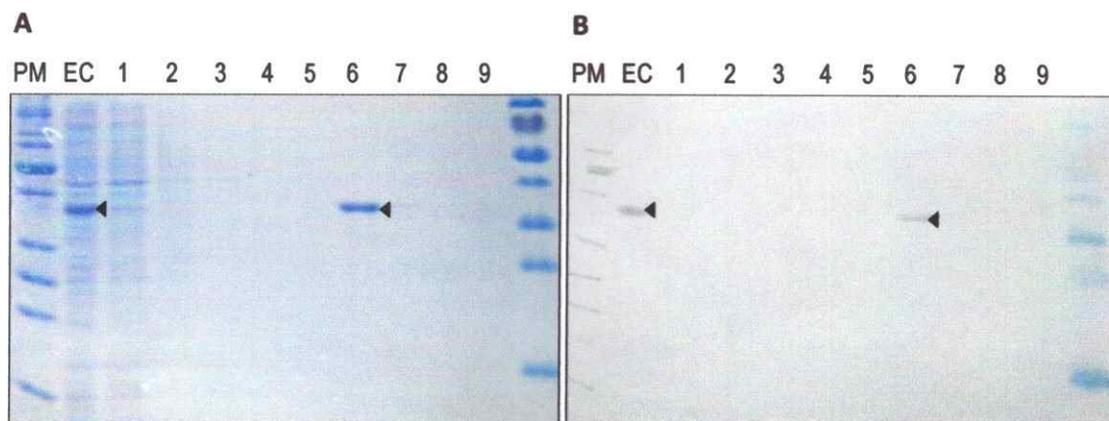


Figura 10: Purificación de 6xHis-AtA6PR por columnas de Níquel. A: SDS-PAGE de fracciones eluidas de una columna de His-trap (tinción: azul de Coomassie). **B:** Western blot de fracciones eluidas de una columna de His-trap (anticuerpo: α -His-AtA6PR). **PM:** Estándar de peso molecular. **EC:** Fracción soluble del extracto crudo de proteínas obtenidas de *E. coli* transformada con pET28a-AtA6PR e inducida con 0,5 mM IPTG por 4 hrs a 25 °C. **1:** Frente de proteínas sin afinidad por la columna. **2, 3, 4, 5:** Fracciones obtenidas al lavar la columna con 40 mM imidazol. **6, 7, 8, 9:** Fracciones obtenidas al lavar la columna con 300 mM imidazol. Se observa la elución de His-AtA6PR en la fracción 6. **Cabezas de flecha negras:** 6xHis-AtA6PR.

5.4.3 Actividad enzimática de His-AtA6PR

Se realizaron numerosos ensayos de actividad para determinar la capacidad catalítica de 6xHis-AtA6PR. Para verificar si la enzima producida en *E. coli* es activa, se examinó la actividad *in vitro* de las fracciones purificadas de enzima tanto como la presente en extractos proteicos crudos de *E. coli* (células inducidas por IPTG respecto a extractos provenientes de células no inducidas que, cabe destacar, presentan un nivel basal de acumulación, **Figura 11.A**), utilizando como control positivo de la reacción extractos crudos de la enzima 6xHis-MdA6PR descrita en la sección previa (Sección 5.4.1).

Inicialmente, fue difícil observar actividad en los ensayos realizados con AtA6PR, por lo que se modificaron las condiciones de producción de la proteína, las de extracción y purificación de la misma y las del ensayo de actividad. Se aumentó la producción de His-AtA6PR en *E. coli* repitiendo la clonación del vector pET28a-AtA6PR

en la cepa BL21 (DE3), que al no poseer el plásmido pLysS permitió un mayor nivel de expresión de AtA6PR, enriqueciendo el extracto que pasó de representar el 17% a conformar el 37% del total de proteínas en la extracción (Valores calculados de acuerdo al software de procesamiento de imágenes ImageJ, **Figura 11.A**).

Se modificaron las condiciones de extracción de la proteína producida en la cepa BL21 (DE3) a través de varios métodos. Inicialmente las células fueron lisadas por sonicación, sin embargo el protocolo utilizado eliminó la actividad de la mezcla de proteína sin purificar, la cual se recuperó parcialmente luego de una incubación de 10 minutos (aproximadamente) en la mezcla de reacción (datos no mostrados). Para proteger la actividad de la proteína, se redujo la duración de los pulsos de sonicación (de 10 segundos ON con intervalos de 20 segundos OFF durante 5 minutos a 3 segundos ON con intervalos de 2 segundos OFF durante 2 minutos), y se agregó BME 1 mM y PMSF 0,1 mM posterior a la sonicación de las muestras, para proteger los residuos de cisteína de la proteína de posibles oxidaciones que afectarían su estructura terciaria. Ya que en presencia de sus sustratos la proteína recuperó actividad, se agregó G6P 20 mM al buffer de sonicación para proteger la enzima, sin embargo en estas condiciones la mezcla de proteínas redujo NADP⁺ sin la adición de S6P como sustrato, probablemente debido a la presencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Banerjee y Fraenkel, 1972) y por lo tanto, alterando las mediciones de la reacción de oxidación de S6P con reducción de NADP⁺. Este problema específico fue solucionado al reemplazar el protocolo de sonicación por el reactivo de extracción de proteínas B-PER®. Respecto a la purificación de la proteína, se probaron las diferentes condiciones detalladas en la sección 5.4.2.

Las variaciones al ensayo de actividad aplicadas tanto en la enzima purificada como en los extractos crudos consistieron en modificaciones del pH de la reacción (7,5; 8; 8,2 y 9), se agregó una incubación de la enzima purificada de 5 minutos a temperatura ambiente (antes de agregarla a la mezcla de reacción) y se varió la concentración de glicerol presente en la enzima (sólo en la enzima purificada): se aumentó hasta un 30% v/v o bien se disminuyó por diálisis (que provocó que la enzima se agregara). Adicionalmente, se evaluó el efecto de Zn²⁺, Mg²⁺ y Mn²⁺ en la actividad de His-AtA6PR, ya que estudios previos han sugerido que algunos cationes divalentes pueden tener efecto en la actividad de MdA6PR (Zhou y cols., 2003). Si bien se

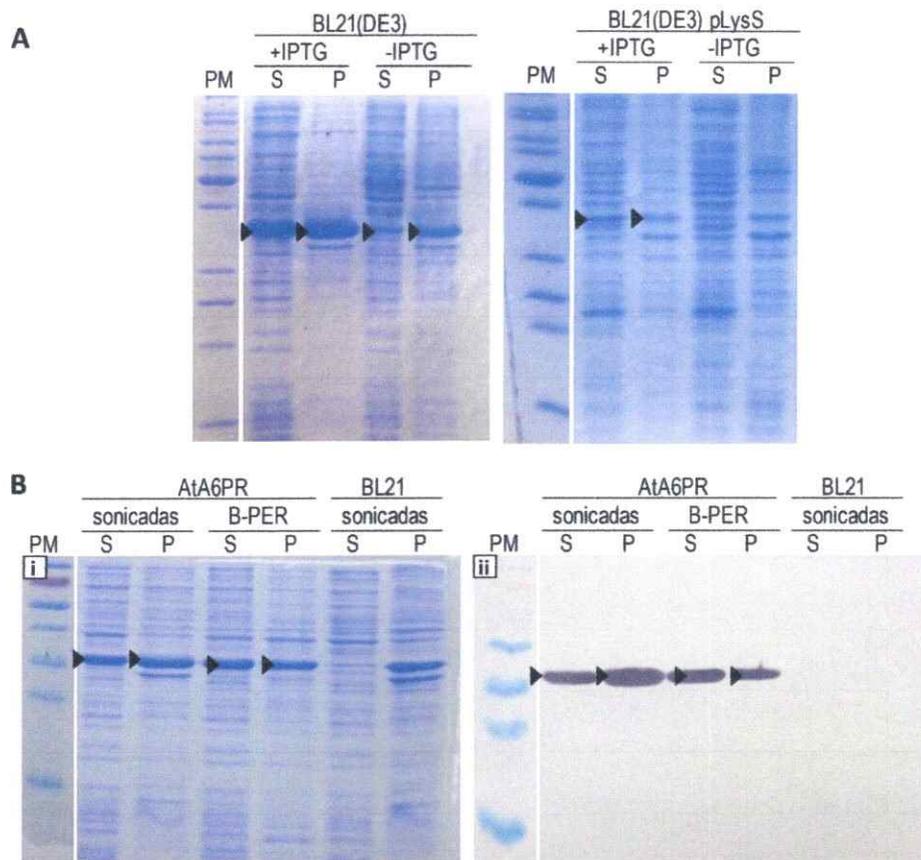


Figura 11: Optimización de la obtención His-AtA6PR. A: Efecto de la cepa de *E. coli* (BL21(DE3) y BL21(DE3) pLysS) utilizada para la expresión de 6xHis-AtA6PR. +IPTG: Muestras inducidas con IPTG 0,5 mM durante 4 hrs a 37 °C. -IPTG: Muestras sin inducción de IPTG, incubadas en iguales condiciones de temperatura y tiempo que las inducidas. **B:** Optimización de lisis celular para ensayos de actividad y purificación de 6xHis-AtA6PR por los métodos de sonicación y utilizando el reactivo B-PER. BL21: Células de la cepa BL21(DE3) sin transformar (control negativo). i: Proteínas totales (tinción: azul de Coomassie). ii: Western blot realizado con anticuerpo α -6xHis. PM: Estándar de peso molecular. S: Fracción soluble del lisado de células. P: Fracción insoluble del lisado de células. Cabezas de flecha negra: 6xHis-AtA6PR

observaron mayores pendientes al agregar Mn^{2+} 1 mM a la enzima (antes de agregar ésta a la mezcla de reacción), el análisis estadístico (ANOVA) indicó que las diferencias observadas no fueron significativas. También se probaron sustratos alternativos para la enzima: no se observó actividad con manosa-6-fosfato (sustrato de la manosa-6-fosfato reductasa, que presenta un porcentaje de identidad superior al 60% con AtA6PR), NAD^+ o NADH. Para los controles positivos, realizados con A6PR de *Malus x domestica*, se encontró actividad para la reducción de G6P y para la

oxidación de S6P sólo utilizando NADPH o NADP⁺ (respectivamente) a todos los pH probados.

A pesar de estos impedimentos, fue posible determinar que para la reacción de oxidación de S6P a G6P (con reducción de NADP⁺, **Figura 12.A**) los extractos crudos de His-AtA6PR (obtenidos de la cepa sin pLysS – por lo tanto los extractos sin inducción por IPTG también presentan expresión de la enzima pero en menor cantidad – **Figura 12.A**) presentaron una actividad de 26,28 nmoles de NADPH formado por mg de mezcla enzimática por minuto, valor significativamente mayor que el detectado para los mismos extractos no inducidos por IPTG (6,91 nmoles mg⁻¹ min⁻¹). De igual manera, los extractos crudos de His-MdA6PR catalizan la formación de 61,49 nmoles NADPH min⁻¹ mg⁻¹. Por otro lado, para la reacción de reducción de G6P a S6P (con oxidación de NADPH, **Figura 12.B**) no fue posible detectar actividad en las muestras de His-AtA6PR, sin embargo, la actividad de las muestras provenientes de His-MdA6PR presentan una actividad de 128,8 nmoles min⁻¹ mg⁻¹ de mezcla enzimática, la cual coincide con la descrita en la literatura para extractos crudos de esta enzima (136 nmoles mg⁻¹ min⁻¹, Figueroa e Iglesias, 2010). Así, al utilizar extractos crudos de His-AtA6PR fue posible encontrar actividad sólo para la oxidación de S6P a pH8 (sin necesidad de preincubar la enzima a temperatura ambiente), la cual podría aumentar con la adición de Mn²⁺.

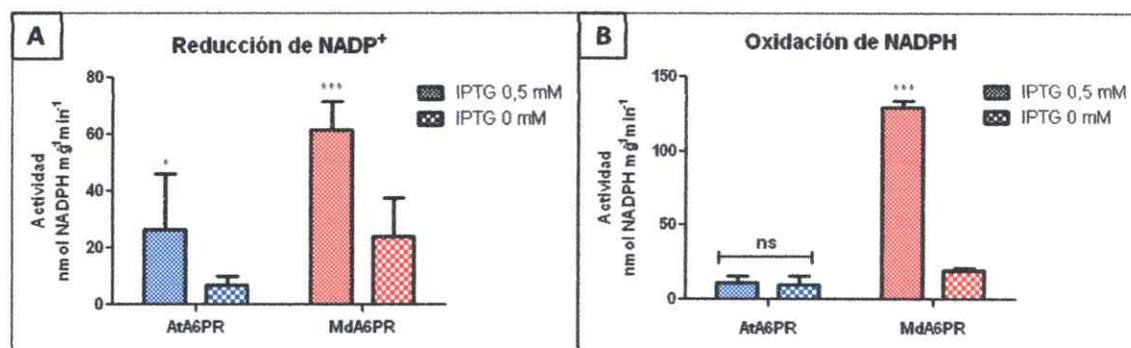


Figura 12: Actividad de His-AtA6PR y His-MdA6PR en extractos crudos de proteína. A: Reacción de oxidación de sorbitol-6-fosfato con reducción de NADP⁺. **B:** Reacción de reducción de glucosa-6-fosfato con oxidación de NADPH. *: p<0,05. ***: p<0,001. ns: no hay diferencias significativas entre las condiciones señaladas. n = 6. Se aplicó el test de ANOVA y el post-test de Tukey para encontrar diferencias significativas entre los grupos de datos. Las barras de error señalan la desviación estándar obtenida para cada grupo de datos.

5.5 Obtención de plantas con menores niveles de expresión de *AtA6PR*.

La forma más directa de esclarecer el rol de *AtA6PR* en el metabolismo de *Arabidopsis*, es la creación de plantas mutantes que carezcan o posean niveles disminuidos de la proteína funcional. Para ello, se llevaron a cabo dos estrategias: en la primera, se adquirieron plantas de la colección SALK, que presentan una inserción de T-DNA que interrumpe el gen de interés (sección 5.5.2).

La segunda estrategia consistió en transformar semillas de *Arabidopsis* con el vector pMDC43-*AtA6PR* (Zamudio, 2010), el cual fue creado para obtener la localización subcelular de la proteína, por lo que fusiona GFP N-terminal a *AtA6PR*. Sin embargo, este vector presenta inesperadamente un codón de stop entre *GFP* y *AtA6PR*, por lo que en plantas transformadas se obtiene producción del mRNA de GFP-*AtA6PR* pero sólo GFP se traduce a proteína (Zamudio, 2010). Este vector puede ser empleado como una herramienta para estudiar el papel que juega *AtA6PR* *in vivo*, considerando los resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio donde, al acoplar un gen vegetal del mismo tamaño de *AtA6PR* (*GONST3*; ~1000 pb) a una secuencia relativamente larga (~700 pb) como la de GFP, se gatilló SGPT por co-supresión, algo que no ocurrió al expresar *GONST3*-His (de menor estabilidad) en la misma planta (Miranda, 2009). De acuerdo a estos antecedentes, si bien el vector pMDC43-*AtA6PR* no resultó funcional para determinar la localización subcelular de *AtA6PR*, sí constituye un vector adecuado para gatillar SGPT por co-supresión de *AtA6PR* en plantas.

5.5.1 Transformantes con pMDC43-*AtA6PR*

Se transformaron plantas de *Arabidopsis* con pMDC43-*AtA6PR* y se recolectaron sus semillas. Debido a que este vector utiliza higromicina como antibiótico de selección, se identificaron las semillas transformadas sembrándolas en medio con este antibiótico (sección 4.1.5) y transplantando aquellas resistentes. Éstas pudieron ser identificadas debido su mayor tamaño respecto a las plántulas sensibles que las rodeaban (Figura 13.A). Además, se utilizaron placas sin antibiótico como controles de crecimiento y desarrollo.

De esta manera, de un total de 1210 semillas, se obtuvieron 8 líneas resistentes a higromicina (0,7% de eficiencia de la transformación), a las cuales se les permitió crecer y desarrollarse. A las 6 semanas de desarrollo, se realizó una extracción de

DNA para confirmar la presencia del T-DNA en el genoma de las plantas, amplificando el fragmento GFP-AtA6PR que se encuentra en el vector pero no en el genoma de plantas de tipo silvestre. Los resultados de la amplificación se observan en la **Figura 13.B**, donde las 8 líneas analizadas presentan una banda del tamaño esperado (~1,7 kb, equivalentes a la banda obtenida en el control positivo) que no se encuentra en la planta de tipo silvestre, demostrando la transformación efectiva de las plantas analizadas.

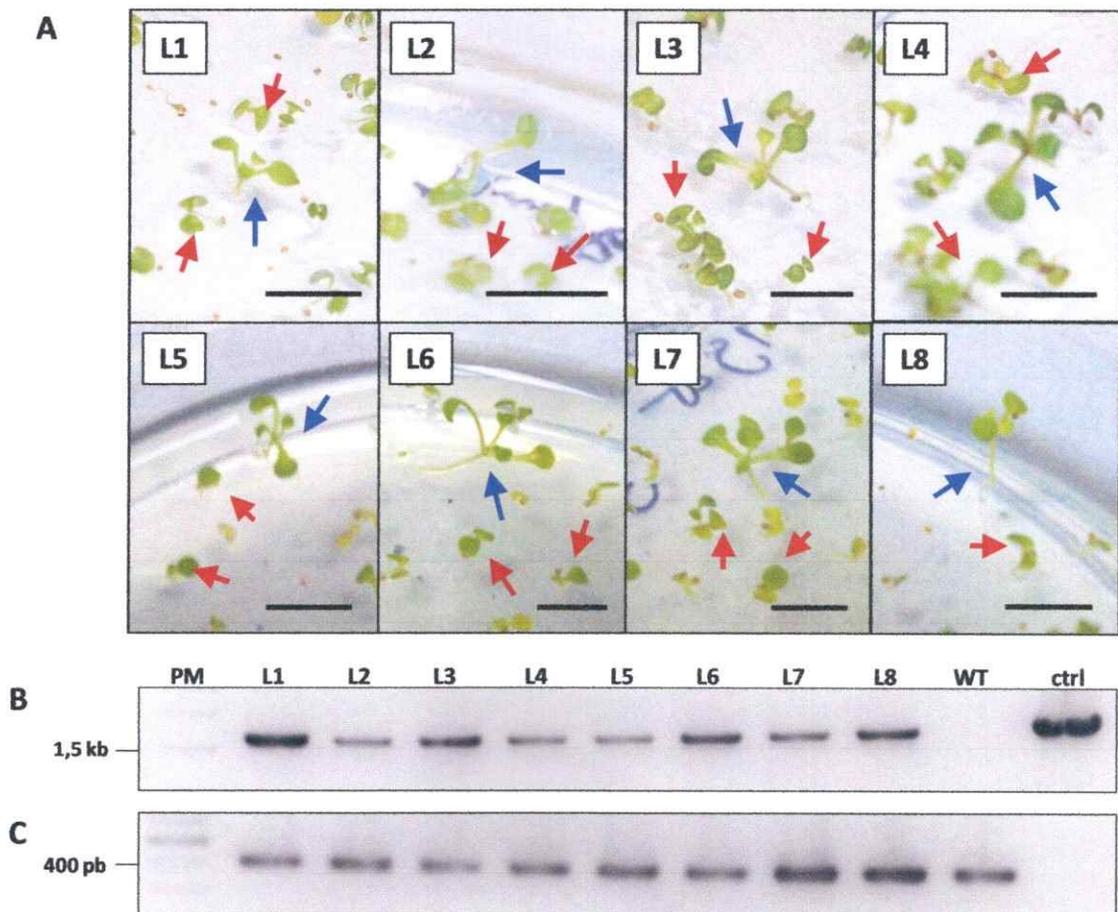


Figura 13: Análisis molecular de Arabidopsis transformadas con pMDC43-AtA6PR. A: Transformantes identificadas por resistencia a higromicina. **B:** PCR del fragmento *GFP-AtA6PR*. **C:** PCR de una región interna del gen constitutivo *GAPA*. **L1-L8:** Plantas o DNA proveniente de las líneas transformantes 1 a 8. **Flechas rojas:** Plantas sensibles al antibiótico. **Flechas azules:** Plantas resistentes al antibiótico. **Barra de tamaño:** 5 mm. **PM:** Estándar de peso molecular. **WT:** DNA de Arabidopsis de tipo silvestre. **Ctrl:** control positivo del PCR en **B** (pMDC43-AtA6PR) y control negativo del PCR (control sin DNA templado) en **C**.

También se analizó la segregación de la resistencia a antibiótico en la T₂ y la T₃ de las transformantes (**Tabla V**), debido a que para los experimentos posteriores (de germinación), se requiere que todas las semillas utilizadas presenten la inserción, las que no pueden ser analizadas sin destruirse.

La forma más sencilla de asegurar la utilización de semillas mutantes es utilizar semillas provenientes de plantas homocigotas para la inserción, por lo que se buscaron plantas que cumplieran esta condición. Para ello, se crecieron 15 individuos T₂ de cada línea y se analizó la resistencia a antibiótico de la descendencia (plantas T₃) de cada una de ellas (datos no mostrados), ya que las plantas homocigotas producen un 100% de semillas resistentes al antibiótico. Aquellas líneas con las que se obtuvo menos del 50% de plántulas T₂ resistentes a higromicina (**Tabla V**) también presentaron una gran mayoría de plántulas T₃ sensibles al antibiótico, a pesar de poseer éstas el fragmento GFP-AtA6PR (demostrado por PCR de AtA6PR, utilizando como templado el DNA genómico de algunas de las mencionadas plantulas, datos no mostrados). De esta manera, se logró obtener transformantes homocigotas en 2 líneas: L4 y L5.

Tabla V: Análisis de segregación de plantas T₂ resistentes y sensibles a higromicina en las líneas transformadas.

Línea	Semillas sin germinar	Plántulas sensibles	Plántulas resistentes	% Semillas resistentes	Total semillas
1	33	311	59	15,9	403
2	12	68	80	54,1	160
3	6	235	30	11,3	271
4	3	48	229	82,7	280
5	9	67	110	62,1	186
6	21	358	165	31,5	544
7	28	56	124	68,9	208
8	18	476	75	13,6	569

5.5.2 Mutantes SALK

Se obtuvieron semillas de 4 líneas de la colección SALK (Alonso y cols., 2003, sección 4.12.3): SALK 084572, SALK 021705, SALK 028553 y SALK 012061; renombradas en este trabajo como líneas *ata6pr-0*, *ata6pr-1*, *ata6pr-2* y *ata6pr-3* respectivamente (**Figura 14**). Las semillas de esta colección presentan interrupciones de T-DNA de ~4,5 kb en el locus At2g21250, lo que permite adquirir mutantes que deberían ser knock-down o knock-out para AtA6PR (sección 4.12.3). Sin embargo, las líneas mutantes de esta colección sólo se encuentran caracterizadas parcialmente, por lo que fue necesario genotipificarlas para confirmar la presencia del T-DNA en las plantas obtenidas y determinar si éste se encuentra en homocigosis, además de corroborar el sitio de inserción en el genoma.

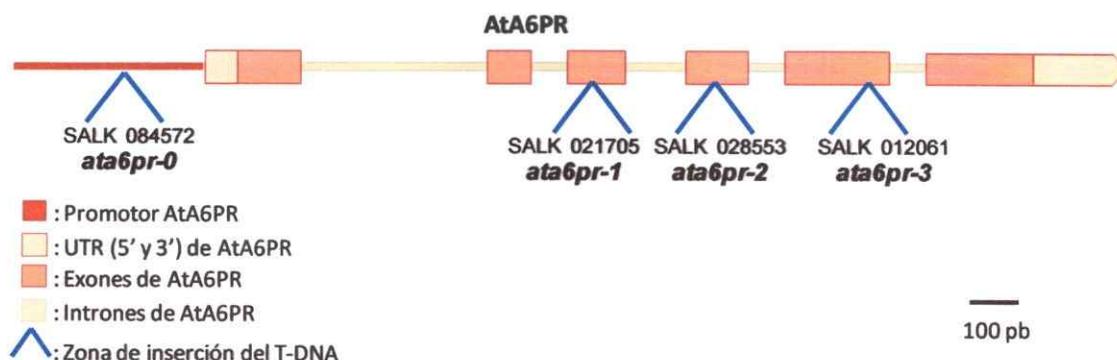


Figura 14: Mutantes insercionales SALK. Esquema de *AtA6PR* indicando la supuesta localización de los T-DNA en las líneas *ata6pr-0*, *ata6pr-1*, *ata6pr-2* y *ata6pr-3*.

Para realizar estos análisis, se sembraron semillas en medio hidropónico y se les permitió desarrollarse para obtener ~12 plantas adultas de cada línea. A las 3 semanas de edad, se cosecharon 2-4 hojas rosetas de cada individuo y se realizó una extracción de DNA genómico, que se usó como templado para las reacciones de PCR necesarias para la genotipificación. Para ello, fue necesario llevar a cabo 2 reacciones de PCR para cada planta (mix y protocolos SALK y AtA6PR, sección 4.6) utilizando los juegos de partidores indicados en la **Figura 15.A**. En la primera reacción (PCR SALK.P o SALK.E), se utiliza el partidor LBb1.3 – que hibridiza con la región 5' del T-DNA – en combinación con un partidor que hibridiza en la región promotora de AtA6PR (partidor AtA6.intF) para la línea *ata6pr-0* (reacción SALK.P) o en el sitio de inicio de la

traducción (partidor S6F) para las líneas *ata6pr-1*, *ata6pr-2* y *ata6pr-3* (reacción SALK.E) (**Figura 15.A**). De esta manera, se obtiene amplicón sólo en plantas donde hay alelos interrumpidos por el T-DNA. La segunda reacción amplifica *AtA6PR* (PCR AtA6PR), por lo que se presenta amplicón sólo cuando existen alelos sin interrumpir (ya que ni el tiempo de extensión de la reacción ni la procesividad de la Taq Polimerasa son adecuados para amplificar un fragmento del tamaño de *AtA6PR* interrumpido con el T-DNA; ~5,5 kb). Así, la primera reacción (SALK) confirma la presencia del T-DNA en el locus *At2g21250*, mientras la segunda (*AtA6PR*) indica si hay copias del gen que no sean interrumpidas. Al unir los datos entregados por ambos análisis, se obtiene la información de cada individuo analizado, que se puede clasificar como planta homocigota, heterocigota o no transformada para la interrupción de *AtA6PR*.

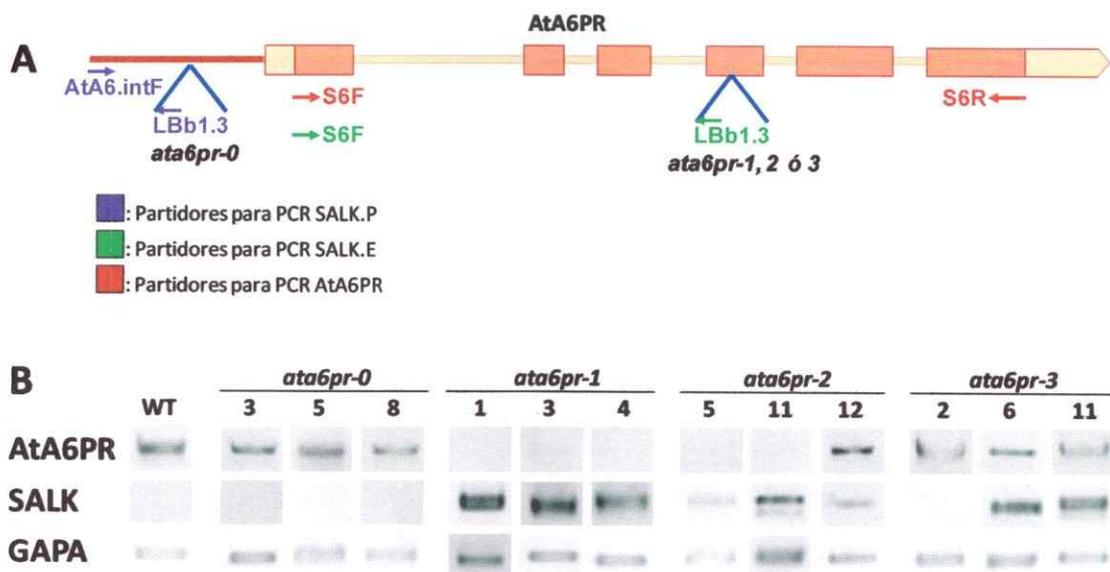


Figura 15: Genotipificación de plantas de la colección SALK. **A:** Pares de partidores utilizados para analizar cada planta. Los juegos de partidores SALK (SALK.P y SALK.E) amplifican fragmentos de un tamaño entre 850 y 2500 pb, respectivamente, sólo cuando el T-DNA interrumpe *AtA6PR*, mientras que los partidores *AtA6PR* amplifican un fragmento de 930 pb sólo cuando el gen no se encuentra interrumpido. **B:** Análisis por PCR de las líneas insercionales. El fragmento **SALK** demuestra la presencia de T-DNA en *AtA6PR* y el fragmento **AtA6PR** indica cuando existe al menos un alelo sin interrumpir. El gen **GAPA** actúa como control de calidad del DNA. **WT:** Planta de tipo silvestre. El número en cada columna corresponde a la identificación de cada planta para cada línea.

En la **Figura 15.B**, se presentan muestras representativas de los resultados obtenidos en este análisis. Las plantas de tipo silvestre (o WT, utilizadas como control) sólo presentaron amplicón al amplificar fragmentos de los genes *AtA6PR* y *GAPA* (control de calidad del DNA). Lo mismo se observó con todas las plantas de la línea *ata6pr-0* y una de la línea *ata6pr-3* (*ata6pr-3.2*), para las cuales no se obtuvieron mutantes con presencia de T-DNA en este locus. Tanto en la última como en la línea *ata6pr-2*, fue posible observar plantas heterocigotas para la presencia del T-DNA en *AtA6PR*, caracterizadas por amplificar bandas para ambos PCR de análisis (*ata6pr-2.12*, *ata6pr-3.6* y *ata6pr-3.11*). Finalmente, se obtuvieron plantas homocigotas en las líneas *ata6pr-1* y *ata6pr-2* (*ata6pr-1.1*, *ata6pr-1.3*, *ata6pr-1.4*, *ata6pr-2.5* y *ata6pr-2.11*, **Figura 15.B**), las que se identificaron por presentarse banda sólo al amplificar el fragmento "SALK".

Para el resto de los análisis, se seleccionaron sólo mutantes homocigotas de las líneas *ata6pr-1* y *ata6pr-2*, ya que se esperaba que un 25% de las semillas obtenidas de líneas heterocigotas presenten el genotipo silvestre, el cual alteraría los resultados de los análisis posteriores, que requirieron uso de semillas y plántulas (que debido a su pequeño tamaño no pueden ser genotipificadas previo a los experimentos sin resultar destruidas). Para determinar con exactitud el sitio de inserción del T-DNA en estas líneas, se secuenciaron los fragmentos SALK amplificados por PCR. De esta manera, se comprobó que en la línea *ata6pr-1* el T-DNA se encuentra en el extremo 5' del 3º intrón, en el nucleótido 856 desde el sitio de inicio de la traducción. En la línea *ata6pr-2*, la inserción se localiza en el extremo 3' del mismo intrón, en el nucleótido 927 desde el inicio de la transcripción (**Figura 16**).

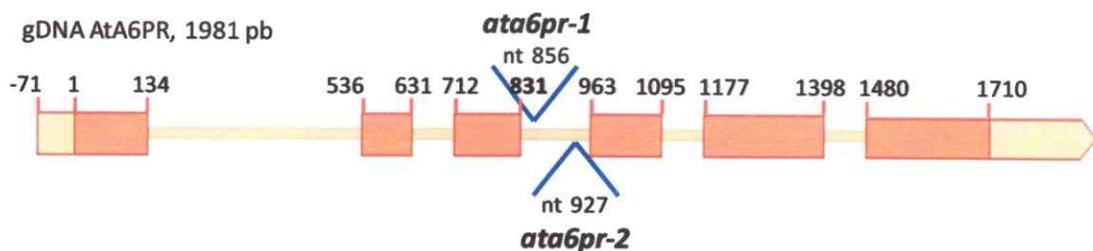


Figura 16: Localización de T-DNA en líneas mutantes SALK. La línea *ata6pr-1* presenta el inserto de T-DNA al inicio del 3º intrón, mientras que en la línea *ata6pr-2* el gen se interrumpe hacia el final del mismo. Se indica el número del nucleótido de inicio y término de cada exón respecto al sitio de inicio de la traducción.

5.6 Caracterización de líneas *ata6pr-1*, *ata6pr-2*, L4 y L5 en condiciones de crecimiento estándar.

5.6.1 Niveles de transcrito de *AtA6PR* en las líneas *ata6pr-1*, *ata6pr-2*, L4 y L5.

Una vez obtenidas las líneas mutantes, se verificaron los niveles de transcrito de *AtA6PR* en las mismas a través de una reacción de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR), que mide la expresión relativa de los genes examinados en las líneas mutantes respecto a la de tipo silvestre.

Para realizar esta reacción, primero se determinó la concentración de partidores a utilizar para obtener una eficiencia de reacción² entre 80 y 120%. La eficiencia de la reacción (ecuación 1) se obtiene a partir de la pendiente de la recta que relaciona el logaritmo de la concentración inicial de templado con el número de ciclos en el cual se alcanza el límite de detección de fluorescencia del equipo (Ct). Las eficiencias obtenidas para cada set de partidores utilizado se detallan en la **Tabla VI**:

Tabla VI: Eficiencia de los partidores utilizados.

Partidores	Eficiencia	Concentración
AtA6PR.intF	94,7	0,4 µM
AtA6PR.intR		
21260.intF	109,9	0,3 µM
21260.intR		
26410F	93,6	0,25 µM
26410R		
PP2AF	102,6	0,25 µM
PP2AR		
UBQF	96,1	0,25 µM
UBQR		
G12240F	91,7	0,25 µM
G12240R		
RD29AF	83,3	0,3 µM
RD29AR		

² : La eficiencia de la reacción indica la sensibilidad del ensayo. Si la eficiencia es baja, la concentración inicial de DNA será subestimada ya que se necesitará mayor número de copias para alcanzar el límite de detección de fluorescencia del instrumento. Por el contrario, si la eficiencia es demasiado alta, la concentración de DNA inicial se sobreestima.

Una vez determinada la eficiencia para cada par de partidores, se llevaron a cabo las reacciones de qPCR para analizar los niveles de transcrito de *AtA6PR* en plantas de tipo mutante y silvestre. Los partidores diseñados para este gen (Tabla I) hibridizan con una región interna del 5° exón de *AtA6PR*, río abajo de los sitios de inserción para las líneas *ata6pr-1* y *ata6pr-2*. Como se observa en la Figura 17, las mutantes insercionales de la línea SALK (*ata6pr-1* y 2) presentaron un 0,85 y 0,56% – respectivamente – de los niveles de transcrito detectados en las plantas de tipo silvestre, por lo que en adelante se consideraron estas líneas como mutantes *knock-out*. Las líneas mutantes pMDC43-*AtA6PR* (L4 y L5), por el contrario, presentaron un nivel de transcrito igual (L4) o superior (L5, mayor en 5 veces) al de las plantas de tipo silvestre. Ya que el objetivo de esta investigación fue trabajar con mutantes con menores niveles de expresión de *AtA6PR*, para los siguientes análisis se descartaron las líneas mutantes L4 y L5 y se continuó el trabajo sólo con las mutantes *ata6pr-1* y *ata6pr-2*. A pesar que en estas últimas, las inserciones de T-DNA se encuentran en un intrón (3), la reducción dramática en los niveles de transcritos en *ata6pr-1* y *ata6pr-2*, detectados mediante partidores río abajo del sitio de inserción (exón 5) implica que hubo efecto en la tasa de transcripción, la estabilidad del mensajero, su procesamiento

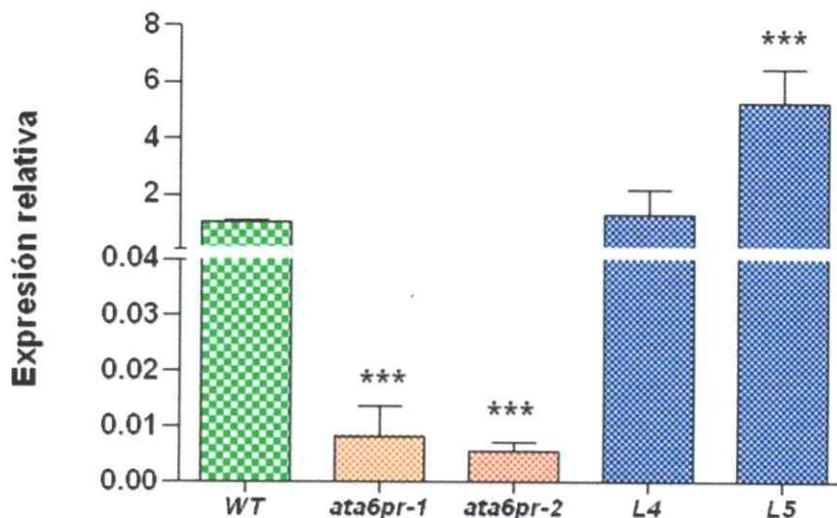


Figura 17: Niveles de transcrito de *AtA6PR* en las líneas analizadas. Cada barra corresponde al promedio entre 3 extracciones de RNA, cada una con 2 repeticiones de la reacción de qPCR. *** $p < 0,001$. WT: Plantas de tipo silvestre. *ata6pr-1* y 2: Líneas mutantes insercionales SALK. L4 y L5: Líneas mutantes pMDC43-*AtA6PR*. Normalizador utilizado: PP2A (AGI At1g13320). Se aplicó el test de ANOVA y el post-test de Dunnett para encontrar diferencias significativas entre los grupos de datos. Las barras de error señalan la desviación estándar obtenida para cada grupo de datos

por *splicing*, u otro proceso. Para determinar si hubo acumulación de proteína AtA6PR en las mutantes (debido a que ambas inserciones se encuentran en el intrón 3), se realizó un ensayo de Western-blot con un anticuerpo específico α -AtA6PR, desarrollado en paralelo en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal durante el transcurso de este trabajo (datos no mostrados, Wurman, 2013). De esta manera, se confirmó la acumulación de AtA6PR en plantas silvestres, y que *ata6pr-1* y *ata6pr-2* son mutantes que carecen de niveles detectables de esta proteína.

La secuencia que codifica *AtA6PR* (At2g21250) se encuentra en el cromosoma 2 de *Arabidopsis*, adyacente a la secuencia At2g21260 (sección 1.4). Considerando la posibilidad de que por el fenómeno de redundancia génica los bajos niveles de transcrito de *AtA6PR* sean compensados con un aumento en los de *At2g21260*, se evaluaron los niveles de transcrito de este gen en las líneas mutantes seleccionadas anteriormente. Se observó que en condiciones estándares de crecimiento, los niveles de transcrito de *At2g21260* respecto al de *AtA6PR* no cambia significativamente en las líneas knock-out *ata6pr-1* y *ata6pr-2* (Figura 18) respecto a la observada para las plantas de tipo silvestre, indicando que *At2g21260* no compensa la disminución del nivel de transcrito de *AtA6PR*.

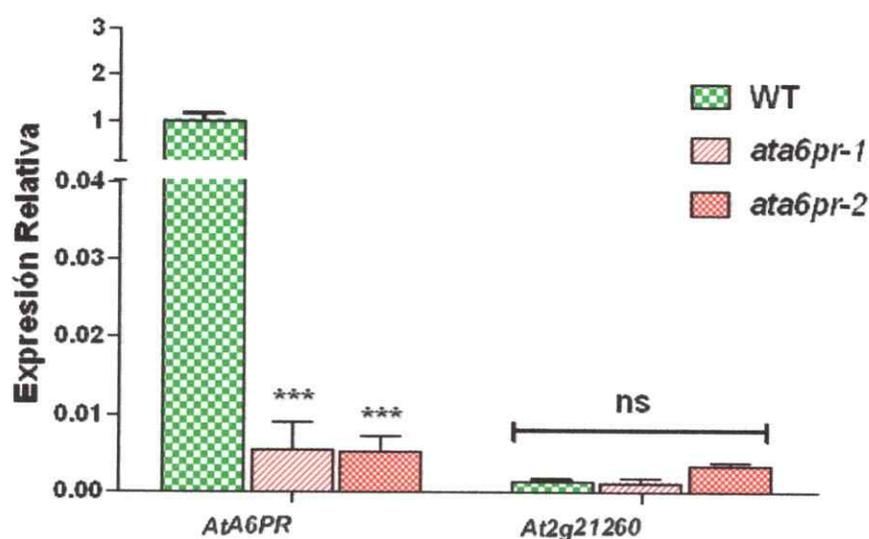


Figura 18: Expresión relativa de *AtA6PR* y *At2g21260* en *ata6pr-1* y *ata6pr-2*. Cada barra corresponde al promedio entre 2 extracciones de RNA, cada una con 2 repeticiones de la reacción de qPCR. $p < 0,001$. **WT:** Plantas de tipo silvestre. ***ata6pr-1* y *2*:** Líneas mutantes insercionales SALK. Normalizador utilizado: PP2A (AGI At1g13320). Las barras de error señalan la desviación estándar obtenida para cada grupo de datos.

5.6.2 Fenotipo de *ata6pr-1* y *ata6pr-2*

Para continuar el análisis, se observó el fenotipo de las líneas mutantes. Considerando que en la base de datos del Botany Array Resource se indica que los niveles de transcrito de *AtA6PR* son altos en semillas embebidas (Zamudio, 2010), se compararon estas características en las líneas *ata6pr-1* y *ata6pr-2* respecto a las plantas de tipo silvestre. Para ello, primero se determinó la tasa de germinación (**Figura 19.B**) y se midió el largo de la raíz principal de plántulas de 7 y 15 días de edad (**Figura 19.C**) en plantas creciendo en placa en ausencia de estrés salino (en medio MS, sección 4.1.5). Adicionalmente, se estudió por separación cromatográfica (HPLC) el impacto de la reducción en los niveles de transcrito de *AtA6PR* en la acumulación de sacáridos de las líneas mutantes en plántulas de 15 días.

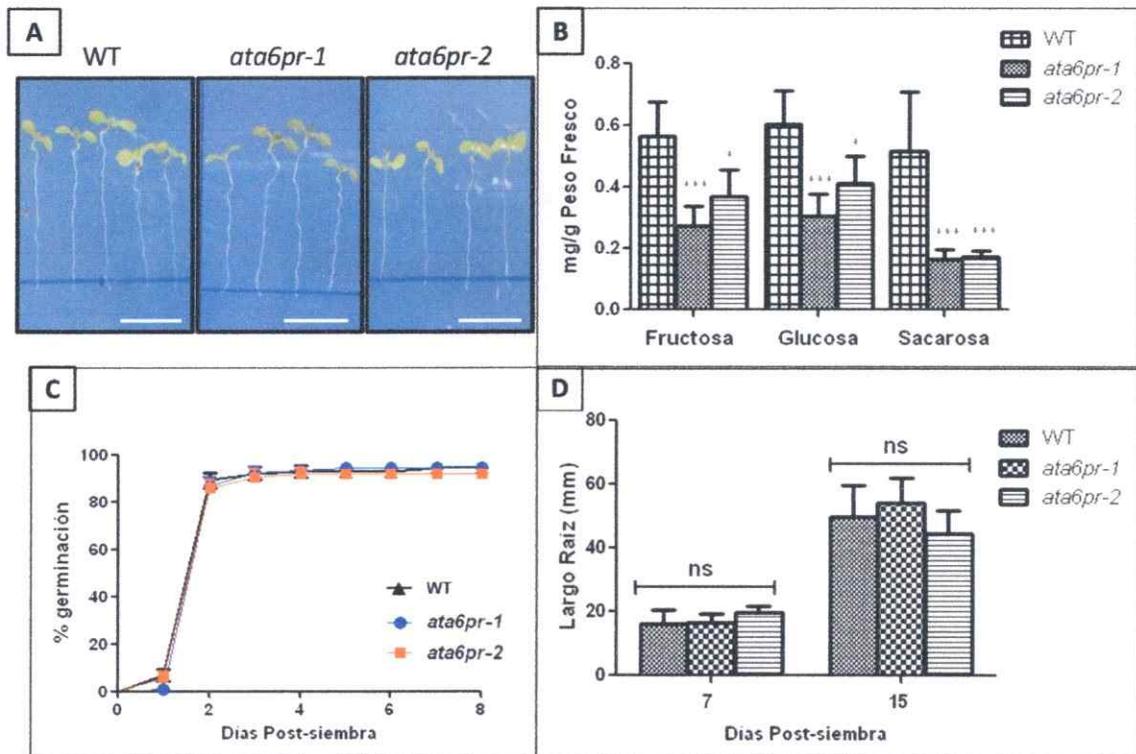


Figura 19: Fenotipo de Arabidopsis de tipo silvestre (WT), *ata6pr-1* y *ata6pr-2* en condiciones estándares de crecimiento. A: Plántulas de 7 días de edad en medio MS. Barra de tamaño: 1 cm. **B:** Sacáridos acumulados en plántulas de tipo silvestre, *ata6pr-1* y *ata6pr-2* de 15 días de edad. *: $p < 0,05$. ***: $p < 0,001$. **C:** Curvas de germinación de semillas de tipo silvestre, *ata6pr-1* y *ata6pr-2*. $n > 80$. **D:** Largo de la raíz principal de plántulas de 7 y 15 días. ns: no hay diferencias significativas entre las líneas señaladas. $n > 10$. Se aplicó el test de ANOVA y el post-test de Bonferroni para encontrar diferencias significativas entre los grupos de datos. Las barras de error señalan la desviación estándar obtenida para cada grupo de datos.

Tal como se observa en la **Figura 19**, las pequeñas diferencias de germinación (**Figura 19.C**) y crecimiento (**Figura 19.D**) observadas no fueron significativas para los tiempos analizados. Tampoco se observaron diferencias de tamaño, aspecto o desarrollo en plantas adultas cultivadas durante 12 semanas en medio hidropónico para la obtención de semillas. Sin embargo, sí fue posible detectar diferencias significativas en la acumulación de los azúcares detectados: La fructosa se reduce de 0,566 mg/g de peso fresco (en las de tipo silvestre) a 0,274 y 0,369 mg/g de peso fresco en *ata6pr-1* y *ata6pr-2* (que corresponden a un 48% para *ata6pr-1* y 65% para *ata6pr-2* respecto de la cantidad encontrada en las de tipo silvestre), mientras la glucosa disminuye de 0,605 mg/g de peso fresco (en las de tipo silvestre) a 0,305 (*ata6pr-1*) y 0,412 (*ata6pr-2*) mg/g de peso fresco (un 50 y 68% respectivamente del encontrado en plantas silvestres) y la sacarosa se reduce a un 32 y 33% de la encontrada en plántulas de tipo silvestre – de 0,517 mg/g de peso fresco (en las de tipo silvestre) a 0,167 y 0,172 mg/g de peso fresco en *ata6pr-1* y *ata6pr-2* respectivamente –, siendo ésta el azúcar cuya acumulación se ve más afectada por los bajos niveles de *AtA6PR* (**Figura 19.B**). Los principales polioles presentes en *Arabidopsis* (xilitol, ribitol, sorbitol, arabitól, manitol, y eritritol) no fueron detectados por el equipo utilizado. La disminución de los niveles de estos sacáridos en plántulas mutantes no estresadas sugiere una alteración en el metabolismo de azúcares en ambas líneas.

5.7 Caracterización de líneas *ata6pr-1* y *ata6pr-2* bajo estrés.

5.7.1 Niveles de transcrito de *AtA6PR*.

Debido a que la literatura sugiere que los polioles en plantas no-rosáceas pueden estar involucrados en los procesos de tolerancia al estrés osmótico, salino (Hincha y Hagemann, 2004) y térmico (Kaplan y cols, 2004), se analizó la expresión de *AtA6PR* bajo las mencionadas condiciones de estrés. Para ello, en primera instancia, se recurrió al recurso *Arabidopsis* eFP Browser (Winter y cols, 2007) del servidor del Botany Array Resource (BAR). Éste, a su vez, utiliza datos de microarreglos (Affymetrix ATH1 array) del AtGenExpress Consortium Data, obtenidos por Kilian y cols (2007). Los resultados se resumen en la **Figura 20**. En la **Figura 20.A**, se puede observar que en condiciones de crecimiento estándares (Control) los niveles de *AtA6PR* aumentan a

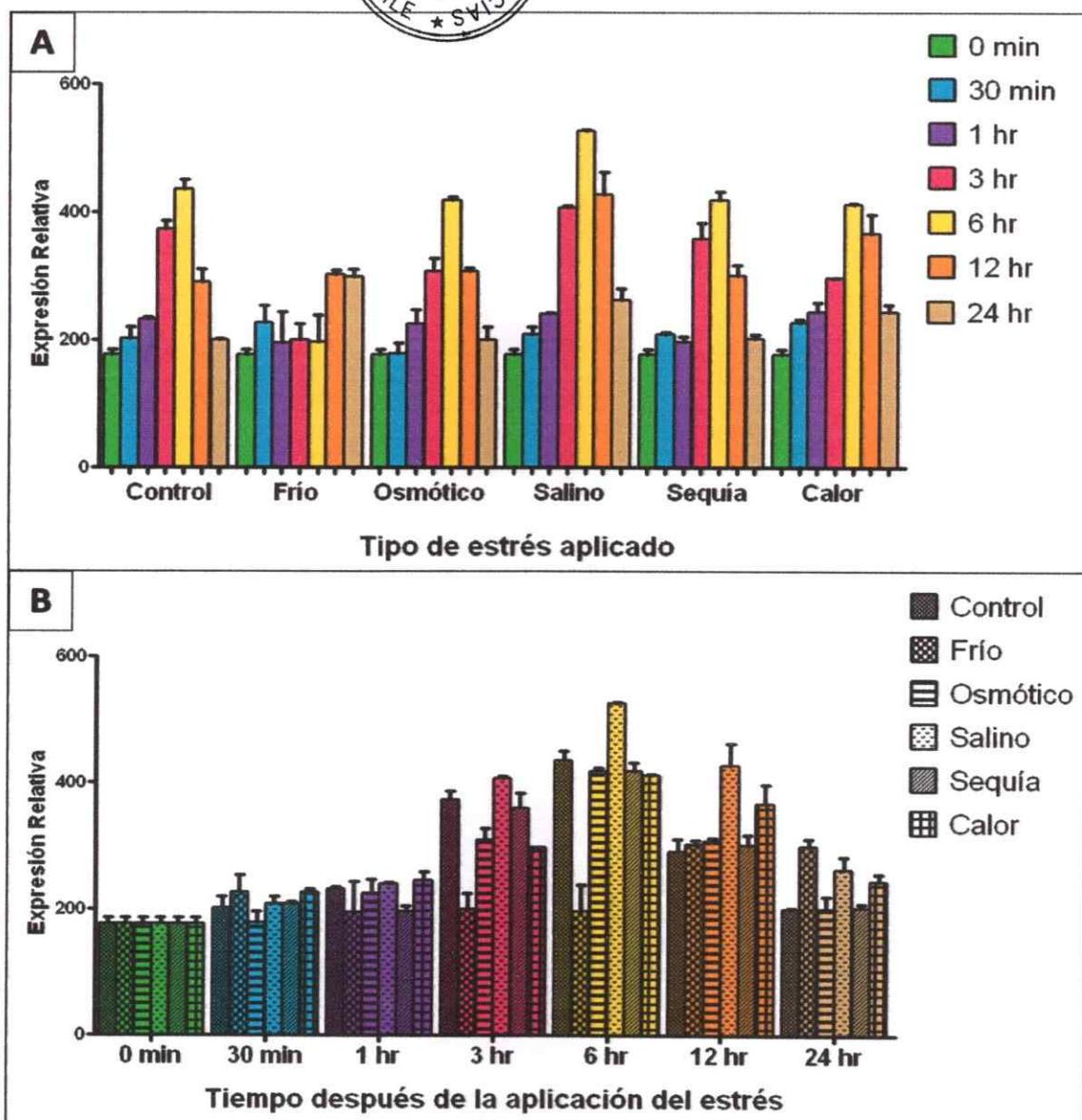


Figura 20: Expresión de *AtA6PR* en plantas bajo estrés abiótico. Los experimentos se llevaron a cabo en plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 18 días, crecidas bajo fotoperíodo de día largo (sección 4.1.5). Las condiciones de estrés indicadas se aplicaron 3 hrs después de la transición luz/oscuridad, y todas las mediciones se realizaron durante el período de luz. **Frío:** Las plantas se enfriaron en hielo y luego se mantuvieron en cámara fría a 4 °C hasta el momento de la cosecha. **Osmótico:** Se agregó manitol (concentración final de 300 mM) al medio. **Salino:** Se agregó NaCl (concentración final de 150 mM) al medio. **Sequía:** Se expusieron las plantas completas a una corriente de aire por 15 min (durante los cuales las plantas perdieron 10% de su peso fresco) y se devolvieron a las condiciones de cultivo estándar hasta la cosecha. **Calor:** Las plantas se incubaron a 38 °C durante 3 hrs y luego fueron devueltas a las condiciones de cultivo estándar hasta la cosecha. Promedios y desviaciones estándar obtenidos de *Arabidopsis* eFP Browser y graficados usando el software GraphPad.

lo largo de las horas, siendo mayores hacia la segunda mitad del día y volviendo a disminuir al inicio del día siguiente, lo que podría indicar que sigue un ritmo circadiano. Esta variación se mantiene para las condiciones de estrés aplicadas; con excepción del estrés por frío donde la acumulación de transcrito de *AtA6PR* se mantiene similar a los niveles de las plantas control hasta las 12 hrs, momento en el cual aumenta. Al examinar las otras condiciones de estrés, se observan variaciones en los niveles de *AtA6PR* respecto a las condiciones control a partir de las 3 hrs de aplicado en estrés (Figura 20.B). En el caso de la exposición a estrés osmótico, se observa un patrón similar al obtenido para las condiciones control, con la excepción de la muestra a las 3 hrs, donde el nivel de *AtA6PR* es ligeramente menor. Bajo estrés salino, el patrón observado se asemeja al obtenido para las muestras control, sin embargo se observa mayores niveles del mRNA de *AtA6PR* a las 6 y 12 hrs. Cabe destacar que bajo este tipo de estrés se observan la mayores acumulaciones de transcrito del experimento (a las 6 y 12 hrs, Figura 20.B). Cuando el estrés aplicado es por sequía, no se observan cambios destacables en ninguno de los momentos de medición, mientras que cuando las plántulas se sometieron a estrés térmico, se observa una ligera disminución de *AtA6PR* a las 3 hrs y un ligero aumento a las 12 y 24 hrs.

Así, bajo la mayoría de las condiciones de estrés aplicadas, no se observan grandes variaciones en los niveles de transcrito de *AtA6PR* respecto a las plantas control, exceptuando al estrés salino (y añadiendo el térmico y por frío pero sólo después de 12 ó 24 hrs). Considerando que reportes previos indican que el estrés salino afecta la tasa de germinación y el crecimiento de *Arabidopsis* (Ruiz y cols., 2007), que este tipo de estrés puede ser aplicado con mayor precisión y reproducibilidad que el estrés osmótico o por frío, y que muchos de los genes involucrados en el primero también responden ante los dos últimos (Zhu, 2000), se continuaron los experimentos *in vivo* sometiendo a estrés salino semillas y/o plántulas de tipo silvestre y las mutantes *ata6pr-1* y *ata6pr-2*, para evaluar y comparar su desempeño en estas condiciones. Las concentraciones de sal utilizadas para estos experimentos (0, 50, 75 y 125 mM) fueron determinadas de acuerdo a lo expuesto en trabajos anteriores, donde se reportó 75 y 100 mM de NaCl como la concentración subletal máxima tolerada por *Arabidopsis* (Zhu, 2000; Ruiz y cols., 2007). Sin embargo, otros trabajos (Kilian y cols, 2007; Hamaji y cols., 2009) utilizan concentraciones mayores de sal, pero sólo lo hacen durante períodos breves (horas). Ya que los datos

obtenidos de esta fuente (eFP browser) no evalúan la expresión de *AtA6PR* en plantas expuestas a estrés por períodos prolongados, que generalmente es la condición que deben afrontar estos organismos en la naturaleza, se estudió el efecto del estrés salino en plántulas de *Arabidopsis* sometidas a estrés salino durante 15 días.

Para comenzar, se examinaron los niveles de *AtA6PR* en plántulas sometidas a las condiciones de estrés ya mencionadas. Debido a que el estrés salino afecta el crecimiento de *Arabidopsis*, se examinó la expresión de genes sólo en plántulas de 15 días, que al ser de mayor tamaño (que las de 7 días) facilitaron la recolección de tejido para los experimentos siguientes.

Considerando que el estrés salino afecta el crecimiento de *Arabidopsis* y que 125 mM se encuentra por sobre la concentración letal de NaCl, no fue posible obtener RNA en la cantidad y calidad necesaria para examinar la expresión de genes a esta concentración. En las condiciones donde sí se logró examinar la expresión (0, 50 y 75 mM de NaCl), se observó que en las líneas de tipo silvestre se produce un aumento significativo en los niveles de mRNA de *AtA6PR*, dependiente de la concentración de NaCl aplicada. Este aumento corresponde a 1,66 veces en sal 50 mM y de 2,26 veces cuando la sal llega a 75 mM (Figura 21.A). No se observó aumento en las líneas *ata6pr-1* o *ata6pr-2*. Tampoco se observaron cambios significativos en los niveles de mRNA de *At2g21260* (Figura 21.B), confirmando la observación anterior donde no se produce compensación por la falta de expresión de *AtA6PR* (Figura 18). Adicionalmente, se examinó el nivel de mRNA de *RD29A* (Figura 21.C), utilizado como gen de control para estrés salino, por frío y/o sequía (Msanne y cols., 2011). Se puede observar que, de acuerdo a lo esperado, en plantas de tipo silvestre los niveles de transcrito aumentan proporcionalmente a la concentración de NaCl aplicada (3,34 y 6,29 veces respecto al silvestre al aplicar NaCl 50 y 75 mM, respectivamente). Sin embargo, en ambas líneas mutantes, el nivel de transcrito se encuentra elevado en condiciones óptimas de crecimiento, y este estado elevado sólo aumenta significativamente al aumentar la concentración de NaCl a 75 mM en la línea con menor expresión de *AtA6PR* (*ata6pr-2*), mientras que, extrañamente, en la línea *ata6pr-1* la concentración de sal aplicada no afectó los niveles de transcrito del gen. Estas alteraciones sugieren que la ausencia del transcrito de *AtA6PR* causa que el metabolismo de la planta en condiciones estándar de crecimiento se comporte en forma similar a la que lo hace cuando se encuentra bajo estrés abiótico.

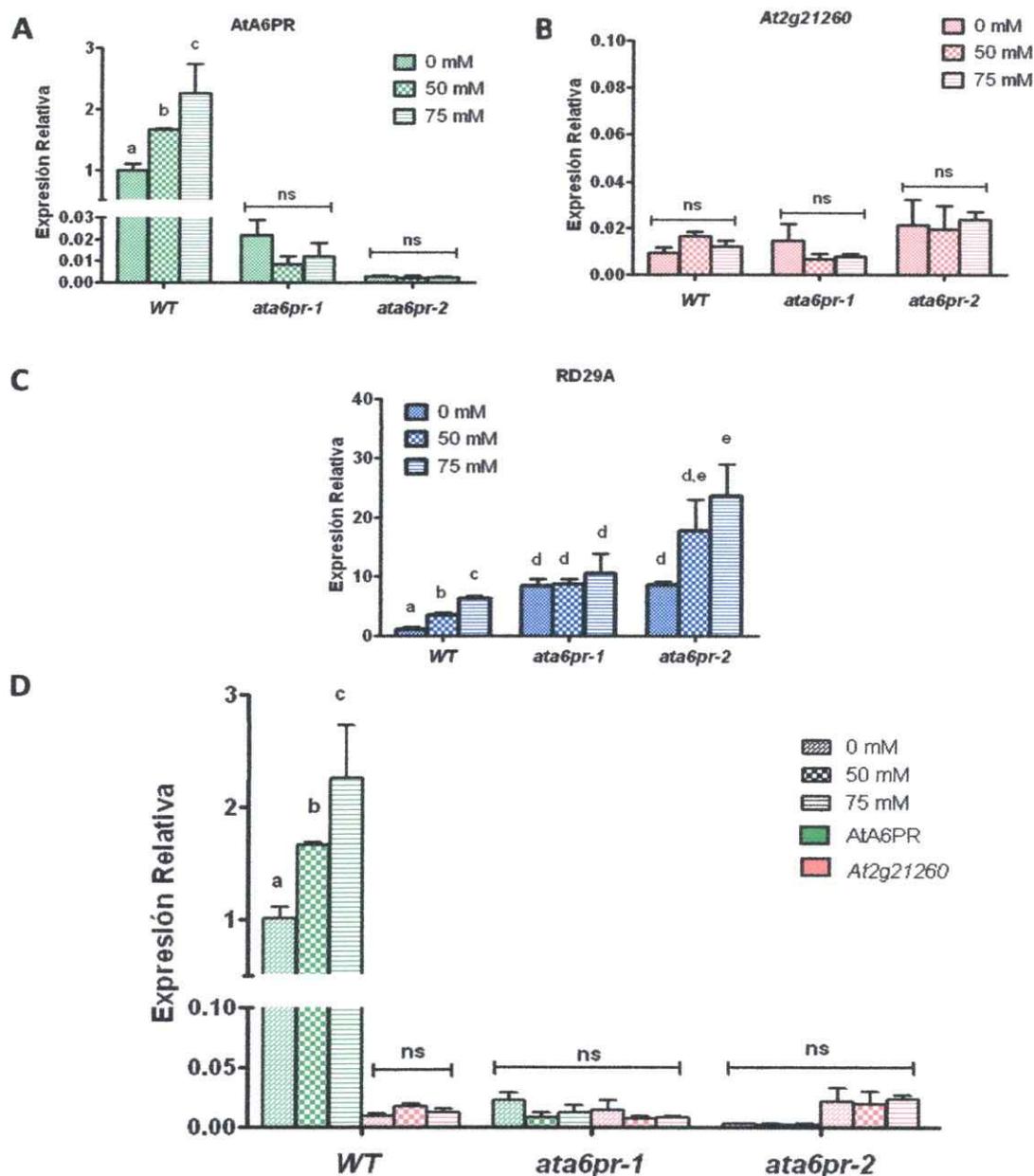


Figura 21: Expresión de *AtA6PR*, *At2g21260* y *RD29A* en plantas tipo silvestre y líneas mutantes sometidas a estrés salino durante 15 días. Cada barra corresponde al promedio entre 3 extracciones de RNA, cada una con 2 repeticiones de la reacción de qPCR. $p < 0,001$. **ns:** no hay diferencias significativas entre las condiciones señaladas. **WT:** Plantas de tipo silvestre. ***ata6pr-1*** y ***2:*** Líneas mutantes insercionales SALK. **ns:** no hay diferencias significativas entre las condiciones señaladas. Las letras minúsculas en las barras indican valores significativamente diferentes, asociándose letras diferentes a valores significativamente distintos. Se aplicó el test de ANOVA y el post-test de Bonferroni para encontrar diferencias significativas entre los grupos de datos. Las barras de error señalan la desviación estándar obtenida para cada grupo de datos. Normalizador utilizado: PP2A (AGI At1g13320).

5.7.2 Fenotipo de *ata6pr-1* y *ata6pr-2*.

Se evaluó el efecto del estrés salino en la germinación y el crecimiento de las semillas mutantes *ata6pr-1* y *ata6pr-2* para comparar su desempeño respecto a las de tipo silvestre. Para ello, se determinó el porcentaje de germinación diario de las semillas estudiadas en medio MS suplementado con las concentraciones de NaCl indicadas anteriormente (0, 50, 75 y 125 mM). Tal como se ha reportado previamente (Galpaz y Reymond, 2010; Joosen y cols 2012), el estrés salino generó un retardo de alrededor de 1 día en la germinación de las semillas, tanto en plantas de tipo silvestre como mutante (**Figura 22**). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la tasa de germinación de las líneas mutantes respecto a las de tipo silvestre en ninguna de las condiciones examinadas.

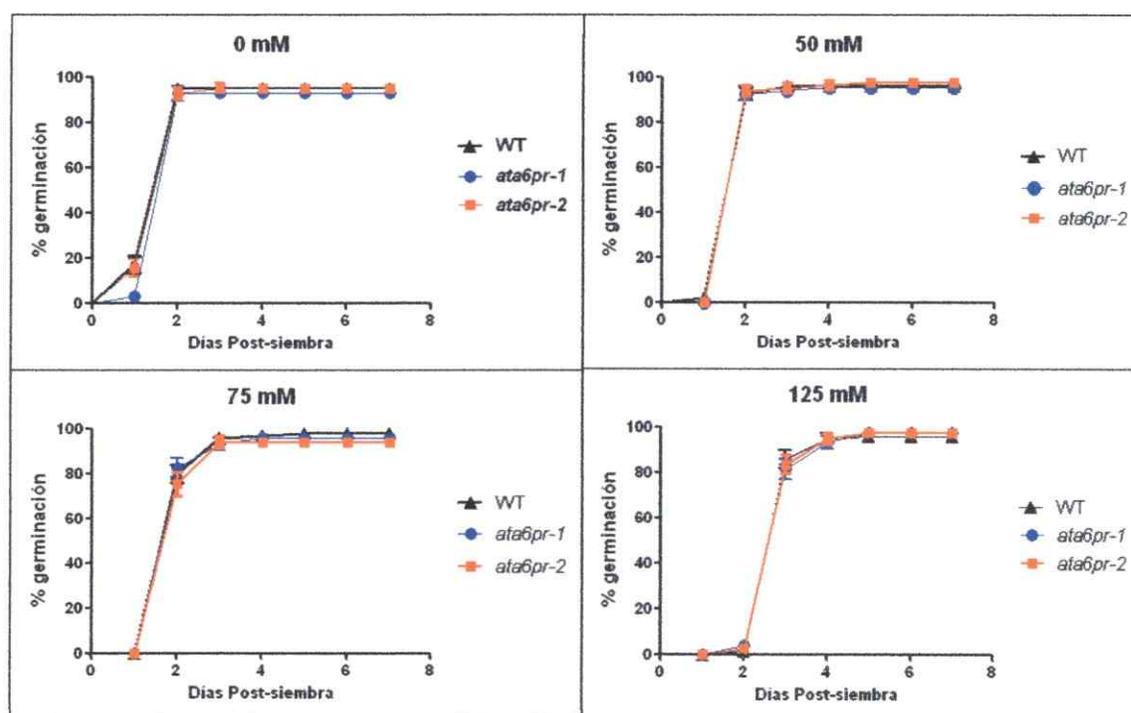


Figura 22: Tasa de germinación de semillas tipo silvestre, *ata6pr-1* y *ata6pr-2* bajo estrés salino. Experimento realizado por duplicado en placa Petri, cada placa con un n>70. Las barras de error señalan la desviación estándar obtenida para cada grupo de datos.

Durante el experimento de germinación, se observaron en cada placa plántulas que si bien germinaron, rápidamente dejaron de crecer, se volvieron cloróticas y murieron. Se cuantificó la incidencia de las plántulas que presentaron esta reacción respecto a la concentración de sal a lo largo del tiempo, obteniéndose curvas de sobrevivencia para cada concentración de NaCl (**Figura 23**). Se observó una marcada disminución en el porcentaje de plántulas sobrevivientes al incrementarse la concentración de sal (llegando a un 40% de mortalidad a 125 mM), sin embargo no se presentaron diferencias significativas entre la sobrevivencia observada para las plantas silvestres y las líneas mutantes.

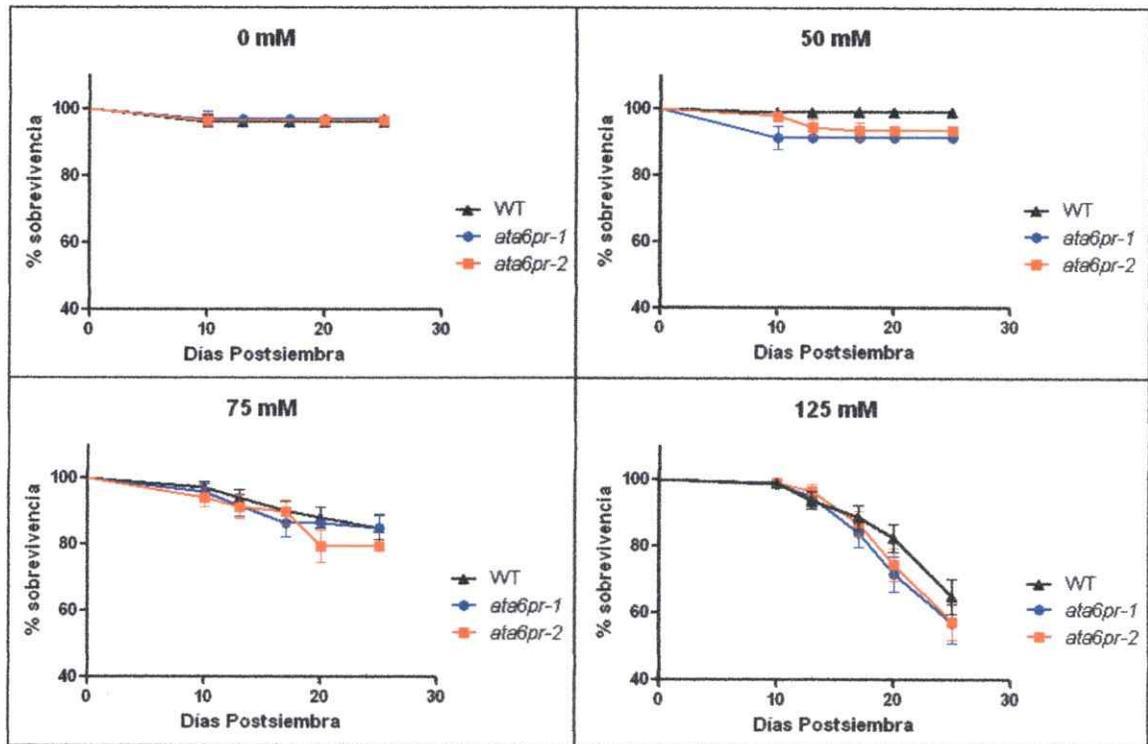


Figura 23: Sobrevivencia de plántulas tipo silvestre, *ata6pr-1* y *ata6pr-2* bajo estrés salino. Experimento realizado por duplicado en placa Petri, cada placa con un $n > 70$. Las barras de error representan la desviación estándar obtenida para cada grupo de datos.

Para continuar la caracterización fenotípica de las líneas mutantes bajo estrés salino, se evaluó el crecimiento de plántulas sometidas a las condiciones de estrés mencionadas anteriormente. Tal como se menciona en la literatura (Galpaz y Reymond, 2010), el estrés salino causó disminución del crecimiento en las plántulas observadas (Figura 24.A), proporcional a la concentración de NaCl utilizada. Nuevamente, la característica donde se observaron mayores diferencias aparentes entre las líneas fue el largo de la raíz principal, que fue cuantificado a los 7 y 15 días de edad de las plántulas (Figuras 24.B y 24.C, respectivamente). Se observó una disminución significativa del largo de la raíz al incrementarse la concentración de sal, la cual se hace más evidente a los 15 días: a esta edad, las raíces de las plántulas sometidas a 50 mM de NaCl miden aproximadamente un 50% del largo de aquellas crecidas sin estrés (25,2 mm en promedio respecto a 49,3 mm en las plantas no estresadas), aquellas crecidas en presencia de NaCl 75 mM poseen aproximadamente un 30% del largo de las no-estresadas (14,0 mm), mientras que las raíces de las crecidas en NaCl 125 mM tienen en promedio un 12% del largo de las plantas no estresadas (6,0 mm). Sin embargo, al comparar el largo de las raíces de las líneas mutantes con las de tipo silvestre crecidas bajo concentraciones de NaCl similares, no se presentaron diferencias significativas, indicando que una menor acumulación de transcritos de *AtA6PR* no afecta la tolerancia a estrés salino en las condiciones observadas. Tampoco se observaron diferencias en el caso de plantas adultas mantenidas bajo estrés salino (NaCl 0, 50, 75 y 125 mM) en medio hidropónico durante 1 mes (datos no mostrados). En estas plantas además (tanto en silvestres como en mutantes), se observó el retraso en el desarrollo de órganos reproductivos descrito previamente (Galpaz y Reymond, 2010), los que en el caso de las plantas bajo NaCl 125 mM no se desarrollaron.

Adicionalmente, se analizó el efecto del bajo nivel de transcrito de *AtA6PR* en la acumulación de sacáridos de plántulas de *Arabidopsis* sometidas a estrés salino. Para ello, se separaron por HPLC los principales sacáridos presentes en plántulas de 15 días, sembradas bajo las concentraciones de NaCl detalladas anteriormente. La edad de las plántulas utilizadas corresponde a aquella donde se observaron diferencias en los niveles de mRNA de *AtA6PR* en las líneas de tipo silvestre, además de poder observarse más claramente la diferencia en el largo de la raíz bajo cada concentración de sal (15 días post siembra). En este experimento, se observaron cambios en la

cantidad de glucosa, fructosa y sacarosa al incrementar la concentración de NaCl (Figura 25). En la sección 5.6.2 se describe la acumulación de estos azúcares observada para las líneas silvestre, *ata6pr-1* y *ata6pr-2* en condiciones estándar de crecimiento (Figura 25.A).

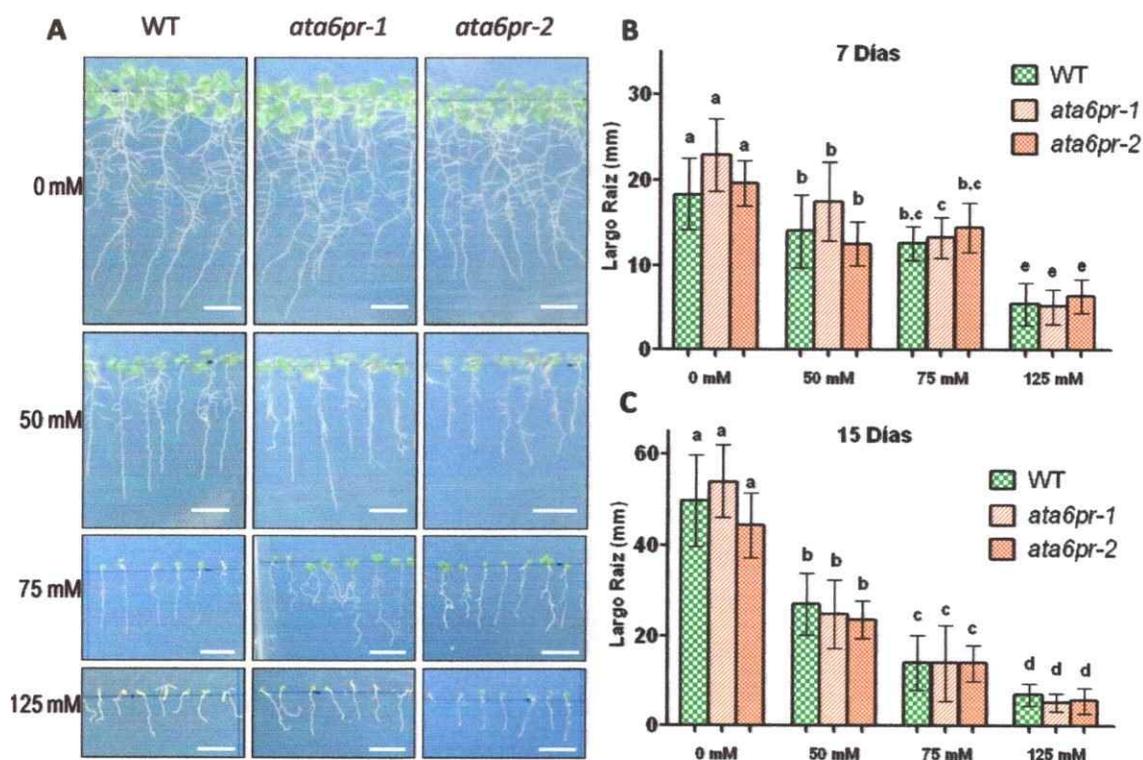


Figura 24: Crecimiento de plántulas tipo silvestre, *ata6pr-1* y *ata6pr-2* bajo estrés salino. A: Plántulas de *Arabidopsis* de 15 días sembradas en medio MS con NaCl 0, 50, 75 y 125 mM. Se midió el largo de la raíz principal de plántulas de 7 días (B) y 15 días post siembra (C). Se aplicó el test de ANOVA y el post-test de Bonferroni para encontrar diferencias significativas entre los grupos de datos. Barras=Desviación estándar. Las letras minúsculas en las barras indican valores significativamente diferentes, asociándose letras diferentes a valores significativamente distintos. $n > 10$. Barra de tamaño: 1 cm.

Los niveles observados con NaCl 0 mM se mantienen para cada línea cuando la sal es de 50 mM (Figura 25.B), encontrándose en este caso que la fructosa de las líneas de tipo silvestre se mantiene en 0,446 mg/g de peso fresco, mientras las líneas *ata6pr-1* y 2 presentan 0,256 y 0,241 mg/g de peso fresco (un 57 y 54% del encontrado en plantas silvestres), respectivamente. La glucosa encontrada en estas plantas se reduce de 0,437 a 0,205 y 0,271 mg/g de peso fresco en las plantas de tipo silvestre, *ata6pr-1* y *ata6pr-2*, respectivamente (es decir, las líneas mutantes presentan sólo un 47 y 62% de la glucosa encontrada en las de tipo silvestre). La sacarosa por su parte, en las líneas mutantes se acumula hasta 0,138 y 0,182 mg/g de peso fresco, un 38 y 49% del acumulado en las plantas silvestres (que acumulan en promedio 0,367 mg/g de peso fresco).

A 75 mM de NaCl (Figura 25.C), se observa que los niveles de azúcares acumulados en las plantas de tipo silvestre se mantienen relativamente constantes respecto a las concentraciones anteriores encontradas, con la fructosa en 0,448, la glucosa en 0,472 y la sacarosa en 0,392 mg/g de peso fresco. Sin embargo, a esta concentración de sal (la mayor concentración sub-letal utilizada en este trabajo), no se presenta la reducción en la acumulación de azúcares observada a menores concentraciones de sal (es decir, no se encuentran diferencias significativas entre las líneas mutantes y las de tipo silvestre).

Cuando se observa la acumulación de cada sacárido en plántulas sembradas bajo una concentración letal de NaCl (125 mM), se revela un aumento en la acumulación de todos los azúcares medidos (en las plantas de tipo silvestre la fructosa aumenta a 1,58 mg/g de peso fresco y la glucosa se acumula hasta 1,66 mg/g de peso fresco), donde destaca la gran acumulación de sacarosa en estas plántulas, con 9,41 mg/g de peso fresco. Se repite el fenómeno observado a 75 mM de NaCl, donde no se observan diferencias significativas entre los sacáridos acumulados en las plantas de tipo silvestre respecto a las mutantes.

Estos resultados indican que, si bien la menor acumulación de transcrito de *AtA6PR* está afectando la acumulación de azúcares en las líneas mutantes *ata6pr-1* y *ata6pr-2* en condiciones estándares de crecimiento, no afecta su acumulación bajo condiciones severas de estrés salino, lo que sugiere que en estas condiciones la acumulación de sacáridos se debe a una vía independiente.

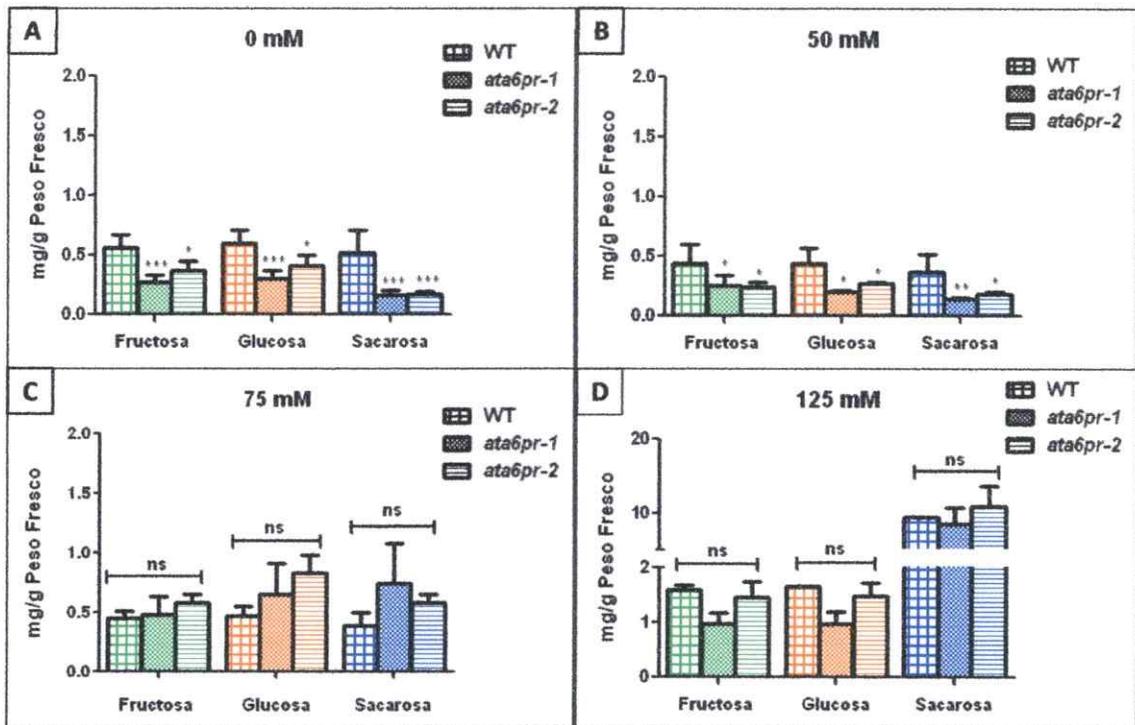


Figura 25: Principales sacáridos encontrados en *Arabidopsis* de tipo silvestre y en las líneas *ata6pr-1* y *ata6pr-2*. Cada título corresponde a la concentración de sal en la cual se sembraron las plántulas en estudio. Las mediciones se realizaron a partir de 4 extracciones independientes, cada una formada por un pool de plantas crecidas en condiciones similares. Plántulas de 15 días de edad post siembra. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$. ns: no hay diferencias significativas entre las líneas señaladas. Se aplicó el test de ANOVA y el post-test de Bonferroni para encontrar diferencias significativas entre los grupos de datos. Las barras de error señalan la desviación estándar obtenida para cada grupo de datos.

6 DISCUSIÓN

En el desarrollo de esta Tesis de Magíster, se estudió AtA6PR como posible aldosa-6-fosfato reductasa propia de *Arabidopsis thaliana* y se intentó esclarecer su asociación con la tolerancia al estrés en el metabolismo de esta planta. Esto se realizó a través de la creación y caracterización fenotípica de plantas mutantes – con bajos niveles de transcrito de este gen – en condiciones normales de crecimiento y bajo estrés salino, y ensayos para determinar su actividad enzimática, utilizando herramientas de bioquímica y biología molecular.

6.1 Obtención de His-AtA6PR y actividad enzimática

Se abordaron diferentes estrategias para determinar la actividad enzimática de la proteína, expresando AtA6PR en varios sistemas en paralelo. Se descartó extraer la proteína directamente de *Arabidopsis* debido a las grandes cantidades de tejido requeridas: Se utilizaron 60 g cuando se extrajo desde hojas de *M. domestica* (Negm y Loescher, 1981) y 200 g para plántulas de *M. domestica* (Kanayama y Yamaki, 1993), cantidades excesivas considerando el pequeño tamaño de *A. thaliana* y que por ser rosácea, *M. domestica* debería presentar gran actividad de MdA6PR mientras que se desconoce la actividad de AtA6PR producida por *A. thaliana*. Por otro lado, al producir una proteína recombinante en plantas, fue posible sobreexpresar la misma en un sistema similar al nativo, pero en un organismo de mucho mayor tamaño (*N. tabacum*), lo que permitió obtener más tejido para las extracciones, facilitando la obtención de la enzima. Además, las construcciones creadas permitieron sobreexpresar la proteína en los tejidos transformados – disminuyendo la cantidad de tejido requerido para cada extracción – y añadir epítomos (6xHis) que facilitarían su purificación. Se buscó un beneficio similar al expresar AtA6PR en el sistema *in vitro*: el aumento significativo de la proporción de enzima en cada extracción y la posibilidad de purificarla en un solo paso por columnas de afinidad de Ni²⁺. Otras razones para elegir estos sistemas de expresión fueron que el sistema *in vitro* (que utiliza el sistema de transcripción y traducción de *E. coli*) permite expresar la proteína en una sola reacción, mientras que

el sistema *in planta* se adoptó en caso que la actividad de la proteína dependiera de modificaciones postraduccionales que no se dan en bacterias (Daniell y cols., 2001).

De esta manera, se crearon 3 vectores diferentes, utilizando como DNA templado un fragmento de *AtA6PR* clonado previamente. Así, se logró obtener las proteínas recombinantes 6xHis-*AtA6PR* (para expresión *in vitro*), *AtA6PR*-6xHis y *AtA6PR* (para expresión *in planta*). Para las dos últimas, la proteína se produjo a través de una transformación transitoria de hojas de *N. tabacum*. Este tipo de transformación fue seleccionada debido a que es más simple y permite mayores rendimientos que la transformación estable (Wydro y cols., 2006), permitiendo la acumulación de grandes cantidades de proteína en poco tiempo (2-4 días) mientras que la transformación estable produce, en un lapso mucho mayor (2-4 meses), bajos niveles de proteína (menos del 1% de proteína total), usualmente debido a la aparición de SGPT (Sheludko y cols., 2007). En los experimentos realizados en este trabajo, se pudo observar que 3 días después de la transformación, efectivamente hay expresión del mRNA de *AtA6PR*-6xHis y producción de la proteína en la planta (Figura 6). Sin embargo, en estos experimentos no se observaron los altos niveles de expresión de proteína recombinante observados en otros trabajos para transformaciones transitorias utilizando el promotor constitutivo y fuerte del virus del mosaico de la coliflor CaMV35S (Romeis y cols., 2001, Fischer y cols., 2004). La variabilidad en la eficiencia de cada evento de transformación (que depende de múltiples factores, como la viabilidad de la planta, la edad de las plantas y de las hojas transformadas y la viabilidad de *Agrobacterium*, Sparkes y cols., 2006) probablemente contribuyó a la falta de reproducibilidad de los ensayos de actividad realizados posteriormente, aunque probablemente el paso por la columna de Sephadex también contribuyó al diluir la muestra utilizada. Otra posibilidad consiste en que la reacción fuese inhibida por algún componente propio de la extracción; sin embargo esta hipótesis no fue sujeta a prueba ya que al momento de realizar los experimentos, His-MdA6PR no se encontraba disponible como control positivo.

Respecto a la expresión *in-vitro* de His-*AtA6PR*, se logró producir la proteína recombinante (Figura 8). Sin embargo la cantidad de proteína obtenida fue insuficiente para purificarla, y no se logró ver su actividad desde extractos crudos debido a que otras enzimas presentes en la mezcla reaccionaron con NADP⁺ (sección 5.3), por lo que éste no constituyó un sistema adecuado para determinar la actividad de His-

AtA6PR. Por esta razón, finalmente se utilizó un sistema de expresión heterólogo en *E. coli*, que sí permitió la sobreexpresión de His-AtA6PR y su purificación. Este sistema se había descartado inicialmente por requerir más tiempo en la formación de vectores y transformaciones que la transcripción y traducción *in vitro* y por la posibilidad que la proteína requiriera modificaciones post-traduccionales para ser activa (a pesar de no haberse encontrado trabajos que reporten evidencias de modificaciones postraduccionales de A6PRs en plantas).

Para obtener la proteína en *E. coli*, fue necesario optimizar las condiciones de expresión de la enzima (sección 5.4.1), de lisis celular (sección 5.4.3) y de purificación de la misma (sección 5.4.2). Debido a que la actividad perdida en el proceso de sonicación se recuperó al incubar la mezcla de enzimas con los sustratos de AtA6PR, es posible que este acontecimiento se debiera a una pérdida de parte de la integridad estructural en las enzimas de la mezcla, que luego se recuperó facilitada por la presencia de un sustrato de AtA6PR (G6P). Sin embargo, en los ensayos realizados la G6P actuó como sustrato para enzimas endógenas de *E. coli*, dentro de las cuales la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa posee un K_m para G6P (de 0,145 mM, Banerjee y Fraenkel, 1972) mucho menor que el de A6PR para G6P (entre 13,9 y 20 mM) o para S6P (entre 2,22 y 3 mM), por lo que al agregar $NADP^+$, se observó actividad enzimática sin agregar S6P.

6.1.1 Actividad de AtA6PR

A pesar de los numerosos intentos y condiciones probadas para establecer la actividad de His-AtA6PR purificada, sólo fue posible obtener actividad con los extractos crudos de *E. coli* inducida que contenía la enzima (Figura 12). Esto puede deberse a una rápida pérdida de actividad de la enzima luego de la extracción: en estudios previos se ha observado que His-AtSDH perdió actividad luego de ser purificada (Aguayo, 2013) y que al purificar parcialmente A6PR de diversas rosáceas (de las subfamilias prunoideae, pomoideae y spiraeoideae, Hirai, 1981) también se perdió actividad algunos minutos después de la purificación. En estos estudios se logró estabilizar la actividad de la enzima cambiando el buffer de purificación y añadiendo glicerol 1 M, respectivamente, condiciones que no incrementaron la actividad de His-AtA6PR en este trabajo.

Ya que no existen A6PR comercialmente disponibles, se sintetizó His-MdA6PR (Figuroa e Iglesias, 2010) como control positivo para los ensayos de actividad. Se dió preferencia a ésta en lugar de purificarla directamente de plantas de *Malus x domestica* debido a que su síntesis y epítopo son similares a los utilizados para His-AtA6PR, permitiendo que ambas enzimas fueran más comparables. Al realizar esta comparación, se observa que la mezcla enzimática que contenía His-AtA6PR era capaz de reducir NADP⁺ a aproximadamente la mitad de la velocidad que lo hace la que contiene His-MdA6PR en presencia de S6P (26,28 nmoles de NADPH mg⁻¹ min⁻¹ y 61,49 nmoles de NADPH mg⁻¹ min⁻¹ respectivamente, Figura 12.A). Esta diferencia puede deberse a que AtA6PR presenta una sustitución del tipo conservado S₂₆₂>T en la secuencia IPKS (Zamudio, 2010), donde se encuentra el posible sitio activo de las aldo-ceto reductasas (en particular en el residuo de lisina, Bohren y cols., 1991). No fue posible comparar la actividad de His-MdA6PR con His-AtA6PR para la oxidación de NADPH (en presencia de G6P) debido a que no se detectó actividad de His-AtA6PR para esta reacción en las condiciones estudiadas. Si la actividad de esta enzima para la reducción de G6P no ocurre en condiciones similares a las fisiológicas, podría implicar que en la planta, la enzima se encarga de catabolizar S6P en lugar de sintetizarlo. De ser éste el caso, se requeriría otro sistema para sintetizar S6P en la planta, como por ejemplo a través de aldosas reductasas o alcohol deshidrogenasas. En *Arabidopsis* existen otras aldo-ceto reductasas descritas, sin embargo éstas presentan mucha menor actividad con azúcares (glucosa, galactosa, eritrosa) que con aldehídos (gliceraldehído, glicoxal, decanal, benzaldehído, Simpson y cols., 2009), con una diferencia en el K_{cat}/K_m de hasta 3 órdenes de magnitud (min⁻¹ mM⁻¹).

6.2 Obtención y análisis de líneas mutantes SALK y pMDC43-AtA6PR.

Para estudiar el rol biológico de AtA6PR en el metabolismo de la planta, se recurrió al uso de mutantes. Para obtener las mutantes requeridas, se abordaron 2 estrategias independientes: la creación de plantas sobreexpresoras del mRNA de *AtA6PR*, que podría culminar en SGPT de este gen, y el uso de mutantes insercionales de la colección SALK. Las últimas presentaban el riesgo de conformar plantas con mutaciones letales (es decir, las mutantes homocigotas no son viables), lo que hubiera forzado la utilización de plantas heterocigotas que dificultarían el estudio (ya que

hubieran requerido crecer cada plántula a analizar – antes de realizar los análisis – para determinar si presentaba la inserción por los análisis de PCR detallados en la sección 5.5.2). Ya que el SGPT produce plantas con variados niveles de silenciamiento, abordar ambas estrategias aseguró la obtención de plantas viables con niveles reducidos de mRNA de *AtA6PR* para los análisis realizados en semillas y plántulas.

En la primera estrategia, se transformaron semillas de *Arabidopsis* con el vector pMDC43-*AtA6PR* (Zamudio, 2010), el cual podría gatillar SGPT por cosupresión en la planta (sección 5.5), tal como se ha observado en trabajos anteriores con vectores similares (Miranda, 2009). A partir de esta transformación, se lograron obtener 8 líneas resistentes a higromicina que presentaron el fragmento de *GFP-AtA6PR* en su genoma (Figura 13). Cuando se analizó la segregación de la resistencia a higromicina de las semillas T₂ obtenidas a partir de cada una de estas líneas, se observó que aproximadamente la mitad presentó un porcentaje menor al esperado (de plántulas resistentes al antibiótico, Tabla V) para plantas con una sola inserción en su genoma (Sección 5.5.1). De acuerdo al Instituto SALK (SIGnAL), en plantas de *Arabidopsis* transformadas con *Agrobacterium* se ha observado silenciamiento de la resistencia a antibiótico luego de más de una generación, por lo que no es inusual que la resistencia a antibiótico no se observe. En otros experimentos, se ha observado que en transformaciones mediadas por *Agrobacterium*, sólo un 50% de las líneas presenta segregación mendeliana correspondiente a una sola inserción en el genoma (incluyendo en este grupo aquellas con proporción 2:1 resistentes:sensibles). Del resto, la mayoría presenta segregación compatible con más de una inserción y alrededor de un 10% del total de las líneas no presentan segregación mendeliana para el marcador de selección, con una proporción menor a 2:1 de semillas T₃ resistentes:sensibles al antibiótico (Feldmann y cols, 1997). Aun así, se obtuvieron transformantes homocigotas en 2 líneas: L4 y L5.

Para la segunda estrategia abordada – el uso de mutantes insercionales de la colección SALK – fue necesario genotipificar cada planta para determinar la posición de la inserción y su estado de homo o heterocigosis. De acuerdo al sitio web del Instituto SALK (SIGnAL), la inserción puede encontrarse hasta 300 pb río arriba del borde izquierdo del sitio señalado como inicio de la inserción (Figura 14), lo que implica que puede encontrarse en intrones o en los exones de *AtA6PR*, o en el caso de

ata6pr-0 en la sección 5' del promotor del gen, lo que provoca que determinar la localización exacta de las inserciones sea vital para una buena interpretación de los resultados obtenidos con estas líneas. Esta incertidumbre existe debido a sobreposiciones en las secuencias obtenidas de la secuenciación de las plantas del proyecto SALK, por lo que la información proporcionada por SIGnAL (<http://signal.salk.edu/>) corresponde a la primera base de alta calidad de la secuenciación obtenida. Debido a que la muestra de semillas proporcionadas por este Instituto corresponden a la generación T₃, ésta contiene una mezcla de semillas homocigotas, heterocigotas y silvestres, por lo que se hace necesario analizar cada una para poder identificar las plantas homocigotas. La heterogeneidad de las semillas entregadas se aprecia en el análisis de PCR (Figura 15), donde las reacciones realizadas evidenciaron las plantas homocigotas, heterocigotas y aquellas que no presentaron la inserción de T-DNA. En particular, no fue posible identificar plantas homocigotas para las líneas *ata6pr-0* y *ata6pr-3*, siendo observadas en la primera sólo plantas carentes del T-DNA y en la última sólo plantas heterocigotas (*ata6pr-3.6*, *ata6pr-3.11*) o sin inserción (*ata6pr-3.2*). Dadas las probabilidades de cada planta de ser homocigota (25% según genética mendeliana) y el número de plantas crecidas (>12, sección 5.5.2), se debería haber encontrado al menos 3 individuos con el T-DNA en homocigocis para cada línea. En el caso de las líneas *ata6pr-0*, la falta de amplicón pudo deberse a que las condiciones adecuadas para la reacción de PCR de este fragmento fueran diferentes a las estandarizadas para las otras líneas SALK, mientras que para la línea *ata6pr-3*, quizás un número aún mayor de individuos sembrados y crecidos hubiera permitido encontrar las mutantes homocigotas requeridas.

Una vez obtenidas las líneas *ata6pr-1*, *ata6pr-2*, L4 y L5 homocigotas, se analizó la acumulación de transcritos de *AtA6PR* en cada una de ellas por qRT-PCR. Como se observa en la Figura 17, se descartó las líneas L4 y L5 para los análisis posteriores debido a que en ellas no se gatilló el SGPT esperado, observándose incluso que en la línea L5 se produjo un gran aumento del nivel de transcrito de *AtA6PR* (521% relativo a plantas silvestres). Esta diferencia, a pesar de haber sido transformadas ambas plantas con el mismo vector se debe a que cada evento de transformación es independiente y el resultado final puede estar influenciado por el sitio donde ocurre la inserción de los transgenes (Vaucheret y Fagart, 2001). La ausencia de SGPT resultante en estas líneas probablemente se debe a un número insuficiente

de inserciones del fragmento *GFP-AtA6PR* en el genoma de la planta, ya que se ha reportado que el número de insertos es inversamente proporcional al nivel de transcrito detectado (Vaucheret y Fagart, 2001). En las líneas *ata6pr-1* y *-2*, por el contrario, sí se observó la disminución esperada del mRNA de *AtA6PR* (a un 0,85 y 0,56% respectivamente) del observado en plantas silvestres, sin que se observara una compensación de los bajos niveles de transcrito de *AtA6PR* con un aumento de los de *At2g21260*. Además, en un trabajo paralelo en el laboratorio, se mostró que ambas mutantes carecen de niveles detectables de *AtA6PR*, mediante el uso de un antisuero policlonal α -*AtA6PR* (Wurman, 2013).

6.2.1 *ata6pr*- bajo condiciones estándar de crecimiento.

Cuando se examinó el fenotipo de las líneas mutantes bajo condiciones estándar de crecimiento, no se observaron diferencias notables entre las líneas de tipo silvestre y las mutantes, sin embargo destacó el hecho que en ambas mutantes se presentaran alteraciones en los niveles de todos los carbohidratos examinados (Figura 19). Este efecto se ha estudiado anteriormente en *Malus x domestica*, donde al reducir *A6PR* por silenciamiento génico, se observó un aumento en los niveles de glucosa y almidón y una disminución en los de sacarosa (Cheng y cols, 2005; Teo y cols, 2006). Sin embargo, estos datos no se corresponden con los observados en las Figuras 19 y 25, donde los niveles de fructosa, glucosa y sacarosa en ambos mutantes disminuyeron a aproximadamente la mitad de los obtenidos en las plantas de tipo silvestre. Resultados mucho más similares a los obtenidos en este trabajo se observaron en un estudio reciente en el cual se suprimió la fotosíntesis en plántulas de *Arabidopsis* de 10 días de edad, disminuyendo aproximadamente a la mitad los niveles de fructosa, glucosa y sacarosa de las hojas (Haydon y cols., 2013). Estos resultados sugieren que los bajos niveles de transcrito de *AtA6PR* podrían entorpecer el proceso de fotosíntesis de las plántulas, causando la baja en los carbohidratos detectados. O bien, si en efecto *AtA6PR* cataboliza S6P a G6P (según lo comentado en la sección 6.1.1), la disminución del transcrito de esta proteína podría disminuir la G6P, que entonces no se encontraría disponible para ser convertida en fructosa ni sacarosa (recurso AraCyc del Plant Metabolic Network, PMN). Dado que el sorbitol puede estar actuando como señalizador en condiciones de estrés abiótico (Feng y cols., 2011, Rosa y cols, 2009), y considerando los altos niveles de transcrito de *RD29A*

detectados, una explicación más probable es que sea la activación de la respuesta a estrés lo que afecta la fotosíntesis, ya que se ha reportado que ésta disminuye en condiciones de estrés salino (Msanne y cols., 2011) y por ende, disminuye también la acumulación de azúcares solubles.

Al examinar los datos de microarreglos de la expresión de *AtA6PR* bajo condiciones estándar de crecimiento (Figura 20), se pueden observar cambios en los niveles de transcrito de este gen donde el transcrito aumenta a lo largo del día y disminuye en las últimas horas de éste, mostrando un posible ritmo circadiano en su expresión, al igual que otras enzimas relacionadas a la fotosíntesis (Haydon y cols., 2013). Este fenómeno ocurre en plantas debido a la fina regulación de los ciclos diurnos y nocturnos de síntesis y utilización de carbono (Graf y cols., 2010). Al agregar a estas observaciones las realizadas respecto al fenotipo y perfil de azúcares de las plantas de tipo silvestre y mutante (Figura 19), se puede inferir una estrecha relación de *AtA6PR* con el proceso de fotosíntesis y el metabolismo de síntesis de azúcares en *Arabidopsis*. Si bien no se observaron diferencias claras en la germinación ni el fenotipo de las mutantes *ata6pr-1* y *ata6pr-2*, sí se pudieron observar diferencias metabólicas, con una menor acumulación de glucosa, fructosa y sacarosa que las de tipo silvestre acompañada por un aumento significativo en los niveles basales de transcrito del gen de respuesta a estrés abiótico *RD29A* (Figura 21.C; 0 mM NaCl), que son más altos que el nivel encontrado en plantas de tipo silvestre sometidas al máximo estrés salino considerado no-letal (75 mM). Estos resultados evidenciaron que aunque no es posible asociar específicamente la síntesis de sorbitol u otros carbohidratos a *AtA6PR*, la disminución de sus niveles de transcrito sí produce un efecto importante en el metabolismo de la planta, reflejado en un aumento significativo (8,5 veces) en la acumulación de transcritos de un gen de respuesta al estrés abiótico (*RD29A*), aún encontrándose en condiciones estándar de propagación y posiblemente afectando el proceso de fotosíntesis. Otra explicación para el aumento del nivel de transcrito de *RD29A* encontrado consiste en que si el sorbitol (via S6P) es el producto de la reacción catalizada por *AtA6PR*, en la planta esta molécula actúe como molécula señalizadora: Un estudio reciente en callos de *Oryza sativa* (arroz) evidenció la transcripción diferencial de múltiples genes entre callos cultivados con y sin sorbitol agregado al medio de regeneración, donde un porcentaje importante de los genes conocidos identificados se relacionaba a la transducción de señales y otro porcentaje

igualmente grande al metabolismo y energía (Feng y cols., 2011). Otra posibilidad consiste en que sea la disminución en los niveles de sacarosa – que puede afectar la transcripción de genes de respuesta a estrés abiótico (Rekarte-Cowie y cols., 2008) – la que altere la transcripción de *RD29A*. Un estudio más reciente (Haydon y cols., 2013) relacionó 3 productos de la fotosíntesis (glucosa, sacarosa, fructosa) con la restitución del ciclo circadiano en plántulas crecidas bajo oscuridad constante, regulando la transcripción de genes del reloj circadiano (*PPR7*). De esta manera, plantas mutantes con bajos niveles de sorbitol podrían presentar algunas alteraciones en indicadores relacionados al estrés como *RD29A* o, si la mutación afecta el proceso de fotosíntesis, podría causar (en forma indirecta) una desregulación en el ciclo circadiano de la planta, alterando su metabolismo y produciendo estrés.

6.2.2 *ata6pr*- bajo estrés salino.

Para observar la relación entre *AtA6PR* y el estrés salino (condiciones bajo las cuales *AtA6PR* sufre los mayores aumentos en expresión, **Figura 20**), se examinó la germinación, fenotipo, expresión génica y perfil de carbohidratos en plántulas sometidas a este estrés por 15 días. Previamente a esto, se observaron los datos de microarreglos disponibles en la web, donde además de evidenciarse el posible ritmo circadiano de *AtA6PR*, se observó el aumento de transcritos de *AtA6PR* en respuesta al estrés salino y una ruptura en el patrón observado bajo condiciones control y bajo los otros tipos de estrés cuando las plantas se sometieron a estrés por frío. Esto puede deberse a que en hojas de *Arabidopsis* bajo estrés por frío, la fotosíntesis se suprime, junto a los niveles de transcrito de proteínas relacionadas a ésta, recuperándose después de un período de aclimatación al frío (~21 días, Strand y cols., 1997).

Al igual que lo observado para plantas en condiciones estándar de crecimiento, no se observaron cambios significativos de germinación o fenotípicos en las líneas *ata6pr-1* ni *ata6pr-2* cuando éstas se sometieron a diferentes grados de estrés salino (**Figuras 22, 23, 24**). Sin embargo sí fue posible observar diferencias en la expresión génica (**Figura 21**) y el perfil de azúcares analizado (**Figura 25**): se produjo un aumento – dependiente de la concentración de NaCl – en los niveles de transcrito de *AtA6PR* en plantas de tipo silvestre (pero que no se observó en las líneas mutantes bajo condiciones similares) sometidas a estrés (**Figuras 20 y 21**), indicando que *AtA6PR* sí responde al estrés salino de manera similar a las enzimas relacionadas a la

síntesis de sacarosa (Rosa y cols, 2009). También se observó un mayor grado de estrés en las plantas mutantes que en las silvestres, evidenciado por el mayor nivel de transcrito de *RD29A* bajo todas las concentraciones de estrés probadas (Figura 21.C).

Respecto a las diferencias encontradas en los carbohidratos analizados, a concentraciones bajas de NaCl (25 mM, Figuras 25.A y 25.B) se observó un menor nivel de acumulación de azúcares en las líneas mutantes, manteniéndose lo observado para las condiciones estándar de crecimiento. Sin embargo, a concentraciones mayores, (NaCl 75 y 125 mM, Figuras 25.C y 25.D) las diferencias encontradas en los niveles de glucosa, fructosa y sacarosa entre plantas silvestres y mutantes desaparece: al aumentar la concentración de sal en el medio de cultivo, los azúcares aumentaron en todas las líneas, de manera que a las mayores concentraciones de NaCl (75 y 125 mM) ya no fue posible observar diferencias entre plántulas silvestres y mutantes (Figura 25). Esto implica que si bien *AtA6PR* tiene un efecto en la acumulación de azúcares en *Arabidopsis* (ya sea afectando su síntesis, su degradación o ambos) y su transcripción aumenta bajo estrés salino, la disminución de los niveles de transcrito de *AtA6PR* en las mutantes no impidieron a la planta responder a este tipo de estrés de igual manera que las plantas silvestres, ya que cuando éstas se encuentran bajo estrés salino o por sequía, se produce degradación de almidón y acumulación de azúcares solubles (Krasensky y Jonak, 2012).

7 CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió la actividad y papel de AtA6PR en el metabolismo de *Arabidopsis* a través de la determinación de la actividad de la proteína y de la caracterización de líneas mutantes deficientes de función.

Para el primer punto mencionado, se logró expresar His-AtA6PR en diversos sistemas heterólogos (*in planta*, *in vitro* y en bacteria), siendo el más efectivo y fácil de optimizar la expresión en *E. coli*, que permitió obtener y purificar la proteína. Si bien no se detectó actividad con la proteína purificada, se logró determinar que extractos crudos de proteína enriquecidos con His-AtA6PR – al provenir de *E. coli* transformadas con el vector pET 28a-AtA6PR e inducidas por IPTG para expresar la proteína – fueron capaces de reducir NADP⁺ en presencia de S6P con mayor actividad que los controles negativos y con menor actividad que la determinada para His-MdA6PR. No se detectó actividad para la oxidación de NADPH y la reducción de G6P bajo las condiciones examinadas en este trabajo.

Respecto a la participación de AtA6PR en el metabolismo de *Arabidopsis*, se demostró que los transcritos de esta proteína responden al estrés salino, aumentando en forma dependiente de la concentración de NaCl aplicada en plantas de tipo silvestre. En concordancia con los objetivos específicos planteados en este estudio, también se logró obtener líneas mutantes incapaces de producir AtA6PR. En estas líneas no se observaron diferencias morfológicas respecto a las líneas de tipo silvestre, sin embargo, sí se identificaron efectos metabólicos. En plantas de las líneas *ata6pr-1* y *ata6pr-2* cultivadas con concentraciones bajas (50 mM) o nulas de NaCl, la disminución de transcritos de *AtA6PR* y consiguiente ausencia de proteína observados coincidieron con una importante reducción en la acumulación de sacáridos solubles (glucosa, fructosa y sacarosa), junto con un aumento considerable en los niveles de transcrito de *RD29A* (gen relacionado a la respuesta al estrés abiótico), pudiendo indicar una disminución en la fotosíntesis debida a la activación de la respuesta a estrés abiótico. Bajo condiciones severas de estrés salino (75 y 125 mM), la acumulación de estos metabolitos se restableció, alcanzando los niveles detectados en las plantas de tipo silvestre, probablemente debido a la participación de vías que

degradan azúcares de reserva como el almidón ante el estrés. Estos resultados permiten inferir una estrecha relación entre AtA6PR, el estrés salino y el metabolismo de sacáridos en la planta (posiblemente siendo capaz de alterar la señalización relacionada al estrés), y confirman la hipótesis planteada al inicio de este trabajo.

8 PROYECCIONES

En esta Tesis de Magister se obtuvo información valiosa para lograr una mejor comprensión del rol que cumple AtA6PR en el metabolismo de Arabidopsis. Para profundizar el conocimiento adquirido en este trabajo, futuros experimentos podrían enfocarse tanto en determinar la actividad de la proteína purificada como en precisar la participación de AtA6PR en el metabolismo de sacáridos.

La primera podría realizarse a través de diversas estrategias, por ejemplo eliminando el epítipo de 6xHis N-terminal para observar la actividad de la proteína nativa, pero para no dificultar su purificación, se debe eliminar el epítipo posterior al paso de purificación de la proteína. En paralelo, se puede intentar resolubilizar AtA6PR desde las fracciones insolubles cuando es producida en *E. coli*. Otra posibilidad consiste en la transformación estable de *N. tabacum* u otro organismo incapaz de sintetizar polioles con AtA6PR bajo un promotor fuerte y constitutivo, para determinar si estos compuestos están siendo formados en la planta y así establecer indirectamente su actividad. Utilizando las mismas técnicas, se puede incluir al producto génico del locus *At2g21260* en estos experimentos para determinar si éste es el responsable de la síntesis de S6P en Arabidopsis.

Para profundizar el conocimiento sobre el rol de AtA6PR en el metabolismo de carbohidratos en Arabidopsis, se pueden utilizar varias aproximaciones. Una de ellas consiste en ampliar los metabolitos examinados en las líneas *ata6pr-1* y *ata6pr-2* para incluir los polioles presentes en esta especie (mezclando técnicas de HPLC con espectrometría de masas y métodos enzimáticos), que también puede realizarse bajo condiciones de estrés diferente al salino (por ejemplo, estrés térmico o por sequía), y ser complementados con la información de los niveles de transcrito. Estos datos pueden ser ampliados si se examina la capacidad de recuperación de las líneas *ata6pr-1* y *ata6pr-2* luego de aplicado el estrés.

Adicionalmente, sería interesante analizar relación entre el estrés, la fotosíntesis y la fluctuación en los niveles de transcrito en 24 hrs. Para ello, sería útil estudiar la secuencia promotora de *AtA6PR*, analizando cajas regulatorias con posible sobrerrepresentación que indiquen específicamente en qué vías de regulación transcripcional se encuentra involucrado este gen. Otra aproximación interesante sería estudiar los niveles de transcritos de diferentes genes de respuesta a estrés en las

líneas *ata6pr-1* y *ata6pr-2*, para estudiar si su expresión también se altera en estas líneas, así como también verificar el aumento de expresión de AtA6PR a nivel de proteína en plantas WT sometidas a estrés. De igual manera, el contar con plantas sobreexpresoras de AtA6PR, permitiría comparar datos de diferentes condiciones de crecimiento con las líneas *ata6pr-1* y *2*, que se podría utilizar para explorar el rol de AtA6PR y el sorbitol como posible molécula señalizadora en el metabolismo de Arabidopsis, obteniéndose una comprensión más profunda de los mecanismos donde participa AtA6PR.

9 BIBLIOGRAFÍA

Aguayo, M. F. 2013. Caracterización bioquímica y rol *in vivo* de AtSDH, una supuesta sorbitol deshidrogenasa de *arabidopsis thaliana*. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas mención Biología Celular, Molecular y Neurociencias. Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Aguayo, M. F.; Ampuero, D.; Mandujano, P.; Parada, R.; Muñoz, R.; Gallart, M.; Altabella, T.; Cabrera, R.; Stange, C.; Handford, M. 2013. Sorbitol dehydrogenase is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 205-206: 63-75.

Ahmad, I., Lahrer, F., Stewart, G. R. 1979. Sorbitol, a compatible osmotic solute in *Plantago maritima*. *New Phytologist* 82(3): 671-678.

Andersen, C. L.; Jensen, J. L.; Ørntoft, T. F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse-transcription PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* 64, 5245-5250.

Alonso, J. M.; Stepanova, A. N.; Leisse, T. J.; Kim, C. J.; Chen, H.; Shinn, P.; Stevenson, D. K.; Zimmerman, J.; Barajas, P.; Cheuk, R.; Gadriab, C.; Heller, C.; Jeske, A.; Koesema, E.; Meyers, C. C.; Parker, H.; Prednis, L.; Ansari, Y.; Choy, N.; Deen, H.; Geralt, M.; Hazari, N.; Hom, E.; Schmid, M.; Weigel, D.; Carter, D. E.; Marchand, T.; Risseuw, E.; Brogden, D.; Zeko, A.; Crosby, W. L.; Berry, C. C. y Ecker J. R. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657.

Banerjee, S., Freankel, D. G. 1972. Glucose 6 phosphate dehydrogenase from *E. coli* and from a "high level" mutant. *Journal of Bacteriology* 110(1): 155-160.

Bantog, N. A., Yamada, K., Niwa, N., Shiratake, 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. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 69 (3): 231-236.

Baulcombe D. C.; Saunders G. R.; Bevan M. W.; Mayo M. A.; y Harrison B. D. 1986. Expression of biologically-active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* 321 (6068): 446-449.

Bellallouie, N.; Brown, P. H.; Dandekar, A. M. 1999. Manipulation of *in Vivo* Sorbitol Production Alters Boron Uptake and Transport in Tobacco. *Plant Physiology* 119: 735-741

Bellallouie, N.; Yadav, R. C.; Chern, M-S.; Hu, H.; Gillen, A.; Grave, C.; Dandekar, A.; Ronald, P.; Brown, P. 2003. Transgenically enhanced sorbitol synthesis facilitates phloem-boron mobility in rice. *Physiologia Plantarum* 117: 79-84.

Bent, A. 2006. *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. En Kan Wang (ed) *Methods in Molecular Biology* 343: 87-104. Humana Press Inc., NJ.

Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* 9: 1055-1066.

Blevins, D. G. y Lukaszewski, K. M. 1998. Boron in plant structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 481-500.

Bohren, K. M., Page, J. L., Shankar, R., Henry, S. P., Gabbay K. H. 1991. Expression of Human Aldose and Aldehyde Reductases. *Journal of Biological Chemistry* 266(35): 24031-24037.

- Brown, P. H., Bellaloui, N., Hu, H., Dandekar, A. M. 1999. Transgenically Enhanced Sorbitol Synthesis Facilitates Phloem Boron Transport and Increases Tolerance to Tobacco to Boron Deficiency. *Plant Physiology* 119: 17-20.
- Cheng, L., Zhou, R., Reidel, E. J., Sharkey, T. D., Dandekar, A. M. 2005. Antisense inhibition of sorbitol synthesis leads to up-regulation of starch synthesis without altering CO₂ assimilation in apple leaves. *Planta* 220: 767-776.
- Christie, P. J., Hahn, M., Walbot, V. 1991. Low-Temperature Accumulation of Alcohol Dehydrogenase-1 mRNA and Protein Activity in Maize and Rice Seedlings. *Plant Physiology* 95(3): 699-706.
- Czechowski, T.; Stitt, M.; Altmann, T.; Udvardi, M. K. y Scheible, W-R. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139: 15-17.
- Daniell, H.; Streatfield, S.; Wycoff, K. 2001. Medical Molecular Farming: Production of Antibodies, Biopharmaceuticals and Edible Vaccines in Plants. *TRENDS in Plant Science*, 6(5): 219-226.
- Deguchi, M., Watanabe, M., Kanayama, Y. 2002. Increase in Sorbitol Biosynthesis in Stressed Japanese Pear Leaves. *Acta Horticulturae* 587: 512-517.
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Everard, J. D.; Cantini, C.; Crumet, R.; Plummer, J.; Loescher W. H. 1997. Molecular cloning of Mannose 6P reductase and its developmental Expression in Celery. *Plant Physiology* 11(3): 1427-1435.
- Fagard, M.; Vaucheret, H. 2000. (Trans)Gene silencing in plants: How many mechanisms?. *Annual Review of plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 167-194.
- Feldmann, K.; Coury, D.; Christianson, M. 1997. Exceptional Segregation of Selectable Marker (Kan^R) in Arabidopsis Identifies Genes Important for Gametophytic Growth and Development. *Genetics* 147: 1411-1422.
- Feng, X.; Zhao, P.; Hao, J.; Hu, J.; Kang, D.; Wang, H. 2011. Effects of sorbitol on expression of genes involved in regeneration of upland rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 106: 455-463.
- Figueroa, C. M. e Iglesias, A. 2010. Aldose-6-phosphate reductase from apple leaves: Importance of the quaternary structure for enzyme activity. *Biochimie* 92: 81-88.
- Fischer, R.; Stoger, E.; Schillberg, S.; Christou, P.; Twyman, P. 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:152-158.
- Gao, M., Tao, R., Miura, K., Dandekar, A. M., Sugiura A. 2001. Transformation of Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant Science* 160: 837-845.
- Galpaz, N. y Reymond, M. 2010. Natural variation in *Arabidopsis thaliana* revealed a genetic network controlling germination under salt stress. *PLOS ONE* 5(12): e15198.
- Gibeaut, D. M.; Hulett, J.; Cramer, G. R. y Seeman, J. R. 1997. Maximal Biomass of *Arabidopsis thaliana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. *Plant Physiology* 115: 317-319.
- Graf, A.; Schlereth, A.; Stitt, M.; Smith, A. 2010. Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. *Proceedings of the National Academy of Science* 107(20): 9458-9463.

- Hamaji, K.; Nagira, M.; Yoshida, K.; Ohnishi, M.; Oda, Y.; Uemura, T.; Goh, T.; Sato, M.; Morita, M. T.; Tasaka, M.; Hasezawa, S.-i.; Nakano, A.; Hara-Nishimura, I.; Maeshima, M.; Fukaki, H. y Mimura, T. 2009. Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 50(12): 2023-2033.
- Haritatos, E., Medville, R., Turgeon, R. 2000. Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211: 105-111.
- Haydon, M.; Mielczarek, O.; Robertson, O.; Hubbard, K.; Webb, A. 2013. Photosynthetic entrainment of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Nature* 502, 689-692.
- Hincha, D. K. y Hagemann, M. 2004. Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochemical Journal* 383: 277-283.
- Hirai, M. 1981. Purification and characteristics of sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from loquat leaves. *Plant Physiology* 67:221-224.
- Jarillo, J. A., Leyva, A., Salinas, J., Martínez-Zapater, J. M. 1993. Low Temperature Induces the Accumulation of Alcohol Dehydrogenase mRNA in *Arabidopsis thaliana*, a Chilling-Tolerant Plant. *Plant Physiology* 101: 833-837.
- Joosen, R.V.L.; Arends, D.; Willems, L. A. J.; Ligterink, W.; Jansen, R. C.; Hilhorst, H. W. M. 2012. Visualizing the genetic landscape of *Arabidopsis* seed performance. *Plant Physiology*, 158(2): 570-589.
- Kanamaru, N., Ito, Y., Komori, S., Saito, M., Kato, H., Takahashi, S., Omura, M., Soejima, J., Shiratake, K., Yamada, K., Yamaki, S. 2004. Transgenic apple transformed by sorbitol-6-phosphate dehydrogenase cDNA switch between sorbitol and sucrose supply due to its gene expression. *Plant Science* 167: 55-61.
- Kanayama, Y.; Yamaki, S. 1993. Purification and properties of NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from apple seedlings. *Plant Cell Physiology*, 34(6): 819-823.
- Kanayama, Y., Odanaka, S. 2000. Biochemistry and Genetic Engineering of sugar Metabolism in Fruit. *Tohoku Journal of Agricultural Reserach* 51(1-2): 7-14.
- Kanayama, Y.; Moriguchi, R.; Deguchi, M.; Kanahama, K.; Yamaki, S. 2007. Effects of Environmental Stresses and Abscisic Acid on Sorbitol-6-phosphate Dehydrogenase Expression in Rosaceae Fruit Trees. *Acta Horticulturae* 738: 375-382.
- Kanayama, Y. 2009. Physiological roles of polyols in horticultural crops. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 78(2): 158-168.
- Kaplan, F.; Kopka, J.; Haskell, D. W.; Zhao, W.; Schiller, K. C.; Gatzke, N.; Sung, D. Y. y Guy, C. L. 2004. Exploring the Temperature-Stress Metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136: 4159-4168.
- Karimi, M.; Inzé D. y Depicker, A. 2002. GATEWAY™ Vectors for Agrobacterium-mediated Plant Transformation. *TRENDS in Plant Science*, 7(5): 193-195.
- Kilian, J.; Whitehead, D.; Horak, J.; Wanke, D.; Weinl, S.; Batistic, O.; D'Angelo, C.; Bornberg-Bauer, E.; Kudla, J. y Harter, K. 2007. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant Journal* 50: 347-363.
- Kim, H.-Y., Ahn, J. H., Choi, J.-H., Hwang, B. Choi, D.-W., 2007. Expression and cloning of the full-length cDNA for sorbitol 6-phosphate dehydrogenase and NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from pear. *Scientia Horticulturae* 112: 406-412.

- Krasensky, J.; Jonak, C. 2012. Drought, salt and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63(4):1593-1608.
- Lewis, D. H., Smith, D. C. 1967. Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants I: Distribution, physiology and metabolism. *New Phytologist* 66(2):143-184
- Li, F.; Lei, H.; Zhao, X.; Tian, R.; Li, T. 2012. Characterization of three sorbitol transporter genes in micropropagated apple plants grown under drought stress. *Plant Molecular Biology Reporter* 30: 123-130.
- Liang, D.; Cui, M.; Wu, S.; Ma, F-w. 2012. Genomic structure, sub-cellular localization, and promoter analysis of the gene encoding sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from apple. *Plant Molecular Biology Reporter* 30(4): 904-914.
- Lo Bianco, R., Rieger, M., Sung S-J. 2000. Effect of drought on sorbitol and sucrose metabolism in sink and sources of peach. *Physiologia Plantarum* 108: 71-78.
- Maier, A.; Fahnenstich, H.; von Caemmerer, S.; Engqvist, M.; Weber, A.; Flügge, U.-I.; Maurino, V. 2012. Transgenic introduction of a glycolate oxidative cycle into *A. thaliana* chloroplasts leads to growth improvement. *Frontiers in Plant Science* 3(38) doi: 10.3389/fpls.2012.00038.
- Matsumoto, T. 2008. *Phytochemistry Research Progress*. Ed. Nova; Capitulo 4: 75-82.
- Morais de Sousa, S., Paniago, M.d.G., Arruda, P., Yunes, J. A., 2008. Sugar levels modulate sorbitol dehydrogenase expression in maize. *Plant Molecular Biology* 68: 203-213.
- Miranda, P. 2009. Desarrollo de herramientas para el estudio del rol de GONST3, un transportador de nucleótidos-azúcar de *Arabidopsis thaliana*. Seminario de título para Ingeniería en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile, Santiago. Chile.
- Msanne, J.; Lin, J.; Stone, J.; Awada, T. 2011. Characterization of abiotic stress-responsive *Arabidopsis thaliana* RD29A and RD29B genes and evaluation of transgenes. *Planta* 234: 97-107.
- Negm, F. B., Loescher, W. H. 1981. Characterization and Partial Purification of Aldose-6-phosphate Reductase (Alditol-6-phosphate:NADP 1-Oxidoreductase) from Apple Leaves. *Plant Physiology* 67:139-142.
- Nosarzewski, M.; Downie, A. B.; Wu, B.; Archbold, D. 2012. The role of sorbitol dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology* 39: 462-470.
- Oberschall, A.; Deák, M.; Török, K.; Sass, L.; Vass, I.; Kovács, I.; Fehér, A.; Dudits, D. y Horváth, G. 2000. A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. *The Plant Journal*, 24(4): 437-446.
- Ohkawa, W., Moriya, S., Kanahama, K., Kanayama, Y. 2008. Re-Evaluation of Sorbitol Metabolism in Fruit from *Rosaceae* Trees. *Acta Horticulturae*; 772: 159-166.
- Ohta, K., Moriguchi, R., Kanahama, K., Yamaki, S., Kanayama Y. 2005. Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-*Rosaceae* plant. *Phytochemistry* 66: 2822-2828.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(1): 2002-2007.
- Pommerrenig, B., Papini-Terzi, F. S., Sauer N. 2007. Differential Regulation of Sorbitol and Sucrose Loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. *Plant Physiology* 144: 1029-1038.
- Rekarte-Cowie, I.; Ebshish, O.; Mohamed, K.; Pearce, R. 2008. Sucrose helps regulate cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 59(15): 4205-4217.

- Reidel, E. J.; Rennie, E. A.; Amiard, V.; Cheng, L.; Turgeon, R. 2009. Phloem loading strategies in plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiology* 149:1601-1608.
- Romeis, T.; Ludwig, A.; Martin, R.; Jones, J. 2001. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *The EMBO Journal* 20(20): 5556-5567.
- Rosa, M.; Prado, M.; Podazza, G.; Internodato, R.; Gonzalez, J. A.; Hilal, M.; Prado, F. 2009. Soluble sugars – Metabolism, sensing and abiotic stress. *Plant Signaling and behavior* 4(5): 388-393.
- Ruiz, K. B.; Baroni, R.; Tassoni, A.; Bagni, N. 2007. Identification of two phenotypes of *Arabidopsis thaliana* under *in vitro* salt stress conditions. *Biologia Plantarum* 51(3):436-442.
- Sakanishi, K.; Kanayama, Y.; Mori, H.; Yamada, K.; Yamaki, S. 1998. Expression of the Gene for NADP-Dependent Sorbitol-6-phosphate Dehydrogenase in Peach Leaves of Various Developmental Stages. *Plant Cell Physiology* 39(12): 1372-1374.
- Schmid, M.; Davison, T. S.; Henz, S. R.; Pape, U. T.; Demar, M.; Vingron, M.; Schölkopf, V.; Weigel, D. y Lohmann J. U. 2005. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature genetics*, 37(5):501-506.
- Schomburg, I.; Chang, A.; Hofmann, O.; Ebeling, C.; Ehrentreich, F.; Schomburg, D. 2002. BRENDA: a resource ofr enzyme data and metabolic information. *Trends in Biochemical Sciences* 27(1): 54-56.
- Sheludko, Y. V.; Sindarovska, Y.R.; Gerasymenko, I.M.; Bannikova, M.A.; Kuchuk, N.V. 2007. Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium* mediated transient expression. *Biotechnology and Bioengineering* 96(3): 608-614.
- Sheveleva, E. V., Marquez, S., Chmara, W., Zegeer, A., Jensen, R. G., Bohnert, H. J. 1998. Sorbitol-6-Phosphate Dehydrogenase Expression in Transgenic Tobacco. *Plant Physiology* 117: 831–839
- Simpson, P. J.; Tantitadapitak, C., Reed, A. M.; Mather, O. C.; Bunce, C. V.; White, S. A.; Ride, J. P. 2009. Characterization of two novel aldo-keto reductases from arabidopsis: expression patterns, broad substrate specificity, and an open active-site structure suggest a role in toxicant metabolism following stress. *Journal of Molecular Biology* 392: 465-480.
- Sparkes, I.; Runions, J.; Kearns, A.; Hawes, C. 2006. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols* 1(4): 2019-2025.
- Strand, A.; Hurry, V.; Gustafsson, P.; Gardeström, P. 1997. Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates. *The Plant Journal*, 12(3): 605-614.
- Tao R.; Uratsu, S. y Dandekar, A. (1995). Sorbitol synthesys in transgenic tobacco with apple cDNA encoding NADP-dependent Sorbitol-6-Phosphate Dehydrogenase. *Plant Cell Physiology* 36(3): 525-532.
- Taravati, A.; Shokrzadeh, M.; Ebadi, A. G.; Valipour, P.; Hassan, A. T. M. y Farrokhi, F. 2007. Various effects of sugar and polyols on the protein structure and function: Role as osmolyte in protein stability. *World Applied Sciences Journal* 2 (4): 353-362.
- Tari, I.; Kiss, G.; Deér, A. K.; Csiszar, J.; Erdei, L.; Gallé, A.; Gémes, K.; Horváth, F.; Poór, P.; Szepesi, Á.; Simon, L. M. 2010. Salicylic acid increased aldose reductase activity and sorbitol accumulation in tomato plants under salt stress. *Biologia Plantarum* 54(4): 677-683.
- Teo, G.; Suzuki, Y., Uratsu, S., Lampinen, B., Ormonde, N., Hu, W. K., DeJong, T. M., Dandekar, A. M. 2006. Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(49): 18842–18847

Vaucheret, H; Fagard, M. 2001. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *TRENDS in Genetics* 17(1): 29-35.

Veeranagamallaiyah, G.; Ranganayakulu, G. S.; Thippeswamy, M.; Sivakumar, M.; Reddy, K. E., Pandurangaiah, M., Sridevi, V., Sudhakar, C. 2009. Aldose reductase expression contributes in sorbitol accumulation and 4-hydroxynon-2-enal detoxification in two foxtail millet (*Setaria italica* L.) cultivars with different salt stress tolerance. *Plant Growth Regul.* 59: 137-143.

Watari, J., Kobae, Y., Yamaki, S., Yamada, K., Toyofuku, K., Tabuchi, T. y Shiratake, K. 2004. Identification of Sorbitol Transporters Expressed in Phloem of Apple Source Leaves. *Plant Cell Physiology* 45(8): 1032-1041.

Winter D.; Vinegar B., Nahal H.; Ammar, R.; Wilson G. V. y Provart, N. 2007. An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLOS ONE* 2(8): e718

Wurman, J. 2012. Generación de un anticuerpo para el estudio de AtA6PR, una enzima involucrada en el metabolismo de sorbitol en *Arabidopsis thaliana*. Seminario de título para Ingeniería en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile, Santiago. Chile.

Wydro, M.; Kozubek, E.; Lehmann, P. 2006. Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochimica Polonica* 53(2): 289-298.

Yamaki, S. 1981. Subcellular localization of sorbitol-6-phosphate dehydrogenase in protoplast from apple cotyledons. *Plant and Cell Physiology* 22(3): 359-367.

Yamaki, S. 1984. NADP⁺ dependent sorbitol dehydrogenase found in apple leaves. *Plant Cell Physiology* 25(7): 1323-1327.

Yamaki, S. 1995. Physiology and metabolism of fruit development. *Acta Horticulturae* 398: 109-120.

Zamudio, M. 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, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Zhou, R., Cheng, L., Dandekar, A. M. 2006. Down-regulation of sorbitol dehydrogenase and up-regulation of sucrose synthase in shoot tips of the transgenic apple trees with decreased sorbitol synthesis. *J. Exp. Botany* 57(14): 3647-3657.

Zhou R.; Sicher, R.; Cheng, L.; Quebedeaux, B. 2003. Regulation of apple leaf aldose-6-phosphate reductase by inorganic phosphate and divalent cations. *Functional Plant Biology* 30: 1037-1043.

Zhu, J-K. 2000. Genetic analyses of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124: 941-948.

Sitios web:

<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>

<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>

<http://signal.salk.edu/>