

UCH-FC  
MAG-B  
M672  
C-1

***Estudio de la función de las lipoil sintasas SILIP1  
y SILIP1p mediante su sobre-expresión en  
tomate.***

**Tesis**

**Entregada a La  
Universidad de Chile  
En cumplimiento parcial de los requisitos  
Para optar al grado de**

**Magíster en Ciencias Biológicas**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Simón David Miranda Chávez**

**Enero, 2017**

**Director de Tesis Dr: Michael Handford**

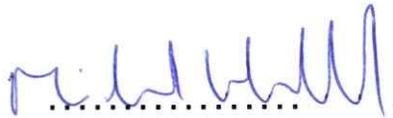
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE MAGÍSTER**

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

**Simón David Miranda Chávez**

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 12 de diciembre de 2016.

Director de Tesis:  
**Dr. Michael Handford**



.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

**Dr. Ricardo Cabrera (P)**



.....

**Dr. Lee Meisel**

*«Ayer fue yesterday  
para buenos colonos  
mas por fortuna nuestro  
mañana no es tomorrow*

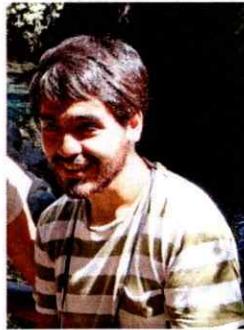
*Tengo un mañana que es mío  
y un mañana que es de todos  
el mío acaba mañana  
pero sobrevive el otro.»*

*"Digamos", Mario Benedetti.*

## BIOGRAFÍA

*«When I read the book, the biography famous,  
and is this, then, (said I,) what the author calls a man's life?  
And so will someone, when I am dead and gone, write my life?  
(As if any man really knew aught of my life;  
Why, even I myself, often think, know little or nothing of my real life;  
Only a few hints –a few diffused, faint clues and indirections,  
I seek, for my own use, to trace out here.)»*

Walt Whitman, *Leaves of Grass*, 1900.



Me resulta difícil hablar de mí autobiográficamente, y no quisiera caer en la descripción cronológica habitual. Quisiera más bien puntualizar los hitos más relevantes que, pese a mi falta de memoria, tengo patentes como eventos decisivos en mi vida y que no son fechas e instituciones, sino las personas que han llenado mi vida. En primer lugar, la constante presencia de mis padres y hermanos durante mis 26 años, que fue imprescindible para mi formación personal, no meramente como estudiante de enseñanza básica, media y universitaria –que es, en mi opinión, un proceso que deviene casi como precepto social y que me parece más propio de registrar en un currículum que en una biografía–, sino, fundamentalmente, como individuo frente a la vida. Luego, la aparición repentina de mi sobrina, quizás la única de una siguiente generación de mi familia, que ha girado en muchos sentidos la dirección que llevábamos, enriqueciendo la vida de todos quienes hemos tenido la suerte de tenerla, cuidarla y aprender de ella. Por último, no sé bien quién sería o dónde estaría si no fuera por Jorge, quien ha sido no sólo mi pilar por casi seis años, sino porque ha sido un compañero de vida, un mentor en mi formación profesional, y más importante para mí, quien me ha enseñado lo poco que sé de las relaciones personales.

## AGRADECIMIENTOS

Sería demasiado extensa la lista si escribiera a cada una de las personas a las que agradezco. Sin embargo, hay algunas que deseo estén en el registro escrito, más duradero que las palabras dichas y que suelen ni siquiera aproximarse a lo que quisiera decirles. En primer lugar, a mis padres Myriam Chávez y Juan Miranda, quienes han sabido formarme como persona frente a la vida. Agradezco profundamente su incondicional apoyo, sobretodo en los momentos donde preferí tomar un rumbo distinto al usual que estoy seguro los hirió profundamente. Admiro su entrega y dedicación, así como la capacidad que han tenido durante toda su vida de dejarnos en una posición mejor que las que ellos vivieron, y agradezco fundamentalmente el que nos hayan permitido ser libres, porque estoy seguro que no se han equivocado en formarnos como lo han hecho.

Agradezco también a mis hermanos: Francisca, Amaranta y Esteban. Cada uno ha contribuido desde sus propias vivencias y sus propias personalidades a formarme, y muchas veces noto actitudes y cualidades que quisiera yo tener y que a ustedes les resultan tan naturales. Agradezco su tolerancia y los momentos que he compartido con ustedes, porque han hecho de mi vida un proceso más alegre, rico en experiencias y momentos especiales. Del mismo modo, agradezco especialmente la existencia de Violeta, mi sobrina. Probablemente aún no sepa y claramente no lo dimensiona, pero ha sido el eje de nuestras vidas en lo que lleva de la suya.

Aunque probablemente preferiría pasar desapercibido en esta sección, agradezco profundamente a Jorge, quien ha sido mi pareja y mi compañero de vida. Puedo dar fe, después de casi seis años juntos, de que eres la persona con la que quiero seguir creciendo y compartiendo una historia en común, y estoy seguro de que nos iremos renovando cuando sea necesario para mantener la relación viva. Has sido indispensable para mí, y confío en que algo he aportado yo a tu propia vida. Admiro tus habilidades y me enorgullece ser tu pareja, y agradezco tu infinita paciencia hasta en las cosas más mínimas, aunque me esmero en mejorar en mis torpes atributos sociales. Como un hallazgo juntos y por coincidencias de la vida, nos topamos con Bárbara: eres una persona admirable, muy autocrítica, y que no reconoce las muchas virtudes y aptitudes que me encantaría tener. Muchas gracias por todo, y tú sabes bien que *todo* es muy amplio, porque no se limita sólo a las horas juntos en el laboratorio. Tal como dices siempre, te gusta regalar experiencias, y quizás no hayas notado que nos has regalado la tuya.

Agradezco además a todos mis amigos de Universidad: Laura, Osmán, Nicolás, Natalia, Rocío, Mary, César, Felipe, Soffa y Roberto. También a mis recuperados amigos del colegio: Gonzalo, Daniel, Nicolás, Carlos.

Agradezco a todas las personas de mi formación académica: Koke, Analía, Angélica, Kari, Pame, y a todos los integrantes del CBMV. Asimismo, a Drs. Michael Handford, Lee Meisel, Ricardo Cabrera e incluso a CONICYT, por permitirme llevar a cabo esta tesis.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VIII
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT .....	XII
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. ESTRÉS ABIÓTICO Y RESPUESTA EN PLANTAS.....	1
1.2. ESTRATEGIAS GENÉTICAS PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA A ESTRÉS.....	2
1.3. ÁCIDO LIPOICO Y SU BIOSÍNTESIS.....	4
1.4. ÁCIDO LIPOICO Y SU ROL EN DISTINTOS TIPOS DE ESTRÉS .....	7
1.5. GENES LIPOIL SINTASAS EN <i>S. LYCOPERSICUM</i> .....	10
1.6. ESTRATEGIA DESARROLLADA .....	11
1.7. HIPÓTESIS .....	13
1.8. OBJETIVO GENERAL.....	13
1.9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	14
2.1.1. <i>Cultivo de bacterias</i> .....	14
2.1.2. <i>Transformación de bacterias</i> .....	14
2.1.3. <i>Crecimiento de Nicotiana tabacum y Solanum lycopersicum</i> .....	17
2.2. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	18
2.2.1. <i>Estrategia de clonación</i> .....	18
2.2.1.1. <i>Diseño de partidores</i> .....	20
2.2.1.2. <i>Programas de PCR para clonación</i> .....	22
2.2.1.3. <i>Electroforesis en geles de agarosa</i> .....	25
2.2.1.4. <i>Purificación de ADN desde bandas de gel de agarosa</i> .....	26
2.2.1.5. <i>Purificación de ADN plasmidial</i> .....	26
2.2.1.6. <i>Cuantificación de ácidos nucleicos</i> .....	27
2.2.1.7. <i>Generación de vectores de entrada portadores de los genes de interés para análisis en bacterias y plantas</i> .....	28
2.2.1.8. <i>Generación de vectores de expresión portadores de los genes de interés para análisis en bacterias y plantas</i> .....	29
2.2.2. <i>Transformación de plantas</i> .....	30
2.3. ANÁLISIS.....	34
2.3.1. <i>Análisis en bacterias:</i> .....	34
2.3.2. <i>Análisis en plantas:</i> .....	41
2.3.3. <i>Análisis estadísticos</i> .....	50

<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
3.1. DETERMINAR LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA DEL PRODUCTO GÉNICO DE <i>SLLIP1P</i> EN <i>E. COLI</i> MUTANTE <i>LIPA KER176</i> Y DETERMINAR SU LOCALIZACIÓN SUBCELULAR EN <i>N. TABACUM</i> .....	51
3.1.1. <i>Obtención de vectores de expresión en bacterias</i> .....	51
3.1.2. DETERMINACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA DE <i>SLLIP1P</i> EN <i>E. COLI LIPA KER17654</i>	
3.1.3. <i>Obtención de vectores de expresión en plantas</i> .....	57
3.1.4. DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE <i>SLLIP1P</i> EN <i>N. TABACUM</i> .....	58
3.2. OBTENER LÍNEAS DE PLANTAS DE TOMATE QUE SOBRE-EXPRESEN <i>SLLIP1</i> O <i>SLLIP1P</i> Y ANALIZAR FENOTÍPICA Y MOLECULARMENTE LAS LÍNEAS TRANSFORMADAS ESTABLEMENTE.....	60
3.2.1. <i>Transformación estable de S. lycopersicum cv. Micro-tom con pGWB8-AtLIP1, SILIP1, SILIP1p y control</i> .....	60
3.2.2. <i>Verificación de la expresión transitoria de los constructos 35S::AtLIP1-His, 35S::SILIP1p-His y 35S::SILIP1-His</i> .....	60
3.2.3. <i>Obtención y análisis de las líneas T0 de S. lycopersicum regeneradas para los constructos AtLIP1-His, SILIP1p-His, SILIP1-His</i> .....	62
3.3. REALIZAR ANÁLISIS DE LIPOILACIÓN DE PROTEÍNAS BLANCO Y DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LÍNEAS DE TOMATE TRANSFORMADAS ESTABLEMENTE CON <i>SLLIP1</i> O <i>SLLIP1P</i> .....	65
3.3.1. <i>Evaluación de los niveles de expresión de los genes de interés en líneas T0 regeneradas</i> .....	65
3.3.2. ANÁLISIS DE LIPOILACIÓN DE PROTEÍNAS BLANCO EN LÍNEAS T0 DE <i>S. LYCOPERSICUM</i> ATLIP1-HIS Y SLLIP1-HIS .....	69
3.3.3. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE GENES BLANCOS DEL ÁCIDO LIPOICO Y DE AQUELLOS INVOLUCRADOS EN SU BIOSÍNTESIS.....	71
<b>4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>74</b>
4.1. DETERMINAR LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA DEL PRODUCTO GÉNICO DE <i>SLLIP1P</i> EN <i>E. COLI</i> MUTANTE <i>LIPA KER176</i> .....	74
4.2. DETERMINAR LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DEL PRODUCTO GÉNICO DE <i>SLLIP1P</i> EN <i>N. TABACUM</i> .....	76
4.3. OBTENER LÍNEAS DE PLANTAS DE TOMATE QUE SOBRE-EXPRESEN <i>SLLIP1</i> O <i>SLLIP1P</i> Y ANALIZAR FENOTÍPICA Y MOLECULARMENTE LAS LÍNEAS TRANSFORMADAS ESTABLEMENTE.....	78
4.4. REALIZAR ANÁLISIS DE LIPOILACIÓN DE PROTEÍNAS BLANCO Y DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LÍNEAS DE TOMATE TRANSFORMADAS ESTABLEMENTE CON <i>SLLIP1</i> O <i>SLLIP1P</i> .....	82
<b>5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....</b>	<b>88</b>
<b>6. ANEXOS .....</b>	<b>91</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>98</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Partidores utilizados para los pasos de clonación y análisis molecular de plantas transformantes.....	26
<b>Tabla II.</b> Programas de PCR realizados para clonación y análisis molecular de plantas.....	29
<b>Tabla III.</b> Partidores utilizados para análisis de líneas T0 regeneradas durante la tesis.....	52
<b>Tabla IV.</b> Resumen de las líneas T0 obtenidas de la transformación estable de <i>S. lycopersicum</i> con pGWB8-AtLIP1, SILIP1p, SILIP1 y control.....	68
<b>Tabla V.</b> Mediciones de parámetros fenotípicos en las líneas T0 transgénicas de tomate obtenidas.....	73
<b>Tabla SI.</b> Partidores utilizados para la amplificación de <i>HPT</i> y <i>LAT52</i> para determinar el número de copias de líneas T0 transgénicas.....	97
<b>Tabla SII.</b> Datos requeridos para la generación de la curva de número de copias.....	99
<b>Tabla SIII.</b> Determinación del número de copias de <i>HPT</i> en líneas T0 transgénicas.....	100
<b>Tablas SIV.</b> Resumen de parámetros estadísticos de colocalización obtenidos para el constructo SILIP1p-EYFP.....	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de síntesis del ácido lipoico.....	11
Figura 2. Esquema de las distintos vectores de expresión en bacterias y plantas.....	24
Figura 3. Clonación de los fragmentos de interés <i>AtLIP1Δ18</i> y <i>SILIP1pΔ110</i> en pCR <sup>TM</sup> 8/GW/TOPO®.....	56
Figura 4. Análisis de restricción de pCR <sup>TM</sup> 8/GW/TOPO®- <i>AtLIP1Δ18</i> y - <i>SILIP1pΔ110</i> .....	57
Figura 5. Análisis de restricción de los vectores de expresión pDEST-His <sub>6</sub> MBP- <i>AtLIP1Δ18</i> , - <i>SILIP1Δ30</i> y - <i>SILIP1pΔ110</i> .....	58
Figura 6. Diagrama del ciclo de ácidos tricarbóxicos.....	59
Figura 7. Detección de las proteínas de fusión His <sub>6</sub> MBP - <i>AtLIP1Δ18</i> , - <i>SILIP1Δ30</i> , - <i>SILIP1pΔ110</i> y -FcCYS en <i>E. coli lipA</i> KER176.....	60
Figura 8. Ensayo de complementación de <i>E. coli lipA</i> KER176 con proteínas LIP1 de origen vegetal.....	61
Figura 9. Clonación de <i>SILIP1p</i> en vectores de expresión en plantas.....	63
Figura 10. Determinación de la localización subcelular de <i>SILIP1p</i> en <i>N. tabacum</i> .....	64
Figura 11. Expresión transitoria de transgenes <i>AtLIP1-His</i> , <i>SILIP1-His</i> y <i>SILIP1p-His</i> en <i>N. tabacum</i> .....	66
Figura 12. Proceso de transformación estable de <i>S. lycopersicum</i> .....	67
Figura 13. Identificación de líneas de <i>S. lycopersicum</i> cv. Micro-tom T0 transformadas para los distintos constructos de interés.....	69
Figura 14. Análisis de expresión relativa de <i>AtLIP1</i> y <i>SILIP1</i> en líneas T0 transgénicas de tomate para constructos 35S- <i>AtLIP1-His</i> y 35S- <i>SILIP1-His</i> .....	71
Figura 15. Fenotipo de líneas T0 transgénicas de tomate con 35S- <i>AtLIP1-His</i> o 35S- <i>SILIP1-His</i> .....	72
Figura 16. Inmunodetección de <i>AtLIP1-His</i> y <i>SILIP1-His</i> en líneas T0 transgénicas de tomate con dichos constructos de interés.....	75
Figura 17. Análisis de lipoilación de las plantas T0 transgénicas de tomate seleccionadas.....	76
Figura 18. Análisis de expresión relativa de <i>E2 KGDH</i> , <i>E2 PDHm</i> y <i>E2 PDHc</i> en líneas T0 transgénicas de tomate para constructos 35S- <i>AtLIP1-His</i> y 35S- <i>SILIP1-His</i> .....	77
Figura 19. Análisis de expresión relativa de <i>SILIP2</i> , <i>SILpIA</i> y <i>SISAM1</i> en líneas T0 transgénicas para constructos 35S- <i>AtLIP1-His</i> y 35S- <i>SILIP1-His</i> .....	78
Figura S1. Clonación del fragmento de interés <i>SILIP1Δ30</i> en pCR <sup>TM</sup> 8/GW/TOPO®.....	96
Figura S2. Histograma 2D de intensidad de píxeles para análisis cuantitativo de colocación del constructo <i>SILIP1p-EYFP</i> .....	101

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

-p	plastidial	LB	lysogenic broth
°C	grados Celsius	LIP1	lipoil sintasa
% m/v	porcentaje masa/volumen	LIP2	lipoil transferasa
% v/v	porcentaje volumen/volumen	<i>lipA</i>	mutante lipoil sintasa
~	aproximadamente	LplA	lipoil ligasa
ACP	proteína portadora de acilo	m	metro
ADHL	ácido dihidrolipoico	mL	mililitro
ADN	ácido desoxirribonucleico	MME	medio mínimo E
ADNc	ADN complementario	MOPS	ácido 3-(N-morfolino)
ADNg	ADN genómico		propanosulfónico
AL	ácido lipoico	MS	medio Murashige & Skoog
AoDH	acetoina deshidrogenasa	MW	marcador peso molecular
APS	amonio persulfato	NAA	ácido naftalenacético
ARN	ácido ribonucleico	NBT	tetrazolio nitro azul
ATP	adenosín trifosfato	OD <sub>562</sub>	densidad óptica a 562 nm
BCA	ácido bicincónico	OD <sub>595</sub>	densidad óptica a 595 nm
BCDH	$\alpha$ -cetogluturato	OD <sub>600</sub>	densidad óptica a 600 nm
	deshidrogenasa de cadena	PAGE	gel electroforesis de
	ramificada		poliacrilamida
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil	pb	pares de base
	fosfato	PCR	Reacción en Cadena de la
BSA	albúmina de suero bovino		Polimerasa
cm	centímetro	PDH	piruvato deshidrogenasa
CN/DAB	cloronaftol/diaminobencidina	qRT-PCR	reacción de la transcriptasa
Da	Dalton		reversa acoplada a PCR
dNTP	desoxinucleótido		cuantitativo en tiempo real
dpi	días post-infiltración	RB	Rich Broth
DTT	ditiotreitól	rpm	revoluciones por minuto
EDTA	ácido etilendiamino	RT-PCR	reacción de la transcriptasa
	tetraacético		reversa acoplada a PCR
EV	vector vacío	s	segundos
EYFP	proteína fluorescente amarilla	S.O.C.	caldo superóptimo
GDC	glicina descarboxilasa	SDS	dodecilsulfato de sodio
h	hora	TEMED	tetrametiletlenodiamina
HRP	peroxidasa de rábano picante	<i>T<sub>m</sub></i>	temperatura alineamiento
IgG	inmunoglobulina G	Tris	tris(hidroximetil) aminometano
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-1-	U	unidad enzimática
	tiogalactopiranosido	UV	ultravioleta
k-	kilo-	V	voltio
kb	kilobase	$\mu$ L	microlitro
kGDH	$\alpha$ -cetogluturato		
	deshidrogenasa		

## RESUMEN

Los diferentes tipos de estrés abiótico constituyen serias amenazas para la agricultura. En plantas, estos estrés convergen en un aumento en especies reactivas de oxígeno, y para reducir el efecto dañino de este estrés oxidativo, las plantas responden mediante mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de este último grupo, se han utilizado estrategias de ingeniería genética para otorgar tolerancia a estrés abiótico, entre otras formas, mediante el aumento de moléculas antioxidantes como antocianinas y carotenoides. Particularmente, esta tesis de magister se centra en el estudio del metabolismo del ácido lipoico, molécula que presenta una serie de ventajas respecto a otros antioxidantes y usado en la industria farmacéutica como un suplemento alimenticio.

En plantas, se ha estudiado el vínculo entre ácido lipoico y diferentes tipos de estrés abiótico. Además, se han identificado las enzimas participantes de su biosíntesis principalmente en *Arabidopsis thaliana*. Así, se sabe que el ácido lipoico es sintetizado y unido covalentemente a proteínas blanco (lipoilación) en mitocondrias mediante una vía de reciclaje, donde participa una lipoil ligasa (AtLplA) y una vía *de novo*, en la que participan una lipoil transferasa (AtLIP2) y una lipoil sintasa (AtLIP1). Sin embargo, el ácido lipoico también es sintetizado en cloroplastos, donde sólo se han identificado las isoformas plastidiales de la vía *de novo*, esto es, dos lipoil transferasas plastidiales (AtLIP2p1 y AtLIP2p2) y una lipoil sintasa plastidial (AtLIP1p). Entre otras, las proteínas blanco (lipoiladas) son las subunidades E2 de los complejos piruvato deshidrogenasa y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, participantes del ciclo de ácidos tricarbóxicos, donde el ácido lipoico cumple el rol de activar a la subunidad E2 al transacetilar a la coenzima A y regenerar la subunidad E3 al reducir a su propio cofactor.

Con la proyección a largo plazo de obtener plantas funcionales con mayor

contenido de ácido lipoico, se eligió el modelo de tomate (*Solanum lycopersicum*), ya sea con el fin de ser utilizado como alimento funcional o para otorgar mayor tolerancia a estrés abiótico. *S. lycopersicum* posee genes denominados *SILIP1* y *SILIP1p*, que codifican respectivamente para supuestas lipoil sintasas mitocondrial y cloroplastidial. En este contexto, la presente tesis de magíster se enfocó en caracterizar funcionalmente la isoforma plastidial (en paralelo al estudio de la isoforma mitocondrial, tesis doctoral Jorge Araya) y en generar líneas transgénicas de tomate que sobre-expresaran ambos genes, con el fin de estudiar su rol de lipoil sintasas al evaluar los efectos fenotípicos y moleculares derivados de su sobre-expresión.

A partir de los resultados obtenidos, se determinó que *SILIP1p* efectivamente se comporta como lipoil sintasa, al complementar funcionalmente a *Escherichia coli* mutante en el gen que codifica para la enzima ortóloga, *lipA*. Además, se verificó por microscopía confocal que *SILIP1p* fusionada a la proteína fluorescente amarilla EYFP posee localización cloroplastidial. Por su parte, fue posible por primera vez generar plantas sobre-expresando lipoil sintasas de origen vegetal. Específicamente, se transformaron establemente tomates variedad Micro-Tom con *SILIP1* y *AtLIP1* fusionadas a un epítipo de hexahistidina N-terminal. Algunas líneas T0 sufrieron reducciones en el crecimiento y retrasos en la floración respecto al control, particularmente en las líneas que mostraron mayores niveles de transcrito de dichos genes. Tales líneas, además, aumentaron significativamente sus niveles de lipoilación. Del mismo modo, hubo mayores niveles de transcritos de los genes *E2 PDH* y *E2 kGDH* y una disminución en cantidades variables de genes vinculados a la biosíntesis de ácido lipoico. Estos resultados sugieren fuertemente el rol de *SILIP1* como lipoil sintasa *in vivo*, y el análisis de las generaciones sucesivas de estas líneas permitiría ahondar el conocimiento de este proceso para obtener plantas funcionales.

## ABSTRACT

Agriculture is threatened by different types of abiotic stresses. In plants, these stresses produce an increase in reactive oxygen species, and in order to reduce the damage caused by oxidative stress, both enzymatic and non-enzymatic responses are triggered. Among the latter group, different genetic engineering approaches have been used in order to confer stress tolerance, for instance by increasing the content of antioxidants such as anthocyanins and carotenoids. This Master thesis is focused on studying the metabolism of lipoic acid, which presents several advantages over other antioxidant compounds and is used in the pharmaceutical industry as a food supplement.

In plants, the link between lipoic acid and abiotic stress has been previously addressed. In addition, a number of the enzymes participating in lipoic acid biosynthesis have been identified, mainly in *Arabidopsis thaliana*. Thus, it is known that lipoic acid is synthesised and attached to target proteins (lipoylation) in mitochondria by two pathways: scavenging from free lipoate by a lipoyl ligase (AtLpIA); and *de novo* synthesis, where a lipoyl transferase (AtLIP2) and a lipoyl synthase (AtLIP1) are involved. However, lipoic acid is also synthesised in chloroplasts, by the plastidial isoforms of those enzymes involved in *de novo* synthesis, namely two plastidial lipoyl transferases (AtLIP2p1 and AtLIP2p2) and a plastidial lipoyl synthase (AtLIP1p). Among others, lipoic acid is incorporated into E2 subunits of pyruvate dehydrogenase (PDH) and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase (kGDH) complexes, which in turn belong to tricarboxylic acid cycle. Lipoic acid activates the E2 subunits by trans-acetylation of coenzyme A and regenerating E3 subunits by reduction of their cofactor.

With the long term aim of generating functional plants with higher levels of lipoic acid, we chose the tomato model (*Solanum lycopersicum*), for obtaining a functional food or a plant with higher tolerance to abiotic stress. *S. lycopersicum* possesses two

genes named *SILIP1* and *SILIP1p*, which codify for mitochondrial and plastidial lipoyl synthases, respectively. In this context, this Master thesis focused on functionally characterising the plastidial isoform (in parallel to studying the mitochondrial isoform, Doctoral thesis Jorge Araya) and generating tomato lines over-expressing these genes, with the aim of studying their role as lipoyl synthases by evaluating the phenotypic and molecular effects caused by their over-expression.

From the results obtained, we conclude that *SILIP1p* acts as a lipoyl synthase, because it was able to functionally complement the *Escherichia coli* mutant in *lipA*, the gene that codifies for the orthologous enzyme. In addition, a plastidial localisation of *SILIP1p* fused to EYFP was verified by confocal microscopy. Moreover, it was possible for the first time to study the role of lipoyl synthases in plants over-expressing plant lipoyl synthases. Specifically, tomatoes cv. Micro-tom were stably transformed with *SILIP1* and *AtLIP1* fused to a hexahistidine tag. Several of the resulting T0 lines showed growth reduction and flowering delay with respect to control lines, especially in the over-expressing lines. Furthermore, these lines had significantly increased lipoylation levels, and presented an increase in transcript levels of *E2 PDH* and *E2 kGDH* and a reduction in transcript levels of those genes involved in lipoic acid biosynthesis. These results strongly suggest that *SILIP1* is a lipoyl synthase *in vivo*. Nevertheless, further analyses of future generations in these over-expressing lines will allow us to further broaden the knowledge of this process for obtaining functional plants, as initially proposed.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Estrés abiótico y respuesta en plantas**

Los diferentes tipos de estrés abiótico constituyen serias amenazas para la agricultura. Por lo mismo, ya en 1982 se indicaba que los factores ambientales podían dar cuenta de hasta el 70% de las pérdidas en la producción de cultivos (Boyer, 1982; Buchanan et al., 2000). A su vez, la Organización de Agricultura y Alimentos de las Naciones Unidas (FAO) afirma que sólo un 3,5% de las áreas cultivables a nivel global no se encuentra afectada por algún tipo de problema ambiental (véase en línea <http://www.fao.org>). Es difícil obtener estadísticas exactas sobre los efectos de estrés abiótico sobre la producción de cultivos. Sin embargo, el tema sigue teniendo un impacto significativo basado en el porcentaje de áreas cultivables afectadas y el número creciente de publicaciones científicas referidas a los diversos tipos de estrés abiótico (Cramer et al., 2011), así como en las cada vez menores producciones previstas para los próximos años para los cinco mayores cultivos destinados a alimentación, debido a la reducción de fuentes de agua, el aumento de la tendencia al calentamiento global y al cambio climático (Lobell et al., 2011).

Las plantas se ven expuestas frecuentemente a distintos tipos de estrés abióticos. Por ejemplo, la exposición a sequía, alta salinidad, frío, contaminación química o inundación son condiciones que pueden darse transitoria o establemente en distintos períodos del desarrollo de una planta (Mickelbart et al., 2015). Tales condiciones producen habitualmente un estrés secundario de tipo osmótico u oxidativo, que altera la homeostasis iónica y osmótica y produce daño a proteínas y membranas

biológicas. La respuesta por parte de los organismos vegetales ante tales circunstancias, suele esquematizarse en distintos niveles de respuesta: percepción y transducción de la señal, control transcripcional y mecanismos de respuesta a estrés (Vinocur y Altman, 2005), los cuales propenden al restablecimiento de la homeostasis celular y a la protección estructural y funcional de proteínas y membranas, lo cual deriva en la adquisición de tolerancia o resistencia al estrés. Además de un posible aumento de las concentraciones de hormonas como ácido salicílico, ácido jasmónico, ácido abscísico y etileno en respuesta a las condiciones ambientales (Hirayama y Shinozaki, 2010), los distintos tipos de estrés abiótico característicamente producen un aumento de la concentración citosólica de calcio, así como un incremento en especies reactivas de oxígeno (ERO). Ante esta situación, los mecanismos de respuesta activados por los procesos de señalización suelen clasificarse en aquellos de tipo enzimático y no enzimático. Dentro del primer grupo, se encuentran enzimas con actividad superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), ascorbato peroxidasa (APX), entre otras. Por su parte, el sistema de respuesta no enzimático está compuesto por moléculas antioxidantes de bajo peso molecular como ascorbato (AsA), glutatión (GSH),  $\alpha$ -tocoferol y ácido lipoico, entre otros (Pérez-López et al., 2010).

## **1.2. Estrategias genéticas para aumentar la tolerancia a estrés**

La adquisición de tolerancia a un estrés abiótico particular puede alcanzarse por selección tradicional de cultivos combinado con el uso de marcadores moleculares como QTLs (Vinocur y Altman, 2005). Sin embargo, también se ha utilizado crecientemente el conocimiento biotecnológico para el mismo fin. Así, las estrategias

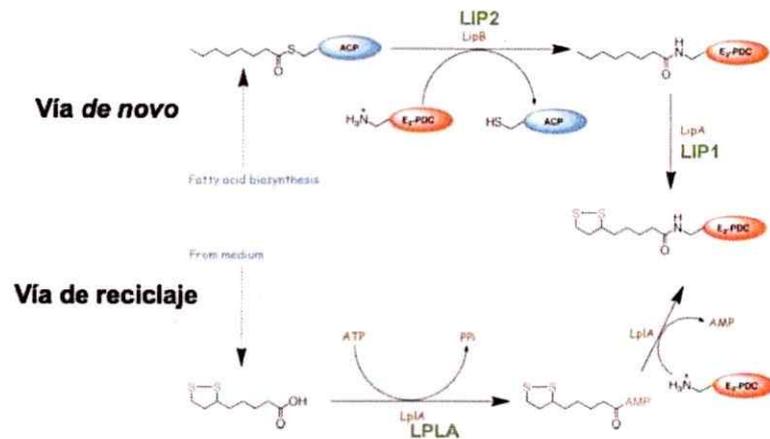
de ingeniería genética en plantas para aumentar la tolerancia a distintos tipos de estrés abiótico se han basado en la expresión de genes involucrados en rutas de señalización, en genes que codifican para proteínas que confieren tolerancia, o en enzimas que participan en rutas de síntesis de metabolitos funcionales o estructurales (Vinocur y Altman, 2005; Cramer et al., 2011; Mickelbart et al., 2015). Respecto a esta última estrategia aplicada a elevar los contenidos de antioxidantes particulares, se han utilizado distintas aproximaciones, las que incluyen: la sobre-expresión de genes involucrados en las rutas biosintéticas del compuesto de interés, o en la síntesis de los precursores; la modificación de la actividad de una o más enzimas claves implicadas en los pasos limitantes de las vías metabólicas blanco; el bloqueo de puntos de ramificación o de inhibición por producto; o bien, el aumento de destinación a compartimentos sumidero para aumentar el almacenamiento de aquellos compuestos blancos (Zhu et al., 2013). En el caso de los antioxidantes, se ha puesto énfasis en utilizar herramientas de ingeniería genética con el fin de aumentar el contenido de antioxidantes lipofílicos (como carotenoides, tococromanoles y coenzima Q<sub>10</sub>) e hidrofílicos (ascorbato, flavonoides, melatonina). Por ejemplo, la sobre-expresión del gen codificante de licopeno β-ciclase de tomate (*SILYCB*) produjo un aumento de cerca de 10 veces en el contenido de β-caroteno respecto a las líneas control, el cual además pareció otorgarles resistencia a estrés hídrico (D'Ambrosio et al., 2004). De manera similar, buscando aumentar el contenido de ácido ascórbico, se sobre-expresó el gen codificante para una GDP-manosa pirofosforilasa de *S. lycopersicum* (*SIGMPasa*) en líneas de tabaco, produciendo 2 a 4 veces más ácido ascórbico que en tabacos control, aumentando a su vez su tolerancia a estrés térmico (Wang et al., 2011). Sin embargo, no existen antecedentes sobre aproximaciones genéticas mediante las cuales se busque aumentar el contenido de ácido lipoico.

### 1.3. Ácido lipoico y su biosíntesis

En este contexto, el presente estudio se enfoca en investigar ácido lipoico, pues presenta varias características biológicas que lo hacen interesante. En primer lugar, es el único entre los antioxidantes que tanto en su forma oxidada de ácido lipoico (AL) como reducida de ácido dihidrolipoico (ADHL) presenta efectos protectores efectivos (Navari-izzo et al., 2002; Gorąca et al., 2011), por varias razones. Por ejemplo, posee la capacidad de quelar radicales libres y metales pesados. De hecho, el ácido lipoico es capaz de quelar metales pesados como  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ , y el ácido dihidrolipoico forma complejos además con  $\text{Hg}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$  (Ou et al., 1995; Zhao et al., 2014). En segundo lugar, su forma oxidada puede inactivar radicales libres, mientras que su forma reducida es la especie predominante que interactúa con ERO, como radicales superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), perhidroxilo ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) e hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ). Tercero, es de carácter anfifílico, por lo que puede tener efectos antioxidantes en ambientes celulares tanto hidro como liposolubles. Finalmente, el ácido dihidrolipoico es capaz de funcionar como antioxidante sobre otros antioxidantes, al poder reducir, por ejemplo, tanto a la vitamina C como E y glutatión, recuperando en ellos su poder reductor (Biewenga et al., 1997; Gorąca et al., 2011). Lo anterior, debido a que la dupla ácido lipoico/ácido dihidrolipoico (AL/ADHL) posee un potencial de reducción estándar de 0,32 V; la cual supera a la dupla sulfuro de glutatión/glutatión (GSSG/GSH), con un potencial de reducción estándar de 0,24 V, el que a su vez es mayor que la dupla monodeshidroascorbato/ácido ascórbico (MDA/AsA, 0,12 V). Esto hace que ADHL pueda reducir directamente a GSSG y a MDA para regenerar a las especies antioxidantes GSH y AsA, respectivamente. Adicionalmente, el ácido dihidrolipoico impide la oxidación de ascorbato y de lipoproteínas de baja densidad dependientes de

la presencia de  $\text{Cu}^{+2}$  (Suh et al., 2005; Shay et al., 2009). Tales propiedades han derivado en su uso terapéutico para tratamientos auxiliares de varias enfermedades, como diabetes, cáncer, VIH y enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y autoinmunes (Gorąca et al., 2011).

En relación a los aspectos moleculares de este antioxidante, el ácido lipoico (ácido 6,8-ditiooctanoico) es un grupo prostético esencial para cinco complejos multienzimáticos importantes: piruvato deshidrogenasa (PDH),  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (KGDH),  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa de cadena ramificada (BCDH), acetolna deshidrogenasa (AoDH) y glicina descarboxilasa (GDC; Perham, 2000; Douce et al., 2001; Mooney et al., 2002). En ellas, funciona como un cofactor necesario para transacetilar a la coenzima A desde el intermediario acoplado a la subunidad E1 y para reducir  $\text{FAD}^{+2}$  a  $\text{FADH}_2$  necesario para regenerar la actividad de la subunidad E3 de cada complejo. El conocimiento respecto a la biosíntesis de ácido lipoico y la lipoilación de proteínas, principalmente proviene de estudios realizados en bacterias y hongos (revisado en Spalding y Prigge, 2010). Así, en *Escherichia coli* la lipoilación de proteínas se basa en dos vías redundantes (ver **Figura 1**): una vía *de novo* y una vía de reciclaje de lipoato libre (Morris et al., 1995). En la primera vía, una octanoiltransferasa (LipB, EC 2.3.1.181) usa grupos octanoil sintetizados *de novo* unidos a proteínas portadoras de grupos acilo (ACP, por sus siglas en inglés) para trans-octanoilar proteínas blanco (Jordan y Cronan, 2003; Zhao et al., 2003; Booker, 2004). Luego, una lipoil sintasa (LipA, EC 2.8.1.8) inserta dos átomos de sulfuro desde S-adenosil metionina en las posiciones C-6 y C-8 del grupo octanoil unido a la proteína blanco (Hayden et al., 1992; Cicchillo et al., 2004; Cicchillo et al., 2005).



**Figura 1. Ruta de síntesis del ácido lipoico.** La figura muestra los pasos necesarios para la lipoilación de proteínas en bacterias. En verde se muestran las proteínas con función homóloga descritas en *Arabidopsis thaliana* (modificado de Booker, 2004).

Por otro lado, en la vía de reciclaje de lipoilación en bacterias (**Figura 1**), LplA es la enzima central, la cual utiliza lipoato libre u octanoato recuperado desde el ambiente intra y extracelular (Hermes y Cronan, 2009; Ramaswamy y Maurelli, 2010). En una reacción de dos pasos, el lipoato se activa primero a lipoil-AMP y luego se liga a las proteínas blanco respectivas (Morris et al., 1994). En arqueas, la actividad de LplA requiere dos proteínas separadas que son similares en sus dominios N o C terminal a LplA bacteriano (Posner et al., 2009). Los mamíferos también requieren dos enzimas separadas para el uso de lipoato libre, una enzima activadora de lipoato dependiente de GTP (Fujiwara et al., 2001) y una lipoiltransferasa dependiente de lipoil-GMP (Fujiwara et al., 1994).

Los procesos correspondientes en plantas son menos conocidos. La mayoría del lipoato se produce en las mitocondrias (Wada et al., 1997; Gueguen et al., 2000; Yasuno et al., 2004; Rébéillé et al., 2007). En estos organelos, la lipoilación de las subunidades blanco de PDH, KGDH, BCDH y GDC ocurre vía octanoil transferasa (AtLIP2; Wada et al., 2001), lipoil sintasa (AtLIP1; Yasuno y Wada, 1998) y

posiblemente AtLPLA (Ewald et al., 2007; Kang et al., 2007). El complejo enzimático PDH es único entre los previamente mencionados, porque no está restringido a las mitocondrias, sino que es esencial en el metabolismo de plastidios, pues en estos compartimentos genera las unidades de acetil-CoA necesarias para la biosíntesis de ácidos grasos (Lernmark y Cardestrom, 1994) y la mutación *knockout* de la subunidad E2 del complejo PDH plastidial resulta en letalidad embrionaria (Lin et al., 2003). Sumado a que los plastidios son el mayor sitio de síntesis de ácidos grasos en plantas (Ohlrogge et al., 1979), está el hecho de que poseen isoformas específicas de octanoiltransferasa (AtLIP2p; Wada et al., 2001 y AtLIP2p2; Ewald et al., 2014) y lipoil sintasa (AtLIP1p; Yasuno y Wada, 2002). Recientemente, se ha reportado que la delección tanto de AtLIP2p como de AtLIP2p2 es letal para el desarrollo embrionario, así como la delección de AtLIP1p (Ewald et al., 2014a). Lo anterior sugiere que la lipoilación de proteínas plastidiales subyace enteramente en una vía autónoma y parcialmente redundante (*de novo*) en *Arabidopsis*. A diferencia de lo que ocurre en mitocondrias, parece ser que en cloroplastos no hay una vía alternativa de recuperación de lipoato libre que pueda reemplazar la vía de lipoilación de proteínas *de novo*, al menos durante la embriogénesis.

#### **1.4. Ácido lipoico y su rol en distintos tipos de estrés**

El rol protector del ácido lipoico ante daños derivados del estrés de tipo oxidativo ha sido estudiado en diversos sistemas biológicos. En estudios realizados en *Saccharomyces cerevisiae*, se ha mostrado que cultivos pre-tratados con ácido lipoico son capaces de responder de mejor forma ante un ambiente oxidativo que un cultivo de levaduras control (Wu et al., 2011). En el caso de mamíferos, el suministro de ácido lipoico en ratas de edad avanzada generó un aumento en la actividad de varias

enzimas mitocondriales, incluyendo isocitrato deshidrogenasa, KGDH, succinato deshidrogenasa y citocromo C oxidasa (Arivazhagan et al., 2001). De manera similar, se ha demostrado que ácido lipoico posee efectos protectores en el proceso de envejecimiento, lo cual se debería a la regulación del estado redox mitocondrial a nivel cardíaco (Janson, 2006); cerebral (Head et al., 2008) y del tejido vascular (Bitar et al., 2010). Del mismo modo, posee efectos protectores en casos de diabetes tipo II y dolor neuropático (Heinisch et al., 2010; Mijnhout et al., 2012). Además, la administración de ácido lipoico causa la activación de actividad tipo caspasa 3 en células cancerígenas de colon humano HT-29 y líneas celulares Jurkat y FaDu, así como en células mesenquimáticas murinas 3T3 (van de Mark et al., 2003; De Marco et al., 2005; Novotny et al., 2008).

En plantas, aunque existen menos estudios comparados con mamíferos y levaduras, se ha investigado el rol de ácido lipoico frente a distintos tipos de estrés. Así, por ejemplo, un estudio realizado en dos variedades de cebada (*Hordeum vulgare* cv. Alpha y cv. Iranis, sensible y resistente a estrés salino, respectivamente) mostró que la variedad naturalmente más resistente a estrés salino presentaba niveles endógenos mayores de ácido lipoico y ácido dihidrolipoico respecto a la variedad sensible. Adicionalmente, al someter a ambas variedades a 80, 160 y 240 mM de NaCl, disminuyó entre un 83 y 100% el contenido de ácido dihidrolipoico, al mismo tiempo que hubo un aumento de ácido lipoico entre tres a seis veces. Por su parte, la variedad de cebada sensible a estrés salino mostró una disminución más drástica en el nivel de ácido dihidrolipoico a menores concentraciones de sal. Además, en ambas variedades el estrés salino generado provocó una disminución de la relación ácido dihidrolipoico/lipoico. Lo anterior pudo ser explicado aduciendo que la disminución de

ácido dihidrolipoico y el aumento de ácido lipoico se correlacionaba con la capacidad de tolerar de mejor forma tratamientos con alta salinidad, lo cual a su vez se agudizaba en la variedad de cebada naturalmente resistente, donde hubo mayor presencia de ambas especies a concentraciones de NaCl mayores (Pérez-López et al., 2010). Asimismo, con el fin de estudiar los efectos sobre el estado rédox celular en trigo (*Triticum aestivum*), éste se creció en condiciones de altos niveles de cobre y se evaluó el contenido de distintos agentes que participan en mantener el estado rédox celular. Entre otros resultados, se observó un aumento en hojas de los niveles de ácido lipoico en su forma reducida a 48 h de tratamiento de 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ , lo cual podría explicar al menos parcialmente la reducción de los niveles de glutatión oxidado en estas condiciones (Sgherri et al., 2002).

Los estudios en plantas sobre ácido lipoico han estado centrado fundamentalmente en los modelos previamente descritos. Sin embargo, el ácido lipoico ha sido detectado también en tomate *S. lycopersicum* (D'Amico et al., 2003) por el mismo método desarrollado previamente en trigo (Sgherri et al., 2002). En dicho artículo, se observó una disminución de ADHL en frutos de *S. lycopersicum* cv. Jama al incrementar la salinidad en el medio de riego, lo cual se relacionaría parcialmente a la regeneración de glutatión y ácido ascórbico (D'Amico et al., 2003). Posteriormente, se evaluó el contenido de ácido dihidrolipoico y ácido lipoico en cuatro variedades distintas de *S. lycopersicum* ante condiciones de alta salinidad, encontrando que en todas ellas tales condiciones produjeron un aumento significativo del contenido de ácido dihidrolipoico (Sgherri et al., 2007). Lo anterior fue reafirmado por el mismo grupo de investigación un año más tarde, quienes reportaron un aumento de aproximadamente 30% tanto de ácido dihidrolipoico como de la proporción ácido dihidrolipoico/lipoico en *S.*

*lycopersicum* cv. Naomi crecida en condiciones de alta salinidad (Sgherri et al., 2008). En conjunto, estas investigaciones propusieron que un mayor contenido de ácido dihidrolipoico en plantas sometidas a condiciones que producen estrés salino, así como una mayor proporción de ácido dihidrolipoico/lipoico en ellas, se correlacionaría directamente con el mayor poder antioxidante de la forma reducida del ácido lipoico. Además, se ha visto que los niveles de ácido lipoico en tomate varían estacionalmente, los cuales se correlacionarían con el estrés lumínico e hídrico diferencial en las estaciones evaluadas (Incerti et al., 2009).

### 1.5. Genes lipoil sintasas en *S. lycopersicum*

Hasta la fecha, no existen reportes de la identificación o caracterización de genes o enzimas de la vía de lipoilación, tanto *de novo*, como de reciclaje (**Figura 1**) en tomates. Por lo tanto, a partir de la información genómica disponible depositada en bases de datos como NCBI (Aoki et al., 2010), se han identificado ortólogos de *AtLIP1* (TAIR, N° Acceso AT2G20860), lipoil sintasa caracterizada en *A. thaliana* (Yasuno y Wada, 1998), denominados *SILIP1p* (NCBI, N° Acceso XP\_004252893.1) y *SILIP1* (NCBI, N° Acceso XP\_004243321.1). Estos genes se encuentran en el genoma nuclear de *S. lycopersicum* y cuyas proteínas poseen localización subcelular predicha es cloroplastidial y mitocondrial, respectivamente (Tesis doctoral en curso, Jorge Araya). En este sentido, *SILIP1p* presenta 93% de cobertura y 78% de identidad con la secuencia proteica de *AtLIP1* y 92% de cobertura y 80% de identidad aminoacídica con *AtLIP1p*, mientras que *SILIP1* presenta 93% de cobertura y 84% de identidad con la secuencia proteica de *AtLIP1* y 87% de cobertura y 50,26% de identidad con la secuencia proteica de *AtLIP1p*, las cuales poseen localización mitocondrial (*AtLIP1*; Yasuno y Wada, 1998) y cloroplastidial (*AtLIP1p*; Yasuno y Wada, 2002). Asimismo,

poseen un 51,85% de identidad aminoacídica entre ambas posibles isoformas de tomate. Pese a que el gen *AtLIP1* presenta tres transcritos distintos con *splicing* alternativo en *Arabidopsis*, no se cuenta con información suficiente en las bases de datos para predecir más de una versión o loci distintos en tomate, por lo que el modelo actual para ambos genes muestra una única versión en el genoma de *S. lycopersicum*. Si bien las subunidades lipoiladas de los cinco complejos proteicos descritos hasta ahora se encuentran en mitocondrias vegetales, el complejo PDH se localiza también en cloroplastos y es fundamental para el metabolismo plastidial (Lernmark y Cardestrom, 1994; Lin et al., 2003). Junto con lo anterior, los plastidios son el sitio donde ocurre en mayor medida la síntesis de ácidos grasos en plantas (Ohlrogge et al., 1979) y presentan, al menos en *Arabidopsis*, isoformas específicas de octanoiltransferasas (*AtLIP2p1* y *AtLIP2p2*) y fundamentalmente una lipoil sintasa plastidial (*AtLIP1p*). Esto, sumado a que la mutante homocigota para *AtLIP1p* produce letalidad embrionaria, lo cual sugiere una vía parcialmente redundante aunque autónoma en cloroplastos en *Arabidopsis* (Ewald et al., 2014b), hace interesante estudiar la contribución de ambas isoformas predichas a la síntesis de ácido lipoico en el modelo de tomate. Por lo anterior, se pretende evaluar los efectos derivados de la sobre-expresión *SILIP1p* y *SILIP1* en líneas de tomate transformadas establemente, y estudiar sus contribuciones relativas a los niveles de ácido lipoico y/o lipoilación de proteínas blanco, en miras de generar en el largo plazo, plantas funcionales que presenten mayor tolerancia a distintos tipos de estrés abiótico.

## 1.6. Estrategia desarrollada

Considerando los antecedentes previamente expuestos, en relación al rol protector que se ha visto que posee ácido lipoico en levaduras (Wu et al., 2011),

animales y modelos celulares de enfermedades humanas (Arivazhagan et al., 2001; Janson, 2006; Head et al., 2008; Novotny et al., 2008; Bitar et al., 2010; Heinisch et al., 2010; Mijnhout et al., 2012), así como a la correlación del contenido de ácido lipoico en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico en otros modelos vegetales (Sgherri et al., 2002; D'Amico et al., 2003; D'Amico et al., 2004; Sgherri et al., 2007; Sgherri et al., 2008; Pérez-López et al., 2010), resulta interesante ahondar en el conocimiento sobre el metabolismo de ácido lipoico, particularmente mediante la manipulación genética en uno de los pasos de la síntesis *de novo* de esta molécula. Dado que las enzimas participantes de su biosíntesis no han sido caracterizadas previamente en *S. lycopersicum*, la primera parte de la tesis de magister desarrollada consiste en caracterizar *SILIP1p*, para lo cual se pretende determinar su localización subcelular en *N. tabacum*. Adicionalmente, se cuenta con una cepa mutante de *E. coli* para lipoil sintasa, *lipA* (KER176), la cual se ha utilizado previamente para estudios de caracterización funcional en plantas (Yasuno y Wada, 1998; Wada et al., 2001; Yasuno y Wada, 2002; Ewald et al., 2014b). Tal caracterización de la isoforma plastidial de lipoil sintasa de *S. lycopersicum* (*SILIP1p*) se realizará en paralelo a caracterizar *SILIP1*, la isoforma mitocondrial de lipoil sintasa de tomate mediante estas mismas técnicas en la tesis doctoral de Jorge Araya.

En la segunda parte de la misma tesis, se ha elegido una estrategia de modificación genética en *S. lycopersicum*, en miras de generar una variedad vegetal que posea mayor tolerancia a estrés abiótico o que pueda ser utilizado como modelo de alimento funcional. Dado que dicha proyección es de largo alcance, la duración del proyecto de tesis magister permite comenzar con dicho proceso mediante la generación de líneas de tomate genéticamente modificadas con *SILIP1* y *SILIP1p*, dos

supuestas lipoil sintasas presentes en el genoma de *S. lycopersicum*. Para ello, tanto *SILIP1* como *SILIP1p* serán sobre-expresadas en líneas de *S. lycopersicum* genéticamente modificadas, con la finalidad de evaluar los efectos derivados de su sobre-expresión a nivel fenotípico y molecular y si ambas isoformas poseen efectos diferenciales. Particularmente, se espera encontrar alteraciones en el grado de lipoilación de proteínas blanco en aquellas líneas transgénicas que sobre-expresen genes lipoil sintasas, las cuales podrían ser evaluadas respecto a su tolerancia a distintos tipos de estrés abióticos, en estudios posteriores.

### **1.7. Hipótesis**

Los genes *SILIP1* y *SILIP1p* codifican para dos isoformas lipoil sintasas, cuya sobre-expresión en *S. lycopersicum* cv. Micro-tom produce un aumento en la lipoilación de proteínas blanco, respecto a líneas de tomate control.

### **1.8. Objetivo general**

Caracterizar funcionalmente *SILIP1p* en sistemas heterólogos y evaluar los efectos fenotípicos y moleculares derivados de la sobre-expresión de *SILIP1* y *SILIP1p* en líneas de tomate genéticamente modificadas.

### **1.9. Objetivos específicos**

1. Determinar la funcionalidad biológica del producto génico de *SILIP1p* en *E. coli* mutante *lipA* KER176 y determinar su localización subcelular en *N. tabacum*.
2. Obtener líneas de plantas de tomate que sobre-expresen *SILIP1* o *SILIP1p* y analizar fenotípica y molecularmente las líneas transformadas establemente.
3. Realizar análisis de lipoilación de proteínas blanco y de expresión génica en líneas de tomate transformadas establemente con *SILIP1* o *SILIP1p*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Material biológico

#### 2.1.1. Cultivo de bacterias

Los microorganismos utilizados durante el desarrollo de la presente tesis corresponden a las cepas de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  OneShot $^{\circledR}$  TOP10 (F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*; Invitrogen, USA) y *E. coli* *lipA* KER176 (F- *rpsL* *lipA150::* Tn1000dKn, Vanden 1991), así como *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (C58, pTiBo542DT-DNA, Rif $^R$ ; Hood et al., 1993).

Para el crecimiento de *E. coli* DH5 $\alpha$  OneShot $^{\circledR}$  TOP10 y *A. tumefaciens* EHA105, las bacterias fueron cultivadas ya sea en medio LB líquido (triptona 1% m/v, NaCl 1% m/v y extracto de levadura 0,5% m/v) o en medio LB agar (triptona 1% m/v, NaCl 1% m/v, extracto de levadura 0,5% m/v y agar – agar 1,4% m/v), y fueron incubadas en agitación a 180 rpm para cultivos líquidos o en estufas para cultivos sólidos y mantenidas a 37°C en el caso de crecimiento de *E. coli*, o a 28°C en el caso de *A. tumefaciens*.

Por su parte, el cultivo de *E. coli* *lipA* KER176 fue realizado tanto en medio Rich Broth líquido (RB; Davis et al., 1982; corresponde a triptona 1% m/v, NaCl 0,5% m/v y extracto de levadura 0,1% m/v) como en medio RB agar (triptona 1% m/v, NaCl 0,5% m/v, extracto de levadura 0,1% m/v y agar – agar 1,4% m/v), y se incubó en agitación a 180 rpm para cultivo líquido o en estufa para cultivo sólido, en ambos casos a 37°C.

#### 2.1.2. Transformación de bacterias

Para todos los pasos de clonación de vectores de expresión, se utilizaron células

quimiocompetentes comerciales *E. coli* DH5 $\alpha$  OneShot $^{\text{®}}$  TOP10 y se transformaron según instrucciones del fabricante. Brevemente, se descongeló en hielo un vial de células quimiocompetentes por reacción de topoisomerización o recombinación, se agregó en cada caso 5  $\mu$ L de cada reacción (véanse secciones 2.2.1.7 y 2.2.1.8, respectivamente) y se incubó por 30 min en hielo. Posteriormente, se realizó un golpe térmico por 45 s a 42 $^{\circ}$ C y se transfirió inmediatamente a hielo por 5 min, tras lo cual se agregaron 250  $\mu$ L de medio S.O.C. (Invitrogen, USA) pre-calentado a 37 $^{\circ}$ C y se incubó durante al menos 1 h a 37 $^{\circ}$ C con agitación a 180 rpm. Finalmente, se sembraron 50 a 150  $\mu$ L de cada cultivo en placas con LB agar suplementado con los antibióticos respectivos (véase sección 2.2.1) y éstas se incubaron a 37 $^{\circ}$ C por 16 h para posteriores análisis.

Con el fin de obtener cepas de *E. coli lipA* KER176 portadoras de los vectores de expresión pDEST-His $_6$ MBP-AtLIP1, pDEST-His $_6$ MBP-SILIP1 y pDEST-His $_6$ MBP-SILIP1p ya verificados molecularmente, se generaron células quimiocompetentes de esta cepa. Para ello, inicialmente células KER176 aisladas desde Rich Broth sólido suplementado con 50  $\mu$ g/mL de kanamicina, fueron crecidas por 16 h a 37 $^{\circ}$ C a 180 rpm en RB líquido hasta saturación. Luego, se prepararon células quimiocompetentes según Hanahan et al. (1991), con las siguientes modificaciones: se inoculó un total de 50 mL de medio RB líquido hasta llegar a OD $_{600}$  = 0,3, posterior a lo cual se realizaron dos incubaciones con solución CCMB80 (acetato de potasio 10 mM, pH 7, CaCl $_2$ ·2H $_2$ O 80 mM, MnCl $_2$ ·4H $_2$ O, MgCl $_2$ ·6H $_2$ O 10 mM, pH 6,4) por 20 min en hielo sin agitación, con respectivas centrifugaciones a 2.000 g por 10 min a 4 $^{\circ}$ C, tras lo cual se resuspendieron en CCMB80 hasta alcanzar una OD $_{600}$  = 1,5 y se dispensaron en alícuotas de 100  $\mu$ L.

Posteriormente, se realizó la transformación de KER176 quimiocompetentes

según Hanahan et al. 1991, excepto que el golpe térmico fue de 1 min a 37°C, posterior a lo cual se agregó 1 mL de Rich Broth líquido suplementado con ácido lipoico 250 nM. Tras 3 h de incubación a 37°C en agitación a 180 rpm, se sembró el sedimento completo de células concentradas en 100 µL en placas con RB sólido suplementado con kanamicina 50 µg/mL, ampicilina 100 µg/mL y ácido lipoico 250 nM y finalmente se incubaron a 37°C por 16 h para obtener colonias transformantes.

Para la obtención de cepas de *A. tumefaciens* EHA105 portadoras de vectores de expresión para la posterior transformación de plantas, en primer lugar se generaron viales de células quimiocompetentes por el método de CaCl<sub>2</sub> (Tsai y Harding, 2008). Para ello, una colonia aislada de *A. tumefaciens* proveniente de una placa de LB agar suplementado con rifampicina 10 µg/mL se dejó creciendo a 28°C en agitación a 180 rpm por 16 h. Luego, el cultivo se enfrió en hielo por 30 min, tras lo cual se distribuyó en alícuotas de 1,5 mL en tubos de microcentrifuga pre-enfriados en hielo. A continuación, las células se sedimentaron a 4.000 rpm por 10 min a 4°C, se removieron los respectivos sobrenadantes y se resuspendieron en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM. Se repitió la sedimentación a 4.000 rpm por 5 min a 4°C y tras eliminar nuevamente cada sobrenadante, se volvió a resuspender las células en 200 µL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM. Finalmente, las células quimiocompetentes así obtenidas se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior uso o se procedió directamente a su transformación.

Para ello, la transformación de *A. tumefaciens* EHA105 se realizó por golpe térmico. Brevemente, se agregaron 500 ng a 1.000 ng de ADN plasmidial a cada vial de células y se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente, se congelaron en nitrógeno líquido por 5 min y en seguida se dio un golpe térmico a 37°C por 5 min, tras lo cual se incubaron en hielo por 5 min. Se agregó 1 mL de LB líquido a cada vial de células quimiocompetentes transformadas y se incubó a 28°C por 4 h en agitación a 180 rpm.

Finalmente, se sembraron 200  $\mu$ L de cultivo en placas que contenían LB agar suplementado con rifampicina 10  $\mu$ g/mL y kanamicina 100  $\mu$ g/mL y se incubaron a 28°C en estufa por 48 h, para sus posteriores análisis.

### 2.1.3. Crecimiento de *Nicotiana tabacum* y *Solanum lycopersicum*

El material vegetal utilizado para el desarrollo de la presente tesis correspondió a *Nicotiana tabacum* y *Solanum lycopersicum* cv. Micro-tom, así como explantes provenientes de este último. Para la germinación de semillas de ambas especies, tanto para la propagación sexual de tabaco y tomate como para la obtención de explantes de éste último, se trabajó en condiciones *in vitro*. En primer lugar, las semillas a germinar fueron desinfectadas por 15 min con una solución de hipoclorito de sodio 30% v/v y Tween 20 0,1% v/v. A continuación, fueron lavadas con agua destilada estéril tres veces y secadas en papel filtro estéril en cámara de flujo laminar. Posteriormente, las semillas fueron sembradas en placas Petri que contenían medio de germinación (Murashige & Skoog con vitaminas (*PhytoTechnology Laboratories, USA*) 0,44% m/v, sacarosa 1,5% m/v, Phytoagar 1,5% m/v, pH 5,8). Luego, fueron incubadas en una cámara de cultivo de plantas a 25°C con 60% humedad y fotoperíodo largo (16 h luz, 8 h oscuridad) durante 8 a 10 días para la obtención de explantes o durante 2 semanas para la propagación de plantas. En este último caso, una vez cumplido dicho período se transfirieron a una mezcla de turba : vermiculita : perlita en proporción 3:1:1 y se crecieron en invernadero a 22°C con fotoperíodo largo (16 h luz, 8 h oscuridad), donde el riego consistió en medio hidropónico ( $\text{KNO}_3$  1,25 mM,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  1,5 mM,  $\text{MgSO}_4$  0,75 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 mM,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  50  $\mu$ M,  $\text{MnSO}_4$  10  $\mu$ M,  $\text{ZnSO}_4$  2  $\mu$ M,  $\text{CuSO}_4$  1,5  $\mu$ M,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  0,075  $\mu$ M,  $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si}$  0,1 mM, pentaacetato de hierro dietilentriamina, pH 6) cada dos días hasta saturación.

## 2.2. Métodos de biología molecular

### 2.2.1. Estrategia de clonación

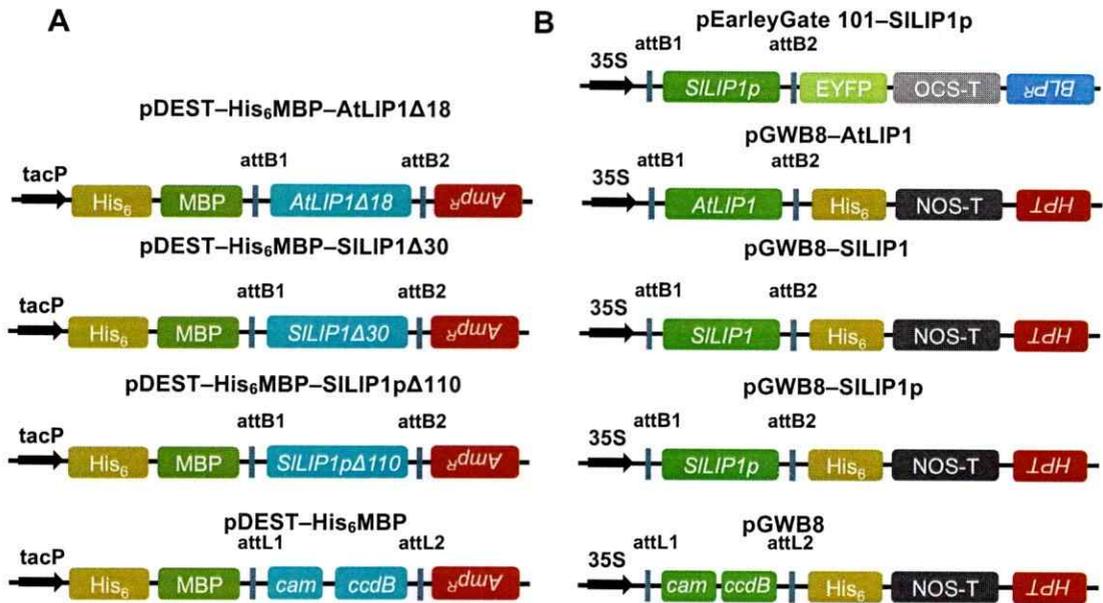
La estrategia empleada para estudiar el rol de SILIP1 y SILIP1p involucró dos líneas experimentales: en primer lugar, la generación de vectores de expresión en la cepa mutante de *E. coli lipA* KER176, con el fin de estudiar la funcionalidad del producto génico de *SILIP1* y *SILIP1p*; y, por otra parte, la generación de vectores de expresión con el propósito de transformar tejido vegetal, ya sea transitoriamente en *N. tabacum* o establemente en *S. lycopersicum* cv. Micro-tom, a través de *A. tumefaciens* EHA105.

Así, para la obtención de vectores de expresión en *E. coli lipA* KER176, se utilizaron los vectores de entrada pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO® portadores de un fragmento de las secuencias codificantes de las potenciales proteínas maduras *AtLIP1*, *SILIP1* y *SILIP1p* (véase sección 2.2.1.7) y el vector de destinación pDEST-His<sub>6</sub>MBP (Nallamsetty et al., 2005), para generar los vectores de expresión pDEST-His<sub>6</sub>MBP-*AtLIP1*Δ18, pDEST-His<sub>6</sub>MBP-*SILIP1*Δ30, pDEST-His<sub>6</sub>MBP-*SILIP1p*Δ110 (véase Figura 2 A).

Por su parte, para determinar la localización subcelular de SILIP1p mediante transformación transitoria en *N. tabacum*, se utilizó el vector de entrada pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO® portador de la secuencia codificante completa de *SILIP1p* con excepción del codón de término de la traducción; y el vector de destinación pEarleyGate 101 (Earley et al., 2006), para generar el vector de expresión pEarleyGate 101-*SILIP1p* (véase Figura 2 B).

En el caso de la transformación estable de *S. lycopersicum*, se utilizaron los vectores de entrada pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO® portadores de las secuencias codificantes completas de *SILIP1* y *SILIP1p* con excepción de sus codones de término de la

traducción y el vector de destinación pGWB8 (Nakagawa et al., 2007), con el fin de obtener los vectores de expresión pGWB8-SILIP1 y pGWB8-SILIP1p (Figura 2 B).



**Figura 2. Esquema de las distintos vectores de expresión en bacterias y plantas.** **A**, resumen de los vectores de expresión en bacterias pDEST-His<sub>6</sub>MBP con los respectivos insertos de interés -AtLIP1Δ18, -SILIP1Δ30, -SILIP1pΔ110 y sin inserto. **B**, se muestran los vectores de expresión en plantas pEarleyGate 101-SILIP1p para determinar su localización subcelular en *N. tabacum* y pGWB8 con los insertos -AtLIP1, -SILIP1, -SILIP1p y sin inserto. *tacP*: promotor *tac* para expresión constitutiva en bacterias; *35S*: promotor del virus del mosaico de coliflor para expresión constitutiva y fuerte en plantas. *His<sub>6</sub>*: epítipo de hexahistidina; *MBP*: proteína de unión a maltosa; *OCS-T* y *NOS-T*: secuencia 3' de poliadenilación del gen de octopina y nopalina sintasa, respectivamente. *attL* y *attB*: secuencias de reconocimiento para recombinación homóloga en el vector de destinación y de expresión, respectivamente. *Cam*: gen de resistencia a cloranfenicol; *ccdB*: gen cuyo producto génico es letal para cepas de *E. coli gyrA*. *HPT*, *Amp<sup>R</sup>* y *BLP<sup>R</sup>*: genes que confieren resistencia a higromicina, ampicilina y BASTA, respectivamente. *AtLIP1*, *SILIP1* y *SILIP1p* corresponden a la secuencia codificante completa o parcial (Δ18, Δ30 o Δ110) de lipoil sintasa de *A. thaliana* y aquellas candidatas en *S. lycopersicum*.

### 2.2.1.1. Diseño de partidores

La obtención de vectores de expresión en *E. coli lipA* KER176 se realizó a partir de las secuencias codificantes de *AtLIP1*, *SILIP1* y *SILIP1p* depositadas en la base de datos de NCBI (NM\_127655, XM\_004243273, XM\_004252845, respectivamente). Los partidores específicos para amplificar *AtLIP1* utilizados han sido descritos previamente (Yasuno y Wada, 1998). Por su parte, para amplificar *SILIP1* y *SILIP1p*, se realizó un análisis bioinformático con sus respectivas secuencias codificantes para evaluar la presencia de un péptido señal de destinación a mitocondrias y cloroplastos, respectivamente. Así, utilizando los programas TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>, Emanuelsson et al., 1999) y ChloroP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>, Emanuelsson et al., 1999), se predijo el posible péptido señal para *SILIP1* y *SILIP1p*, respectivamente. Lo anterior, sumado a un alineamiento aminoacídico con *AtLIP1* para el caso de *SILIP1* y con *AtLIP1p* previamente caracterizado (Yasuno y Wada, 1998) para el caso de *SILIP1p*, fue utilizado para el diseño de partidores específicos para las secuencias a amplificar (ver Tabla I), las cuales abarcaron desde el 5' de la secuencia codificante de cada potencial proteína madura hasta el respectivo codón de término de la traducción. Por su parte, el diseño de partidores específicos para *SILIP1p* necesario en la obtención del vector de expresión para su posterior transformación en plantas (ver Tabla I), se basó en la secuencia codificante completa de *SILIP1p* referida previamente (XM\_004252845).

Asimismo, se diseñaron partidores específicos para analizar la inserción de los respectivos constructos en plantas de tomates transformadas con *AtLIP1*, *SILIP1* y *SILIP1p* y para realizar análisis de expresión génica mediante qRT-PCR, los cuales se resumen en la Tabla I a continuación.

Tabla I. Partidores utilizados para los pasos de clonación y análisis molecular de plantas transformantes.

Nombre	Secuencia (5' a 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Nº Acceso	Referencia
AtLIP1expF	TTCTCCTCTTCCTCGGCTGTA ACT	60	NM_127655	Yasuno y Wada, 1998
AtLIP1expR	CTACGGGGATGTAGAAGGAGAAGCC	61		
SILIP1mexpF	GCTACACCAGCATCTCCACCTC	60	XM_004243273	Este estudio
SILIP1mexpR	CTAAGACAACGATGCTGCACGATCAGAT	62		
SILIP1cexpF	CCACCCTCAAATGGGTCCG	56	XM_004252845	Este estudio
SILIP1cexpR	CTATTGTGACATAGTTTGTGCATTTCTG	56		
Sllp1c_F	ATGAATAGGAAGTTTAGCAATATAGCAAACC	56	XM_004252845	Este estudio
Sllp1c_R	CTATTGTGACATAGTTTGTGCATTTCTG	55		
Sllp1c_Rns	TTGTGACATAGTTTGTGCATTTCTG	54		
SI_GAPDH_F	TGTTTAAGTATGATAGTGTACACGGC	56	NM_001279325	Chalupowicz et al., 2010
SI_GAPDH_R	GCTCAAAGCAATCCAGCCTTG	58		
35S_F3	AGAACTCGCCGTAAAGACTGGC	60	AB289771	Este estudio
His3	GCATGATGATGATGATGATGGCTG	58		
Hlgr0_F	TTTGTGTACGCCCGACAGT	57		Este estudio
Hlgr0_R	AAGACCTGCCTGAAACCGA	57		
CmR_F	AGACGGTGAGCTGGTGATATGGGAT	62		Este estudio
ccdB_R	TGATGTCATTTTCGCGGTGGCTGAGA	64		
SI_CAC_F	CCTCCGTTGTGATGTA ACTGG	60	NM_001324017	Expósito-Rodríguez et al., 2008
SI_CAC_R	ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG	60		
qRT-AtLIP1_F	CCTGCAGGCACCTTAACAAAGACT	60	NM_127655	Este estudio
qRT-AtLIP1_R	AAGGCATCTGGTGTACGTA CTCA	61		
qAtLIP1_F2	GTCGTACAAAGCGGGAGAGT	60		
qAtLIP1_R2	GCATGATGATGATGATGATGGCTG	60		
qRT-LIP1m_F	ACCCTAGAGGGATTACGCCA	60	XM_004243273	Este estudio
qRT-LIP1m_R	CTTCGTCCCTACCTCAACCG	60		
qLIP1m_F2	TTCTCGGCACACAAATGGGA	60		
qLIP1m_R2	GCATGATGATGATGATGATGGCTG	60		
qPCR-LIP1c_F	AGAATGTTGGAATGGTGGTGGAGATG	60	XM_004252845	Este estudio
qPCR-LIP1c_R	ATAGGGTCAGGAGGAGCAGGATTC	60		
qLIP1c_F2	TCCCTTGGTTCGATCCTCCT	60		
qLIP1c_R2	GCATGATGATGATGATGATGGCTG	60		
OligoAP	CGCCACGCGTGCAGTACTTTTTTTTTTTT TTTT			

- T<sub>m</sub>: Temperatura de alineamiento de los partidores.

### 2.2.1.2. Programas de PCR para clonación

La generación de los vectores de expresión pDEST-His<sub>6</sub>MBP portadores de *AtLIP1*, *SILIP1* y *SILIP1p* involucró la inicial amplificación de los respectivos fragmentos mediante PCR utilizando *Taq* DNA polymerase (Sigma-Aldrich, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello, cada reacción de PCR consistió en 1 U de *Taq* DNA polymerase (Sigma-Aldrich, Alemania), 0,5  $\mu$ M de cada partidor, dNTPs 200  $\mu$ M de cada uno y 5 ng de ADN plasmidial portador ya sea de *SILIP1*, *SILIP1p* o *AtLIP1* previamente secuenciados (tesis doctoral en curso, Jorge Araya), disuelto en la solución amortiguadora 1X correspondiente en un volumen de reacción de 20  $\mu$ L. El programa de PCR empleado para cada amplicón varió en función de la *T<sub>m</sub>* de los respectivos partidores y de la longitud de la secuencia a amplificar, siguiendo el perfil térmico: 94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 30 s, (*T<sub>m</sub>* – 5)°C por 45 s y 72°C por (1 min por cada kb); 72°C por 5 min y 10°C como temperatura de mantención.

Por su parte, la amplificación de *SILIP1p* necesaria para su clonación en vectores de expresión en plantas, se realizó utilizando Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. De este modo, cada reacción de PCR consistió en 1 U de Herculase II Fusion DNA polymerase, 0,5  $\mu$ M de cada partidor, dNTPs 200  $\mu$ M de cada uno y 50 ng de ADNc proveniente de hoja de tomate (véase sección 2.3.2.5), disuelto en la solución amortiguadora 1X correspondiente en un volumen de reacción de 20  $\mu$ L. El programa de PCR empleado siguió el siguiente perfil térmico: 95°C por 3 min; 40 ciclos de 95°C por 30 s, (52 a 58)°C por 45 s y 72°C por 1 min 30 s; 72°C por 10 min y 10°C como temperatura de mantención.

Tras la optimización de las condiciones de PCR para obtener fragmentos únicos con los respectivos tamaños esperados, se realizó para cada fragmento a clonar una

amplificación por PCR utilizando *Pfu* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Así, cada reacción de PCR consistió en 0,5 U de *Pfu* DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,5  $\mu$ M de cada partidor, dNTPs 200  $\mu$ M de cada uno y 50 ng de ADNc proveniente de hoja de tomate, disuelto en la solución amortiguadora 1X correspondiente en un volumen de reacción de 20  $\mu$ L. El programa de PCR empleado para cada amplicón varió en función de la *T<sub>m</sub>* de los respectivos partidores, de acuerdo a la **Tabla II**.

Tabla II. Programas de PCR realizados para clonación y análisis molecular de plantas.

Programa	Partidores	Descripción	Programa		
			Tª (°C)	Tiempo	Ciclos
AtLIP1	AtLIP1expF y AtLIP1expR	Amplifica un fragmento del CDS de <i>AtLIP1</i> de 1071 pb, correspondientes a la secuencia codificante de la proteína madura <i>AtLIP1</i> para su clonación en vector de destinación pDEST-His <sub>6</sub> MBP y posterior expresión en <i>E. coli lipA</i> KER176.	94*	3'	1
			94*	30"	35
			60	45"	
			72	1'15"*	
			72	5'	1
SILIP1	SILIP1mexpF y SILIP1mexpR	Amplifica un fragmento del CDS de <i>SILIP1</i> de 1053 pb, correspondientes a la secuencia codificante de la potencial proteína madura <i>SILIP1</i> para su clonación en vector de destinación pDEST-His <sub>6</sub> MBP y posterior expresión en <i>E. coli lipA</i> KER176.	94*	3'	1
			94*	30"	35
			60	45"	
			72	1'20"*	
			72	5'	1
SILIP1p-exp	SILIP1cexpF y Sllp1c_R	Amplifica un fragmento del CDS de <i>SILIP1p</i> de 975 pb, correspondientes a la secuencia codificante de la potencial proteína madura <i>SILIP1p</i> para su clonación en vector de destinación pDEST-His <sub>6</sub> MBP y posterior expresión en <i>E. coli lipA</i> KER176.	94*	3'	1
			94*	30"	35
			53,3	45"	
			72	1*	
			72	5'	1
SILIP1p	Sllp1c_F y Sllp1c_Rns	Amplifica el CDS completo de <i>SILIP1p</i> de 1302 pb exceptuando el codón de término de la traducción 5' ATC 3', para su clonación en vectores de destinación pEarleyGate 101 y pGWB8, para su posterior expresión en plantas.	94	3'	1
			94	30"	35
			53,3	45"	
			72	1'30"*	
			72	5'	1
SIGAPDH	SI_GAPDH_F y SI_GAPDH_R	Amplifica un fragmento de 782 ó 2.358 pb de <i>SIGAPDH</i> , utilizando como templado ADNc o ADNg de hoja de tomate, respectivamente. Utilizado para evaluar la integridad del ADNc o ADNg de tomate.	94	5'	1
			94	30"	35
			60	45"	
			72	1'30"	
			72	5'	1
35S-His	35S_F3 y His3	Amplifica un fragmento de 1.746, 1.764, 1.926 ó 2.264 pb para los constructos pGWB8- <i>AtLIP1</i> , - <i>SILIP1</i> , - <i>SILIP1p</i> o sin inserto, respectivamente. Utilizado para evaluar integración de los respectivos constructos en líneas de tomates T0.	94	5'	1
			94	30"	35
			53	45"	
			72	2'30"	
			72	5'	1
HPT	Higro_F e HigroR	Amplifica un fragmento de 386 pb de la secuencia codificante del gen <i>HPT</i> presente en el vector de destinación pGWB8. Permite inferir la inserción de los distintos constructos de interés para su expresión en plantas.	94	5'	1
			94	30"	35
			52	30"	
			72	1'	
			72	5'	1
CmR-ccdB	CmR_F y ccdB_R	Amplifica un fragmento de 1.039 pb, correspondiente a parte del gen codificante para <i>CmR</i> y del gen <i>ccdB</i> , ambos presentes dentro del fragmento de ADN recombinado entre el vector pCR8 y los vectores de destinación Gateway® LR.	94	5'	1
			94	30"	35
			60	50"	
			72	1'	
			72	5'	1

\*: tiempo indicado se duplica en caso de utilizarse enzima *Pfu*, para los pasos de clonación.

### 2.2.1.3. Electroforesis en geles de agarosa

Para verificar la presencia de amplicones derivados de programas de PCR, así como para diferenciar bandas obtenidas tras ensayos de digestión enzimática de ADN plasmidial, se realizaron electroforesis en geles de agarosa. Para ello, se prepararon geles de agarosa a 1% m/v en solución amortiguadora TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Por su parte, para verificar la presencia de amplicones derivados de programas de qRT-PCR, se prepararon geles de agarosa a 3% m/v en la misma solución amortiguadora. Asimismo, en el caso de verificar la integridad de ADN genómico obtenido desde hojas de plantas de *S. lycopersicum* transgénicas, se prepararon geles de agarosa a 0,8% m/v en solución amortiguadora TAE 1X. En todos los casos anteriores, se colocaron los geles en una cámara electroforética embebida en TAE 1X y en seguida se cargaron de 10 a 20  $\mu$ L de muestra pre-mezclada con una solución amortiguadora de carga (azul de bromofenol 0,25% m/v, xilencianol 0,25% m/v y glicerol 80% v/v disueltos en TAE 1X). Todas las electroforesis en geles de agarosa fueron realizadas estableciendo una diferencia de potencial eléctrico constante a 90 V durante 50 a 90 min, o hasta que los colorantes presentes en la solución amortiguadora de carga dividieran el gel en aproximadamente tres partes equivalentes. A continuación, se procedió al revelado de los geles embebiéndolos en una solución de bromuro de etidio a 1 mg/L durante aproximadamente 20 min, tras lo cual fueron embebidos en agua destilada por 10 min. Finalmente, los geles teñidos con bromuro de etidio fueron visualizados en transiluminador excitando por entre 200 a 400 ms con luz UV y fotografiados en tales condiciones mediante el software GeneSnap (Syngene, USA).

#### **2.2.1.4. Purificación de ADN desde bandas de gel de agarosa**

La purificación de ADN proveniente de cada amplificación con *Pfu* DNA Polymerase se realizó mediante Wizard SV Gel and PCR Clean – up System (Promega Corporation, EE.UU.). Brevemente, se añadieron 10  $\mu$ L de solución de unión a membrana por cada 10 mg de gel. Se realizó una agitación de 10 s en vórtex y se incubó a 65°C por 10 min.

Luego, se transfirió la mezcla del gel disuelto a un sistema consistente en una columna puesta sobre un tubo colector, previamente enfriados. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min y luego se centrifugó a 16.000 $\times$ g por 1 min, descartando el eluido. En seguida, se añadieron 700  $\mu$ L de solución de lavado y se centrifugó a 16.000 $\times$ g por 1 min, descartando nuevamente el eluido. Este paso de lavado se repitió una vez más con 500  $\mu$ L de solución de lavado, centrifugando a 16.000 $\times$ g por 5 min. Se centrifugó una vez más a 16.000 $\times$ g por 1 min para permitir la evaporación de cualquier traza de etanol residual, y luego se transfirió la columna a un tubo de 1,5 mL limpio. Se añadieron 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 16.000 $\times$ g por 1 min. Se descartó la columna y se almacenó el ADN obtenido a -20°C para su procesamiento posterior.

#### **2.2.1.5. Purificación de ADN plasmidial**

Durante el proceso de clonación de los vectores de expresión a utilizar se realizaron extracciones de ADN plasmidial de aquellos clones que resultaron positivos para la presencia del gen de interés tanto en los vectores de entrada como de destinación. Lo anterior se llevó a cabo mediante el uso de GeneJET Plasmid Miniprep kit (Thermo Fisher Scientific, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, cultivos de noche de 5 mL de cada clon fueron centrifugados a 13.000 $\times$ g por 1 min para obtener

un sedimento de células, cada uno de los cuales fue resuspendido en 250  $\mu$ L de Resuspension Buffer y transferido a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. En seguida, a cada tubo se agregaron 250  $\mu$ L de Lysis Buffer y se agitaron de 4 a 6 veces. Posteriormente, se agregaron 350  $\mu$ L de Neutralization Buffer y se agitaron de 6 a 8 veces. A continuación, los tubos fueron centrifugados a 13.000 $\times$ g por 5 min, y el sobrenadante fue transferido a un sistema de columnas en tubos colectores. Nuevamente fueron centrifugados a 13.000 $\times$ g por 1 min, posterior a lo cual se realizaron dos lavados con el fin de eliminar contaminantes, para lo cual se agregaron en cada ocasión 500  $\mu$ L de Wash Solution y en cada oportunidad se centrifugó a 13.000 $\times$ g por 1 min y se descartó el eluido. Finalmente, cada columna fue transferida a respectivos tubos de microcentrífuga de 1,5 mL limpios y se agregaron 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, centrifugando a 16.000 $\times$ g por 2 min a temperatura ambiente. Tales minipreparaciones así obtenidas fueron cuantificadas (véase sección 2.2.1.6) y almacenada a -20°C para posteriores análisis.

#### **2.2.1.6. Cuantificación de ácidos nucleicos**

La cuantificación de los ácidos nucleicos provenientes de las purificaciones de ADN desde bandas de gel de agarosa, así como de extracciones de ADN genómico o ARN de *N. tabacum* o *S. lycopersicum* cv. Micro-tom y de ADN plasmidial purificado fue realizada por espectrometría a 260 nm, mediante NanoVue (GE Healthcare Life Sciences, USA). Con ello, para cada muestra se midió la absorbancia en un rango de 230 a 320 nm, otorgando los índices 260/280 nm y 260/230 nm, para evaluar la pureza tanto de ADN como de ARN.

### 2.2.1.7. Generación de vectores de entrada portadores de los genes de interés para análisis en bacterias y plantas

En primer lugar, se realizaron los respectivos programas de PCR para amplificar *AtLIP1*, *SILIP1* o *SILIP1p* (véase sección 2.2.1.2) con los partidores específicos diseñados (véase sección 2.2.1.1) tanto para la obtención de vectores de expresión pDEST-His<sub>6</sub>MBP como para la generación de vectores de expresión en plantas, y se corrieron los respectivos productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (véase sección 2.2.1.3). A continuación, se realizó en cada caso un 3' Tailing en una reacción que contenía 50 a 150 ng del producto de purificación desde gel de agarosa (véase sección 2.2.1.4), 1 U de *Paq* DNA Polymerase (Agilent Technologies, USA) y dATP 200  $\mu$ M, disueltos en solución amortiguadora 1X en un volumen de 10  $\mu$ L, incubando la reacción a 70°C por 30 min. Cada fragmento así tratado fue clonado en el vector de entrada pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO® en una reacción de 6  $\mu$ L que contenía aproximadamente 120 ng del fragmento purificado con 3'A añadido y 1  $\mu$ L de vector pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO® en una solución salina (NaCl 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM). Para producir la topoisomerización de cada fragmento de interés en el vector de entrada, se incubó por 30 min a 1 h a temperatura ambiente, tras lo cual la reacción de topoisomerización se incubó con un vial de células *E. coli* OneShot® TOP10 quimiocompetentes por 30 min en hielo. Posteriormente, se procedió a la transformación mediante golpe térmico (véase sección 2.1.2).

Para cada transformación, las colonias obtenidas en placas con LB agar suplementadas con espectinomicina 100  $\mu$ g/mL fueron analizadas mediante PCR de colonia para cada gen de interés (véase sección 2.3.1.1), y aquellas que resultaron positivas fueron crecidas en medio LB líquido suplementado con espectinomicina 100  $\mu$ g/mL por 16 h a 37°C en agitación a 180 rpm. Posteriormente, se guardó un stock de

glicerol en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL de dichos cultivos en glicerol 30% v/v y se almacenaron a -80°C. Paralelamente, se purificó el ADN plasmidial del volumen restante de cada cultivo y se realizaron análisis de restricción enzimática y secuenciación (véanse secciones 2.2.1.5, 2.3.1.2 y 2.3.1.3, respectivamente). Con dichos resultados se seleccionaron los clones adecuados para los procedimientos posteriores.

#### **2.2.1.8. Generación de vectores de expresión portadores de los genes de interés para análisis en bacterias y plantas**

Con los clones seleccionados en la etapa anterior (véase sección 2.2.1.7) para pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO@-AtLIP1, pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO@-SILIP1 y pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO@-SILIP1p para la expresión de *AtLIP1*, *SILIP1* y *SILIP1p* en *E. coli lipA* KER176, así como con los clones seleccionados de pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO@-SILIP1p para la expresión ya sea transitoria de *SILIP1p* en *N. tabacum* o estable en *S. lycopersicum* cv. Microtom, se procedió a la generación de los respectivos vectores de expresión utilizando ya sea pDEST-His<sub>6</sub>MBP, pEarleyGate 101 ó pGWB8 según la estrategia de clonación previamente descrita (véase sección 2.2.1). Para ello, se realizaron las correspondientes recombinaciones homólogas entre el vector de entrada pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO@ con los vectores de destinación ya mencionados utilizando la tecnología Gateway® (Hartley et al., 2000).

Con este objetivo, se realizaron reacciones de recombinación LR entre los vectores de entrada y destinación respectivos. Así, cada reacción se llevó a cabo en un volumen total de 10 µL, y estuvo compuesta de: 300 ng de vector de entrada portador de cada gen de interés, aproximadamente 100 ng del vector de destinación respectivo, 2 µL de LR Clonase<sup>TM</sup> Enzyme Mix, 1X de LR Clonase<sup>TM</sup> Reaction Buffer, además de

una solución amortiguadora TE (EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8). Cada reacción se incubó a temperatura ambiente por 16 h, y luego fue almacenada a -20°C para su posterior uso o fue directamente utilizada para transformar células *E. coli* OneShot® TOP10 quimiocompetentes según se describiera previamente (véase sección 2.1.2). Luego, cada reacción fue sembrada en placas con LB agar suplementado con el antibiótico correspondiente: ampicilina 100 µg/mL para pDEST-His<sub>6</sub>MBP o kanamicina 100 µg/mL para pEarleyGate 101 o para pGWB8. Se incubaron a 37°C por 16 h y las colonias transformantes obtenidas fueron analizadas por PCR de colonia (véase sección 2.3.1.1) y aquellas que resultaron positivas fueron crecidas en medio LB líquido suplementado con los respectivos antibióticos de selección de plasmidio para realizar la correspondiente purificación de ADN plasmidial y análisis de restricción enzimática (véanse secciones 2.2.1.5, 2.3.1.2 y 2.3.1.3, respectivamente).

Tras dichos análisis, se seleccionaron aquellos clones representativos de los constructos de expresión en *E. coli lipA* KER176, a saber: pDEST-His<sub>6</sub>MBP-AtLIP1, pDEST-His<sub>6</sub>MBP-SILIP1 y pDEST-His<sub>6</sub>MBP-SILIP1p. Del mismo modo, se seleccionaron aquéllos representativos de los vectores de expresión en plantas, que son: pEarleyGate 101-SILIP1p, para la transformación transitoria de hojas de *N. tabacum*; y pGWB8-SILIP1p, para la transformación estable de explantes de *S. lycopersicum* cv. Micro-tom.

## **2.2.2. Transformación de plantas**

### **2.2.2.1. Transformación transitoria de *Nicotiana tabacum***

La transformación transitoria de *N. tabacum* se llevó a cabo mediante infiltración de hojas de tres semanas de edad crecidas en invernadero en condiciones controladas (véase sección 2.1.3), siguiendo un protocolo estándar descrito previamente (Sparkes

et al., 2006). Brevemente, se utilizaron los clones de *A. tumefaciens* EHA105 portadores ya sea del vector pEarleyGate 101-SILIP1p, pEarleyGate 101 sin inserto o pBI121-RecA (obtenido por gentileza de Dra. Lee Meisel, perteneciente al Laboratorio de Genética Vegetal), los cuales fueron utilizados como control negativo y positivo de la transformación transitoria, respectivamente. Para ello, cada clon fue crecido en medio LB líquido suplementado con rifampicina 10 µg/mL para la selección de *A. tumefaciens* y con kanamicina 100 µg/mL para la selección del vector pEarleyGate 101 o con espectinomicina 100 µg/mL para la selección del vector pBI121, y dichos cultivos fueron crecidos a 28°C en agitación a 180 rpm por 16 h, tras lo cual fueron sedimentados a 1.000×g por 10 min a temperatura ambiente y resuspendidos en un medio de infiltración (MES 50 mM, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2 mM, D-glucosa 0,5% m/v y acetosiringona 100 µM) hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> = 0,1. A continuación, tres plantas de tabacos distintas para cada construcción fueron infiltradas en la cara abaxial de la tercera o cuarta hoja desde el meristema apical mediante jeringa, de modo tal que en cada hoja infiltrada hubiera representación de los tres constructos a estudiar. Posteriormente, las plantas infiltradas fueron mantenidas en las mismas condiciones de crecimiento anteriores, y secciones de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de cada infiltración fueron analizadas por microscopía confocal LSM Zeiss 510 tras 2 a 3 dpi.

#### **2.2.2.2. Transformación estable de *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom**

Para evaluar los efectos de la sobre-expresión de las potenciales lipoil sintasas de tomate SILIP1 y SILIP1p, se siguió un protocolo de transformación de explantes provenientes de cotiledones descrito previamente (Pino et al., 2010) con ciertas modificaciones. Para ello, en primer lugar los cotiledones de plántulas de 8 a 10 días de edad crecidas en condiciones *in vitro* (véase sección 2.1.3) fueron aislados y sus

extremos proximales y distales removidos, de modo de dividir cada cotiledón transversalmente en dos porciones. Luego, los explantes así obtenidos fueron sumergidos en una solución de medio MS líquido [Murashige & Skoog con vitaminas (PhytoTechnologies Laboratories, USA) 0,44% m/v, pH 5,8] para evitar su deshidratación. Posteriormente, se co-cultivaron aproximadamente 50 explantes por constructo con cultivos de *A. tumefaciens* EHA105 portadores de los constructos pGWB8-SILIP1 (obtenido en la Tesis Doctoral en curso de Jorge Araya), pGWB8-SILIP1p (obtenido en la presente tesis), pGWB8 sin inserto y pGWB8-AtLIP1 (obtenido en la Tesis Doctoral en curso de Jorge Araya); estos últimos fueron utilizados como control negativo y positivo de la transformación estable, respectivamente. Para ello, un cultivo líquido de noche de cada clon de *A. tumefaciens* EHA105 crecido en medio LB líquido suplementado con rifampicina 10 µg/mL y kanamicina 100 µg/mL, fue sedimentado a 3.000×g por 10 min a temperatura ambiente y, a continuación, fue resuspendido en medio de transformación (Murashige & Skoog con vitaminas 0,44% m/v y acetosiringona 100 µM, pH 5,8) hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> = 0,3 y fue incubado a 28°C en agitación a 180 rpm por 1 h, tras lo cual se procedió al co-cultivo con explantes de cotiledones de la forma mencionada previamente. Posteriormente, éstos fueron secados en papel absorbente estéril, y fueron en seguida ubicados en placas Petri con su cara abaxial en contacto con el medio de co-cultivo (Murashige & Skoog con vitaminas 0,44% m/v, acetosiringona 100 µM, NAA 0,4 µM, sacarosa 3% m/v y Phytoagar 0,6% m/v, pH 5,8). Tales placas fueron mantenidas en oscuridad a 25°C por 48 h, tras lo cual los explantes fueron transferidos a placas Petri que contenían un medio de inducción de brotes (Murashige & Skoog con vitaminas 0,44% m/v, sacarosa 3% m/v, mio-inositol 0,01% m/v, trans-zeatina 2 mg/L, higromicina 5 mg/L, timentín 400 mg/L y Phytoagar 0,6% m/v, pH 5,8) y mantenidos en cámaras de cultivo con

fotoperíodo largo 16 h luz y 8 h oscuridad, a 25°C hasta la aparición de brotes, con recambio de medio de inducción cada 3 semanas.

Cuando los brotes generados alcanzaron aproximadamente 1 cm de altura, fueron transferidos a placas Petri que contenían medio de elongación de brotes (Murashige & Skoog con vitaminas 0,44% m/v, sacarosa 3% m/v, mio-inositol 0,01% m/v, trans-zeatina 1 mg/L, higromicina 5 mg/L, timentín 400 mg/L y Phytoagar 0,6% m/v, pH 5,8) y mantenidos en las condiciones de cultivo descritas previamente. Cuando los explantes alcanzaron aproximadamente 5 cm de altura, fueron transferidos a frascos Incu Tissue® (SPL Life Sciences, Korea del Sur) que contenía el mismo medio de elongación, el cual era recambiado cada 3 semanas. Tras aproximadamente dos meses, los brotes mejor desarrollados fueron transferidos a cajas Magenta® (SPL Enterprises, Korea) que contenían medio de enraizamiento (Murashige & Skoog con vitaminas 0,22% m/v, sacarosa 1,5% m/v, ácido indolbutírico IBA 5 mg/L, higromicina 2,5 mg/L, timentín 400 mg/L y Phytoagar 0,6% m/v, pH 5,8) y mantenidos por aproximadamente 2 semanas o hasta que aparecieran raíces de cerca de 5 cm de largo. Todo el procedimiento anterior fue realizado en triplicado y en condiciones de esterilidad bajo cámara de flujo laminar. Finalmente, las plántulas de tomate T0 regeneradas mediante la metodología previamente descrita fueron transferidas a una mezcla de turba : perlita : vermiculita en proporción 3:1:1, dispuestas en maceteros plásticos translúcidos cubiertos con Alusplast para su aclimatación por 1 mes, regadas con medio hidropónico (KNO<sub>3</sub> 1,25 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,75 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 50 µM, MnSO<sub>4</sub> 10 µM, ZnSO<sub>4</sub> 2 µM, CuSO<sub>4</sub> 1,5 µM, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 0,075 µM, Na<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Si 0,1 mM, pentaacetato de hierro dietilentriamina, pH 6) una vez por semana y mantenidas en condiciones de cultivo controladas (véase sección 2.1.3).

## 2.3. Análisis

### 2.3.1. Análisis en bacterias:

#### 2.3.1.1. PCR de colonia

Para analizar las colonias transformantes procedentes de los pasos de clonación tanto en pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO® (véase sección 2.2.1.7) como en pDEST-His<sub>6</sub>MBP, pEarleyGate 101 y pGWB8 (véase sección 2.2.1.8), así como en el análisis de las colonias de *A. tumefaciens* EHA105 y *E. coli lipA* KER176 (véase sección 2.1.2) transformadas con los vectores de expresión respectivos (véase sección 2.2.1), se realizó el programa de PCR de colonia descrito a continuación.

Se eligieron 10 colonias aisladas para cada constructo en cada paso de clonación en los vectores de entrada y destinación previamente mencionados o 2 colonias aisladas para analizar los vectores de expresión obtenidos en *A. tumefaciens* EHA105 o *E. coli lipA* KER176, y en cada caso se resuspendieron en 10 µL de agua estéril. Luego, se incubaron a 95°C por 5 min, tras lo cual se centrifugaron a 14.000 rpm por 5 min para sedimentar los restos celulares de cada colonia inoculada. Finalmente, cada reacción de PCR constó de 1 U de *Taq* DNA polymerase, 0,5 µM de cada partidor, dNTPs 200 µM de cada uno y 5 µL de cada sobrenadante obtenido tras la centrifugación antes mencionada, disuelto en la solución amortiguadora 1X correspondiente en un volumen de reacción de 20 µL. El programa de PCR empleado para cada amplicón varió en función de la *T<sub>m</sub>* de los respectivos partidores y de la longitud de la secuencia a amplificar, siguiendo el perfil térmico: 94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 30 s, (*T<sub>m</sub>* - 5) °C por 45 s y 72°C por (1 min por cada kb); 72°C por 5 min y 10°C como temperatura de mantención.

### 2.3.1.2. Digestión enzimática de ADN plasmidial

Luego de cada paso de clonación tanto en los vectores de entrada como de destinación (véanse secciones 2.2.1.7 y 2.2.1.8) se realizó un análisis del ADN plasmidial incorporado tras la transformación por golpe térmico de *E. coli* OneShot® TOP10, ya sea para analizar el sentido de topoisomerización de los fragmentos clonados, en el caso de pCR™8/GW/TOPO® o para verificar la correcta recombinación en los casos de los vectores de destinación pDEST-His<sub>6</sub>MBP, pEarleyGate 101 y pGWB8. Para ello, se realizó un análisis *in silico* mediante el programa SnapGene v. 2.3.2 de cada vector generado, y se eligieron las enzimas de restricción a partir de la capacidad para obtener fragmentos diferenciables en gel de agarosa y de generar patrones de digestión discernibles para cada caso.

Así, se obtuvieron las siguientes combinaciones para cada vector: Nco I y Ava I (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) para digerir el vector pCR™8/GW/TOPO® portador de *SILIP1p*; Ava II (Thermo Fisher Scientific, USA) para digerir todos los vectores portadores de *AtLIP1*, *SILIP1* y *SILIP1p* para su expresión en *E. coli lipA* KER176 (véanse secciones 2.2.1.7 y 2.2.1.8); y Nco I para el vector de destinación pGWB8 portador de *SILIP1p*.

Cada reacción de digestión simple consistió en 5 U de enzima y 1 µg de ADN plasmidial previamente obtenido por minipreparación por kit comercial (véase sección 2.2.1.5), disueltos en una solución amortiguadora Tango™ 1X (Tris-acetato 33 mM pH 7,9, acetato de magnesio 10 mM, acetato de potasio 66 mM y seroalbúmina bovina BSA 0,1 mg·mL<sup>-1</sup>). Por su parte, cada reacción de digestión doble se realizó en reacciones de igual composición que la descrita anteriormente, con la excepción de que se utilizó la solución amortiguadora Tango™ a una concentración 2X. Todas las reacciones de digestión enzimática se realizaron según las instrucciones del fabricante,

esto es a 37°C por 1 a 16 h y posterior inactivación a 65°C por 15'. Luego, cada reacción fue analizada mediante electroforesis en geles de agarosa como se describiera previamente (véase sección 2.2.1.3).

#### **2.3.1.3. Secuenciación**

Tras los análisis previos del vector de entrada pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO® mediante digestión enzimática (véase sección 2.3.1.2), al menos 3 clones independientes para cada constructo fue secuenciado en MacroGen USA utilizando los partidores M13 F y M13 R – pUC universales. Posteriormente, los resultados de secuenciación fueron analizados mediante el programa Snappene v. 2.3.2, contrastándolos con los vectores de entrada generados *in silico* a partir de las secuencias respectivas depositadas en la base de datos de NCBI (véase sección 2.2.1.7). De tal forma, se seleccionó para cada constructo aquel clon que presentara 100% de identidad nucleotídica con la secuencia de referencia respectiva, en toda su extensión.

#### **2.3.1.4. Expresión de His<sub>6</sub>MBP-AtLIP1, -SILIP1 y -SILIP1p en *E. coli lipA* KER 176 y extracción de proteínas totales**

Para inducir la expresión de las proteínas de fusión His<sub>6</sub>MBP-AtLIP1, His<sub>6</sub>MBP-SILIP1 y His<sub>6</sub>MBP-SILIP1p en la cepa de *E. coli lipA* KER 176 transformadas respectivamente con los vectores pDEST-His<sub>6</sub>MBP-AtLIP1, pDEST-His<sub>6</sub>MBP-SILIP1, pDEST-His<sub>6</sub>MBP-SILIP1p y pDEST-His<sub>6</sub>MBP-CYS (gentileza de Uri Aceituno, CBMV) utilizada como control, se inoculó una colonia aislada proveniente de medio RB sólido suplementado con ampicilina 100 µg/mL en 5 mL de medio RB líquido con la misma selección y se cultivaron toda la noche a 37°C con agitación a 180 rpm.

Al día siguiente, se inocularon 500 µL del cultivo de noche en 50 mL de medio RB líquido suplementado con ampicilina a 100 µg/mL y se cultivaron a 37°C con

agitación a 180 rpm hasta alcanzar una  $OD_{600} = 0,5$ . Luego, se dividió cada cultivo en dos partes iguales, agregando IPTG 1 mM a una de ellas y agregando el mismo volumen de agua sin IPTG en la parte utilizada como control. En seguida se crecieron a 28°C en agitación a 180 rpm por 4 h, posterior a lo cual se sedimentaron las células centrifugando a 5.000×g por 5 min y se almacenaron a -80°C hasta realizar la extracción de proteínas totales respectiva.

Para la extracción de proteínas totales, cada sedimento de células KER176 con los constructos de interés y el control tanto sometidas como no sometidas a inducción por IPTG fue resuspendido en 2 mL de B-PER Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) suplementado con 0,2 mg de lisozima (Thermo Fisher Scientific, USA) y 4 U de DNasa I (Thermo Fisher Scientific, USA) e incubado a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 15.000×g por 5 min y se recuperó cada sobrenadante, almacenándolos a 4°C para análisis posteriores.

#### **2.3.1.5. Cuantificación de proteínas**

Para cuantificar los extractos crudos de proteínas provenientes de clones de *E. coli lipA* KER176 portadores de los vectores de expresión pDEST-His<sub>6</sub>MBP con los insertos *AtLIP1*, *SILIP1* y *SILIP1p* y control, y para cuantificar proteínas provenientes de extractos crudos de plantas transformantes con pGWB8 portadores de *AtLIP1*, *SILIP1*, *SILIP1p* y sin inserto, se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello, se realizó una curva de calibración entre 1 y 10 µg de BSA mediante el uso del reactivo de Bradford (azul de Coomassie 10% m/v, etanol 5% v/v, ácido fosfórico 8,5% v/v). Para tal efecto, se midió la absorbancia a 595 nm de cada punto de calibración con BSA y se realizó un gráfico de dispersión para relacionar la dependencia de la absorbancia en función de la cantidad de BSA presente. La regresión lineal así obtenida se utilizó para

calcular las concentraciones de las posteriores extracciones de proteínas desde *E. coli* KER176 y desde hojas de tabaco y tomate transformadas transitoria y establemente con los constructos respectivos. Para cada medición, tanto para la confección de la curva de calibración como para la medición de extractos crudos de proteínas, se cargaron 5  $\mu$ L de muestra en reactivo de Bradford 1X, rasando en 1 mL con agua destilada.

#### **2.3.1.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE)**

Para resolver por peso molecular las distintas proteínas extraídas tanto de *E. coli lipA* KER176 (véase 2.3.1.4) como de hojas de tabaco y tomate transformadas transitoria y establemente (véase sección 2.3.2.6), respectivamente, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes. Para ello, se realizó el gel separador al 10% de acrilamida/bis-acrilamida, utilizando 2,1 mL de agua destilada, 1,7 mL de una solución de acrilamida 30%/bis-acrilamida 0,8% m/v, 1,2 mL de solución amortiguadora Tris-HCl 1,5 M a pH 8,8, 25  $\mu$ L de una solución de SDS 20% m/v, 2  $\mu$ L TEMED y 75  $\mu$ L de una solución APS 10% m/v. Por su parte, el gel concentrador fue preparado al 5%, para lo cual se utilizó 1,75 mL de agua destilada, 500  $\mu$ L de una solución de acrilamida 30%/bis-acrilamida 0,8% m/v, 750  $\mu$ L de solución amortiguadora Tris-HCl 0,5 M a pH 6,8, 12,5  $\mu$ L de una solución de SDS 20% m/v, 3  $\mu$ L de TEMED y 30  $\mu$ L de una solución APS 10% m/v. Los geles fueron preparados en una cámara electroforética vertical con un grosor de gel de 1 mm (Biorad) y se cargaron con 20 a 25  $\mu$ g de proteínas provenientes de extractos crudos resuspendidos en un buffer de carga denaturante 1X (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 20% v/v,  $\beta$ -mercaptoetanol 2% v/v, azul de bromofenol 0,1% m/v y SDS 4% m/v), tras ser incubados a 85°C por 15

min. El buffer de corrida utilizado correspondía a una solución de Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 192 mM y SDS 0,1% m/v. Cada gel se corrió a 80 V por 30 min y luego a 100 V por aproximadamente 3 h o hasta que el frente de migración coloreado hubiese llegado al límite inferior del gel. Posteriormente, los geles de poliacrilamida fueron revelados con tinción de Coomassie (Coomassie R-250 0,3% m/v, metanol 50% v/v, ácido acético glacial 10% v/v; Meyer y Lamberts, 1965) por 1 h en agitación suave, tras lo cual se incubaron en solución de desteñido (metanol 20% v/v y ácido acético glacial 10% v/v) por 1 a 16 h en agitación suave.

#### **2.3.1.7. Inmunodetección del epítipo de hexahistidina mediante *western blot***

Luego de realizar el SDS-PAGE (véase sección 3.3.1.6), las proteínas ya resueltas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con poros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Thermo Fisher Scientific). Para ello, se embebió el gel, los papeles filtro Whatman 1 y la membrana de nitrocelulosa en una solución amortiguadora de transferencia (Tris-HCl 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,0375% m/v, metanol 20% v/v) y se aplicó una diferencia de potencial eléctrico de 15 V durante 20 min. Para corroborar la transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa, ésta fue teñida por 5 s con una solución de rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0,1% m/v, ácido acético 5% v/v). En seguida, se lavó con una solución de TBS-T (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 140 mM, Tween 20 0,05% v/v) hasta obtener una total decoloración. Luego, se bloqueó la membrana de nitrocelulosa con una solución TBS-T 0,05% con leche descremada 5% v/v (Svelty, Nestlé, Chile) durante 1 h a temperatura ambiente a 20 rpm. A continuación, la membrana fue lavada tres veces con una solución TBS-T 0,05% v/v durante 5 min cada vez en igual condición de temperatura y agitación, para ser incubada con el

anticuerpo primario anti-polihistidina monoclonal de ratón (Sigma-Aldrich, Alemania, hibridoma HIS-1, código H1029) diluido 1:3.000 en una solución de TBS-T 0,05% v/v con leche descremada 5% v/v durante la noche a 4°C sin agitación. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con una solución TBT-T 0,05% v/v de 10 min cada vez, y en seguida se incubó con el antisuero policlonal secundario anti-IgG de ratón fusionado a fosfatasa alcalina producida en cabra (Sigma-Aldrich, Alemania, código A4187) diluido 1:10.000 en una solución de TBS-T 0,05% v/v con leche descremada 5% v/v por 1 h a temperatura ambiente con agitación a 20 rpm. Luego, la membrana fue lavada tres veces en una solución TBS-T 0,05% v/v por 10 min cada vez en iguales condiciones de temperatura y agitación, tras lo cual se realizaron otros dos lavados en una solución amortiguadora alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) por 5 min cada vez, nuevamente a temperatura ambiente y en agitación a 20 rpm. Finalmente, la membrana de nitrocelulosa fue incubada en una solución de revelado (NBT 330 ng/mL y BCIP 165 ng/mL en solución amortiguadora alcalina descrita previamente) por 30 s o hasta la aparición de bandas, a temperatura ambiente y en oscuridad. Esta reacción fue detenida al incubar la membrana en una solución de EDTA 20 mM.

#### **2.3.1.8. Complementación heteróloga**

El ensayo de complementación heteróloga para evaluar la funcionalidad de las potenciales lipoil sintasas SILIP1 y SILIP1p se realizó siguiendo un protocolo estándar descrito previamente (Zhao et al., 2004).

Brevemente, un clon representativo de *E. coli lipA* KER176 portador respectivamente del vector pDEST-His<sub>6</sub>MBP-AtLIP1, pDEST-His<sub>6</sub>MBP-SILIP1, pDEST-His<sub>6</sub>MBP-SILIP1p y control aislado de placas Petri que contenían medio RB sólido

suplementado con kanamicina 50 µg/mL y ampicilina 100 µg/mL fue inoculado en 5 mL de medio RB líquido con la misma selección, y en seguida fueron cultivados a 37°C en agitación a 180 rpm por 16 h. Luego, se re-inocularon 500 µL de cada cultivo de noche en 5 mL de medio RB líquido con la selección previamente descrita, y se incubaron hasta que cada cultivo alcanzara una  $OD_{600} = 0,6$ . A continuación, se separaron en volúmenes iguales cada cultivo y se agregó IPTG 1 mM a una de las muestras para cada constructo, dejando un control al que se agregó el mismo volumen de agua estéril sin IPTG. En seguida, se incubaron a 28°C en agitación a 180 rpm por 4 h, tras lo cual los cultivos fueron sedimentados a 1.000xg por 10 min y lavados en dos ocasiones con agua destilada estéril con respectivos pasos de centrifugación a 1.000xg por 5 min. Finalmente, las células de cada cultivo fueron resuspendidas en agua destilada estéril hasta alcanzar una  $OD_{600} = 0,05$ . Luego, un inóculo de 10 µL de cada uno de los cuatro cultivos inducidos por IPTG y su respectivo control sin inducción fue sembrado en dos series de tres placas Petri con medio mínimo MME (ácido cítrico 2% m/v,  $K_2HPO_4$  1% m/v,  $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$  0,35% m/v, glucosa 0,2% m/v,  $MgSO_4$  1 mM, agar 1,5% m/v), cada una de las cuales fue suplementada con acetato 5 mM y succinato 5 mM (de aquí en más, placa MME+AS), ácido lipoico 250 nM (de aquí en más, placa MME+AL) o sin suplemento (de aquí en adelante, placa MME). Las placas fueron mantenidas a 28°C por 3 días.

### **2.3.2. Análisis en plantas:**

#### **2.3.2.1. Extracción de ADN genómico desde tejido vegetal**

La extracción de ADN genómico proveniente de hojas de *S. lycopersicum* cv. Microtom de plántulas T0 regeneradas tras su transformación estable, así como de hojas de *N. tabacum* transformadas transitoriamente se realizó siguiendo un protocolo descrito

previamente (Lodhi, 1994). Para ello, aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de tejido vegetal congelado en N<sub>2</sub> líquido y pulverizado con mortero fue homogenizado con 700 µL de solución amortiguadora CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio [CTAB] 2% m/v, Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M y β-mercaptoetanol 0,2% v/v, pH 8) previamente calentado a 60°C.

A continuación, las muestras fueron incubadas en un baño termostático a 60°C por 25 min en agitación a 700 rpm y luego fueron enfriadas en hielo y mezcladas en frío mediante vórtex con 700 µL de una solución de cloroformo : alcohol isoamílico en proporción 24:1. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 rpm por 15 min y cada sobrenadante fue transferido a tubos de microcentrifuga de 1,5 mL conteniendo 200 µL de NaCl 5 M, a los cuales se agregaron 900 µL de etanol absoluto pre-enfriado en hielo. Posteriormente, las muestras fueron incubadas a -20°C por 2 h, y luego se centrifugaron a 3.000 rpm por 3 min, seguido de una centrifugación de 6.000 rpm por 3 min. A continuación, los respectivos sobrenadantes fueron descartados y cada sedimento de ADN así obtenido fue lavado con 500 µL de etanol 80% v/v y centrifugado a 11.000 rpm por 5 min, dejando secar a temperatura ambiente por 10 min para eliminar trazas de etanol. Finalmente, cada muestra fue resuspendida en 20 µL de agua ultrapura libre de nucleasas (Winkler, Chile) e incubada con 1 U de RNAsa A (Thermo Fisher Scientific, USA) a 37°C por 30 min, posterior a lo cual se congeló a -20°C o se procedió directamente a su cuantificación (véase sección 2.2.1.6) y a sus respectivos análisis (véanse sección 2.3.2.3 y 2.3.2.4).

### **2.3.2.2. Extracción de ARN total desde tejido vegetal**

La extracción de ARN total a partir de hojas de *S. lycopersicum* cv. Micro-tom y *N. tabacum* tanto silvestres como aquellos transformados de manera estable o transitoria,

respectivamente, fue realizado mediante el uso de TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para ello, 100 mg de tejido vegetal fue congelado en N<sub>2</sub> líquido y pulverizado en mortero, tras lo cual cada muestra se homogenizó con 1 mL de TRIzol Reagent y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Luego, se agregó a cada tubo 200 µL de cloroformo y se mezcló vigorosamente a mano por 15 s, tras lo cual se centrifugó a 12.000×g por 15 min a 4°C. El sobrenadante de cada muestra fue transferido a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL pre-enfriado en hielo, y se agregó a cada muestra 500 µL de isopropanol absoluto pre-enfriado en hielo, permitiendo la precipitación de ARN a temperatura ambiente por 10 min. A continuación, se centrifugaron a 12.000 g por 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante.

De este modo, cada sedimento que contenía ARN fue lavado en dos ocasiones con etanol 75% v/v preparado con agua nanopura pretratada con DEPC 0,1% v/v por 1 h a 37°C y luego autoclavada. Para ello, se agregó a cada muestra 1 mL de etanol 75%, se centrifugó a 7.500×g por 5 min a 4°C y en seguida se descartó el sobrenadante, repitiendo esta operación en dos ocasiones. Finalmente, se dejaron secar las muestras a temperatura ambiente, tras lo cual se agregaron 20 µL de agua destilada.

### **2.3.2.3. Visualización de integridad de ADN genómico y ARN total extraído desde tejido vegetal**

Con el fin de visualizar la integridad del ADN genómico extraído de material vegetal (véase sección 2.3.2.1), se prepararon geles de agarosa 0,8% m/v en solución amortiguadora TAE 1X. Luego, se procedió a colocar los geles de agarosa en una cámara electroforética embebida en TAE 1X y en seguida se cargó el volumen

equivalente a 200 ng de muestra pre-mezclada con una solución amortiguadora de carga 1X (azul de bromofenol 0,25% m/v, xilencianol 0,25% m/v y glicerol 80% v/v disueltos en TAE 1X). Dichos geles de agarosa fueron realizados estableciendo una diferencia de potencial eléctrico constante a 100 V durante 40 min, o hasta que los colorantes presentes en la solución amortiguadora de carga dividieran el gel en aproximadamente tres partes equivalentes. A continuación, se procedió al revelado de los geles embebiéndolos en una solución de bromuro de etidio a  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  durante aproximadamente 20 min, tras lo cual fueron embebidos en agua destilada por 10 min. Finalmente, los geles teñidos con bromuro de etidio fueron visualizados en transiluminador excitando por entre 200 a 400 ms con luz UV y fotografiados en tales condiciones mediante el software GeneSnap (Syngene, USA).

Por su parte, la integridad del ARN total extraído desde tejido vegetal (véase sección 2.3.2.2) fue analizada mediante geles de agarosa en condiciones denaturantes (Sambrook et al., 1989). Para ello,  $1 \mu\text{g}$  de cada muestra de ARN fue mezclado con un volumen equivalente de solución amortiguadora de carga denaturante (formamida 100%, azul de bromofenol 0,25% m/v, xilencianol 0,25% m/v y bromuro de etidio  $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). En tales condiciones, cada muestra fue denaturada a  $70^\circ\text{C}$  por 10 min y a continuación fue incubada en hielo por 5 min. Luego, las muestras fueron cargados en un gel de agarosa 1,5% m/v y formaldehído 3% v/v, disuelto en una solución amortiguadora MOPS 1X (MOPS 400 mM, EDTA 10 mM pH 8 y acetato de sodio 100 mM). Entonces, cada electroforesis en geles de agarosa en condiciones denaturantes fue realizada en cámara electroforética que contenía solución amortiguadora MOPS 1X, estableciendo una diferencia de potencial eléctrico constante a 65 V durante 45 min, posterior a lo cual fue visualizado mediante transiluminador (Syngene, USA) y fotografiado por entre 200 a 400 ms tras excitación con luz UV utilizando el programa

GeneSnap (Syngene, USA). Para determinar la integridad del ARN total extraído, se verificó la presencia de al menos dos bandas de ARN ribosomal 28 y 18S en razón 2:1, como se describiera previamente (Glasel, 1995).

#### **2.3.2.4. PCR de ADN genómico**

La inserción del fragmento de interés *35S::SILIP1p-YFP* en el genoma de *N. tabacum* de las hojas transformadas transitoriamente con pEarleyGate 101-SILIP1p (véase sección 2.2.2.1), así como de los fragmentos de interés *35S::AtLIP1-His*, *35S::SILIP1* y *35S::SILIP1p* en el genoma de *S. lycopersicum* cv. Micro-tom de las plantas T0 regeneradas según se describiera previamente (véase sección 2.2.2.2), con sus respectivos controles, fue analizada mediante PCR. Para ello, se utilizaron partidores específicos para hibridar con parte de la secuencia del promotor fuerte 35S hacia el extremo 5' y con el epítipo de histidina hacia el extremo 3' (véase sección 0 y Tabla II). Cada reacción de PCR consistió en 1 U de *Taq* DNA polymerase, 0,5  $\mu$ M de cada partidor, dNTPs 200  $\mu$ M de cada uno y 50 ng de ADN genómico proveniente de hojas de tabaco infiltradas con pEarleyGate 101-SILIP1p o hojas de tomate T0 regeneradas posterior a la transformación estable con los constructos pGWB8-AtLIP1, pGWB8-SILIP1, pGWB8-SILIP1p o pGWB8 sin inserto como control, disuelto en la solución amortiguadora 1X correspondiente en un volumen de reacción de 20  $\mu$ L.

El programa de PCR empleado para cada amplicón siguió el perfil térmico a continuación mencionado: 94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 45 s y 72°C por 1 min 30 s; 72°C por 5 min y 10°C como temperatura de mantención.

#### **2.3.2.5. Transcripción reversa y análisis de expresión génica mediante qRT-PCR**

Con el objetivo de eliminar trazas de ADN procedente de muestras de ARN total

extraído desde hojas de tabaco y tomate silvestres y transformados de manera transitoria y estable, respectivamente (véase sección 2.3.2.2), cada muestra de ARN fue tratado con DNasa I. Para ello, cada reacción constó de 3 µg de ARN total extraído, 1,5 U de DNasa I (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), solución amortiguadora 1X de DNasa I y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final por reacción de 15 µL. Tales reacciones fueron llevadas a cabo a 37°C por 1 h, posterior a lo cual se agregó EDTA hasta una concentración final de 4,5 mM y se incubó a 65°C por 10 min.

Posteriormente, se procedió a realizar la transcripción reversa de las muestras de ARN tratado con DNasa I. Con este fin, en primer lugar se agregó 1 µg de oligo AP (véase sección 0) a 2 µg de ARN tratado con DNasa I y se incubó a 70°C por 5 min, y en seguida se incubó en hielo por 5 min. A continuación, la mezcla de ARN y oligo AP fue transferida a tubos de 0,2 mL, de modo tal que cada reacción de transcripción reversa constó de 40 U de Improm II™ Reverse Transcriptase (Promega Corporation, EE.UU.), dNTPs 0,5 µM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, y 40 U de Ribolock (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), disueltos en una solución amortiguadora de la transcriptasa reversa 1X y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 40 µL. El perfil térmico del programa de transcripción reversa consistió en: 25°C por 5 min, 42°C por 2 h, 72°C por 15 min y 10°C como temperatura de mantención.

Para cada fragmento de interés, el programa de qRT-PCR se realizó mediante el uso de SensiMix™ SYBR® Hi-Rox (Agilent Technologies, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, cada reacción de 20 µL contuvo 10 µL de SensiMix™ SYBR® Hi-Rox, 250 nM de cada partidor directo y reverso y 50 ng de ADNc proveniente de hoja de cada línea T0 regenerada a analizar (3 µL de una dilución 1:3 de cada reacción de transcripción reversa) o el equivalente volumen en H<sub>2</sub>O ultrapura (Winkler, Chile) para el control sin templado (NTC) utilizado en cada

reacción de qRT-PCR. Como gen normalizador se utilizó *SICAC* (SGN-U314153), el cual se describió previamente en análisis de expresión génica (Expósito-Rodríguez et al., 2008). El programa utilizado para todos los análisis de qRT-PCR consistió en una activación de la ADN polimerasa a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de: denaturación a 95°C por 15 s, alineamiento a 60°C por 15 s y extensión a 72°C por 15 s; seguido de una denaturación final de 60 a 95°C con medición de la señal de fluorescencia de SYBR® cada 0,2°C.

**Tabla III. Partidores utilizados para análisis de líneas T0 regeneradas durante la tesis. Se muestran los partidores utilizados para los pasos de clonación, análisis molecular de plantas transformantes y estudios de expresión génica**

Nombre	Secuencia (5' a 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Nº Acceso	Referencia
E2kGDH_F	ATGGTTGTTGGAGGCGTCAT	60	NM_001319222	Este estudio
E2kGDH_R	AACATCAAGGAGTAGGCCGGC	60		
E2PDHc4_F	GGATGTTGAGACGGTTTACGATGGGA	60	XM_004238892	Este estudio
E2PDHc4_R	CCACAACCGGAGATTGAGGTTCA	60		
E2PDHm_F	GCCGGTCCTTGTAACCTCCTC	60	XM_010314281	Este estudio
E2PDHm_R	CCTGACCAAACCTTAATGAAGAAGCA	60		
qPCR-LIP2_F	AAGATTGGCGCGATTGGAGT	60	XM_010318481	Este estudio
qPCR-LIP2_R	CTTCAGCGGGAAGCTCTACA	60		
qPCR-LpIA_F	GCAACACAGATGCTCTCCCT	60	XM_004241783	Este estudio
qPCR-LpIA_R	ATGATGAACCCAACGCCCTT	60		
qRT-SIMET1_F	GTCACGTGCTTGCAACTAACTTGG	60	NM_001247496.3	Este estudio
qRT-SIMET1_R	CGGTCTCATCGTGTGGGGTG	60		

T<sub>m</sub>: Temperatura de alineamiento de los partidores.

### 2.3.2.6. Extracción de proteínas totales de plantas T0 regeneradas

Para realizar el análisis de lipoilación de las proteínas blanco en líneas de tomate T0 regeneradas con los constructos de interés, se extrajeron proteínas totales desde tejido foliar. Para ello, 100 mg de hoja de cada planta a 2 meses desde su aclimatación fueron pulverizados y homogenizados en frío con 2 mL de solución de extracción (ácido tricloroacético 10% v/v en acetona y β-mercaptoetanol 0,07% v/v) mediante agitación en vórtex. A continuación, cada muestra fue precipitada por 1 h a -20°C, tras lo que se centrifugó a 14.000xg por 30 min a 4°C. El sedimento obtenido fue lavado dos veces para extraer pigmentos y otros contaminantes. Para ello, cada sedimento

fue homogenizado con 2 mL de solución de lavado (acetona con  $\beta$ -mercaptoetanol 0,07% v/v), luego se dejó precipitar por 1 h a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y se centrifugó a  $14.000\times g$  por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Cada muestra se dejó secar a temperatura ambiente por 20 min, y finalmente se resuspendieron en 400  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 125 mM.

#### **2.3.2.7. Inmunodetección de epítomos de hexahistidina y ácido lipoico en extractos totales de proteínas de líneas de tomate T0 regeneradas mediante *western blot***

La cuantificación de la extracción de proteínas totales desde tejido vegetal se realizó utilizando el kit de Ensayo de Proteínas por BCA (Thermo Scientific, EE.UU.). Para ello, se realizó una curva de calibración de BSA entre 0 y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se midió cada extracto de proteínas totales a 562 nm tras incubar cada reacción de 100  $\mu\text{L}$  de muestra con 2 mL de solución de trabajo (50 partes de reactivo BCA A con 1 parte de reactivo BCA B) por 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Utilizando la ecuación obtenida de la curva de calibración realizada, se determinó para cada muestra la concentración del extracto crudo de proteínas.

Para realizar la inmunodetección de las proteínas recombinantes de interés mediante su epítomo de hexahistidina, se siguió el procedimiento descrito previamente (véanse secciones 2.3.1.6 y 2.3.1.7). Por su parte, para la inmunodetección de proteínas lipoiladas se siguió el mismo protocolo antes mencionado, pero utilizando el anticuerpo primario policlonal anti-ácido lipoico de conejo (Calbiochem, código 437695, EE.UU.) en una dilución 1:3.000 y el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo fusionado a HRP en una dilución 1:5.000. Adicionalmente, el sistema de revelado fue colorimétrico, para lo cual se utilizó el kit de sustrato CN/DAB (ThermoFischer Scientific, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **2.3.2.8. Visualización en microscopía confocal**

Con la finalidad de determinar la localización subcelular de SILIP1p-EYFP, se transformaron transitoriamente hojas de *N. tabacum* como se describiera previamente (véase sección 2.2.2.1). Dos días después de realizar cada infiltración, se cortaron secciones de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de hoja completa, y se montaron en portaobjetos para su visualización en microscopio confocal LSM 510 META (Zeiss, Alemania). Para cada muestra analizada, se excitó a 488 nm a 20% de intensidad, con el fin de captar la señal de clorofila en el rango de 600 – 650 nm. Por su parte, para captar la señal de EYFP, se excitó a 514 nm a 15% de intensidad y se filtraron las longitudes de onda entre 530 – 600 nm. Adicionalmente, se escaneó cada muestra en campo claro. Cada imagen fue capturada mediante LSM Start Image Browser con una resolución de 1.024 píxeles, con una ponderación puntual de 2 escaneos por pixel. Para efectos de evaluar la colocación de la señal de autofluorescencia de clorofila con la de EYFP en el constructo de interés, se utilizó ImageJ sobreponiendo las señales de cada canal.

### **2.3.2.9. Análisis de lipoilación de proteínas**

Después de analizar los niveles de expresión de los genes en estudio, se evaluó el nivel de lipoilación de las proteínas blanco en líneas de tomate T0 regeneradas con los constructos de interés. Para ello, se realizó la extracción de proteínas totales según el método previamente descrito por duplicado para cada muestra (véase sección 2.3.2.6) y luego se realizó la inmunodetección de ácido lipoico unido a proteínas en dichos extractos crudos (véase sección 2.3.2.7) en duplicado para cada extracción. Posteriormente, se fotografiaron mediante el programa EPSON Scan® (EPSON Corp., USA) a 700 ppp. Dichas imágenes fueron tratadas mediante ImageJ, al convertirlas a 8-bit para convertir cada imagen a blanco y negro. A continuación, para cuantificar la

señal total de lipoilación para cada muestra, se calculó el área por banda presente en cada gel y para cada muestra, obteniendo un área promedio que fue ponderada respecto al área promedio de la línea transformada con el vector vacío cargada en cada réplica.

### **2.3.3. Análisis estadísticos**

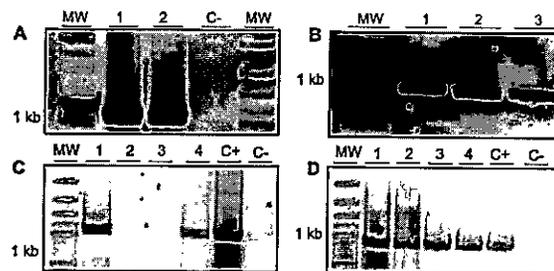
Para los análisis de expresión génica y de lipoilación de proteínas blanco, los promedios de cada réplica fueron graficados en GraphPad v. 6.0e. Con ellos, se realizó un *T-test* no pareado con un intervalo de confianza de 95% como forma de evaluar la significancia estadística de cada comparación.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Determinar la funcionalidad biológica del producto génico de *SILIP1p* en *E. coli* mutante *lipA* KER176 y determinar su localización subcelular en *N. tabacum*.

##### 3.1.1. Obtención de vectores de expresión en bacterias

Con la finalidad de determinar la funcionalidad biológica del producto génico de *SILIP1p* en *E. coli lipA* KER176, la primera actividad consistió en la obtención de los vectores de expresión pDEST-His<sub>6</sub>MBP con los insertos –*SILIP1p* y –*AtLIP1* (como control positivo). Para ello, los fragmentos *AtLIP1Δ18* y *SILIP1pΔ110* (para detalles sobre el diseño, véase sección 2.2.1), se amplificaron respectivamente con *Pfu* DNA Polymerase, se cargaron en un gel de agarosa y las bandas así obtenidas (Figura 3 A–B) fueron purificadas desde gel para su clonación en pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO®. Una vez clonadas, fueron transformadas en *E. coli* OneShot® TOP10, y por último, cada transformación fue verificada por PCR de colonia para cada fragmento de interés, tal como se muestra en Figura 3 C-D.



**Figura 3.** Clonación de los fragmentos de interés *AtLIP1Δ18* y *SILIP1pΔ110* en pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO®. Se muestra el producto amplificado con *Pfu* por PCR para *AtLIP1Δ18* (A) y *SILIP1pΔ110* (B) desde minipreparaciones plasmidiales secuenciadas pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO®–*AtLIP1* y –*SILIP1p* generadas para la obtención de vectores de expresión en plantas, las cuales muestran los tamaños esperados de 1.071 pb y 975 pb, respectivamente. C-D, corresponde al análisis por PCR de cuatro colonias para *AtLIP1Δ18* (C) o *SILIP1pΔ110* (D) de clones transformantes con cada fragmento en pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO®. El control positivo de cada reacción (C+) de PCR de colonia correspondió a 5 ng de ADN plasmidial con los vectores pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO®–*AtLIP1* y –*SILIP1p*, respectivamente. Por su parte, el control negativo de PCR (C-) correspondió a agua utilizada como templado. Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa 1% a 90 V por 50 a 60 min. MW: marcador de peso molecular GeneRuler<sup>TM</sup> 100 pb Plus DNA Ladder.

El mismo procedimiento antes descrito se realizó para la clonación de *SILIP1Δ30*, como actividad paralela al desarrollo de esta tesis (véase Anexo I), con el propósito de caracterizar funcionalmente ambas isoformas en *E. coli lipA* KER176. Adicionalmente, se realizaron minipreparaciones de ADN plasmidial para los mismos clones de *E. coli* OneShot® TOP10 portadores de los vectores pCR™8/GW/TOPO® con los respectivos insertos *-AtLIP1Δ18* y *-SILIP1pΔ110* y se analizaron mediante un análisis de restricción para evaluar su orientación de topoisomerización, obteniéndose los resultados resumidos a continuación (Figura 4).

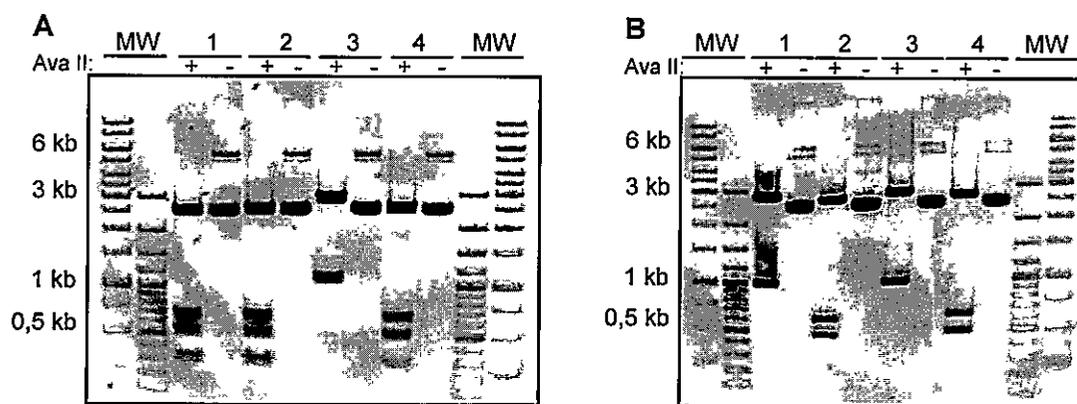
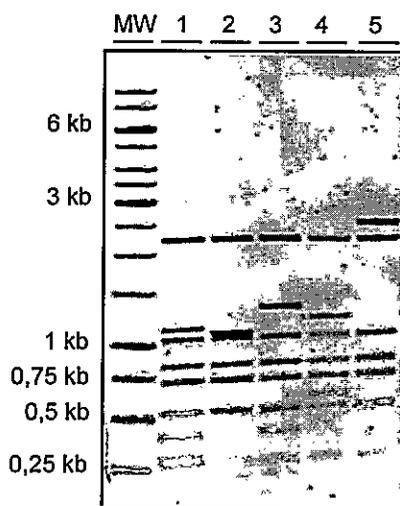


Figura 4. Análisis de restricción de pCR™8/GW/TOPO®-*AtLIP1Δ18* y *-SILIP1pΔ110*. Se muestra el resultado de la digestión enzimática con *Ava* II de 1 µg de minipreparación de ADN plasmidial obtenido para cuatro clones representativos de *E. coli* OneShot® TOP10 portadores de cada vector de entrada pCR™8/GW/TOPO® con los insertos *-AtLIP1Δ18* (A) y *-SILIP1pΔ110* (B). Para cada reacción, se muestra el patrón obtenido en presencia de *Ava* II (+) y su respectivo control sin digerir (-). Los fragmentos esperados para *AtLIP1Δ18* fueron: 2.462, 641, 493 y 292 pb (en sentido) y 1.870, 1.085, 641 y 292 pb (en antisentido). Por su parte, para *SILIP1pΔ110*, los fragmentos esperados fueron: 2.658, 641 y 493 pb (en sentido) y 2.799, 993 y 151 pb (en antisentido). Todas las electroforesis fueron realizadas en geles de agarosa 1% a 90 V por 90 V. MW: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb y 100 pb Plus DNA Ladder.

Así, los clones para cada constructo con la orientación correcta (clones 1, 2 y 4 para *AtLIP1Δ18*; y clones 2 y 4 para *SILIP1pΔ110*) fueron secuenciados y las secuencias obtenidas fueron analizadas para elegir un clon único para cada inserto que tuviese 100% de identidad nucleotídica con la respectiva secuencia obtenida de la base de datos de NCBI (véase sección 2.3.1.3). Bajo esta selección, el clon 4 para *AtLIP1Δ18* y

el clon 4 para *SILIP1pΔ110* fueron elegidos para continuar con la recombinación con el vector de destinación pDEST-His<sub>6</sub>MBP.

De este modo, se procedió a la recombinación entre pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO® portador del inserto *-AtLIP1Δ18* o *-SILIP1pΔ110* y el vector de destinación pDEST-His<sub>6</sub>MBP, y con el producto de cada reacción se procedió a la transformación de *E. coli* OneShot® TOP10 por golpe térmico, de modo de obtener clones transformantes con los vectores de expresión pDEST-His<sub>6</sub>MBP con los respectivos insertos *-AtLIP1Δ18* o *-SILIP1pΔ110*. Tras realizar un primer análisis por PCR de colonia para verificar la transformación con cada fragmento de interés, se realizó un análisis de restricción con la enzima *Ava* II, resultado que se resume en la **Figura 5**.

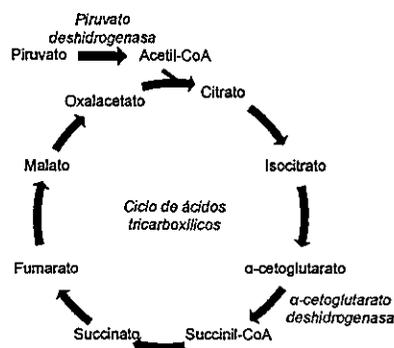


**Figura 5.** Análisis de restricción de los vectores de expresión pDEST-His<sub>6</sub>MBP-*AtLIP1Δ18*, *-SILIP1Δ30* y *-SILIP1pΔ110*. Se muestra el resultado de la digestión enzimática con *Ava* II de 1 µg de minipreparación de ADN plasmidial obtenido de un clon representativo de *E. coli* OneShot® TOP10 portador del vector pDEST-His<sub>6</sub>MBP con el inserto *-AtLIP1Δ18* (1), *-SILIP1Δ30* (2) y *-SILIP1pΔ110* (3), así como los controles *-SILIP1Δ30* en antisentido (4) y el vector pDEST-His<sub>6</sub>MBP sin inserto (5). Los fragmentos esperados para *AtLIP1Δ18* fueron: 2.241, 1.135, 1.046, 838, 727, 533, 412, 292, 279 y 222 pb. Por su parte, para *-SILIP1Δ30*, los fragmentos esperados fueron: 2.241, 1.089, 1.046, 838, 732, 727, 533, 279 y 222 pb. En el caso de *SILIP1pΔ110*, los fragmentos esperados fueron: 2.241, 1.331, 1.046, 838, 727, 533, 412, 279 y 222 pb. Los fragmentos esperados para *-SILIP1Δ30* en antisentido fueron: 2.241, 1.220, 1.046, 838, 727, 601, 533, 279 y 222 pb. Por último, en el caso del vector pDEST-His<sub>6</sub>MBP sin inserto, los fragmentos esperados fueron: 2.396, 2.241, 1.046, 838, 727, 533, 279 y 222 pb. La electroforesis fue realizada en gel de agarosa 1% a 90 V por 90 V. MW: marcador de peso molecular GeneRuler<sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder.

De este modo, se corroboró la correcta transformación de cada vector de expresión en *E. coli* OneShot® TOP10, por lo que se dio por concluido el proceso de clonación de los vectores de expresión para su posterior transformación en la cepa mutante *E. coli lipA* KER176.

### 3.1.2. Determinación de la funcionalidad biológica de SILIP1p en *E. coli lipA* KER176

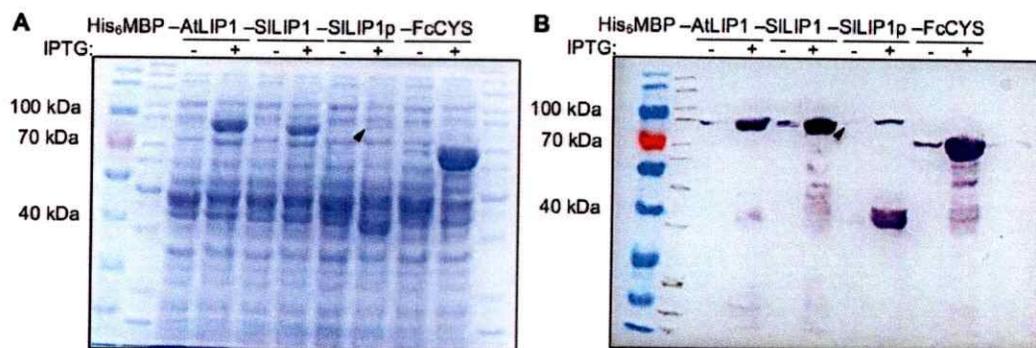
Tras realizar exitosamente el proceso de clonación de los vectores de expresión en bacterias, se pasó a la actividad de determinar la función biológica de SILIP1p en la cepa mutante para lipoil sintasa *E. coli lipA* KER176 (Reed y Cronan, 1993). Dicha cepa no puede producir ácido lipoico desde la síntesis *de novo* a partir de precursores derivados de ácidos grasos (véase **Figura 1**, Introducción), por lo que debe utilizar la ruta de reciclaje para generar proteínas lipoiladas, particularmente de las subunidades E2 de los complejos PDH y kGDH (**Figura 6**). Tal lipoilación es necesaria para mantener su actividad enzimática, por lo que es necesario el suministro exógeno de ácido lipoico en el medio de cultivo de *E. coli lipA* KER176 para su crecimiento.



**Figura 6. Diagrama del ciclo de ácidos tricarbóxicos.** Se muestra esquemáticamente el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, donde cada flecha representa un paso enzimático de la ruta. En rojo se muestran los complejos enzimáticos de la ruta que son lipoilados.

Con el fin de evaluar la funcionalidad biológica de SILIP1p, se realizó un ensayo de complementación heteróloga ya descrito (Yasuno y Wada, 1998; Zhao y cols, 2004), utilizando a AtLIP1Δ18 como control positivo, por haber sido caracterizado previamente (Yasuno y Wada, 2002) y a FcCYS como control negativo, por ser una proteína funcional caracterizada en el laboratorio y desvinculada del metabolismo de ácido lipoico.

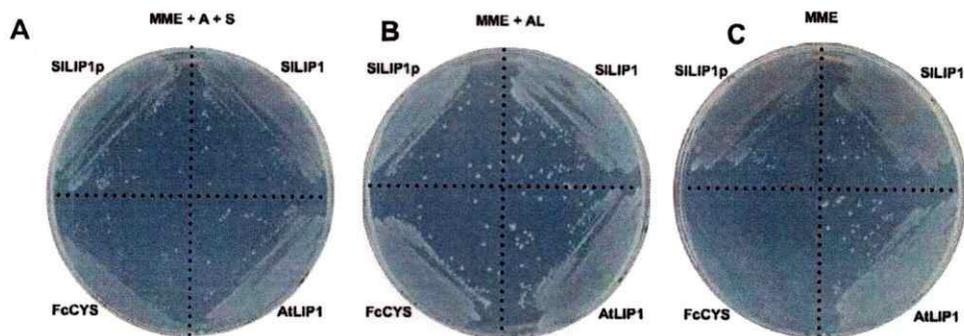
Para comenzar con esta actividad, se procedió a evaluar la acumulación de AtLIP1Δ18, SILIP1pΔ110 y SILIP1Δ30 (para la caracterización paralela de SILIP1 en la tesis doctoral de Jorge Araya) y del control negativo, en *E. coli lipA* KER176. Dado que el vector de expresión pDEST-His<sub>6</sub>MBP genera una proteína de fusión con una etiqueta N-terminal de hexahistidina (véase sección 2.2.1), se pudo detectar la presencia de las respectivas proteínas de fusión mediante un *western blot* anti-His, resultado que se muestra en **Figura 7**.



**Figura 7. Detección de las proteínas de fusión His<sub>6</sub>MBP –AtLIP1Δ18, –SILIP1Δ30, –SILIP1pΔ110 y –FcCYS en *E. coli lipA* KER176.** **A**, se observa el resultado del gel SDS-PAGE teñido con solución de Coomassie obtenido con los respectivos extractos crudos de proteínas de *E. coli lipA* KER176 portador de pDEST-His<sub>6</sub>MBP con –AtLIP1Δ18, –SILIP1Δ30, –SILIP1pΔ110 o –FcCys. Para cada caso, se cargaron 25 μg de proteínas de la fase soluble obtenidas tras 4 h de inducción con IPTG 1 mM (+) o su respectivo control sin inducir (-) a partir de un cultivo inicial a OD<sub>600</sub> = 0,5. **B**, se muestra el resultado de un *western blot* anti-His para las mismas fracciones visibles en **A**. En ella, el anticuerpo primario correspondió a α-poli-histidina monoclonal de ratón 1:3.000. Por su parte, el anticuerpo secundario correspondió a α-IgG de ratón fusionado a fosfatasa alcalina producida en cabra 1:10.000. Tamaño esperados aproximados: AtLIP1Δ18: ~82 kDa, SILIP1Δ30: 81,5 kDa, SILIP1pΔ110: 85 kDa y FcCYS: ~70 kDa.

Con lo anterior, fue posible detectar las proteínas de fusión AtLIP1Δ18, SILIP1Δ30, SILIP1pΔ110 y FcCYS, siendo en todos los casos evaluados mayor su acumulación tras la inducción con IPTG (**Figura 7 B**). Pese a que la abundancia de SILIP1pΔ110 fue notoriamente menor que en el resto de los casos, fue posible detectarla tanto en el gel de proteínas como por inmunodetección anti-His (flecha negra, **Figura 7 A y B**), aunque fue mayor la abundancia de una proteína trunca de 40 kDa tras la inducción con IPTG.

A continuación, se procedió a realizar el ensayo de complementación según se describiera previamente (Yasuno y Wada, 1998; Zhao y cols, 2004). Para ello, se crecieron cultivos de *E. coli lipA* KER176 portadores ya sea de AtLIP1Δ18, SILIP1Δ30, SILIP1pΔ110 o FcCYS en un medio rico hasta  $OD_{600} = 0,5$ , se agregó IPTG 1 mM y tras 4 h de inducción, cada cultivo fue sembrado en placas conteniendo medio mínimo (MME), medio mínimo suplementado con acetato y succinato 5 mM (MME+A+S) o con ácido lipoico 50 ng/mL (MME+AL). Los resultados obtenidos tras 3 días de crecimiento se exponen en **Figura 8**.



**Figura 8. Ensayo de complementación de *E. coli lipA* KER176 con proteínas LIP1 de origen vegetal.** Se muestran imágenes representativas del resultado del ensayo de complementación de la cepa mutante para lipoil sintasa *E. coli lipA* KER176 con SILIP1pΔ110 (y SILIP1Δ30, correspondiente a la tesis doctoral de Jorge Araya). Para cada placa conteniendo MME suplementado con acetato y succinato 5 mM (MME + A + S, **A**), con ácido lipoico 50 ng/mL (MME + AL, **B**) o MME sin suplementar (MME, **C**), se sembró en cada cuadrante un cultivo de *E. coli lipA* KER176 con pDEST-His<sub>6</sub>MBP portador ya sea de -AtLIP1Δ18 (control positivo), -FcCYS (control negativo), SILIP1Δ30 o SILIP1pΔ110. Las imágenes fueron registradas a tres días posterior a la inoculación. Para evitar el crecimiento bacteriano debido a trazas de AL remanentes, cada cultivo fue lavado dos veces y resuspendido en H<sub>2</sub>O estéril, hasta una  $OD_{600} = 0,05$ .

A partir de este resultado, todos los cultivos crecen de manera similar en MME + A + S y en MME + AL (Figura 8 A y B), lo cual resultaba esperable, debido a que el suministro de ácido lipoico permite la lipoilación de las subunidades E2 de PDC y KGDC, mientras que el suministro de acetato y succinato son precursores alternativos en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Sin embargo, tanto *E. coli lipA* KER176 con SILIP1pΔ110 como con SILIP1Δ30 crecen de manera similar a AtLIP1Δ18 en MME sin suplemento (Figura 8 C), a diferencia de lo que ocurre con el control negativo. Lo anterior demuestra que tanto SILIP1pΔ110 como SILIP1Δ30 tienen funcionalidad lipoil sintasa en *E. coli*, debido a que permite el crecimiento de la mutante *lipA*, sin suministro de ácido lipoico exógeno.

### 3.1.3. Obtención de vectores de expresión en plantas

Con la finalidad de determinar la localización subcelular de SILIP1p (en paralelo a SILIP1, realizado en la tesis doctoral de Jorge Araya) y evaluar los efectos derivados de la sobre-expresión de *SILIP1* y *SILIP1p* en plantas de tomate regeneradas *in vitro*, se debió clonar *SILIP1p* en pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO®, para generar a su vez los vectores de expresión pEarleyGate 101 y pGWB8 con el inserto *SILIP1p*. Para ello, se amplificó por PCR la secuencia codificante de *SILIP1p* incluyendo su péptido señal predicho (Figura 9 A) y se insertó en pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO®, realizando los análisis previamente descritos para la clonación en bacterias (secciones 2.3.1.1 y 2.3.1.2, Figura 9 B) con el fin de obtener un único clon para el fragmento de interés. Luego, se procedió a la recombinación con los vectores de destinación pEarleyGate 101 y pGWB8 y se realizaron, al igual que en los casos anteriores, los análisis respectivos (Figura 9 C - F).

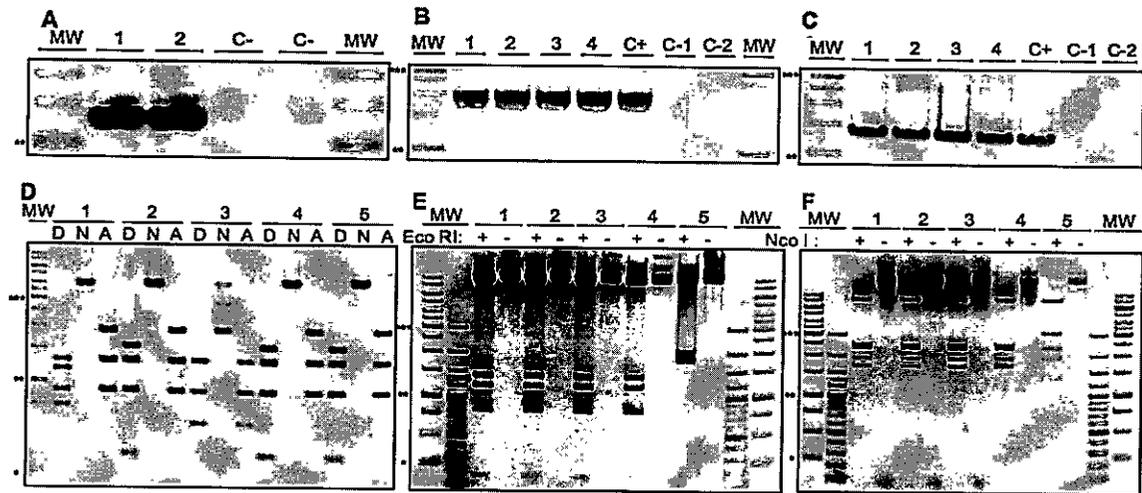
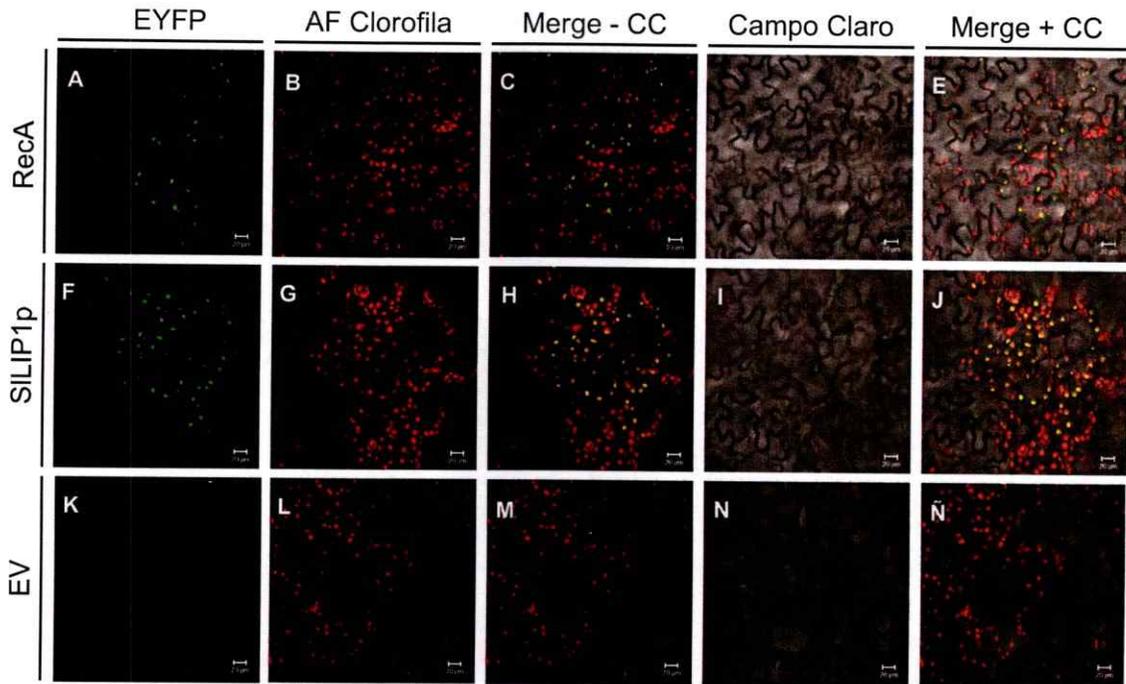


Figura 9. Clonación de *SILIP1p* en vectores de expresión en plantas. A, amplicón de *SILIP1p* de 1.303 pb obtenido por PCR con *Pfu* a partir de cDNA de hoja de tomate. B, digestión de 1 µg de minipreparación de pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO®-*SILIP1p* de cinco clones de *E. coli* OneShot® TOP10 con *Nco* I + *Ava* I (D), *Nco* I (N) o *Ava* I (A). Además, se muestran los amplicones de 1.972 y 1.370 pb de cada PCR de colonia para *SILIP1p* F – EYFP R (C) o para *SILIP1p* F – His3 (E) de cuatro clones de *E. coli* OneShot® TOP10 pEarleyGate 101 o pGWB8 con *SILIP1p*. En cada caso, control positivo C+: minipreparación de *SILIP1p* en pEarleyGate 101 o pGWB8, respectivamente; y para cada reacción, controles negativos: vector de destinación sin inserto (C-1) y agua como templado (C-2). Asimismo, se muestra el patrón de digestión con *Eco* RI para los mismos clones de pEarleyGate 101-*SILIP1p* (D) o con *Nco* I para pGWB8-*SILIP1p* (F). Los fragmentos esperados para *SILIP1p* fueron: 1.300, 1.171, 904 y 744 pb ó 1.867, 1.451, 641 y 160 pb (en la doble digestión en sentido y antisentido en pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO®, 4 B "D"); 8.653, 1.373, 1.172, 782 y 148 pb (en pEarleyGate 101, 4 D) y 8.211, 2.410, 2.250, 1.879, 1.638 y 528 pb (en pGWB8, 4 F). MW: marcador de peso molecular GeneRuler<sup>TM</sup> 1 kb y 100 pb Plus DNA Ladder (\*: 250 pb; \*\*: 1.000 pb; \*\*\*: 3.000 pb).

### 3.1.4. Determinación de la localización subcelular de *SILIP1p* en *N. tabacum*

Como primera aproximación para estudiar a *SILIP1p* en plantas, se procedió a determinar su localización subcelular en el modelo heterólogo de *N. tabacum*. Dado que el análisis bioinformático (véase sección 2.2.1.1) predecía una localización cloroplastidial, se transformaron transitoriamente hojas de tabaco con *A. tumefaciens* portador ya sea del vector pEarleyGate 101-*SILIP1p*, pBI121-*RecA* o con pEarley Gate 101 sin inserto (EV, control negativo). *RecA* fue utilizado como control positivo del ensayo, por ser un marcador descrito de localización cloroplastidial (Cerutti et al., 1992). Dado que el vector pEarleyGate 101 genera una proteína de fusión con EYFP C-terminal, al igual que la construcción pBI121-*RecA* disponible en el laboratorio, se evaluó la fluorescencia de EYFP a 514 nm y la autofluorescencia de clorofila a 488 nm

mediante microscopía confocal para cada transformación transitoria, resultado que se resume en **Figura 10**.



**Figura 10. Determinación de la localización subcelular de SILIP1p en *N. tabacum*.** Se muestran imágenes a 40X representativas de tres eventos de transformación transitoria de *N. tabacum* con pBI121-RecA (**A – E**), pEarleyGate 101-*SILIP1p* (**F – J**), o con pEarleyGate 101 sin inserto (**K – Ñ**). Para cada construcción, se observa el patrón de fluorescencia obtenida para EYFP (**A, F, K**), la autofluorescencia de clorofila (**AF Clorofila, B, G, L**) o la sobreposición de ambas imágenes (**Merge-CC, C, H, M**). Además, se presenta en cada ocasión el campo claro respectivo (**CC, D, I, N**) y la sobreposición de la fluorescencia de EYFP, clorofila y campo claro (**Merge+CC, E, J, Ñ**). Las imágenes fueron tomadas en microscopía confocal LSM 510 Meta a 3 días post-infiltración. Patrón de excitación y emisión: 514 nm y 530-600 nm (EYFP); 488 nm y 650 nm (AF de clorofila). Barra: 20  $\mu$ m.

Tal como se observa, el patrón de fluorescencia para EYFP en la construcción pEarleyGate 101-*SILIP1p* es similar al de pBI121-RecA (**Figura 10 A y F**), esto es, muestran un patrón punteado de tamaños similares (aproximadamente 5  $\mu$ m, según barra) y una distribución periférica respecto a los bordes celulares visibles en campo claro (**Figura 10 E y J**), a diferencia de lo que se observa para el control experimental (**Figura 10 K – Ñ**). Lo anterior se suma al hecho de que hay 74% de colocación de

las señales de EYFP y la autofluorescencia de clorofila para la construcción pEarleyGate 101-SILIP1p en la región donde hay co-ocurrencia de ambas señales (Figura 10 H y J y Anexo III) en las células transformadas con la construcción, permite validar experimentalmente la predicción de la localización subcelular de SILIP1p, acumulándose en cloroplastos en el modelo de tabaco al menos hasta 3 dpi.

### **3.2. Obtener líneas de plantas de tomate que sobre-expresen SILIP1 o SILIP1p y analizar fenotípica y molecularmente las líneas transformadas establemente.**

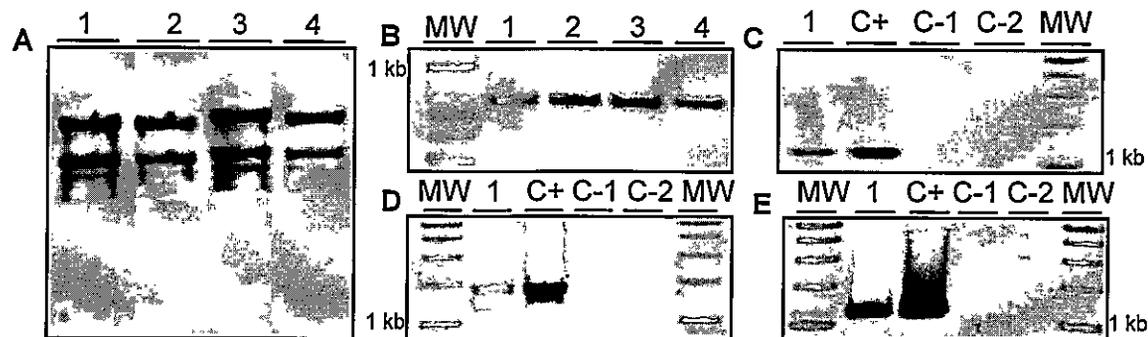
#### **3.2.1. Transformación estable de *S. lycopersicum* cv. Micro-tom con pGWB8-AtLIP1, SILIP1, SILIP1p y control**

El estudio de la función de *SILIP1p* continuó mediante la evaluación de los efectos derivados de su sobre-expresión en *S. lycopersicum* cv. Micro-tom. Para ello, se generó el constructo 35S::SILIP1p-His en el vector pGWB8 (véase sección 2.2.1), en el que también se encontraban clonados los constructos 35S::AtLIP1-His y 35S::SILIP1-His (tesis doctoral de Jorge Araya). Así, se buscó estudiar los efectos causados al transformar explantes de tomate con pGWB8-AtLIP1 (utilizado como control positivo, por encontrarse previamente caracterizado funcionalmente), pGWB8-SILIP1, pGWB8-SILIP1 y pGWB8 sin inserto (utilizado como control negativo y como referencia para los análisis posteriores).

#### **3.2.2. Verificación de la expresión transitoria de los constructos 35S::AtLIP1-His, 35S::SILIP1p-His y 35S::SILIP1-His**

Con la finalidad de verificar la correcta expresión de *AtLIP1-His*, *SILIP1p-His* y *SILIP1-His* en un modelo vegetal previo a transformar establemente *S. lycopersicum*,

se transformaron transitoriamente hojas de tabaco siguiendo el mismo procedimiento que el descrito previamente (sección 2.2.2.1). A continuación, se extrajo ARN total desde las hojas transformadas con los constructos de interés, se sintetizó ADNc a partir de éste y se realizó un PCR para cada transgén, resultado que se expone en **Figura 11**.



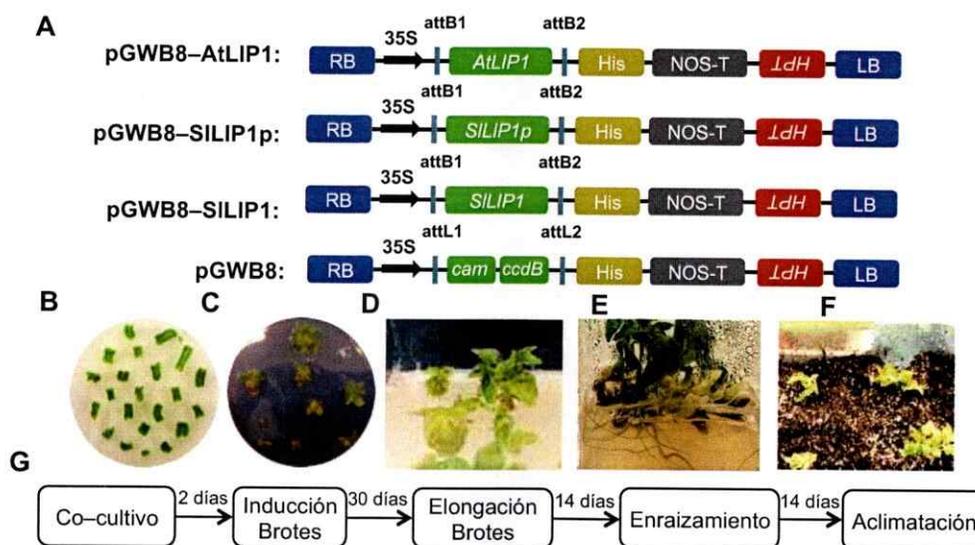
**Figura 11.** Expresión transitoria de transgenes *AtLIP1-His*, *SILIP1-His* y *SILIP1p-His* en *N. glauca*. Se muestra el RNA total en gel denaturante (A) y el RT-PCR para *GAPDH* (B, 782 pb) obtenido para hojas de tabaco transformadas transitoriamente con pGWB8 -*AtLIP1* (1), *SILIP1* (2), *SILIP1p* (3) o sin inserto (4). Además, se muestra el resultado de RT-PCR para *AtLIP1-His* (C, 1.190 pb), *SILIP1p-His* (D, 1.370 pb) y *SILIP1-His* (E, 1.208 pb), utilizando como templado DNAc de hoja de tabaco infiltrado con el respectivo constructo (1 de C, D, E). En cada caso el control positivo C+ correspondió a una alícuota de minipreparación de pGWB8 con -*AtLIP1* (C), -*SILIP1p* (D) o -*SILIP1* (E). Los controles negativos fueron ADNc de hoja de tabaco infiltrado con pGWB8 sin inserto (C-1) o H<sub>2</sub>O (C-2) utilizados como templado de la reacción. MW: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb y 100 pb Plus DNA Ladder.

Como se observa, el ADNc de hojas de tabaco infiltradas con pGWB8-*AtLIP1*, -*SILIP1p*, -*SILIP1p* y sin inserto proviene de una extracción íntegra de ARN total (**Figura 11 A**) y en todos los casos fue posible amplificar *GAPDH* (**Figura 11 B**), lo cual en conjunto comprueba la calidad del ADNc generado. Además, se obtuvo un amplicón del tamaño esperado para cada transgén evaluado (*AtLIP1-His*, *SILIP1p-His*, *SILIP1-His*, **Figura 11 C, D, E**, respectivamente) utilizando ADNc de hoja de tabaco infiltrada con el respectivo constructo de interés, mientras que no hay amplicón en caso de provenir de hoja de tabaco infiltrada con el vector sin inserto (C-1 para **Figura 11 C, D, E**). Lo anterior muestra la correcta expresión de cada transgén analizado en los

respectivos vectores de expresión a utilizar para la transformación estable.

### 3.2.3. Obtención y análisis de las líneas T0 de *S. lycopersicum* regeneradas para los constructos AtLIP1-His, SILIP1p-His, SILIP1-His

Habiendo confirmado la expresión de *AtLIP1-His*, *SILIP1p-His* y *SILIP1-His*, se procedió a transformar establemente *S. lycopersicum* cv. Micro-tom con pGWB8-*AtLIP1*, -*SILIP1p*, -*SILIP1* y pGWB8 sin inserto según se describiera previamente (véase sección 2.2.2.2), en al menos tres eventos independientes de transformación. Lo anterior se resume en **Figura 12**.



**Figura 12. Proceso de transformación estable de *S. lycopersicum*.** A, esquema de los constructos de interés en pGWB8 utilizados para la transformación estable de *S. lycopersicum* cv. Micro-tom con *AtLIP1*, *SILIP1p*, *SILIP1* y control, con etiqueta C-terminal de hexahistidina (*His*), bajo el promotor CaMV 35S (35S) y con terminador de nopalina sintasa (*NOS-T*), y que constan de gen de resistencia a higromicina (*HPT*) entre borde derecho (*RB*) e izquierdo (*LB*). El gen de interés queda flanqueado por sitios de reconocimiento para recombinación (*attL1* y 2) o posterior a ella (*attB1* y 2). Además, se muestran imágenes representativas de las etapas de transformación estable, esto es, explantes en co-cultivo (**B**), inducción de brotes (**C**), elongación (**D**), enraizamiento (**E**) y aclimatación (**F**). Tales etapas del proceso de transformación estable se resumen en **G**, donde además se indican los tiempos teóricos entre cada etapa.

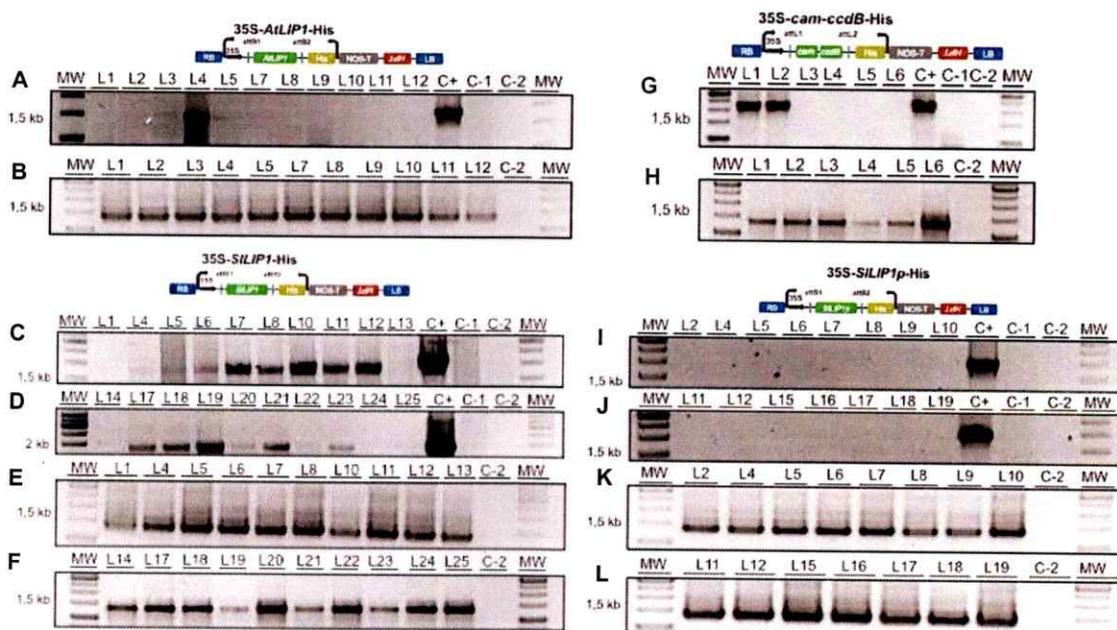
En términos generales, fue posible llevar a cabo la regeneración de las líneas T0 transformadas con los constructos de interés (véase **Figura 12**) en medio selectivo conteniendo higromicina 5 mg/L. Sin embargo, el tiempo promedio necesario para la regeneración de brotes de aquellas líneas transformadas con pGWB8–AtLIP1, –SILIP1p o –SILIP1 fue cerca del doble (3,8; 4,5 y 4,6 meses, respectivamente) al que tardó la regeneración de aquellos brotes transformados con pGWB8 vacío (2,4 meses). Más aún, aquellas líneas transformadas con el vector sin inserto fueron regeneradas aproximadamente en el tiempo descrito (3 meses, Sun et al., 2006; Pino et al., 2010). Pese a ello, fue posible lograr el correcto enraizamiento y aclimatación de líneas de todos los constructos de interés en tasas variables, resultado que se resume en **Tabla IV**. En ella además se resume el análisis por PCR para identificar a aquellas líneas con la inserción del constructo 35S–fragmento de interés–His (**Figura 13**).

**Tabla IV.** Resumen de las líneas T0 obtenidas de la transformación estable de *S. lycopersicum* con pGWB8–AtLIP1, SILIP1p, SILIP1 y control. Se muestra el total de líneas regeneradas totalmente para cada constructo de interés y su respectivo porcentaje de regeneración ( $N^{\circ}$  líneas regeneradas  $\cdot$  100/ $N^{\circ}$  explantes transformados). Además, se expone el total de líneas que resultaron positivas para el PCR de 35S–gen de interés–His y su porcentaje de transformación ( $N^{\circ}$  líneas positivas para la inserción  $\cdot$  100/ $N^{\circ}$  explantes transformados). El total de explantes transformados para cada constructo se calculó a partir de las distintas rondas de transformación realizadas y el tiempo promedio de regeneración se calculó desde la germinación de semillas hasta el traspaso de plántulas a aclimatación.

Constructo	N° de explantes transformados	Tiempo promedio regeneración (días)	Regeneración		Transformación	
			N° líneas regeneradas	Porcentaje regeneración (%)	N° líneas 35S–His3 positivas	Porcentaje transform. (%)
pGWB8–AtLIP1	251	114	11	4,4	2	0,8
pGWB8–SILIP1p	269	135	19	7,0	0	0
pGWB8–SILIP1	315	140	25	7,9	15	4,8
pGWB8 sin inserto	163	74	6	3,7	2	1,2

Como puede observarse en **Tabla IV**, fue posible obtener entre un porcentaje de 3,7 y 7,9% de regeneración, aunque excluyendo el caso de pGWB8–SILIP1, tiende a fluctuar entre un 3,7 y 5,2%, siendo la tasa de regeneración cerca de un doble en el caso

mencionado. Una tendencia similar se observa en la tasa de transformación (0,8 a 1,2% vs 4,8% para SILIP1). Por último, no fue posible identificar líneas positivas para la inserción en el caso de pGWB8–SILIP1p, resultado que se muestra en mayor detalle en **Figura 13**.



**Figura 13. Identificación de líneas de *S. lycopersicum* cv. Micro-tom T0 transformadas para los distintos constructos de interés.** Se muestra el análisis por PCR para determinar líneas transgénicas portando respectivamente los fragmentos: 35S-*AtLIP1*-His para las 11 líneas regeneradas con dicho constructo (**A**), 35S-*SILIP1*-His para 20 de las 25 líneas regeneradas (**C**), 35S-*SILIP1p*-His para 15 de las 19 líneas obtenidas (**I-J**), o 35S-*cam-ccdB*-His para las 6 líneas resultantes de la transformación con pGWB8 sin inserto (**G**). Asimismo, se muestra el resultado del PCR para *SIEF1*, utilizado como un gen control de calidad del ADN genómico extraído desde las mismas líneas analizadas para los constructos con *AtLIP1* (**B**), *SILIP1* (**E-F**), *SILIP1p* (**K-L**) o pGWB8 sin inserto (**H**). En cada caso, el control positivo C+ correspondió a 1 ng de la respectiva minipreparación de ADN plasmidial pGWB8-*AtLIP1*, -*SILIP1p* o -*SILIP1*, utilizadas para transformar *A. tumefaciens* EHA105. Por su parte, los controles negativos de cada reacción de PCR consistieron en utilizar ADN genómico de *S. lycopersicum* silvestre (C-1) o H<sub>2</sub>O (C-2) como templados de la reacción. MW: Marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

A partir de lo anterior, pudo identificarse la inserción del constructo 35S-*AtLIP1*-His para 2 líneas de las regeneradas (**Figura 13 A**), 15 líneas con el constructo 35S-*SILIP1*-His (**Figura 13 D y E**) y 2 para las líneas control (**Figura 13 G**). Sin embargo, no se identificaron líneas transgénicas con el constructo 35S-*SILIP1p*-His, pese a

haber variado las condiciones de PCR en gradientes de  $MgCl_2$  y temperatura de alineamiento, re-extraído ADN genómico de las 15 líneas portando 35S-*SILIP1p*-His y utilizado otra ADN polimerasa para realizar el análisis. Lo anterior no se debió a la calidad del ADN genómico extraído, ya que fue posible amplificar un fragmento de aproximadamente 1,5 kb correspondiente a *SIEF1* desde DNA genómico de plantas T0 regeneradas que fueron transformadas con dicho constructo (Fig. 13 K y L). Bajo estas condiciones, fue posible obtener líneas de tomate T0 transgénicas para tres de los cuatro constructos de interés, en las cuales se cuantificó el número de copias del respectivo inserto como se describiera previamente (Ji et al., 2012). En resumen, la gran mayoría de las líneas generadas poseen una sola inserción, salvo una (línea 2 portando pGWB8 sin inserto) (Anexo II).

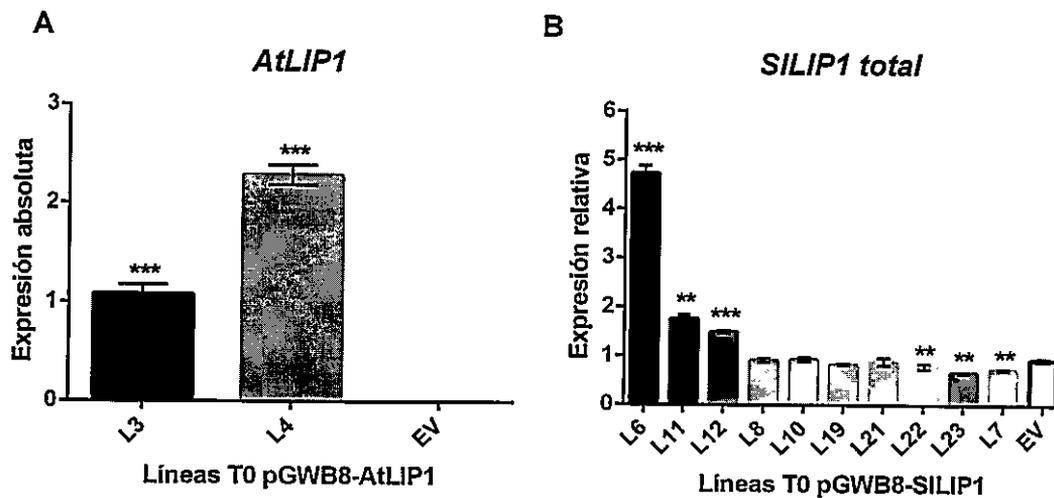
Por último, pese a que no se pudo continuar el estudio de *SILIP1p* en plantas, el resto de los constructos permitió continuar el desarrollo de la tesis, al analizar los efectos en lipoilación y expresión génica que tuvo la transformación estable en *S. lycopersicum*.

### **3.3. Realizar análisis de lipoilación de proteínas blanco y de expresión génica en líneas de tomate transformadas establemente con *SILIP1* o *SILIP1p*.**

#### **3.3.1. Evaluación de los niveles de expresión de los genes de interés en líneas T0 regeneradas**

Dado que la inserción de cada constructo de interés mediante el uso de *A. tumefaciens* es aleatoria en el genoma nuclear de la planta transformada (Gelvin, 2003), resulta necesario evaluar el nivel de expresión de cada gen en estudio en las líneas transgénicas.

Por ello, tras identificar las líneas T0 positivas para la inserción 35S-*AtLIP1*-His, 35S-*SILIP1*-His y control, se procedió a evaluar respectivamente el nivel de expresión relativa del gen *AtLIP1* y *SILIP1* endógeno mediante qRT-PCR en todas las líneas transgénicas regeneradas con cada constructo de interés, respecto a las plantas T0 regeneradas con el vector pGWB8 sin inserto. Para dichos análisis, se utilizó como gen normalizador *SICAC*, el que ha demostrado mantener niveles estables de expresión a lo largo del desarrollo de *S. lycopersicum* (Expósito-Rodríguez et al., 2008). Lo anterior se resume en **Figura 14**.

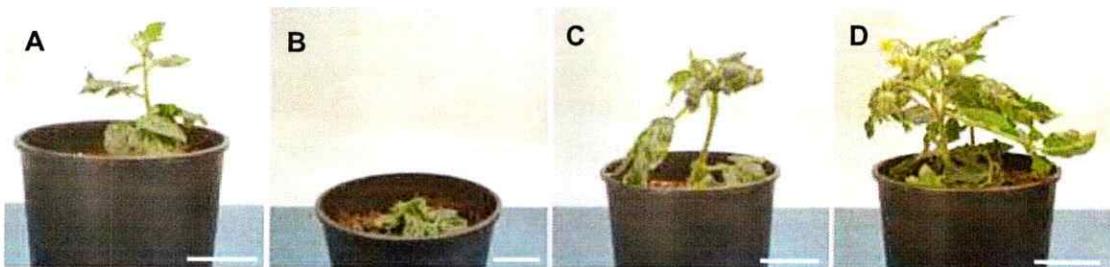


**Figura 14.** Análisis de expresión relativa de *AtLIP1* y *SILIP1* en líneas T0 transgénicas de tomate para constructos 35S-*AtLIP1*-His y 35S-*SILIP1*-His. **A**, se muestra el nivel de expresión absoluto de *AtLIP1* en las líneas positivas para la inserción 35S-*AtLIP1*-His. **B**, se muestra el nivel de expresión relativa de *SILIP1* endógeno en las líneas positivas por PCR para la inserción 35S-*SILIP1*-His, respecto al promedio de su expresión en las líneas portando el vector pGWB8 vacío. En ambos casos, el gen normalizador utilizado correspondió a *CAC*. Se realizó un *t*-test no pareado y los resultados se muestran como el promedio ( $n = 3$ )  $\pm$  desviación estándar (valor-*p*: \*, 0,05; \*\*, 0,01; \*\*\*, 0,001).

Se desprende de dicho resultado que las líneas T0 regeneradas con 35S-*AtLIP1*-His muestran niveles variables de expresión de *AtLIP1*, siendo mayor su expresión en la línea 4 (**Figura 14 A**). Por su parte, la expresión de *SILIP1* en plantas T0 regeneradas con 35S-*SILIP1*-His es también variable entre líneas distintas. En efecto, tres líneas

presentan entre 1,6 y 4,7 veces mayor nivel de expresión de *SILIP1* respecto al que poseen las líneas transformadas con el vector pGWB8 vacío (L6, L11, L12). Adicionalmente, cuatro líneas presentaron el mismo nivel de expresión relativa de *SILIP1* que las líneas control (L8, L10, L19, L21), y otras tres presentan entre 20 y 35% menor expresión relativa que aquellas con el vector pGWB8 vacío (L22, L23, L7), pese a que el nivel de expresión del gen normalizador *SICAC* en todas las líneas fue similar, con excepción de la línea 7 para *SILIP1*, donde fue ligeramente menor.

Paralelamente a evaluar la expresión de los genes en estudio, fue interesante evidenciar el fenotipo asociado a su transformación en líneas de tomate. En efecto, además de presentar un severo retardo en la elongación de brotes durante el proceso de regeneración de los explantes transformados, las líneas 35S-*AtLIP1*-His y 35S-*SILIP1*-His presentaron menor altura que las líneas portando la inserción correspondiente al vector pGWB8 vacío, lo cual fue particularmente notorio en las líneas con el constructo 35S-*SILIP1*-His que aquellas con 35S-*AtLIP1*-His. Lo anterior se encuentra resumido en **Figura 15**, donde se muestran imágenes representativas de algunas de las líneas transgénicas evaluadas que presentaron los fenotipos más contrastantes.



**Figura 15. Fenotipo de líneas T0 transgénicas de tomate con 35S-*AtLIP1*-His o 35S-*SILIP1*-His.** Se muestra el fenotipo de línea 4 portadora de 35S-*AtLIP1*-His (A), de línea 6 y 23 con el inserto 35S-*SILIP1*-His (B y C, respectivamente) y de línea 2 con el vector pGWB8 vacío (D). Las imágenes fueron fotografiadas el mismo día, a un mes de aclimatación en tierra. Barra: 5 cm.

Como puede observarse en comparación con el control (Figura 15 D y Tabla V), existe un efecto sobre el crecimiento más evidente en el caso de la línea 6 con 35S-SILIP1-His que en la línea 23 con el mismo constructo, cuyo fenotipo es más cercano al de la línea control. Por su parte, el fenotipo de la línea 4 con la inserción 35S-AtLIP1-His se aproxima más al que presentaron las plantas control.

Adicionalmente, hubo un notorio retraso de entre 21 y 26 días en la floración en algunas de las líneas transgénicas respecto a las líneas transformadas con el vector pGWB8 vacío, particularmente en aquellas que sobre-expresan SILIP1 (L6, 11 y 12), como puede verse en Tabla V. Sin embargo, todas las líneas transgénicas obtenidas fueron capaces de desarrollar flores y frutos en cantidades variables.

**Tabla V. Mediciones de parámetros fenotípicos en las líneas T0 transgénicas de tomate obtenidas. Se muestra la altura aérea de cada línea a octubre de 2016, así como su tiempo de floración, medido desde su traspaso a tierra en agosto de 2016 hasta la aparición de la primera flor en cada línea analizada. Además, se contabilizaron el total de flores y frutos visiblemente desarrollados a octubre de 2016.**

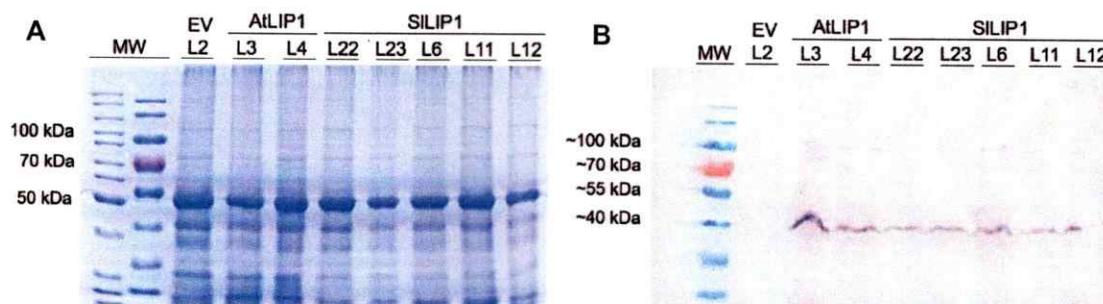
Constructo	Altura aérea (cm)	Tiempo floración (días)	Número flores + frutos desarrollados (Nº)
AtLIP1 L3	14	21	22 + 7
AtLIP1 L4	8	23	15 + 0
SILIP1 L6	7	44	7 + 0
SILIP1 L7	15	40	10 + 5
SILIP1 L8	14	25	16 + 1
SILIP1 L10	14	48	13 + 1
SILIP1 L11	12	43	15 + 1
SILIP1 L12	10	39	14 + 2
SILIP1 L19	12	27	10 + 1
SILIP1 L21	16	39	14 + 2
SILIP1 L22	13	41	14 + 5
SILIP1 L23	14	44	19 + 8
EV L1	16	18	12 + 5
EV L2	17	18	17 + 10

### 3.3.2. Análisis de lipoilación de proteínas blanco en líneas T0 de *S. lycopersicum* AtLIP1-His y SILIP1-His

Con el afán de continuar ahondando en el estudio molecular sobre el efecto de los genes *AtLIP1* y *SILIP1*, se seleccionaron aquellas líneas que resultaron más contrastantes para los siguientes análisis. De este modo, se eligieron ambas líneas con el constructo 35S-*AtLIP1*-His y las líneas 6, 11, 12, 22 y 23 con la inserción 35S-*SILIP1*-His, debido a que presentan los mayores (L6, 11 y 12) y menores (L22 y 23) niveles de expresión del gen de interés respecto a las líneas control, así como efectos fenotípicos asociados contrastantes.

Teniendo en consideración que las líneas que sobre-expresan *SILIP1* presentaron menor crecimiento respecto a las líneas control, y por lo tanto carecían de la cantidad de tejido necesaria para realizar la extracción de ácido lipoico libre según lo que se encuentra publicado en literatura (Navari-izzo et al., 2002; Sgherri et al., 2002), resultaba imposible cuantificar el contenido de ácido lipoico mediante HPLC. No obstante, y dado que la acción molecular de una lipoil sintasa en la vía de síntesis *de novo* culmina con la incorporación de ácido lipoico a proteínas blanco, sí era posible evaluar los niveles de lipoilación de proteínas blanco mediante *western blot*.

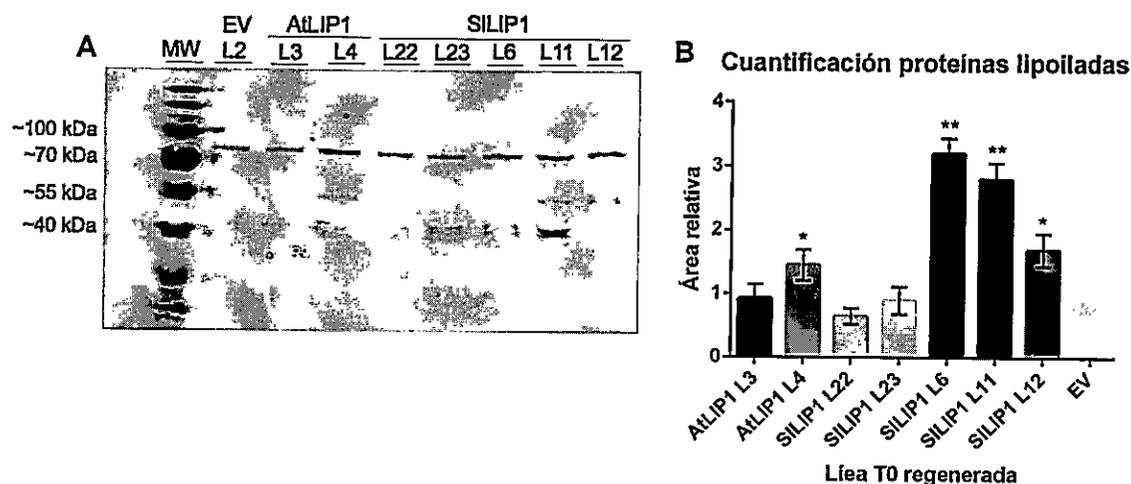
Para realizar dicha actividad, inicialmente se determinó la presencia de las proteínas AtLIP1-His y SILIP1-His en aquellas líneas T0 transgénicas para tales constructos, mediante *western blot* anti-His, lo cual se observa en **Figura 16**.



**Figura 16. Inmunodetección de AtLIP1-His y SILIP1-His en líneas T0 transgénicas de tomate con dichos constructos de interés.** Se muestra una imagen representativa del resultado de SDS-PAGE en que se cargaron 50 µg de proteínas provenientes de extractos totales obtenidos desde hojas de líneas con 35S-AtLIP1-His y 35S-SILIP1-His seleccionadas, y de la línea 2 portando el constructo del vector pGWB8 vacío (EV L2), tras su tinción en solución de Coomassie (A). Luego, se realizó la inmunodetección del epítipo de hexahistidina para las mismas fracciones visibles en A (B). En ella, el anticuerpo primario correspondió a  $\alpha$ -polihistidina monoclonal de ratón 1:3.000. Por su parte, el anticuerpo secundario correspondió a  $\alpha$ -IgG de ratón fusionado a fosfatasa alcalina producida en cabra 1:10.000. Tamaños esperados aproximados: AtLIP1-His: 44,0 kDa, SILIP1-His: 44,8 kDa. MW: PageRuler™ Prestained (~40, ~55, ~70 y ~100 kDa, B) and Unstained Protein Ladder (50, 70 y 100 kDa, A).

A juzgar por el patrón de migración de las bandas visibles cercanas a ~40 kDa (Figura 16 B), fue posible detectar la acumulación de AtLIP1-His (44 kDa) en ambas líneas portando el constructo 35S-AtLIP1-His, del mismo modo en que se detectó la señal correspondiente a SILIP1-His (44,8 kDa) en las líneas portando el respectivo constructo, mientras que en la línea control no se detectó ninguna señal. En ambos casos, la señal detectada fue de intensidad variable entre distintas líneas, no correlacionándose aparentemente con los niveles de expresión de los genes respectivos en cada línea.

A continuación, se procedió a evaluar los niveles de lipoilación en hojas de las líneas T0 previamente seleccionadas mediante la realización de un *western blot* anti-ácido lipoico unido covalentemente a proteínas, lo cual fue realizado para dos extracciones distintas por línea y en duplicado técnico para cada extracción, con el fin de dar sustento experimental a la cuantificación de la intensidad de las señales obtenidas mediante esta técnica. Dicho resultado se muestra en Figura 17.



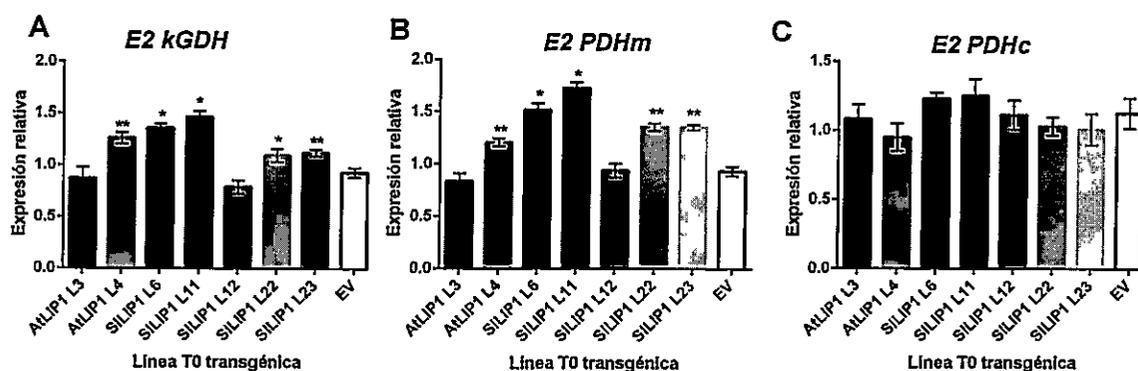
**Figura 17. Análisis de lipoilación de las plantas T0 transgénicas de tomate seleccionadas.** A, se muestra una imagen representativa de cuatro repeticiones del resultado de la inmunodetección de ácido lipoico (AL) unido a proteínas blanco, en 50 µg de extractos totales de proteínas obtenidos desde hojas de plantas T0 portando las inserciones 35S-*AtLIP1*-His o 35S-*SILIP1*-His. B, el conjunto de las señales de lipoilación por cada carril fue cuantificadas mediante ImageJ, y relativizadas a la señal de lipoilación detectada en la línea 2 portando el constructo correspondiente a pGWB8 (*EV L2*). En ella, se muestra el promedio de las cuatro repeticiones de dicho análisis.

A partir de dicho resultado, se obtuvo que la señal promedio de ácido lipoico unido a proteínas extraídas en las líneas que sobre-expresan *SILIP1* 6 y 11 y de la línea 4 que sobre-expresa *AtLIP1*, es mayor a aquélla que existe en el resto de líneas analizadas, respecto a la línea control. Lo anterior sugiere un mayor grado de lipoilación de proteínas en aquellas líneas que presentaron niveles elevados de *AtLIP1* o *SILIP1*, a juzgar por la intensidad promedio de las señales obtenidas, aunque para afirmar con mayor seguridad tal aseveración se requeriría realizar otros análisis más acuciosos.

### 3.3.3. Análisis transcripcional de genes blancos del ácido lipoico y de aquellos involucrados en su biosíntesis

Dado el resultado del análisis de lipoilación obtenido, se quiso indagar respecto a la expresión de las subunidades E2 del complejo  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (E2 kGDH) y piruvato deshidrogenasa tanto mitocondrial como cloroplastidial (E2 PDHm y E2 PDHc, respectivamente). El objetivo es saber si las subunidades lipoiladas en las

líneas transgénicas obtenidas correspondían a un pool basal ya presente en dichas plantas o si había transcripción de nuevas subunidades capaces de incorporar ácido lipoico para mantener su función biológica. Tales análisis de expresión génica se resumen en **Figura 18**.



**Figura 18.** Análisis de expresión relativa de *E2 kGDH*, *E2 PDHm* y *E2 PDHc* en líneas T0 transgénicas de tomate para constructos 35S-*AtLIP1*-His y 35S-*SILIP1*-His. A, se muestra el promedio del nivel de expresión relativa de *E2 kGDH* (A), *E2PDHm* (B), *E2 PDHc* (C) para las líneas transgénicas seleccionadas en los análisis anteriores portando 35S-*AtLIP1*-His o 35S-*SILIP1*-His, respecto al promedio de su expresión en las líneas portando el vector pGWB8 vacío. En todos los casos, el gen normalizador utilizado correspondió a *CAC*. Se realizó un *t-test* no pareado y los resultados se muestran como el promedio ( $n = 3$ )  $\pm$  desviación estándar (valor-*p*: \*, 0,05; \*\*, 0,01; \*\*\*, 0,001).

Tal resultado muestra que existe un aumento en la expresión relativa entre 1,2 y 1,5 veces de *E2 kGDH* (**Figura 18 A**) y entre 1,2 y 1,7 veces de *E2 PDHm* (**Figura 18 B**) en las líneas que sobre-expresan *SILIP1* 6 y 11 y en la línea 4 portando el constructo 35S-*AtLIP1*-His, siendo ligeramente menor en las líneas 22 y 23 portando el constructo 35S-*SILIP1*-His o en la línea 3 que sobre-expresa *AtLIP1*. A su vez, no se observa diferencia en la expresión relativa de *E2 PDHc* en ninguna de las líneas transgénicas con respecto a las líneas control.

Para evaluar otros posibles efectos derivados de la sobre-expresión de los genes en estudio, se analizaron los niveles de expresión de genes relacionados a las rutas biosintéticas de ácido lipoico. Por ello, se realizó qRT-PCR para cuantificar la

expresión de los genes *SISAM1*, codificante para una sintetasa de S-adenil metionina, dador de los átomos de azufre necesarios para la síntesis de ácido lipoico; *SILIP2*, que codifica para una lipoil transferasa y que está vinculada con la biosíntesis *de novo* desde precursores provenientes de la síntesis de ácidos grasos; y *SILpIA*, gen que codifica una lipoil ligasa, necesaria para la inserción de ácido lipoico a las proteínas blanco mediante una ruta de reciclaje del mismo (Figura 2). Dichos resultados se presentan en Figura 19.

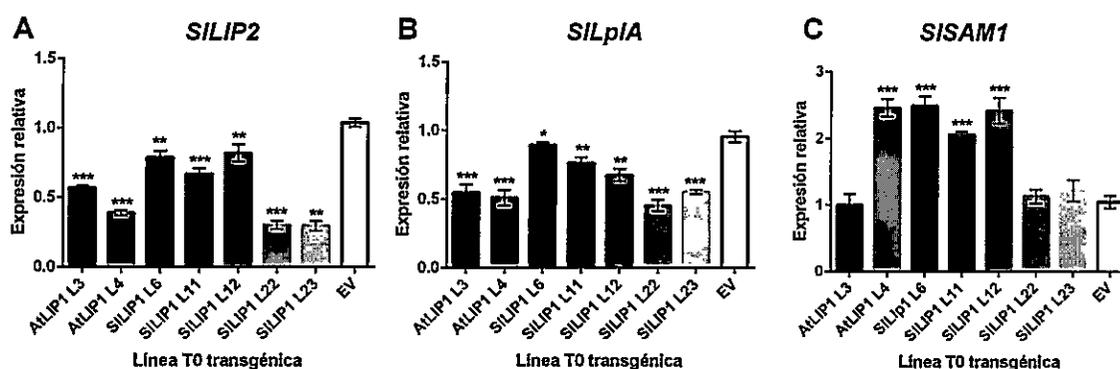


Figura 19. Análisis de expresión relativa de *SILIP2*, *SILpIA* y *SISAM1* en líneas T0 transgénicas para constructos 35S-*AtLIP1*-His y 35S-*SILIP1*-His. A, se muestra el promedio del nivel de expresión relativa de *SILIP2* (A), *SILpIA* (B), *SISAM1* (C) para las líneas transgénicas seleccionadas en los análisis anteriores portando 35S-*AtLIP1*-His o 35S-*SILIP1*-His, respecto al promedio de su expresión en las líneas portando el vector pGWB8 vacío. En todos los casos, el gen normalizador utilizado correspondió a *CAC*. Se realizó un *t*-test no pareado y los resultados se muestran como el promedio (n=3)  $\pm$  desviación estándar (valor-p: \*, 0,05; \*\*, 0,01; \*\*\*, 0,001).

En este caso, se observa que todas las líneas analizadas presentan menores niveles de expresión tanto de *SILIP2* como de *SILpIA* respecto al control (Figura 19 A y B), siendo mayor la diferencia en las líneas 22 y 23 para 35S-*SILIP1*-His como en ambas líneas portando la inserción 35S-*AtLIP1*-His. Por su parte, al analizar los niveles de acumulación de transcrito de *SISAM1*, se observó que las líneas *AtLIP1* L4 y *SILIP1* L6, L11 y L12, muestran niveles de expresión entre 2 a 2,5 veces mayor al compararlas con la expresión del control, mientras que las líneas restantes no mostraron diferencias apreciables respecto a las líneas transformadas con pGWB8 sin inserto (Figura 19 C).

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Determinar la funcionalidad biológica del producto génico de *SILIP1p* en *E. coli* mutante *lipA* KER176

Tal como se expusiera previamente en los resultados de la presente tesis (Figuras 3 – 5), fue posible generar los vectores de expresión en bacterias propuestos inicialmente en la estrategia desarrollada, dado que se obtuvieron los insertos *AtLIP1Δ18* y *SILIP1pΔ110* en pDEST–His<sub>6</sub>MBP, así como con el inserto *SILIP1Δ30*, lo cual se realizó como actividad paralela a la tesis. En efecto, se pudieron clonar las secuencias codificantes para ambas isoformas de potenciales lipoil sintasas de tomate así como el control positivo de lipoil sintasa de *A. thaliana* previamente caracterizada (Yasuno y Wada, 1998; Yasuno y Wada, 2002). En todos los casos mencionados, se siguió la estrategia de clonación publicada previamente para *AtLIP1Δ18* (Yasuno y Wada, 2002), correspondiente a clonar el fragmento codificante de cada proteína sin incorporar la secuencia correspondiente al péptido señal de destinación predicho bioinformáticamente (sección 2.2.1.1). Lo anterior se debe a que se ha visto que la incorporación de dichas secuencias puede afectar negativamente la estabilidad estructural de la proteína de fusión generada, limitando la producción de proteína recombinante (Khan et al., 2012; Rosano y Ceccarelli, 2014).

Dado además que la expresión inducida de proteína recombinante puede generar cuerpos de inclusión, es que se han desarrollado estrategias para fusionar la secuencia de interés a agentes solubilizantes, como una proteína de unión a maltosa o glutatión S–transferasa (MBP y GST, respectivamente, por sus siglas en inglés). En este caso, se utilizó MBP para dicho cometido, proteína que mantiene en solución a la proteína de fusión generada, debido a que permite su correcto plegamiento

aisladamente o en conjunto a chaperonas (Raran-Kurussi y Waugh, 2012). Lo anterior explicaría el hecho de que se detectaran en la fracción soluble todas las proteínas de fusión de interés (Figura 7), en mayor abundancia tras la inducción con IPTG. Sin embargo, también fue posible observar la presencia de todas las proteínas de fusión en extractos crudos provenientes de *E. coli* que no fue expuesto a IPTG. Lo anterior es atribuible al vector pDEST-His<sub>6</sub>MBP utilizado, debido a que éste posee un promotor *tac*, derivado del promotor *lac* (que posee la región -35 del promotor *trp* y -10 del promotor *lac*) que aumenta cerca de 10 veces los niveles de expresión del constructo de interés respecto al promotor *lacUV5*, pero que debido a ello presenta expresión en ausencia de inductor (Rosano y Ceccarelli, 2014).

Como tercer punto a considerar respecto a la generación de proteínas de fusión His<sub>6</sub>MBP con AtLIP1Δ18, SILIP1pΔ110 y SILIP1Δ30, fue el hecho de que la abundancia de SILIP1pΔ110 fue notoriamente menor a la que se obtuvo para el resto de los casos, mientras que hubo una versión de una proteína trunca de cerca de 40 kDa. Probablemente, tal proteína corresponde a His<sub>6</sub>MBP sola, debido a que es detectable en un *western blot* anti-His al poseer el epítipo de hexahistidina en N-terminal y dado que su peso molecular predicho es de 41,4 kDa.

Tal explicación supone la posibilidad de una proteólisis entre MBP y SILIP1p. Lo anterior resulta factible, debido a que en distintos modelos de expresión de proteínas recombinantes dicho fenómeno ocurre con frecuencia (Jahic et al., 2003), lo cual además se ha observado particularmente en la generación de proteínas de fusión con MBP (Li et al., 2010), donde puede ocurrir proteólisis entre MBP y la proteína fusionada de interés. Si bien el clivaje sitio-dirigido de la proteína de interés desde la proteína de fusión generada resulta de interés con objetivos de purificación y estudios posteriores, los clivajes inespecíficos ocurren en distintos sistemas de expresión de proteínas

recombinantes, para lo cual hay ciertas estrategias que se aconseja seguir para prevenirlos (Waugh, 2011), entre las cuales destaca la optimización de codones o modificar la secuencia aminoacídica con fines de modificar la estructura tridimensional de la proteína recombinante.

No obstante lo anterior, considerando el hecho de que fue posible expresar las proteínas recombinantes en todos los casos en sus versiones completas, se realizó el ensayo de complementación heteróloga de *E. coli lipA* KER176. A partir de dichos resultados (Figura 8 A – C), se pudo establecer que la acumulación de la proteína His<sub>6</sub>MBP–SILIP1pΔ110 (así como His<sub>6</sub>MBP–SILIP1Δ30) permiten el crecimiento de *E. coli lipA* KER176 tal como lo hace His<sub>6</sub>MBP–AtLIP1Δ18, a diferencia del control negativo. Lo anterior implica que SILIP1pΔ110 (así como SILIP1Δ30) restauran los requerimientos de carbono necesarios para su utilización en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y que se ven perjudicados por la falta de lipoilación de las subunidades E2 de los complejos PDH y α-kGDH en la cepa mutante *lipA* utilizada. Además, aunque este ensayo no es cuantitativo, el hecho de que visualmente el crecimiento de las colonias en placas MME (Figura 8 C) sea muy parecido entre aquéllas que crecieron, podría indicar que poseen capacidades similares de actuar como lipoil sintasas.

#### **4.2. Determinar la localización subcelular del producto génico de *SILIP1p* en *N. tabacum***

La determinación de la localización subcelular de una proteína resulta útil para entender los mecanismos por los cuales es regulada, así como para entender el contexto celular en el que se encuentra o las moléculas de distinta índole con las cuales puede interactuar (Hu et al., 2009). Además, se sabe que muchos fenotipos

observables en distintos organismos o incluso algunas enfermedades en humanos están vinculados con alteraciones en la destinación de distintas proteínas (revisado en Hung y Link, 2011).

En el contexto de caracterizar molecularmente *SILIP1p* como potencial lipoil sintasa plastidial de *S. lycopersicum*, resultaba razonable determinar su localización subcelular, no sólo por los motivos previamente expuestos, sino porque respecto al metabolismo de ácido lipoico en eucariontes inicialmente se lo confinaba exclusivamente a mitocondrias (Hayden et al., 1992; Packer, 1995; Wada et al., 1997; Yasuno y Wada, 1998). Sin embargo, posteriormente aumentó la evidencia respecto a que en organismos vegetales también existen isoformas plastidiales de algunas de las enzimas participantes en la biosíntesis de ácido lipoico (Wada et al., 2001; Yasuno y Wada, 2002; Ewald et al., 2007; Kang et al., 2007; Ewald et al., 2014). Lo anterior resulta relevante considerando que los complejos proteicos propensos a ser lipoilados (KGDH, BCDH, AoDH, GDC) son exclusivamente mitocondriales, mientras que el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) está presente tanto en mitocondrias como en cloroplastos (Lernmark y Cardestrom, 1994; Wada et al., 2001). Dado que en el proyecto de tesis doctoral de Jorge Araya se determinó bioinformáticamente que *SILIP1p* (NCBI, XP\_004252893.1) tenía un 78% de identidad aminoacídica con *AtLIP1p* (TAIR, N° Acceso AT2G20860) y que la localización predicha era cloroplastidial (68% de probabilidad, [www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/)), se procedió a determinarla experimentalmente, corroborando que *SILIP1p* se acumulaba efectivamente en cloroplastos (Figura 10 F – J). Este hallazgo permite no sólo incorporar información biológica respecto al gen y verificar predicciones bioinformáticas, sino que permite ahondar en la caracterización de parte de las rutas biosintéticas de ácido lipoico, al comprobar la existencia de una isoforma plastidial de

lipoil sintasa en tomate del mismo modo como ocurre en *Arabidopsis* (Yasuno y Wada, 2002). De esta manera, se genera mayor conocimiento sobre los distintos compartimentos donde ocurre la síntesis de ácido lipoico en organismos vegetales y cuyos blancos moleculares son, en gran parte, distintos. Por lo anterior, resulta posible suponer que los procesos en los cuales el ácido lipoico participa sean también parcialmente diferentes en ambos compartimentos. En cloroplastos en particular ocurre la síntesis de ácidos grasos en organismos vegetales (Ohlrogge et al., 1979), por lo cual existen precursores para la síntesis de ácido lipoico. Además, al menos en *Arabidopsis* se ha determinado recientemente la existencia de dos isoformas plastidiales de lipoil transferasas, AtLIP2p1 y AtLIP2p2 (Ewald et al., 2014), pero no se ha identificado a la fecha una lipoil ligasa plastidial, por lo que hasta ahora sólo se ha verificado la existencia de la vía de síntesis de ácido lipoico *de novo* y no la vía de reciclaje. Sin embargo, las isoformas de lipoil transferasas plastidiales no han sido identificadas en *S. lycopersicum*, por lo que una proyección posible corresponde a caracterizarlas y determinar su localización subcelular, lo que permitiría aumentar el conocimiento respecto a la síntesis de ácido lipoico en este compartimento.

#### **4.3. Obtener líneas de plantas de tomate que sobre-expresen *SILIP1* o *SILIP1p* y analizar fenotípica y molecularmente las líneas transformadas establemente**

Como pudo observarse en Tabla IV, se obtuvieron líneas T0 regeneradas para todos los constructos de interés en tasas variables de regeneración. De hecho, el porcentaje de regeneración de líneas para todos los constructos se encuentra dentro del rango esperable para transformaciones de explantes de tomate con *A. tumefaciens* que se encuentra previamente descrito (Sun et al., 2006; Pino et al., 2010; Cruz-Mendivil et al.,

2011; Guo et al., 2012), fluctuando entre un 3 y 8% del total de explantes utilizados para la transformación de cada constructo de interés. Lo anterior es esperable, considerando que tanto el co-cultivo de los explantes de tomate con *A. tumefaciens*, así como la mantención en medio selectivo y en condiciones de altas concentraciones hormonales por cerca de 5 meses resultan ser agentes estresantes durante el proceso de regeneración.

Ahora bien, la obtención de líneas de tomate que efectivamente portaron cada constructo de interés fue en gran parte realizada, resultando en la obtención de 2 líneas transgénicas para 35S-*AtLIP1*-His, 15 para 35S-*SILIP1*-His y 2 para el vector pGWB8 sin inserto, nuevamente en tasas variables entre un 0,8 y 4,8%. Sin embargo, resultó sorprendente que pese a obtener 19 líneas T0 regeneradas en medio de selección para el constructo 35S-*SILIP1p*-His, tras realizar los análisis moleculares no se obtuviera ninguna línea transgénica portando la inserción. Como puede corroborarse en **Figura 13 I, J, K y L**, tal resultado no pudo atribuirse a dificultades técnicas en los análisis moleculares: La calidad del ADN genómico extraído desde dichas líneas fue adecuada, pues fue posible amplificar por PCR un gen endógeno (*SIEF1*), y las condiciones de PCR para detectar la inserción 35S - His3 fueron aptas, dado que se utilizó el mismo programa térmico y en las mismas condiciones que para detectar las demás inserciones, además de haberse variado dichas condiciones tanto en términos de la concentración de Mg<sup>+2</sup> como de la temperatura de alineamiento. Lo anterior supone dos hechos: el primero, que pese a que los medios de regeneración contenía higromicina, la concentración utilizada no fue suficiente para evitar 19 falsos positivos en el caso del constructo 35S-*SILIP1p*-His. El segundo hecho es que, por algún motivo, la transformación con dicho constructo tuvo un efecto diferencial respecto al obtenido con el resto y, fundamentalmente, con 35S-*AtLIP1*-His y 35S-*SILIP1*-His.

Respecto al primer hecho, es posible suponer que se obtuvieran falsos positivos en el caso del constructo en cuestión, dado que en las líneas T0 regeneradas con 35S-*AtLIP1*-His, 35S-*SILIP1*-His y con el vector pGWB8 vacío también se obtuvieron falsos positivos en cantidades variables. De este modo, se obtuvieron falsos positivos en 9 de 11, 10 de 25 y 4 de 6 líneas con los respectivos constructos, lo cual constituye un 82%, 40% y 67% respectivamente, aunque en ningún otro caso se obtuvo un porcentaje del 100%. A su vez, la presencia de falsos positivos puede ser explicada a la concentración de higromicina utilizada (5 mg/L), pues no se utilizó la dosis máxima (25 mg/L) descrita previamente para la transformación de explantes de tomate (Chaudhry y Rashid, 2010). La razón de utilizar una concentración sub-máxima fue precisamente para propiciar la regeneración de los explantes transformados sin generar su muerte por la exposición a dicho agente selectivo, el que a concentraciones cercanas a la dosis máxima se ha reportado que puede impedir la regeneración de explantes vegetales (Meng et al., 2007).

El segundo hecho, sin embargo, no puede ser explicado únicamente por la obtención exclusiva de falsos positivos a juzgar por el resultado obtenido en el resto de los constructos, lo cual supondría una razón biológica más que técnica del proceso de regeneración. En este sentido, cabe destacar que todos los constructos en los cuales se obtuvieron líneas transgénicas son de isoformas de lipoil sintasas mitocondriales (*AtLIP1* y *SILIP1*) o bien, fueron transformadas con el vector pGWB8 vacío, que no porta un producto génico funcional que pudiera tener efectos fenotípicos o moleculares distintivos. Por ello, resulta tentador pensar que la carencia de líneas transgénicas para *SILIP1p* y no para el resto de los casos guarde relación de alguna forma con *SILIP1p* específicamente. Si ese fuese el caso, tendría que diferenciarse de algún punto común compartido por *AtLIP1*, *SILIP1* y el vector pGWB8. Exceptuando este último caso, tanto

*AtLIP1* como *SILIP1* codifican para lipoil sintasas mitocondriales (Yasuno y Wada, 2002 y tesis doctoral en curso de Jorge Araya, respectivamente), mientras que *SILIP1p* tiene localización cloroplastidial (**Figura 10**). En este contexto, si bien no se tiene información respecto a la sobre-expresión de genes involucrados en la biosíntesis de ácido lipoico, sí se cuenta con información de *Arabidopsis* relacionada a los efectos derivados de la mutación *knockout* de lipoil transferasas plastidiales (*Atlip2p* y *Atlip2p2*) y lipoil sintasa plastidial (*Atlip1p*). A partir de dicha información, se sabe que se requiere de la inactivación de ambas lipoil transferasas plastidiales para producir un efecto letal a nivel embrionario. Lo interesante es que es suficiente la inactivación de la lipoil sintasa plastidial para producir el mismo efecto en *Arabidopsis* (Ewald et al., 2014). Del mismo modo, la disrupción del gen que codifica para la subunidad E2 de PDH plastidial es suficiente para producir letalidad embrionaria tempranamente (Lin et al., 2003). Asumiendo que algunos de los explantes transformados con el constructo 35S-*SILIP1p*-His hubiesen expresado dicho gen y teniendo en consideración el fenotipo clorótico y el evidente retraso en el proceso de regeneración, resulta factible hipotetizar que un cambio en los niveles de transcrito codificante para lipoil sintasa plastidial pudiese haber imposibilitado la regeneración, posiblemente por el blanco molecular descrito correspondiente a PDH cloroplastidial. Sin embargo, tal hipótesis requeriría esfuerzos en el futuro para ser contestada con propiedad. Adicionalmente, el fenotipo clorótico y la imposibilidad de obtener líneas transgénicas portando el constructo 35S-*SILIP1p*-His también podría estar relacionada con otro proceso biológico vinculado a un cambio en el flujo metabólico de ciertos metabolitos producidos durante el ciclo de ácidos tricarbóxicos. En esta línea de pensamiento, asumiendo que la transformación estable de explantes de tomate con 35S-*SILIP1p*-His hubiese ocurrido, y que existieran explantes transcribiendo dicho transgén y

traduciendo la isoforma plastidial de lipoil sintasa, resulta factible pensar que hubiese un flujo aumentado desde  $\alpha$ -cetoglutarato hacia succinil-CoA, debido a un aumento en dicha conversión mediada por una mayor actividad del complejo kGDH sujeto a lipoilación. Si ese fuese el caso, habría menor cantidad de  $\alpha$ -cetoglutarato disponible para ser convertido a glutamina y ésta a glutamato (Temple et al., 1998; Stitt et al., 2001, Buchanan et al., 2015), derivando en última instancia en una menor asimilación de nitrógeno por parte de dichos explantes, lo cual genera un fenotipo clorótico, como el observado durante todo el proceso de regeneración. Sin embargo, tal hipótesis debe ser evaluada en mayor profundidad en el futuro.

De todas formas, el hecho de haber obtenido líneas transgénicas para el resto de los constructos permitió la continuación del estudio del rol de las isoformas mitocondriales, AtLIP1 y SILIP1 con respecto a aquellas líneas portando el constructo del vector pGWB8 sin inserto y descarta, además, la opción de que la inserción de genes que codifican para lipoil sintasa *per se* impida la regeneración de tomates.

#### **4.4. Realizar análisis de lipoilación de proteínas blanco y de expresión génica en líneas de tomate transformadas establemente con *SILIP1* o *SILIP1p***

Como pudo observarse en **Figura 14**, fue posible obtener líneas transgénicas que presentaron niveles de expresión de *AtLIP1* o *SILIP1* variables. En el caso de 35S-*AtLIP1*-His, la línea 4 expresa 1,2 veces más el gen *AtLIP1* que la línea 3 portando el mismo constructo, mientras que en el caso de 35S-*SILIP1*-His, 3 de las 10 líneas transgénicas presentaron mayores niveles de expresión relativa de *SILIP1* (líneas 6, 11 y 12), 4 presentaron niveles comparables a las líneas control (líneas 8, 10, 19 y 21) y 3

presentaron una ligera disminución de la expresión relativa de dicho gen (líneas 7, 22 y 23). En esto, resulta interesante notar que el nivel de expresión más alto obtenido fue de sólo 4,7 veces el de las plantas control, mientras que el más bajo fue de 0,65 veces respecto al control, pese a que la expresión de cada gen en el vector pGWB8 queda comandada por el promotor fuerte y constitutivo 35S, el que se utiliza habitualmente para sobre-expresar genes de manera constitutiva con un aumento en al menos 10 veces los niveles de expresión del transgén inserto (Kay et al., 1987; Dutt et al., 2014). Si la observación anterior se suma al hecho de no haber obtenido líneas transgénicas para uno de los casos (SILIP1p), resulta factible hipotetizar que la sobre-expresión de genes codificantes para lipoil sintasas sea un proceso acotado entre límites relativamente estrechos. Esto es razonable considerando que todos los blancos moleculares de lipoil sintasa participan en el metabolismo central, ya sea directamente en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (PDH y KGDH), en la regulación del estado energético celular (BCDH y AoDH) o en el proceso de fotorespiración (GDC). No obstante, tales aseveraciones son sólo tentativas y deben ser analizadas en profundidad con las generaciones sucesivas de las líneas transgénicas obtenidas (T1, T2). Además, si bien el hecho de haber obtenido niveles de expresión tan variables en las líneas transformadas, pese a utilizar un promotor fuerte es razonable considerando que la inserción del constructo de interés es azarosa y por lo tanto puede encontrarse en regiones genómicas con grados variables de transcripción (Gelvin, 2003), la obtención de niveles de expresión menores al control no puede ser explicada por esta razón. Más bien, resulta posible atribuir dicho efecto a la ocurrencia de algún tipo de silenciamiento génico, fenómeno que se ha descrito en la transformación mediada por *A. tumefaciens* en distintas generaciones de las líneas transformadas (Vaucheret et al., 1995; Gelvin, 2003; Fernandez et al., 2009).

Un hecho no menor a considerar es que hubo alteraciones en el crecimiento de ciertas líneas transgénicas, portando tanto *AtLIP1* (línea 4) como *SILIP1* (líneas 6 y 11), el que ya se sumaba al retraso en el tiempo de regeneración para tales construcciones. Adicionalmente, fue evidente que algunas de las líneas transgénicas con dichos genes presentaron una floración retrasada respecto a las plantas control. Lo llamativo de lo anterior, es que tales efectos fueron más notorios en aquellas líneas que sobre-expresan *SILIP1* o *AtLIP1* que en aquellas con niveles de expresión comparables al control, como pudo observarse en **Figura 15** y **Tabla V**. Tales resultados dan cuenta de efectos fenotípicos asociables a la sobre-expresión de los genes en estudio incluso en la generación transformada, aunque resulta imprescindible realizar estos análisis en las generaciones sucesivas de las líneas transgénicas generadas (T1, T2).

Teniendo en cuenta el propósito de evaluar los efectos de sobre-expresar los genes en estudio sobre la lipoilación, es que se seleccionaron ambas líneas con 35S-*AtLIP1*-His y aquellas con 35S-*SILIP1*-His con características fenotípicas y de expresión más contrastantes (línea 6, 11, 12, 22, 23). Respecto a ellas, se detectó la señal anti-His correspondiente a las proteínas *AtLIP1*-His y *SILIP1*-His en todas las líneas analizadas (véase **Figura 16** de Resultados), aunque no hubo una correlación clara entre la intensidad de cada señal y el nivel de expresión del transgén en cada línea (**Figura 14**). Lo anterior puede deberse a varios motivos tanto técnicos como biológicos. Respecto a estos últimos, la abundancia de proteínas detectadas por el *western blot* anti-His no necesariamente pesquisa procesos vinculados a su acumulación como son la cinética de degradación o síntesis, la regeneración de precursores en cada línea u otros procesos que alteren los niveles proteicos.

Luego de confirmar la presencia de *AtLIP1*-His y *SILIP1*-His, se procedió a

evaluar los efectos de éstas sobre la lipoilación de proteínas blanco. Como pudo verse en **Figura 17**, hubo notorios aumentos en los niveles de proteínas lipoiladas en las líneas que sobre-expresan *SILIP1*, así como fundamentalmente en la línea 4 que sobre-expresa *AtLIP1*, respecto a las líneas con menor nivel de expresión de ambos genes y de la línea control. Lo anterior tiende a correlacionarse con los niveles respectivos de expresión de *AtLIP1* y *SILIP1* en dichas líneas, aunque tal tendencia debería ser evaluada en las generaciones sucesivas de las líneas analizadas, para asegurar homogeneidad en el fondo genético sobre el cual realizar comparaciones. No obstante, resulta promisorio el hecho de que ya en T0 existan alteraciones de lipoilación detectables, así como efectos fenotípicos sobre floración y crecimiento. En suma, estos resultados constituyen una fuerte evidencia de que *SILIP1p* actúa efectivamente como una lipoil sintasa *in vivo*, particularmente en plantas, y no solo en el sistema heterólogo de *E. coli* utilizado previamente durante el desarrollo de la tesis.

A continuación, con el fin de extender el conocimiento adquirido respecto a los efectos de sobre-expresar *AtLIP1* y *SILIP1* en las líneas de tomate portando los respectivos constructos, se realizaron análisis de expresión génica. En el caso de los genes que codifican las subunidades lipoiladas de los complejos PDH mitocondrial y KGDH, se observó un aumento variable en su expresión relativa (**Figura 17**), particularmente en aquellas líneas que sobre-expresan ambos genes en estudio, aunque hubo también un aumento menor de la expresión de tales genes en las líneas *SILIP1* que mostraban menores niveles de expresión de este último gen respecto al control. Además, las mismas líneas que sobre-expresan *AtLIP1* (línea 4) y *SILIP1* (líneas 6, 11 y 12) presentaron mayores niveles de lipoilación de proteínas. Lo anterior puede implicar que existe una correlación entre el grado de lipoilación y el nivel de expresión de las subunidades propensas de lipoilación en las líneas que sobre-

expresan los genes en estudio. Lo anterior tienta a proponer que una mayor cantidad de ácido lipoico generado al sobre-expresar *AtLIP1* o *SILIP1* podría requerir mayores niveles de expresión de las subunidades propensas a ser lipoiladas al haber, idealmente, una mayor cantidad de éstas siendo efectivamente lipoiladas. Sin embargo, no se conocen mecanismos regulatorios que vinculen los niveles de expresión de dichas subunidades con los niveles de ácido lipoico o con la actividad de lipoil sintasas, así como tampoco se conoce la cinética de regeneración de subunidades propensas de ser lipoiladas. Por ello, sólo puede aseverarse con propiedad que al menos parte de las subunidades lipoiladas en aquellas líneas que sobre-expresan *AtLIP1* o *SILIP1* estaría dada por expresión de nuevos genes codificantes para tales subunidades. No obstante, no se pueden descartar del todo los efectos propios de cada línea, tanto por su hemicigosidad como por el hecho de que no existe un comportamiento opuesto en las líneas 22 y 23 con 35S-*SILIP1*-His que presentan menores niveles de expresión de dicho transgén, como se esperaría de una directa correlación. Por ello, nuevamente estudios en la descendencia de cada una de las líneas podría permitir esclarecer dichos aspectos, particularmente al analizar mediante *western blot* la abundancia de PDH y KGDH, lo que podría permitir discernir si el aumento de la lipoilación se correlaciona con un aumento de las subunidades propensas a ser lipoiladas al aumentar su transcripción, o si la incorporación de ácido lipoico se hace sobre un conjunto de subunidades ya disponibles.

Un caso similar ocurre al analizar la expresión de los genes *SILIP2* y *SILpIA* (**Figura 19**), donde se obtuvo en ambos casos una disminución de la expresión relativa de dichos genes en las líneas que sobre-expresan *AtLIP1* o *SILIP1*, pero no se obtuvo el comportamiento contrario en las líneas 22 y 23 que presentan menores niveles de expresión de *SILIP1*. Del mismo modo, en las líneas que sobre-expresan ambos genes

en estudio hubo un aumento de la expresión de *SISAM1* (Figura 19), que codifica para una posible S-adenil sintetasa que genera el precursor S-adenil metionina, necesario para la síntesis de ácido lipoico, mientras que no se observa un aumento de la expresión de *SISAM1* en las líneas 22 y 23 con 35S-*SILIP1*-His. Estos antecedentes podrían implicar alteraciones a nivel transcripcional de genes vinculados a la biosíntesis de ácido lipoico, pero no son concluyentes respecto al asunto y se requerirían mayores análisis para tener mayor propiedad sobre las conclusiones que de ellos pueden extraerse.

Por último, la sobre-expresión de *AtLIP1* y *SILIP1* tuvo efectos fenotípicos en floración y crecimiento en las líneas T0. Suponiendo que dichos fenotipos son heredables a las siguientes generaciones (T1, T2), es razonable proponer que tales efectos se deban a la sobre-expresión de *AtLIP1* y *SILIP1*, pues hubo un aumento en la lipoilación de subunidades de complejos enzimáticos participantes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. ¿Cómo podrían ser vinculados un aumento de la lipoilación de estas subunidades con los efectos negativos en el desarrollo vegetativo y reproductivo observados en las tomates que sobre-expresan tales genes? Para responder a esta pregunta, se sabe que en tomate, una disminución de la actividad citrato sintasa del mismo ciclo produce alteraciones en parámetros fisiológicos similares (Sienkiewicz-Porzucek et al., 2008). Además, recientemente se reportó en *Arabidopsis* que la mutación de la subunidad E2 del complejo PDH mitocondrial tiene efectos detrimentales sobre la actividad enzimática y sobre el crecimiento de dichas líneas (Song y Liu, 2015). Por lo anterior, resulta razonable suponer que la sobre-expresión de ambos genes en estudio tenga efectos fenotípicos de este tipo vinculados a las alteraciones que provoca sobre el ciclo de ácidos tricarbóxicos, modificando parte del metabolismo energético en tales líneas.

## 5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

Considerando el estado del arte al momento de iniciar la Tesis de Magíster expuesta, el trabajo desarrollado permitió ahondar en el conocimiento sobre parte del metabolismo del ácido lipoico en *S. lycopersicum*. En primer lugar, se caracterizó la potencial lipoil sintasa plastidial SILIP1p (en conjunto con la isoforma mitocondrial SILIP1 en la tesis de doctorado de Jorge Araya), corroborando que ambas son capaces de complementar funcionalmente a *E. coli lipA*, funcionando como lipoil sintasas en este modelo. A esto se sumó la verificación de su localización plastidial y mitocondrial de SILIP1p y SILIP1, respectivamente.

Además, y por primera vez según nuestros conocimientos, se generaron líneas T0 transgénicas que sobre-expresan *AtLIP1* y *SILIP1*. Las líneas transgénicas con las que se pudo continuar trabajando, presentaron niveles de expresión de los transgenes variables respecto al control. De manera interesante, parece haber una correlación entre el nivel de expresión de cada transgén con el aumento de los niveles de lipoilación en las proteínas blanco. Tales líneas, además, mostraron efectos fenotípicos visibles, particularmente en su crecimiento y floración. Además, no se logró obtener líneas que sobre-expresaran *SILIP1p*, lo cual podría dar cuenta del papel biológico de esta isoforma. Sin embargo, para aumentar el conocimiento respecto a SILIP1p, y a juzgar por la imposibilidad de regenerar líneas con este constructo, se podrían generar líneas que sobre-expresen *SILIP1p* de manera inducible o bien de manera, por ejemplo, fruto-específica, dado que en ambos casos se permitiría su regeneración inicial para lograr evaluar en etapa adulta los efectos derivados de su sobre-expresión.

Con todo, a través del desarrollo de este trabajo se responde la hipótesis del mismo, a saber: Los genes *SILIP1* y *SILIP1p* codifican para dos isoformas lipoil

sintasas, cuya sobre-expresión en *S. lycopersicum* cv. Micro-tom produce un aumento en la lipoilación de proteínas blanco, respecto a líneas de tomate control.

Sin embargo, la realización de esta tesis abre nuevas aristas a abordar. En primer lugar, si bien hay notorias tendencias en las líneas evaluadas, sería interesante extender este conocimiento analizando las generaciones sucesivas, particularmente en condiciones donde el fondo genético de cada línea sea homogéneo, de modo de poder discernir los efectos propios de la sobre-expresión respecto a aquellos propios de cada línea analizada, tal como se puntualizara previamente. Adicionalmente, se podrían sumar nuevos análisis que robustezcan la información obtenida en esta tesis o que la extiendan con el fin de abordar algunas preguntas biológicas de interés. Así, por ejemplo, sería interesante contar con al menos una evidencia experimental más respecto a la determinación de la localización subcelular, por ejemplo por fraccionamiento subcelular, dado que se sugiere contar con al menos dos abordajes experimentales independientes debido a los resultados no necesariamente coincidentes que pueden entregar tales técnicas (Hu et al., 2009). Además, sería interesante obtener las generaciones T2 o T3 de cada línea transgénica analizada en esta tesis, con el fin de poder llevar a cabo las mediciones de ácido lipoico por HPLC u otra técnica que permita cuantificar directamente los niveles de ácido lipoico libre. Esto robustecería el análisis de lipoilación hecho en el desarrollo de la tesis, el cual midió indirectamente el efecto de las lipoil sintasas estudiadas en la incorporación del ácido lipoico a proteínas blanco.

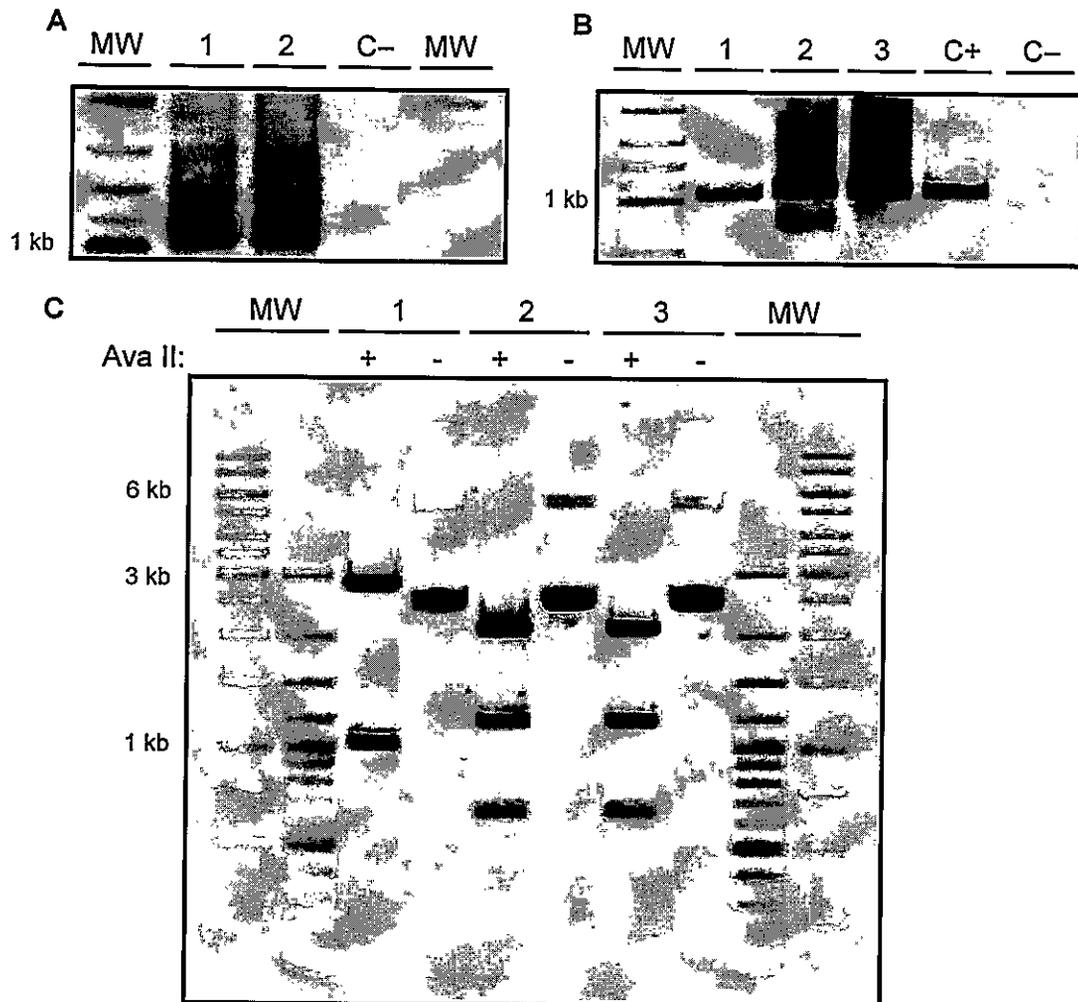
Por otra parte, considerando los efectos sobre el desarrollo y las diferencias tanto en lipoilación como en los niveles de expresión de los genes que codifican las subunidades E2 de PDH y KGDH, sería interesante poder ahondar en el estudio de los efectos de la sobre-expresión de *AtLIP1* y *SILIP1* sobre el ciclo de los ácidos

tricarboxílicos, así como sobre el complejo glicina descarboxilasa. Tales análisis podrían incluir ensayos de actividad de algunas de dichas enzimas, o evaluación de la fotorespiración generada en cada línea en condiciones experimentales, debido a la participación del complejo glicina descarboxilasa (sujeto a lipoilación) en este proceso.

Por último, cabe recordar que la Tesis de Magíster desarrollada estaba enmarcada en el proyecto de largo alcance de generar líneas de tomate con mayor contenido en ácido lipoico, en mira de obtener un alimento funcional o de plantas con mayor resistencia a diferentes tipos de estrés abiótico. En este contexto, se propone evaluar la respuesta de las líneas que sobre-expresan *AtLIP1* o *SILIP1* ante la exposición de estrés por sequía, por salinidad o presencia de metales pesados, entre otros, con el fin de abordar dicha proyección y dar continuidad al trabajo realizado.

## 6. ANEXOS

### Anexo I



**Figura S1. Clonación del fragmento de interés *SILIP1*Δ30 en pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO®.** Se muestra el producto amplificado con *Pfu* por PCR para *SILIP1*Δ30 (A) desde minipreparación plasmidial secuenciada pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO®-*SILIP1* generada para la obtención de vectores de expresión en plantas, la cual muestra el tamaño esperado de 1.050 pb. B, corresponde al análisis por PCR de tres colonias para *SILIP1*Δ30 de clones transformantes con el fragmento de interés en pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO®. El control positivo de cada reacción (C+) de PCR de colonia correspondió a 5 ng de ADN plasmidial del vector pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO®-*SILIP1*. Por su parte, el control negativo de PCR (C-) correspondió a agua utilizada como templado. C, se muestra el análisis de restricción de pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO®-*SILIP1*Δ30 en presencia (+) o ausencia (-) de *Ava* II, para minipreparaciones plasmidiales de las colonias de *E. coli* OneShot® TOP10 analizadas en B. Los fragmentos esperados para *SILIP1*Δ30 fueron: 2.059, 1.167 y 641 pb (sentido); 2.799 pb, 1.011 pb y 57 pb. Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa 1% a 90 V por 50 a 60 min. MW: marcador de peso molecular GeneRuler<sup>TM</sup> 100 pb Plus DNA Ladder.

## Anexo II

Para determinar el número de copias insertas en el genoma nuclear de *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom transformadas con pGWB8 portando los insertos –AtLIP1, –SILIP1 y sin inserto seleccionados para los análisis de lipoilación, se procedió según Ji et al. (2012). En primer lugar, se amplificaron mediante PCR los fragmentos de LAT52 (92 pb) y HPT (137 pb) a partir de ADN<sub>g</sub> de línea 2 de tomate T0 portando pGWB8 sin inserto. Para ello, se realizaron 10 reacciones de PCR, cada una de las cuales constó de 250 µM de cada partidor (véase Tabla SI), 200 µM de dNTPs, 1 U de *Taq* DNA polymerase (Sigma-Aldrich, Alemania), disuelto en la solución amortiguadora 1X correspondiente en un volumen de 20 µL. El programa de PCR empleado para cada amplicón siguió el perfil térmico: 94°C por 5 min; 45 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s y 72°C por 30 s; 72°C por 2 min y 10°C como temperatura de mantención.

**Tabla SI. Partidores utilizados para la amplificación de HPT y LAT52 para determinar el número de copias de líneas T0 transgénicas. Se muestra la secuencia de cada partidor utilizado para la amplificación inicial de HPT y LAT52 y para los análisis por qRT-PCR para la generación de la curva y la determinación del número de copias de líneas de tomate T0 transgénicas seleccionadas.**

Nombre	Secuencia (5' a 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Referencia
LAT52_F	AGACCACGAGAACGATATTTGC	60	Yang et al., 2005
LAT52_R	TTCTTGCCTTTTCATATCCAGACA	60	
HPT_F	CATATGAAATCACGCCATGTAGTGATTGA	60	Morales, 2016
HPT_R	GAACTGCCCGCTGTTCTGCA	60	

Posteriormente, se realizó la precipitación de cada producto de PCR con el fin de purificar ambos amplicones. Para realizarlo, el volumen total de cada amplicón (200 µL, correspondiente a la suma de las 10 reacciones por amplicón) fue mezclado por inversión con un volumen de CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 7,5 M y dos volúmenes de etanol absoluto. Cada mezcla fue incubada a -20°C durante 1 hora y posteriormente fue centrifugada durante a 16.000×g por 30 min a 4°C. A continuación, se descartó el sobrenadante y cada sedimento obtenido fue lavado con 500 µL de etanol 80% v/v, tras lo cual se

realizó una centrifugación a 16.000×g por 15 min a 4°C. Luego, cada sobrenadante fue descartado y las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente por 15 min para eliminar trazas de etanol. Finalmente, cada sedimento fue resuspendido en 10 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Winkler, Chile) y cuantificado mediante NanoVue. Dado que la concentración de ADN de doble hebra se calcula relacionando la absorbancia a 260 nm con un factor equivalente a 50 ng/µL, se obtuvo la absorbancia a 260 nm según la siguiente ecuación:

**Ecuación 1.** 
$$\text{Concentración} = 50 \text{ [ng/}\mu\text{L]} \cdot A_{260 \text{ nm}}$$

A continuación, se calculó la concentración molar en la muestra, a partir de la ecuación de Lambert-Beer:

**Ecuación 2.** 
$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Donde *A* corresponde a la absorbancia, en este caso a 260 nm;  $\varepsilon$  corresponde al coeficiente de extinción molar, medido en [L / mol·cm]; *l* corresponde a la longitud del paso óptico, medida en [cm]; y *c* corresponde a la concentración molar respectiva, medida en [mol / L]. Para calcular el coeficiente de extinción molar de cada amplicón, se utilizó la plataforma disponible en línea (<http://biophysics.idtdna.com/UVSpectrum.html>), utilizando la secuencia nucleotídica correspondiente al fragmento de *LAT52* y *HPT* amplificado. El paso óptico utilizado correspondió a 0,05 cm, debido a que la configuración automática de cuantificación de ácidos nucleicos utiliza un paso óptico de 0,5 mm.

Con lo anterior, se obtuvieron las concentraciones molares de cada uno de los productos de PCR previamente purificados, a partir de lo cual se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a una concentración de 10 nM para cada amplicón. Desde dicha dilución, se realizaron diluciones seriadas de cada amplicón desde 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>,

correspondientes a 1 nM hasta  $1 \cdot 10^{-6}$  nM, los cuales fueron utilizados como templado de programas de qRT-PCR para amplificar cada fragmento desde cada dilución.

Para realizar la curva necesaria para calcular el número de copias de *HPT* de muestras biológicas, se realizaron reacciones de qRT-PCR para amplificar *HPT* y *LAT52* por triplicado para cada dilución, de modo reacción consistió en 10  $\mu$ L de SYBR-Hi Rox (Agilent Technologies, EE.UU.), 250 nM de cada partidor y 5  $\mu$ L de cada dilución en cada reacción de 20  $\mu$ L. El programa de qRT-PCR consistió en una activación de la ADN polimerasa a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de: denaturación a 95°C por 30 s y alineamiento a 60°C por 30 s (Ji et al., 2012); seguido de una denaturación final de 60 a 95°C con medición de la señal de fluorescencia de SYBR® cada 0,2°C.

Con los datos obtenidos de cada amplificación por qRT-PCR, se realizó la curva con los puntos resumidos en **Tabla SII**.

**Tabla SII. Datos requeridos para la generación de la curva de número de copias.** La relación *LAT52/HPT* corresponde a la división de las concentraciones de *LAT52* y *HPT* para cada punto de la curva. Por su parte, el  $\Delta C_t(LAT52-HPT)$  corresponde a la diferencia entre los promedios de *LAT52* y *HPT* obtenida de las tres réplicas técnicas para cada dilución en cada amplificación.

Punto	LAT52 (nM)	HPT (nM)	Eje X	Eje Y
			$\text{Log}_2(LAT52/HPT)$	$\Delta C_t(LAT52-HPT)$
1	$1 \cdot 10^0$	$1 \cdot 10^{-6}$	19,93	-22,45
2	$1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5}$	13,29	-15,12
3	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-4}$	6,64	-7,67
4	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	0	-050
5	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-2}$	-6,64	6,16
6	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-1}$	-13,29	13,87
7	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^0$	-19,93	21,69

A partir de dicha curva, se obtuvo la ecuación de la regresión de tendencia lineal para el gráfico de dispersión generado, que se muestra a continuación:

**Ecuación 3.**  $\Delta C_t(LAT52-HPT) = 1,0979 \cdot \text{Log}_2(LAT52/HPT) - 0,5733$

Finalmente, se realizaron las mediciones por qRT-PCR para amplificar *HPT* y *LAT52* en cada una de las muestras a analizar. Para realizarlo, se siguió el mismo programa

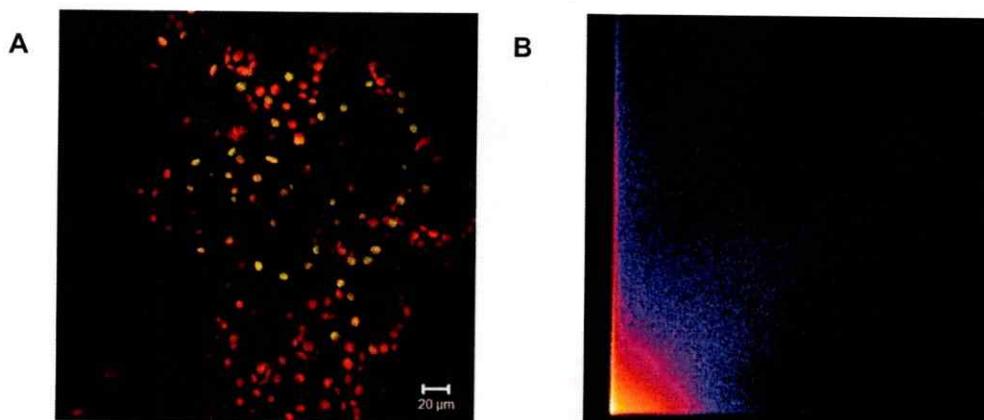
de qRT-PCR descrito previamente, pero en este caso se utilizó como templado 5  $\mu$ L de cada ADN<sub>g</sub> de las líneas T0 analizadas por triplicado, correspondientes en reacción a 50 ng de ADN<sub>g</sub> en una reacción de 20  $\mu$ L. Tales resultados se resumen en **Tabla SIII**.

**Tabla SIII. Determinación del número de copias de HPT en líneas T0 transgénicas.** El  $\Delta C_t$ (LAT52-HPT) corresponde a la diferencia entre los promedios de LAT52 y HPT obtenida de las tres réplicas técnicas para cada amplificación de la respectiva muestra analizada. El valor de  $\text{Log}_2(\text{LAT52}/\text{HPT})$  se obtuvo mediante la ecuación 3 referida en el Anexo II. Por su parte, el valor de HPT/LAT52 corresponde al recíproco multiplicativo del  $\text{Antilog}_2(\text{LAT52}/\text{HPT})$  del valor obtenido en la columna  $\text{Log}_2(\text{LAT52}/\text{HPT})$ . Por último, el número de copia para cada muestra corresponde a la aproximación entera más cercana de cada valor obtenido para la relación HPT/LAT52.

Muestra	LAT52		HPT		$\Delta C_t$ (LAT52-HPT)	$\text{Log}_2$ (LAT52/HPT)	HPT/LAT52	Nº copia
	$C_t$	$\bar{x} C_t$	$C_t$	$\bar{x} C_t$				
AtLIP1 L3	25,13	25,27	27,30	27,28	-2,02	0,25	0,8	1
	25,23		27,25					
	25,44		27,30					
AtLIP1 L4	25,33	25,36	32,23	32,13	-6,77	0,79	0,6	1
	25,28		32,52					
	25,46		31,64					
SILIP1 L6	24,13	24,17	25,92	25,86	-1,69	0,17	0,9	1
	24,24		25,84					
	24,13		25,82					
SILIP1 L11	25,55	25,45	27,33	27,36	-1,91	0,23	0,9	1
	25,39		27,38					
	25,40		27,37					
SILIP1 L12	23,74	23,85	25,07	25,43	-1,58	0,14	0,9	1
	23,96		25,53					
	23,84		25,69					
SILIP1 L22	25,84	25,93	27,72	27,81	-1,88	0,22	0,9	1
	25,92		27,83					
	26,02		27,87					
SILIP1 L23	25,88	25,93	28,01	28,08	-2,15	0,28	0,8	1
	26,10		28,13					
	25,80		28,09					
pGW8 vacío L1	24,10	24,13	24,75	24,82	-0,68	-0,24	1,2	1
	24,20		24,69					
	24,10		25,01					
pGWB8 vacío L2	24,15	24,13	24,36	24,38	-0,25	-0,75	1,7	2
	24,12		24,43					
	24,12		24,36					

### Anexo III

Para realizar la cuantificación del nivel de colocalización, se utilizó ImageJ mediante el uso del complemento disponible en línea Coloc2 (<http://Fiji.sc>). Para ello, se siguió el protocolo detallado previamente (Moser et al., 2016), el cual utiliza un análisis de colocalización que combina el reconocimiento de objetos con la correlación de intensidad de píxeles en cada canal, con el fin de sustraer el ruido de fondo de los análisis estadísticos. A partir del uso del macro publicado en dicha publicación, se obtuvieron los resultados resumidos en **Figura S2** y **Tabla SIV**.



**Figura S2. Histograma 2D de intensidad de píxeles para análisis cuantitativo de colocalización del constructo SILIP1p-EYFP.** A. Se muestra en línea segmentada el área utilizada correspondiente a la zona de co-ocurrencia de señales en ambos canales utilizados para el análisis de colocalización. B. Corresponde al resultado del análisis de colocalización obtenido para el constructo SILIP1p-EYFP referido en **Figura 10 J** mediante ImageJ a través del complemento Coloc2. En eje X se encuentra canal 1, correspondiente a la intensidad de cada píxel en el canal utilizado para observar la señal de EYFP. Por su parte, en eje Y se encuentra canal 2, correspondiente a la intensidad de cada píxel en el canal utilizado para visualizar la señal de clorofila.

**Tablas SIII. Resumen de parámetros estadísticos de colocalización obtenidos para el constructo SILIP1p-EYFP.** Los valores fueron obtenidos mediante ImageJ a través de su complemento Coloc2 a través del macro publicado en Moser et al. 2016 y están referidos a **Figura 10 J**.

Parámetro estadísticos	Valor
Coefficiente de Correlación Pearson	0.57
Coefficiente Colocalización Manders sin umbral	1.00
Coefficiente Colocalización Manders con umbral	0.74

A partir de **Figura S2**, dado que hay un gran porcentaje de píxeles con intensidad cero en ambos canales, resulta coherente considerar el coeficiente de colocalización de

Manders con umbral, el cual excluye los píxeles bajo un umbral de intensidad determinado automáticamente para cada imagen. Además, es independiente de la proporcionalidad de la señal entre ambos canales y es sensible a la co-ocurrencia de ambas señales para cada píxel, esto es, que sólo son considerados para el análisis cuantitativo de colocación aquellos píxeles donde hay señal detectable en ambos canales en estudios, a diferencia del coeficiente de Pearson, el cual es independiente de los niveles de cada señal y de su co-ocurrencia y es susceptible a errores debido al ruido de fondo de cada imagen (Moser et al., 2016).

Dado que los valores del coeficiente de correlación de Pearson pueden fluctuar entre -1 y +1, donde las señales son inversamente o totalmente lineales, respectivamente, un valor de 0.57 indica que para el caso analizado, la distribución de intensidades para cada píxel en ambos canales puede ser explicada en un 57% por la colocación de ambas señales en dicho píxel. Por su parte, los valores del coeficiente de colocación de Manders fluctúan entre 0 y 1, siendo totalmente o nulamente excluyentes ambas señales, por lo que el valor de 0.74 indica que para el caso del constructo SILIP1p-EYFP, la señal de EYFP y autofluorescencia de clorofila pueden coexistir o colocarse en un 74% para el caso analizado.

## 7. REFERENCIAS

- Arivazhagan P, Ramanathan K, Panneerselvam C (2001) Effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats. *Chem Biol Interact* 138: 189–198
- Biewenga GP, Haenen GRMM, Bast A (1997) The pharmacology of the antioxidant: Lipoic acid. *Gen Pharmacol* 29: 315–331
- Bitar MS, Ayed AK, Abdel-Halim SM, Isenovic ER, Al-Mulla F (2010) Inflammation and apoptosis in aortic tissues of aged type II diabetes: Amelioration with alpha-lipoic acid through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- dependent mechanism. *Life Sci* 86: 844–853
- Booker SJ (2004) Unraveling the pathway of lipoic acid biosynthesis. *Chem Biol* 11: 10–12
- Boyer J (1982) Plant productivity and environment. *Science* (80- ) 218: 443–448
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2015) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Second Edition. American Society of Plant Biologists. Wiley Blackwell.
- Chaudhry Z, Rashid H (2015) An improved *Agrobacterium* mediated transformation in tomato using hygromycin as a selective agent. *African J Biotechnol* 9: 1882–1891
- Cicchillo RM, Booker SJ, Park U V, Pennsylv V (2005) Mechanistic investigations of lipoic acid biosynthesis in *Escherichia coli*: both sulfur atoms in lipoic acid are contributed by the same lipoyl synthase polypeptide. 222: 2860–2861
- Cicchillo RM, Iwig DF, Jones AD, Nesbitt NM, Baleanu-Gogonea C, Souder MG, Tu L, Booker SJ (2004) Lipoyl synthase requires two equivalents of S-adenosyl-L-methionine to synthesize one equivalent of lipoic acid. *Biochemistry* 43: 6378–6386
- Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K (2011) Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol* 11: 163
- Cruz-Mendivil A, Rivera-López J, Germán-Báez LJ, López-Meyer M, Hernández-Verdugo S, López-Valenzuela JA, Reyes-Moreno C, Valdez-Ortiz A (2011) A simple and efficient protocol for plant regeneration and genetic transformation of tomato cv. micro-tom from leaf explants. *HortScience* 46: 1655–1660
- D'Ambrosio C, Giorio G, Marino I, Merendino A, Petrozza A, Salfi L, Stigliani AL, Cellini F (2004) Virtually complete conversion of lycopene into  $\beta$ -carotene in fruits of tomato plants transformed with the tomato lycopene  $\beta$ -cyclase (*tlcy-b*) cDNA. *Plant Sci* 166: 207–214
- D'Amico ML, Izzo R, Navari-Izzo F, Tognoni F, Pardossi A (2003) Sea water irrigation: Antioxidants and quality of tomato berries (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Acta Hort* 609: 59–65
- D'Amico ML, Navari-Izzo F, Sgherri C, Izzo R (2004) The role of lipoic acid in the regulation of the redox status of wheat irrigated with 20% sea water. *Plant Physiol Biochem* 42: 329–334
- Dutt M, Dhekney S a, Soriano L, Kandel R, Grosser JW (2014) Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. *Hortic Res* 1: 14047
- Ewald R, Hoffmann C, Florian A, Neuhaus E, Fernie AR, Bauwe H (2014a) Lipoate-protein ligase and octanoyltransferase are essential for protein lipoylation in mitochondria of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 165: 978–990

- Ewald R, Hoffmann C, Neuhaus E, Bauwe H (2014b) Two redundant octanoyltransferases and one obligatory lipoyl synthase provide protein-lipoylation autonomy to plastids of *Arabidopsis*. *Plant Biol* 16: 35–42
- Ewald R, Kolukisaoglu U, Bauwe U, Mikkat S, Bauwe H (2007) Mitochondrial protein lipoylation does not exclusively depend on the mtKAS pathway of de novo fatty acid synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 145: 41–48
- Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Pérez JA (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol* 8: 131
- Fernandez AI, Viron N, Alhaghdow M, Karimi M, Jones M, Amsellem Z, Sicard A, Czerednik A, Angenent G, Grierson D, et al. (2009) Flexible tools for gene expression and silencing in tomato. *Plant Physiol* 151: 1729–1740
- Fujiwara K, Okamura-Ikeda K, Motokawaf Y (1994) Purification and Characterization of Lipoyl-AMP : N-lysine lipoyltransferase from bovine liver mitochondria. *J.Biol.Chem.* 267, 20011–20016
- Fujiwara K, Takeuchi S, Okamura-Ikeda K, Motokawa Y (2001) Purification, characterization, and cDNA cloning of lipoate-activating enzyme from bovine liver. 276: 28819–28823
- Gelvin SB (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 16–37
- Goraça A, Huk-Kolega H, Plechota A, Kleniewska P, Clejka E, Skibska B (2011) Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep* 63: 849–58
- Gueguen V, Macherel D, Jaquinod M, Douce R, Bourguignon J (2000) Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *J Biol Chem* 275: 5016–5025
- Guo M, Zhang YL, Meng ZJ, Jiang J (2012) Optimization of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of Micro-Tom tomatoes. 11: 661–671
- Hayden MA, Huang I, Bussiere DE, Ashley GW (1992) The biosynthesis of lipoic acid. 9512–9515
- Head E, Nukala V, Fenoglio K, Muggenburg B, Cotman C, Sullivan P (2008) Effects of age, dietary and behavioral enrichment on brain mitochondria in a canine model of human aging. *Exp Neurol* 44: 735–745
- Heinisch BB, Francesconi M, Mittermayer F, Schaller G, Gouya G, Wolzt M, Pleiner J (2010) Alpha-lipoic acid improves vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes: A placebo-controlled randomized trial. *Eur J Clin Invest* 40: 148–154
- Hermes FAM, Cronan JE (2009) Scavenging of cytosolic octanoic acid by mutant LplA lipoate ligases allows growth of *Escherichia coli* strains lacking the lipB octanoyltransferase of lipoic acid synthesis. *J Bacteriol* 191: 6796–6803
- Hirayama T, Shinozaki K (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. *Plant J* 61: 1041–1052
- Hu Y, Lehrach H, Janitz M (2009) Comparative analysis of an experimental subcellular protein localization assay and in silico prediction methods. *J Mol Histol* 40: 343–352
- Hung M-C, Link W (2011) Protein localization in disease and therapy. *J Cell Sci* 124: 3381–92
- Incerti A, Navari-Izzo F, Pardossib A, Izzo R (2009) Seasonal variations in polyphenols and lipoic acid

- in fruits of tomato irrigated with sea water. *J Sci Food Agric* **89**: 1326–1331
- Jahic M, Gustavsson M, Jansen AK, Martinelle M, Enfors SV** (2003) Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *J Biotech.* doi:10.1016
- Janson M** (2006) Orthomolecular medicine: the therapeutic use of dietary supplements for anti-aging. *Clin Interv Aging* **1**: 261–265
- Ji W, Li J, Liu J** (2012) A method for measuring gene copy number in biological samples without using control samples of known copies. *J Molec Diagnosis. Rev.* **14**: 280 - 285
- Jordan SW, Cronan JE** (2003) The *Escherichia coli* lipB Gene encodes lipoyl (octanoyl)-acyl carrier protein : protein transferase. *J Bacteriol* **185**: 1582–1589
- Kang SG, Jeong HK, Lee E, Natarajan S** (2007) Characterization of a lipoate-protein ligase A gene of rice (*Oryza sativa* L.). *Gene* **393**: 53–61
- Kay R, Chan A, Daly M, McPherson J** (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science (80- )* **236**: 1299–1302
- Khan F, Legler PM, Mease RM, Duncan EH, Bergmann-Leitner ES, Angov E** (2012) Histidine affinity tags affect MSP1 structural stability and immunodominance in mice. *Biotechnol J* **7**: 133–147
- Lernmark U, Cardestrom P** (1994) Distribution of pyruvate dehydrogenase complex activities between chloroplasts and mitochondria from leaves of different species. *Plant Physiol* **106**: 1633–1638
- Li Z, Leung W, Yon A, Nguyen J, Perez VC, Vu J, Giang W, Luong LT, Phan T, Salazar K, Gomez SR, Au C, Xiang F, Thomas DW, Franz AH, Lin-Cereghino J, Lin-Cereghino GP** (2010) Secretion and proteolysis of heterologous proteins fused to the *Escherichia coli* Maltose Binding Protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2010 July; **72**(1): 113 - 124. doi: 10.1016/j.pep.2010.03.004.
- Lin M, Behal R, Oliver DJ** (2003) Disruption of pIE2 , the gene for the E2 subunit of the plastid pyruvate dehydrogenase complex in *Arabidopsis* causes an early embryo lethal phenotype. 865–872
- Lobell DB, Schlenker W, Costa-Roberts J** (2011) Climate trends and global crop production since 1980. *Science* **333**: 616–620
- De Marco VG, Bosanquet JP, Rawlani VR, Skimming JW** (2005) Lipoic acid decreases exhaled nitric oxide concentrations in anesthetized endotoxemic rats. *Vascul Pharmacol* **43**: 404–410
- van de Mark K, Chen JS, Stellou K, Perrine SP, Faller D V** (2003) Alpha-lipoic acid induces p27Kip-dependent cell cycle arrest in non-transformed cell lines and apoptosis in tumor cell lines. *J Cell Physiol* **194**: 325–40
- Meng ZH, Liang AH, Yang WC** (2007) Effects of hygromycin on cotton cultures and its application in *Agrobacterium*-mediated cotton transformation. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* **43**: 111–118
- Mickelbart M V., Hasegawa PM, Bailey-Serres J** (2015) Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nat Rev Genet* **16**: 237–251
- Mijnhout GS, Kollen BJ, Alkhalaf A, Kleefstra N, Bilo HJG** (2012) Alpha lipoic acid for symptomatic peripheral neuropathy in patients with diabetes: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Endocrinol.* doi: 10.1155/2012/456279
- Morales I** (2016) Análisis funcional de *Vitis vinifera* AGAMOUS-like 11 en el desarrollo de flores, frutos y semillas en tomate. Seminario de Título entregado a la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Moser B, Hochreiter B, Herbst R, Schmid J** (2016) Fluorescence colocalization microscopy analysis can

- be improved by combining object-recognition with pixel-intensity-correlation. *Biotech J*, 2016, 11. doi: 10.1002/biot.201600332
- Navari-Izzo F, Quartacci MF, Sgherri C (2002) Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Rev Lit Arts Am* 40: 463–470
- Novotny L, Rauko P, Cojocel C (2008)  $\alpha$ -Lipoic acid – the potential for use in cancer therapy. *In Vitro* 81–86
- Ohlrogge J, Kuhn D, Stumpf PK (1979) Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. 76: 1194–1198
- Ou P, Tritschler HJ, Wolff SP (1995) Thiocctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant? *Biochem Pharmacol* 50: 123–126
- Packer L (1995) Acide lipoic as biological antioxydant. Review Article. *Free Radic Biol Med* 19: 227–250
- Pérez-López U, Robredo A, Lacuesta M, Sgherri C, Mena-Petite A, Navari-Izzo F, Muñoz-Rueda A (2010) Lipoic acid and redox status in barley plants subjected to salinity and elevated CO<sub>2</sub>. *Physiol Plant* 139: 256–268
- Pino LE, Lombardi-Crestana S, Azevedo MS, Scotton DC, Borgo L, Quecini V, Figueira A, Peres LE (2010) The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato “Micro-Tom” model system. *Plant Methods* 6: 23
- Posner MG, Upadhyay A, Bagby S, Hough DW, Danson MJ (2009) A unique lipoylation system in the Archaea lipoylation in *Thermoplasma acidophilum* requires two proteins. 276: 4012–4022
- Ramaswamy A V, Maurelli AT (2010) *Chlamydia trachomatis* serovar I2 can utilize exogenous lipoic acid through the action of the lipoic acid ligase LplA1. 192: 6172–6181
- Raran-Kurussi S, Waugh DS (2012) The ability to enhance the solubility of its fusion partners is an intrinsic property of maltose-binding protein but their folding is either spontaneous or chaperone-mediated. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0049589
- Rébélié F, Alban C, Bourguignon J, Ravanel S, Douce R (2007) The role of plant mitochondria in the biosynthesis of coenzymes. *Photosynth Res* 149–162
- Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front Microbiol* 5: 1–17
- Sgherri C, Kadlecová Z, Pardossi A, Navari-Izzo F, Izzo R (2008) Irrigation with diluted seawater improves the nutritional value of cherry tomatoes. *J Agric Food Chem* 56: 3391–3397
- Sgherri C, Navari-Izzo F, Pardossi A, Soressi GP, Izzo R (2007) The influence of diluted seawater and ripening stage on the content of antioxidants in fruits of different tomato genotypes. *J Agric Food Chem* 55: 2452–2458
- Sgherri C, Quartacci MF, Izzo R, Navari-Izzo F (2002) Relation between lipoic acid and cell redox status in wheat grown in excess copper. *Plant Physiol Biochem* 40: 591–597
- Shay K, Moreau R, Smith E (2009) Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys* 1790: 1149–1160
- Sienkiewicz-Porzucek A, Nunes-Nesi A, Sulpice R, Lisec J, Centeno DC, Carillo P, Leisse A, Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR (2008) Mild reductions in mitochondrial citrate synthase activity result in a compromised nitrate assimilation and reduced leaf pigmentation but have no effect on

- photosynthetic performance or growth. *Plant Physiol* **147**: 115–27
- Song L, Liu D** (2015) Mutations in the three *Arabidopsis* genes that encode the E2 subunit of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex differentially affect enzymatic activity and plant growth. *Plant Cell Rep* **34**: 1919–1926
- Stitt M, Müller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Schelble WR, Krapp A** (2001) Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J Exp Bot* vol 53, No 370, pp. 959-970.
- Suh JH, Moreau R, Heath S-HD, Hagen TM** (2005) Dietary supplementation with (R)-alpha-lipoic acid reverses the age-related accumulation of iron and depletion of antioxidants in the rat cerebral cortex. *Redox Rep* **10**: 52–60
- Sun HJ, Uchii S, Watanabe S, Ezura H** (2006) A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol* **47**: 426–431
- Temple SJ, Vance CP, Gantt S** (1998) Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends in Plant Sci*, February 1998, vol 3, No 2 pp. 51 - 56.
- Vaucheret H, Palauqui JC, Elmayan T, Moffatt B** (1995) Molecular and genetic analysis of nitrite reductase co-suppression in transgenic tobacco plants. *Mol Gen Genet* **248**: 311–317
- Vinocur B, Altman A** (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: Achievements and limitations. *Curr Opin Biotechnol* **16**: 123–132
- Wada H, Shintani D, Ohlrogge J** (1997) Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production. **94**: 1591–1596
- Wada M, Yasuno R, Jordan SW, Cronan JE, Wada H** (2001) Lipoic acid metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cloning and characterization of a cDNA encoding lipoyltransferase. *Plant Cell Physiol* **42**: 650–6
- Wang H Sen, Yu C, Zhu ZJ, Yu XC** (2011) Overexpression in tobacco of a tomato GMPase gene improves tolerance to both low and high temperature stress by enhancing antioxidation capacity. *Plant Cell Rep* **30**: 1029–1040
- Wang M, Marín A** (2006) Characterization and prediction of alternative splice sites. *Gene* **366**: 219–227
- Waugh DS** (2011) An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif* 2011 December; **80**(2): 283 - 293. doi:10.1016/j.pep.2011.08.005
- Wu MJ, Doherty PJO, Fernandez HR, Lyons V, Rogers PJ, Dawes IW, Higgins VJ** (2011) An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00726.x
- Yang L, Pan A, Jia J, Ding J, Chen J, Cheng H, Zhang C, Zhang D** (2005) Validation of a tomato-specific gene, LAT52, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic tomatoes. *J Agric and Food Chem. Rev.* **53**: 183 - 190
- Yasuno R, Wada H** (1998) Biosynthesis of lipoic acid in *Arabidopsis*: cloning and characterization of the cDNA for lipoic acid synthase. *Plant Physiol* **118**: 935–943
- Yasuno R, Wada H** (2002) The biosynthetic pathway for lipoic acid is present in plastids and mitochondria in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **517**: 110–114
- Yasuno R, Wettstein-knowles P Von, Wada H** (2004) Identification and Molecular Characterization of the  $\alpha$ -Ketoacyl-[Acyl Carrier Protein] synthase component of the *Arabidopsis* mitochondrial fatty acid

- synthase. *Biol Chem* 279: 8242–8251
- Zhao L, Wang C, Song D, Li Y, Song Y, Su G, Dunalef JL** (2014) Systemic administration of the antioxidant/iron chelator  $\alpha$ -lipoic acid protects against light-induced photoreceptor degeneration in the mouse retina. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 55: 5979–5988
- Zhao X, Miller JR, Jiang Y, Marletta MA, Cronan JE** (2003) Assembly of the covalent linkage between lipoic acid and its cognate enzymes. *Chem Biol* 10: 1293–1302
- Zhu C, Sanahuja G, Yuan D, Farré G, Arjó G, Berman J, Zorrilla-López U, Banakar R, Bai C, Pérez-Massot E, et al.** (2013) Biofortification of plants with altered antioxidant content and composition: Genetic engineering strategies. *Plant Biotechnol J* 11: 129–141