

UCH-FC  
MAG-B  
A 663  
C.1



ESCUELA DE POSTGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

## **“Purificación y caracterización de VvSDL, una enzima de *Vitis vinifera* (vid) capaz de oxidar sorbitol”**

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

**Magister en Ciencias Biológicas**

**Facultad de ciencias**

Por

**Jorge Andrés Araya Flores**

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

**Diciembre 2013  
Santiago – Chile**



**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE MAGÍSTER**

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

**Jorge Andrés Araya Flores**

Ha sido aprobado 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 25 de octubre, 2013.

Director de Tesis:

**Dr. Michael Handford**

Firma manuscrita en azul del Dr. Michael Handford, sobre una línea punteada.

Comisión de Evaluación de la Tesis

**Dra. Liliana Cardemil**

(Presidenta comisión)

**Dr. Francisco Pérez**

(Evaluador Comisión)

Firma manuscrita en azul de Liliana Cardemil, sobre una línea punteada. Debajo de la firma se encuentra un sello circular de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, con el texto "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL" y "U. DE CHILE".

*...A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional  
A Beatriz, por la fuerza y alegría que me da día a día  
A mi tutor por su apoyo y compañía durante mi formación  
científica...*

177

1000 3 10 10 10 10 10

10 10 10 10 10 10

10 10 10 10 10 10

10 10 10 10 10 10

10 10 10 10

10 10 10 10 10 10

10 10 10 10 10 10

10 10 10 10 10 10

10 10 10 10 10 10

10 10

10 10 10 10 10 10

10 10 10 10 10 10

10 10 10 10 10 10

10 10 10 10 10 10

10 10 10 10 10 10

10 10 10 10 10 10

10 10 10 10 10 10

10 10 10 10 10 10

10 10

10 10

10 10 10 10 10 10

10 10 10 10 10 10

10 10 10 10 10 10

10 10

## BIOGRAFIA



Una calurosa mañana del 11 de enero de 1985 a eso de las 11 de la mañana fue el momento en el que tuve contacto por primera vez con esta realidad. Mis padres, Mario Araya y Margarita Flores decidieron que su tercer hijo llevase por nombre de Jorge Andrés.

Mi educación básica y media la realicé en un colegio científico humanista, mixto y perteneciente a los Marianistas. El año 2002 fue el año en el cual se podría decir que se cerró uno de los primeros ciclos en mi vida, salir de la burbuja del colegio, realizando eso sí una transición pre-universitaria de un año.

Luego de esta etapa, durante el año 2004 ingresé al Programa Académico de Bachillerato de la Universidad de Chile, dando así inicio a lo que se podría denominar un nuevo ciclo, durante el cual para el año 2006 ya me encontraba en la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la cual me titulé el año 2011.

Durante el tiempo de permanencia en la universidad he conocido a muchas personas, muchas realidades y creo que todos quienes han vivido esta etapa saben, o deberían saber, que el mundo se abre de una manera impresionante... que algunos puntos de vista cambian y otros se reafirman.

Con esta tesis se cierra un ciclo comenzado hace 2 años para obtener el grado académico de magister en ciencias biológicas y, como todo en esta vida, el término de una etapa no es más que el comienzo de otra.

## **Agradecimientos**

... Sin duda y primero que todo agradecer a mi familia, por el apoyo eterno e incondicional que siempre he sentido de su parte, no tengo duda alguna que sin ellos jamás habría llegado hasta este punto en mi vida y no sería lo que soy hoy... a mis padres por formarme en los valores necesarios para afrontar la vida y a mis hermanos por el cuidado, apoyo y preocupación que siempre ha existido...

... a la gente del laboratorio, por el ambiente de trabajo grato que siempre ha existido y en especial por las tertulias "científicas" con una cerveza en mano... todas instancias que me han ayudado en demasía a crecer como científico y como persona... a mi tutor por el apoyo y entrega a sus alumnos, siempre dispuesto a discutir algún resultado o cualquier inquietud que tuviese tanto dentro del ámbito científico como fuera de él...

... Beatriz, mi compañera, por esa alegría y energía que me das día a día y que tan importante ha sido durante los últimos meses, permitiéndome cerrar de buena forma este ciclo.

... gracias a la vida por darme la oportunidad de participar y llegar al fin de este ciclo y dar así comienzo a una nueva etapa...

## INDICE

BIOGRAFIA .....	iv
Agradecimientos.....	v
Índice de figuras.....	ix
Índice de Tablas .....	xi
Abreviaturas .....	xii
Resumen .....	xiii
Abstract.....	xv
1 INTRODUCCION.....	1
1.1 Distribución de carbohidratos en plantas.....	1
1.2 Alcoholes de azúcar en plantas.....	1
1.3 Metabolismo de sorbitol en organismos vegetales.....	3
1.3.1 Sorbitol Deshidrogenasa (SDH).....	4
1.1.1 Aldosa 6-fosfato reductasa (A6PR).....	6
1.4 Polioles y su metabolismo en plantas no-Rosacea .....	7
1.5 <i>Vitis vinifera</i> como modelo de interés.....	9
1.6 Estrategia Desarrollada.....	12
2 HIPOTESIS .....	14
3 OBJETIVOS .....	14
3.1 Objetivo General:.....	14
3.2 Objetivos específicos: .....	14
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
4.1 Equipos y programas computacionales utilizados.....	15

4.1.1	Centrifugas.....	15
4.1.2	Termociclador .....	15
4.1.3	qRT-PCR.....	15
4.1.4	Digitalización de resultados obtenidos en geles de agarosa, generación de esquemas y estudios <i>in-silico</i> .....	15
4.1.5	Cuantificación de ácidos nucleicos.....	15
4.2	Material biológico .....	16
4.2.1	Vectores utilizados y crecimiento de bacterias.....	16
4.2.2	Especies vegetales utilizadas .....	17
4.3	Partidores, programas utilizados para reacciones de amplificación de ácidos nucleicos y geles de agarosa .....	17
4.4	Síntesis de cDNA a partir de RNA de <i>Vitis vinifera</i> .....	20
4.4.1	Tratamiento con DNasa .....	20
4.4.2	Transcripción reversa (RT).....	21
4.5	Construcción de vectores .....	21
4.5.1	pCR8-VvSDL.....	21
4.5.2	pET28a-His-VvSDL.....	23
4.5.3	pGWB5-VvSDL-GFP.....	24
4.6	Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).....	25
4.7	Expresión y purificación de His-VvSDL.....	26
4.7.1	Determinación de las condiciones de inducción .....	26
4.7.2	Extracción de proteínas totales .....	26
1.6.1	Purificación de His-VvSDL.....	27
4.8	Cuantificación de proteínas.....	27
4.9	Geles de poliacrilamida e inmuno-detección mediante western blot (WB).....	27
4.10	Ensayos de actividad enzimática y determinación de parámetros cinéticos .....	30
4.11	Transformación transitoria de <i>N. tabacum</i> y localización subcelular.....	31
5	RESULTADOS .....	32
5.1	Clonación de <i>VvSDL</i> en pCR8.....	32
5.2	Análisis aminoacídico de <i>VvSDL</i> .....	33
5.3	Determinación de la calidad del cDNA para ensayos de qRT-PCR.....	35



5.4	Análisis de expresión de <i>VvSDL</i> y <i>VvS6PDL</i> en distintos estadios del desarrollo de la baya de uva.	37
5.5	Predicción <i>in-silico</i> de la localización subcelular de <i>VvSDL</i> .	40
5.6	Construcción del vector pGWB5- <i>VvSDL</i> .	40
5.7	Visualización Microscópica de <i>VvSDL</i> -GFP.	43
5.8	Construcción de pET28a-His- <i>VvSDL</i> .	44
5.9	Inducción y extracción de HIS- <i>VvSDL</i> utilizando perlas de vidrio.	46
5.10	Estandarización de las condiciones de inducción.	47
5.11	Ensayos de actividad con extractos solubles totales.	50
5.12	Purificación de HIS- <i>VvSDL</i> mediante gradiente continuo.	51
5.13	Purificación de His- <i>VvSDL</i> mediante gradiente discontinuo.	52
5.14	Determinación de los parámetros cinéticos de HIS- <i>VvSDL</i> purificada con sorbitol.	54
6	Discusión.	56
6.1	Clonación de <i>VvSDL</i> desde Thompson Seedless.	56
6.2	Análisis de los niveles de expresión de <i>VvSDL</i> y <i>VvS6PDL</i> .	59
6.3	Determinación de la localización subcelular de <i>VvSDL</i> .	62
6.4	Purificación y determinación de los parámetros cinéticos de <i>VvSDL</i> .	63
7	Conclusiones.	67
8	BIBLIOGRAFIA.	69
	ANEXO I.	74
	ANEXO II.	76

## Índice de figuras

<b>Figura 1: Ruta metabólica del sorbitol en rosáceas.....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 2: Estructura cristalográfica de SDH de rata.....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 3: Perfil térmico utilizado en las reacciones de qRTPCR.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 4: Amplificación de <i>VvSDL</i> desde baya de vid. ....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 5: Digestión doble de pCR8A y pCR8B.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 6: Resultados de la secuenciación de <i>VvSDL</i> de Thompson Seedless.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 7: Identidad aminoacídica entre SDHs vegetales conocidas y <i>VvSDL</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 8: Alineamiento de secuencias entre SDH conocidas .....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 9: Calidad de cDNA de los distintos estadios de desarrollo .....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 10: Análisis de expresión de <i>VvSDL</i> y <i>VvS6PDL</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 11: Digestión enzimática de pCR8C.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 12: Corroboración de la construcción de pGWB5-<i>VvSDL</i>-GFP.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 13: PCR de colonias de <i>A. tumefaciens</i> portadoras de pGWB5-<i>VvSDL</i>-GFP .</b>	<b>42</b>
<b>Figura 14: Localización subcelular de <i>VvSDL</i>-GFP.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 15: Digestión doble de pCR8D y pET28a.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 16: PCR para corroborar la construcción pET28a-HIS-<i>VvSDL</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 17: Digestión con <i>Ava</i>I de pET28a-HIS-<i>VvSDL</i>. ....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 18: Estudios preliminares de actividad SDH de HIS-<i>VvSDL</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 19: SDS-PAGE de extractos de proteínas totales obtenidos desde inducciones con diferentes concentraciones de IPTG.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 20: SDS-PAGE y western blot de inducciones a 37 y 28 °C. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 21: Ensayos de actividad con extractos solubles totales.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 22: Purificación de HIS-<i>VvSDL</i> mediante gradiente continuo de imidazol.....</b>	<b>52</b>

**Figura 23: Purificación mediante gradiente discontinuo de imidazol..... 53**

**Figura 24: Gráfico de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato... 54**

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1: Partidores utilizados.</b> .....	17
<b>Tabla 2: Programas Termociclador.</b> .....	19
<b>Tabla 3: Predicción <i>in-silico</i> de la localización sub celular de VvSDL.</b> .....	40

## Abreviaturas

- ADH:** Alcohol deshidrogenasa  
**CaMV35S:** Promotor 35S del Virus de Mosaico de Coliflor  
**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario  
**CDS:** Secuencia codificante ("Coding Sequence")  
**Ct:** Ciclo umbral (*cycle threshold*)  
**Da:** Dalton  
**DEPC:** Dietil Pirocarbonato, compuesto que inactiva RNAsa por modificación covalente en residuos de histidina  
**dNTPs:** Deoxi-nucleótidos-trifosfato: dATP, dTTP, dGTP, dCTP.  
**DO:** Densidad óptica  
**EST:** "expressed sequence tag" o marcador de secuencia expresada  
**EtOH:** Etanol  
**GFP:** proteína verde fluorescente (green fluorescent protein)  
**Gpf:** gramos por peso fresco  
**idonatoDH:** L-idonato deshidrogenasa  
**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido  
**kb:** Kilobases (1000pb)  
**Kcat:** Constante catalítica  
**Km:** Constante de Michaelis-Menten  
**L 100pb:** Estándar de peso molecular de ácidos nucleicos de 1000 pares de bases.  
**L 1Kb:** Estándar de peso molecular de ácidos nucleicos de 1000 pares de bases.  
**LB:** Medio Luria Bertani  
**Np:** nanopura  
**ORF:** "open reading frame" o marco abierto de lectura  
**pb:** Pares de bases  
**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)  
**qRT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (quantitative real time polymerase chain reaction)  
**PT:** proteínas totales  
**RNA:** Ácido ribonucleico ribosomal.  
**SDH:** sorbitol deshidrogenasa-NAD dependiente  
**Tm:** Temperatura de apareamiento del ADN, temperatura a la cual dos hebras complementarias en solución se separan completamente.  
**U:** unidad enzimática  
**UV:** Luz ultra-violeta.  
**Vmax:** Velocidad máxima  
**VvSDL:** Vitis Vinifera Sorbitol Deshidrogenasa Like (enzima putativa)  
**VvS6PDL:** Vitis Vinifera Sorbitol 6 fosfato Deshidrogenasa Like (enzima putativa)

## Resumen

El sorbitol es el mayor producto fotosintético en especies de árboles frutales de importancia económica para Chile pertenecientes a la familia *Rosaceae*. El sorbitol se sintetiza a partir de la glucosa mediante la enzima sorbitol 6-fosfato deshidrogenasa (S6PDH) en las hojas y es transportado por el floema hasta los órganos sumideros, en donde es convertido a fructosa por la acción de la enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH).

A pesar de que el sorbitol es propio y característico de especies vegetales pertenecientes a la familia *Rosaceae*, secuenciaciones de los genomas de otras especies vegetales han revelado la presencia de secuencias ortólogas del tipo *SDH* en especies no *Rosaceae*. En este contexto, trabajos anteriores identificaron un marco de lectura abierta en el genoma de *Vitis vinifera* (vid) el cual se aisló desde la variedad Cabernet Sauvignon y se denominó *VvSDH1*. *VvSDH1* posee 75-86% de identidad aminoacídica con *SDHs* conocidas de especies pertenecientes a la familia *Rosaceae*.

Durante el desarrollo de este trabajo, se aisló a partir de cDNA de *V. vinifera* (variedad Thompson Seedless) un ORF que codifica para un gen denominado *VvSDL* (99% de identidad con *VvSDH1*), se determinaron los niveles de expresión para dicho gen y para *VvS6PDL* (una posible *S6PDH*) en distintos estadios del desarrollo de la baya de uva, se determinó la localización subcelular de *VvSDL-GFP* mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco y se expresó y purificó *HIS-VvSDL* para el desarrollo de ensayos bioquímicos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, sugieren que *VvSDL-GFP* es una proteína citosólica y que los niveles expresión de *VvSDL* y *VvS6PDL* varían en los distintos estadios

de desarrollo de la baya de uva estudiados. Además se determinó que HIS-VvSDL es capaz de oxidar sorbitol, ribitol y xilitol *in vitro* y que posee Km de 1,56 y una velocidad máxima de 61 nM utilizando sorbitol y NAD como sustratos.

### Abstract

Sorbitol is the major photosynthetic product in fruit tree species belonging to the *Rosaceae* family which is of economic importance to Chile. Sorbitol is synthesised from glucose by sorbitol 6-phosphate dehydrogenase (S6PDH) in the leaves and transported through the phloem to sink organs, where it is converted to fructose by sorbitol dehydrogenase (SDH).

Although sorbitol is characteristic of plants belonging to the *Rosaceae* family, the sequencing of other plant genomes has revealed the presence of SDH-type orthologous sequences in non-*Rosaceae* species. In this context, previous work has identified an open reading frame in the genome of *Vitis vinifera* (grapevine, Cabernet Sauvignon) named *VvSDH1*. *VvSDH1* has 75-86% amino acid identity with SDHs from species belonging to the *Rosaceae* family.

In this work the ORF of *VvSDL* (99% of identity with *VvSDH1*) was isolated from cDNA of grapevine (Thompson Seedless variety). *VvSDL* and *VvS6PDL* (a putative S6PDH) expression levels were measured in different development stages of grape berry, the subcellular localisation of *VvSDL*-GFP was determined by transient transformation of tobacco leaves and HIS-*VvSDL* was expressed and purified in order to perform biochemical assays.

The results obtained in this study indicate that *VvSDL*-GFP is a cytosolic protein and both, *VvSDL* and *VvS6PDL* expression levels, change during the different developmental stages of the grape berry. Furthermore HIS-*VvSDL* is capable of oxidising sorbitol, ribitol and xylitol *in vitro* and has a  $K_m$  1,56 and  $V_{max}$  61 nM using sorbitol and NAD as substrate.



## 1 INTRODUCCION

### 1.1 Distribución de carbohidratos en plantas

La distribución de carbohidratos en las plantas es fundamental para el desarrollo de las mismas. Este proceso comienza con la fijación inicial de carbono a través de la fotosíntesis, para continuar con la conversión metabólica y la posterior distribución de compuestos de carbono reducidos a lo largo del organismo vegetal. Dependiendo de la especie, esta última etapa consiste en el movimiento de azúcares o de alcoholes de azúcar (poli alcoholes o polioles) desde los tejidos fotosintéticos hasta los tejidos sumidero no fotosintéticos (Slewinsky y Braun 2010).

### 1.2 Alcoholes de azúcar en plantas

Los alcoholes de azúcar son la forma reducida de azúcares del tipo aldosa o cetosa. La cadena de carbón de éstos puede ser lineal (polioles acíclicos o alditoles) o dispuesta como un anillo (polioles cíclicos o ciclitoles). El término poliol se refiere a compuestos con tres o más carbonos, los cuales poseen un grupo hidroxilo (OH). Los alditoles reciben su nombre de acuerdo al número de átomos de carbono que posean, siendo los más comunes aquellos que están constituidos por seis carbonos (hexitoles). En plantas superiores se han reportado diecisiete alditoles entre los cuales al menos trece diferentes se han identificado en angiospermas (Lewis 1984). Los tres hexitoles más comunes en angiospermas son el manitol, el cual es la forma reducida de la manosa; el sorbitol o glucitol, la forma reducida de la glucosa y el galactitol o dulcitol, la forma reducida de la galactosa (Noiraud y cols. 2001). Todos estos compuestos se clasifican como “solutos compatibles”, dentro de los cuales también se incluyen compuestos de amonio

cuaternarios, prolina y compuestos sulfónicos terciarios, con la característica de acumularse en altas concentraciones dentro de las células sin interferir con el metabolismo de las mismas (Stoop y cols., 1996).

En algunas familias de plantas superiores, el transporte de carbohidratos se realiza en forma de sacarosa o rafinosa en conjunto con algún poliol dependiendo de la familia a la que el organismo pertenezca. Es así como en Apiaceas (e.g. apio), Oleaceas (e.g. olivo) y Rubiaceas (e.g. café) se transporta manitol; en Celastraceas (e.g. *Euonymus* spp.) se transporta galactitol y en Rosaceas (e.g. manzana) y Plantaginaceas (e.g. llantén) se transporta sorbitol (Pommerrenig y cols. 2007).

Tanto el manitol como el sorbitol son derivados de productos fotosintéticos primarios en hojas maduras (Stoop y cols., 1996). Se ha descrito, por ejemplo, que una alta tasa fotosintética en apio (*Apium graveolens*) está vinculada con la síntesis de manitol lo que representa un sumidero adicional en la fijación fotosintética de CO<sub>2</sub> (Pharr y cols, 1995).

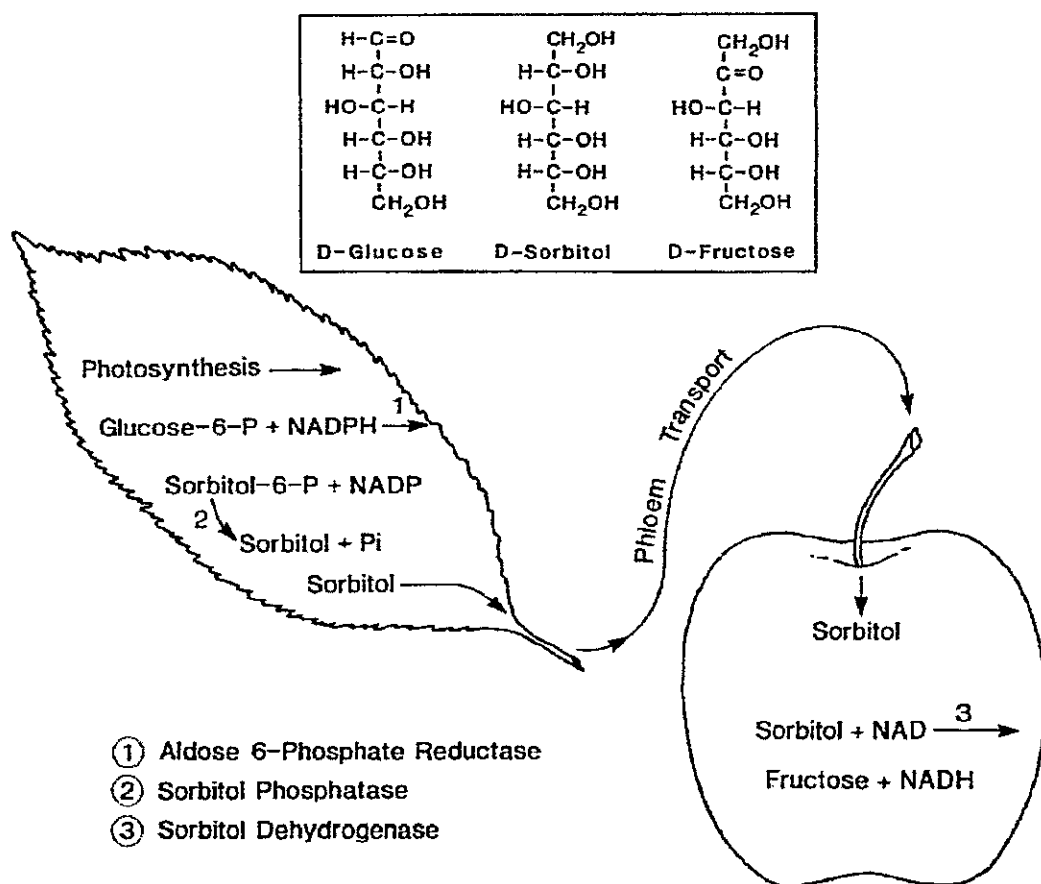
El transporte de polioles a través del floema de la planta provee por lo menos cinco ventajas al organismo comparado con el transporte de azúcares. Primero, confieren un uso de carbono más eficientemente, debido a que la utilización de un alcohol de azúcar con respecto a un azúcar como la sacarosa o rafinosa tiene un mayor rendimiento neto de ATP en órganos no fotosintéticos (Pharr y cols, 1995). Segundo, otorgan una mejor protección contra radicales hidroxilos debido a la capacidad de neutralizarlos (Smirnoff y Cumbers, 1989; Shen y cols., 1997). Tercero, en su forma lineal son eficientes osmolitos por lo que su acumulación permite mejorar la tolerancia a la salinidad

(Everard y cols., 1994; Stoop y Pharr, 1994; Hu y cols., 2005; Rejskova y cols., 2007; Pommerrenig y cols., 2007). Cuarto, pueden compensar reducciones en el potencial hídrico, además de establecer puentes de hidrogeno a través de sus grupos hidroxilos en casos de limitación de agua (Popp y Smirnoff, 1995), pudiendo estabilizar membranas y mantener actividades enzimáticas otorgando resistencia al estrés térmico (Hasegawa y cols., 2000). Finalmente, son capaces de formar complejos con el boro, el cual es un importante micronutriente para los organismos vegetales, lo que permite mejorar la movilización de éste a través del floema (Bellaloui y cols., 1999; Lehto y cols., 2004).

### **1.3 Metabolismo de sorbitol en organismos vegetales**

Junto con la sacarosa, el sorbitol es el mayor producto fotosintético en muchas especies de árboles frutales de importancia económica para Chile pertenecientes a la familia Rosacea tales como manzana, pera, durazno, cereza, damasco y ciruela. Tanto el sorbitol como la sacarosa son transportados desde las hojas hasta los órganos sumidero como son los frutos y raíces (Bielecki, 1982; Loescher, 1987). El sorbitol es un alditol cuya fórmula molecular es  $C_6H_{14}O_6$ , posee una masa molecular de 182.17 g/mol y su nombre según la nomenclatura IUPAC es (2R,3R,4R,5S)-hexane-1,2,3,4,5,6-hexol (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). En sistemas vegetales, el sorbitol se sintetiza a partir de glucosa mediante la catálisis realizada por tres enzimas; primero una aldosa 6-fosfato reductasa (A6PR) convierte glucosa 6-fosfato en sorbitol 6 fosfato, reacción acoplada a la oxidación de NADPH, luego el sorbitol 6 fosfato es desfosforilado por una fosfatasa y es translocado hacia el floema. Una vez que el sorbitol ha sido transportado a los órganos sumideros, éste puede ser oxidado a fructosa mediante la reacción reversible

catalizada por la enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH) con la reducción concomitante de  $\text{NAD}^+$ , formando  $\text{NADH}$  (figura 1) (Loescher, 1987).



**Figura 1: Ruta metabólica del sorbitol en rosáceas.** Resumen de las reacciones involucradas en la síntesis y catabolismo de sorbitol en Rosáceas, junto con la estructura molecular de los principales metabolitos (Loescher, 1987).

### 1.3.1 Sorbitol Deshidrogenasa (SDH)

La enzima sorbitol deshidrogenasa (L-iditol: $\text{NAD}^+$  oxidoreductasa, EC 1.1.1.14) cataliza la reacción reversible  $\text{D-sorbitol} + \text{NAD}^+ \leftrightarrow \text{D-fructosa} + \text{NADH} + \text{H}^+$ . Fue parcialmente purificada por primera vez en 1951 desde el hígado de rata (Negm y

Loescher, 1979; Blakley, 1951), posteriormente desde pera japonesa (Oura y cols., 2000) y caracterizada desde manzana utilizando proteínas recombinantes (Yamada y cols., 1998), mostrando que es una enzima presente tanto en animales como en plantas.

En mamíferos, SDH ha sido ampliamente estudiada debido a la relación que pueda tener la acumulación de sorbitol en diferentes tejidos con las complicaciones de la diabetes en humanos (Gabbay, 1973). Es así como se han obtenido estructuras cristalográficas de SDH desde ratón (Johansson y cols., 2001) y desde humanos (Pauly y cols., 2003). Se ha descrito que SDH es una enzima que utiliza estrictamente NAD<sup>+</sup> como coenzima para llevar a cabo la oxidación de sorbitol a fructosa, es un tetrámero con un ion de zinc por subunidad aunque puede ser considerada como un dímero de dímeros (figura 2) y posee una relación distante con respecto a alcoholes deshidrogenasas (ADH) de mamíferos presentando solamente alrededor de un 20% de identidad posicional (Johansson y cols., 2001; Eklund y cols., 1985). Si se analiza la estructura de cada subunidad, éstas presentan dos dominios distintivos. Uno de ellos es el dominio de unión a coenzima, el cual presenta un motivo de “plegamiento de Rossmann” y un sitio de unión a NAD<sup>+</sup> (similar a lo que ocurre en ADH). El otro dominio es el catalítico, el cual posee un sitio de unión a zinc (Johansson y cols., 2001).

Cabe mencionar que durante la caracterización bioquímica de SDH provenientes de distintos organismos, los resultados muestran que ésta no es exclusiva para la oxidación de sorbitol, sino que es capaz de oxidar otros alcoholes de azúcar, tales como iditol, ribitol, manitol, entre otros (Oura y cols., 2000; Lindstad y cols., 1992; Negm y Loescher, 1979)

Estudios realizados con SDH en manzana (*Malus x domestica*) en donde se estudian dos isoformas de la enzima codificadas por los genes MdSDH5 y MdSDH6 muestran que la localización subcelular corresponde principalmente a citoplasma y cloroplasto, resultados que fueron ratificados mediante transformaciones transitorias en *Arabidopsis thaliana* (Wang y cols. 2009)



**Figura 2: Estructura cristalográfica de SDH de rata.** Homotetrámero que se puede considerar como un dímero de dímeros (modificado de Johansson y cols., 2001).

### 1.1.1 Aldosa 6-fosfato reductasa (A6PR)

La enzima aldosa 6-fosfato reductasa (EC 1.1.1.200) o sorbitol 6-fosfato deshidrogenasa (S6PDH) es la principal enzima en la biosíntesis del sorbitol en hojas fotosintéticamente activas. La reacción que cataliza es la transformación de glucosa 6-fosfato a sorbitol 6-fosfato, reacción acoplada a la oxidación de NADPH a NADP. Esta enzima fue clonada por primera vez desde plantas por Kanayama y cols. (1992) quienes determinaron que pertenece al grupo filogenético de las aldosas reductasa. Usando plantas transgénicas de

tabaco que poseen el gen de S6PDH proveniente de manzana, se demostró que esta enzima es capaz de sintetizar sorbitol en dicho organismo (Tao y cols., 1995). Posteriormente se reportó que plantas transgénicas de manzana en las cuales la expresión del gen fue suprimida presentan niveles disminuidos de sorbitol, demostrando que ésta es una enzima esencial para la síntesis del mismo (Kanamaru y cols. 2004).

#### **1.4 Polioles y su metabolismo en plantas no-Rosacea**

Alcoholes de azúcar, y las enzimas involucradas en su metabolismo, también están presentes en especies vegetales no-Rosaceas, aún cuando la concentración es menor a la registrada en especies pertenecientes a familias que característicamente transportan y acumulan polioles. En plantas no-Rosaceas, se ha observado un incremento en los niveles de varios poli-alcoholes principalmente en condiciones de estrés, lo cual se relaciona con el carácter soluto compatible que caracteriza estos compuestos.

Por ejemplo, en *Arabidopsis*, utilizando perfiles metabolómicos, se determinó que el sorbitol presente en bajos niveles en hojas, aumentó su concentración al aplicar un golpe de frío (Kaplan y cols, 2004). En condiciones de estrés por deshidratación otros polioles fueron identificados en *Arabidopsis* (glicerol, lactitol, inositol, maltitol, manitol y xilitol) de los cuales los niveles de xilitol aumentaron unas 4 veces en hojas rosetas luego de ser sometidas al estrés (Rizhsky y cols, 2004). En condiciones de estrés por sequía los niveles de sorbitol y ribitol en hojas de plantas de *Arabidopsis* aumentaron aproximadamente 1,5 y 3,8 veces, respectivamente (Nosarzewski y cols, 2012). De esta forma, los alcoholes de azúcar mencionados, en particular sorbitol, xilitol y ribitol podrían cumplir un papel osmoprotector en *Arabidopsis*. Junto con esto, trabajos

realizados en nuestro laboratorio lograron detectar y caracterizar bioquímicamente SDH presente en *Arabidopsis* (Aguayo y cols., 2013) encontrando actividad para sorbitol, ribitol y xilitol.

En tomate (*Solanum lycopersicum*), que pertenece a la familia Solanacea, las concentraciones de sorbitol en frutos son menores (1,75  $\mu\text{mol/gpf}$ ; Roessner y cols, 2003) con respecto a frutos pertenecientes a la familia Rosacea (65  $\mu\text{mol/gpf}$  Hudina y Stampar, 1998). Sin embargo, arabitol se acumula en hojas de tomate infectadas con *Cladosporium fulvum*, un patógeno fúngico (Clark y cols, 2003). La acumulación de arabitol es fundamental para la patogenicidad del *C. fulvum*, por lo tanto, el catabolismo de arabitol por LeSDH, la cual posee actividad para sorbitol, arabitol, xilitol entre otros, podría cumplir una función antifúngica en esta especie (Ohta y cols, 2005).

Además, se ha detectado actividad SDH en extractos crudos de semillas de soja en proceso de germinación (Kuo y cols., 1990). También, se ha purificado parcialmente SDH desde endosperma de maíz (*Zea mays*) en desarrollo (Doehlert, 1987) y desde tallos de *Viscum album*, una planta parasítica (Wanek y Richter 1993).

*In silico*, se ha determinado que otras especies no-Rosacea podrían poseer enzimas SDH. Proyectos de mapeo genómico en plantas han revelado que secuencias ortólogas del tipo SDH están ampliamente representadas en el reino vegetal y están presentes en bases de datos de marcadores de secuencia expresada (EST por su sigla en inglés de "expressed sequence tag") de especies de plantas no-Rosaceas al ser comparadas con la secuencia de SDH de manzana. Tales especies incluyen maíz, *Citrus paradisi* (pomelo), *Poncirus*



*trifoliata* (naranja espinoso), *Medicago sativa* (alfalfa), *Gossypium raimondii* (algodón) y *Pinus taeda* (pino) (Ohta y cols., 2005). Bioinformáticamente, se ha determinado que existe una potencial SDH en vid (*Vitis vinifera*), llamado VvSDH1 (Tang, 2011; Araya, 2011), la cual es el foco de esta tesis de Magister.

### **1.5 *Vitis vinifera* como modelo de interés**

Durante este trabajo de investigación se realizaron estudios sobre el producto génico del gen denominado VvSDL, el cual codifica para una enzima con actividad y características estructurales similares a SDHs ya descritas en la literatura, aislado desde *V. vinifera*, especie que transporta principalmente sacarosa desde tejidos fotosintéticos a través del floema (Swanson y Elshishiny, 1958)

En investigaciones anteriores realizadas en el laboratorio, se identificó mediante homología de secuencias aminoacídicas, una posible SDH perteneciente a vid (*Vitis vinifera*), que llamamos VvSDH1 (Tang, 2011). El cDNA de *VvSDH1* fue aislada y clonada durante el desarrollo del seminario de título de Yu-Wen Tang Hsu desde la variedad Cabernet Sauvignon. Sus estudios mostraron que VvSDH1 posee entre un 75 y 86% de identidad aminoacídica con SDHs conocidas (por ejemplo. manzana, tomate y maíz), y que además posee los dominios característicos de unión a zinc y a NAD<sup>+</sup> encontrados en SDHs de otras especies (Tang, 2011; sección 1.3.1).

Con el objetivo de determinar si VvSDH1 es efectivamente una enzima con actividad sorbitol deshidrogenasa, se construyó, mediante técnicas moleculares, un vector de expresión de VvSDH1, dirigiendo su expresión específicamente a los frutos utilizando el

promotor del gen de la poligalacturonasa de tomate (Montgomery y cols., 1993). Mediante la transformación transitoria de frutos de tomate, se expresó de forma heteróloga el producto génico de VvSDH1 y se realizaron ensayos de actividad para sorbitol con extractos de proteínas totales, comprobando que VvSDH1 es capaz de oxidar sorbitol *in vitro* (Araya, 2011).

Con respecto a la presencia de sorbitol en vid, mediante HPLC se detecta en trazas junto con manitol, alcanzando niveles detectables durante el periodo de brotación. (Anderse y Brodbeck, 1989). Por otra parte un estudio realizado durante la maduración de la baya, el cual está centrado en la producción de pasas, demostró que la concentración de este alcohol de azúcar aumenta a medida que el fruto comienza a deshidratarse (Aung y cols. 2002). Sin embargo los autores no hacen referencia al rol que podría cumplir este alcohol de azúcar en dicho proceso, sino que más bien sugieren que enzimas relacionadas podrían ser utilizadas como un marcador en el proceso de producción de pasas. Estos antecedentes muestran que los niveles de sorbitol cambian en las distintas condiciones en que se realizaron los estudios. Además es sabido que durante el desarrollo de la baya de vid los niveles en azúcares tales como la glucosa y fructosa varían en los distintos estados fenológicos (Davis y Robinson, 1995; Wu y cols, 2011). Siendo el sorbitol un intermediario entre la glucosa y fructosa éste también podría variar durante los distintos estadios fenológicos lo que podría deberse a variaciones en la expresión de los genes que codifican las enzimas que lo sintetizan (VvSDL) y degradan (VvS6PDL), variaciones que han sido reportadas durante la caracterización de SDH y S6PDH ya descritas en otras especies (pera, Kim y cols, 2007; tomate, Ohta y cols 2005;

manzana, Yamada y cols. 1998). Es por esto que durante el desarrollo de esta tesis es importante estudiar la expresión de estos genes durante el desarrollo de la baya.

Finalmente cabe mencionar con respecto al organismo seleccionado como modelo de estudio, según los datos registrados hasta el año 2009, cerca del 30% de la superficie plantada para la producción de fruta fresca en Chile corresponde a uva ([www.chileanfreshfruit.com](http://www.chileanfreshfruit.com)), siendo la fruta más cultivada dentro del país (DIRECON). Esto se explica teniendo en cuenta que tanto la uva de mesa como el vino se encuentran entre los 10 principales productos exportados, representando el 2% y el 3% del total de las exportaciones chilenas, respectivamente (ProChile).

Además de lo antes mencionado, de acuerdo a la FAO, el área a nivel mundial utilizado para el cultivo de la vid, destinados ya sea a la producción de vino, uva de mesa o pasas, es del orden de 7.5 millones de hectáreas. Más del 90% se encuentra en el hemisferio norte, destacando países de la Unión Europea (Italia, Francia y España), de Asia (Turquía e Irán) y Norte América. En el hemisferio sur, los principales países productores son Argentina, Chile, Brasil, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda (SITEC). Entre ellos, Chile es el mayor productor de uvas y el mayor exportador a nivel mundial, siendo los Estados Unidos el principal destino para la uva de mesa seguido por Holanda e Inglaterra (SITEC). Dentro de las variedades de uva de mesa que tienen una mayor importancia desde el punto de vista comercial (exportación) se encuentran: Thompson Seedless, Red Globe, Flame Seedless y Crimson Seedless. La importancia de una u otra varía según las preferencias de los consumidores en el mercado de destino; por ejemplo, para el mercado de EE.UU la variedad más importante es Thompson Seedless (SITEC).

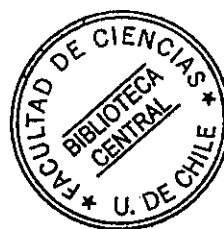
## 1.6 Estrategia Desarrollada

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

Además del interés por profundizar nuestros conocimientos sobre el metabolismo de polioles en especies no-Rosacea, se abre la posibilidad de generar aplicaciones biotecnológicas para producir cultivares con mejor resistencia a estrés abiótico, o mejores características organolépticas en sus frutos. En esta última línea, un proyecto Innova desarrollado en nuestro laboratorio busca obtener una variedad de manzanas más dulce mediante la conversión de sorbitol en fructosa (mediante SDH), siendo esta última un azúcar que genera una mayor sensación de dulzor. Dentro del marco de este proyecto, se está identificando y caracterizando SDHs de otras especies vegetales, y se está evaluando su actividad enzimática comparada con las SDHs ya descritas.

Durante el desarrollo de esta Tesis, se profundizó el estudio sobre la especificidad de sustrato de SDH aislada desde *V. vinifera* en la variedad Thompson Seedless, el cual fue nombrado VvSDL, mediante la expresión, purificación y ensayos de actividad. Además, se determinó su localización subcelular y se estudió su perfil de expresión durante el desarrollo de la baya, incluyendo en este último estudio al gen cuyo producto génico

posee un 70% de homología con sorbitol 6-fosfato deshidrogenasa de manzana, denominado VvS6PDL.



## 2 HIPOTESIS

VvSDL de *Vitis vinifera* es una sorbitol deshidrogenasa citosólica la cual se expresa de manera diferencial en los distintos estadios del desarrollo de la baya de uva.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo General:

Determinación de la localización subcelular, los parámetros cinéticos y el patrón de expresión de VvSDL en *Vitis vinifera*.

### 3.2 Objetivos específicos:

3.2.1 Clonación de VvSDL desde Thompson Seedless y análisis de los niveles de expresión de VvSDL y VvS6PDL en distintos estadios de desarrollo en baya mediante qRT-PCR.

3.2.2 Determinación de la localización subcelular de VvSDL-GFP mediante la expresión transitoria en *Nicotiana tabacum*.

3.2.3 Expresión y purificación de VvSDL mediante proteínas recombinantes producidas en microorganismos.

3.2.4 Análisis bioquímicos de VvSDL para determinar la especificidad de sustrato y sus parámetros cinéticos con sorbitol.

## **4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Equipos y programas computacionales utilizados**

#### **4.1.1 Centrifugas**

Todas las centrifugaciones de volúmenes menores a 2 mL y realizadas a temperatura ambiente se hicieron en una centrifuga spectrafuge 24D Labnet, mientras que todas las demás centrifugaciones se realizaron en una centrifuga Universal 32R Hettich.

#### **4.1.2 Termociclador**

Las reacciones de PCR o de Transcripción Reversa fueron realizadas en un termociclador MyCycler™ BIORAD para gradientes y en un termociclador XP Cycler BIOER cuando la temperatura de hibridación era única.

#### **4.1.3 qRT-PCR**

Todas las reacciones de amplificación en tiempo real fueron realizadas en un termociclador MX3000p Stratagene.

#### **4.1.4 Digitalización de resultados obtenidos en geles de agarosa, generación de esquemas y estudios *in-silico***

Los resultados en geles de agarosa fueron visualizados mediante un trans-iluminador UV (GeneGenius Classic de SynGene) el cual cuenta con un sistema de fotografía digital a través del software GeneSnap. Con respecto a los esquemas de construcciones y los estudios *in silico* realizados se utilizó el programa Vector NTI 10.3.0 (Invitrogen).

#### **4.1.5 Cuantificación de ácidos nucleicos**

La cuantificación de DNA se llevó a cabo mediante Image J 1.38X (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, Java 1.6.0\_02) el cual analiza las imágenes captadas (sección

4.1.4). Las cuantificaciones de RNA fueron realizadas con la tecnología Nanodrop.

## **4.2 Material biológico**

### **4.2.1 Vectores utilizados y crecimiento de bacterias**

Se utilizó el vector comercial pCR8 junto con cepas MACH one (Invitrogen) como vector de entrada. Los vectores de destinación utilizados fueron pET28a con el cual se transformaron cepas de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y BL21, estas últimas portadoras del plasmidio pLyss para efectos de la expresión de His-VvSDL. También se utilizó el vector de destinación pGWB5 con el cual se transformaron células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 para experimentos de determinación de la localización sub-celular de VvSDL-GFP.

Todos los clones de *E. coli* fueron crecidos en medio LB líquido [NaCl 1% (p/v), triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), pH 7 a 25 °C] con agitación de 200 rpm o en placas con LB sólido [LB líquido con agar 1,6% (p/v)] agregando, según sea el caso, espectomicina (100  $\mu$ g/mL) para seleccionar a bacterias portadoras de pCR8; kanamicina (50  $\mu$ g/mL) para seleccionar a bacterias portadoras de pGWB5 y (100  $\mu$ g/mL) para seleccionar pET28a ; cloranfenicol (35 $\mu$ g/mL) para seleccionar pLyss.

La cepa GV3101 de *A. tumefaciens* fue crecida en medio LB líquido con agitación de 200 rpm o LB sólido por 36-48 h a 28 °C. El medio LB fue suplementado con los antibióticos rifampicina (10  $\mu$ g/mL) y gentamicina (50  $\mu$ g/mL) para la selección de la cepa y del plasmidio Ti, respectivamente.



#### 4.2.2 Especies vegetales utilizadas

Las muestras biológicas para la extracción de RNA fueron obtenidas durante la temporada 2010/2011 a partir de *Vitis vinifera* L. variedad Thompson Seedless la cual fue crecida en plantaciones de 2,5 x 3 m con sistema de riego de doble goteo 1,5 L/h en un campo perteneciente a INIA La Platina en la Región Metropolitana. El muestreo fue realizado por Daniella Utz y consideró estadios de flor (estadio A), cuaja (estadio B), baya 3-4 mm (estadio C), baya 5-6 mm (estadio D), baya 7-8 mm (estadio E), 7 días post envero (estadio F), cosecha (estadio G) y post cosecha (estadio H) desde 3 individuos clonales.

Se crecieron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) silvestre (wild type, wt) en cultivo hidropónico (Gibeaut, 1997) a 23 °C, con 16 h de fotoperiodo con 2400 lux. Plantas de 12-13 semanas fueron utilizadas en los experimentos de agro-infiltración.

#### 4.3 Partidores, programas utilizados para reacciones de amplificación de ácidos nucleicos y geles de agarosa.

Todos los partidores utilizados se detallan en la Tabla 1

**Tabla 1: Partidores utilizados.** Se muestra el nombre del partidor junto a su secuencia y una breve descripción.

	Nombre	Secuencia	Descripción
1	VvSDL_F	ATGGGAAAAGGAGGGATGTCTCAGGG	Partidor en sentido desde el codón de inicio de VvSDL
2	VvSDL_R	GAGGTTGAACATGACCTTAATGGCAG	Partidor antisentido que no incluye el codón de término de VvSDL

3	VvSDL_RS	CTAGAGGTTGAACATGACCTTAATGG CAG	Partidor antisentido que incluye el codón de término de VvSDL
4	5BhIVvSD	GGATCCATGGGAAAAGGAGGGATG	Partidor en sentido que incluye la secuencia de restricción para la enzima BamHI antes del codón de inicio
5	3HdIIIvSD	AAGCTTGAGGTTGAACATGACCTT	Partidor antisentido que incluye la secuencia de restricción para la enzima HindIII sin el codón de término de VvSDL
6	5BamHIVv	GGATCCATGGGAAAAGGAGGGATGTC	Partidor en sentido que incluye la secuencia de restricción para la enzima BamHI antes del codón de inicio de VvSDL
7	3HindIIIv	AAGCTTTCAGAGGTTGAACATGACCT	Partidor antisentido que incluye la secuencia de restricción para la enzima HindIII después del codón de término de VvSDL
8	Vv_Actin_F	CTTGCATCCCTCAGCACCTT	Partidor sentido para el gen <i>actina</i> de <i>Vitis</i> utilizado como normalizador en reacciones de qRT-PCR
9	Vv_Actin_R	TCCTGTGGACAATGGATGGA	Partidor antisentido para el gen <i>actina</i> de <i>Vitis</i> utilizado como normalizador en reacciones de qRT-PCR
10	Vv_sand_F	CAACATCCTTTACCCATTGACAGA	Partidor sentido para el gen <i>SAND</i> de <i>Vitis</i> utilizado como normalizador en reacciones de qRT-PCR
11	Vv_sand_R	GCATTTGATCCACTTGACAGATAAG	Partidor antisentido para el gen <i>SAND</i> de <i>Vitis</i> utilizado como normalizador en reacciones de qRT-PCR
12	Vv_EFI_F	GAACTGGGTGCTTGATAGGC	Partidor sentido para el gen <i>EFI-α</i> de <i>Vitis</i> utilizado como normalizador en reacciones de qRT-PCR
13	Vv_EFI_R	AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA	Partidor antisentido para el gen <i>EFI-α</i> de <i>Vitis</i> utilizado como normalizador en reacciones de qRT-PCR
14	Vv_GAPDH_F	TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA	Partidor sentido para el gen <i>GAPDH</i> de <i>Vitis</i> utilizado como normalizador en reacciones de qRT-PCR
15	Vv_GAPDH_R	CCACAGACTTCATCGGTGACA	Partidor antisentido para el gen <i>GAPDH</i> de <i>Vitis</i> utilizado como normalizador en reacciones de qRT-PCR
16	VvSDL_RTF	TGGAGCACCCAGAATTGTCA	Partidor en sentido para la amplificación de un segmento de 181pb del gen <i>VvSDL</i> por qRT-PCR

17	VvSDL_RTR	AAAGCCGGCACAATCAAAGC	Partidor en antisentido para la amplificación de un segmento de 181pb del gen <i>VvSDL</i> por qRT-PCR
18	VvS6PDL_RTF	CGGAACACGGTTGTCATCCCAAAA	Partidor en sentido para la amplificación de un segmento de 142pb del gen <i>VvS6PDL</i> por qRT-PCR
19	VvS6PDL_RTR	TTGCAGGCTGATTGGTTCGATGCT	Partidor en antisentido para la amplificación de un segmento de 142pb del gen <i>VvS6PDL</i> por qRT-PCR
20	OligoAP	CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTT TTTTTTTT	Hibrida con poli A en la región 3' de los mRNA.

Los programas utilizados para la amplificación de las distintas cadenas de ácidos nucleicos se detallan en la Tabla 2.

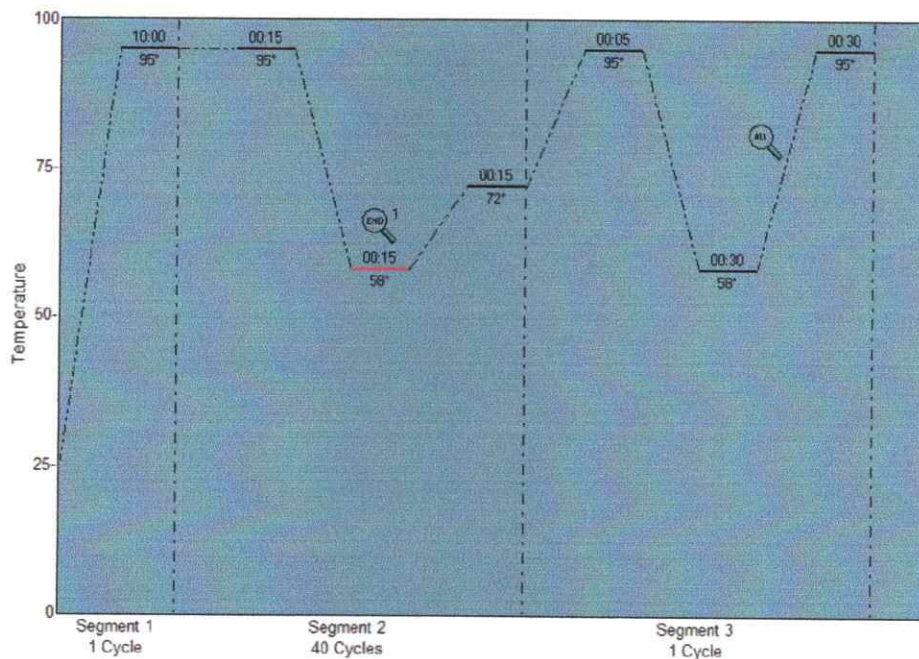
Los geles de agarosa utilizados para visualizar los productos de amplificación de ácidos nucleicos se prepararon con solución amortiguadora TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) a diferentes concentraciones de agarosa (p/v). Una vez realizada la electroforesis el gel, se incubó a temperatura ambiente en una solución de bromuro de etidio 5 mM durante 10 min y se visualizó (sección 4.1.4).

**Tabla 2: Programas Termociclador.** Se detallan los tiempos y temperaturas utilizadas para las reacciones de PCR convencional.

Nombre	Nº Ciclos	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min:s)
RT	1	Desnaturalización	-	-
	1	Desnaturalización	72	05:00
		Hibridación	25	05:00
		Extensión	42	59:59
		Extensión	72	15:00
VvSDL	1	Desnaturalización	94	05:00
	32	Desnaturalización	94	00:30
		Hibridación	59	00:50
		Extensión	72	01:30
		Extensión	72	10:00
18S	1	Desnaturalización	94	05:00
	32	Desnaturalización	94	00:45
		Hibridación	56	00:45
		Extensión	72	00:45
		Extensión	72	10:00



Con respecto a las reacciones realizadas en el equipo de qRT-PCR el perfil térmico se muestra en la siguiente figura:



**Figura 3: Perfil térmico utilizado en las reacciones de qRT-PCR**

#### **4.4 Síntesis de cDNA a partir de RNA de *Vitis vinifera***

La extracción de RNA para cada uno de los 8 estadios en estudio (sección 0) fue realizada por Daniella Utz en el contexto de su tesis doctoral. Las muestras de RNA fueron sometidas a una reacción de transcripción reversa como se detalla a continuación.

##### **4.4.1 Tratamiento con DNasa**

Se cuantificó el RNA total y se trataron 2 µg de cada muestra con 1 U de DNasaI (Fermentas), amortiguador DNasaI 1X, 10 U de “RiboLoc RNase Inhibitor” (Fermentas), y H<sub>2</sub>O DEPC (volumen final, 10 µL). Se incubó (37 °C, 30 min), se dejó en hielo (1 min) y finalmente, se adicionó 1 µL de EDTA 25 mM para detener la reacción.

#### **4.4.2 Transcripción reversa (RT)**

La reacción se llevó a cabo utilizando el sistema “RT-ImProm-II Reverse Transcription System” de Promega. Las muestras sometidas al tratamiento de DNasa fueron divididas en dos tubos (5,5 µl en cada uno, llamados tubo A y B, siendo este último un control del tratamiento de DNasa). A cada tubo, se le adicionó 0,5 µM Oligo-AP (Tabla 1). Además, se preparó la “mezcla RT” (1X “ImProm-II Reaction Buffer”, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM dNTPs, 0,5 U de “RiboLock RNAase Inhibitor”, 1 µl “ImProm-II Reverse Transcriptase” y H<sub>2</sub>O DEPC suficiente de tal manera que al adicionar la mezcla de RNA tratada con DNasa y Oligo-AP, el volumen final fuese de 20 µl) y la “mezcla sin RT” la cual fue exactamente igual a la antes mencionada salvo que no contiene “ImProm-II Reverse Transcriptase”.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador, en el cual se ejecutó el protocolo RT (Tabla 2). En el paso a 70 °C, se colocaron solamente los tubos en presencia de RNA y oligo-AP. Luego, se detuvo el programa y las muestras fueron incubadas en hielo (5 min). Posteriormente, a los “tubos A” se les añadió la “mezcla RT” y a los “tubos B” la “mezcla sin RT”. Una vez agregado, se volvieron las muestras al termociclador y se continuó el programa.

#### **4.5 Construcción de vectores**

##### **4.5.1 pCR8-VvSDL**

Se realizaron cuatro construcciones en pCR8 (esquema en Anexo II A). Se amplificó VvSDL por PCR a partir de cDNA, obtenido desde baya 3-4 mm, con la enzima PFU Polimerasa (Fermentas). La reacción se llevó a cabo con 1X amortiguador de reacción

PFU polimerasa, 0,2 mM dNTPs, 0,5  $\mu$ M de partidor en sentido, 0,5  $\mu$ M partidor en anti sentido, 1  $\mu$ L de molde y 1 U PFU polimerasa (volumen final, 20  $\mu$ L). Se utilizaron las siguientes mezclas de partidores: VvSDL\_F y VvSDL\_R (marco de lectura de VvSDL sin codón de término; reacción A), VvSDL\_F y VvSDL\_R\_S (marco de lectura de VvSDL con codón de término, reacción B), 5BhIVvSD y 3HdIIIvSD (marco de lectura de VvSDL sin codón de término flanqueado por las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*; reacción C), 5BamHIVv y 3HindIIIv (marco de lectura de VvSDL flanqueado por las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* incluyendo el codón de término; reacción D) obteniendo así 4 reacciones diferentes (A, B, C y D respectivamente). El PCR fue realizada utilizando el programa VvSDL.

Una vez realizado el PCR, se procedió a purificar los productos utilizando el kit comercial Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Con cada producto de la purificación, se generó un vector pCR8/GW/TOPO utilizando el protocolo establecido por el fabricante (pCR8A, pCR8B, pCR8C, pCR8D dependiendo de la reacción con la que fueron construidos). Para todos los vectores construidos se verificó la presencia de VvSDL mediante una reacción de PCR (partidores VvSDL\_F y VvSDL\_RS, programa VvSDL), digestión enzimática con las enzimas *NsiI* y *BstEII* siguiendo las especificaciones del fabricante y finalmente fueron secuenciados en Macrogen USA.

#### 4.5.2 pET28a-His-VvSDL

Cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  portadoras del vector pET28a y MACH one portadoras del vector pCR8D (sección 4.5.1) fueron crecidas (sección 4.2) y se realizó una extracción de DNA plasmidial utilizando el kit comercial Axyprep Plasmid Miniprep mediante centrifugación siguiendo el protocolo estipulado por el fabricante.

Ambos plasmidios obtenidos fueron sometidos a una digestión simple y doble con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III (Fermentas); la reacción se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante a 37 °C durante 2 h.

Los productos de la digestión fueron cargados en un gel de agarosa 1,5% (sección 4.1.4) y se extrajeron y purificaron las bandas correspondientes al vector pET28a linealizado y al fragmento de DNA correspondiente a VvSDL flanqueado por los sitios de corte para las enzimas *Bam*HI y *Hind*III utilizando el kit comercial Wizard SV gel and PCR clean-up system siguiendo el protocolo indicado por el fabricante, para luego ser ligadas.

La reacción de ligación consistió en: 150 ng de vector linealizado (pET28a), 50 ng de inserto (*VvSDL*), amortiguador ligasa Promega 1X, 1,5 U T4 DNA ligasa (Promega) y H<sub>2</sub>O libre de DNAsa (volumen final, 10  $\mu$ L).

Con el producto de la reacción de ligación se procedió a transformar mediante golpe térmico una alícuota de 100  $\mu$ l de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes. Se agregaron 6  $\mu$ L de la reacción de ligación y se mantuvo en hielo durante 30 min. Posteriormente, se aplicó un golpe térmico de 42 °C durante 45 s y luego se depositaron en hielo por 2 min. Después se agregó 1 mL de LB líquido y se incubó por 4 h a 28 °C.

Luego, se sembraron alícuotas de 150  $\mu$ L y de 50  $\mu$ L en LB sólido suplementado con antibiótico (sección 4.2.1) y se incubaron a 37 °C por 16 h.

Para corroborar la correcta construcción del vector las colonias obtenidas fueron analizadas mediante una reacción de PCR (partidores 6 y 7, programa VvSDL, sección 4.3) y digestión enzimática con la enzima *Ava*I (Fermentas) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Finalmente se realizó una purificación plasmidial y se procedió a transformar células BL21 (D3) (sección anterior) con el vector pET28a-His-VvSDL (esquema del vector en Anexo II C), las cuales fueron corroboradas mediante una reacción de PCR (partidores 7 y 8, programa VvSDL, sección 4.3)

#### **4.5.3 pGWB5-VvSDL-GFP**

A partir del vector pCR8D se volvió a generar el vector pCR8C (para ahondar en el motivo de esto dirigirse a la sección 5.1). El vector pCR8C (sección 4.5.1) fue recombinado con el vector pGWB5 (esquema en anexo II B) utilizando el sistema Gateway LR Clonase II (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. La correcta construcción del vector se verificó mediante digestión enzimática con *Ava*I (Fermentas) siguiendo las indicaciones del fabricante y un PCR (partidores 6 y 7, programa VvSDL, sección 4.3) amplificando el gen VvSDL.

Una vez corroborada la correcta construcción, se realizó una extracción de DNA plasmidial y se procedió a transformar células de *A. tumefaciens* para lo cual alícuotas de 100  $\mu$ L de *A. tumefaciens* quimiocompetentes fueron mezcladas con 500 ng del vector



pGWB5-VvSDL-GFP, se incubó en nitrógeno líquido (5 min) y se descongelaron en hielo. Se le adicionó 1 mL de LB líquido y se incubó a 28 °C, 200 rpm durante 4 h. Posteriormente, se sembraron en LB sólido con antibióticos (sección 4.2.1)

#### 4.6 Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)

Los experimentos de qRT-PCR, se realizaron utilizando la sonda fluorescente SYBR green, contenida en el kit SensiMix SYBR Hi-Rox (Bioline) y se empleó el termociclador *Stratagene Mx3000P* (Agilent Technologies). La reacción se realizó según lo estipulado por el fabricante. Se analizó la expresión de los genes *VvSDL* (partidores 16 y 17) y *VvS6PDL* (partidores 18 y 19). Además se analizaron 4 genes como posibles normalizadores: *actina* (partidores 8 y 9), *SAND* (partidores 10 y 11), *EFI-α* (partidores 12 y 13) y *GAPDH* (partidores 14 y 15). Se ensayaron estos 6 genes para los 8 estadios de desarrollo estudiados (sección 4.2.2) realizando 2 réplicas técnicas. La eficiencia para cada reacción se determinó mediante el software PCRLinReg v2012.0 (<http://www.hartfaalcentrum.nl/index.php?main=files&sub=LinRegPCR>) y el mejor normalizador se determinó utilizando el software NormFinder (Andersen y cols. 2004).

La cuantificación se realizó considerando la siguiente ecuación (1):

$$\text{Razón} = \frac{E_{\text{gen}}^{\Delta CP(\text{control-muestra})}}{E_{\text{ref}}^{\Delta CP(\text{control-muestra})}}$$

Ecuación 1: Formula para el cálculo de la expresión del gen con respecto a un calibrador (referencia), en donde E es la eficiencia y ΔCP la diferencia de CT entre el control (0) y la muestra.

## **4.7 Expresión y purificación de His-VvSDL**

### **4.7.1 Determinación de las condiciones de inducción**

Para la expresión de His-VvSDL mediante el sistema pET28a se crecieron colonias portadoras de la construcción pET28a-His-VvSDL en medio LB a 37 °C con los antibióticos correspondientes (sección 4.2.1) hasta alcanzar una  $D.O_{600nm}$  de 0,6. Una vez alcanzada esta densidad óptica, se agregó IPTG para inducir la producción de la proteína recombinante.

Para determinar las condiciones óptimas de inducción se ensayó induciendo con 0; 0,25; 0,5 y 0,75 mM de IPTG. También se probó, luego de agregar IPTG dejar el cultivo 14 h tanto a 28 °C como a 30 °C.

Una vez transcurrido el tiempo de inducción (14 h), las células se centrifugaron a 3500 g durante 5 min y se descartó el sobrenadante.

### **4.7.2 Extracción de proteínas totales**

#### **4.7.2.1 Mediante Perlas de Vidrio**

Las células sedimentadas fueron mezcladas con una solución de 1,5 g/mL de perlas de vidrio (Sigma, diámetro <106  $\mu$ m) en Tris-HCl pH 9,0. Se dejaron en agitación a 1500 rpm a 25 °C durante 40 min y finalmente fueron centrifugadas a 13000 g durante 25 min obteniéndose en el sobrenadante las proteínas solubles totales.

#### **4.7.2.2 Mediante el agente comercial B-PER**

Las células sedimentadas fueron sometidas a una extracción de proteínas totales utilizando el sistema comercial B-PER (ThermoScientific) siguiendo las

especificaciones del fabricante con lo cual se obtiene un sobrenadante (proteínas solubles totales) y un precipitado (proteínas insolubles totales).

#### **1.6.1 Purificación de His-VvSDL**

La purificación se llevó a cabo mediante la columna HisTrap de GE Healthcare de 1 mL siguiendo las especificaciones del fabricante. Se realizó un gradiente continuo desde 20 a 500 mM de imidazol (en buffer fosfato 20 mM pH 7,4 y 0,5 M NaCl) colectando fracciones de 2 mL. Finalmente se realizó un gradiente discontinuo a 20, 200, 300 y 500 mM de imidazol (en buffer fosfato 20 mM pH 7,4 y 0,5 M NaCl) recolectando 8 fracciones de 2 mL para cada concentración.

#### **4.8 Cuantificación de proteínas**

Todas las cuantificaciones de proteínas se llevaron a cabo mediante el método de Bradford utilizando la solución comercial Protein Assay Concentrated Dye de BioRad siguiendo las condiciones estipuladas por el fabricante.

#### **4.9 Geles de poliacrilamida e inmuno-detección mediante western blot (WB)**

Los geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) se prepararon al 12%. Para esto, el gel separador se preparó mezclando 1,7 ml de agua desionizada; 2 ml de una solución de acrilamida 30 % (p/v) y bis-acrilamida 0,8 % (p/v); 1,3 mL Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 50 µL de SDS 10% (p/v), 30 µL de APS 10 % (p/v) y 5 µL de TEMED. El gel concentrador fue preparado al 4% (p/v) mezclando 1,54 ml de agua desionizada, 0,335 mL de una solución de acrilamida 30 % (p/v) y bis-acrilamida 0,8 % (p/v); 0,625

mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 25  $\mu$ L de SDS 10% (p/v), 50  $\mu$ L de APS 10 % (p/v) y 8  $\mu$ L de TEMED.

Para cargar las muestras de proteínas en los geles, éstas se mezclaron con buffer de carga 2X [125 mM Tris-HCl pH 6,8; glicerol 20 % (v/v);  $\beta$ -mercaptoetanol 2 % (v/v); azul de bromofenol 0,1 % (p/v) y 4 % (p/v) SDS] y se incubaron con agitación (800 rpm) a 85 °C durante 15 min. Los geles fueron sometidos a electroforesis por media hora a 80 V y el resto del tiempo a 100 V hasta que el frente de migración pasó los límites del gel. El buffer de corrida fue preparado con 25 mM Tris-HCl pH 8,8; 192 mM glicina y 0,1 % (p/v) SDS.

Realizada la electroforesis, los geles fueron revelados mediante tinción de Coomassie o transferidos a membranas de nitrocelulosa para posteriores western blots. La masa molecular relativa de las proteínas se determinó a partir de la migración electroforética con respecto a un estándar de peso molecular (Prestained Protein Ladder, Fermentas)

La tinción de Coomassie consistió en azul brillante Coomassie R-250 0,3 % (p/v) disuelto en una mezcla de metanol 50 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v). Los geles fueron incubados en esta mezcla durante 1 h con agitación constante y luego fueron desteñidos con la misma mezcla sin azul brillante Coomassie en agitación constante hasta obtener un contraste entre las señales y el gel.

Cuando se requirió, la transferencia de proteínas se realizó hacia membrana de nitrocelulosa (ThermoScientific) utilizando una cámara de transferencia Trans-Blot SD "Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell" (Bio-Rad). Para esto, los papeles filtros

(Whatman), gel y membrana fueron embebidos en un buffer de transferencia [192 mM glicina; 25 mM Tris-HCl pH 8,3; 0,1 % (p/v) SDS y 15 % (v/v) metanol]. La transferencia se efectuó a 15 V durante 15 min, luego de la cual se lavó la membrana en TBS-T [20 mM Tris-HCl pH 7,5; 140 mM NaCl y 0,1 Tween-20 % (v/v)]. Para determinar la eficiencia de la transferencia, se incubó la membrana en una solución de Rojo de Ponceau [Rojo de Ponceau 0,1 % (p/v) y ácido acético 5 % (v/v)]. Luego se lavó la membrana con agua destilada y se incubó en leche 5% (p/v) en TBS-T con agitación suave a 4 °C durante 16 h. Luego la membrana se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 min y fue incubada en leche 5% (p/v) en TBS-T en presencia del anticuerpo primario anti-His (1:5000, Mouse IgG monoclonal, Sigma) en agitación suave por 2 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo la membrana se lavó con TBS-T durante 3 veces durante 10 min y luego se incubó en leche 5 % (p/v) en TBS-T en presencia del anticuerpo secundario anti-mouse-AP (1:10000, Mouse IgG policlonal, Sigma) en agitación suave por 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, la membrana se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 min.

El revelado se realizó utilizando fosfatasa alcalina. Para esto, se lavó la membrana 2 veces con buffer alcalino [100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl y 5 mM MgCl<sub>2</sub>] durante 5 min y se reveló la membrana con 20 ml en una mezcla de buffer alcalino con 66 µl de NBT 50 % (p/v) y 33 µl de BCIP 50 % (p/v) a temperatura ambiente hasta detectar una señal. Finalmente la reacción de revelado se detuvo con 20 ml de EDTA 20 mM.

#### 4.10 Ensayos de actividad enzimática y determinación de parámetros cinéticos

La actividad enzimática se determinó en una reacción que contenía 100 mM de Tris-HCl pH 9,0; 1,5 mM de NAD<sup>+</sup>; concentraciones variables del sustrato a evaluar y 5 µL de enzima (extractos totales o His-VvSDL purificada) en un volumen final de 200 µL, mediante el monitoreo de la formación de NADH a 25 °C registrada a 340 nm en un espectrofotómetro Lambda Ez 201 (PerkinElmer) mediante la siguiente ecuación (2):

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

**Ecuación 2: Actividad específica.** En donde  $\epsilon$  corresponde al coeficiente de extinción molar del NADH,  $V_e$  al volumen de reacción,  $V_c$  al volumen de la enzima y  $C_e$  a la concentración de la enzima.

Los sustratos ensayados fueron sorbitol, xilitol, ribitol, manitol, arabitol y fructosa.

Los parámetros cinéticos se determinaron mediante la medición de la velocidad inicial de reacción a distintas concentraciones de sorbitol a través de un ajuste de los datos al modelo cinético de Michaelis-Menten descrito por la ecuación (3):

$$V_0 = \frac{V_{MAX} \times [S]}{K_M + [S]}$$

**Ecuación 3: Modelo cinético de Michaelis Menten.** Ecuación que describe el modelo cinético de Michaelis.Menten en donde  $K_m$  corresponde a la constante de Michaelis Menten,  $V_{max}$  a la velocidad máxima,  $V_0$  a la velocidad inicial y  $[S]$  a la concentración de sustrato.

Dicho ajuste y la gráfica de los datos fueron realizados mediante el programa GraphPad Prism v 5.0, al igual que todos los análisis estadísticos realizados en el desarrollo de esta tesis. Finalmente, se calculó la constante catalítica la cual se dedujo a partir de la ecuación (4):

$$V_{max} = K_{cat} * [ET]$$

**Ecuación 4: Cálculo de la constante catalítica.** En donde  $V_{max}$  es la velocidad máxima,  $K_{cat}$  la constante catalítica y  $ET$  la concentración total de enzima en la reacción.

#### **4.11 Transformación transitoria de *N. tabacum* y localización subcelular.**

Para la transformación transitoria, se utilizó la técnica de agro-infiltración. Para ello, células de *A. tumefaciens* transformadas con pGWB5 fueron crecidas en LB líquido (sección 4.2.1) hasta una  $DO_{600nm}$  de 1,8. Se sedimentaron las bacterias (3000 g, 5 min, 22 °C) y se suspendieron hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,8 en medio de infiltración (MMA) [MES 10 mM pH 5,7,  $MgCl_2$  10 mM y acetosiringona (3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenona) 150  $\mu M$ ].

Posteriormente, mediante el uso de una jeringa de 5 mL se inyectó esta suspensión en la cara inferior de cada hoja. Las plantas infiltradas fueron dejadas en fotoperiodo normal (sección 4.2.2) durante 78 h. Posteriormente, las zonas infiltradas fueron visualizadas en un microscopio de epifluorescencia (Microscopio Olympus IX70, utilizando una longitud de onda de 488 nm).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Clonación de *VvSDL* en pCR8

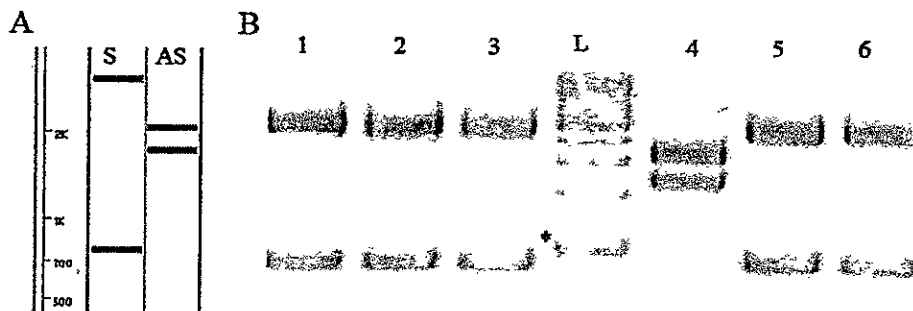
A partir de cDNA obtenido desde la muestra correspondiente a baya 5-6 mm (estadio C) de Thompson Seedless, se procedió a amplificar *VvSDL* con la enzima PFU para la construcción de los vectores pCR8A (marco de lectura sin codón de término) y pCR8B (marco de lectura con codón de término) (figura 4) obteniéndose una banda cercana a las 1000 pb que correspondería a *VvSDL* (con un tamaño teórico de 1098 pb).



**Figura 4: Amplificación de *VvSDL* desde baya de vid.** En la figura, se muestra los resultados de la amplificación de *VvSDL* desde el estadio de baya 3-4 mm de Thompson Seedless. Los carriles 1 a 3 corresponden a la amplificación del marco de lectura sin codón de término (para pCR8A), carriles 4 al 6 corresponden a la amplificación del marco de lectura con codón de término (para pCR8B). C+ corresponde al control positivo correspondiente a un plásmido que contiene *VvSDH1* y L corresponde al estándar de peso molecular de 1Kb. Se observa una señal cercana a 1000 pb para todas las muestras.

Las bandas purificadas fueron clonadas en pCR8, generándose los vectores pCR8A y pCR8B. Posteriormente, se comprobó su direccionalidad con respecto a los sitios de recombinación mediante una digestión enzimática con las enzimas *NsiI* y *BstEII* (figura 5). Como se puede apreciar, se obtuvieron 3 muestras en sentido con respecto a los sitios de recombinación (una banda sobre los 2000 pb y una inferior a 1000 pb) para pCR8A y 2 muestras para pCR8B. Se realizó el mismo procedimiento para pCR8C y pCR8D (sección 4.5.1, datos no mostrados). Muestras de cada construcción fueron enviadas a secuenciar.





**Figura 5: Digestión doble de pCR8A y pCR8B.** En la figura se muestran los resultados de una digestión doble con las enzimas *NsiI* y *BstEII*. En A se muestra el patrón esperado para una construcción en sentido con respecto a los sitios de recombinación (S) o en antisentido (AS). En B, L corresponde al patrón de peso molecular de 1000 pb en el cual se indica este último tamaño con un asterisco (\*), los carriles del 1 al 3 corresponden a pCR8A; del 4 al 6 a pCR8B. El carril 4 presenta bandas entre los 1000 y 2000 pb mientras que el resto muestra una banda superior a los 2000 pb y otra inferior a los 1000 pb.

Pese a que teóricamente el marco de lectura para *VvSDL* debiese ser igual para todas las construcciones, debido a que se amplificó con una enzima de alta fidelidad (PFU), se obtuvieron diferencias en las secuencias, las cuales se resumen en la figura 6. Se obtuvieron varias diferencias a nivel nucleotídico, mientras que a nivel aminoacídico se presentan 2 grandes grupos. Uno idéntico a la secuencia aislada desde Cabernet Sauvignon (Tang 2011, indicados en azul figura 8) y otro que difiere solo en un aminoácido (V326G; en verde figura 8) con respecto a la base de datos de Pinot Noir (NCBI; XM\_002269859.2). Considerando estas variaciones se decidió seguir trabajando a partir de pCR8D4 y utilizarlo como molde para futuras construcciones por presentar la mayor similitud con la base de datos (sección 6, discusión)

## 5.2 Análisis aminoacídico de *VvSDL*.

Una vez seleccionada la secuencia para continuar trabajando con *VvSDL*, se procedió a realizar una comparación de identidad aminoacídica (figura 7) y un alineamiento de secuencia (figura 8) con otras SDHs conocidas utilizando el programa Vector NTI 10 de Invitrogen.

Clón	G9D	P91T	K128E	A254P	V326G	G355D
VvSDHI						
C.S	G26A	T177A C271A		G645A	T977G	A1026G A1041G
pCR8A1	G26A	T177A C271A		G645A	T977G	A1026G A1041G
pCR8B1	G26A	T177A C271A		G645A	T977G	A1026G A1041G
pCR8B3	G26A	T177A C271A			T977G	A1026G
pCR8A2	G26A	T177A C271A		G645A	T977G	A1026G A1041G
pCR8C1			A382G		T977G	
pCR8D2				G760C	T977G	
pCR8B2	T75C				T977G	C1083-
pCR8D1	T75C				T977G	A1026G
pCR8A3					T977G	A1026G
pCR8D3			T431A		T977G	A1026G
pCR8D4	T75C				T977G	A1026G
1	2	3	4	5	6	

**Figura 6: Resultados de la secuenciación de VvSDL de Thompson Seedless.** En la figura, se muestran las diferencias nucleotídicas obtenidas entre VvSDHI (Cabernet Sauvignon) y los 11 diferentes clones de VvSDL de Thompson Seedless enviados a secuenciar con respecto a la base de datos (variedad Pinot noir). La primera fila en gris indica cuando la variación nucleotídica significó un cambio aminoacídico. En el resto de las filas se indica la posición del nucleótido cambiado y por cual fue reemplazado. La última fila en anaranjado da cuenta de los exones del gen. En azul se agrupan secuencias similares a VvSDHI y en verde las con mayor similitud a la base de datos. Se decidió seguir trabajando con pCR8D4

	AtSDH	EjSDH	FaSDH	MdSDH	PcSDH	PpSDH	PsSDH	SISDH	VvSDL
AtSDH		76	84	78	80	81	80	86	84
EjSDH			81	72	76	77	76	81	79
FaSDH				80	82	82	82	86	86
MdSDH					83	83	83	78	77
PcSDH						97	96	83	81
PpSDH							98	84	81
PsSDH								83	81
SISDH									87

**Figura 7: Identidad aminoacídica entre SDHs vegetales conocidas y VvSDL.** En la figura se muestran las identidades aminoacídicas entre SDH de *Arabidopsis* (AtSDH, NP\_200010.1), níspero (EjSDH, BAA95897), frutilla (FaSDH, BAF75466.1), una isoforma de manzana (MdSDH, AAW33814.1), cerezo (PcSDH, AAK71492.1), durazno (PpSDH, BAA94084), ciruelo (PsSDH, ACL18054), tomate (SISDH, BAE47038.1) y vid (VvSDL).

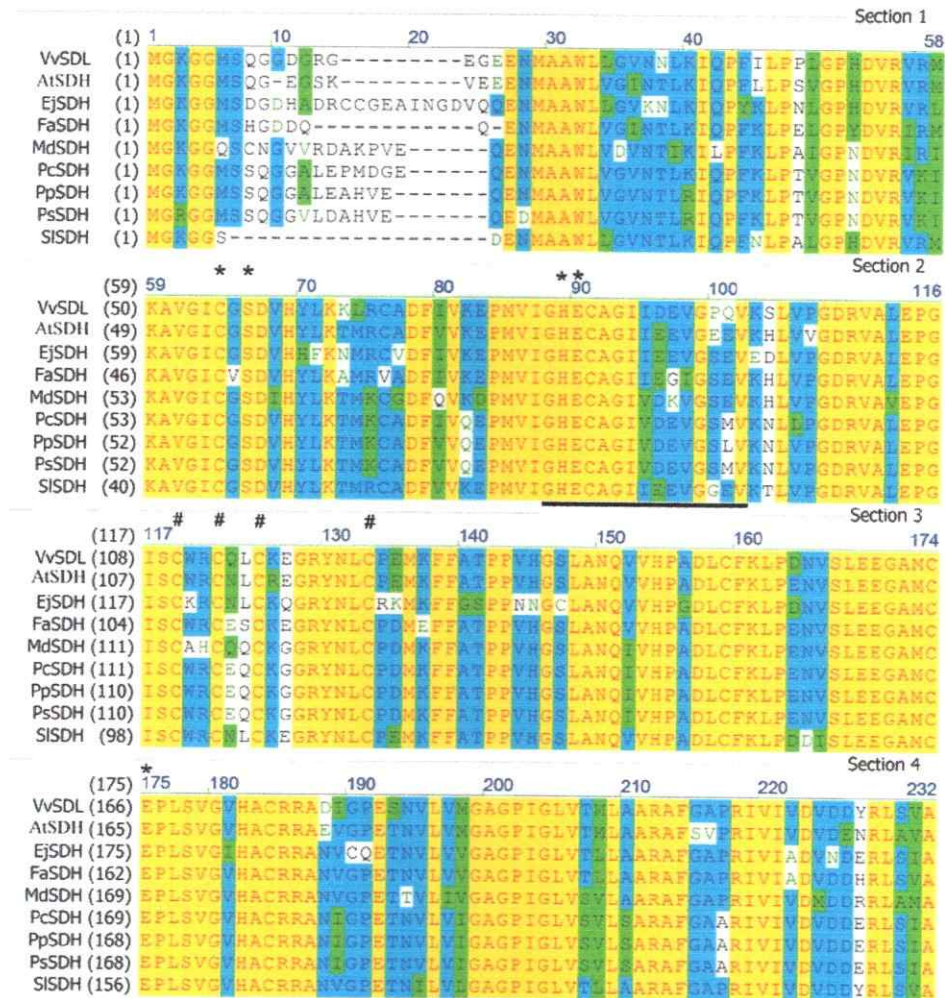
Con respecto al porcentaje de identidad, VvSDL presenta un 87% como máximo con la SDH de *S. lycopersicum* y un 77% con *M. domestica*. En cuanto al alineamiento, VvSDL comparte sitios catalíticos y de unión a zinc y un dominio característico de alcoholes deshidrogenasas dependientes de zinc (sección 1.3.1)

Todos los antecedentes presentados sugieren fuertemente que VvSDL fue correctamente aislado y clonado desde cDNA de Thompson Seedless y su producto génico posee un peso molecular teórico de 39244.58 Da

### 5.3 Determinación de la calidad del cDNA para ensayos de qRT-PCR

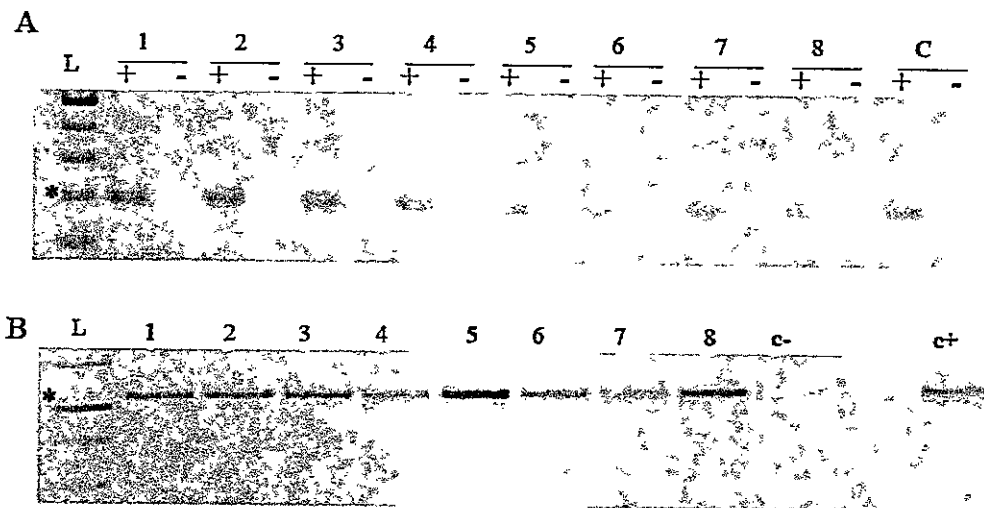
Con el objetivo de determinar el patrón de expresión de *VvSDL* en los diferentes estadios del desarrollo de la baya de vid, se procedió a realizar la cuantificación de los niveles de transcrito en 8 estadios del desarrollo mediante qRT-PCR. Para esto, es necesario determinar que la calidad del cDNA a utilizar sea la apropiada.





**Figura 8: Alineamiento de secuencias entre SDH conocidas.** En la figura se muestra un alineamiento desde el aminoácido 1 hasta el 232 (alineamiento completo disponible en el anexo). En amarillo se muestran aminoácidos idénticos. En celeste cambios conservativos, en verde bloques de similitud, y en fondo blanco baja similitud. Los asteriscos (\*) indican sitios de unión a zinc, el signo numeral (#) indica los sitios catalíticos de unión a zinc mientras que los aminoácidos subrayados indican un sitio conservado para alcoholes deshidrogenasas dependientes de zinc. Las especies se encuentran detalladas en la leyenda de Figura 7.

Para determinar la calidad de cDNA sintetizado (sección 4.4) y la ausencia de DNA genómico, se amplificó *I8S* a partir de todas las muestras sometidas a RT y los controles sin RT (figura 9A). Además se amplificó *VvSDL* a partir de todos los cDNA (figura 9B)



**Figura 9: Calidad de cDNA de los distintos estadios de desarrollo.** En A y B los números corresponden a los estadios de Thompson Seedless analizados: flor (1), cuaja (2), baya 3-4 mm (3), baya 5-6 mm (4), baya 7-8 mm (5), 7 días post envero (6), cosecha (7) y post cosecha (8). En A el + indica tratamiento con la enzima RT y - que no hubo tratamiento, C corresponde a un control de cDNA total (+) y RNA total (-) de Arabidopsis. L corresponde al estándar de peso molecular, (\*) indica 200 pb. En B (\*) indica 1000 pb mientras que C+ es el control positivo utilizando como templado pCR8 portador del gen *VvSDH1*, C- corresponde al control negativo de la reacción de PCR (sin templado).

Como se puede apreciar en la figura 9A existe amplificación de *18S* solamente en las muestras que fueron sometidas a transcripción reversa, lo que indica que existe cDNA para todos los estadios estudiados y que además, al no haber amplificación en las muestras sin tratamiento, no existe contaminación de DNA genómico. En la figura 9B se observa una amplificación cercana a los 1000 pb lo cual correspondería al *VvSDL* (1098 pb).

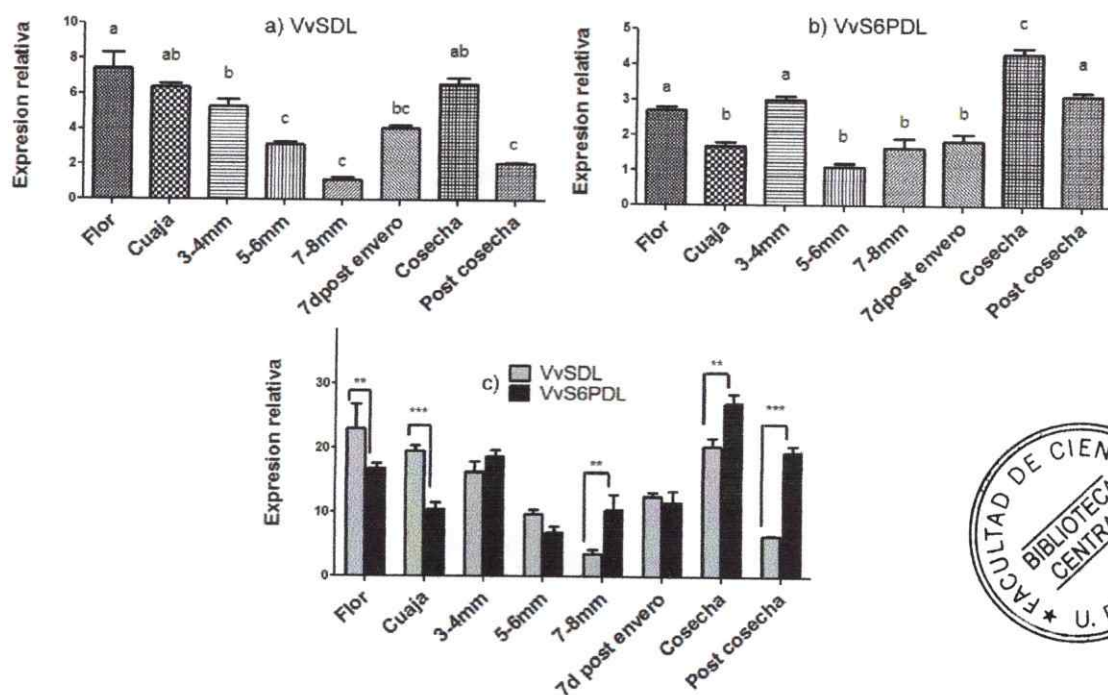
#### 5.4 Análisis de expresión de *VvSDL* y *VvS6PDL* en distintos estadios del desarrollo de la baya de uva.

Junto con el estudio de los niveles de expresión de *VvSDL* mediante qRT-PCR se estudiaron también los del gen *VvS6PDL* cuyo producto génico posee un 70% de

identidad con MdS6PDH, enzima que participa en la síntesis de sorbitol en manzana (Negm y Loescher, 1981; Figura 10).

A partir de los parámetros de eficiencia calculados para los genes normalizadores *Actina*, *SAND*, *EFI- $\alpha$* , y *GAPDH* se determinó, utilizando el programa NormFinder, que el mejor gen normalizador fue *GAPDH*.

Los resultados para la expresión de *VvSDL* (figura 10a) y *VvS6PDL* (figura 10b) fueron normalizados con respecto a *GAPDH* y relativizados con respecto al estadio de menor expresión para los genes (baya 7-8 mm y baya 5-6mm respectivamente) además de esto se muestran los resultados comparando los niveles de expresión de ambos genes (figura 10c). Los resultados muestran que existe variación en los niveles de expresión entre los distintos estadios del desarrollo de la baya de uva y que el máximo para *VvSDL* se encuentra en flor, cuaja y cosecha, mientras que el mínimo en baya 7-8 mm y post-cosecha (figura 10a). Además de esto, se observa que en los primeros estadios del desarrollo es mayor la expresión de *VvSDL* con respecto a *VvS6PDL* mientras que en los estadios finales ocurre lo opuesto.



**Figura 10: Análisis de expresión de *VvSDL* y *VvS6PDL*.** En la figura se muestra la expresión relativa de los genes *VvSDL* y *VvS6PDL* con respecto al gen normalizador *GAPDH*. En a) se muestran los resultados para *VvSDL* calibrados con respecto a la menor expresión (estadio baya 7-8 mm). En b) se muestran los resultados para *VvS6PDL* calibrados con respecto a la menor expresión (estadio baya 5-6 mm). En c) se muestran ambas expresiones relativas a *GAPDH* para efectos comparativos. Se realizaron 2 replicas técnicas. Las barras indican la desviación estándar entre los duplicados y para cada caso se realizó un análisis estadístico ANOVA de 2 vías

Todos los antecedentes anteriormente expuestos (secciones 5.1 a 5.4) muestran que *VvSDL* fue correctamente clonada y que fue posible determinar diferencias en los niveles de expresión para los estadios del desarrollo de la baya, cumpliendo así con el primer objetivo específico: Clonación de *VvSDL* desde Thompson Seedless y análisis de los niveles de expresión de *VvSDL* y *VvS6PDL* en distintos estadios de desarrollo en baya mediante qRT-PCR.

### 5.5 Predicción *in-silico* de la localización subcelular de VvSDL.

Antecedentes sobre la localización subcelular de SDHs de otras especies vegetales muestran que puede estar localizada exclusivamente en el citoplasma (Arabidopsis; Aguayo y cols., 2013) o en el citoplasma, cloroplasto y vacuola (manzana; Wang y cols., 2009)

Como una primera aproximación para la determinación de la localización subcelular de VvSDL se realizó una predicción bioinformática utilizando cuatro herramientas de predicción de localización subcelular para el producto génico de VvSDL (Tabla 3).

**Tabla 3: Predicción *in-silico* de la localización sub celular de VvSDL**

Herramienta	Resultado	Referencia
ESLpred	Citoplasma	<a href="http://www.imtech.res.in/raghava/eslpred/">http://www.imtech.res.in/raghava/eslpred/</a>
SignalIP	Sin péptido señal	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/Signal">http://www.cbs.dtu.dk/services/Signal</a> .
Cello	Citoplasma	<a href="http://cello.life.nctu.edu.tw">http://cello.life.nctu.edu.tw</a>
Yloc	Citoplasma	<a href="http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/YLoc/webloc.cgi">http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/YLoc/webloc.cgi</a>

Los análisis indicaron que VvSDL es una proteína citoplasmática y no destinado a otro organelo. Con el objetivo de confirmar esta predicción y observar su localización *in vivo*, se procedió a generar una proteína de fusión VvSDL-GFP

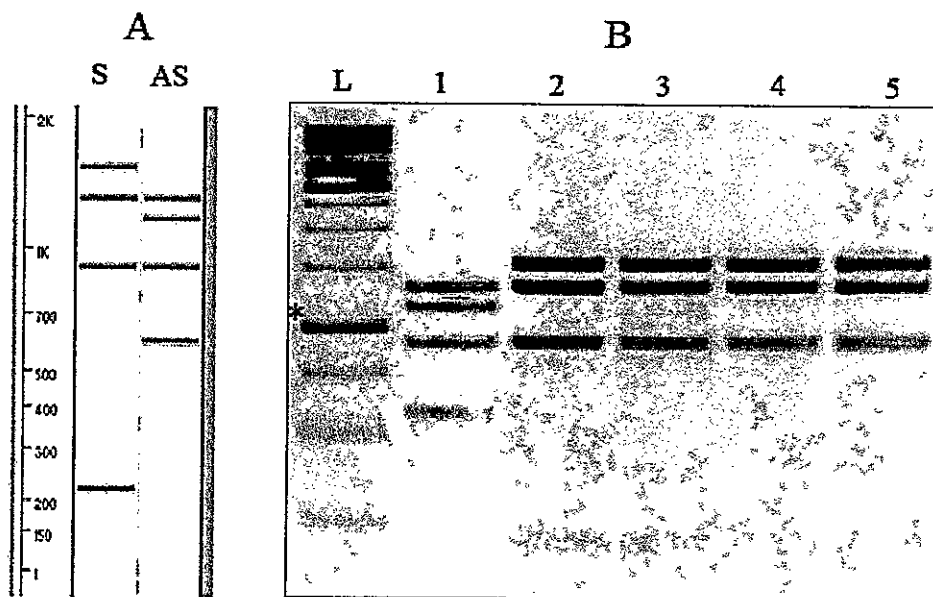
### 5.6 Construcción del vector pGWB5-VvSDL

A partir del vector pCR8D4 se amplificó *VvSDL* (partidores 4 y 5, reacción VvSDL, sección 4.3) sin la presencia del codón de término. Luego de clonar el amplificado en pCR8, se corroboró su direccionalidad con respecto a los sitios de recombinación, mediante una digestión enzimática con *AvaI* (figura 11). Se obtuvieron 4 construcciones

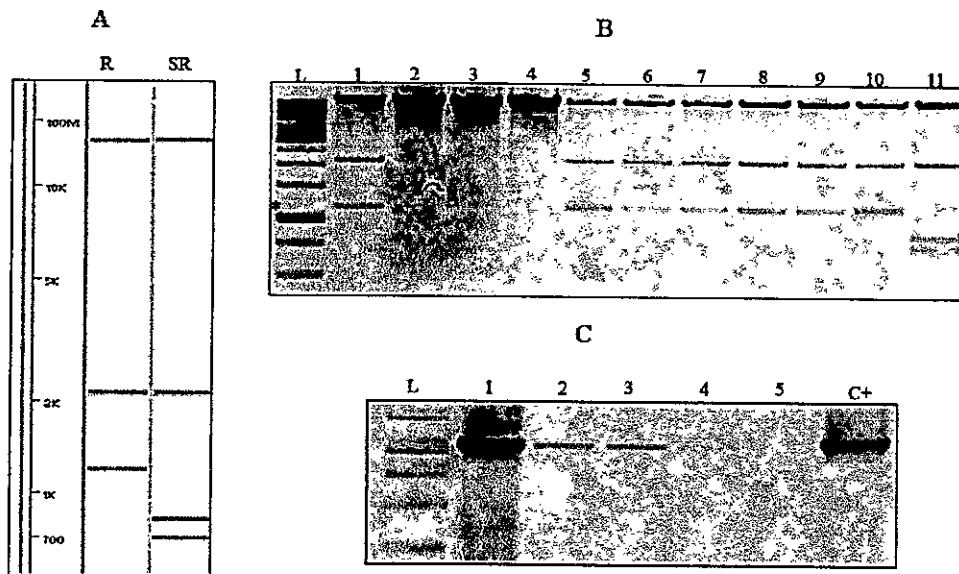


de pCR8C en sentido (Figura 11 carriles 2 3 4 5) y se seleccionó la construcción 4 para ser recombinada con pGWB5.

Las construcciones obtenidas, luego de la recombinación, fueron corroboradas mediante una digestión enzimática con *AvaI* (Figura 12B) obteniéndose 7 construcciones correctamente recombinadas. Además, se realizó un PCR para amplificar *VvSDL* (partidores 4 y 5, reacción VvSDL, sección 4.3) seleccionando la construcción del carril 1 (Figura 12C) denominada pGWB5-VvSDL-GFP (esquema en anexo II B) para transformar *A. tumefaciens*.

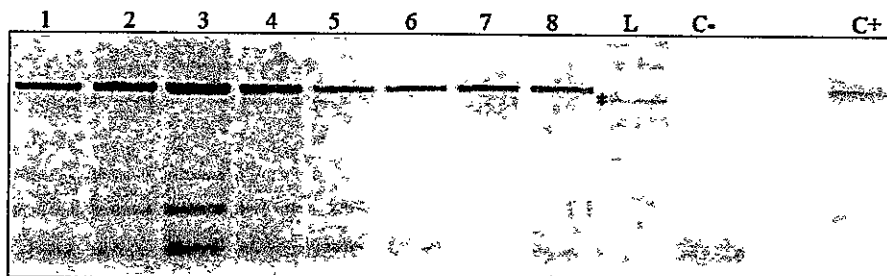


**Figura 11: Digestión enzimática de pCR8C.** En A se muestra un esquema de los posibles resultados de la digestión enzimática con la enzima *AvaI*, siendo S cuando el inserto se encuentra en sentido con respecto a los sitios de recombinación y AS cuando el inserto se encuentra en antisentido. En B se muestran 5 clones estudiados (carriles del 1 al 5). L corresponde al patrón de peso molecular de 1000 pb siendo indicado este último tamaño con un asterisco (\*).



**Figura 12: Corroboración de la construcción de pGWB5-VvSDL-GFP.** En A, el carril R muestra el patrón de digestión esperado con *Ava*I para una correcta inserción de VvSDL en pGWB5, SR indica el patrón de digestión de pGWB5 sin recombinar. En B se muestran 10 vectores analizados (carril del 1 al 10) mientras que L corresponde al patrón de peso molecular de 1000 pb indicando con un asterisco (\*) la banda con dicho tamaño. El carril 11 corresponde al vector pGWB5 sin recombinar. En C se muestra un PCR de VvSDL realizado a 5 de los 7 vectores pGWB5-VvSDL-GFP correctamente recombinados.

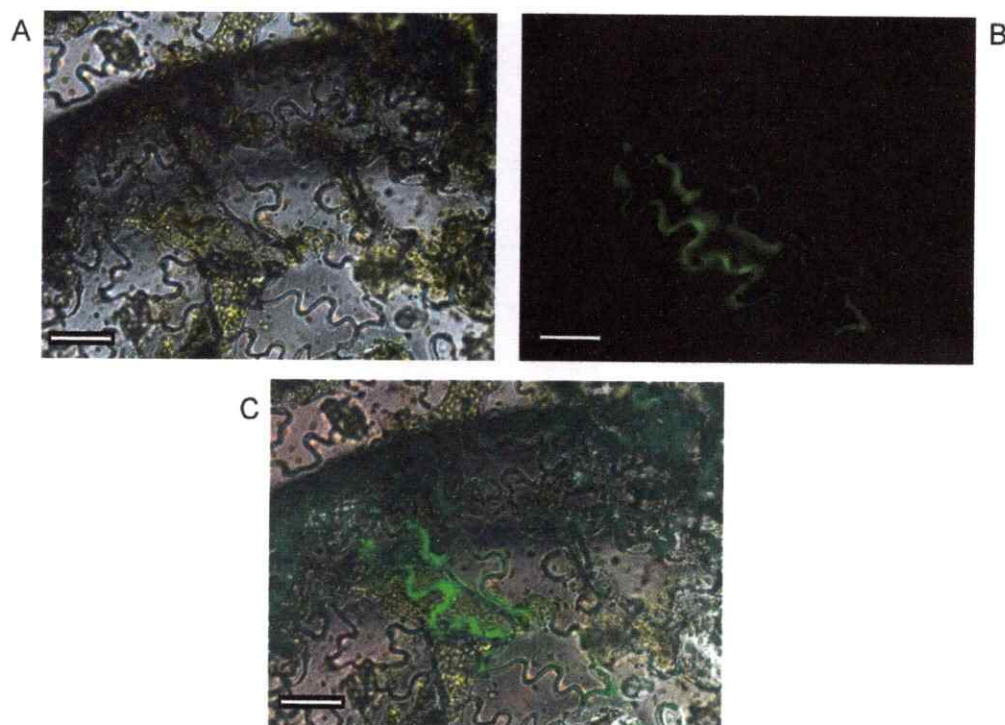
Una vez realizada la transformación del vector obtenido en *A. tumefaciens*, ésta fue corroborada mediante PCR de colonias (Figura 13) siendo las muestras que presentan una amplificación cercana a 1000 pb las que poseen el vector. Se seleccionó el clon 1 para realizar la transformación transitoria de hojas de tabaco (sección 4.11).



**Figura 13: PCR de colonias de *A. tumefaciens* portadoras de pGWB5-VvSDL-GFP.** En la figura se muestra un PCR de *VvSDL* en colonias de *A. tumefaciens* transformadas con pGWB5-VvSDL-GFP (carriles del 1 al 8). L corresponde a un patrón de peso molecular de 1000 pb indicando con un asterisco (\*) la banda correspondiente a este tamaño. C- es un control de la reacción sin templado. C+ es un control positivo utilizando el plasmido pGWB5-VvSDL-GFP como templado.

### 5.7 Visualización Microscópica de VvSDL-GFP

Las muestras de hojas infiltradas fueron visualizadas por microscopía epifluorescente (figura 14). En A se observa el campo claro de las células epidermales de la cara abaxial de tabaco. En B se aprecia fluorescencia en el contorno celular. En C se muestra una superposición de ambas imágenes, apreciándose que efectivamente la fluorescencia es en el contorno celular.



**Figura 14: Localización subcelular de VvSDL-GFP.** En A se muestra el campo claro de una muestra de epidermis de una hoja de tabaco infiltrado 78 horas antes con *Agrobacterium* portando pGWB5-VvSDL-GFP. En B se muestra el campo oscuro de la misma muestra. En C se realizó una superposición entre A y B. Todas las imágenes fueron tomadas con un aumento de 200X. La barra blanca corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

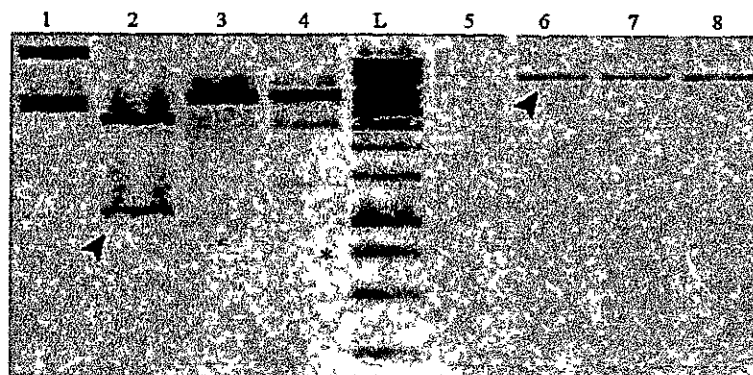
Tomando en cuenta los resultados expuestos (sección 5.5 a 5.7) se sugiere que la localización subcelular para VvSDL-GFP es citoplasmática con lo cual se da por cumplido el segundo objetivo, determinación de la localización sub celular de VvSDL.

### 5.8 Construcción de pET28a-His-VvSDL

Con el objetivo de realizar la caracterización bioquímica de VvSDL, se utilizó como estrategia la expresión de éste en un sistema heterólogo como es *E. coli*, estrategia que ha sido exitosa al caracterizar SDH de manzana (Park y cols., 2002) and ciruela (Guo y cols., 2012)

El vector de expresión seleccionado fue pET28a el cual tiene la característica de poseer un promotor inducible por IPTG y generar una proteína de fusión, en este caso, HIS-VvSDL, lo cual permite posteriormente, mediante un sistema HIS trap, obtener la proteína recombinante purificada.

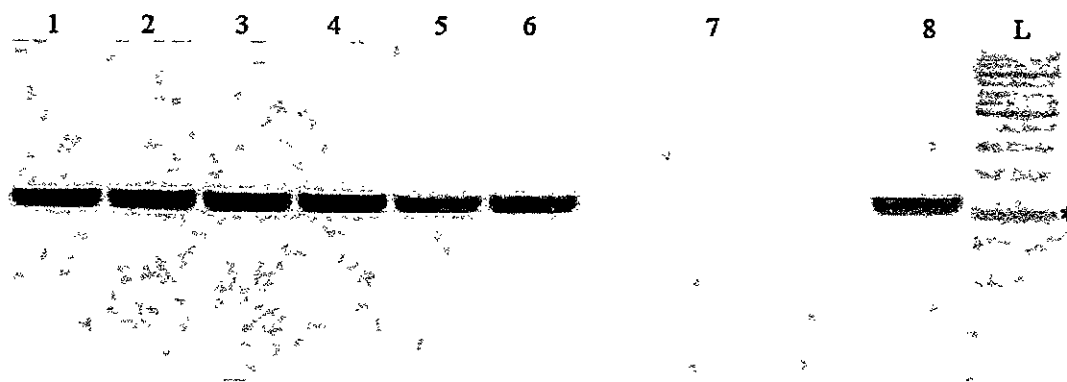
Para generar el vector pET28a-His-VvSDL se realizó una digestión doble con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III de los vectores pCR8D y pET28a (Figura 15).



**Figura 15: Digestión doble de pCR8D y pET28a.** En la figura se muestran los resultados de una digestión doble con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III de los vectores pCR8D (2) y pET28a (6), los carriles 1 y 5 corresponden a los vectores sin digerir, 3 y 7 a digestiones con *Bam*HI y 4 y 8 a digestiones con *Hind*III para los vectores pCR8D y pET28a respectivamente. Las flechas indican las bandas de interés (*VvSDL* en 2 y pET28a linealizado en 6). L corresponde a un patrón de peso molecular de 1000 pb indicándose con un asterisco (\*) dicho peso molecular.

Las bandas correspondientes a *VvSDL* flanqueado por las enzimas de restricción antes mencionada y el vector pET28a linealizado (Figura 15, indicadas con una flecha) fueron extraídas y purificadas para realizar una reacción de ligación. La construcción obtenida se denominó pET28a-HIS-VvSDL y se transformaron células DH5 $\alpha$ .

Se realizó una miniprep a las colonias obtenidas luego de la transformación y se procedió a corroborar la presencia del gen mediante un PCR a *VvSDL* (partidores 4 y 5, programa *VvSDL*, sección 4.3) utilizando los plasmidos como templado (Figura 16)



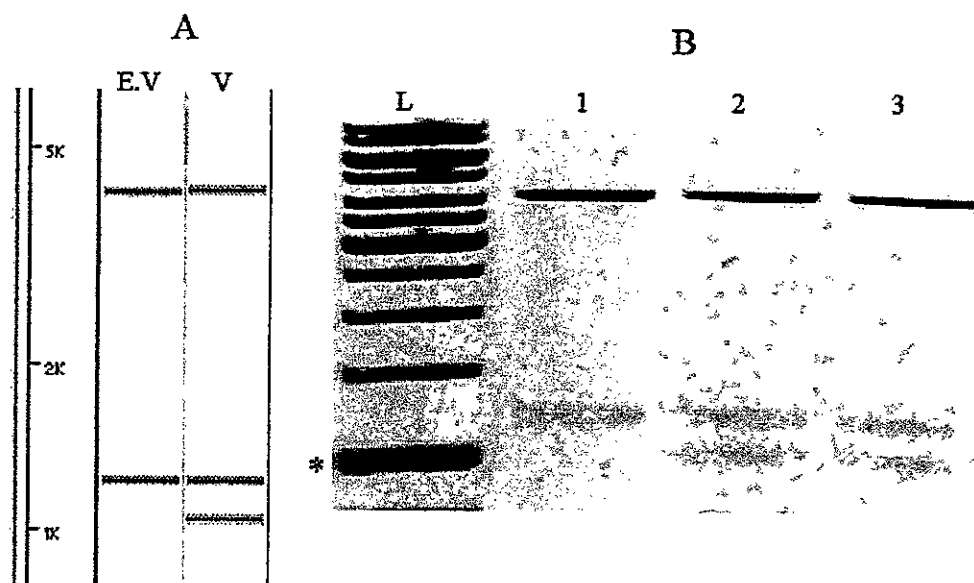
**Figura 16: PCR para corroborar la construcción pET28a-HIS-VvSDL.** En la figura se muestran los resultados de un PCR para amplificar *VvSDL*. Del carril 1 al 6 corresponde a vectores analizados, 7 es un control negativo sin templado y 8 es el control positivo pCR8C. L corresponde a un patrón de peso molecular de 1000 pb, indicando este último tamaño con un asterisco (\*).

Como se puede observar en la Figura 16, se obtuvieron amplificaciones para todos los vectores ensayados cercanas a las 1000 pb sugiriendo la presencia de *VvSDL* en los vectores.

Además se seleccionaron 2 clones para realizar una digestión enzimática con *Ava*I (Figura 17) a modo de, mediante una segunda técnica molecular, confirmar la presencia

del gen en cuestión. Se obtuvo el patrón esperado para el vector con el inserto VvSDL para ambas muestras analizadas.

Una vez que se corroboró la correcta construcción de pET28a-HIS-VvSDL (esquema del vector en anexo II C) se procedió a transformar células de *E. coli* BL21 DB3 pLyss.

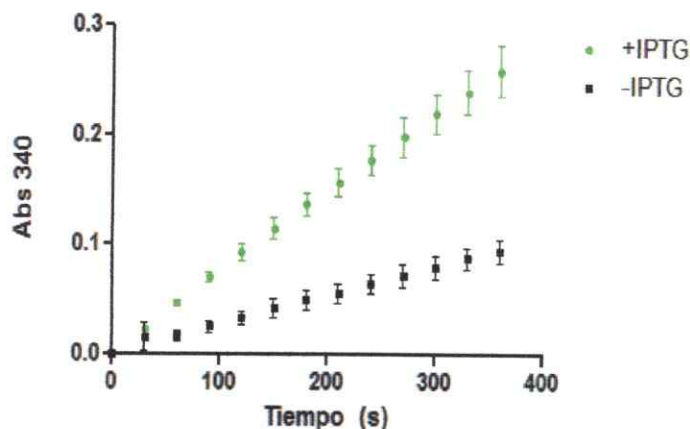


**Figura 17: Digestión con *Ava*I de pET28a-HIS-VvSDL.** En A se muestra el patrón de digestión esperado para el vector sin inserto (E.V) y para el vector con VvSDL (V). En B, 1 corresponde a pET28a, 2 y 3 corresponden a vectores pET28a-HIS-VvSDL, y L corresponde a un patrón de peso molecular de 1000 pb indicando este último tamaño indicado con un asterisco (\*).

### 5.9 Inducción y extracción de HIS-VvSDL utilizando perlas de vidrio.

Como una primera aproximación se realizó la inducción de células portadoras del vector pET28a-HIS-VvSDL y a modo de control un cultivo sin inducir. La inducción fue realizada durante 5 horas a 28 °C utilizando 0,5 mM de IPTG. Posteriormente, se extrajeron proteínas totales, mediante el uso de perlas de vidrio, para determinar la existencia de actividad de tipo sorbitol deshidrogenasa. Los resultados mostrados en la Figura 18 muestran una mayor actividad en la fracción inducida con respecto al control

sin inducir. Considerando que para ambos casos se utilizó la misma concentración de proteínas totales, los resultados sugieren que HIS-VvSDL, presente en un extracto crudo de proteínas, es capaz de oxidar sorbitol *in-vitro*.

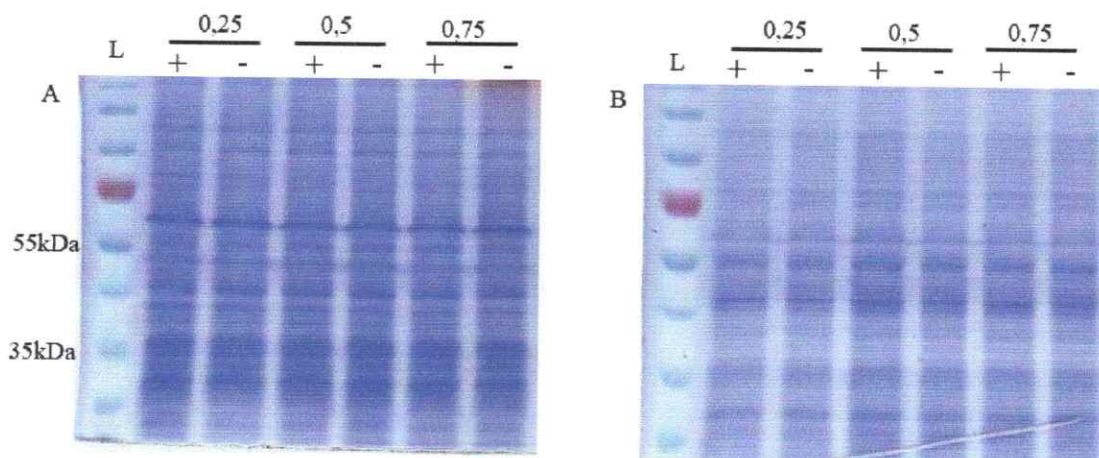


**Figura 18: Estudios preliminares de actividad SDH de HIS-VvSDL.** Extractos crudos obtenidos de *E. coli* transformados con pET28a-HIS-VvSDL inducidos (o no) con IPTG fueron ensayados para actividad de SDH. En la figura se muestra una cinética de aumento de absorbancia en el tiempo. En verde se muestran los resultados provenientes de células inducidas con IPTG, en negro el control sin inducir. N=3, las barras indican la desviación estándar. Abs 340 se refiere a la absorbancia medida a 340 nm.

### 5.10 Estandarización de las condiciones de inducción

Se realizaron ensayos para obtener el máximo rendimiento en la producción de HIS-VvSDL durante la inducción. Todas las extracciones realizadas fueron mediante el sistema B-PER. El primer factor ensayado fue la concentración de IPTG para lo cual la inducción se realizó durante 4 horas a 37 °C (Figura 19). Las muestras fueron centrifugadas a 15000 g durante 15 minutos, separándose entre fracción soluble y sedimentada (la cual fue resuspendida en B-PER). Las muestras se cargaron y se realizó un SDS-PAGE el cual se tiñó con azul de Coomassie. El tamaño esperado para VvSDL recombinante generada a partir del vector pET28a es de 42,8 kDa



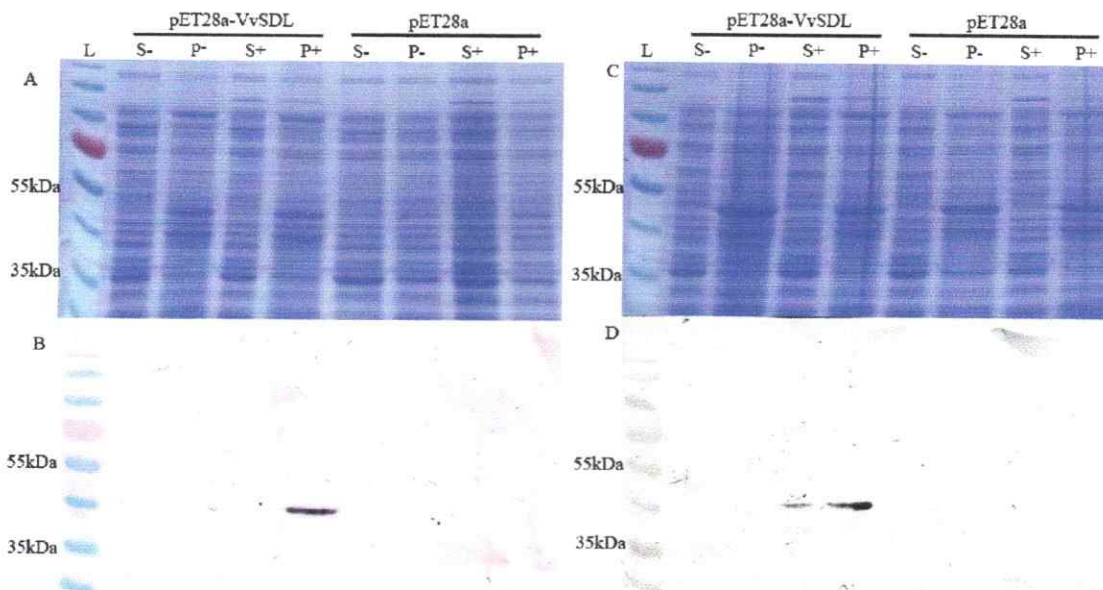


**Figura 19: SDS-PAGE de extractos de proteínas totales obtenidos desde inducciones con diferentes concentraciones de IPTG.** En A se muestra las fracciones solubles de proteínas mientras que en B se muestran las fracciones sedimentadas. En ambos casos se realizó una tinción con Coomassie. L corresponde a un patrón de peso molecular pre teñido para proteínas. Los números sobre los carriles corresponden a la concentración mM de IPTG mientras que + indica inducción y – un control sin inducir.

Los resultados no muestran diferencia en la inducción para ninguna de las condiciones ensayadas, al no apreciarse ninguna banda significativa alrededor del tamaño esperado para His-VvSDL, cercano a los 43 kDa, se decidió continuar trabajando con 0,5 mM de IPTG.

El siguiente factor ensayado fue la temperatura de inducción, por lo que se realizaron inducciones a 28 °C y a 37 °C durante 16 horas (figura 20). El procedimiento fue el mismo al descrito anteriormente pero además se realizó un western blot utilizando un antisuero anti-HIS.



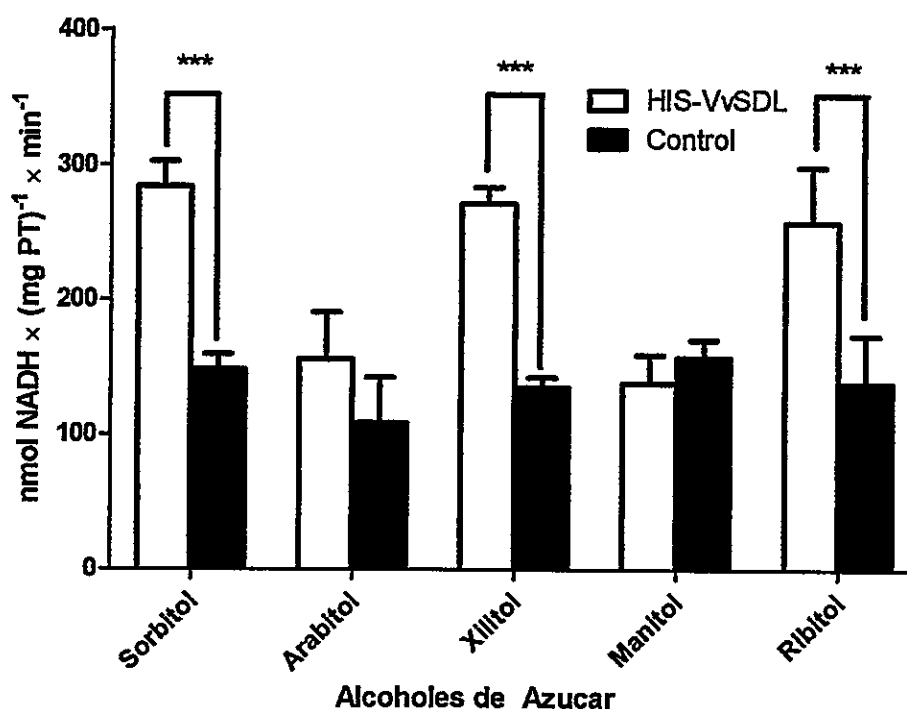


**Figura 20: SDS-PAGE y western blot de inducciones a 37 y 28 °C.** A y C corresponden a un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de extractos de proteínas cuya temperatura de inducción fue de 37 y 28 °C, respectivamente, B y D corresponde a western blot (anti-His) de las inducciones a 37 y 28 °C, respectivamente. S- y P- corresponden a proteínas solubles totales y proteínas sedimentadas, respectivamente, provenientes de un cultivo control sin inducir. S+ y P+ corresponden a proteínas solubles totales y proteínas sedimentadas, respectivamente, provenientes de un cultivo que fue inducido con 0,5 mM de IPTG a las temperaturas antes indicadas durante 16 h.

Los resultados no muestran diferencia en el SDS-PAGE entre una inducción a 37 °C (Figura 20A) o a 28 °C (Figura 20C), sin embargo en el western blot se puede apreciar que tanto para 37 °C (Figura 20B) como para 28 °C (Figura 20D) existe una señal con un tamaño cercano al patrón de peso molecular de 40 kDa (entre las bandas de 35 y 55 kDa), la cual coincide con el peso molecular esperado de HIS-VvSDL (~43 kDa). Se decidió continuar trabajando con una temperatura de inducción de 28 °C debido a que solamente a esta temperatura la proteína se obtiene en la fracción soluble. Los resultados no muestran señal para el vector con el gen de interés (pET28a-VvSDL) sin inducir ni tampoco para el vector sin inserto.

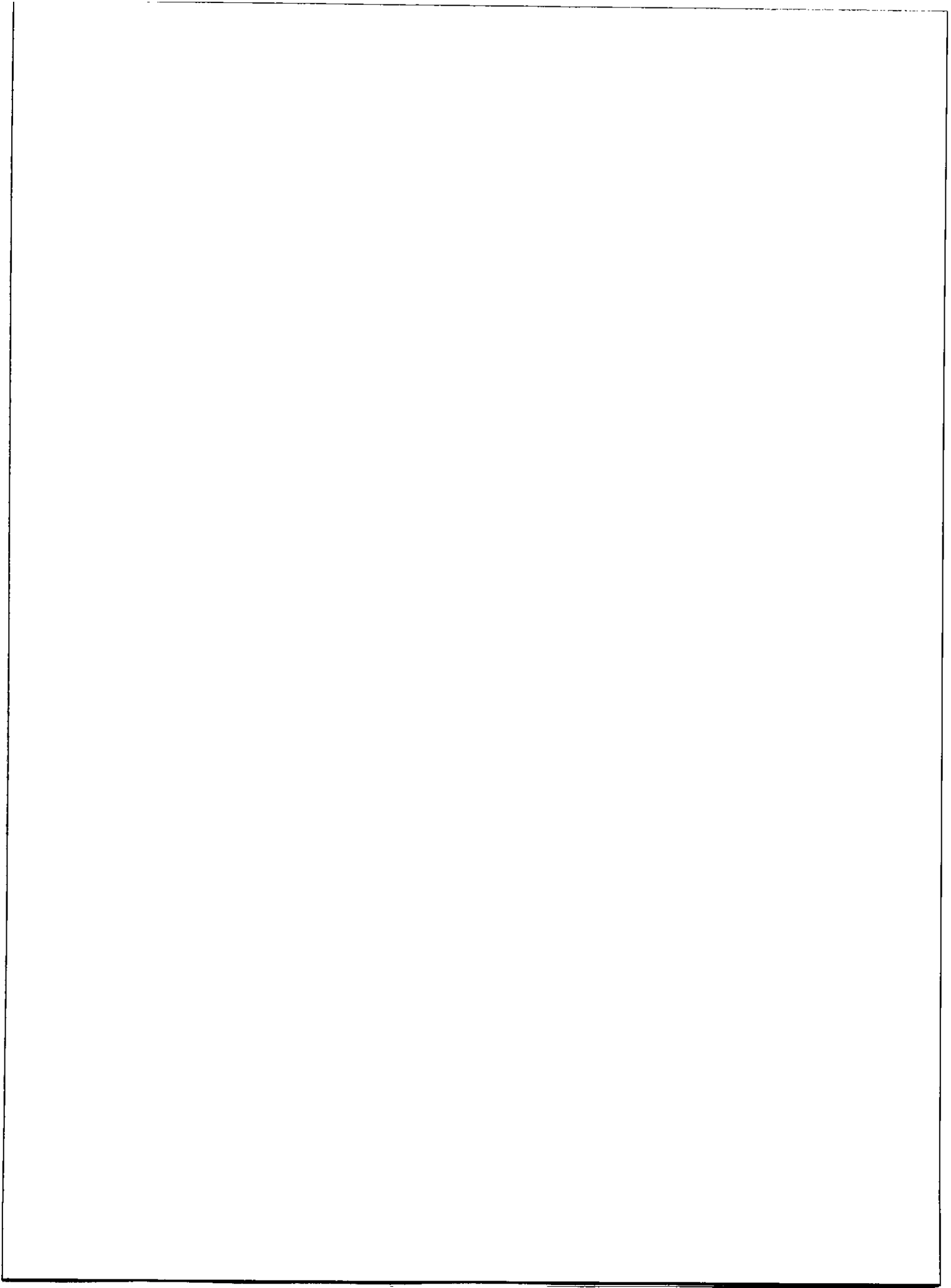
### 5.11 Ensayos de actividad con extractos solubles totales.

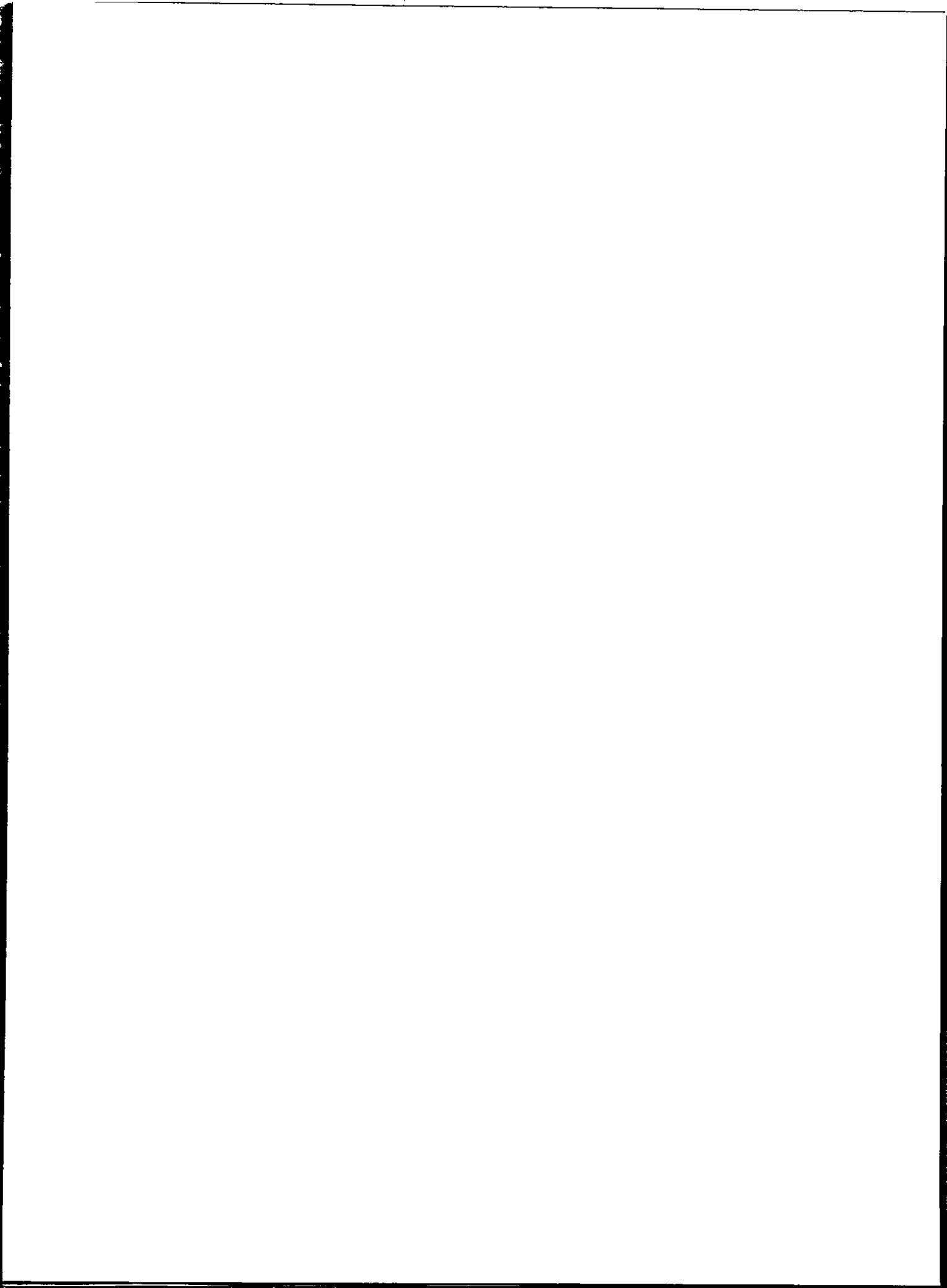
Una vez estandarizadas las condiciones de inducción, se procedió a realizar ensayos de actividad utilizando extractos solubles totales para determinar si es que la proteína mantiene actividad luego del proceso de extracción mediante B-PER (Figura 21).



**Figura 21: Ensayos de actividad con extractos solubles totales.** A partir de extractos solubles totales se realizó un ensayo de actividad para oxidación de alcoholes de azúcar mediante el seguimiento de la aparición de NADH. Las barras blancas indican extractos solubles totales provenientes de cultivos bacterianos inducidos para la producción de HIS-VvSDL mientras que las barras negras indican cultivos sin inducir. Se obtuvo actividad para sorbitol, xilitol y ribitol. N=3 T-test de una cola (\*\*\*) = p < 0,001

Los resultados obtenidos muestran que extractos solubles totales de *E. coli* inducidos para la producción HIS-VvSDL y extraídos con B-PER son capaces de oxidar sorbitol, xilitol y ribitol *in vitro*.

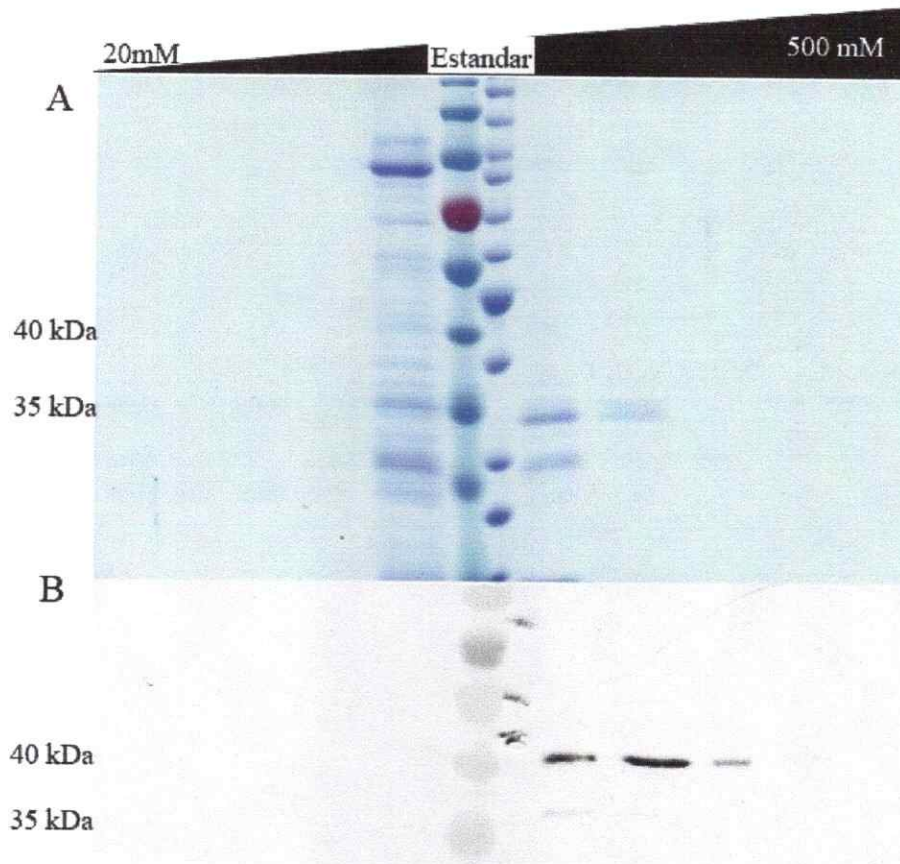




### 5.12 Purificación de HIS-VvSDL mediante gradiente continuo.

Como se muestra en la sección anterior (sección 5.11) los resultados indican que HIS-VvSDL es capaz de oxidar sorbitol en ensayos con extractos solubles totales *in vitro*. Con el objetivo de determinar los parámetros cinéticos de VvSDL para este alcohol de azúcar se procedió a purificar HIS-VvSDL. Para la purificación se realizó, como una primera aproximación, una elución desde la columna HIS-trap utilizando un gradiente continuo desde los 20 hasta los 500 mM de imidazol (Figura 22). Las diferentes fracciones colectadas se resolvieron en un gel de SDS-PAGE el cual fue teñido con azul de Coomassie (figura 22 A) y además se realizó un western blot anti-His (figura 22 B). Como se puede observar en la figura 22 A, en la fracción cargada a la izquierda de los estándares de peso molecular, se observa una gran población de proteínas pero ninguna de éstas fue reconocida por el anticuerpo anti-His. En la fracción cargada a la derecha de los estándares de peso molecular y la siguiente a ésta, hay tinción de proteínas de un peso molecular aproximado de 35 kDa y de otras de menor peso (figura 22 A). Sin embargo, al realizar el western blot se detecta presencia de un epítipo anti HIS cercano a los 40 kDa (lo cual no se aprecia en la tinción con Coomassie) y cercana a los 35 kDa (que correspondería a la señal observada en figura 22 A).

Considerando que el tamaño esperado para HIS-VvSDL es aproximadamente 43 kDa, los resultados muestran que HIS-VvSDL es detectable en su forma íntegra solamente mediante western blot en al menos 3 de las fracciones colectadas.

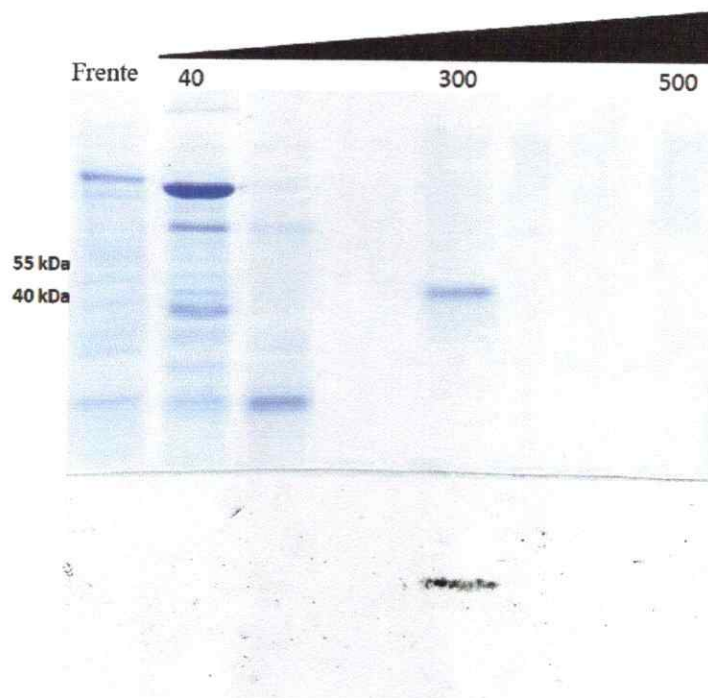


**Figura 22: Purificación de HIS-VvSDL mediante gradiente continuo de imidazol.** En la figura se muestra un SDS-PAGE teñido con azul de coomassie (A) y un western blot anti-HIS (B) de las fracciones recolectadas a través de un gradiente continuo de 20 a 500 mM imidazol. En A se observa que al menos 3 de las fracciones colectadas concentran la mayor cantidad de proteínas. Mediante el uso de un antisero anti-HIS (B) es posible detectar una señal en al menos 3 de las fracciones colectadas. Los estándar corresponden a patrones de peso molecular pre teñido (izquierda) y sin teñir (derecha).

Con el objetivo de obtener mayor cantidad de proteína y un mayor grado de pureza se procedió a realizar una purificación mediante gradiente discontinuo.

### 5.13 Purificación de His-VvSDL mediante gradiente discontinuo.

Basándose en los resultados mostrados en figura 22, para esta purificación se utilizaron concentraciones de 20, 200, 300 y 500 mM de imidazol (Figura 23).



**Figura 23: Purificación mediante gradiente discontinuo de imidazol.** En la figura se muestra un SDS-PAGE y bajo él un western blot (anti-His) de las fracciones colectadas a través de una purificación de gradiente discontinuo para concentraciones de 40, 200, 300 y 500 mM de imidazol.

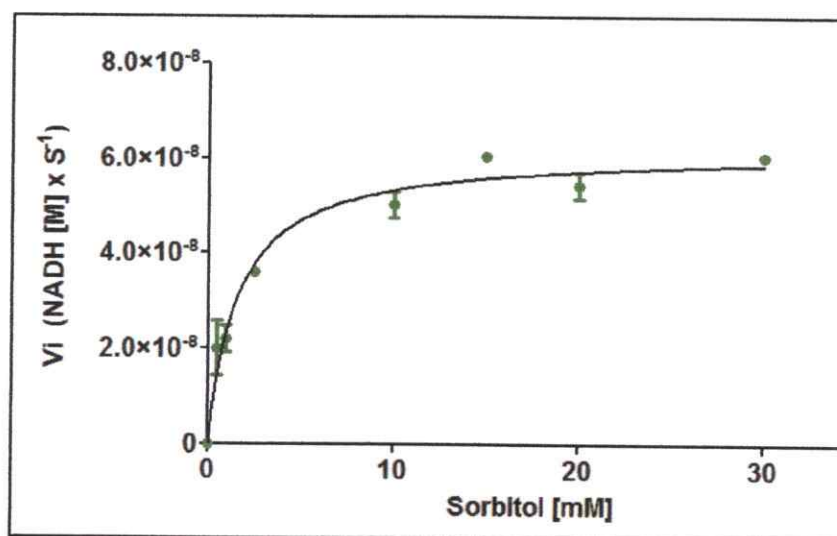
Como se puede apreciar la proteína fue eluida a los 300 mM de imidazol (Figura 23), señal cercana a los 40 kDa tanto en el SDS-PAGE como en el western blot. Al realizar un análisis de pixeles del gel teñido con Coomassie, se determinó que la muestra cargada tiene un 94% de pureza para HIS-VvSDL.

Teniendo en cuenta que, para efectos de ensayos bioquímicos una proteína se considera pura cuando representa más de un 90% de la muestra. los resultados obtenidos para la purificación de HIS-VvSDL nos permiten realizar ensayos de caracterización enzimática a partir de una fracción purificada, dando así por cumplido el tercer objetivo específico: Expresión y purificación de VvSDL mediante proteínas recombinantes producidas en microorganismos.



#### 5.14 Determinación de los parámetros cinéticos de HIS-VvSDL purificada con sorbitol.

A partir de los extractos purificados obtenidos de HIS-VvSDL, se realizaron mediciones cinéticas a distintas concentraciones de sorbitol con una concentración saturante y constante de NAD (1,5 mM). Los resultados fueron graficados y se realizó un ajuste de Michaelis Menten (Figura 24).



**Figura 24: Gráfico de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato.** En el gráfico se informa la velocidad inicial ( $V_i$ ) en función de la concentración de sorbitol utilizada en distintas mediciones de cinética enzimática. Se realizó un ajuste a una cinética tipo Michaelis Menten utilizando el programa GraphPad ( $R^2=0,978$ ). Las barras corresponden a la desviación estándar de 3 replicas técnicas a partir de una réplica biológica.

Los resultados indican que HIS-VvSDL posee una  $K_m$  de  $1,56 \pm 0,23$  mM, una velocidad máxima de  $61 \text{ nM S}^{-1}$  y una  $k_{cat}$  de  $0,338 \text{ S}^{-1}$ . Al realizar ensayos utilizando NADH, NADP<sup>+</sup> o NADPH como cosustrato no se registró actividad (datos no mostrados).

Considerando los últimos resultados expuestos (sección 5.8 a 5.14), se puede afirmar que VvSDL es una enzima capaz de oxidar sorbitol con una  $K_m$  de 1,56 mM y que, al



igual que otras SDH previamente caracterizadas es capaz de oxidar también otros alcoholes de azúcar, tales como el ribitol y xilitol, cumpliendo así con el cuarto objetivo específico: Análisis bioquímicos de VvSDL para determinar la especificidad de sustrato y sus parámetros cinéticos con sorbitol.

## 6 Discusión

### 6.1 Clonación de VvSDL desde Thompson Seedless

El objetivo general de esta tesis fue la determinación de la localización subcelular, los parámetros cinéticos y el patrón de expresión de *VvSDL* en *Vitis vinifera*. Para llevar a cabo este objetivo general lo primero que se realizó fue aislar el CDS de *VvSDL* desde la variedad Thompson Seedless.

Trabajos previos realizados en el laboratorio mostraron que VvSDH1 aislada desde la variedad Cabernet Sauvignon es capaz de oxidar sorbitol *in vitro* al ser expresada en un sistema heterólogo (transformación transitoria de tomate; Araya, 2011). Con el objetivo de seguir estudiando el rol que podría tener una posible SDH en vid, durante el desarrollo de esta tesis, se realizaron ensayos de expresión para el gen que la codifica (*VvSDL*) y para el gen que codifica para un producto génico que podría participar en la síntesis de sorbitol (*VvS6PDL*), el cual posee un 70% de homología con el gen que codifica para una sorbitol 6-fosfato deshidrogenasa en manzana (Negm y Loescher, 1981).

Considerando que al momento de realizar los experimentos de expresión génica, existía disponibilidad de tejido biológico en el laboratorio, correspondiente a la variedad Thompson Seedless en distintos estadios, se decidió aislar esta posible SDH desde esta variedad en vez de continuar trabajando con Cabernet Sauvignon.

Al momento de plantear la metodología, se decidió generar 4 vectores de entrada (pCR8): uno con el marco de lectura completo (pCR8B), otro sin el codón de término

(pCR8A) y uno que tuviera adaptadores de sitios de restricción para la posterior construcción de un vector que permitiera su expresión heteróloga en *E. coli* utilizando un tag amino (pCR8D) o carboxilo terminal (pCRC). Varios clones de cada vector fueron enviados a secuenciar y se encontraron diferencias nucleotídicas entre las secuencias provenientes de 11 clones analizados. Se podría pensar que estas diferencias se deben a fallos en la amplificación con la DNA polimerasa PFU. Sin embargo, considerando la alta fidelidad de esta enzima comercial (< un error cada  $10^6$  bases) y el hecho de que los cambios de base ocurriesen en la misma posición, con la misma sustitución y en más de un clon, nos hace suponer que estos eventos no fueron aleatorios. Luego de analizar los resultados de la secuenciación y compararlos con la secuencia publicada en NCBI anotada para la variedad Pinot noir, se encontraron 13 diferencias a nivel nucleotídico que estaban presentes en al menos 3 de los 11 clones secuenciados. De éstas, 3 generan a su vez un cambio a nivel aminoacídico, siendo el más importante un cambio de valina 326 por glicina el cual se encontró en todos los clones analizados (Figura 6) y que se encuentra conservada en todas las SDH analizadas (glicina 335 del alineamiento, Anexo I).

En particular para el cambio de valina 326 por glicina, se decidió analizar la secuencia publicada en la base de datos. Esta anotación proviene de un análisis bioinformático utilizando el predictor de genes GNOMON a partir de 44 ESTs distintos provenientes de diferentes variedades de vid sujetos a diferentes tratamientos. Al descargar los ESTs y volverlos a empalmar mediante el uso del programa vector NTL, se encontró que la anotación en la base de datos posee un error y es que el aminoácido correspondiente a la

posición 326 es una glicina, lo cual explica que todos los clones analizados fueran diferentes a la base de datos.

Una posibilidad para explicar las demás diferencias encontradas en las secuencias es que existan 2 alelos para este gen (considerando que Thompson Seedless es un organismo diploide) pero esto explicaría solo 2 diferencias por lo cual por sí solo no es suficiente para explicar todas las diferencias. En esta tesis, la clonación de VvSDL fue a partir de cDNA de baya de 5-6 mm proveniente de muestras biológicas extraídas desde 3 individuos generados por injertos, provenientes de la misma planta (clones). Tomando en cuenta la existencia de variación somaclonal (Larkin and Scowcroft, 1981), la cual consiste en variaciones incluso a nivel genético entre individuos propagados de forma clonal, se podría considerar que cada individuo, a pesar de ser clones, aporta con 2 mRNA diferentes. Una última posible explicación para los resultados obtenidos es que exista más de una copia para el gen en el genoma de *V. vinifera* (duplicación génica) tal como se ha visto por ejemplo en el estudio de enzimas relacionadas con la ruta de los flavonoides en vid, las cuales poseen entre una y cuatro copias por genoma diploide (Sparvoli y cols. 1994).

Para poder sacar una conclusión robusta respecto a los resultados obtenidos de la secuenciación, sería necesario contar con un número mayor de muestras. De esta forma se podría definir con mayor precisión cuáles y cuántas son las poblaciones de transcrito presentes para este gen y luego diseñar experimentos que permitan dilucidar el origen de las mismas. De todas maneras, considerando todos los análisis realizados, se seleccionó

el clon pCR8D4 para continuar con los estudios bajo el criterio de que fue la secuencia con mayor similitud a la base de datos.

## **6.2 Análisis de los niveles de expresión de *VvSDL* y *VvS6PDL***

Considerando que en rosáceas, el sorbitol es transportado desde las hojas hasta los órganos sumideros en donde se almacena y puede ser transformado a fructosa (Loescher, 1987) y que en vid se ha reportado la presencia de este alcohol de azúcar en las bayas, además del hecho de que durante el desarrollo de la misma se generan cambios en las concentraciones de carbohidratos entre otros compuestos (Aung y cols. 2002; Swanson y Elshishiny, 1958), se buscó determinar si es que los niveles de expresión de los posibles genes relacionados con la síntesis y metabolización de sorbitol varían a lo largo del desarrollo de la baya.

Para esto, se diseñaron partidores que amplifican un fragmento del gen *VvSDL* para realizar ensayos de qRT-PCR. En forma paralela al desarrollo de esta tesis, se trabajó en la clonación de un gen cuyo producto génico posee una identidad de 70% con sorbitol 6-fosfato dehidrogenasa de manzana, enzima requerida para la síntesis del sorbitol en rosáceas. El gen se denominó *VvS6PDL* y se analizó los niveles de expresión para este gen junto con *VvSDL*.

Los resultados obtenidos (sección 5.4) muestran que en etapas tempranas del desarrollo de la baya, *VvSDL* alcanza su máxima expresión, mientras que con un tamaño de 7 a 8 mm se alcanza el mínimo. Para el caso de *VvS6PDL*, el máximo se encuentra en la etapa de cosecha mientras que el mínimo se encuentra cuando las bayas tienen un tamaño de 5

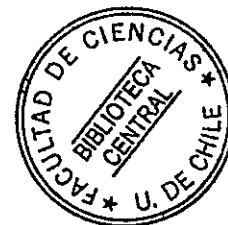
a 6 mm. Si se hipotetiza que los niveles de sorbitol presentes en la baya dependen exclusivamente de los niveles de expresión de las enzimas que principalmente lo sintetiza (VvS6PDL) y degrada (VvSDL) en este órgano, los resultados obtenidos sugieren que a medida que la baya madura se estaría generando una acumulación de sorbitol, puesto que los niveles de VvS6PDL son mayores que los de VvSDL generando así que al haber más síntesis que metabolización el sorbitol se acumule. Sin embargo, se sabe que *in vivo* hay otros factores que influyen además de los niveles de transcrito, tales como la eficiencia de traducción del mRNA en proteína y la eficiencia catalítica de cada enzima. Por lo tanto, para poder afirmar de forma indirecta qué estaría ocurriendo con los niveles de sorbitol en la baya analizando las principales enzimas, haría falta determinar la eficiencia de traducción de ambas enzimas y la eficiencia catalítica de VvS6PDL. Además de esto, en especies rosáceas la síntesis de sorbitol ocurre principalmente en hojas maduras para luego ser transportado a órganos sumideros. En el caso de vid se hace necesario analizar los niveles de transcritos para estos genes en hojas maduras y ver qué es lo que ocurre con la producción de sorbitol, puesto que a pesar de que no se ha reportado una alta concentración de sorbitol en exudados de floema de *Vitis* (Anderse y Brodbeck, 1989), sí se ha descrito la presencia en vid de transportadores homólogos con transportadores de *Arabidopsis* capaces de transportar sorbitol y otros alcoholes de azúcar (Demien y cols., 2010).

Pese a no poseer los datos experimentales antes mencionados, un trabajo realizado por Aung y cols. (2002) en donde registraron los niveles de sorbitol durante el desarrollo de

la baya, mostró que existe una acumulación de sorbitol durante la maduración de ésta lo cual es coincidente con los resultados obtenidos en cuanto a los niveles de transcrito.

Si se analizan los niveles de expresión de ambos genes, se observa que luego de la etapa de 7-8 mm existe un aumento en los niveles de transcrito para ambas enzimas estudiadas. Este aumento coincide con la etapa en que la baya comienza a acumular azúcares tales como la glucosa y fructosa, y en algunas variedades comienzan a decaer los niveles de sacarosa (Davis y Robinson, 1995; Wu y cols, 2011). Si bien es cierto anteriormente se sugirió que en etapas tardías del desarrollo de la baya se podría estar acumulando sorbitol, los resultados sugieren también que al haber un aumento en los niveles de transcrito de los genes que codifican para ambas enzimas se podría estar aumentando el flujo desde glucosa a fructosa mediado por la síntesis y metabolización de sorbitol (en 7 días post envero aumenta la expresión de ambos genes y en particular en la etapa de cosecha, siendo mayor la cantidad de transcrito para VvS6PDL, Ver figura 10).

Sin lugar a dudas que para poder comprender cuál es el rol del sorbitol en vid se hace necesario realizar estudios con respecto a la concentración de este alcohol de azúcar y de carbohidratos tales como la sacarosa, glucosa y fructosa, tanto en hojas como en fruto, para así poder relacionar el contenido de estos en el organismo directamente con los niveles de expresión de las enzimas relacionadas con el metabolismo del sorbitol. Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis son un aporte importante y entregan algunas piezas necesarias para lograr armar este puzle.



### 6.3 Determinación de la localización subcelular de VvSDL

Estudios de la localización subcelular de SDHs de otras especies vegetales muestran que puede estar localizada exclusivamente en el citoplasma (Arabidopsis; Aguayo y cols., 2013) o en el citoplasma, cloroplasto y vacuola (manzana; Wang y cols., 2009). Tanto los resultados *in silico* como *in vivo* a través de microscopia de epifluorescencia sugieren que VvSDL-GFP posee localización citosólica. El patrón de fluorescencia observado en los contornos celulares (sección 5.7, Figura 14) que es característico de una localización citosólica debido a que en células vegetales la vacuola desplaza el citosol hacia el contorno, podría también corresponder a localización de pared, membrana plasmática o membrana vacuolar. Para resolver esto, se realizó una cotransformación utilizando pGWB5-VvSDL-GFP y el vector vac-rk CD3-975, el cual expresa la proteína fluorescente mCherry fusionada a la región carboxilo terminal de la acuaporina vacuolar  $\gamma$ -TIP (Brook y cols., 2007). De esta forma la estrategia consistía en hacer una superposición de imágenes entre la señal verde (VvSDL-GFP), roja ( $\gamma$ -TIP-mCherry) y el campo claro en el cual se puede apreciar la pared celular, esperando que la señal verde (correspondiente a VvSDL-GFP) se encontrase entre la pared y la señal roja (tonoplasto), con lo cual se descartaría localización a tonoplasto o pared. Sin embargo, el resultado de este experimento (dato no mostrado) no fue informativo debido a la resolución del microscopio de epifluorescencia, lo cual se podrá resolver a futuro utilizando microscopía confocal.

Por lo tanto, considerando las predicciones bioinformáticas, los resultados de la microscopia de epifluorescencia y los reportes encontrados en la literatura para otras



SDH vegetales, se sugiere que la localización de VvSDL es citosólica. Para determinar de manera más robusta y definitiva la localización subcelular de VvSDL, además de repetir la estrategia de coinfiltración utilizando microscopia confocal, se podrá desarrollar un antisuero  $\alpha$ -VvSDL para así poder realizar ensayos de inmunolocalización.

#### 6.4 Purificación y determinación de los parámetros cinéticos de VvSDL

Durante esta tesis, se utilizó el sistema de expresión heteróloga en *E. coli*. Determinamos mediante extractos solubles totales de proteínas que HIS-VvSDL es capaz de oxidar sorbitol, ribitol y xilitol *in vitro* al igual que AtSDH (Aguayo y cols., 2013).

Al purificar HIS-VvSDL mediante el uso de columna de afinidad para histidina hubieron dificultades durante el proceso (tales como pérdida de actividad, precipitación de la proteína y degradación de la misma), pudiendo obtener fracciones con más de un 90% de pureza y con actividad bioquímica solamente en una ocasión (sección 5.13, Figura 23). La cantidad de HIS-VvSDL purificada obtenida fue suficiente para realizar ensayos cinéticos con sorbitol. Para realizar estos ensayos, se utilizó una concentración saturante de  $\text{NAD}^+$  (1,5 mM), el cual es el co-sustrato para las SDH, obteniéndose valores de  $K_m$  igual a  $1,56 \pm 0,23$  mM, una velocidad máxima de  $61 \text{ nM S}^{-1}$  y una  $k_{cat}$  de  $0,338 \text{ S}^{-1}$ . Estos valores obtenidos concuerdan con los de otras SDHs de especies no Rosaceas como por ejemplo tomate ( $K_m$  2,39 mM;  $V_{max}$  56  $\text{nM S}^{-1}$ ; Ohta y cols., 2005) enzima con la que comparte un 87% de identidad aminoacídica. Sin embargo el hecho de que la  $K_m$  de VvSDL sea menor que SiSDH estaría indicando que es una enzima con mayor

eficiencia para metabolizar sorbitol a fructosa, lo cual podría coincidir con los bajos niveles de sorbitol reportados en vid.

El cosustrato de VvSDL es NAD, y no NADP tal como se ha descrito tanto para enzimas SDH caracterizadas desde rosáceas (manzana; Negm y Loesher, 1979) como para no rosáceas (tomate; Ohta y cols., 2005).

Para hacer más robusto este análisis bioquímico para VvSDL, es necesario realizar ensayos variando la concentración de  $\text{NAD}^+$  utilizando una concentración saturante de sorbitol para así determinar las constantes cinéticas para  $\text{NAD}^+$ . Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente, no fue posible volver a obtener una fracción pura y activa y ensayos con extractos totales solubles (sección 5.11, Figura 21) muestran una actividad basal para la reducción de  $\text{NAD}^+$ , lo que hace imposible determinar los parámetros cinéticos a partir de éstos.

Al realizar un BLAST utilizando la secuencia codificante de VvSDL en la base de datos de NCBI, la secuencia con mayor identidad resultante (99%) es una proteína con la anotación de una supuesta “L-idonate 5- dehydrogenase-like” (XM\_002269859) proveniente de Pinot Noir, para la cual no existen publicaciones que la caractericen. Esta proteína posee la misma secuencia aminoacídica que la proteína anotada como “unamed protein product” de vid CAO24583.1 (actualmente indicada como obsoleta en NCBI), la cual fue el candidato seleccionado como una posible SDH con que se comenzó esta línea de investigación (Tang, 2011) y para la cual no existen publicaciones relacionadas para su actividad bioquímica.

Actualmente, existe una anotación para una idonato deshidrogenasa de vid (ABA01327.1) la cual fue caracterizada por Debolt y cols. (2006) y que comparte un 77% de identidad con VvSDL de Thompson Seedless. Ante este antecedente, y considerando que idonato deshidrogenasa participa en la ruta de síntesis del ácido tartárico, el cual es el principal ácido soluble no fermentable presente en uva, es necesario realizar ensayos bioquímicos con His-VvSDL usando idonato como sustrato. Sin embargo, este compuesto no se encuentra disponible de manera comercial, y no se logró realizar el ensayo utilizando la reacción inversa (de ácido 5-ceto D-glucónico a idonato) debido a la inactivación e imposibilidad de obtener más enzima pura y activa.

Como muestran los resultados de actividad obtenidos a partir de ensayos con extractos solubles totales, HIS-VvSDL es capaz de oxidar sorbitol, xilitol y ribitol *in vitro*, vale decir VvSDL posee afinidad por más de un alcohol de azúcar, tal como se ha visto con otras SDH ya descritas (tomate, Ohta y cols., 2005; Pera japonesa, Oura y cols., 2000) Se sabe, tal como se mencionó en la introducción, que variados estudios demuestran la relación entre el metabolismo de alcoholes de azúcar y las diversas ventajas que confieren tales como: mejor tolerancia a la salinidad, compensar reducciones de potencial hídrico, facilitar la movilización de boro, entre otros (Kanayama, 2009). Los resultados obtenidos hacen suponer que *in vivo* VvSDL podría estar funcionando como una sorbitol deshidrogenasa relacionada con la regulación de los niveles de sorbitol ya sea en condiciones de stress y/o contribuyendo a la acumulación de azúcares durante el desarrollo del fruto. Alternativamente podría estar participando como una ribitol deshidrogenasa o una xilitol deshidrogenasa incorporando D-ribulosa o D-xilulosa

respectivamente a la ruta de las pentosas fosfato (Ying HC, 1998). Sin embargo para mi conocimiento no existen reportes en la literatura con respecto a la presencia de xilitol y ribitol en vid, por lo que la actividad observada *in vitro* no necesariamente refleja una función biológica

Para nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que describe la presencia de una enzima con la capacidad de oxidar sorbitol en vid. Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis son un primer aporte que junto con experimentos futuros tales como profundizar en la caracterización de VvS6PDL, además de la medición de los niveles de sorbitol y otros azúcares en diferentes tejidos y estados fenológicos de vid permitirán determinar cuál es el rol que desarrolla tanto el sorbitol, como las enzimas participantes en el metabolismo de éste, en el contexto biológico durante el ciclo de vida de esta especie.

## 7 Conclusiones

Durante el desarrollo de esta tesis se clonó, a partir de cDNA proveniente de *Vitis vinifera* variedad Thompson Seedless, la secuencia codificante de un gen cuyo producto posee alta homología a SDHs caracterizadas en especies vegetales tanto pertenecientes a la familia rosácea como no pertenecientes a ésta. Dicha secuencia fue denominada VvSDL. De manera paralela, se identificó otra secuencia cuyo producto génico posee alta homología con S6PDH de manzana la cual se denominó VvS6PDL.

Se determinaron los niveles de expresión para ambos genes y se encontró que los niveles de los mismos varían dependiendo del estadio de desarrollo de la baya. Si los niveles de sorbitol dependiesen exclusivamente de los niveles de transcrito de las enzimas que lo sintetiza y metaboliza, los resultados sugerirían que existe una acumulación de sorbitol en estadios tardíos de desarrollo.

A partir de la generación de una proteína de fusión con un tag GFP carboxilo terminal, la transformación transitoria de hojas de tabaco y su observación mediante microscopia de epifluorescencia, se sugiere que VvSDL-GFP posee una localización citoplasmática. Este resultado concuerda con predicciones *in silico* de localización en base a análisis de secuencia y a la localización característica de otras SDHs previamente caracterizadas.

Finalmente, con el objetivo de determinar parámetros bioquímicos de VvSDL se logró expresar y purificarla mediante un sistema de expresión heteróloga en *E. coli*. Los resultados obtenidos a partir de extractos solubles totales de proteínas indican que His-VvSDL es capaz de metabolizar sorbitol, ribitol y xilitol *in vitro* y que mediante análisis

bioquímicos con extractos purificados de His-VvSDL, se determinó que ésta tiene una Km igual a  $1,56 \pm 0,23$  mM, una velocidad máxima de  $61 \text{ nM S}^{-1}$  con sorbitol como sustrato en condiciones de concentración saturante de  $\text{NAD}^+$  (1,5 mM)

Por todo lo anteriormente expuesto es que se valida la hipótesis propuesta al comienzo del desarrollo de esta tesis y se afirma que VvSDL de *Vitis vinifera* es una sorbitol deshidrogenasa citosólica la cual se expresa de manera diferencial en los distintos estadios del desarrollo de la baya de uva.

## 8 BIBLIOGRAFIA

- Aguayo F, Ampuero D, Mandujano P, Parada R, Muñoz R, Gallart M, Altabella T, Cabrera R, Stange C, Handford M. (2013).** SORBITOL DEHYDROGENASE is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* **205-206:** 63-75
- Andersen, P., Brodbeck, B. (1989).** Chemical composition of xylem exudate from bleeding spurs of *Vitis rotundifolia* Noble and *Vitis* hybrid Suwannee in relation to pruning date. *American Journal of Enology and Viticulture*, **40(3)**, 155
- Aung L, Ramming D y Tarailo R. (2002).** Changes in moisture, dry matter and soluble sugars of dry-on-the-vine raisins special reference to sorbitol. *Journal of horticultural science & Biotechnology*, **77(1)**, 100-105
- Bellaloui N, Brown PH, Dandekar AM., (1999),** Manipulation of in vivo sorbitol production alters boron uptake and transport in tobacco, *Plant Physiol.* **119:** 735-742.
- Bieleski RL.** Sugar alcohols. En: Loewus FA, Tanner W, eds. *Plant carbohydrates. I. Intracellular carbohydrates*, Encyclopedia of plant physiology New series, Vol. 13A. Berlin 1982 Springer, 158-192.
- Blakley R.L., (1951),** The metabolism and antiketogenic effects of sorbitol. Sorbitol dehydrogenase, *Biochem J* **49:** 257-271
- Clark, A.J., Blissett, K.J., Oliver, R.P. (2003).** Investigating the role of polyols in *Cladosporium fulvum* during growth under hyper-osmotic stress and in planta. *Planta* **216**, 614-619.
- Davis, A. R., Levi, A., Kim, S., King, S. R., Hernandez, A. (2006).** RNA extraction method from fruit tissue high in water and sugar. *HortScience* **41(5)**, 1292-1294.
- Debolt, S., Cook, D. R., Ford, C. M. (2006).** L -Tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *PNAS* **103**, 5608-5613.
- Deluc, L. G., Grimplet, J., Wheatley, M. D., Tillett, R. L., Quilici, D. R., Osborne, C., y cols., (2007).** Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC genomics*, **8(1)**, 429
- Doehlert, D.C., 1987,** Ketose reductase activity in developing maize endosperm, *Plant Physiol.* **84:** 830-834.
- Eklund H., Horjales E., Jörnvall H., Brändén C., Jeffery J., 1985,** Molecular aspects of functional differences between alcohol and sorbitol dehydrogenases, *Biochemistry* **24:** 8005-8012.
- Estonius M., Danielsson O., Karlsson C., Persson H., Jörnvall H., Höög J.-O., 1993,** Distribution of alcohol and sorbitol dehydrogenases: assessment of mRNAs in rat tissues, *Eur. J. Biochem* **215:** 497-503.

- Everard, J. D., Gucci, R., Kann, S. C., Flore, J., Loescher, W. H. (1994). Gas Exchange and Carbon Partitioning in the Leaves of Celery (*Apium graveolens* L.) at Various Levels of Root Zone Salinity. *Plant physiology*, **106**(1), 281-292.
- Gabbay K.H., 1973, The sorbitol pathway and the complications of diabetes, *New Engl. J. Med.* **288**: 831–836.
- Gibeaut, Hulett, Cramer, Seeman. (1997). Maximal Biomass of *Arabidopsis thaliana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. *Plant Physiol.* **115**: 317-319.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K., Bohnert, H. J. (2000). PLANT CELLULAR AND MOLECULAR RESPONSES TO HIGH SALINITY. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**, 463-499.
- Hu, C. G., Honda, C., Kita, M., Zhang, Z., Tsuda, T., Moriguchi, T. (2002). A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. *Plant Molecular Biology Reporter*, **20** (1), 69-69
- Hu, L., Lu, H., Liu, Q., Chen, X., Jiang, X. (2005). Overexpression of mtlD gene in transgenic *Populus tomentosa* improves salt tolerance through accumulation of mannitol. *Tree physiology*, **25**(10), 1273-81.
- Hudina, M. y Stampar, F. (1998) Free sugar and sorbitol in pear (*pyrus communis* L.) CV. "Williams" during fruit development using different treatments. *Acta. Hort.* **514** ISHS 2000
- Johansson K., El-Ahmad M., Kaiser C., Jörnvall H., Eklund H., Höög J., Ramaswamy S., (2001), Crystal structure of sorbitol dehydrogenase. *Chemico-biological interactions.* **130–132**: 351–358.
- Kanamaru, N., Y. Ito, S. Komori, M. Saito, H. Kato, S. Takahashi, M. Omura, J. Soejima, K. Shiratake, K. Yamada and S. Yamaki. (2004). Transgenic apple transformed by sorbitol-6-phosphate dehydrogenase cDNA switch between sorbitol and sucrose supply due to its gene expression. *Plant Sci.* **167**:55–61.
- Kanayama Y, Mori H, Imaseki H y Yamaki S. (1992) Nucleotide Sequence of a cDNA Encoding NADP-Sorbitol-6-Phosphate Dehydrogenase from Apple. *Plant Physiol* **100**, 1607-1608
- Kanayama Y. (2009), Physiological roles of polyols in horticultural crops. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **78**: 158-168
- Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D.W., Zhao, W., Schiller, K.C., Gatzke, N., Sung, D.Y., y Guy, C.L. (2004) Exploring the Temperature-Stress Metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **136**:4159-4168.
- Kuo, T.M., Doehlert, D.C., Crawford, C.G., (1990), Sugar metabolism in germinating soybean seeds. Evidence for the sorbitol pathway in soybean axes, *Plant Physiol.* **93**: 1514–1520.
- Larkin PJ y Scowcroft WR (1981). Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* **60**: 197-214.



- Lehto, T., Raisanen, M., Lavola, A., Julkunen-Tiitto, R., Aphalo, P. J. (2004). Boron mobility in deciduous forest trees in relation to their polyols. *New Phytologist*, **163**(2), 333-339.
- Lewis D.H., Physiology and metabolism of alditols, En: Lewis D.H. (Ed.), *Storage Carbohydrates in Vascular Plants*, Cambridge University Press, Cambridge, 1984, pp. 157-179.
- Lindstad R, Koll P, McKinley-McKee J. (1998) Substrate specificity of sheep liver sorbitol dehydrogenase. *Biochem.J.* **330**: 479-487.
- Lo Bianco, R., Rieger, M., Sung, S.-J. S. (1999). Activities of sucrose and sorbitol metabolizing enzymes in vegetative sinks of peach and correlation with sink growth rate. *J. AMER. Soc. HORT. Sci.*, **124**(4), 381-388.
- Loescher WH., (1987), Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants, *Physiologia Plantarum* **70**: 553-557.
- Mandujano P (2008), Construcción y evaluación de vectores para sobre-expresar la sorbitol deshidrogenasa de tomate (LeSDH) en plantas. Seminario de Titulo, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Montgomery, J., Pollard, V., Deikman, J., Fischer, R. L. (1993). Positive and negative regulatory regions control the spatial distribution of polygalacturonase transcription in tomato fruit pericarp. *The Plant cell*, **5**(9), 1049-62
- Negm F.B. y Loesher W.H., (1979), Detection and characterization of sorbitol dehydrogenase from apple callus tissue, *Plant Physiol.* **64**: 69-73.
- Negm FB and Loescher WH., (1981), Characterization and partial purification of aldose-6-phosphate reductase (alditol-6-phosphate: NADP 1-oxidoreductase) from apple leaves. *Plant Physiol.* **67**: 139-142
- Noiraud, N. (2001). Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **39**(9), 717-728
- Nosarzewski M, Downie AB, Wu B and Archbold DD. (2012), The role of sorbitol dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology* **39**: 462-470.
- Ohta Kazuhiro, Moriguchi Ryo, Kanahama Koki, Yamaki Shohei, Kanayama Yoshinori, (2005), Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant, *Phytochemistry* **66**: 2822-2828.
- Orzaez, D., Mirabel, S., Wieland, W. H., Granell, A. (2006). Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiology*, **140**(1), 3.
- Oura, Y., Yamada, K., Shiratake, K., Yamaki, S., (2000), Purification and characterization of a NAD<sup>+</sup>-dependent sorbitol dehydrogenase from Japanese pear fruit, *Phytochemistry* **54**: 567-572.
- Pauly T., Ekstrom J., Beebe D., Chrnyk B., Cunningham D., Griffor M., Kamath A., Lee S., Madura R., Mcguire D., 2003, X-Ray Crystallographic and Kinetic Studies of Human Sorbitol Dehydrogenase, *Structure* **11**: 1071-1085.

- Pharr D.M., Stoop J.M.L., Williamson J.D., Feusi M.E.S., Massel M.O., Conkling M.A.** (1995), The dual role of mannitol as osmoprotectant and photoassimilate in celery, *Hort. Sci.* **30**: 1182–1188.
- Pommerrenig, B., Papini-Terzi, F. S., Sauer, N.** (2007). Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. *Plant physiol.*, **144**(2), 1029-38.
- Popp M., Smirnof N.**, Polyol accumulation and metabolism during water stress, En: Smirnof M. (Ed.), *Environment and Plant Metabolism. Flexibility and Acclimatation*, Bioscientific Publishers Ltd, Oxford, 1995, pp. 199–215
- Rejsková, A., Patková, L., Stodůlková, E., Lipavská, H.** (2007). The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions. *Plant physiol.* **164**(2), 174-84.
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R.** (2004). When Defense Pathways Collide. The Response of *Arabidopsis* to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiology* **134**: 1683–1696.
- Roessner-Tunali, U., Bjorn, H., Lytovchenko, A., Carrari, F., Bruediagam, C., Granot, D., Fernie, A.R.** (2003). Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpression hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiol.* **133**, 84–99.
- Roubelakis-Angelakis, K. A., Kliewer, W. M.** (1979). The composition of bleeding sap from Thompson Seedless grapevines as affected by nitrogen fertilization. *American Journal of Enology and Viticulture*, **30**(1), 14.
- Shen, B., Jensen, R. G., Bohnert, H. J.** (1997). Mannitol Protects against Oxidation by Hydroxyl Radicals. *Plant physiol.* **115**(2), 527-532.
- Slewinski, T. L., y Braun, D. M.** (2010). Current perspectives on the regulation of whole-plant carbohydrate partitioning. *Plant Science*, **178**(4), 341-349
- Smirnof, N., Cumbes, Q. J.** (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, **28**(4), 1057–1060.
- Stoop J.M.H., Pharr D.M.**, (1994), Mannitol metabolism in celery stressed by excess macronutrients, *Plant Physiol.* **106**: 503–511.
- Stoop J.M.H., Williamson J.D., Pharr D.M.**, (1996), Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress, *Trends Plant Sci.* **1**:139–144.
- Swanson CA, Elshishiny EDH** (1958) Translocation of sugars in the Concord grape. *Plant Physiol* **33**: 33-37
- Tang Y.**, (2011), Construcción y verificación de vectores para sobre expresar VvSDH1, una posible sorbitol deshidrogenasa de *Vitis vinifera* (vid), Seminario de Título, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

**Tao, R., S. L. Uratsu and A. M. Dandekar.** 1995. Sorbitol synthesis in transgenic tobacco with apple cDNA encoding NADPdependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant Cell Physiol.* **36**: 525–532.

**Teo, G., Suzuki, Y., Uratsu, S. L., Lampinen, B., Ormonde, N., Hu, W. K., Dejong, T.M., Dandekar, A.M.,** (2006). Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(49), 18842-7.

**Verwoerd, T. C., Dekker, B. M. M., Hoekema, A.** (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Research*, **17**(6), 2362

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

**Wanek, W., Richter, A.,** (1993), -IDITOL:NAD-oxidoreductase in *Viscum album*: utilization of host-derived sorbitol, *Plant Physiol. Biochem.* **31**: 205–211.

**Yamada, K., Oura, Y., Mori, H., Yamaki, S.,** (1998), Cloning of NADdependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit and gene expression, *Plant Cell Physiol.* **39**: 1375–1379.

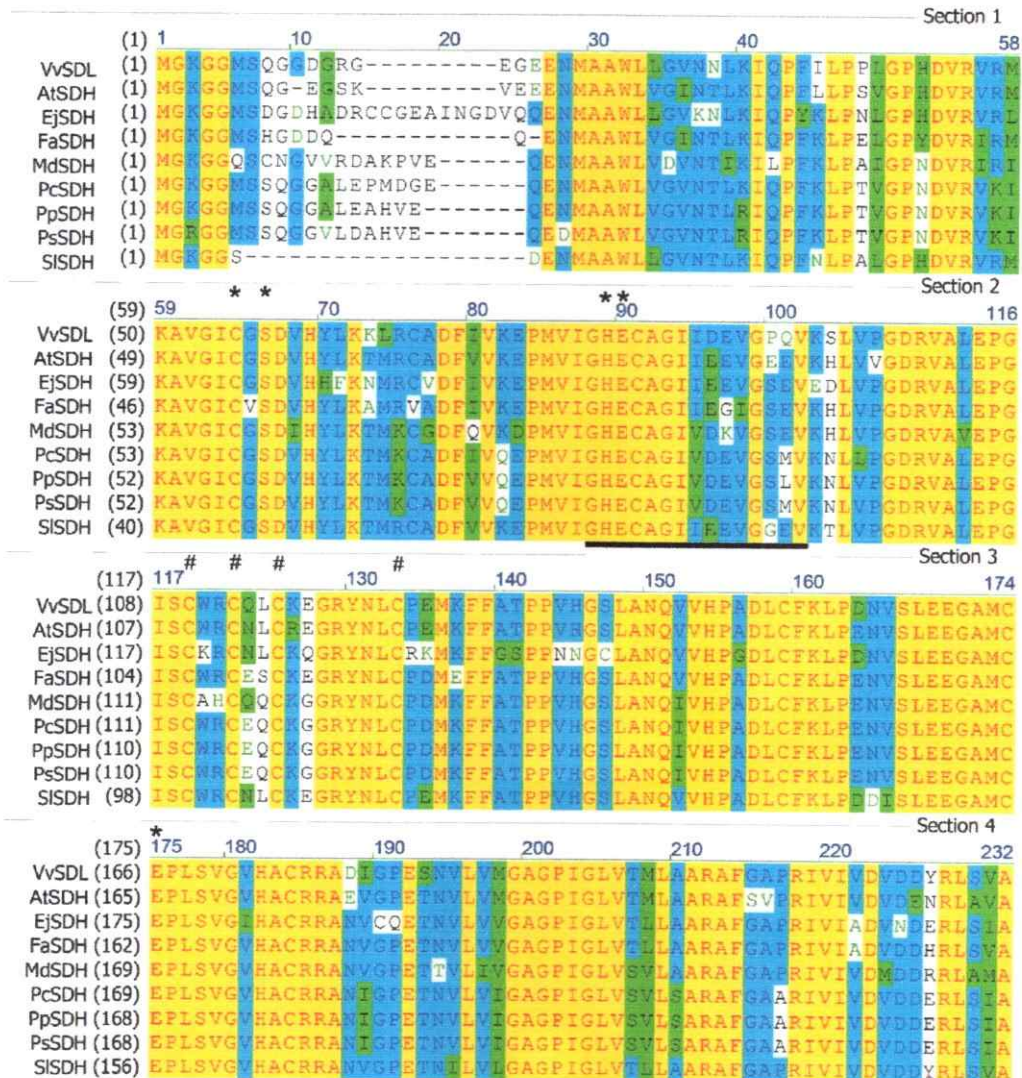
**Yamaguchi, H., Kanayama, Y., Yamaki, S.** (1994). Purification and properties of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit. *Plant and cell physiology*, **35**(6), 887.

**Zamboni, A., Minoia, L., Ferrarini, A., Tornielli, G. B., Zago, E., Delledonne, M., y cols.,** (2008). Molecular analysis of post-harvest withering in grape by AFLP transcriptional profiling. *Journal of experimental botany*, **59**(15), 4145

**Ying HC.,** SRI international, 1998, <http://pmn.plantcyc.org/GRAPE/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=LARABITOLUTIL-PWY>

## ANEXO I

Alineamiento completo de SDH de especies vegetales conocidas: SDH de Arabidopsis (AtSDH, NP\_200010.1), níspero (EjSDH, BAA95897), frutilla (FaSDH, BAF75466.1), una isoforma de manzana (MdSDH, AAW33814.1), cerezo (PcSDH, AAK71492.1), durazno (PpSDH, BAA94084), ciruelo (PsSDH, ACL18054), tomate (SISDH, BAE47038.1) y vid (VvSDL). En amarillo se muestran aminoácidos idénticos. En celeste cambios conservativos, en verde bloques de similitud, y en fondo blanco baja similitud. Los asteriscos (\*) indican sitios de unión a zinc, el signo numeral (#) indica los sitios catalíticos de unión a zinc mientras que los aminoácidos subrayados indican un sitio conservado para alcoholes deshidrogenasas dependientes de zinc. En el rectángulo rojo se indica la glicina 326.



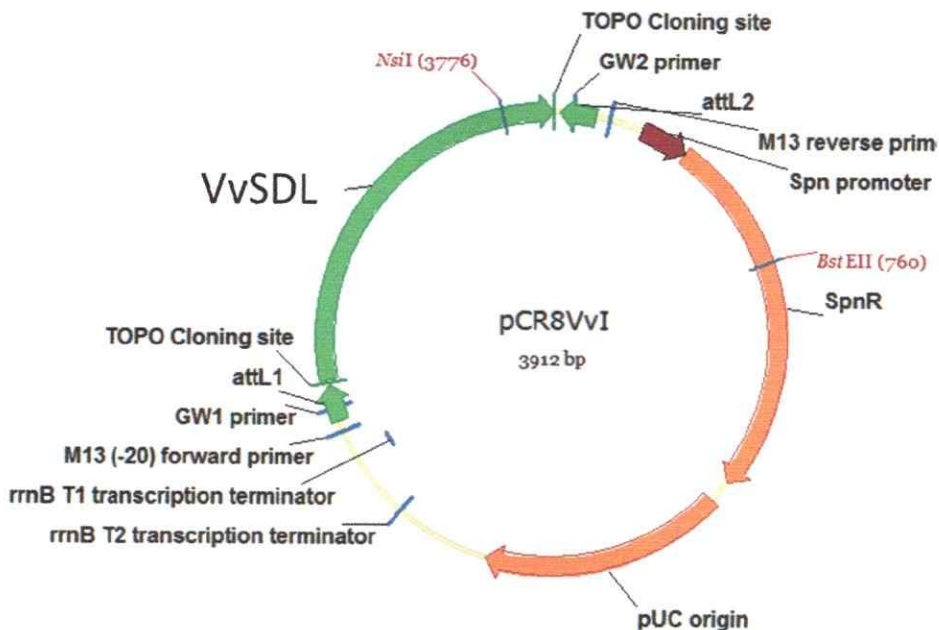


										Section 5		
(233)	233	240	250	260	270	280	290					
VvSDL (224)	KDLGAD	EVVSTN	IQDVAEEV	VQIHKAMGAR	RVVDS	FDCAGFD	DKTMS	TALSAT	STGGK			
AtSDH (223)	KQLGAD	EVQVTN	IEDVGE	VEVQIQKAMGS	NIIDVT	FDCAGFN	KTMST	ALAAAT	RCGGK			
EjSDH (233)	KSLGAD	EVVKVSTN	IEDIAEEV	VTIQKVL	ENGVD	VSFDCAGF	DKTIT	TALSAT	RPGGK			
FaSDH (220)	KILGAD	EVVSTN	IQDVAEEV	VQIRKAMGAR	RVVDS	FDCAGFD	DKTMS	TALRAT	RPGGK			
MdSDH (227)	KSLGAD	GTWVST	KMEDLD	EEVAKI	KEAMG	SEVDVT	FDCVGF	NKTMST	GLNAT	RPGGK		
PcSDH (227)	KSLGAD	ISVKVSTN	PCDLENE	VSKI	SKAMR	GGVD	VSFDCV	GFNKTM	TALSAT	RPGGK		
PpSDH (226)	KSLGAD	IAVKVSTN	PCDLENE	VSKI	SKAMK	GGVD	VSFDCV	GFNKTM	TALSAT	RPGGK		
PsSDH (226)	KSLGAD	IVVKVSTN	PCDLEAE	VSKI	GKAMK	GGVD	VSFDCV	GFNKTM	TALSAT	RPGGK		
SISDH (214)	KKLGAD	IVKVS	INIQDVA	TDIENI	QKAMG	GGIDAS	FDCAGF	NKTMST	TALGAT	RPGGK		
										Section 6		
(291)	291	300	310	320	330	340						
VvSDL (282)	VCLVGM	GHNEM	TVPLT	PAAARE	VDVVG	FRYKNT	WPLCL	EFLR	SGKID	VKPLI	THRFG	
AtSDH (281)	VCLVGM	GHGIM	TVPLT	PAAARE	VDVVG	FRYKNT	WPLCL	EFLT	SGKID	VKPLI	THRFG	
EjSDH (291)	VCLVGM	QREMT	LPLATR	---	EIDV	IGIFRY	QNTW	PLCLE	EFLR	SGKID	VKPLI	THRFG
FaSDH (278)	VCLVGM	GHGDM	ATLPL	TSASARE	VDVVG	IFRYKNT	WPLCL	EFLR	SGKID	VKPLI	THRFG	
MdSDH (285)	VCLVGM	GHGVM	TVPLT	PAAARE	VDVVG	FRYKNT	WPLCL	EFLR	SGKID	VKPLI	THRFG	
PcSDH (285)	VCLVGM	GHGVM	TVPLT	PAAARE	VDVVG	IFRYKNT	WPLCL	EFLR	SGKID	VKPLI	THRFG	
PpSDH (284)	VCLVGM	GHGVM	TVPLT	PAAARE	VDVVG	IFRYKNT	WPLCL	EFLR	SGKID	VKPLI	THRFG	
PsSDH (284)	VCLVGM	GHGVM	TVPLT	PAAARE	VDVVG	IFRYKNT	WPLCL	EFLR	SGKID	VKPLI	THRFG	
SISDH (272)	VCLVGM	GHHEM	TVPLT	PAAARE	VDVVG	IFRYKNT	WPLCL	EFLR	SGKID	VKPLI	THRFG	
										Section 7		
(349)	349	360	374									
VvSDL (340)	FSQKEVEE	AFET	SARGG	TAIKVM	FNL							
AtSDH (339)	FSQKEVEE	AFET	SARGS	NAIKVM	FNL							
EjSDH (346)	FSQKEVEE	AFET	SARGG	NAIKVM	FNL							
FaSDH (336)	FSQKEVEE	AFAT	SACGG	NAIKVM	FNL							
MdSDH (343)	FTI	KEVEE	AFAT	SARGG	NAIKVM	FNL						
PcSDH (343)	FTI	KEIEE	AFET	SARGG	NAIKVM	FNL						
PpSDH (342)	FSQKEIEE	AFET	SARGG	NAIKVM	FNL							
PsSDH (342)	FSQKEIEE	AFET	SARGG	NAIKVM	FNL							
SISDH (330)	FSQEEVEE	AFET	SARGG	DAIKVM	FNL							

## ANEXO II

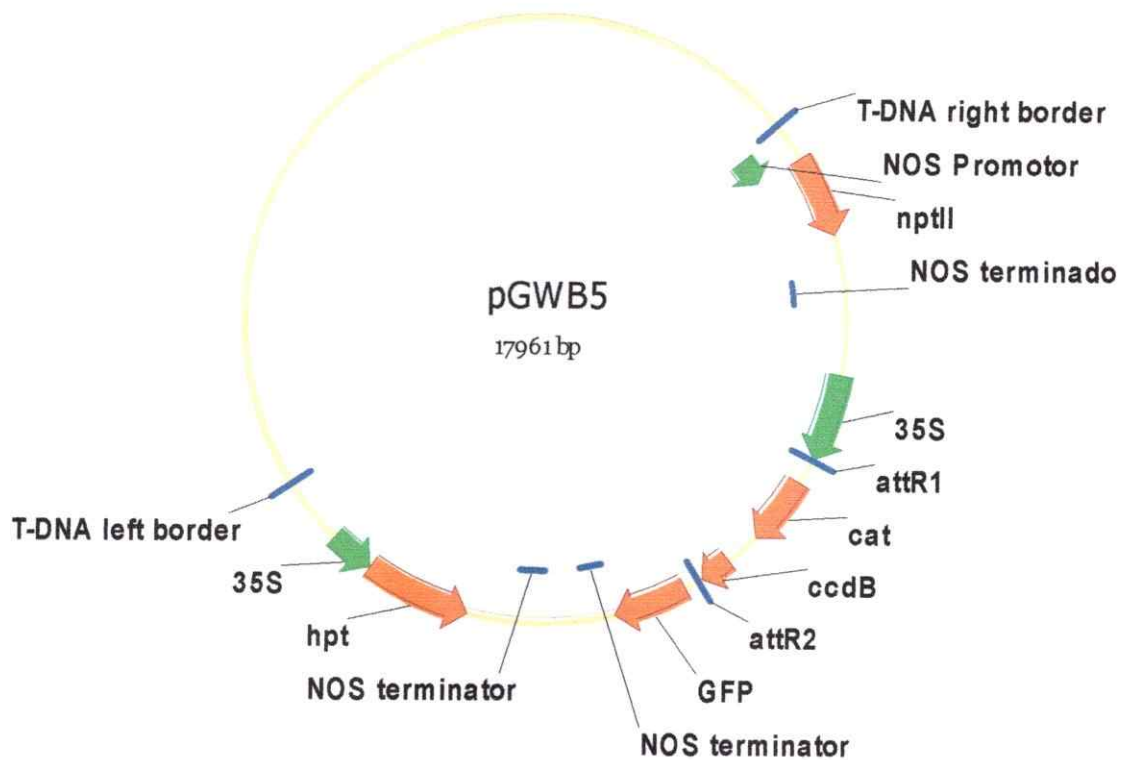
Esquema de los vectores construidos durante el desarrollo de la tesis:

A) Esquema de PCR8-VvSDL: el CDS de VvSDL se inserta entre los sitios de clonación mediante la topoisomerasa (marcados como TOPO cloning site en el esquema)



Se realizaron 4 construcciones en pCR8: pCR8A: Marco lectura sin Stop, pCR8B: Marco lectura con Stop, pCR8C: marco de lectura flanqueado por enzimas *Bam*HI *Hind*III con stop, pCR8D: marco de lectura flanqueado por enzimas *Bam*HI *Hind*III sin stop

B) Esquema PGWB5: El vector posee un sitio de recombinación mediante tecnología Gateway (*attR1* y *attR2*) donde se insertará el CDS de *VvSDL*, como se puede ver en la figura luego de *attR2* el vector posee la secuencia GFP lo que generará una proteína de fusión la cual se expresara bajo el promotor constitutivo 35S



C) Esquema pET28a-VvSDL-HIS: El vector construido mediante corte y ligación utilizando las enzimas BamHI y HindIII. El vector posee un promotor inducible por IPTG (T7) y genera una proteína de fusión amino terminal con un tag HIS para posteriores purificaciones.

