



**Caracterización bioquímica de las enzimas
recombinantes aldosa-6-fosfato reductasas
(NADPH) AtA6PR1 y 2, de *Arabidopsis
thaliana*.**

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

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

Por

Karina Vanessa Olivos Hernández

Julio, 2020

Director de Tesis: Dr. Michael Handford

Co- Director de Tesis: Dr. Ricardo Cabrera



INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

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

KARINA VANESSA OLIVOS HERNÁNDEZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día _____

Director de Tesis:

Dr. Michael Handford.

Co-Director de Tesis:

Dr. Ricardo Cabrera

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Victoria Guixé

Dra. Lee Meisel

BIOGRAFÍA



Nací un 24 de marzo de 1992 en Buin, mi infancia se desarrolló en una localidad llamada Vínculo, comuna de Paine, donde viví con mis padres y mi hermana mayor. En el colegio nos destacábamos por nuestras buenas notas y por participar en los grupos de danza. La enseñanza media la realizamos en Santiago, en el Internado Nacional Femenino Carmela Silva Donoso, sin embargo, al segundo año de mis estudios nos cambiamos de ciudad y nos fuimos a Parral, ubicada en la VII región, donde terminé mi enseñanza media.

Fue allá donde comenzó a interesarme el área de la biología, y al momento de escoger una carrera me incliné por Biotecnología en la Universidad de Chile, entré a la carrera y con los ramos de Botánica y prácticos de células vegetales de biología celular me di cuenta que me gustaban mucho las plantas, por lo que decidí hacer mi Seminario de Título en esa área, antes de entrar a un laboratorio de “plantas” hice una pasantía en el laboratorio de Inmunología de la Dra. Bono, pero me di cuenta que no era lo mío. Finalmente entré al Centro de Biología Molecular Vegetal bajo la tutela del Dr. Handford en el año 2013, primero haciendo una pasantía, a lo que siguió una Unidad de Investigación, el desarrollo de mi Seminario de Título y finalmente mi Tesis de Magíster.

AGRADECIMIENTOS

...Agradecer en primer lugar a mi familia por su incondicional apoyo...

...A mi tutor de Tesis, Dr. Michael Handford, primero por haberme aceptado en su laboratorio como pasante en 2013, permitirme desarrollar mi Seminario de Título y posteriormente mi tesis de Magister, gracias por su apoyo y guía durante todo este tiempo y proceso...

...A mis compañeros de lab, por hacer de este lugar un espacio agradable para trabajar, en especial a mi Team MH, Maripi y Pame, que me apoyaron, ayudaron y contribuyeron de alguna manera en el desarrollo de esta tesis y me dieron ánimos cada vez que lo necesitaba...

...A todos los integrantes del Centro de Biología Molecular Vegetal, que durante los seminarios, me daban su opinión/comentarios/preguntas que me permitieron desarrollar un mejor pensamiento crítico...

...Al laboratorio del Dr. Ricardo Cabrera, por su ayuda en experimentos, guiarme en procesar la información y por esas reuniones que siempre ayudaban a despejar dudas...

...A mi pareja, Ignacio, por darme ánimos, consejos, cada vez que los necesitaba. Gracias por estar siempre ahí...

...Gracias a mi, por no rendirme, a pesar de todo...

ÍNDICE

LISTADO DE TABLAS	VIII
LISTADO DE FIGURAS	IX
LISTADO DE ECUACIONES.....	XI
ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XVII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 POLIOLES EN PLANTAS.....	1
1.2 FUNCIÓN DE LOS POLIOLES	2
1.3 ALDOSA 6-FOSFATO REDUCTASA.....	4
1.4 ALDOSA 6-FOSFATO REDUCTASA EN ROSÁCEAS.....	6
1.5 ALDOSA 6-FOSFATO REDUCTASA EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> , UNA ESPECIE NO-ROSACEAE.....	7
1.6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	11
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 OBJETIVO GENERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3.2.1 <i>Establecer un sistema de expresión de las proteínas recombinantes AtA6PR1 y AtA6PR2 desde E. coli.</i>	15
3.2.2 <i>Determinar los parámetros cinéticos de las enzimas recombinantes AtA6PR1 y AtA6PR2.</i>	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	16
4.1.1 <i>Optimización de codones</i>	16

4.1.2	<i>Síntesis de genes optimizados</i>	16
4.1.3	<i>Diseño de partidores y programas de PCR</i>	16
4.2	MATERIAL BIOLÓGICO.....	19
4.2.1	<i>Cepas y crecimiento bacteriano</i>	19
4.2.2	<i>Preparación de Escherichia coli quimio competente</i>	19
4.3	OBTENCIÓN Y VERIFICACIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN	20
4.3.1	<i>Purificación de plásmidos</i>	20
4.3.2	<i>Vectores utilizados</i>	20
4.3.3	<i>Clonación de AtA6PR1 y AtA6PR2 en el vector pCR8</i>	21
4.3.4	<i>Transformación bacteriana</i>	22
4.3.5	<i>Secuenciación</i>	23
4.3.6	<i>Recombinación de vectores</i>	23
4.3.7	<i>Análisis molecular de vectores mediante digestión enzimática y PCR</i>	24
4.4	EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	24
4.4.1	<i>Extracción de RNA de E. coli</i>	25
4.5	GENERACIÓN DE cDNA	25
4.5.1	<i>Tratamiento con DNasaI</i>	25
4.5.2	<i>RT-PCR</i>	25
4.6	CUANTIFICACIÓN Y CORROBORACIÓN DE INTEGRIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	26
4.6.1	<i>Cuantificación</i>	26
4.6.2	<i>Determinación de la calidad e integridad de ácidos nucleicos</i>	26
4.7	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	27
4.7.1	<i>Determinación de condiciones de inducción</i>	27
4.7.2	<i>Extracción de proteínas totales</i>	28
4.7.3	<i>Purificación de proteínas</i>	29
4.8	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	29
4.8.1	<i>Cuantificación de proteínas</i>	29
4.8.2	<i>Geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes SDS-PAGE</i>	30
4.8.3	<i>Western blot anti-histidina</i>	31

4.9 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS	32
4.9.1 Curva de absorbancia de NADPH.....	32
4.9.2 Medición de actividad enzimática y estimación de parámetros cinéticos	32
5. RESULTADOS.....	34
5.1 OPTIMIZACIÓN DE SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DE ATA6PR1 Y ATA6PR2	34
5.2 OBTENCIÓN DE VECTORES DE ENTRADA PCR8-ATA6PR1 Y PCR8-ATA6PR2	35
5.2.1 Clonación de <i>AtA6PR1</i> y <i>AtA6PR2</i> en vector de entrada <i>pCR8</i>	35
5.2.2 Transformación de <i>E. coli</i> con <i>pCR8-AtA6PR1</i> y 2 y verificación por PCR..	36
5.3 GENERACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS VECTORES DE DESTINACIÓN.	39
5.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA A PARTIR DE <i>E. COLI</i> BL21 (DE3) pLYSS TRANSFORMADAS CON VECTORES DE INTERÉS MEDIANTE RETROTRANSCRIPCIÓN (RT- PCR).....	42
5.5 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	44
5.5.1 Optimización y extracción de proteínas mediante sonicación.....	44
5.5.2 Optimización y extracción de proteínas mediante reactivo B-PER.....	46
5.5.3 Purificación de proteínas	50
5.6 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	56
5.6.1 Ensayo de actividad con proteína comercial pura <i>A6PR</i> de humano	56
5.6.2 Ensayo con extractos crudos y fracción soluble de <i>His-MdA6PR</i> y <i>E. coli</i> BL21 (DE3) <i>pLysS</i>	58
5.6.3 Ensayo con extractos crudos de <i>His-AtA6PR1</i> y 2 y <i>HisMBP-AtA6PR1</i> y 2..	61
5.6.4 Ensayo con proteína purificada <i>His-AtA6PR1</i> y 2 y <i>HisMBP-AtA6PR1</i> y 2..	64
6. DISCUSIÓN.....	67
6.1 OPTIMIZACIÓN DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE ATA6PR1 Y ATA6PR2	67
6.2 OBTENCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN.....	68
6.3 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	69
6.4 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y ENSAYOS DE ACTIVIDAD	71

7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....	75
8. REFERENCIAS	77

LISTADO DE TABLAS

Tabla I: Partidores utilizados durante el desarrollo de Tesis	17
Tabla II: Combinación de partidores usada para la amplificación de DNA por PCR.....	17
Tabla III: Programas de PCR utilizados.....	18
Tabla IV: Optimización de condiciones sonicación	28
Tabla V: Cuantificación de DNA de purificaciones por banda y producto de PCR.....	36
Tabla VI: Actividad específica de A6PR comercial	58
Tabla VII: Actividad específica de HisMBP-AtA6PR1	66

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo del sorbitol.....	2
Figura 2: Modelo monomérico de la proteína A6PR.....	6
Figura 3: Niveles de transcrito de <i>AtA6PR1</i> (At2g21250) y <i>AtA6PR2</i> (At2g21260) en <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
Figura 4: Niveles de transcrito relativos de <i>AtA6PR1</i> y <i>AtA6PR2</i> en diferentes tejidos de <i>A. thaliana</i> sometidos a estrés abiótico.....	10
Figura 5: Expresión del dominio F2 recombinante de EBA-175 de <i>P. falciparum</i> en <i>P. pastoris</i>	12
Figura 6: Apariencia de hojas de tabaco expuestas a tratamiento con larvas de <i>Helicoverpa armigera</i>	14
Figura 7: Porcentaje de identidad entre las secuencias nucleotídicas nativas y optimizadas de <i>AtA6PR1</i> y <i>AtA6PR2</i>	34
Figura 8: PCR de pUC57 portadores de los genes <i>AtA6PR1</i> y <i>AtA6PR2</i> optimizados.....	35
Figura 9: PCR de mini preparaciones de <i>E. coli</i> transformadas con pCR8- <i>AtA6PR1</i> y pCR8- <i>AtA6PR2</i>	37
Figura 10: Digestión enzimática de las mini preparaciones de <i>E. coli</i> transformadas con pCR8- <i>AtA6PR1</i> y pCR8- <i>AtA6PR2</i>	38
Figura 11: PCR de colonia de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con pDEST-HisMBP- <i>AtA6PR1</i> y 2 y pDEST17- <i>AtA6PR1</i> y 2.....	40
Figura 12: Digestión enzimática de las minipreparaciones de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con pDEST-HisMBP- <i>AtA6PR1</i> y 2 (A) y pDEST17- <i>AtA6PR1</i> y 2 (B).....	41
Figura 13: PCR de colonia de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS transformadas con pDEST-HisMBP- <i>AtA6PR1</i> y 2 y pDEST17- <i>AtA6PR1</i> y 2.....	42
Figura 14: RT-PCR de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS transformadas con los vectores de expresión.....	43
Figura 15: Optimización de extracción de proteínas obtenidas por sonicación.....	44
Figura 16: SDS-PAGE y Western blot de proteínas obtenidas por sonicación.....	45

Figura 17: Optimización de condiciones para expresar AtA6PR1 recombinante a partir de pDEST17-AtA6PR1 y pDEST-HisMBP-AtA6PR1.	47
Figura 18: SDS-PAGE y Western blot utilizando los constructos pDEST17-AtA6PR1 y 2 y pDEST-HisMBP-AtA6PR1 y 2.	48
Figura 19: SDS-PAGE y Western blot de proteínas del pellet de bacterias transformadas con pDEST17-AtA6PR1 y pDEST-HisMBP-AtA6PR1.	49
Figura 20: Equipo de purificación de proteínas, Äktaprime plus.	51
Figura 21: Correlación entre la cuantificación de proteínas de las fracciones purificadas y cromatograma de absorbancia.	52
Figura 22: SDS-PAGE y Western blot de 4 fracciones de proteínas purificadas usando pDEST-HisMBP-AtA6PR1.	53
Figura 23: SDS-PAGE y Western blot de las proteínas de fusión purificadas His-AtA6PR1.	54
Figura 24: SDS-PAGE y Western blot de las proteínas de fusión purificadas His-AtA6PR1, His-AtA6PR2, HisMBP-AtA6PR1 y HisMBP-AtA6PR2.	55
Figura 25: Ensayo de actividad de A6PR comercial.	57
Figura 26: Ensayo de actividad de extractos crudos y fracción soluble de His-MdA6PR y BL21 (DE3) pLysS obtenidas mediante sonicación.	59
Figura 27: Ensayo de actividad de extractos crudos y fracción soluble de His-MdA6PR y BL21 (DE3) pLysS obtenidas mediante B-PER.	61
Figura 28: Ensayo de actividad de extractos crudos y fracción soluble de His-AtA6PR1 y 2, y HisMBP-AtA6PR1 y 2.	63
Figura 29: Ensayo de actividad de proteínas purificadas HisMBP-AtA6PR1.	65

LISTADO DE ECUACIONES

Ecuación 1: Actividad específica.....	33
--	----

ABREVIATURAS

% v/v	porcentaje volumen/volumen
%p/v	porcentaje peso/volumen
°C	grados Celsius
6X-His	6 hexa histidina
A6PR	aldosa 6-fosfato reductasa
AKR	familia de las Aldo ceto reductasa
APS	amonio persulfato
AtA6PR1	aldosa 6-fosfato reductasa 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtA6PR2	aldosa 6-fosfato reductasa 2 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adenosin tri fosfato
<i>attR1-attR2</i>	sitios de recombinación
B-PER™	agente de extracción de proteínas bacterianas
BCIP	5-bromo-4cloro-3'indolifosfato p-toluidina
CaCl ₂	cloruro de calcio
cDNA	ácido desoxiribonucleico complementario
CDS	marco abierto de lectura
Ce	concentración de enzima
CHO	grupo aldehído
Cmr ^R	resistencia a cloranfenicol
CO	grupo cetona
D.O.	densidad óptica
DEPC	pirocarbonato de dietilo
dNTP	desoxinucleosido trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FVIIIHC	cadena pesada del factor VIII de coagulación humano
g	Gramo
G6P	glucosa 6-fosfato
GFP	proteína fluorescente verde
h	Horas
IP6	inositol hexafosfato

IPTG	isopropil b-D-1-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase
kDa	kilo Dalton
l	Largo
LB	medio Luria-Bertani
MgCl ₂	cloruro de magnesio
Min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N ₂	Nitrógeno
NaCl	cloruro de sodio
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	forma reducida de Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	nitro azul cloruro de tetrazolio
ng	nanogramo
OH	grupo hidroxilo
Pb	pares de base
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
qRT-PCR	PCR cuantitativo en tiempo real
RBS	sitio de unión al ribosoma
RNA	ácido ribonucleico
RNA ^t	ácido ribonucleico de transferencia
RT-PCR	PCR de transcripción reversa
s	segundos
S6P	sorbitol 6-fosfato
S6PP	sorbitol 6-fosfato fosfatasa
SDH	sorbitol deshidrogenasa
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes
TBS	búffer Tris salino
TBS-T	búffer Tris salino-tween 20
TEMED	tetrametiletildiamina

V	volumen
V _e	volumen de enzima
VP1	proteína de la capsída viral
WT	wild type o silvestre
μl	microlitro

RESUMEN

Las plantas de la familia Rosaceae producen sorbitol durante la fotosíntesis. Este es un alcohol de azúcar sintetizado por la aldosa 6-fosfato reductasa (A6PR) a partir de glucosa 6-fosfato en conjunto con la oxidación de NADPH, y luego translocado por el floema hacia órganos sumideros para ser oxidado a fructosa por la sorbitol deshidrogenasa (SDH), la cual posteriormente es almacenada o utilizada. Sin embargo, se ha reportado que plantas que no pertenecen a la familia Rosaceae y que translocan sacarosa como principal fotosintato poseen enzimas que metabolizan sorbitol. Es el caso de *Arabidopsis thaliana*, planta herbácea de la familia de las Brassicaceae, que posee las enzimas SDH y A6PR. Esta última, correspondería a la enzima clave de la ruta de síntesis de sorbitol, y se ha encontrado que en *Arabidopsis* existen 2 marcos de lectura que codifican proteínas con una identidad aminoacídica de > 65% con A6PR conocidas. Ambas proteínas, denominadas AtA6PR1 y AtA6PR2, poseen las características moleculares de proteínas clasificadas dentro de la familia de las aldo-ceto reductasas. Ambos genes se expresan ubicuamente en toda la planta, donde *AtA6PR1* se expresa aproximadamente unas 100 veces más que *AtA6PR2*, y responden diferencialmente frente a estrés abiótico (frío o salinidad). Por otro lado, se ha estudiado la localización subcelular de ambas proteínas (proteína fusionada a GFP), siendo estas citosólicas. Sin embargo, no se ha determinado la actividad enzimática de ambas reductasas.

En esta Tesis de Magíster, se optimizó la secuencia génica de *AtA6PR1* y *AtA6PR2* para su expresión en el organismo heterólogo *Escherichia coli*, y se construyó y comprobó la funcionalidad de dos vectores de expresión (pDEST17 y pDEST-HisMBP) portadores de los genes vegetales optimizados. Adicionalmente, se realizó una primera aproximación a

la caracterización enzimática de ambas proteínas, obteniendo una actividad enzimática parcial para HisMBP-AtA6PR1, sugiriendo que efectivamente es capaz de reducir glucosa 6-fosfato en presencia de NADPH.

ABSTRACT

Plants in the Rosaceae family produce sorbitol during photosynthesis. This is a sugar alcohol synthesised by aldose 6-phosphate reductase (A6PR) from glucose 6-phosphate combined with the oxidation of NADPH, which is then translocated by the phloem to sink organs to be transformed into fructose by sorbitol dehydrogenase (SDH), which is stored or used. However, it has been reported that plants that do not belong to this family and that translocate sucrose as the main photosynthate possess enzymes that metabolise sorbitol. This is the case of *Arabidopsis thaliana*, a herbaceous plant of the Brassicaceae family, which has the enzymes SDH and A6PR. The latter corresponds to the key enzyme of sorbitol synthesis, and in *Arabidopsis*, there are 2 open reading frames encoding proteins with >65% amino acid identity with known A6PR. Both proteins, called AtA6PR1 and AtA6PR2, possess the molecular characteristics of proteins classified within the aldo-keto reductase family. Both genes are ubiquitously expressed throughout the plant, where *AtA6PR1* is expressed approximately 100 times more than *AtA6PR2*, and they respond differentially to abiotic stress (cold or saline). Moreover, the subcellular localisation of both proteins (protein fused to GFP) has been studied; both are cytosolic. However, the enzymatic activities of both proteins have not been determined to date.

In this Master's thesis, the gene sequences of *AtA6PR1* and *AtA6PR2* were optimised for expression in the heterologous organism *Escherichia coli*, and the functionality of two expression vectors (pDEST17 and pDEST-HisMBP) carrying the optimised plant genes was tested. In addition, both proteins were partially characterised enzymatically, suggesting that HisMBP-AtA6PR1 is indeed capable of reducing glucose 6-phosphate in the presence of NADPH.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Polioles en plantas

El proceso de la fotosíntesis ha sido ampliamente estudiado en plantas superiores. Durante éste, el principal compuesto generado en los órganos fuente (hojas) es la sacarosa, sin embargo, en algunas especies vegetales los principales compuestos son alcoholes de azúcares o polioles, productos reducidos de azúcares donde el grupo carbonilo se ha reducido a un alcohol. Ejemplos de los polioles son el manitol, forma reducida de la manosa, galactitol, forma reducida de la galactosa y el sorbitol o glucitol, producto reducido de la glucosa (Lewis y Smith, 1967), mientras que en órganos sumideros como las raíces o frutos, estos polioles son oxidados a azúcares solubles, como glucosa o fructosa.

En el caso del sorbitol, su síntesis en las hojas involucra la reducción de la glucosa-6-fosfato (G6P) acoplado a la oxidación de NADPH por la acción de aldosa-6-fosfato reductasa (NADPH) (A6PR; EC 1.1.1.200), generando sorbitol-6-fosfato (S6P). Luego, S6P es desfosforilado por la acción de la sorbitol fosfatasa (S6PP, EC 3.1.3.50) produciendo sorbitol, el cual finalmente es translocado a través del floema hacia los órganos sumideros, en donde, por acción de la sorbitol deshidrogenasa (SDH; EC 1.1.1.14), es oxidado a fructosa para su uso o almacenaje (Figura 1; Loescher, 1987; Beruter y cols., 1997).

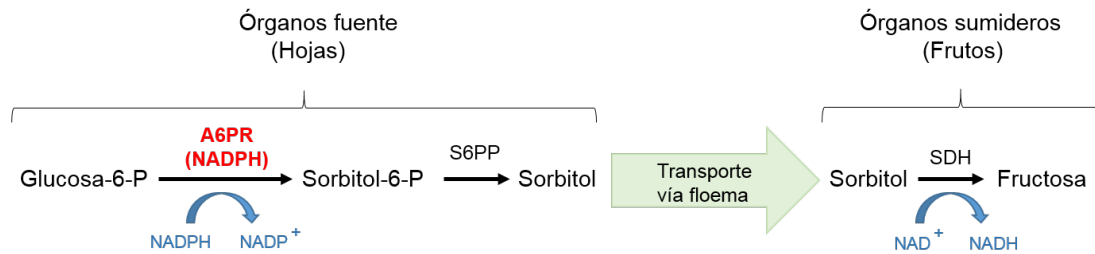


Figura 1: Metabolismo del sorbitol. Vía de síntesis (Órganos fuentes) y degradación (Órganos sumideros) de sorbitol en plantas. Enzimas que participan en la ruta: A6PR (NADPH), aldosa 6-fosfato reductasa; S6PP, sorbitol 6-fosfato fosfatasa; SDH, sorbitol deshidrogenasa.

1.2 Función de los polioles

Los polioles se pueden clasificar en 2 grupos: alditoles e inositoles. Los alditoles presentan una cadena lineal de átomos de carbono y se generan cuando un grupo aldehído (CHO) o cetona (CO) de un azúcar, es reducido a un grupo alcohol (OH). Entre estos, los más comunes en plantas son el sorbitol, manitol, y galactitol. Por otro lado, los inositoles son polioles cíclicos de seis átomos de carbono, presentes tanto en animales como en plantas. En estas últimas, el inositol hexafosfato, también llamado ácido fítico, es la principal forma para almacenar fósforo en semillas y en la capa externa de los granos de cereal (Munnik y Vermeer, 2010; Gerke, 2015).

Las principales funciones de los polioles en plantas son:

- 1.- Ser solutos compatibles, es decir, se puede acumular una gran concentración de polioles dentro de la célula (citoplasma) sin afectar las funciones biológicas de ésta ni dañar a las propias células (Stoop y cols., 1996).

- 2.- Ser reservorios de poder reductor, ya que al ser oxidados se producen moléculas de NADH, que resultan en la producción de ATP en la célula, mientras que en la oxidación de sacarosa o rafinosa se requiere de ATP (Stoop y cols., 1996; Pharr y cols, 1995).
- 3.- Protegen contra radicales hidroxilo, ya que tienen la capacidad de neutralizarlos (Smirnoff y Cumbers, 1989; Shen y cols., 1997).
- 4.- Confieren tolerancia frente a estrés biótico y abiótico. Producto de las funciones mencionadas anteriormente, se ha sugerido que plantas atacadas por patógenos responden aumentando la capacidad de síntesis de polioles, confiriendo un aumento en fuentes de carbono y energía para la respuesta de defensa (Williamson y cols, 1995). Mientras que, en el caso del estrés abiótico, estos polioles funcionan como osmoprotectores, ya que sus grupos hidroxilo pueden formar una esfera de hidratación alrededor de macromoléculas, evitando inhibir reacciones metabólicas y manteniendo actividades enzimáticas, ya que pueden reducir el efecto inhibitorio de iones sobre la actividad enzimática (Galinski y Truper, 1994; Pommerrenig y cols., 2007; Hasegawa y cols., 2000).
- 5.- Forman complejos con el boro del tipo poli-ol-borato-poli-ol, el cual es traslocado por el floema de la planta redistribuyéndolo, ya que el boro es un micronutriente considerado inmóvil y muy importante para las plantas en varias etapas de su crecimiento y desarrollo. Por ejemplo, este es requerido para la síntesis de la pared celular en conjunto con el calcio, o durante la división celular (Bellaloui y cols., 1999; Lehto y cols., 2004; Brown y Hu, 1996).

1.3 Aldosa 6-fosfato reductasa

La A6PR es la primera enzima que participa en la ruta de síntesis de sorbitol (Figura 1). Posee una localización subcelular citosólica y está compuesta por alrededor de 320 aminoácidos, con un peso molecular de 34 - 37 kDa aproximadamente (Penning, 2015). Es una enzima monomérica (El-Kabbani y cols., 1995; Wilson y cols., 1995; El-Kabbani y cols., 2005) o en algunos casos dimérica como la AKR7 (AKR7A1 del hígado de rata) (Kozma y cols., 2002).

Los miembros de la superfamilia de las aldo/ceto reductasas (AKR) presenta una tétrada catalítica conservada, compuesta por los aminoácidos Tirosina (Tyr) conservada en el 97%, Aspártico (Asp) en el 99%, Lisina (Lys) en el 97% e Histidina (His) en el 88% de todas las AKR anotadas (Penning, 2015). Estas enzimas no requieren de iones metálicos para su funcionamiento, aunque pueden ser afectadas por cationes divalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} y Cu^{+2}), ya que disminuyen la actividad enzimática (Zhou y cols., 2003), utilizan como cofactor NAD(P)H y poseen un dominio tipo barril $(\alpha/\beta)_8$ en su estructura tridimensional. El espectro de sustratos utilizados por las AKR es muy amplio, abarcando aldehídos, cetonas, monosacáridos, cetosteroides, quetoprostaglandinas, precursores de ácidos biliares, carcinógenos químicos y sus metabolitos, etc., y el proceso catalítico comienza con la unión del cofactor, seguido de la unión de su sustrato respectivo (Mindnich y Penning., 2009).

Se han descrito 16 familias de AKR, las cuales incluyen: AKR1, aldehído reductasa, aldosa reductasa, hidroxisteroide deshidrogenasa y esteroide 5β -reductasa, AKR2, manosa y xilosa reductasa, AKR3, AKRs de levadura (indole-3-acetaldehído reductasa),

AKR4, chalcona y codienona reductasa, AKR5 ácido glucónico reductasa, AKR6, subunidades β de los canales de voltaje de potasio; AKR7, aflatoxina dialdehído y reductasas de semialdehído succínicas; AKR8, piridoxal reductasa; AKR9, aril alcohol deshidrogenasa, AKR10, AKRs de Streptomices (BlmT, para biosíntesis de bluensomicina, AKR11, AKRs de Bacilus (aldo ceto reductasa), AKR12, azúcar aldehído reductasa de Steptomices, AKR13, reductasas de bacterias hipertermófilas, AKR14, reductasas de *Escherichia coli*, AKR15, reductasas de Micobacterias y AKR16, reductasas de *Vibrio cholerae* (www.med.upenn.edu/akr).

La mayoría de los miembros de las AKR de plantas están agrupados dentro de la familia 4, categorizados en 3 subfamilias (ej: 4A, 4B y 4C). Sin embargo, las A6PRs están clasificada en la familia 2A1 de las AKR, descrita como participante en la síntesis de sorbitol, reduciendo G6P a S6P al igual que la sorbitol 6-fosfato deshidrogenasa y la manosa 6-fosfato reductasa, también clasificadas en la familia 2 (Sengupta y cols, 2015).

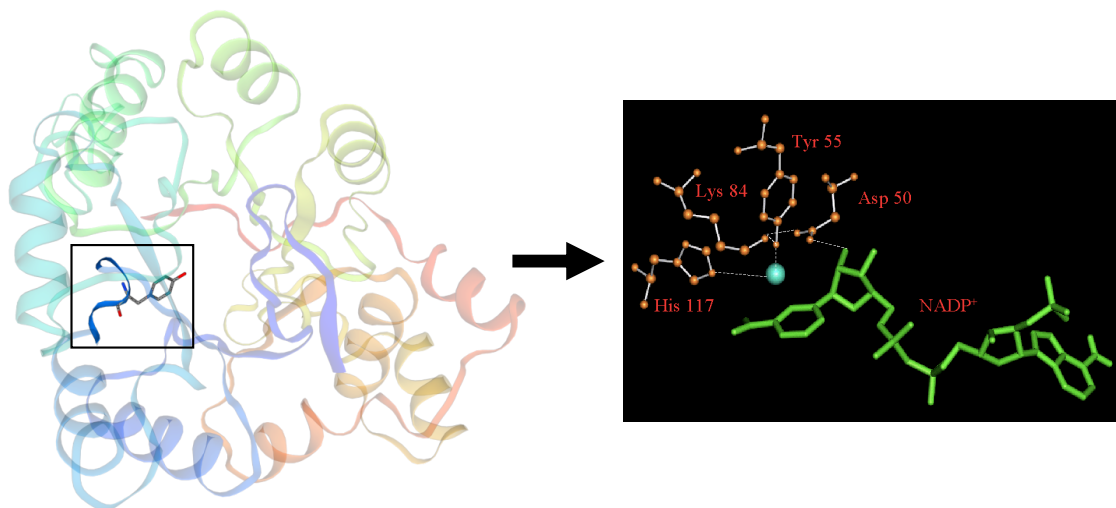


Figura 2: Modelo monomérico y tétreda catalítica de la proteína A6PR. Izquierda: Estructura obtenida desde la plataforma SWISS-MODEL de “*Malus domestica (Apple) (Pyrus malus)* NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase” (código P28475, S6PD_MALDO). Recuadro negro indica el aminoácido Tirosina (Tyr) del sitio activo. Derecha: Representación de la tetrada catalítica de 3a-HSD (AKR1C9) indicando los aminoácidos histidina, lisina, tirosina y aspártico en coordinación con NADP(H), esfera azul corresponde a una molécula de agua (www.med.upenn.edu / AKR Superfamily).

1.4 Aldosa 6-fosfato reductasa en Rosáceas

La A6PR ha sido estudiada principalmente en especies que pertenecen a la familia Rosaceae, ya que es en estas especies donde los polioles son los principales productos generados en la fotosíntesis. Esta familia comprende a muchas especies frutales de consumo humano, como manzana, pera, durazno, frutilla, etc.

El cDNA que codifica para esta enzima fue clonada por primera vez desde plantas por Kanayama y cols., (1992) donde se determinó que pertenece al grupo filogenético de las aldosas reductasa. En la actualidad, las A6PRs están clasificadas dentro de la familia de las aldo/ceto reductasas, las cuales son proteínas citosólicas, clave para la síntesis de

sorbitol y que utilizan NADPH como cofactor (Deguchi y cols., 2004; Figueroa e Iglesias, 2010; Kanayama y cols., 1992; Kim y cols., 2007; Negm y Loescher, 1981; Zamudio, 2010).

Kanayama y cols purificaron la enzima desde semillas de manzana en 1993, obteniendo una actividad específica de 2,2 U/mg proteína de S6P oxidado, siendo un valor más alto que el reportado a partir de hojas de manzano (0,628 U/mg proteína, Negm y Loescher 1981; 1,25 U/mg de proteína, Figueroa e Iglesias, 2010). Además, se determinó que el pH óptimo para la reducción de G6P está entre 7 y 9, mientras que para la oxidación de S6P el valor es de 9,5 (reacción reversa) (Hirai, 1981; Negm y Loescher, 1981).

A nivel génico se ha observado que la regulación de esta enzima ocurre principalmente a nivel transcripcional y su expresión y actividad se llevan a cabo principalmente en órganos fuente (hojas maduras) (Yamada y cols., 2006; Kim y cols., 2007). Por otro lado, se encontró que al transformar establemente plantas de manzana con el gen *Mda6PR*, habían líneas que lo sobre-expresaron y líneas que silenciaron el gen. Cuando éste fue sobre-expresado, tanto la sacarosa como el sorbitol aumentaron, mientras que en aquellas que silenciaron el gen se observó una disminución de sorbitol y un aumento de aproximadamente 7 veces de sacarosa, sin observarse cambios fenotípicos (Kanamaru y cols., 2004).

1.5 Aldosa 6-fosfato reductasa en *Arabidopsis thaliana*, una especie no-Rosaceae

Dentro de las especies que no pertenecen a la familia *Rosaceae*, se encuentra *Arabidopsis thaliana*, planta herbácea de la familia *Brassicaceae*, la cual transporta sacarosa y pequeñas cantidades de rafinosa a través de su floema (Haritatos y cols., 2000). Sin

embargo, también se ha encontrado la presencia de sorbitol y de actividad sorbitol deshidrogenasa.

Se ha observado que, al someter a esta planta a estrés abiótico, específicamente estrés por deshidratación, se detectan polioles como el glicerol, inositol, manitol, maltitol y xilitol (Rizhsky y cols, 2004) además de aumentar el sorbitol y ribitol 1,5 y 3,8 veces respectivamente (Nosarzewski y cols, 2012), mientras que, al someter a las plantas a estrés por frío, los niveles de sorbitol en hojas aumentan (Kaplan y cols, 2004). Estos hallazgos indican que la ruta de síntesis de sorbitol esté presente en esta especie vegetal.

En 2010, Sofía Zamudio realizó un BLASTp usando la secuencia aminoacídica de la A6PR de manzana (código GenBank Accesion D11080) contra el genoma completo de *Arabidopsis*, encontrando 2 marcos de lectura abiertos (AGI: At2g21250 y At2g21260), que presentaban una identidad aminoacídica de 69 y 70 % con la secuencia de manzana y una identidad del 93% entre ellas. Además, ambas presentan las 3 características comunes de las aldo/ceto reductasas: La región N-terminal LxxxGxxxPxxGxG, la región del sitio activo GxxxxDxAxxY y LxKxxxxxxxxDxxxxH (el cual contiene los aminoácidos conservados Asp, Tyr, Lis e His) y la secuencia IPKS. Además, se determinó mediante PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) que los niveles de transcrito de *AtA6PR2* (At2g21260) eran significativamente menores comparados con los niveles de transcrito de At2g21250, denominado *AtA6PR1* (Figura 3).

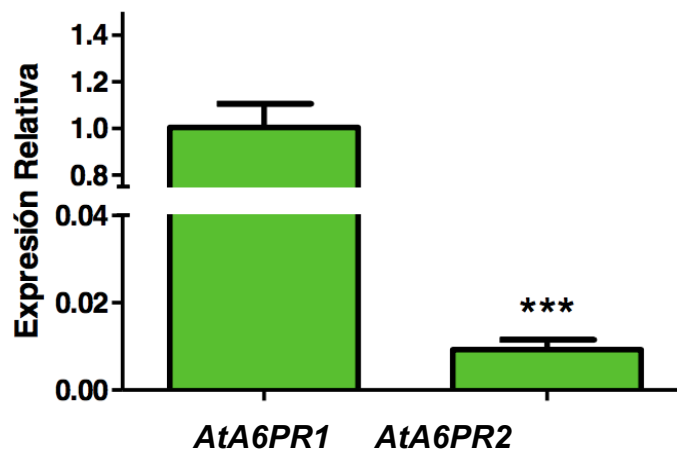


Figura 3: Niveles de transcrito de *AtA6PR1* (At2g21250) y *AtA6PR2* (At2g21260) en *Arabidopsis thaliana*. Datos obtenidos de plántulas completas de *Arabidopsis* de 15 días. Barras corresponden al promedio de tres extracciones de RNA, con 2 repeticiones de la reacción de qPCR. Barras de error corresponden a la desviación estándar obtenida. *** = $P < 0.001$. Test t de Student. Normalizador utilizado: PP2A (At1g13320). (Modificado de Zamudio, 2012).

Considerando los aumentos en los niveles de sorbitol observados en *A. thaliana* durante condiciones de estrés abiótico (Kaplan y cols, 2004; Nosarzewski y cols, 2012), se evaluó el efecto en los niveles de transcrito de *AtA6PR1* y 2 al someter las plantas a estrés por frío (4°C) o estrés salino (150 mM de NaCl; Rojas y cols, 2019). Se encontró una expresión diferencial entre los genes dependiendo del tipo de estrés. Específicamente, cuando plantas fueron sometidas a estrés por frío, los niveles de transcrito de *AtA6PR1* aumentaron principalmente en raíces hacia las 24 h luego del tratamiento, mientras que los niveles de transcrito de *AtA6PR2* disminuyeron significativamente en todos los tejidos estudiados (Figura 4A y B). Por otro lado, durante estrés salino, se observó que los niveles de transcrito de *AtA6PR2* aumentaban hacia las 24 h, mientras que los niveles de *AtA6PR1* disminuían (Figura 4C y D).

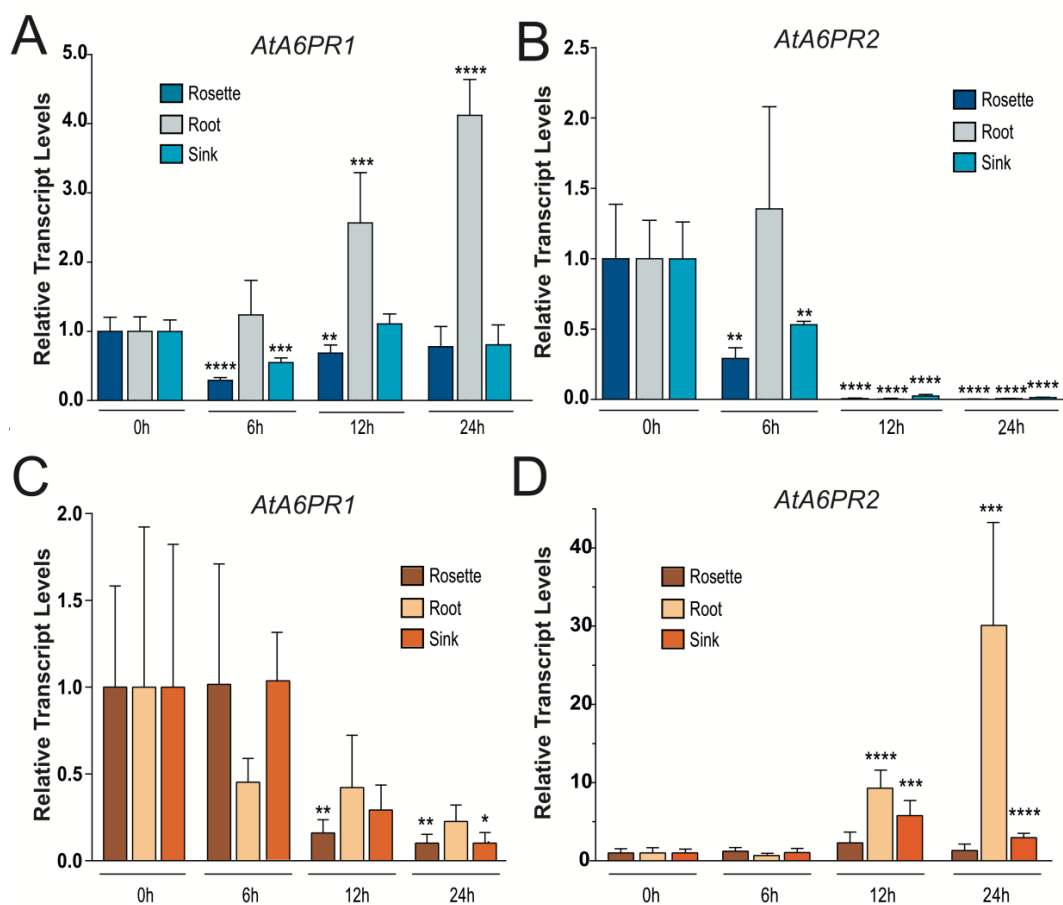


Figura 4: Niveles de transcrito relativos de *AtA6PR1* y *AtA6PR2* en diferentes tejidos de *A. thaliana* sometidos a estrés abiótico. Niveles de transcrito de *AtA6PR1* (A) y *AtA6PR2* (B) en plantas sometidas a estrés por frío (4°C). Niveles de transcrito de *AtA6PR1*(C) y *AtA6PR2* (D) en plantas sometidas a estrés salino (150 mM NaCl). Ambos tratamientos realizados durante 24 h, utilizando el gen *PP2A(At1g13320)* como normalizador en las reacciones de qRT-PCR \pm SD. Test estadístico t-Student de 2 colas utilizado para determinar la significancia entre los tejidos tratados y sus respectivas condiciones control (tratamiento a 0 h) *=P< 0.05; **=P< 0.01; ***=P< 0.001; ****= P<0.0001 (Modificado de Rojas y cols, 2019).

Por otro lado, se corroboró que la localización de las proteínas *AtA6PR1* y *2* es citoplasmática, mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco con la fusión de

las proteínas a GFP (Rojas y cols, 2019). Además, ambos genes se expresan tanto en órganos fuente como órganos sumidero (Rojas y cols, 2019), a diferencia de manzano en donde se expresa principalmente en órganos fuente (Yamaki, 1981). Una vez determinada la localización de las proteínas y teniendo como antecedentes previos que la enzima MdA6PR había sido caracterizada enzimáticamente (Figueroa e Iglesias, 2010), Sofía Zamudio en su Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas (Zamudio, 2014), intentó determinar los parámetros cinéticos de AtA6PR1. Para ello, extrajo proteínas recombinantes a partir de 3 sistemas: Tabaco transformado con AtA6PR1-His, *E. coli* transformados con His-AtA6PR1 y expresión *in vitro* de His-AtA6PR1. Sin embargo, en los tres casos, con extractos crudos o proteínas purificadas (mediante su epítipo de Histidina), AtA6PR1 recombinante no poseía actividad enzimática utilizando los sustratos analizados (G6P, S6P, NADPH, NADP). Esta dificultad fue exacerbada por las bajas cantidades de proteína recombinante que se acumulaba en cada uno de los sistemas ensayados.

1.6 Estrategia experimental

De acuerdo a los antecedentes expuestos en la sección 1.4 y 1.5 sobre la caracterización enzimática, surge una herramienta que puede ser crucial al momento de querer trabajar con proteínas expresadas heterológamente. Es el caso de la optimización de codones, ya que cada organismo utiliza un “set” particular de codones. Se ha reportado que los requerimientos para obtener una proteína recombinante activa dependen principalmente de: el microambiente del hospedero para la expresión y de la compatibilidad del uso de codones entre la secuencia del gen nativo con el huésped de expresión (Yadava y

Ockenhouse, 2003). Esto debido a que el uso de codones tiene un papel importante en el control de la velocidad de elongación de la traducción y los codones poco frecuentes pueden provocar un estancamiento del ribosoma en el ARNm al momento de la traducción, resultando en una terminación prematura de la traducción (Liu, 2020).

A modo de ejemplo, en el estudio realizado por Yadava y Ockenhouse (2003), se compararon los efectos de la modificación de los codones al expresar el dominio F2 de EBA-175 de *Plasmodium falciparum* en *Pichia pastoris*, utilizando 3 constructos de F2 basados en: los codones de la secuencia nativa de *P. falciparum*, codones de *E. coli* y codones de *Pichia*. Los resultados obtenidos fueron una expresión de 9 veces más de proteína cuando la optimización había sido realizada con los codones de *Pichia* (Figura 5, carril 3) en comparación con la utilización de los codones de *E. coli* (Figura 5, carril 2), mientras que la proteína fue indetectable por western blot al utilizar los codones nativos (Figura 5, carril 1).

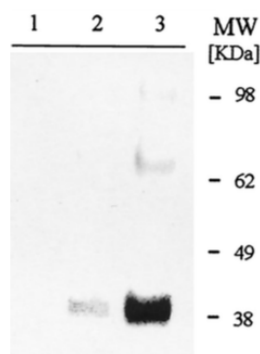


Figura 5: Expresión del dominio F2 recombinante de EBA-175 de *P. falciparum* en *P. pastoris*. Análisis de western blot de las proteínas recombinantes Pf-F2 (codones nativos) en el

carril 1, proteína eF2 utilizando codones de *E. coli* en el carril 2 y proteína yF2 utilizando codones de *P. pastoris* en el carril 3 (Modificado de Yadava y Ockenhouse, 2003.)

Para facilitar estas investigaciones, se han generado nuevas herramientas para la optimización de codones. Es el caso del trabajo realizado por Kwon y cols. (2016), donde crearon una plataforma para optimizar codones y poder expresar las proteínas recombinantes en cloroplastos. Para ello, utilizaron los genes *psbA* de 133 especies de plantas, logrando eliminar 105 y 59 de los codones raros o menos representados (cadena pesada del factor VIII de coagulación humano [FVIIIHC] y proteína de la capsída viral [VP1] respectivamente).

Un ejemplo en plantas de la importancia de la optimización de codones fue realizado por Li y cols (2013). En ese trabajo, se optimizó la secuencia del gen *cryIAh* de *Bacillus thuringiensis* que otorga resistencia a insectos y que, al transformar plantas de tabaco con distintas versiones optimizadas (*m1-cryAh*, *m2-cryAh*, *m3-cryAh*), se observó una mayor resistencia de las plantas frente a la infección (Figura 6).

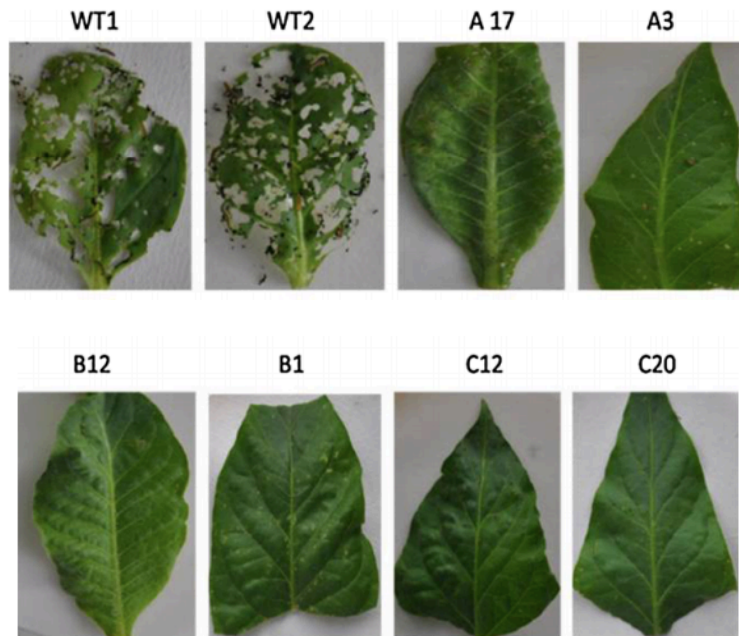


Figura 6: Apariencia de hojas de tabaco expuestas a tratamiento con larvas de *Helicoverpa armigera*. WT1 y WT2 hojas de planta control sin transformar, A17 y A3 líneas transformadas con las secuencias optimizadas m1-cryAh, B12 y B1 líneas transformadas con la versión optimizada m2-cryAh, C12 y C20 líneas transformadas con la versión optimizada m3-cryAh. Imágenes tomadas luego de 3 días post-infección (Modificado de Li y cols., 2013).

Cabe destacar que cuando se expresó His-AtA6PR1 en *E. coli*, se realizaron esos experimentos con la secuencia nucleotídica nativa del gen vegetal, obteniendo bajos niveles de expresión y sin poder detectar actividad enzimática (Zamudio, 2014). Por lo tanto, y considerando los antecedentes anteriores sobre el efecto positivo que se suele observar al optimizar los codones, es que en esta Tesis de Magíster, se propuso optimizar los codones de *AtA6PR1* y *2* para así expresarlas en el sistema de expresión heteróloga de *E. coli*. De esta manera, se utilizaron los nuevos constructos para demostrar si efectivamente las proteínas codificadas por *AtA6PR1* y *2* son aldosas 6-fosfato reductasas.

2. HIPÓTESIS

Las enzimas AtA6PR1 y AtA6PR2 de *Arabidopsis thaliana*, codificadas por At2g21250 y At2g21260, son aldosas-6-fosfato reductasas y tienen la capacidad de reducir glucosa-6-fosfato.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Expresar, purificar y caracterizar las enzimas recombinantes AtA6PR1 y 2 de *A. thaliana*, optimizadas para su expresión en *E. coli*.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Establecer un sistema de expresión y purificación de las proteínas recombinantes AtA6PR1 y AtA6PR2 desde *E. coli*.

3.2.2 Determinar los parámetros cinéticos de las enzimas recombinantes AtA6PR1 y AtA6PR2.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Análisis bioinformático

4.1.1 Optimización de codones

Se analizaron los dos marcos de lectura de la aldosa 6-fosfato reductasa de *Arabidopsis thaliana*, At2g21250 y At2g21260, y se compararon sus secuencias nucleotídicas y aminoacídicas entre ellas y además con la secuencia de manzano (GenBank: BAA01853.1, Kanayama y cols., 1992) mediante BLAST. Posteriormente se realizó la optimización de codones desde las secuencias aminoacídicas para expresar las proteínas de *A. thaliana* en *E. coli*, mediante el uso del software web OPTIMIZER (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>).

4.1.2 Síntesis de genes optimizados

La síntesis de los genes ya optimizados para su expresión en *E. coli* se realizó mediante el servicio otorgado por la empresa GenScript®, la cual sintetiza las secuencias solicitadas y luego las envía ligadas al plásmido pUC57 liofilizadas.

4.1.3 Diseño de partidores y programas de PCR

Se diseñaron partidores específicos para las secuencias nucleotídicas optimizadas de ambos genes en estudio, para amplificar desde el codón de inicio de la traducción hasta el

codón de término, utilizando la plataforma Integrated DNA Technologies (IDT) (Tabla I, Tabla II, Tabla III).

Tabla I: Partidores utilizados durante el desarrollo de Tesis. Se indican los nombres de los partidores, las secuencias y la temperatura de *melting*.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
AtA6PR1_F_opt	5'- <u>ATG</u> GAA ATC ACC CTG AAC TCT G - 3'	54,7
AtA6PR1_R_opt	5'- <u>TCA</u> CGC GTA CAG GTC GAT G - 3'	57,1
AtA6PR2_F_opt	5'- <u>ATG</u> GAA ATC ACC CTG AAC TCT G - 3'	54,7
AtA6PR2_R_opt	5'- <u>TCA</u> CGC GTA CAG TTC GAT ACC - 3'	56,7
His_F_pDEST	5'- <u>CCA</u> TCA CCA TCA CCA TCA CG - 3'	69,5
OligoAp	5'- CGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T - 3'	51

Nota: en las secuencias, se subrayan los codones de inicio y de término en los partidores F y R, respectivamente.

Tabla II: Combinación de partidores usada para la amplificación de DNA por PCR. Se indica la combinación de partidores usados para amplificar los fragmentos de interés a partir de DNA plasmidial, y cDNA, sus nombres y el tamaño esperado a amplificar.

Pares de partidores	Templado	Nombre	Tamaño esperado (pb)
AtA6PR1_F_opt AtA6PR1_R_opt	DNA plasmidial (pUC57) - AtA6PR1 y cDNA	AtA6PR1 (CDS completo)	930
AtA6PR2_F_opt AtA6PR2_R_opt	DNA plasmidial (pUC57- AtA6PR2) y cDNA	AtA6PR2 (CDS completo)	930
His_F_pDEST AtA6PR1_R_opt	Vector pDEST-HisMBP Vector pDEST17	MBP-AtA6PR1 17- AtA6PR1	2088 996
His_F_pDEST AtA6PR2_R_opt	Vector pDEST-HisMBP Vector pDEST17	MBP-AtA6PR2 17-AtA6PR2	2088 996

Tabla III: Programas de PCR utilizados. Se indica el nombre del programa de PCR, los ciclos, la temperatura y el tiempo para cada etapa del PCR.

N° de programa	Nombre	N° ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min:s)
1	AtA6PR1 AtA6PR2	1	94	03:00
		35	94	00:30
			55	00:40
			72	01:00
		1	72	05:00
2	pDEST17 His_F_pDEST AtA6PR1 o 2_R_opt	1	94	03:00
		30	94	00:30
			53	00:40
			72	01:00
		1	72	05:00
3	pDEST-HisMBP His_F_pDEST AtA6PR1 o 2_R_opt	1	94	03:00
		35	94	00:30
			53	00:40
			72	02:00
		1	72	05:00
4	RT-PCR	1	70	05:00
			4	05:00
			25	05:00
			42	60:00
			70	15:00

4.2 Material biológico

4.2.1 Cepas y crecimiento bacteriano

E. coli TOP10 y *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformadas con los vectores de expresión fueron crecidas en LB sólido [NaCl 0,8% (p/v), triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), agar 1,6% (p/v)] más ampicilina (100 µg/ml) mientras que la cepa BL21(DE3) pLysS sin transformar fue crecida en LB sólido más ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml).

4.2.2 Preparación de *Escherichia coli* quimio competente

Ambas cepas de *E. coli*, TOP10 y BL21(DE3) pLysS, fueron preparadas independientemente. Se incubó un pre-inóculo de 20 µl en 5 ml de LB líquido [NaCl 0,8% (p/v), triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v)] con los antibióticos (sección 4.2.1) con agitación a 37°C durante 18 h. Posteriormente se traspasó este cultivo a 100 ml de LB líquido con igual concentración de antibióticos y agitación en un matraz de 250 ml hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (D.O._{600nm} entre 0,5 y 0,9, JENWAY 6300 Spectrophotometer). El cultivo se traspasó a dos tubos Falcon de 50 ml y se centrifugaron a 3000 g y 4°C durante 10 min para posteriormente eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 10 ml de una solución de CaCl₂ (80 mM), MgCl₂ (50 mM) estéril frío. Se dejó en hielo por 10 min y luego se centrifugó a 2000 g por 8 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de CaCl₂ (0,1 M) y glicerol (50% v/v).

Luego, se congelaron alícuotas de 300 μ l en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

4.3 Obtención y verificación de vectores de expresión

4.3.1 Purificación de plásmidos

E. coli TOP10 con los vectores de interés (sección 4.3.3) fue crecida en LB líquido, y posteriormente se extrajo el DNA plasmidial siguiendo las indicaciones del protocolo de mini-prep (GeneJET Plasmid Miniprep Kit).

4.3.2 Vectores utilizados

Se utilizó el vector pUC57 el cual contenía las secuencias optimizadas de los genes *AtA6PR1* o la secuencia optimizada *AtA6PR2*, enviado por GenScript. Se utilizó también el vector de entrada pCR8 (pCR®8/GW/TOPO® LifeTechnologies), el cual posee el gen que codifica para la resistencia a espectinomicina, permitiendo así seleccionar células bacterianas transformadas con este vector. Este vector fue utilizado para ligar los genes de interés y poder luego recombinarlos con los vectores de expresión en bacteria, pDEST™17 y pDEST-HisMBP. pDEST™17 posee un promotor T7 inducible por IPTG, un sitio de unión a ribosoma (RBS), epítipo de hexa histidina (6X-His) en el extremo amino terminal, genes que codifican para la resistencia a cloranfenicol (Cmr^R) y el gen *ccdB* entre los sitios de recombinación *attR1* y *attR2*, terminador T7 y el gen que codifica para la resistencia al antibiótico ampicilina. pDEST-HisMBP presenta un promotor Tac

inducible por IPTG, epítomos de hexa histidina (6X-His) y *Maltose Binding Protein* (MBP) en el extremo amino terminal, genes que codifican para la resistencia a cloranfenicol (Cm^R) y el gen *ccdB* entre los sitios de recombinación *attR1* y *attR2*, terminador Tac y el gen que codifica para la resistencia a ampicilina.

Tanto los vectores pCR8, pDESTTM17 y pDEST-HisMBP son compatibles con la tecnología GATEWAYTM (basada en la recombinación sitio-específica entre fago λ y DNA de *E. coli*) (Karimi y cols., 2002).

4.3.3 Clonación de AtA6PR1 y AtA6PR2 en el vector pCR8

Se realizó un PCR utilizando como templado el vector pUC57-AtA6PR1 y pUC57-AtA6PR2 para amplificar los genes de interés (sección 4.3.7 y 4.3.2 respectivamente). Se corroboró la correcta amplificación de los fragmentos mediante geles de agarosa al 1,5% (p/v) preparado con buffer TAE 1X [Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8]. Las muestras de DNA se mezclaron con buffer de carga (6X DNA Loading Dye de Fermentas®), y los geles fueron depositados en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X. Se aplicó una diferencia de potencia de 90 V durante 50 min. Luego se incubaron en una solución de bromuro de etidio (1 μ g/ml) durante 15 min. Las bandas se visualizaron en una cámara oscura equipada con un transiluminador UV y se capturó la imagen con GeneGenius Classic (SynGene®).

Posteriormente, se purificaron las bandas deseadas (930 pb) utilizando el kit de purificación Wizard® Genomic DNA Purification Kit Protocol (Promega). Posteriormente las bandas purificadas (100 ng) fueron ligadas al vector de entrada pCR8

(1 μ l), adicionando además solución salina (1 μ l) a un volumen final de 6 μ l, dejando la reacción por 1 h a temperatura ambiente para posteriormente realizar la transformación bacteriana.

4.3.4 Transformación bacteriana

Se transformó *E. coli* TOP10 quimio competente (sección 4.2.2) con los vectores pCR8-AtA6PR1 y pCR8-AtA6PR2 y *E. coli* BL21(DE3) pLysS quimio competente con los vectores pDEST17-AtA6PR1, pDEST17-AtA6PR2, pDEST-HisMBP-AtA6PR1 y pDEST-HisMBP-AtA6PR2 mediante golpe térmico.

Para la transformación de *E. coli* TOP10 quimio competente, se descongelaron dos alícuotas, a las cuales se les agregó el volumen total de ligación (sección 4.3.2), se incubaron en hielo por 20 min, luego a 42°C por 45 s y finalmente en hielo por 10 min. Posteriormente se agregaron 300 μ l de LB líquido (sección 4.2.2) estéril a cada alícuota y se incubaron a 37°C por 2 h en agitación para luego ser sembrados 50 μ l de cultivo en medio LB sólido con el antibiótico espectinomicina (100 μ g/ml) a 37°C. El día siguiente, se picó una colonia de *E. coli* resistente al antibiótico (crecida en placas) y se depositó en 5 ml de medio LB líquido con los antibióticos respectivos (sección 4.3.3). Luego de >16 h, se tomaron 700 μ l del cultivo líquido y se depositaron en un tubo eppendorf de 1,5 ml al cual se le adicionó 400 μ l de glicerol (85% v/v) para ser almacenados a -80°C para sus posteriores usos.

Para la transformación de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS quimio competente, se descongelaron 4 alícuotas. A cada una se le agregó 1 μ g del vector respectivo (sección

4.3.3), se incubaron en hielo por 20 min, luego a 42°C por 45 s y finalmente en hielo por 10 min. Posteriormente se agregaron 450 µl de LB líquido (sección 4.2.2) estéril a cada alícuota y se incubaron a 37°C por 90 min en agitación para luego ser sembrados 100 µl de cultivo en medio LB sólido con el antibiótico ampicilina (100 µg/ml) a 37°C.

4.3.5 Secuenciación

Para determinar si las secuencias de *AtA6PR1* y *2* habían sido correctamente clonadas en el vector de entrada pCR8, se enviaron a secuenciar las muestras de DNA plasmidial purificadas previamente a partir de cultivos líquidos de *E. coli* (sección 4.3.1). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias optimizadas previamente sintetizadas (sección 4.1.2).

4.3.6 Recombinación de vectores

Los fragmentos de interés en pCR8 están entre los sitios *attL* (1 y 2) que luego por recombinación homóloga con el vector de expresión que posee los sitios de recombinación *attR* (1 y 2) quedan flanqueado por estos sitios, en una reacción catalizada por la enzima LR Clonase™ de Invitrogen. La reacción de recombinación (volumen final 10 µl) consistió en 300 ng de pCR8-*AtA6PR1* o *2* y 150 ng de pDEST™17 o pDEST-HisMBP purificados, ambos cuantificados mediante NanoDrop (sección 4.6.1) y 2 µl de LR Clonase™ Enzyme Mix (Invitrogen). Se incubó a 25°C por 2 h, se agregó 1 µl de proteinasa K y se dejó a 37°C por 10 min para detener la reacción.

4.3.7 Análisis molecular de vectores mediante digestión enzimática y PCR

Los vectores de entrada pCR8-AtA6PR1 y 2 y los vectores de expresión pDESTTM17-AtA6PR1 y 2 y pDEST-HisMBP-AtA6PR1 y 2 purificados desde *E. coli* TOP10 (sección 3.3.1) se sometieron a digestión enzimática para determinar la orientación del gen en estudio con respecto al promotor cobijado en el vector. Para ello se utilizaron las enzimas de restricción *Ava*I y *Nco*I (0,5 µl de cada una) para el caso de pCR8 y pDEST-HisMBP, y las enzimas *Ava*I, *Nco*I y *Xba*I (0,5 µl de cada una) para pDESTTM17, más 500 ng del vector respectivo en un volumen final de 25 µl. Se incubaron a 37°C durante 1 h y posteriormente se detuvo la reacción incubándolas a 65°C por 20 min. Los resultados se analizaron mediante la migración de las muestras en un gel de agarosa al 1,5 % (p/v).

Además, los vectores estudiados fueron analizados mediante PCR. Para ello se utilizó la enzima Taq DNA Polimerasa, donde las diferentes reacciones consistieron en la mezcla de 1X buffer de reacción con MgCl₂ 15 mM de Sigma-Aldrich®, dNTP 0,2 mM *mix* [dATP 10 mM, dCTP 10 mM, dGTP 10 mM y dTTP 10 mM], 1 µM de cada partidor, 1 U de enzima Taq DNA Polimerasa de Sigma-Aldrich®, ~100 ng de templado y agua miliQ estéril hasta obtener un volumen final de 20 µl. Los programas de PCR utilizados se describen en la sección 4.1.3 (Tabla III, programas 1, 2 y 3). Para la observación de los productos de PCR se realizaron geles de agarosa al 1,5% (p/v).

4.4 Extracción de ácidos nucleicos

4.4.1 Extracción de RNA de *E. coli*

Para determinar la expresión de los genes de interés, se realizó una extracción de RNA desde 5 ml de cultivos líquidos de *E. coli* TOP10 y *E. coli* BL21(DE3) pLysS utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen) y siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.5 Generación de cDNA

4.5.1 Tratamiento con DNasaI

Luego de extraer el RNA, las muestras fueron tratadas con el fin de eliminar posibles fragmentos de DNA. Para esto, se trataron 2 µg de RNA total con 1 U de DNasa I (Thermo Scientific™), buffer DNasaI 1X (Thermo Scientific™) y H₂O DEPC hasta un volumen final de 15 µl. Se incubó a 37°C durante 1 h, se agregó 1,5 µl 50 mM EDTA y se incubó a 65°C durante 10 min.

4.5.2 RT-PCR

Para la síntesis de cDNA, se realizó una reacción de transcripción reversa a las muestras de RNA tratadas con DNasa. Se usó el sistema de ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega). Se tomaron 8,25 µl de la reacción de tratamiento con DNasa (sección 3.5.1), se mezcló con 0,1 mM oligoAp (TablaI), se incubó durante 5 min a 75 °C y luego 5 min en hielo. Posteriormente se agregó el “mix RT” compuesto por 5X Buffer ImProm-II™, 2,5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP *mix* en DEPC [dATP, dCTP, dGTP y dTTP; 10 mM cada uno], 2 µl ImProm-II™ Reverse Transcriptase y se llevó a volumen final de 20 µl

con agua libre de nucleasas. Luego se llevó a cabo la reacción de transcripción reversa en un termociclador siguiendo el programa RT-PCR (sección 4.1.3, Tabla III). Posteriormente las muestras se guardaron a -20°C .

4.6 Cuantificación y corroboración de integridad de ácidos nucleicos

4.6.1 Cuantificación

Para la cuantificación de DNA plasmidial y RNA, se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop®ND-1000 UV-Vis. Se midieron las absorbancias 230 nm, 260 nm y 280 nm, con las cuales se calcularon los índices de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . Cuando el índice A_{260}/A_{280} es cercano a 1,8 (para DNA) o 2 (para RNA) se considera que las muestras están libres de contaminantes como proteínas o compuestos fenólicos, mientras que cuando el índice A_{260}/A_{230} está dentro del rango 1,8 – 2,2 indica que las muestras no presentan solventes orgánicos y sales. Valores menores a los mencionados anteriormente, indican contaminación de las muestras.

4.6.2 Determinación de la calidad e integridad de ácidos nucleicos

Para determinar la integridad del RNA extraído, éste fue sometido a una electroforesis en condiciones no denaturantes. Se preparó un gel de agarosa al 2% (p/v) en 50 ml 1X TAE, al cual se le agregó GelRed a una concentración final de 1%, y luego se le aplicó un voltaje de 75V durante 45 min.

Para determinar la integridad y calidad del DNA plasmidial y cDNA, se realizaron PCR, amplificando los genes de interés utilizando los partidores AtA6PR1 o 2_F_opt y AtA6PR1 o 2_R_opt, y His_F_pDEST y AtA6PR1 o 2_R_opt (sección 4.1.3, Tabla I); los programas de PCR utilizados fueron los descritos en la Tabla III. Los productos de PCR fueron cargados en geles de agarosa al 1,5% (p/v), resueltos por electroforesis, se visualizaron las bandas en una cámara oscura equipada con un transiluminador UV y se capturó la imagen con GeneGenius Classic (SynGene®).

4.7 Expresión y purificación de proteínas

4.7.1 Determinación de condiciones de inducción

Se probaron distintas condiciones para la inducción de la expresión de proteínas y así determinar la condición óptima. Se realizó un pre-inóculo de 5 ml de cultivo con el antibiótico ampicilina (100 µg/ml), luego fue traspasado a un matraz estéril de 250 ml y se le agregó medio LB líquido hasta completar 100 ml. Con estos cultivos, se analizaron dos temperaturas de inducción, 28 °C y 37 °C, dos tiempos de inducción, 4 y 16 h y dos concentraciones del inductor IPTG, 0,05 y 0,5 mM. Luego, los cultivos fueron centrifugados a 5000 g durante 5 min a 4°C y el sobrenadante eliminado, se lavó el pellet 2 veces usando 10 ml buffer TEN (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA), se centrifugó a 5000 g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y posteriormente se almacenó el pellet a -80 °C hasta su uso.

4.7.2 Extracción de proteínas totales

Para la extracción de proteínas totales de células sin inducir o inducidas, se resuspendió el pellet almacenado a -80 °C (sección 4.7.1) en buffer B-PER™ (Bacterial Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific™) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Por otro lado, se extrajo proteínas totales mediante sonicación. Para ello se resuspendió el pellet almacenado a -80 °C en 3 ml de búffer A de resuspensión (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% (v/v) glicerol, 0,1 mM EDTA, inhibidor de proteasa 1X), y luego se probaron distintos tiempos y cantidad de pulsos de sonicación (Tabla IV). Entre cada pulso de sonicación, las muestras se dejaron en hielo durante 1 min. Se retiraron 500 µl de la muestra sonicada y luego los 2,5 ml restantes se centrifugaron a 10000 g por 15 min a temperatura ambiente. Se separaron las fracciones solubles e insolubles y esta última se resuspendió en búffer A para sus posteriores análisis.

Tabla IV: Optimización de condiciones sonicación. Cantidad de pulsos y tiempos de sonicación para la extracción de proteínas.

Nº de pulsos	Tiempo de sonicación
5	30 s
10	30 s
15	30 s
5	1 min
10	1 min
15	1 min

4.7.3 Purificación de proteínas

La purificación de proteínas His-AtA6PR1 o 2 y HisMBP-AtA6PR1 o 2 se realizó por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC), utilizando columnas His-Trap™ HP de GE Healthcare Life Sciences de 1 mL, las cuales contienen una matriz de sefarosa unida a iones de Níquel (Ni^{2+}), al que se une el epítipo de histidinas, siendo esta retenida mientras que el resto de las proteínas fueron eluidas en las primeras fracciones. Luego de extraer las proteínas (sección 4.7.2), éstas fueron resuspendidas en buffer de extracción (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 30 mM Imidazol) y luego cargadas en la columna. Se lavó la columna con buffer de extracción y para la elución de éstas, se utilizó buffer de purificación (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM Imidazol) y se recolectaron fracciones de 1,8 ml.

4.8 Análisis de proteínas

4.8.1 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el uso del Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™). Se realizó una curva de calibración utilizando la proteína BSA como estándar, agregando desde 0 hasta 10 μg de proteína, en un volumen final de 200 μl . Para las muestras de proteínas en estudio, se utilizó 5 μl del extracto proteico (proteínas totales) o 1 μl de proteínas purificadas, la reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos y luego se midió la absorbancia a 562 nm usando el equipo EPOCH 2 microplate reader (BioTek).

4.8.2 Geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes SDS-PAGE

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% (p/v) [1,7 ml agua destilada, 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 25 μ l 20% (p/v) SDS, 2 ml de solución de 30% (p/v) acrilamida/0,8% (p/v) bis-acrilamida, 50 μ l 10% (p/v) APS y 5 μ l TEMED]. El gel concentrador fue preparado al 4% (p/v) [1,54 ml agua destilada, 625 μ l 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 125 μ l 20% (p/v) SDS, 335 μ l solución 30% (p/v) acrilamida/0,8% (p/v) bis-acrilamida, 25 μ l 10% (p/v) APS y 5 μ l TEMED].

La electroforesis en condiciones denaturantes se realizó sumergiendo los geles en buffer de corrida [250 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM glicina y 20% (p/v) SDS]. Las muestras fueron mezcladas con buffer de carga 4X [125 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% (v/v) glicerol, 2% (v/v) β -mercaptoetanol, 0,1% (p/v) azul de bromofenol, y 4% (p/v) SDS], luego hervidas por 1 minuto y cargadas en el gel. Se utilizaron 20 μ g de proteína totales o 5 μ g de proteínas purificadas, las cuales fueron corridas por 30 min a un potencial de 90 V y luego por 90 min a un potencial de 200 V. Los geles se revelaron mediante tinción Coomassie R-250 0,3% (p/v) disuelto en una mezcla de metanol 50% (v/v) y ácido acético 10% (v/v), tiñéndolos durante 1 h y luego destiñendo con solución de desteñido [metanol 20% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y agua destilada] durante 24 h o transferidos a una membrana de nitrocelulosa.

4.8.3 Western blot anti-histidina

Para determinar la presencia y el tamaño de la proteína de fusión His-AtA6PR1, His-AtA6PR2, HisMBP-AtA6PR1 y HisMBP-AtA6PR2, se realizaron ensayos de western blot anti-Histidina. Para ello se transfirieron las proteínas resueltas en el gel SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa utilizando el equipo Trans-Blot® SD “Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell” de Bio-Rad. La transferencia fue efectuada durante 30 min a un potencial de 10 V, posteriormente la membrana fue lavada con agua destilada y luego incubada con Rojo de Ponceau [0,1 % (p/v) Rojo de Ponceau, 5 % (v/v) ácido acético] durante 30 s en agitación. Se lavó la membrana con agua destilada y se incubó durante 1 h con TBS-T [20 mM Tris-HCl pH 7,5, 140 mM NaCl y 0,1% (p/v) Tween 20] y 5% (p/v) leche Svelty a 37 °C en agitación. Se lavó la membrana 3 veces por 10 min con TBS-T y luego se incubó la membrana con TBS-T, 5% (p/v) leche y el anticuerpo primario Histidina (1/5000 o 1/3000, anticuerpo monoclonal anti poli-His producido en ratón, Sigma-Aldrich®) durante 1 h a 37°C en agitación. Posteriormente se lavó 3 veces la membrana durante 10 min con TBS-T y se incubó con TBS-T, 5% (p/v) leche más el anticuerpo secundario (fosfatasa alcalina 1/5000 o 1/10000, anticuerpo anti IgG de ratón producido en cabra, Sigma-Aldrich®) durante 1 h a 37°C en agitación. Se lavó la membrana con TBS-T 3 veces por 10 min, luego se lavó 2 veces por 5 min con buffer alcalino [100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂] y finalmente se incubó por 30 min con 10 ml de solución buffer alcalino más 66 µl NBT (50 µg/µl) y 33 µl BCIP (25 µg/µl) para el revelado. Esta reacción se detuvo con 400 µl 0,5 M EDTA.

4.9 Ensayos de actividad enzimática y determinación de parámetros cinéticos

4.9.1 Curva de absorbancia de NADPH

Se preparó NADPH 10 mM en agua destilada estéril, se midió su absorbancia a 340 nm mediante un barrido de absorbancia entre los 240 y 700 nm de éste en un lector de microplaca (Epoch 2, BioTek).

4.9.2 Medición de actividad enzimática y estimación de parámetros cinéticos

Para determinar la actividad enzimática, se realizaron ensayos de oxidación de NADPH y reducción de glucosa 6-fosfato. Para ello, la reacción contenía 0,1 mM NADPH, 50 mM G6P, 100 mM Tris-HCl (pH 8) y distintos volúmenes de enzima (proteínas del extracto crudo o proteínas enriquecidas), en un volumen final de 200 μ l. Se utilizó como control positivo la enzima comercial purificada Aldosa reductasa humana (Sigma-Aldrich, SRP6371), mientras que como control negativo para la reacción se utilizaron extractos proteicos solubles de bacterias *E. coli* BL21(DE3) pLysS sin transformar. La reacción se inició al momento de agregar el sustrato (G6P), y luego se fue monitoreando la desaparición del NADPH mediante la disminución de la absorbancia a 340 nm registrada por el equipo EPOCH durante 30 minutos a 25 °C. Se utilizó la ecuación 1 para determinar la actividad específica.

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

Ecuación 1: Actividad específica. Ecuación que permite calcular la actividad enzimática, donde ϵ corresponde al coeficiente de extinción molar del NADPH, l corresponde al largo de la cubeta utilizada, V_e corresponde al volumen de la enzima utilizado, V_c al volumen final de reacción y C_e a la concentración de enzima.

5. RESULTADOS

5.1 Optimización de secuencias aminoacídicas de AtA6PR1 y AtA6PR2

Las secuencias nucleotídicas de los genes codificantes para las enzimas AtA6PR1 y 2 fueron optimizadas desde su secuencia aminoacídica, con el fin de poder expresar estas proteínas de manera heteróloga en *E. coli*. Para esto se utilizó la herramienta bioinformática web OPTIMIZER, donde se depositaron las secuencias aminoacídicas de cada proteína vegetal y se seleccionó la especie en la cual se quería expresar. Luego de esto, se obtuvieron las secuencias nucleotídicas optimizadas de *AtA6PR1* y 2, las cuales poseen alrededor de 77% de identidad nucleotídica con sus respectivas secuencias nativas.

A Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

	1	2	
1: AtA6PR1_nativa	100.00	76.88	1: AtA6PR1_nativa
2: AtA6PR1_opt	76.88	100.00	2: AtA6PR1_opt

B Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

	1	2	
1: AtA6PR2_nativa	100.00	76.88	1: AtA6PR2_nativa
2: AtA6PR2_opt	76.88	100.00	2: AtA6PR2_opt

Figura 7: Porcentaje de identidad entre las secuencias nucleotídicas nativas y optimizadas de *AtA6PR1* y *AtA6PR2*. A: porcentaje de identidad de las secuencias nucleotídicas de *AtA6PR1* nativa comparada mediante BLAST con la secuencia de *AtA6PR1* optimizada, B: porcentaje de identidad nucleotídica utilizando las secuencias *AtA6PR2* nativa y *AtA6PR2* optimizada.

Las secuencias nucleotídicas optimizadas fueron sintetizadas por la empresa GenScript, las cuales fueron ligadas al vector de entrada pUC57 y enviadas liofilizadas para sus posteriores usos.

5.2 Obtención de vectores de entrada pCR8-AtA6PR1 y pCR8-AtA6PR2

5.2.1 Clonación de AtA6PR1 y AtA6PR2 en vector de entrada pCR8

Con el fin de sub-clonar los genes optimizados en vectores de expresión, los insertos de interés en pUC57-AtA6PR1 y pUC57-AtA6PR2 fueron amplificados mediante PCR utilizando los partidores detallados en Tabla II (sección 4.1.3). Los productos de PCR fueron cargados en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) y visualizados luego de su tinción con bromuro de etidio bajo luz UV. Se observaron las bandas del tamaño esperado de aproximadamente 930 pb.

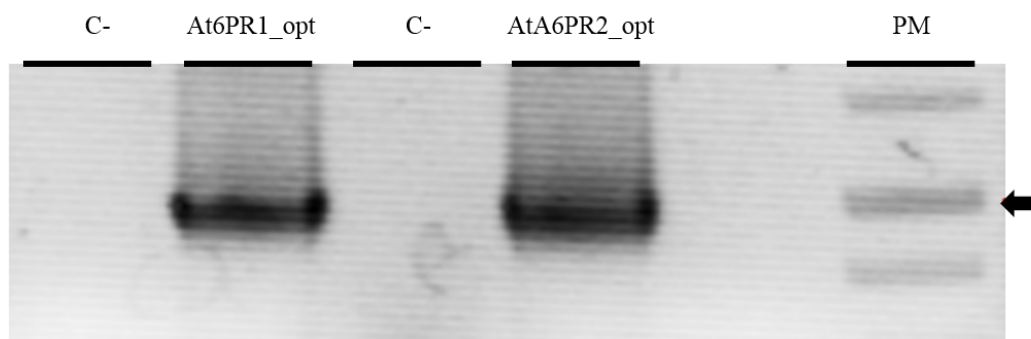


Figura 8: PCR de pUC57 portadores de los genes *AtA6PR1* y *AtA6PR2* optimizados. Se observan bandas en los carriles AtA6PR1_opt y AtA6PR2_opt de aproximadamente 930 pb, correspondientes al tamaño esperado para el CDS del AtA6PR respectivo. El carril C- corresponde al control negativo de PCR usando como templado agua. La flecha indica los 1000 pb del marcador de peso molecular (PM).

Corroborados los vectores, se procedió a purificar las bandas (sección 4.3.3) de dos formas; purificación de banda desde gel de agarosa y purificación desde productos de PCR. A partir de esto, se obtuvo mejor rendimiento y pureza al purificar desde producto de PCR (sección 4.6.1, Tabla V), por lo que se continuó con estas muestras para realizar la ligación al vector de entrada pCR8 (sección 4.3.3).

Tabla V: Cuantificación de DNA de purificaciones por banda y producto de PCR. Se muestra la cuantificación de 2 purificaciones realizadas por banda desde gel de agarosa (banda) y una cuantificación de purificación a partir de producto de PCR para cada constructo (AtA6PR1 y AtA6PR2). Se indican las concentraciones obtenidas en ng/μl y los índices de absorbancia.

Muestra	Concentración (ng/μl)	A260/280 nm	A260/230 nm
AtA6PR1 banda (1)	57	1.9	1.3
AtA6PR1 banda (2)	48.5	1.732	0.795
AtA6PR1 producto PCR	281.5	1.810	1.889
AtA6PR2 banda (1)	107.4	1.838	0.968
AtA6PR2 banda (2)	89	1.788	1.099
AtA6PR2 producto PCR	343.5	1.837	1.908

5.2.2 Transformación de *E. coli* con pCR8-AtA6PR1 y 2 y verificación por PCR

Ligados los genes de interés al vector pCR8 (sección 4.3.3), se transformó la cepa de *E. coli* TOP10 con los vectores pCR8-AtA6PR1 y pCR8-AtA6PR2 mediante golpe térmico (sección 4.3.4). Se seleccionaron 10 colonias para cada construcción y se realizaron cultivos líquidos los cuales fueron sometidos a mini preparaciones para la purificación de los vectores y su posterior verificación mediante PCR y digestión enzimática. Los PCR se realizaron utilizando los partidores de la sección 4.2.1, y los productos fueron cargados en

un gel de agarosa al 1,5% (p/v) observándose las bandas del tamaño esperado de 930 pb (Figura 9).

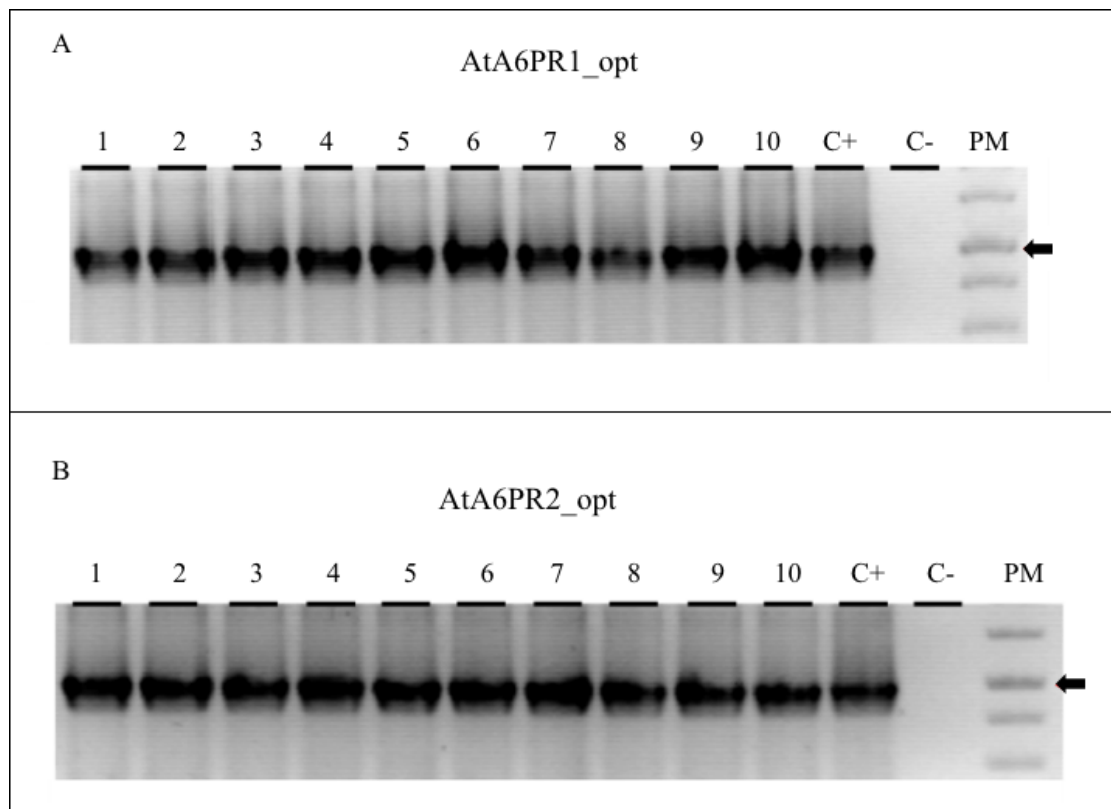


Figura 9: PCR de mini preparaciones de *E. coli* transformadas con pCR8-AtA6PR1 y pCR8-AtA6PR2. Amplificación del gen de interés (A) *Ata6pr1_opt* y (B) *Ata6pr2_opt*. Se observan bandas del tamaño esperado de 930 pb. El carril C+ corresponde al vector pUC57-AtA6PR1 o 2 respectivamente, como templado, y el carril C- corresponde a producto de PCR utilizando como templado agua. La flecha indica los 1000 pb del marcador de peso molecular (PM).

Adicionalmente, se realizó un ensayo de digestión enzimática para determinar la orientación de los genes de interés *in silico* e *in vivo* con respecto a los sitios de recombinación *attR1* y *attR2* (sección 4.3.7). En todos los casos, se obtuvo un patrón de direccionalidad en sentido, concordante con lo realizado *in silico*, es decir, el gen en la

orientación correcta para su posterior recombinación en los vectores de expresión. Para ambas construcciones se esperaba un patrón de bandeo de 1543, 1300 y 904 pb, lo que es observable en la Figura 10 A y B.

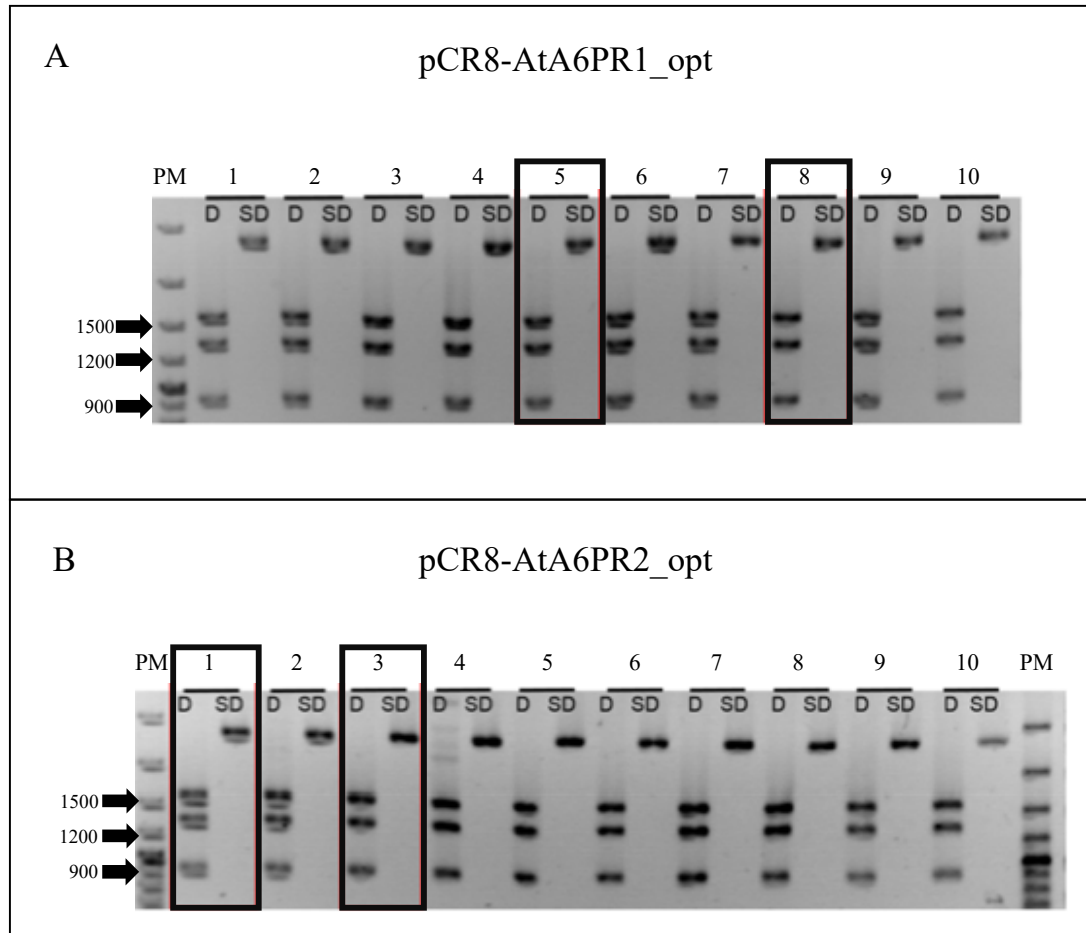


Figura 10: Digestión enzimática de las mini preparaciones de *E. coli* transformadas con pCR8-AtA6PR1 y pCR8-AtA6PR2. Digestión enzimática de los vectores pCR8-AtA6PR1 (A) y pCR8-AtA6PR2 (B) con las enzimas de restricción *Ava*I y *Nco*I. Los carriles del 1 al 10 corresponden a las 10 minipreparaciones ensayadas, D corresponde al vector digerido con ambas enzimas y SD corresponde al vector sin digerir. Las flechas indican los tamaños del marcador de peso molecular (PM) de 1500, 1200 y 900 pb. Los recuadros indican las colonias que no presentaron mutaciones en su secuencia.

Las 10 muestras para cada constructo fueron enviadas a secuenciar para verificar que no hubiese ocurrido alguna mutación durante su amplificación (sección 4.2.1). Para el caso de pCR8-AtA6PR1, las mini preparaciones de las colonias 5 y 8 no presentaron cambios comparada con la secuencia sintetizada, mientras que para pCR8-AtA6PR2, las secuencias de las mini preparaciones 1 y 3 eran las mismas al compararlas con las secuencias optimizadas previamente sintetizadas (recuadrados en Figura 10 A y B).

5.3 Generación y análisis molecular de los vectores de destinación.

Se realizó la recombinación entre los vectores de entrada, pCR8 y destinación, pDEST17 y pDEST-HisMBP, donde el primero posee un epítipo de 6X-Histidina y un promotor inducible por IPTG, mientras que el segundo posee el epítipo 6X-Histidina y la secuencia MBP que permite solubilizar las proteínas de interés generadas, ambos epítopos en el extremo amino terminal (sección 4.3.6). Luego, se transformaron células de *E. coli* TOP10 y BL21(DE3) pLysS (sección 4.3.4). Las bacterias transformantes de *E. coli* TOP10 fueron corroboradas mediante PCR de colonia y digestión enzimática (sección 4.3.7). Para el PCR, se seleccionaron 3 colonias por cada construcción, y los partidores utilizados fueron MBP-AtA6PR1 o 2 para pDEST-HisMBP-AtA6PR1 y 2, y 17-AtA6PR1 o 2 para pDEST17-AtA6PR1 y 2 (sección 4.1.3, Tabla II), respectivamente. Los productos de PCR se cargaron en geles de agarosa al 1,5% (p/v) y se observaron bandas del tamaño esperado correspondientes a 2088 pb para pDEST-HisMBP-AtA6PR1 y 2 y bandas de 996 pb para pDEST17-AtA6PR1 y 2 (Figura 11 A y B).

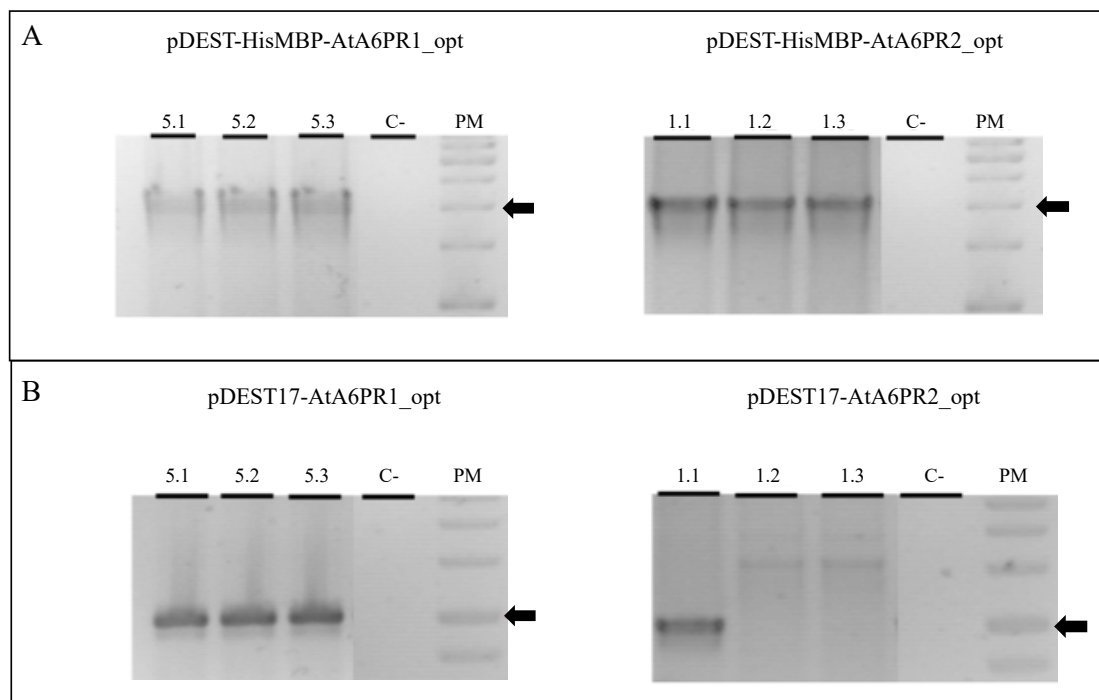


Figura 11: PCR de colonia de *E. coli* TOP10 transformadas con pDEST-HisMBP-AtA6PR1 y 2 y pDEST17-AtA6PR1 y 2. A: PCR del gen de interés y su epítipo correspondiente (HisMBP-AtA6PR1 o 2) con un tamaño esperado de 2088 pb. La flecha indica el marcador de 2000 pb. B: PCR del gen de interés y su epítipo (His-AtA6PR1 o 2) de 996 pb. La flecha indica el marcador de 1000 pb. Los carriles C- en A y B corresponden a productos de PCR utilizando agua como templado. PM, marcador de peso molecular.

Posteriormente, estas mini preparaciones fueron analizadas mediante digestión enzimática *in silico* e *in vivo*. Para pDEST-HisMBP-AtA6PR1 y 2 se utilizaron *Ava*I y *Nco*I, mientras que para pDEST17-AtA6PR1 y 2 se utilizaron *Ava*I, *Nco*I y *Xba*I. Se obtuvo el patrón de bandeo predicho *in silico*, observándose bandas de 4662 y 2922 pb para pDEST-HisMBP-AtA6PR1 y 2 y bandas de 4538 y 1118 pb para pDEST17-AtA6PR1 y 2 (Figura 12).

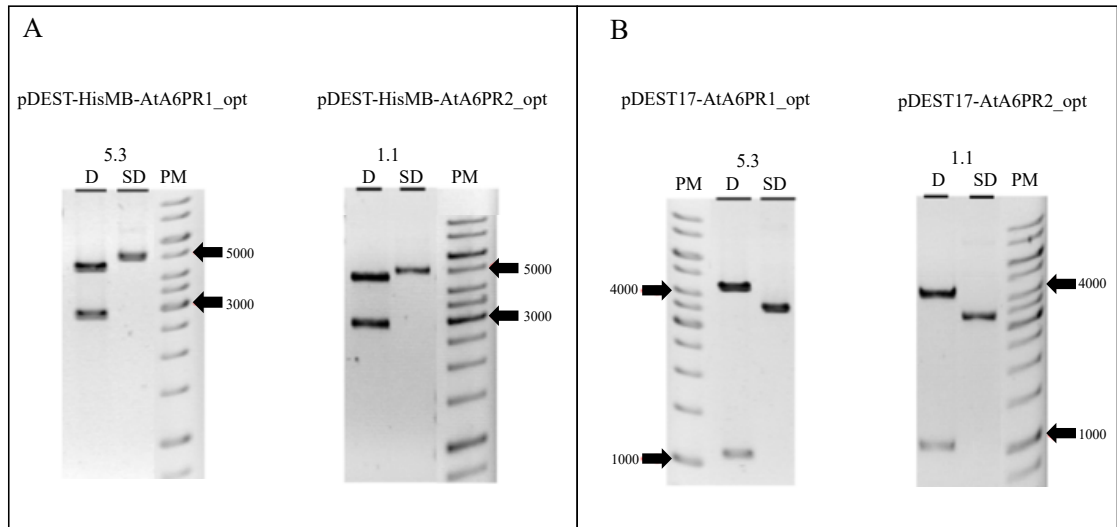


Figura 12: Digestión enzimática de las minipreparaciones de *E. coli* TOP10 transformadas con pDEST-HisMBP-AtA6PR1 y 2 (A) y pDEST17-AtA6PR1 y 2 (B). Se muestra la digestión enzimática de una minipreparación representativa por constructo. A: Se utilizaron *Ava*I y *Nco*I para digerir pDEST-HisMBP-AtA6PR1 y 2 obteniéndose bandas del tamaño de 4662 y 2922 bp. B: Se utilizaron *Ava*I, *Nco*I y *Xba*I para digerir pDEST17-AtA6PR1 y 2, observándose bandas de 4538 y 1118 bp. D, vector digerido con las dos o tres enzimas de restricción (según corresponda). SD, vector sin digerir. Las flechas indican los tamaños de marcadores de peso molecular (PM) de 5000 pb y 3000 pb en A, y de 4000 pb y 1000 pb en B.

Por otro lado, las células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformadas fueron corroboradas mediante PCR, amplificando los genes de interés y su epítipo correspondiente. Se obtuvieron las bandas de los tamaños esperados de 2088 pb para pDEST-HisMBP-AtA6PR1 y 2, y 996 pb para pDEST17-AtA6PR1 y 2 (Figura 13).

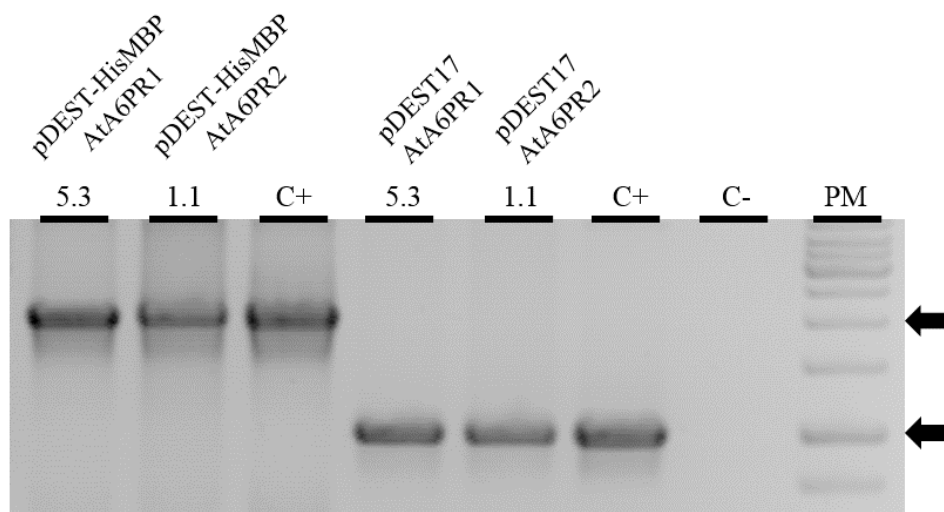


Figura 13: PCR de colonia de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformadas con pDEST-HisMBP-AtA6PR1 y 2 y pDEST17-AtA6PR1 y 2. Una colonia de *E. coli* fue seleccionada por constructo para amplificar los genes de interés y el epítipo. Se utilizó una mini preparación dependiendo del vector utilizado como control positivo (C+) y para el control negativo (C-) se utilizó agua como templado. Las flechas indican los 2000 pb (superior) y 1000 pb (inferior) del carril del marcador de peso molecular, PM.

5.4 Análisis de expresión génica a partir de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformadas con vectores de interés mediante retrotranscripción (RT-PCR).

Obtenidas las bacterias transformadas con los vectores de interés, primero se analizó la expresión de los genes en estudio incluyendo sus epítipos. Considerando que la transcripción de ambos genes es regulada por un promotor inducible (promotor Tac presente en pDEST-HisMBP y promotor T7 presente en pDEST17, donde ambos aumentan los niveles de expresión de un gen blanco ya que son inducibles por IPTG), se indujo su expresión en condiciones no-optimizadas, es decir, agregando al medio de

cultivo 0,5 mM de IPTG, suplementadas con el antibiótico ampicilina y crecidas durante toda la noche. Luego, se extrajo RNA (sección 4.4.1), se sintetizó cDNA (sección 4.5.2) y se realizó un PCR amplificando el gen recombinante de interés desde la región que codifica el epítipo (5'), hasta el codón de término de los genes (3'). Se obtuvieron las bandas del tamaño esperado de 996 pb aproximadamente para pDEST17-AtA6PR1 y 2 y de 2088 pb aproximadamente para pDEST-HisMBP-AtA6PR1 y 2 (Figura 14).

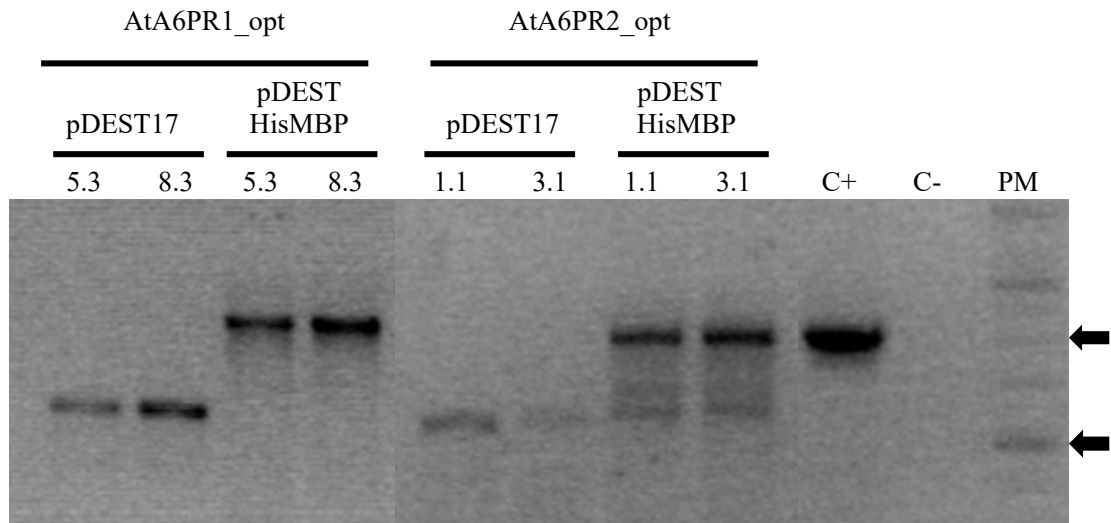


Figura 14: RT-PCR de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformadas con los vectores de expresión. Se observa las bandas de los tamaños esperados para pDEST17-AtA6PR1 (A) y 2 (B) de 996 pb y de 2088 pb aproximadamente para pDEST-HisMBP-AtA6PR1 (A) y 2 (B). Se utilizó como control positivo (C+) los vectores de expresión obtenidos luego de la recombinación con el vector de entrada, y como control negativo (C-) se utilizó agua como templado. Las flechas indican 2000 pb (superior) y 1000 pb (inferior) del marcador de peso molecular (PM).

5.5 Expresión y purificación de proteínas

5.5.1 Optimización y extracción de proteínas mediante sonicación

Una técnica utilizada para la extracción de proteínas fue la sonicación (sección 4.7.2). Para ello se crecieron cultivos líquidos sin inducción (usados como control negativo) e inducidos con 0,5 mM de IPTG de bacterias portadoras del vector pDEST-HisMBP-AtA6PR1, luego se realizó una optimización de los tiempos y pulsos de sonicación (sección 4.7.2, Tabla IV), para extraer posteriormente las proteínas solubles. Mediante geles SDS-PAGE y Western blot (anti-Histidina) se observó que a los distintos tiempos de sonicación, no hubo una mayor diferencia en cuanto a la intensidad de la banda estudiada en los extractos crudos. Sin embargo, al separar el extracto crudo en fracciones solubles e insolubles, y luego analizar las fracciones solubles, se determinó que el mejor tiempo de sonicación correspondía a 5 pulsos de 30 seg (Figura 15), ya que la banda observada es más intensa (se predice que HisMBP-AtA6PR1 posee un peso molecular de 70 kDa).

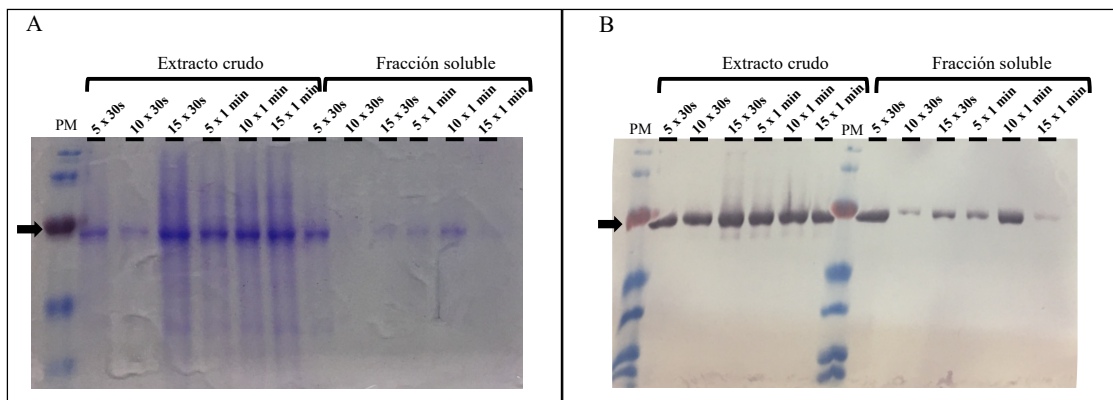


Figura 15: Optimización de extracción de proteínas obtenidas por sonicación. A: 20 μ g de proteínas totales (extracto crudo) y proteínas solubles totales inducidas con 0,5 mM de IPTG

fueron resueltas por SDS-PAGE, corridos durante 30 min a 90 V y luego 90 min a 180 V, y posteriormente teñidos con azul de Coomassie. B: Western blot anti-Histidina (1:5000) para detectar la presencia de las proteínas recombinantes pDEST-HisMBP-AtA6PR1. La flecha indica los 70 kDa.

Una vez obtenido el mejor tiempo de sonicación, se procedió a obtener proteínas a partir de cultivos líquidos con los constructos restantes (Figura 16). Se observó que el tiempo de sonicación no afectó la integridad de las proteínas detectadas y que en todos los casos se obtuvo la señal correspondiente, es decir, una banda de aproximadamente 35 kDa para las proteínas recombinantes His-AtA6PR1 y 2 y His-MdA6PR, mientras que una banda de aproximadamente 70 kDa para las proteínas recombinantes HisMBP-AtA6PR1 y 2.

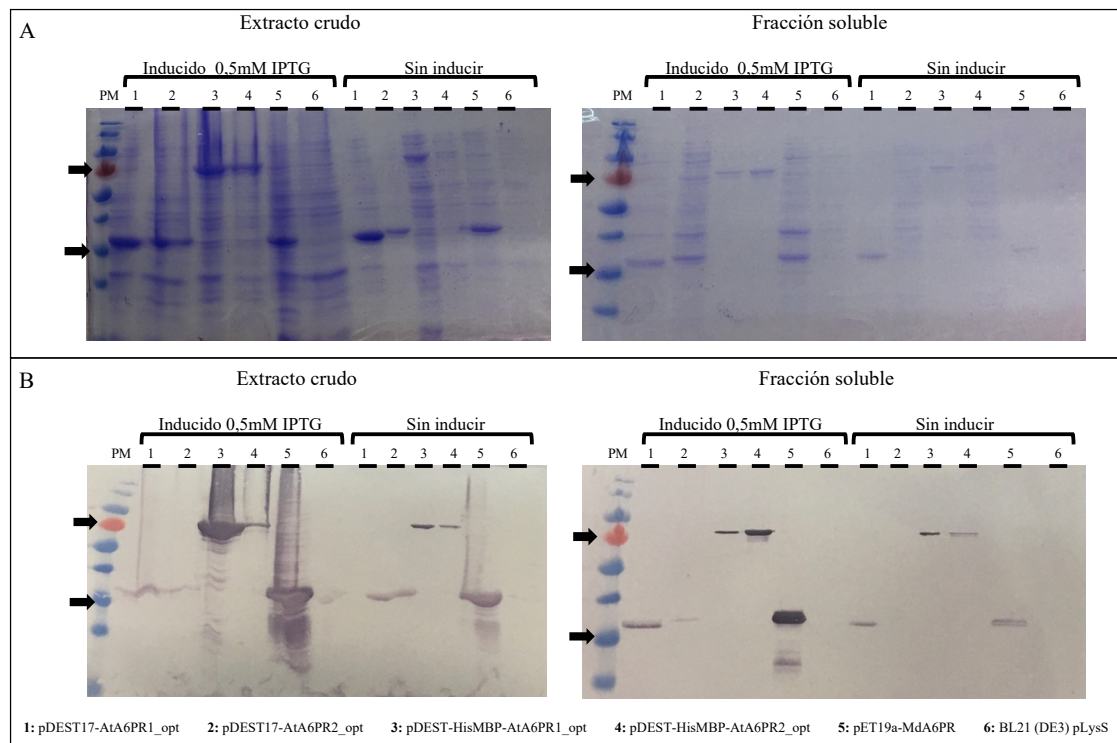
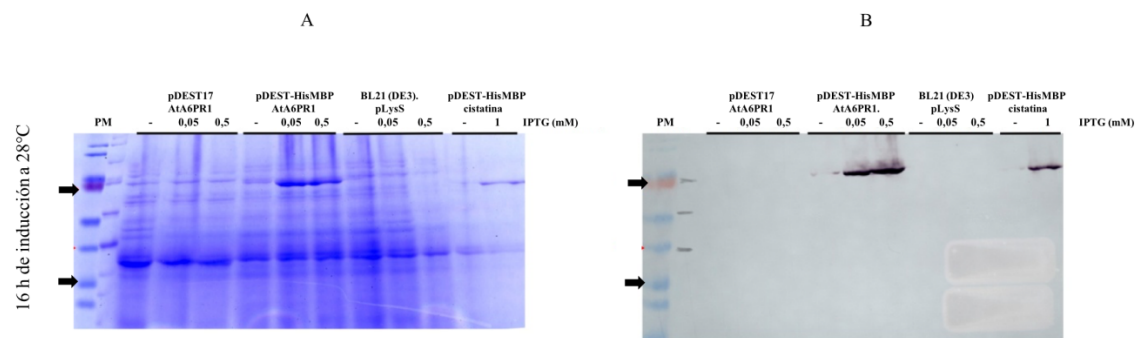


Figura 16: SDS-PAGE y Western blot de proteínas obtenidas por sonicación. A: 20 μ g de proteínas del extracto crudo y proteínas solubles totales sin inducir e inducidas con 0,5 mM de

IPTG fueron resueltas por SDS-PAGE, corridos durante 30 min a 90 V y luego 90 min a 180 V, y posteriormente teñidos con azul de Coomassie. B: Western blot anti-Histidina (1:5000) para detectar la presencia de las proteínas recombinantes. La cepa BL21 (DE3) pLysS sin transformar fue utilizada como control negativo. Las flechas indican los 70 kDa (superior) y 35 kDa (inferior) de los carriles de peso molecular (PM).

5.5.2 Optimización y extracción de proteínas mediante reactivo B-PER

Para determinar la condición óptima para crecer las bacterias y obtener una mayor cantidad de proteínas recombinantes, se probaron diferentes variables para la inducción de expresión (sección 4.7.1). Luego, utilizando el reactivo B-PER se obtuvieron las proteínas solubles y se determinó mediante geles SDS-PAGE y Western blot, que las condiciones óptimas correspondían al uso de 0,5 mM del inductor IPTG, una temperatura de 28°C y un tiempo de crecimiento de 16 h (Figura 17), especialmente en el caso de los constructos pDEST-HisMBP.



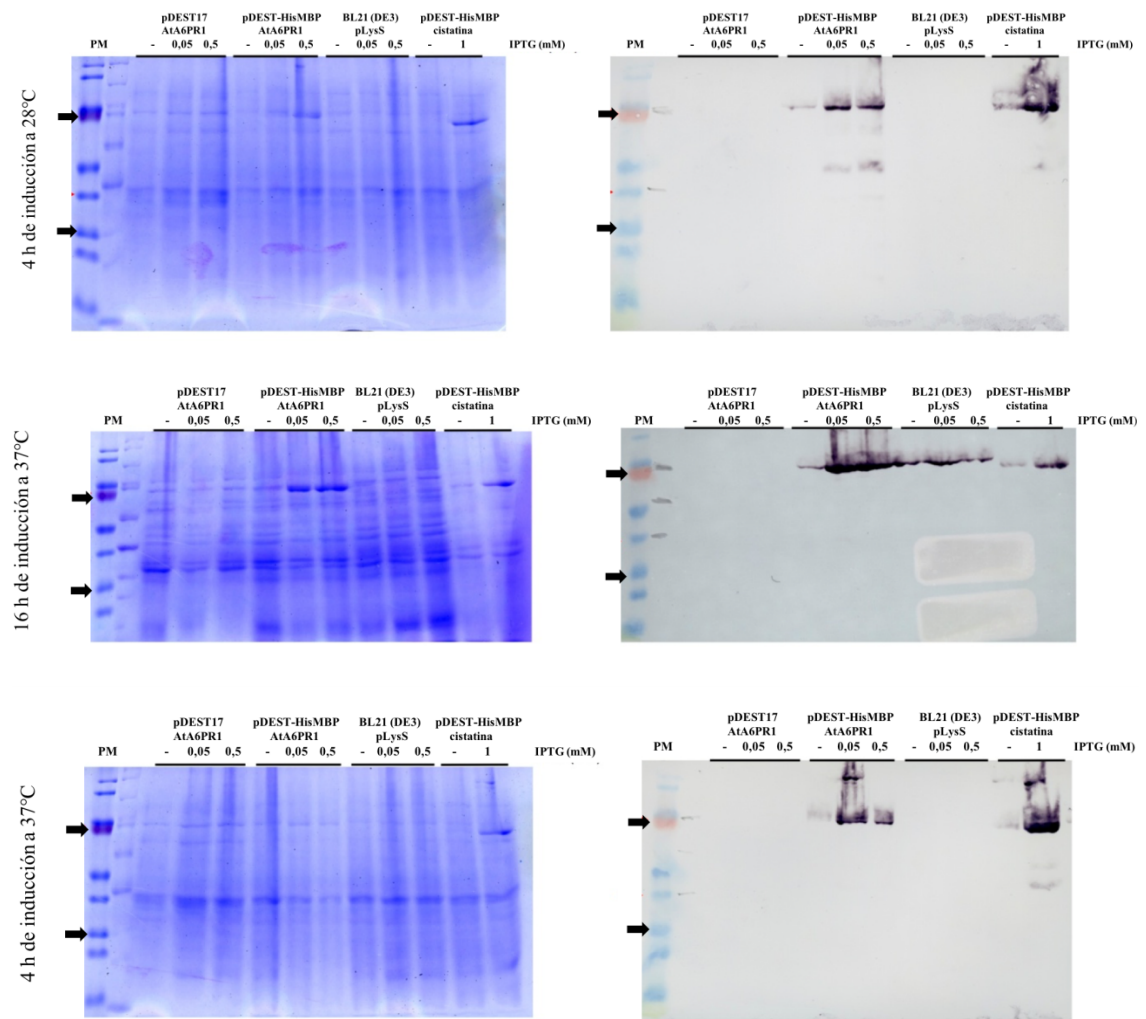


Figura 17: Optimización de condiciones para expresar AtA6PR1 recombinante a partir de pDEST17-AtA6PR1 y pDEST-HisMBP-AtA6PR1. A: 20 μ g de proteínas solubles obtenidas desde condiciones sin inducir (-), inducidas con 0,05 mM o 0,5 mM de IPTG fueron resueltas por SDS-PAGE durante 30 min a 90 V y luego 180 min a 120 V, y posteriormente teñidos con azul de Coomassie. B: Western blot anti-Histidina (1:3000) para detectar la presencia de las proteínas recombinantes. pDEST-HisMBP-cistatina fue usado como control positivo mientras que BL21 (DE3) pLysS sin transformar fue utilizada como control negativo. Las flechas indican los 70 kDa (superior) y 35 kDa (inferior) de los carriles de peso molecular (PM). Se observan bandas del tamaño esperado de aproximadamente 70 kDa para la construcción pDEST-HisMBP-AtA6PR1.

Obtenidas las condiciones óptimas de cultivo y expresión de proteínas, se comparó la potencia de la expresión de proteínas de todos los constructos, con y sin inducción (pDEST17-AtA6PR1 y 2 y pDEST-HisMBP-AtA6PR1 y 2) (Figura 18), observando bandas del tamaño esperado de 35 kDa para pDEST17-AtA6PR1 con y sin inducción sin mayores diferencias en intensidad (Figura 18 A y B, carriles 1 y 2), mientras que para AtA6PR2, no se observó bandas en el ensayo de western blot (Figura 18 B, carriles 5 y 6), a pesar de que si hay transcripción del gen (Figura 14). Por otro lado se observó bandas del tamaño esperado de 70 kDa para las proteínas HisMBP-AtA6PR1 y 2 (Figura 18, carriles 3 y 4 para HisMBP-AtA6PR1 y carriles 7 y 8 para HisMBP-AtA6PR2), donde se puede apreciar una diferencia en la intensidad de las bandas para ambos casos cuando hay o no inducción, además de observarse que la expresión de HisMBP-AtA6PR1 es mayor que HisMBP-AtA6PR2.

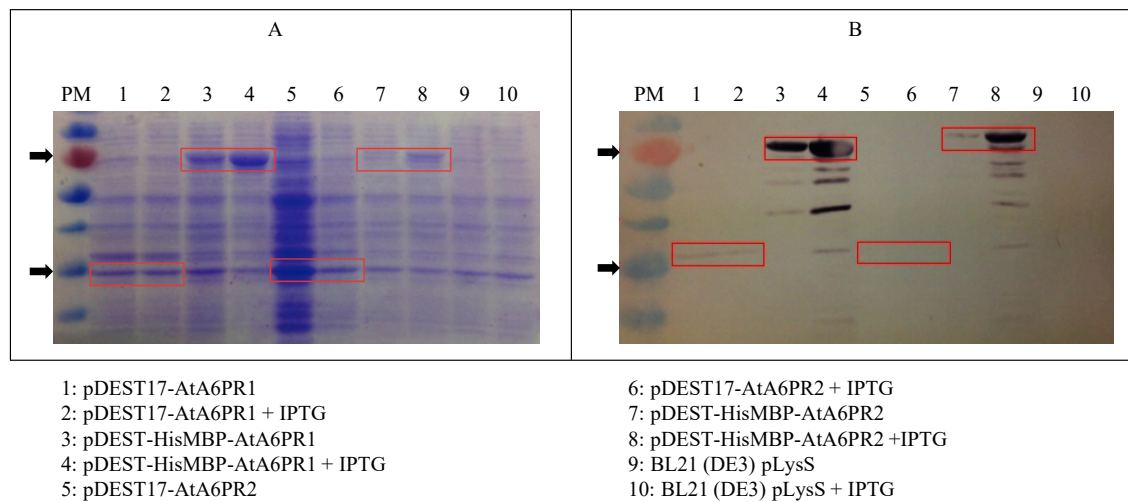


Figura 18: SDS-PAGE y Western blot utilizando los constructos pDEST17-AtA6PR1 y 2 y pDEST-HisMBP-AtA6PR1 y 2. A: 20 µg de proteínas solubles totales obtenidas desde condiciones sin inducir e inducidas con 0,5 mM de IPTG fueron resueltas por SDS-PAGE, corridos durante 30 min a 90 V y luego 90 min a 180 V, y posteriormente teñidos con azul de

Coomassie. B: Western blot anti-Histidina (1:5000) para detectar la presencia de las proteínas recombinantes. Los carriles 9 y 10 fueron utilizados como controles negativos de expresión de proteínas. Las flechas indican los 70 kDa (superior) y 35 kDa (inferior) de los carriles del marcador de peso molecular (PM).

Para tener una estimación de la cantidad de la proteína de interés que no es posible llevar a la fracción soluble, se resolvieron por SDS-PAGE las proteínas que quedaron en el pellet de los constructos pDEST17-AtA6PR1 y pDEST-HisMBP-AtA6PR1. Se observó que para la construcción pDEST17-AtA6PR1 había una mayor cantidad de proteína inmunoreactiva en el pellet, sin embargo, las bandas observadas son de un tamaño mayor al esperado (35 kDa para His-AtA6PR1), por lo que se descartó que fuese la proteína en estudio (Figura 19B, recuadro rojo). Para el caso de pDEST-HisMBP-AtA6PR1, aunque se observó señal en el pellet (Figura 19B), ésta era mucho menos intensa y difusa en comparación con los ensayos mostrados en la Figura 18.

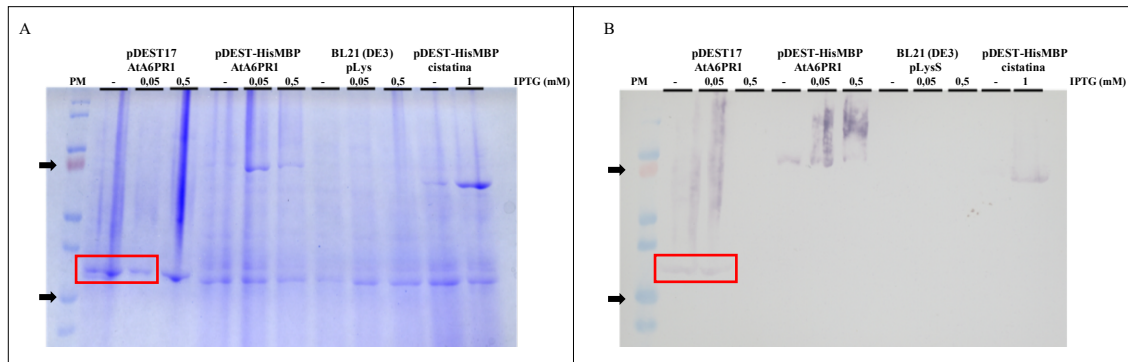


Figura 19: SDS-PAGE y Western blot de proteínas del pellet de bacterias transformadas con pDEST17-AtA6PR1 y pDEST-HisMBP-AtA6PR1. A: 20 μ g de proteínas totales del pellet obtenidas desde condiciones sin inducir (-), inducidas con 0,05 mM o 0,5 mM de IPTG fueron resueltas por SDS-PAGE durante 30 min a 90 V y luego 180 min a 120 V, y

posteriormente teñidos con azul de Coomassie. B: Western blot anti-Histidina (1:3000) de las proteínas del pellet. pDEST- HisMBP-cistatina fue usado como control positivo mientras que BL21 (DE3) pLysS sin transformar fue utilizada como control negativo. Las flechas indican los 70 kDa (superior) y 35 kDa (inferior) de los carriles de MW. Se observan bandas del tamaño esperado de aproximadamente 70 kDa.

Si bien al utilizar ambas metodologías de lisis celular, se pudo detectar las proteínas recombinantes de interés, se observó que la sonicación permitía obtener menores cantidades de proteínas de interés en la fracción soluble en comparación con el reactivo B-PER. Por ese motivo, se siguió utilizando la técnica de extracción con el reactivo B-PER para posteriormente purificar las proteínas de interés. Además, se enfocaron los estudios principalmente en los constructos que poseían los epítomos HisMBP, ya que en estos casos la cantidad de proteína obtenida era siempre mayor.

5.5.3 Purificación de proteínas

Optimizadas las condiciones y corroborada la expresión de proteínas solubles mediante SDS-PAGE y Western blot, se procedió a purificar las proteínas de interés. Esto se realizó mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) utilizando una columna de Níquel (sección 4.7.3; Figura 20).

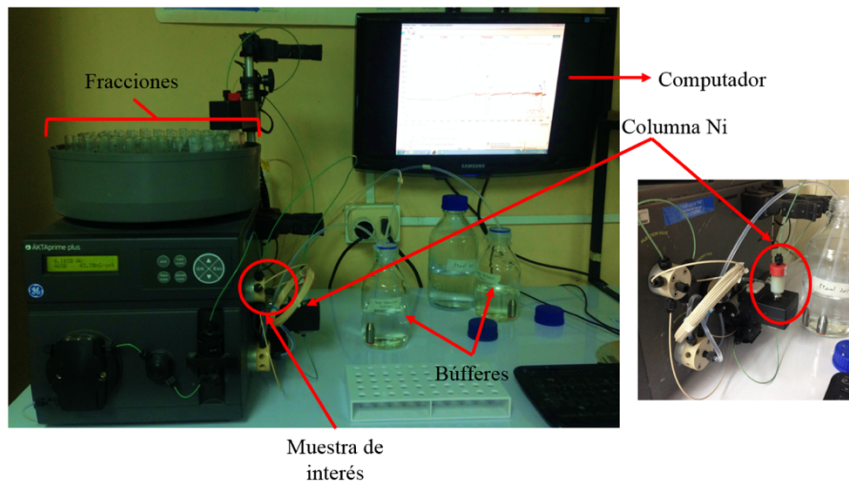


Figura 20: Equipo de purificación de proteínas, ÄktaPrime plus. Sistema automatizado de carga de proteínas y purificación de las mismas. Equipo conectado a un computador el cual va registrando la conductividad, pH, y absorbancia. Muestras purificadas son colectadas en tubos de 2 ml (Fracciones).

Un extracto proveniente del sistema de expresión con pDEST-HisMBP-AtA6PR1 fue aplicado sobre la columna y luego de las etapas de lavado y elución se procedió a cuantificar la concentración de proteína en las fracciones obtenidas, las cuales fueron comparadas con el perfil de elución (siguiendo la absorbancia a 280 nm) obtenido desde el equipo de purificación. Como era esperado, las fracciones con mayor contenido de proteína las encontramos alrededor del peak de absorbancia (Figura 21, fracciones 4 - 7).

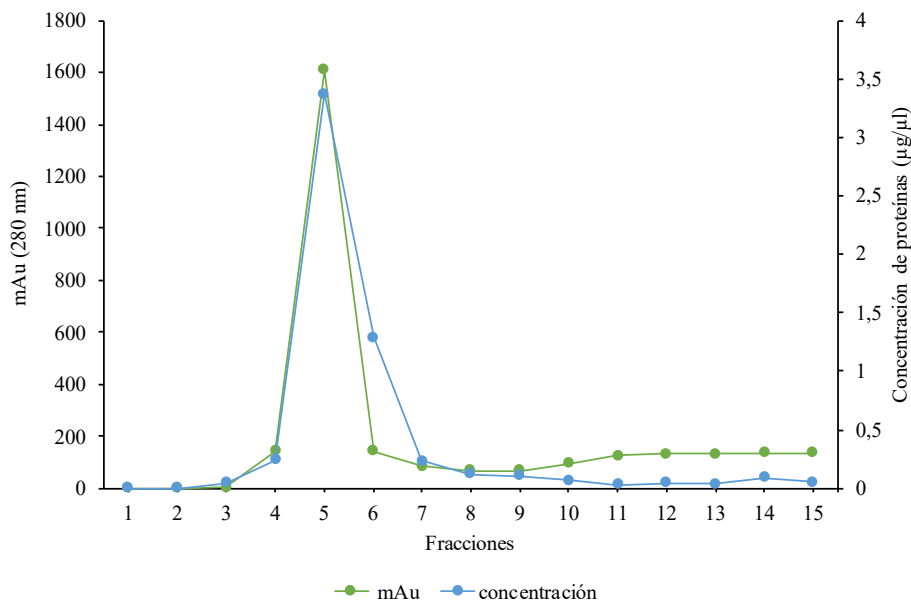


Figura 21: Correlación entre la cuantificación de proteínas de las fracciones purificadas y cromatograma de absorbancia. Línea punteada azul corresponde a la concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de proteínas cuantificadas mediante BCA, mientras que la línea punteada verde corresponde al cromatograma de la purificación de la proteína de fusión HisMBP-AtA6PR1 utilizando 500 mM de Imidazol para la elución, ambos análisis fueron realizados para 15 fracciones.

Conociendo qué fracciones eran las que presentaban mayor concentración de proteínas y correlacionadas con el cromatograma de absorbancia, se procedió a cargar distintas cantidades de las fracciones 4, 5, 6 y 7 en geles SDS-PAGE, además de realizar un ensayo de Western blot anti-Histidina para detectar la proteína de interés (Figura 22), observándose que para las 4 fracciones ensayadas, se obtuvo una banda de aproximadamente 70 kDa, concordante con el tamaño esperado. Estas 4 fracciones fueron mezcladas, obtenido así una solución de proteína enriquecida en la banda de aproximadamente 70 kDa, con las cuales se procedió a realizar los ensayos de actividad mostrados más adelante (sección 5.6.4).

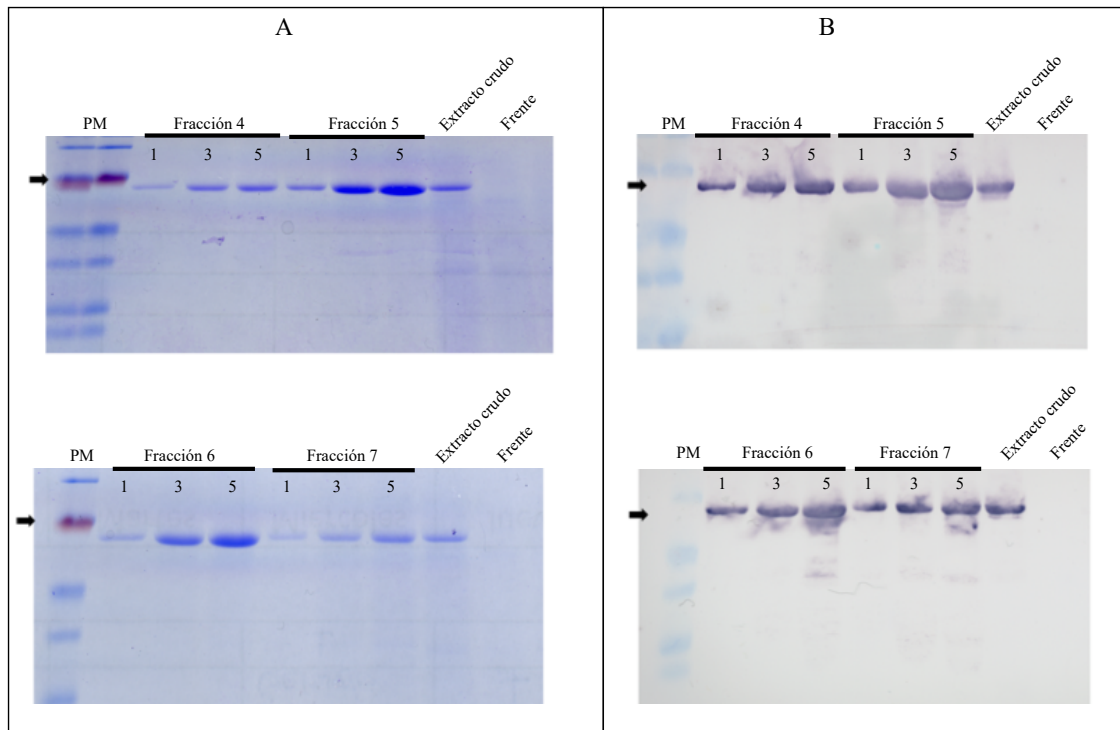


Figura 22: SDS-PAGE y Western blot de 4 fracciones de proteínas purificadas usando pDEST-HisMBP-AtA6PR1. A: SDS-PAGE cargado con 1, 3 y 5 µg de proteínas purificadas de las fracciones 4, 5, 6 y 7. B: Western blot anti-Histidina (1:5000). Se observa la presencia de una sola banda de aproximadamente 70 kDa correspondiente al tamaño esperado. Carriles de Extracto crudo usado como control de carga, Frente, corresponde a componentes no retenidos por la columna. La flecha indica 70 kDa del marcador de peso molecular (PM).

Se logró purificar también la proteína de fusión His-AtA6PR1, se cuantificaron las distintas fracciones obtenidas y se cargaron en geles SDS-PAGE aquellas fracciones con mayor concentración (Figura 23), observándose la banda del tamaño esperado de aproximadamente 35 kDa en las fracciones 7, 8, 9 y 10, siendo más intensa la banda del carril 8. Sin embargo, estas muestras no presentaron actividad enzimática al realizar los ensayos respectivos (dato no mostrado).

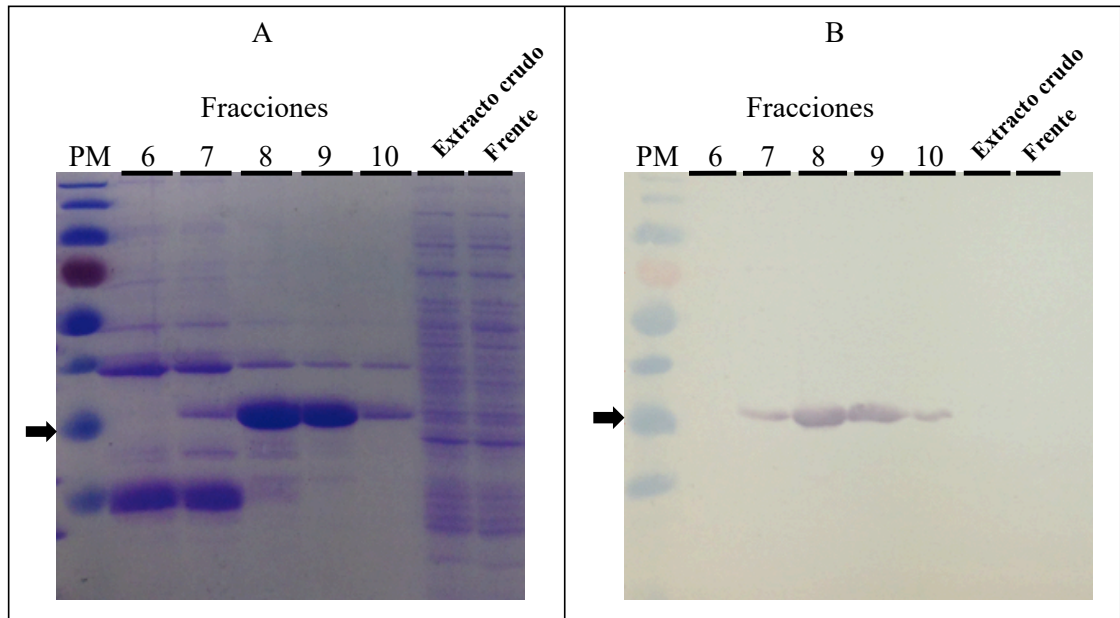


Figura 23: SDS-PAGE y Western blot de las proteínas de fusión purificadas His-AtA6PR1. A: SDS-PAGE cargado con 20 μ g de proteínas purificadas de las fracciones (6, 7, 8, 9, 10, extracto crudo y frente). B: Western blot anti-Histidina (1:5000). Se observa la presencia de bandas en los carriles 7, 8, 9 y 10 de 35 kDa aproximadamente. La flecha indica los 35 kDa del carril de peso molecular (PM).

Posteriormente se intentó purificar nuevamente las proteínas de fusión His-AtA6PR1, His-AtA6PR2, HisMBP-AtA6PR1 y HisMBP-AtA6PR2, sin embargo, no se lograron obtener las proteínas purificadas, solo se observaron en el frente de purificación la presencia de la proteína de interés HisMBP-AtA6PR1 y 2 tanto en el SDS-PAGE como en el western blot, mientras que para las proteínas de fusión His-AtA6PR1 y 2 se observó señal en el frente de purificación (SDS-PAGE) pero no en el western blot (Figura 24), lo cual nos indicaría que las proteínas en estudio eluyeron antes de aplicar el buffer de elución.

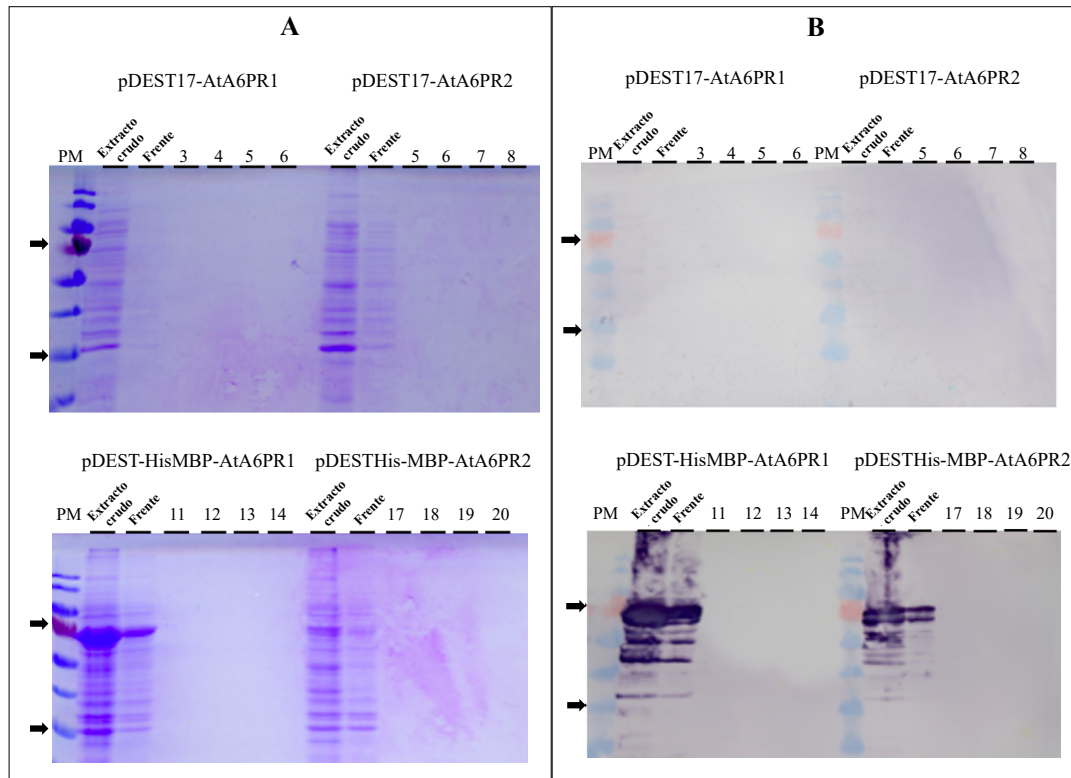


Figura 24: SDS-PAGE y Western blot de las proteínas de fusión purificadas His-AtA6PR1, His-AtA6PR2, HisMBP-AtA6PR1 y HisMBP-AtA6PR2.A: SDS-PAGE cargado con 20 μ g de **proteínas** purificadas de las fracciones (3, 4, 5 y 6 para pDEST17-AtA6PR1, 5, 6, 7 y 8 para pDEST17-AtA6PR2, 11, 12, 13 y 14 para pDEST-HisMBP-AtA6PR1 y 17, 18, 19 y 20 para pDEST-HisMBP-AtA6PR2). B: Western blot anti-Histidina (1:5000). Se observa la presencia de múltiples bandas en los carriles del extracto crudo y frente (componentes no retenidos por la columna). Las flechas indican los 70 kDa (superior) y 35 kDa (inferior) de los carriles de peso molecular (PM).

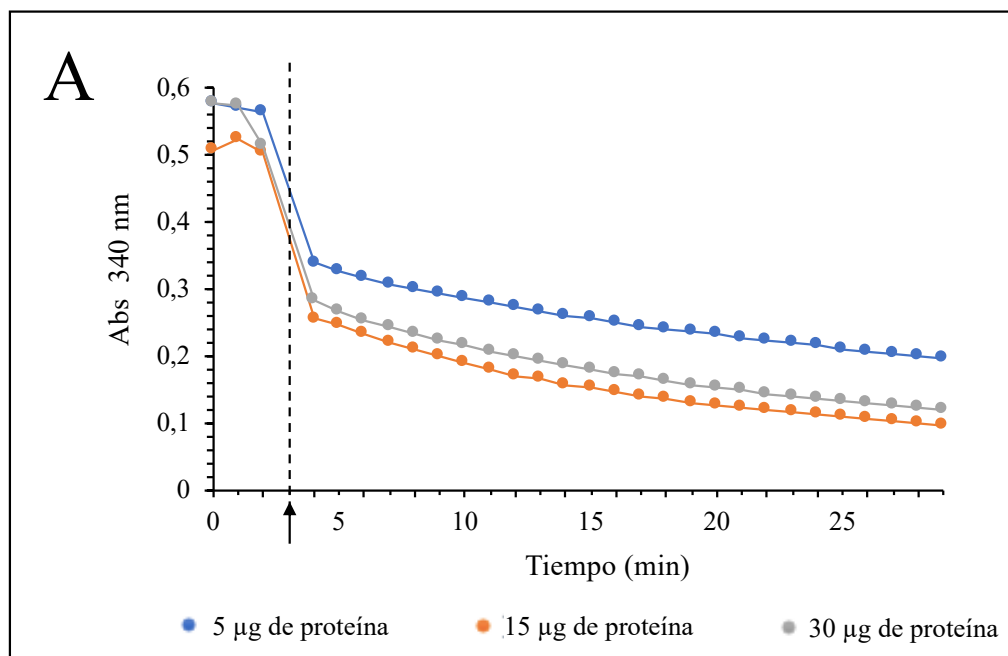
Se realizaron varios intentos para obtener proteínas purificadas de los 4 constructos trabajados durante el desarrollo de esta Tesis, sin embargo, solo fue posible obtener una purificación para la proteína recombinante HisMBP-AtA6PR1. Para la purificación de los 4 constructos, se tuvo diversos problemas. En algunos casos al momento de cargar las

muestras la columna se obstruía. Se trató de corregir esta dificultad centrifugando a máxima velocidad las muestras y filtrándolas con filtro de 0,22 μm , sin embargo, no se obtenía proteína purificada. En otros casos se obtuvieron fracciones enriquecidas, pero al momento de cuantificar y analizar mediante western blot, no se observó presencia de proteína recombinante como se muestra en la figura 24.

5.6 Ensayos de actividad enzimática

5.6.1 Ensayo de actividad con proteína comercial pura A6PR de humano

Se realizó un ensayo de actividad con la proteína A6PR humana comercial, para ello se probaron 3 concentraciones diferentes de proteína, 5, 15 y 30 μg y se observó el comportamiento de la absorbancia a 340 nm (Figura 25). Así mismo, se realizaron los controles respectivos (ensayo de actividad sin enzima, sin sustrato (G6P) y sin NADPH, datos no mostrados).



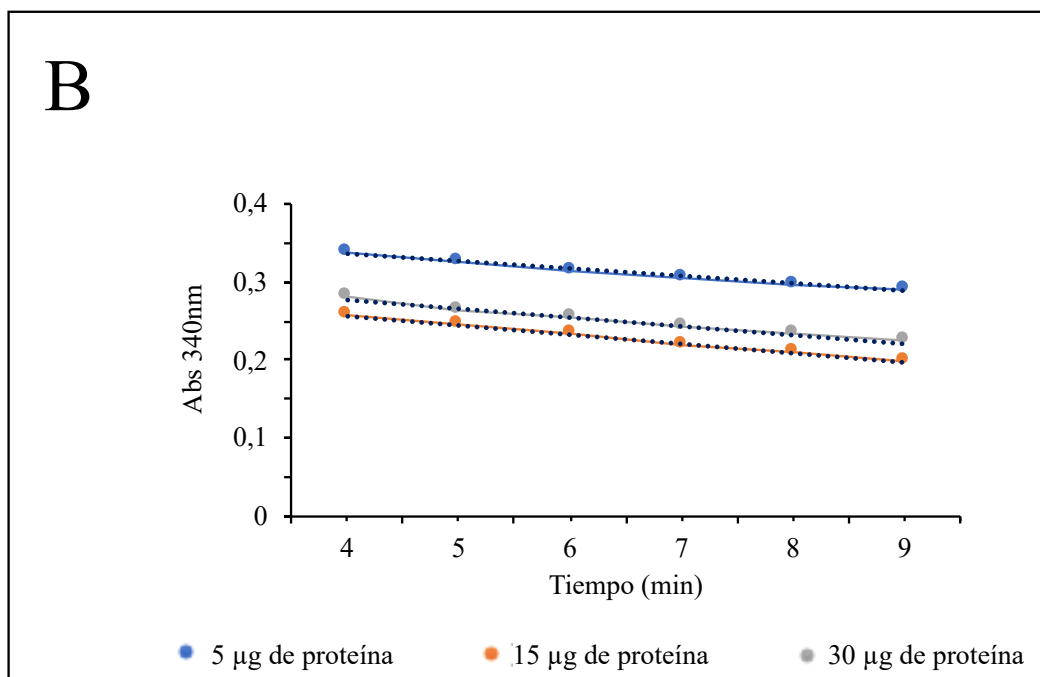


Figura 25: Ensayo de actividad de A6PR comercial. A: Gráfica del comportamiento de la absorbancia a 340 nm durante 29 min a 25°C de A6PR. 5, 15 y 30 µg de proteínas fueron utilizados para el ensayo. Flecha negra indica la adición del sustrato G6P (50 mM). B: Gráfica de la selección del rango lineal (entre 4 y 9 minutos) de absorbancia a 340 nm, utilizados para el cálculo de actividad específica de la enzima.

Se observó una disminución de la absorbancia a 340 nm del NADPH, partiendo en 0,55 U Abs hasta aproximadamente 0,1 U de Abs, lo que daría cuenta de la oxidación de NADPH y reducción de G6P (Figura 25 A). Para el cálculo de actividad específica de A6PR comercial, se utilizaron los datos del rango lineal de la cinética medida, es decir, los valores entre el minuto 4 y el minuto 9 de medición de absorbancia (Figura 25 B). La Tabla VI muestra los valores de actividad calculados, obteniendo mayores valores de actividad con menor concentración de enzima utilizada.

Tabla VI: Actividad específica de A6PR comercial. Valores de la actividad específica de la enzima pura comercial A6PR, utilizando 5, 15 y 30 µg de proteína en cada ensayo.

	[Proteína]		
	5 µg	15 µg	30 µg
Actividad específica (U/mg)	0,098	0,038	0,020

5.6.2 Ensayo con extractos crudos y fracción soluble de His-MdA6PR y *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

Estudios previos ya habían caracterizado la enzima A6PR de manzana (ej: Figueroa e Iglesias, 2010), por lo cual se realizaron ensayos de actividad con los extractos crudos y fracción solubles de proteínas His-MdA6PR como control positivo, extraídos mediante sonicación y B-PER inducidos con IPTG. Según la gráfica de la Figura 26 A correspondiente a proteínas obtenidas mediante sonicación (constructo His-MdA6PR), se observó una leve disminución en la absorbancia medida a 340 nm, tanto en el extracto crudo como en la fracción soluble y partiendo con valores muy por debajo de los 0,6 U Abs esperados para el NADPH, lo cual puede ser debido a la mezcla de diversas proteínas presentes en *E. coli*. De la misma manera, se realizaron ensayos de actividad con los extractos crudos y fracción solubles de proteínas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS obtenidas por sonicación, observando un comportamiento similar (control negativo, Figura 26 B).

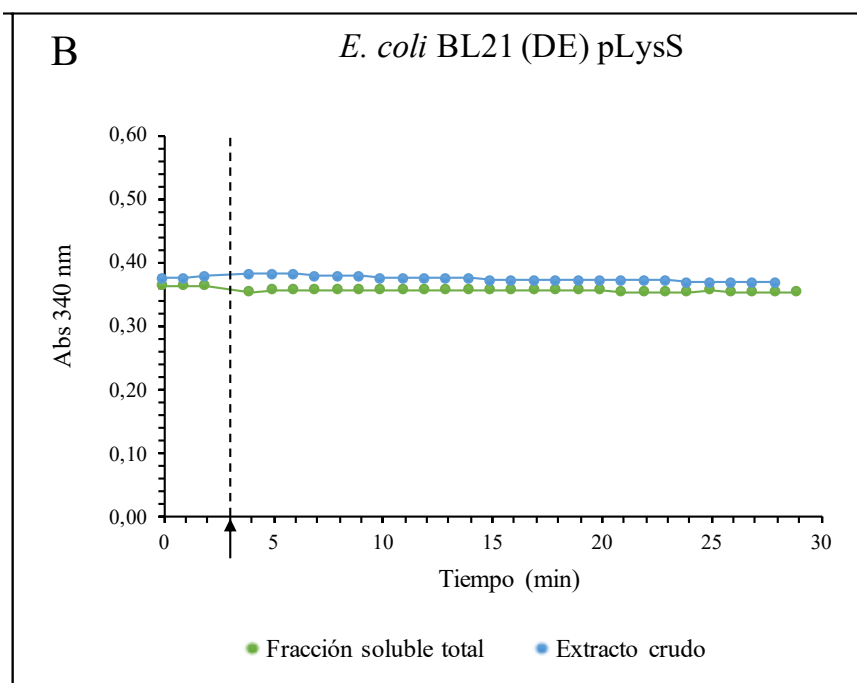
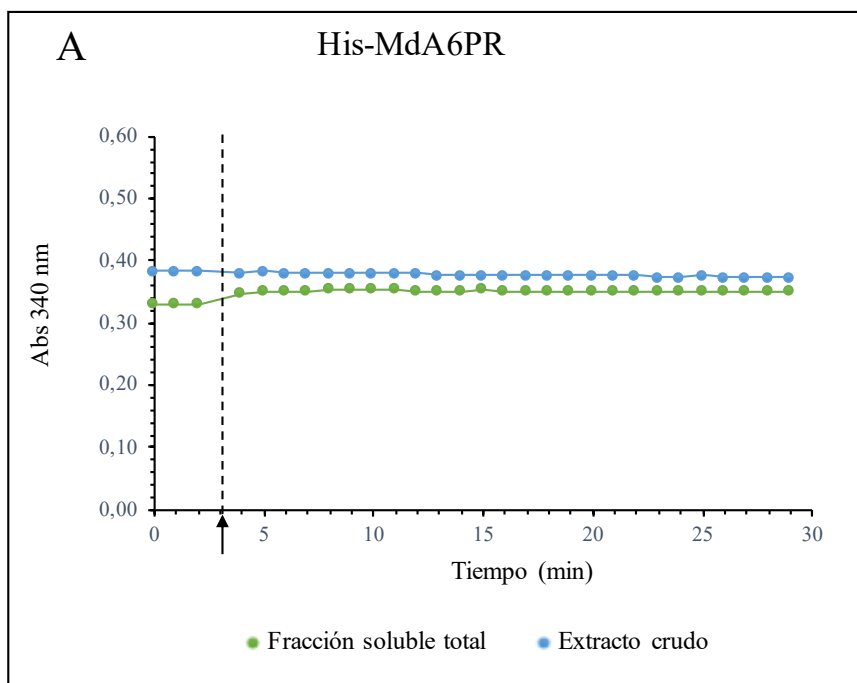
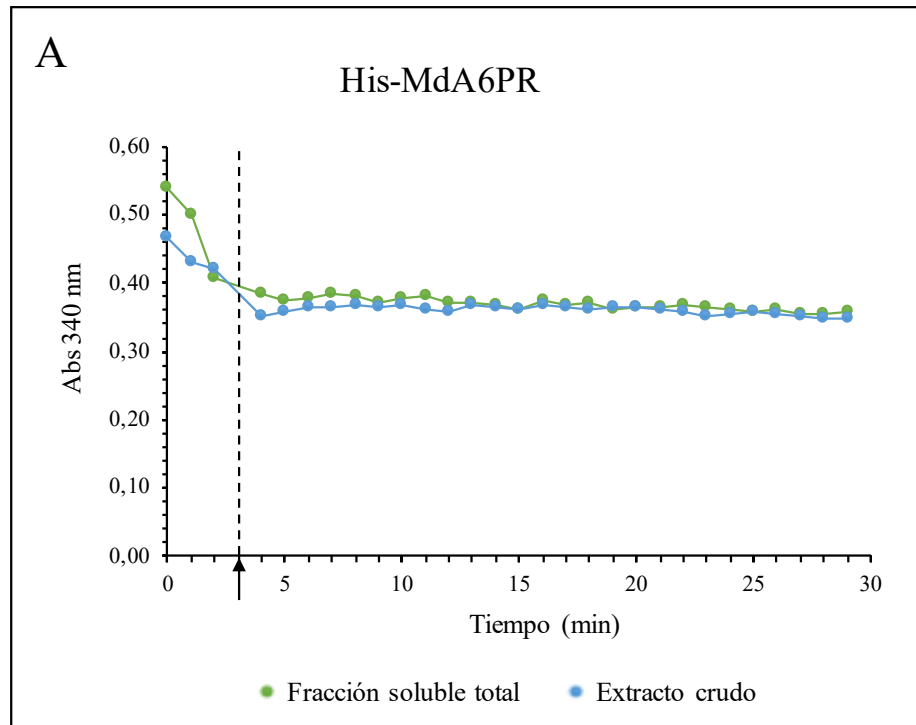


Figura 26: Ensayo de actividad de extractos crudos y fracción soluble de His-MdA6PR y BL21 (DE3) pLysS obtenidas mediante sonicación. Gráfica del comportamiento de la absorbancia a 340 nm durante 29 min a 25°C. A: Ensayo de actividad con proteínas de la fracción soluble y extracto crudo de MdA6PR obtenidas mediante sonicación, B: Ensayo de actividad

con proteínas de la fracción soluble y extracto crudo de BL21 (DE3) pLysS, obtenidas mediante sonicación. Flecha negra indica adición de sustrato G6P.

El comportamiento observado de la absorbancia a 340 nm de proteínas obtenidas mediante el reactivo B-PER se puede observar en la Figura 27. Se puede apreciar que los valores de absorbancia parten en valores de alrededor de 0,5 U Abs y la disminución observada en el tiempo es mínima, similar al comportamiento observado en la Figura 26, lo cual nos estaría indicando que la proteína no presenta actividad.



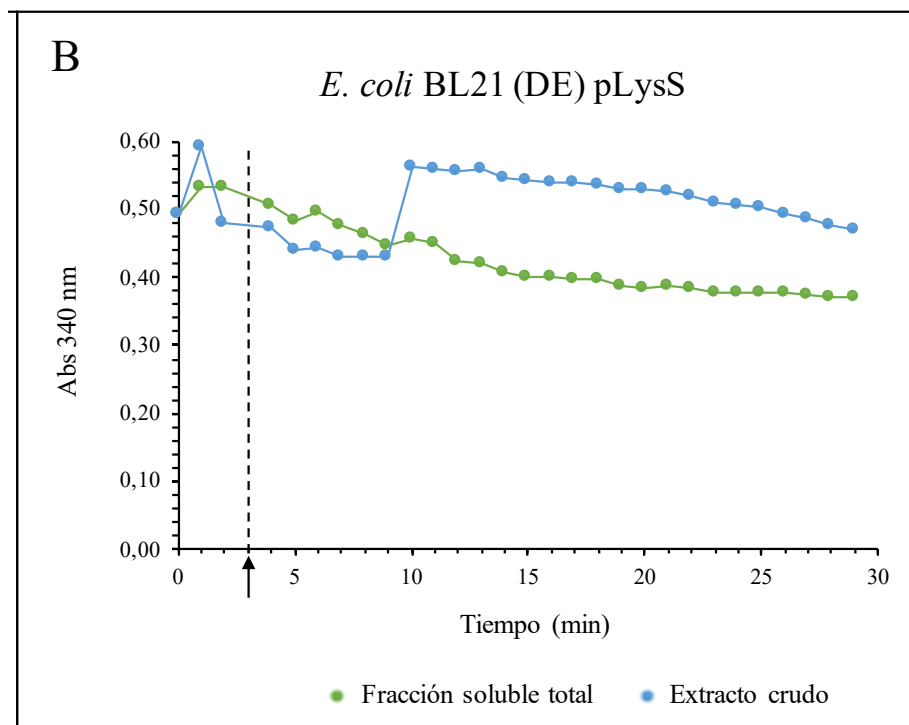
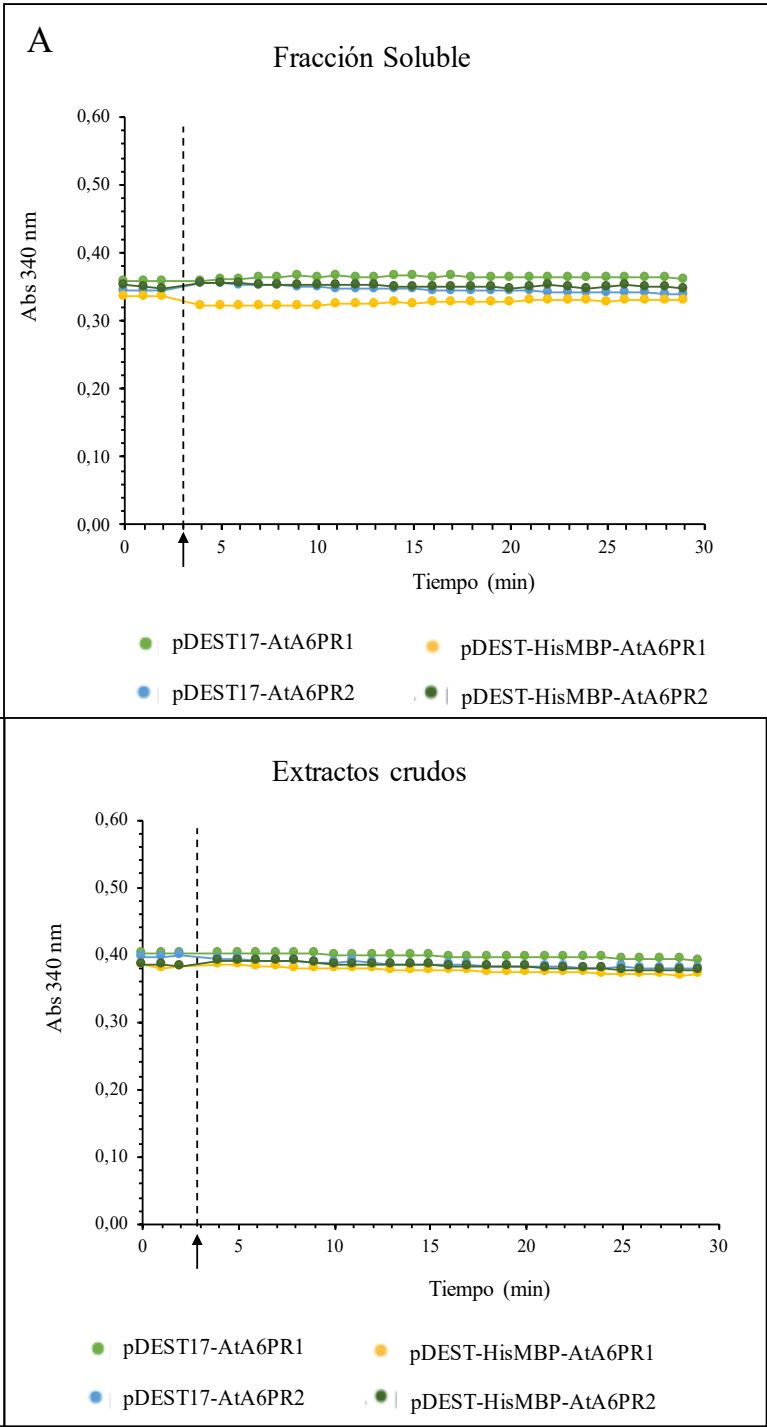


Figura 27: Ensayo de actividad de extractos crudos y fracción soluble de His-MdA6PR y BL21 (DE3) pLysS obtenidas mediante B-PER. Gráfica del comportamiento de la absorbancia a 340 nm durante 29 min a 25°C. A: Ensayo de actividad con proteínas de la fracción soluble y extracto crudo de MdA6PR obtenidas mediante el reactivo B-PER, B: Ensayo de actividad con proteínas de la fracción soluble y extracto crudo de BL21 (DE3) pLysS, obtenidas mediante el reactivo B-PER. Flecha negra indica adición de sustrato G6P.

5.6.3 Ensayo con extractos crudos de His-AtA6PR1 y 2 y HisMBP-AtA6PR1 y 2

Al igual que en la sección 5.6.2, se realizaron ensayos de actividad midiendo la absorbancia a 340 nm de los extractos crudos y de la fracción soluble de las proteínas de interés obtenidas mediante sonicación (A) y B-PER (B) (Figura 28). Se observó en el ensayo con proteínas obtenidas mediante sonicación, que el cambio de absorbancia fue mínimo, además, se vio la misma tendencia en los ensayos con las proteínas obtenidas mediante B-PER. Estos hallazgos sugerirían que al haber una mezcla de todas las proteínas

de *E. coli*, estas comienzan a utilizar inmediatamente NADPH, lo que conlleva a que al momento de agregar el sustrato G6P, no se aprecie un cambio sustancial en los valores de Abs (Figura 28).



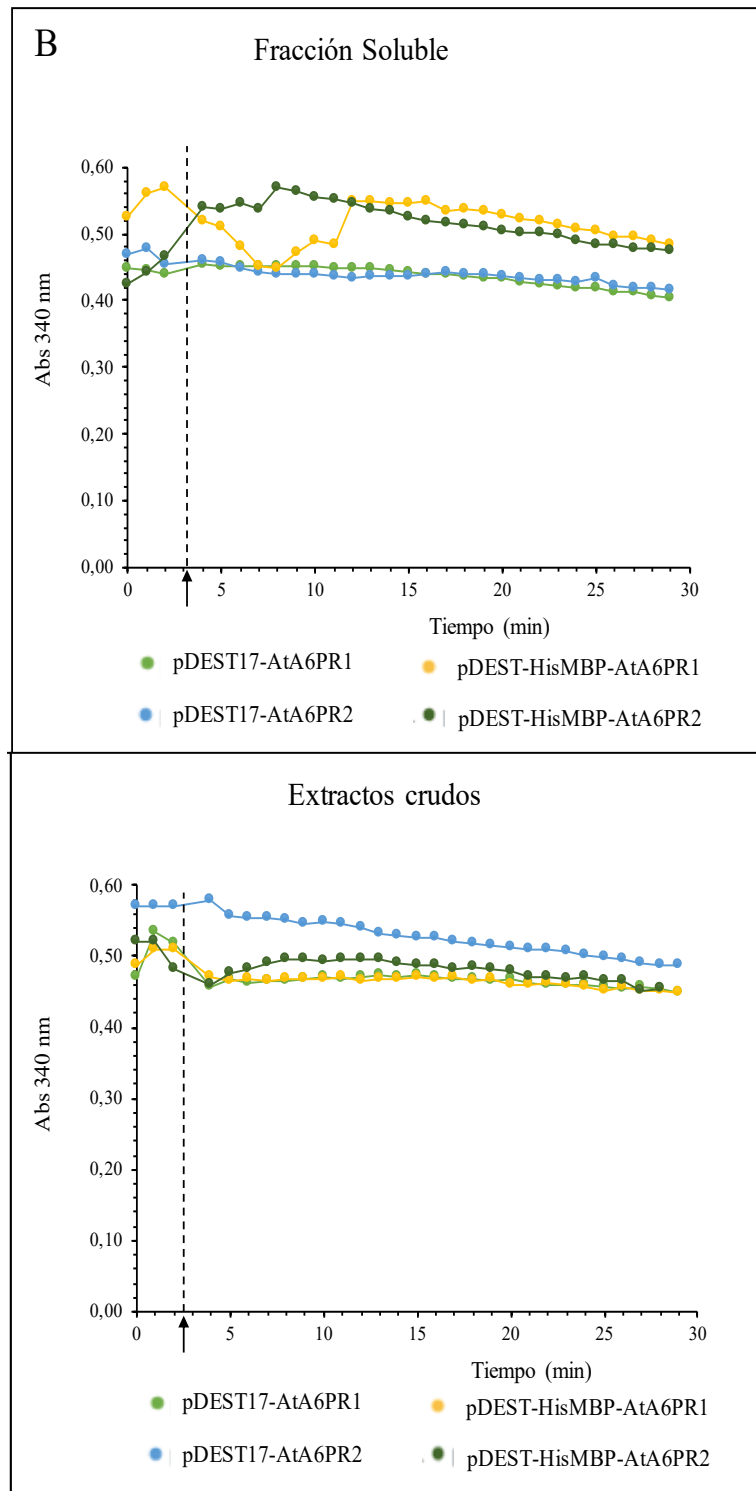


Figura 28: Ensayo de actividad de extractos crudos y fracción soluble de His-AtA6PR1 y 2, y HisMBP-AtA6PR1 y 2. Gráfica del comportamiento de la absorbancia a 340 nm durante

29 min a 25°C. A: Ensayo de actividad con proteínas de la fracción soluble y extracto crudo de los constructos His-AtA6PR1 y 2 y HisMBP-AtA6PR1 obtenidos mediante sonicación y, B: Ensayo de actividad con proteínas de la fracción soluble y extracto crudo de His-AtA6PR1 y 2 y HisMBP-AtA6PR1 obtenidos mediante extracción con B-PER. Flecha negra indica adición de sustrato G6P.

5.6.4 Ensayo con proteína purificada His-AtA6PR1 y 2 y HisMBP-AtA6PR1 y 2

Los ensayos de purificación fueron realizados con proteínas extraídas con el reactivo B-PER (sección 4.7.2) y posteriormente pasadas por la columna de Níquel (sección 4.7.3). Como se obtuvo proteínas enriquecidas de la construcción pDEST17-AtA6PR1 y pDEST-HisMBP-AtA6PR1 (Figura 23 y 22 respectivamente), se realizaron ensayos de actividad con estas. Para la proteína recombinante His-AtA6PR1 no se logró obtener una curva de absorbancia descendente y por ende no se obtuvo actividad de esta proteína, mientras que para la proteína HisMBP-AtA6PR1 se observó que los valores de absorbancia partían desde los 0,25 U Abs aproximadamente y no desde los 0,6 esperados por la presencia de NADPH. Además, la disminución en absorbancia observada fue mínima. Estos ensayos fueron repetidos 5 veces y en cada caso; los valores obtenidos eran similares en cuanto a una disminución mínima de la absorbancia, pero con datos muy distintos entre las réplicas. Aún así, se realizaron ensayos de actividad a modo de ejemplo, con diferentes concentraciones de proteínas y en todos los casos se obtuvo el mismo resultado (Figura 29 A). Luego se calculó el valor de la actividad específica de la enzima, para ello se utilizó el rango lineal de la curva de absorbancia, entre los 4 y 9 minutos, observando que con menor cantidad de enzima, la actividad era mayor (Tabla VII).

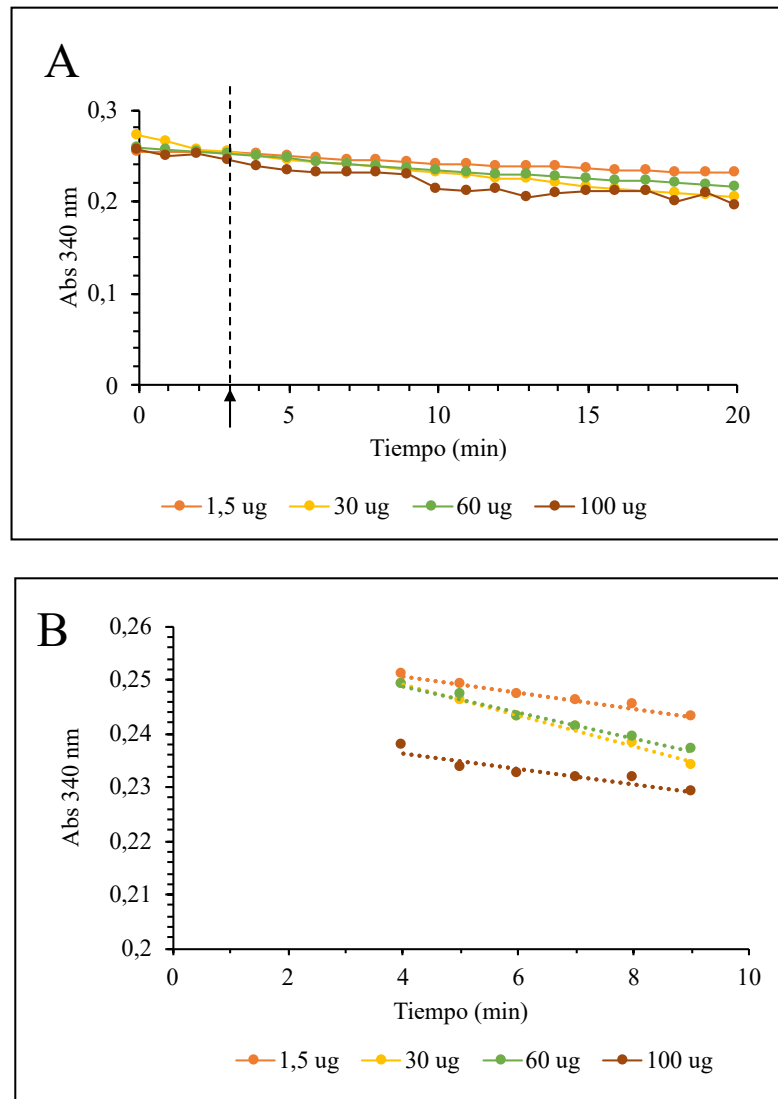


Figura 29: Ensayo de actividad de proteínas purificadas HisMBP-AtA6PR1. A: Gráfica del comportamiento de la absorbancia a 340 nm durante 20 min a 25°C de proteínas de fusión HisMBP-AtA6PR1 purificada sometida a ensayo de actividad. Se ensayaron concentraciones de 1,5 – 30 – 60 y 100 µg de proteína purificada. Flecha negra indica adición de sustrato G6P (50 mM). B: Gráfica correspondiente al rango lineal (entre 4 y 9 minutos) de absorbancia a 340 nm, utilizados para el cálculo de actividad específica de la enzima.

Tabla VII: Actividad específica de HisMBP-AtA6PR1. Valores de la actividad específica de la enzima purificada HisMBP-AtA6PR1, utilizando 1,5 – 30 – 60 y 100 μg de proteína en cada ensayo. Sustratos: glucosa 6-fosfato y NADPH.

	Concentración de proteína			
	1,5 μg	30 μg	60 μg	100 μg
Actividad específica (U/mg)	0,268	0,0223	0,0129	0,003

En resumen, se logró generar los vectores con los genes de interés optimizados, corroborar la presencia de estos y determinar que estaban siendo expresados (transcritos y traducidos). Fue posible calcular la actividad específica de la enzima enriquecida, sin embargo, los datos obtenidos para cada concentración de enzima ensayada fueron distintos entre sí, contradictorio a lo esperado teóricamente, donde se esperaría que, independiente de la concentración de enzima, la actividad de ésta sea la misma.

6. DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de esta Tesis de Magíster, se tenía como objetivo principal la caracterización bioquímica de las enzimas recombinantes AtA6PR1 y 2 de *A. thaliana* a partir de las secuencias encontradas por Sofía Zamudio en 2010 de 2 posibles aldosas 6-fosfato reductasas las cuales poseen un 65% de identidad aminoacídica con A6PRs de *Rosaceae*. Para ello, se utilizó una nueva estrategia en comparación con las ya utilizadas en primera instancia por ella y así poder determinar si efectivamente estas tenían la capacidad de reducir glucosa 6-fosfato y determinar entonces que estos 2 marcos de lectura encontrados efectivamente codifican enzimas que actúan en la ruta de síntesis de sorbitol.

6.1 Optimización de secuencias nucleotídicas de AtA6PR1 y AtA6PR2

La estrategia abordada para poder determinar si las secuencias génicas At2g21250 y At2g21260 codificaban para enzimas aldo ceto reductasas, fue optimizar las secuencias nucleotídicas y expresarlas en el sistema heterólogo de *E. coli*. Esto se realizó primero ya que Zamudio en 2012, trabajando con las secuencias nativas de ambos genes y expresándolas en 3 sistemas (a partir de plantas transformadas, expresión *in vitro* y expresión desde *E. coli*) no logró obtener suficiente cantidad de proteínas y consecuentemente no pudo caracterizarlas enzimáticamente, segundo porque se ha observado que la optimización de codones es una herramienta efectiva para la obtención de abundante cantidad de proteína, sobre todo cuando esta está siendo expresada en un sistema heterólogo (Yadava y Ockenhouse, 2003; Kwon y cols, 2016; Li y cols, 2013) ya

que codones sinónimos se reconocen con diferentes eficiencias por los ARNt. En diferentes organismos ya sea eucariotas o procariotas, el sesgo del uso de codones se correlaciona con los niveles de ARNt o con el número de copias de genes de ARNt, además el uso de codones regula la velocidad de elongación en la traducción, lo que da como resultado tasas de decodificación de ribosomas no uniformes en los ARNm durante la traducción que se adapta al proceso de plegamiento de proteínas (Liu, 2020).

Finalmente, las secuencias génicas de AtA6PR1 y AtA6PR2 fueron optimizadas para su expresión en *E. coli* y sintetizadas de manera exitosa, corroborándose estas mediante PCR y secuenciación luego de ser clonadas en el vector de entrada pCR8 (sección 5.2.1).

6.2 Obtención de vectores de expresión

Se planteó la estrategia de trabajar con dos vectores de expresión, pDEST-HisMBP y pDEST17, ya que ambos vectores permiten generar proteínas de fusión con epítopos en el extremo amino terminal. Se escogieron estos ya que en el estudio realizado por Figueroa e Iglesias (2010) se observó una baja actividad específica de MdA6PR cuando el epítipo estaba en el extremo C-terminal, atribuible a que la enzima al actuar como dímero para catalizar la reacción de oxidación de G6P requeriría de una interacción en sus extremos C-terminales y que posiblemente cuando el epítipo estaba en esa región, se generaba un impedimento estérico al momento de liberar los productos generados durante la reacción. Además, como la localización de la proteína es citosólica, esta no poseería señal de destinación en el extremo N-terminal, por lo que no debería interferir con el destino final de las proteínas recombinantes al poner un epítipo en ese extremo. Por otro lado, ambos vectores a pesar de poseer promotores diferentes pueden ser inducidos por IPTG, lo cual

nos permitió obtener mayor cantidad de proteína en comparación a la condición sin inducir (sección 5.5.1) en el caso de la utilización del vector pDEST-HisMBP. Se recuerda que este vector, además de poseer el epítipo de 6X-His, posee la secuencia MBP, la cual facilite que la proteína de fusión generada sea soluble, permitiendo que esta pueda ser extraída fácilmente en comparación con la utilización del vector pDEST17, que solo posee el epítipo de 6X-His. Además, en pDEST-HisMBP, los epítipos evitan la agregación de proteínas (Waugh, 2005) y el tag HisMBP puede ser removido por la proteasa TEV, dejando una proteína similar a la nativa (Waugh, 2011). Finalmente se lograron obtener los vectores de expresión con las secuencias optimizadas de *AtA6PR1* y *AtA6PR2*, las cuales al corroborarlas mediante ensayos de PCR y expresión del gen (sección 5.3, Figura 13 y sección 5.4, Figura 14 respectivamente), se constató que efectivamente las secuencias estaban ligadas en los vectores y estaban siendo expresadas.

6.3 Expresión de proteínas

Una vez obtenidos y analizados los vectores de expresión, se procedió a la expresión de proteínas en el sistema heterólogo escogido, *E. coli*. Este hospedero fue elegido debido a su fácil manipulación, y rápido crecimiento en comparación con levaduras. La cepa utilizada, BL21(DE3)pLysS, permite una alta expresión de proteínas de interés de genes que estén bajo el control del promotor T7 (como lo es en pDEST17), además esta cepa al contener el plásmido pLysS que codifica para la lisozima T7, reduce los niveles de expresión basales de los genes blanco bajo el control del promotor T7, pero no interfiere con el nivel de expresión alcanzado después de la inducción por IPTG (Studier y Moffatt, 1986; Davanloo y cols., 1984). Esta cepa también puede ser transformada con el

vector pDEST-HisMBP, ya que como fue mencionado en la sección 6.2, la proteína MBP favorece la solubilización de las proteínas siendo extraídas fácilmente.

Para determinar la mejor forma de expresar proteínas, se utilizó el inductor IPTG, ya que los vectores utilizados en presencia de este compuesto permiten generar una mayor cantidad de proteínas, como se logró observar al realizar la optimización de las condiciones de inducción (sección 5.5.1), creciendo finalmente las bacterias con una concentración final de 0,5 mM de IPTG. Luego, la metodología para extraer las proteínas principalmente de la fracción soluble, fueron sonicación y utilizando el reactivo B-PER. La primera es una técnica de aplicación de ultrasonido a través de un medio como el agua. En esta técnica, se produce el fenómeno de cavitación donde el ultrasonido se propaga por el líquido creando millones de burbujas debido a los cambios de presión; estas se expanden y estallan, generando la disrupción de las membranas celulares (Piyasena y cols, 2003) liberando al medio su contenido. Luego, mediante centrifugación es posible separar proteínas solubles y del pellet, mientras que el reactivo B-PER es un detergente no iónico que permite lisar las células, solubilizar proteínas nativas o recombinantes sin desnaturarlas y luego por centrifugación separar las fracciones de proteínas solubles y del pellet (<https://www.thermofisher.com/>). Para la metodología de sonicación fue necesario optimizar las condiciones, ya que esta técnica es dependiente de la cantidad de pulsos y tiempo de sonicación; mientras mayor es el tiempo que las células son sonicadas, se tiene el riesgo de fragmentar las proteínas (Malik y cols., 2017), dejándolas inutilizadas para experimentos posteriores como caracterización enzimática. Sin embargo, a pesar de obtener la condición óptima para extraer proteínas, cuando estas eran cuantificadas, el rendimiento de proteínas era más bajo en comparación con lo obtenido con la extracción

mediante B-PER (Figuras 16 y 17 respectivamente). De igual manera se realizaron ensayos de actividad con los extractos crudos y fracciones solubles, sin embargo, no se obtuvieron resultados concluyentes, ya que la curva de absorbancia medida no siguió una tendencia hacia la disminución (Figura 28 A y B). Una explicación puede ser la alta actividad del resto de las enzimas presentes en la fracción soluble y el extracto crudo o una sinergia entre las proteínas propias de *E. coli* y la proteína de fusión, generando una baja abrupta de la absorbancia la cual no pudo ser medida, ya que al momento de agregar el sustrato para comenzar con la reacción, toma alrededor de 1 min, tiempo suficiente para que la reacción de reducción del NADPH se haya realizado o ya se haya utilizado todo el NADPH disponible, o la cantidad de NADPH usado en la reacción no estuviese en concentraciones saturantes. Esto se observó tanto en proteínas obtenidas por sonicación como por B-PER (Figura 28 A y B).

La principal razón entonces para seguir trabajando con el reactivo B-PER como método de extracción de proteínas preferido, fue la concentración de estas, la cual permitió que se pasara al paso siguiente de purificación mediante columna.

6.4 Purificación de proteínas y ensayos de actividad

El método utilizado para la purificación de proteínas fue mediante columna (sección 4.7.3), ya que las proteínas de fusión presentaban el epítipo de histidina. Este epítipo es uno de los más utilizados, ya que agrega a la proteína de fusión solo 6 aminoácidos, presenta una alta afinidad de adhesión a la resina y puede ser agregado en ambos extremos (N y C-terminal). Para determinar las condiciones de purificación, se realizó en primera instancia con la proteína de fusión HisMBP-AtA6PR1, logrando su purificación sin

grandes contaminaciones. No obstante, durante el desarrollo de esto, se tuvieron problemas al momento de cargar las muestras en la columna, debido a que la extracción con el reactivo B-PER dejaba las muestras viscosas, generando que la columna se tapase; esto se logró revertir filtrando las muestras previamente a ser cargadas y con centrifugaciones a mayor velocidad, sin embargo, esto también generaba una pérdida en la cantidad de proteínas a cargar en la columna.

Si bien se pudo purificar la proteína de fusión HisMBP-AtA6PR1 teniendo el tamaño esperado de 70 kDa aprox. y realizar un ensayo de actividad con esta, las repeticiones realizadas no seguían una tendencia, es decir, los valores obtenidos en cada ensayo de actividad (medición de Abs a 340 nm) eran distintos. Por otro lado los valores de absorbancia observados al inicio de la reacción siempre fueron bajos, de 0,3 aprox., muy por debajo del valor esperado al utilizar NADPH, esto ya que el coeficiente de extinción molar para NADH o NADPH a 340 nm es de 6,22 l/mmol/cm y que de acuerdo a la ley de Lambert-Beer, significa que para una solución de 0,1 mM, la absorbancia debería ser igual a 0,622 U Abs. (Veskoukis y cols., 2018). Estas observaciones nos sugieren que al momento de mezclar la enzima con el NADPH se podría estar realizando la interacción entre estos de manera muy rápida, evitando que la lectura de Abs. fuese de 0,6 o que el NADPH se estuviese degradando, para esto se probó hacer el ensayo en oscuridad para pero de igual forma, se obtuvieron resultados similares a los anteriores. Además, se probó también trabajar con búffer a pH 7 y 9 (datos no mostrados), aunque Figueroa e Iglesias (2010) determinaron que la enzima de manzano (MdA6PR) era estable entre pH 6 y 10; aún así, no se observó mejoras de ningún tipo.

Los resultados obtenidos de actividad enzimática específica tanto para la proteína comercial como para la proteína recombinante HisMBP-AtA6PR1 fueron diferentes al usar distintas concentraciones de enzima. Se observó una disminución de la actividad específica a medida que la concentración de enzima era mayor, contrario a lo teórico, ya que se esperaba obtener un valor de actividad específica igual, independiente de la concentración de enzima utilizada. Una posible explicación de este comportamiento podría ser que haya una agregación de proteínas al momento de aumentar la concentración de esta, impidiendo utilizar el sustrato.

Al momento de expresar las proteínas recombinantes, siempre se observó una mayor expresión de la isoforma HisMBP-AtA6PR1 en comparación con la 2, a pesar de que ambos genes estaban comandados por el mismo promotor (Tac o T7) inducibles por IPTG. Esto podría estar ocurriendo por las diferencias que existen entre las secuencias génicas de *AtA6PR1* y 2, las cuales podrían afectar la eficiencia del acoplamiento de la maquinaria para la traducción de la proteína o el efecto contrario. Esta posible explicación podría estar ligada a lo que se observa en *Arabidopsis*, donde se ha planteado que los genes *AtA6PR1* y *AtA6PR2* serían una duplicación génica, ya que poseen una alta identidad nucleotídica y están posicionadas adyacentes entre sí en el cromosoma dos, y que en este caso el gen *AtA6PR1* sería el que posea mayores elementos regulatorios (ej: elementos de respuesta a frío) promoviendo su expresión (Figura 3). Además, es sabido que en *A. thaliana* hay una alta tasa de duplicaciones génicas en su genoma: sobre un 50% del total de los genes codificados en el cromosoma 2 (donde se encuentran las secuencias candidatas) son duplicados (Lin y cols., 1999).

Por otro lado, a pesar de que ambas proteínas aparentemente no sufren modificaciones postraduccionales, se cree que estas enzimas posiblemente requieran de algún componente asociado a un tipo de estrés, ya que los genes que codifican para estas enzimas son mayormente expresados bajo estrés abiótico, frío para *AtA6PR1* y salinidad en el caso de *AtA6PR2* (Rojas y cols., 2019). Por ejemplo, se ha observado que en plantas, las especies reactivas de oxígeno (ROS) a concentraciones bajas, tienen funciones de señalización críticas en procesos como el crecimiento del tubo polínico, desarrollo y senescencia de hojas, elongación celular, gravitropismo, entre otros, y esto se logran con ayuda de proteínas que son sensibles a cambios redox (proteína redox), movilización de calcio en la célula, fosforilación de proteínas y expresión génica (Pandey y cols., 2017). Por lo tanto, si estos factores auxiliares sí son esenciales para la actividad enzimática de las AtA6PRs, su ausencia en el sistema heterólogo de *E. coli* podría reducir dramáticamente la actividad enzimática de las proteínas vegetales de interés al expresarlas en bacterias.

7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

Durante el desarrollo de esta Tesis de Magíster, se planteó estudiar las características bioquímicas de las proteínas AtA6PR1 y AtA6PR2 de *Arabidopsis thaliana* para poder determinar si ambas correspondían a enzimas aldosas reductasas. Para ello, se optimizaron sus secuencias y se las expresaron en un organismo heterólogo. A partir de los experimentos realizados, se concluye que:

1. La construcción de los cuatro vectores portadores de las secuencias optimizadas fue exitosa, comprobando su funcionalidad transcripcional y traduccional en *E. coli*.
2. El uso de promotores inducibles, en este caso por IPTG, aumentó significativamente la acumulación de las proteínas recombinantes. Los niveles de acumulación obtenidos fue diferente, encontrando para ambos vectores de expresión, mayor acumulación de AtA6PR1 recombinante.
3. Los dos métodos de extracción de proteínas, por sonicación y por B-PER, permitieron obtener proteínas recombinantes sin afectar su integridad, al observado por ensayos de western blot. Utilizando el reactivo B-PER, se lograba obtener mayores concentraciones de proteínas en la fracción soluble, lugar en el cual estaban las proteínas de interés.
4. En los ensayos de medición de actividad enzimática de los extractos crudos, fracción soluble y proteína purificada/enriquecidas, los cambios en la absorbancia fueron mínimos y distintos entre cada repetición. Por lo tanto, no se pudo

determinar empíricamente las características bioquímicas de las proteínas estudiadas. Sin embargo, al momento de realizar el cálculo de la actividad específica, utilizando la proteína HisMBP-AtA6PR1 enriquecida, esta presentaba una actividad comparable a la obtenida por Figueroa e Iglesias (2010) estudiando la enzima A6PR de manzano, para la reducción de glucosa 6-fosfato mediada por NADPH.

Las proyecciones de esta Tesis de Magíster son múltiples. Por ejemplo, aunque se logró *detectar* actividad reductora de glucosa 6-fosfato por HisMBP-AtA6PR1, es necesario *cuantificarla*, tanto para este sustrato como para otros sustratos potenciales, tanto para AtA6PR1 como AtA6PR2. Además, para abordar Objetivo Específico 2, se debe clivar el epítipo HisMBP de ambas proteínas recombinantes, antes de realizar ensayos bioquímicos, lo cual posiblemente requeriría de mayores volúmenes de cultivos bacterianos para la inducción, expresión y posterior purificación de las proteínas de interés. Como abordaje alternativo, ahora se sabe que la expresión en la planta de *AtA6PR1* y *AtA6PR2* es mayor en condiciones de estrés por frío y salinidad, respectivamente (Rojas y cols., 2019). Al inducir su expresión en la planta bajo dichas condiciones y extraer las proteínas nativas, es posible que utilizando protocolos ya existentes para determinar su actividad (Lo Bianco y cols., 2000) tendrán mayor éxito.

8. REFERENCIAS

- Bellallouie, N., Brown, P. H., Dandekar, A. M.** 1999. Manipulation of *in vivo* sorbitol production alters boron uptake and transport in tobacco. *Plant Physiology* 119: 735-741.
- Beruter, J., Studer, M. E., Ruedi, P.** 1997. Sorbitol and sucrose partitioning in the growing apple fruit. *Journal Plant Physiol* 151:269-276.
- Brown, P. H., Hu, H.** 1996. Phloem Mobility of Boron is Species Dependent: Evidence for phloem mobility in sorbitol-rich species. *Annals of Botany* 77: 497–505.
- Davanloo, P., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., & Studier, F. W.** 1984. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(7): 2035–2039.
- Deguchi, M., Koshita, Y., Gao, M., Tao, R., Tetsumura, T., Yamaki, S., Kanayama, Y.** 2004. Engineered sorbitol accumulation induces dwarfism in *Japanese persimmon*. *Journal of Plant Physiology* 161: 1177–1184.
- El-Kabbani, O., Judge, K., Ginell, S. L., Myles, D. A. A., DeLucas, L. J., Flynn, T. G.** 1995. Structure of porcine aldehyde reductase holoenzyme. *Nature Structural Biology* 2 (8): 687-692.
- El-Kabbani, O., Carbone, V., Darmanin, C., Oka, M., Mitschler, A., Podjarny, A., Schulze-Briese, C., Chung, R. P. T.** 2005. Structure of aldehyde reductase holoenzyme in complex with the potent aldose reductase inhibitor fidarestat: Implications for inhibitor binding and selectivity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48 (17): 5536-5542.
- Figueroa, C. M., Iglesias, A. A.** 2010. Aldose-6-phosphate reductase from apple leaves: Importance of the quaternary structure for enzyme activity. *Biochimie* 92: 81–88.
- Galinski, E. A., Truper, H. G.** 1994. Microbial behavior in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol* 15: 95-108.
- Gerke, J.** 2015. Phytate (Inositol Hexakisphosphate) in Soil and Phosphate Acquisition from Inositol Phosphates by Higher Plants. *A Review Plants* 4: 253-266.
- Haritatos, E., Medville, R., Turgeon, R.** 2000. Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211: 105-111.

Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K., Bohnert, H. J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.

Hirai, M. 1981. Purification and characteristics of sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from loquat leaves. *Plant Physiology* 67: 221–224.

Kanamaru, N., Ito, Y., Komori, S., Saito, M., Kato, H., Takahashi, S., Omura, M., Soejima, J., Shiratake, K., Yamada, K., Yamaki, S. 2004. Transgenic apple transformed by sorbitol-6-phosphate dehydrogenase cDNA switch between sorbitol and sucrose supply due to its gene expression. *Plant Science* 167: 55-61.

Kanayama, Y., Mori, H., Imaseki, H., & Yamaki, S. 1992. Nucleotide Sequence of a cDNA Encoding NADP-Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from Apple. *Plant Physiology* 100: 1607–1608.

Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D. W., Zhao, W., Schiller, K. C., Gatzke, N., Sung, D. Y., Guy, C. L. 2004. Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiology* 136: 4159-4168.

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

Kozma, E., Brown, E., Ellis, E. M., Laphorn, A. J. 2002. **The crystal structure of rat liver AKR7A1** a dimeric member of the aldo-keto reductase superfamily. *The journal of biological chemistry.* 277 (18): 16285–16293.

Kwon, K-Ch., Chan, H-T., León, I. R., Williams-Carrier, R., Barkan, A., Daniell, H. 2016. Codon optimization to enhance Expression yields insights into chloroplast translation. *Plant Physiology* 172: 62–77.

Lehto, T., Räisänen, M., Lavola, A., Julkunen-Tiitto, R., Aphalo, P.J. 2004. Boron mobility in deciduous forest trees in relation to their polyols. *New Phytologist* 163: 333–339.

Lewis, D. H., Smith, D. C. 1967. Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants I: Distribution, physiology and metabolism. *New Phytologist* 66: 143-184.

Li, X., Li, S., Lang, Z., Zhang, J., Zhu, L., Huang, D. 2013. Chloroplast-targeted expression of the codon-optimized truncated cry1Ah gene in transgenic tobacco confers a high level of protection against insects. *Plant Cell Rep* 32: 1299-1308.

Liu, Y. 2020. A code within the genetic code: codon usage regulates co-translational protein folding. *Cell Commun Signal* 18: 145. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00642-6>

Lin, X., Kaul, S., Rounsley, S., Shea, TP., Benito, M., Town, CD., Fujii, CY., Mason, T., Bowman, CL., Barnstead, M. 1999. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402: 761–769.

Lo Bianco, R., Rieger, M., Sung, S.J.S. 2000. Effect of drought on sorbitol and sucrose metabolism in sinks and sources of peach. *Physiol. Plant.* 108: 71–78.

Loescher, W. H. 1987. Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiol. Plantarum* 70: 553-557.

Malik, M.A., Sharma, H.K., Saini, C.S. 2017. High intensity ultrasound treatment of protein isolate extracted from dephenolized sunflower meal: Effect on physicochemical and functional properties. *Ultrasonics Sonochemistry* 39: 511-519.

Mindnich, R. D., Penning, T. M. 2009. Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: Genomics and annotation. *HUMAN GENOMICS* 3 (4): 362–370.

Munnik, T., Vermeer, J. E. 2010. Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. *Plant, Cell and Environment* 33: 655–669.

Negm, F. B., Loescher, W. H. 1981. Characterization and partial purification of Aldose-6-phosphate reductase (Alditol-6-phosphate: NADP 1-Oxidoreductase) from Apple leaves. *Plant Physiology* 67: 139-142.

Nosarzewski, M., Downie, A. B., Wu, B., Archbold, D. D. 2012. The role of sorbitol dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology* 39: 462–470.

Pandey, S., Fartyal, D., Agarwal, A., Shukla, T., James, D., Kaul, T., Negi, Y. K., Arora, S., Reddy, M. K. 2017. Abiotic Stress Tolerance in Plants: Myriad Roles of Ascorbate Peroxidase. *Frontiers in Plant Science* 8: 581.

Penning, T. M. 2015. The Aldo-Keto Reductases (AKRs): Overview. *Chem Biol Interact* 234: 236–246.

Pharr, D. M., Stoop, J. M. H., Williamson, J. D., Studer-Feusi, M. E., Massel, M. O., Conkling, M. A. 1995. The dual role of mannitol as osmoprotectant and photoassimilate in celery. *Hort Sci* 30: 1182-1188.

Piyasena, P., Dussault, Ch., Koutchma, T., Ramaswamy, H. S., Awuah, G. B. 2003. Radio frequency heating of foods: Principles, applications and related properties—A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (6): 587–606.

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: 1029-1038.

Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler R. 2004. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* 134: 1683-1696.

Rojas, B., Wurman, J., Zamudio, M. S., Donoso, A., Cabedo, P., Díaz, F., Stange, C., Handford, M. 2019. AtA6PR1 and AtA6PR2 encode putative aldose 6-phosphate reductases that are cytosolically localized and respond differentially to cold and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 28: 114-119.

Sengupta, D., Naik, D., Reddy, A. R. 2015. Plant aldo-keto reductases (AKRs) as multi-tasking soldiers involved in diverse plant metabolic processes and stress defense: A structure-function update. *Journal of Plant Physiology* 179: 40–55.

Shen, B., Jensen, R. G., Bohnert, H. J. 1997. Mannitol Protects against Oxidation by Hydroxyl Radicals. *Plant Physiol* 115: 527-532.

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

Stoop, J.M., Williamson, J.D., Pharr, D.M. 1996. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends Plant Sci.* 1: 139-144.

Studier, F. W., Moffatt, B. A. 1896. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* 189: 113-130.

Veskoukis, A. S., Margaritelis, N.V., Kyparos, A., Paschalis, V., Nikolaidis, M. G. 2018. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood and tissues: the NADPH network. *Redox Report* 23 (1): 47-56.

Waugh, D. S. 2005. Making the most of affinity tags. *TRENDS in Biotechnology* 23 (6): 316-320.

Waugh, D. S. 2011. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif.* 80 (2): 283–293.

Williamson, J. D., Stoop, J.M., Massel, M.O., Conkling, M.A., Pharr, D.M. 1995. Sequence analysis of a mannitol dehydrogenase cDNA from plants reveals a function for the pathogenesis-related protein ELI3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (16): 7148–52.

Wilson, D. K., Nakano, T., Petrash, M., Quijcho, F. A. 1995. 1.7 Å structure of FR-1, a fibroblast growth factor-induced member of the Aldo-Keto Reductase Family, complexed with coenzyme and inhibitor. *Biochemistry* 34 (44): 14323- 14330.

Yadava, A., Ockenhouse, Ch. F. 2003. Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded Malaria Vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Infection and immunity.* 71 (9): 4961–4969.

Yamada, K., Suzue, Y., Hatano, S., Tsukuda, M., Kanayama, Y., Shiratake, K., Yamaki, S. 2006. Changes in the activity and gene expression of sorbitol- and sucrose-related enzymes associated with development of ‘La France’ pear fruit. *Journal Japan Soc. Hort. Sci.* 75 (1): 38 – 44.

Yamaki, S. 1891. Subcellular localization of Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase in protoplast from apple cotyledons. *Plant & Cell Physiol.* 22 (3): 359-367.

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

Zamudio, S. 2014. Estudios Bioquímicos y Fisiológicos de AtA6PR, una posible Aldosa-6-fosfato reductasa de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Zhou, R., Sicher, R. C., Cheng, L., Quebedeaux, B. 2003. Regulation of apple leaf aldose-6-phosphate reductase activity by inorganic phosphate and divalent cations. *Functional Plant Biology*, 30(10): 1037-1043. doi:10.1071/fp02225

Recursos web

<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/> (Visitada última vez: Mayo 2016)

www.med.upenn.edu/akr (Noviembre 2019)

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lin=s&p=has_linkout&id=3745 (Noviembre 2019)