

UCH-FC
MAG-B
M 271
C. 1



ESCUELA DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

Localización sub-celular y caracterización bioquímica de AtSDL una probable sorbitol deshidrogenasa

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para
optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas.

por

PATRICIO JAVIER MANDUJANO MORENO



Agosto de 2010,
Santiago de Chile

Director Tesis Magister: **Michael Handford, PhD**



“Localización sub-celular y caracterización bioquímica de AtSDL una probable sorbitol deshidrogenasa”

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas Mención Biología Molecular y Neurociencias.

PATRICIO JAVIER MANDUJANO MORENO

Director Tesis.

Dr. Michael Handford

Firma manuscrita en azul de Michael Handford, sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación Tesis de Magister

Dr. Marcelo Baeza Cancino,
Presidente

Dra. Liliana Cardemil Oliva

Firma manuscrita en azul de Marcelo Baeza Cancino, sobre una línea horizontal.
Firma manuscrita en azul de Liliana Cardemil Oliva, sobre una línea horizontal.
Sello circular de la Facultad de Ciencias, Biblioteca Central, U. de Chile.



A mi familia... y a ti.

BIOGRAFÍA



Todo empezó un 26 de octubre de 1984 en Rancagua. Mi madre, una hermosa joven de grandes ojos verdes y larga cabellera ondulada me trajo a este mundo con un gran esfuerzo; mi castigo: no heredar ninguna de esas características. De ésta etapa de mi vida, no tengo grandes recuerdos, ni siquiera sé donde estude. Lo único que recuerdo es que entré muy pequeño al sistema educacional de este país, a la edad de 2 años estaba en lo que se llama Nivel Medio Menor. Desde entonces hasta ahora no he dejado de estudiar y de escuchar a un profe retándome por hablar y molestar en clases. Así que deben entender lo feliz que estoy al escribir esto. Llegué a Santiago en circunstancias que no valen la pena recordar, ni escribir obviamente, lo importante es que fue un cambio radical en mi vida, que me hizo crecer, entender y querer lo que la vida nos entrega cada día. Desde este punto podemos encontrar una bifurcación en la historia. Por un lado podemos hablar de mi vida directamente, así como la mejor de las teleseries venezolanas y por otro lado, en un sentido más académico, podemos encontrar la explicación del por qué termine estudiando la carrera de la que me estoy titulando. Como me interesa más el último punto y no quiero entrar en melodramas, comenzaré relatando mis estudios básicos. Estos fueron realizados en un colegio llamado Licarayen, el cual tenía la particularidad de nombrar a los cursos, no por su año ni su letra sino con nombres de volcanes y cosas "raras". El mío correspondía el curso Lonquimay, del que forme parte desde kínder hasta 3ro básico. Si lo pienso bien, no tengo recuerdos dentro de las salas de clases, sino afuera, en los pasillos o el patio, extraño creo yo. Luego, por otras razones que... bueno ya saben, me cambie a otro colegio, llamado Colegio Particular La Concepción. Este nombre no hace alusión a la capital de la región del Bio-Bio, sino a una batalla, de la Guerra del Pacífico, librada en Concepción, una localidad en los andes centrales del Perú. Cuando te repiten las cosas tantas veces te las aprendes, aunque no quieras. En este colegio terminé la enseñanza básica, sin pena ni gloria, aunque con mil amonestaciones.. La enseñanza media la cursé en el Colegio Pedro de Valdivia, como se puede observar, la otra vertiente de mi historia (la melodramática) influye económicamente en la académica, lo cual estuvo...bien. Es triste la comparación, pero en este colegio pude encontrar inspiración, y me di cuenta que, más que profesores, hay grandes personas que te motivan a ser mejor. Cuando pequeño le decía a mi mamá que cuando grande iba a ser científico y un test vocacional en 2do medio lo confirmó. De esta manera entre a estudiar ingeniería en biotecnología molecular, carrera de extenso nombre, que usé para impresionar a más de una mujer. Ajeno a todo lo que esta carrera me pudo entregar, en la universidad de Chile conocí a grandes personas y amigos que fueron los profesores e inspiración para ser un mejor ser humano. Se cerró una etapa y partimos con otra, más incierta que la anterior y con más influencia del lado melodramático de la vida.

AGRADECIMIENTOS

Esta parte es conflictiva, porque uno agradece a los que estuvieron contigo, a tus amigos y familiares, y en la selección de éstos está el problema.

Si tengo que agradecer a alguien lo que soy ahora, mi deber es darles las gracias a todas las personas con las que he tenido algún tipo de contacto en mi vida, sea bueno o malo. Desde el extraño tipo que te da la mano en la micro para pedirte una moneda hasta mi madre. Cada persona que me conoce o me conoció, merece mi agradecimiento. Soy sencillamente lo que he aprendido de mi vida y cada uno de ustedes forma parte de ésta.

Un especial agradecimiento a Michael Handford, mi tutor, quien con su paciencia y joven sabiduría me ayudó a realizar este seminario. Me enseñó las herramientas básicas con las que pude desenvolverme mejor y con más confianza. Gracias también por entender mi torpeza, al romper algunas cosillas en forma accidental en el laboratorio. Son cosas que pasan, a mi más frecuentemente, pero que él pudo entender.



ÍNDICE DE CONTENIDOS



INDICE DE CONTENIDOS.	i
INDICE DE TABLAS.	iv
INDICE DE FIGURAS.	v
LISTA DE ABREVIATURAS.	vi
RESUMEN.	vii
ABSTRACT.	x
1.-INTRODUCCIÓN.	1
2.-HIPÓTESIS.	12
2.1.-HIPÓTESIS ALTERNATIVA.	12
3.- OBJETIVOS.	12
3.1.-Objetivo General.	12
3.2.-Objetivos Específicos.	12
4.-MATERIALES Y MÉTODOS.	14
4.1.- Material Biológico.	14
4.1.1.- Crecimiento de las plantas <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Columbia y <i>Nicotiana tabacum</i> .	14
4.1.2.- Crecimiento de bacterias <i>Escherichia coli</i> (cepas <i>DH5α</i> y <i>BL21(DE3)pLys</i>) y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (cepa GV3101).	14
4.1.3.- Crecimiento de células de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cepa SC-29 (Δ ura ⁻).	15
4.1.4.- Transformación de <i>E. coli</i> (<i>DH5α</i> y <i>BL21(DE3)pLys</i>) quimio-competentes.	15
4.1.5.- Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> quimio-competentes.	17
4.1.6.- Transfección de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cepa SC-29 (Δ ura ⁻) electro-competentes.	18
4.1.7.- Agro-infiltración de hojas de <i>Nicotiana tabacum</i> .	19
4.2.- Biología molecular.	19
4.2.1.- Diseño de partidores específicos para amplificar el ADNc de AtSDL incluyendo, en la secuencia, sitios de corte para las endonucleasas <i>Bam</i> HI y <i>Not</i> I.	19



4.2.2.- Extracción de ARN total desde diferentes tejidos de <i>A. thaliana</i> .	21
4.2.3.- Electroforesis en geles de agarosa.	23
4.2.4.- Reacción de retro-transcripción (RT) desde RNA total extraído desde tejidos de <i>A. thaliana</i> .	23
4.2.5.- Reacción de PCR con el objetivo de amplificar el cDNA de AtSDL y LeSDH.	24
4.2.6.- Clonamiento en pCR8®.	25
4.2.7.- Digestión de ADN plasmidial con las endonucleasas <i>Bam</i> HI y <i>Not</i> I.	26
4.2.8.- Reacción de ligación con ADN ligasa T4.	27
4.2.9.- Sistema de clonamiento Gateway® y construcción del vector pGWB5-AtSDL-GFP.	27
4.2.10.- Mini-preparaciones de ADN plasmidial desde <i>E. coli</i> cepa <i>DH5α</i> .	29
4.3.- Bioquímica y Biología Celular.	29
4.3.1.- Expresión de AtSDL y LeSDH recombinante en <i>E. coli</i> cepa <i>BL21(DE3)pLys</i> .	29
4.3.2.- Purificación de His-AtSDL por cromatografía de afinidad de ión metálico (Ni) inmovilizado.	30
4.3.3.- Re-plegamiento de AtSDL y LeSDH recombinante.	31
4.3.4.- Expresión de AtSDL-His en <i>S. cerevisiae</i> cepa SC-29 (Δ ura).	31
4.3.5.- Ensayos de actividad sorbitol deshidrogenasa (SDH).	32
4.3.6.- Preparación de un antisuero de ratón contra AtSDL.	33
4.3.7.- Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE).	34
4.3.8.- Inmunodetección mediante Western-Blot.	35
4.3.9.- Análisis de localización sub-celular de AtSDL-GFP por microscopia de fluorescencia.	36
4.3.10.- Análisis de localización de AtSDL por fraccionamiento sub-celular y extracción de proteínas totales de diferentes tejidos de <i>A. thaliana</i> .	37
4.4.- Bioinformática.	38
4.4.1.- Análisis preliminar de los dominios conservados de la secuencia aminoacídica de AtSDL.	38
4.4.2.- Alineamiento múltiple y dendrograma.	39

4.4.3.-	Modelo de la estructura molecular de AtSDL y experimentos de dinámica molecular.	39
4.4.4.-	Análisis de ligandos en la estructura tridimensional de AtSDL usando Autodock-1.5.2.	40
5.-	RESULTADOS.	42
5.1.-	Bioinformática.	42
5.1.1.-	Estudio de la secuencia aminoacídica de AtSDL.	42
5.1.2.-	Dendrograma.	47
5.1.3.-	Evaluación del modelo de AtSDL generado por homología.	49
5.1.4.-	Análisis <i>in silico</i> de especificidad de sustrato.	52
5.2.-	Construcción de los vectores de expresión de AtSDL en bacterias, levadura y plantas.	59
5.2.1.-	Clonamiento del ADNc de AtSDL en PCR [®] .	59
5.2.2.-	Construcción de vectores para expresar AtSDL en bacteria (pET-28a, pET-24d y pGEX-5X-1).	61
5.2.3.-	Construcción del vector de expresión en levaduras p426-GPD-AtSDL-His.	63
5.2.4.-	Construcción del vector de expresión en plantas pGWB5-AtSDL-GFP.	64
5.2.5.-	Construcción del vector pGEX-5X-1-LeSDH.	65
5.3.-	Análisis de expresión de las proteínas recombinantes AtSDL y LeSDH.	66
5.4.-	Experimentos de re-plegamiento de AtSDL recombinante.	70
5.5.-	Análisis de la expresión de AtSDL en <i>S. cerevisiae</i> cepa SC-29 (Δura).	73
5.6.-	Localización sub-celular de AtSDL-GFP.	75
5.7.-	Preparación de un antisuero de ratón contra AtSDL.	77
5.7.1.-	Detección de AtSDL en diferentes tejidos de <i>A. thaliana</i> mediante Westen-Blot.	78
5.7.2.-	Localización de AtSDL por fraccionamiento sub-celular e inmunodetección.	79
6.-	DISCUSIÓN.	81
7.-	CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.	91
8.-	BIBLIOGRAFÍA.	93



INDICE DE TABLAS



Tabla I.-	Porcentaje de identidad de aminoácidos entre diferentes SDH y AtSDL_____	8
Tabla II.-	Vectores utilizados._____	17
Tabla III.-	Partidores utilizados en la Tesis._____	21
Tabla IV.-	Tamaños de las proteínas recombinantes._____	34
Tabla V.-	Análisis <i>in silico</i> de la localización sub-celular de AtSDL._____	44
Tabla VI.-	Puntajes entregados por Verify-3D._____	52
Tabla VII.-	Energías y constantes de unión asociadas a diferentes polialcoholes como ligandos del modelo de AtSDL._____	55
Tabla VIII.-	Actividad SDH de His-AtSDL_____	72
Anexo	Secuencias Dendrograma_____	98



INDICE DE FIGURAS

Figura 1.-	Metabolismo de sorbitol _____	2
Figura 2.-	Sistema de clonamiento Gateway® _____	28
Figura 3.-	Dominios conservados en AtSDL _____	42
Figura 4.-	Alineamiento múltiple de AtSDL _____	46
Figura 5.-	Dendrograma _____	48
Figura 6.-	Z-score para el modelo de AtSDL _____	50
Figura 7.-	Modelo de AtSDL _____	54
Figura 8.-	Análisis del sitio de unión a NAD ⁺ y D-Sorbitol _____	56
Figura 9.-	Sitio activo del modelo de AtSDL _____	57
Figura 10.-	Expresión del RNAm de AtSDL _____	59
Figura 11.-	Reacciones de digestión enzimática de pCR8-AtSDL _____	60
Figura 12.-	Reacciones de digestión para los vectores pET usados _____	61
Figura 13.-	Análisis de pGEX-5X-1-AtSDL _____	62
Figura 14.-	Análisis de p426-GPD-AtSDL _____	63
Figura 15.-	Análisis de pGWB5-AtSDL _____	65
Figura 16.-	Análisis de Western Blot de AtSDL recombinante _____	67
Figura 17.-	Análisis de SDS-PAGE de AtSDL y LeSDH recombinantes _____	68
Figura 18.-	Purificación de His-AtSDL _____	69
Figura 19.-	Expresión de AtSDL en <i>S. cerevisiae</i> _____	74
Figura 20.-	Fluorescencia de AtSDL-GFP _____	76
Figura 21.-	Análisis de Western-Blot anti-AtSDL _____	78
Figura 22.-	Acumulación de AtSDL en diferentes órganos de <i>A. thaliana</i> _____	79
Figura 23.-	Análisis de la localización de AtSDL mediante fraccionamiento sub-celular _____	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
AtSDL	Potencial Sorbitol Deshidrogenasa de <i>A. thaliana</i>
BCA	"Bicinchoninic acid"
BCIP	"5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidine salt"
CaMV	"Cauliflower mosaic virus"
d	Días
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DO_{600nm}	Densidad óptica medida a 600 nm.
dT	Desoxitimidina
DTM	Dominio trans-membrana
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
GAPA	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa.
GFP	Proteína fluorescente verde
h	Horas
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobases
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio "Lysogeny Broth"
LeSDH	Sorbitol Deshidrogenasa de tomate
MES	Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)etanosulfónico
min	Minutos
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NBT	"Nitro blue tetrazolium chloride"
pb	Par de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PG	Poligalacturonasa
RT	Reacción de transcriptasa reversa
s	Segundos
SDH	Sorbitol Deshidrogenasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEP	Solución de extracción de proteínas totales desde plantas
TA	Temperatura Ambiente
TCA	Ácido tricloro acético
TDH	Treonina deshidrogenasa
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
TEMED	Tetrametiletildiamina

Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidad enzimática
UV	Radiación ultra violeta
V_{max}	Velocidad máxima

RESUMEN

Poli-alcoholes tales como manitol, xilitol y principalmente sorbitol, cumplen variadas funciones en plantas. Entre estas, la más estudiada es el transporte de carbono como sorbitol por medio del floema en la familia *Rosaceae*. En otras funciones estudiadas destacan su papel como osmo-protector y en la movilidad de micronutrientes (boro). Las enzimas involucradas en el metabolismo de sorbitol, principalmente la sorbitol deshidrogenasa NAD⁺ dependiente (SDH), han sido clonadas y caracterizadas, sobre todo en especies de la familia Rosáceas. Sin embargo, se ha encontrado SDHs similares en especies no-*Rosaceae*. En una de estas especies, *Arabidopsis thaliana*, se ha documentado la existencia de bajas concentraciones de sorbitol y además, gracias al conocimiento de su genoma, se ha identificado un ORF que codificaría para una enzima similar a una sorbitol deshidrogenasa (AtSDL), que comparte más de un 75 % de identidad amino-acídica con las SDHs presentes en otras especies. En esta tesis, se caracterizó bioinformática y bioquímicamente AtSDL, sentando las bases para determinar el papel fisiológico de esta enzima y sus sustratos en plantas no-*Rosaceae*.

Análisis bioinformáticos revelaron que AtSDL es una enzima soluble citoplasmática que presenta dos dominios de unión característicos de alcoholes deshidrogenasas de unión a dinucleótidos (NAD[P]).

Mediante modelamiento por homología y experimentos mediante “docking” se evaluó energéticamente los posibles sustratos, revelando que el modelo de AtSDL une preferentemente a NAD⁺ y a los poli-alcoholes inicialmente mencionados.

En forma preliminar los análisis por RT-PCR demostraron que el ARNm de AtSDL se expresa en varios órganos, incluidas hojas, tallos, raíces y flores.

La quimera AtSDL-GFP posee una localización citosólica en hojas agro-infiltradas de *Nicotiana tabacum*. Este resultado fue confirmado mediante fraccionamiento sub-celular de *A. thaliana* y detección mediante western-blot usando un suero de ratón anti-AtSDL poli-clonal desarrollado en este trabajo. Para la determinación de la especificidad de sustrato de la enzima, AtSDL-His recombinante fue sobre-expresada en *Escherichia coli*. La proteína se encontró formando cuerpos de inclusión. Después de la purificación realizada en condiciones no-nativas se realizaron experimentos de re-plegamiento mediante diálisis y dilución. Los resultados revelaron que mediante dilución y en presencia de zinc la enzima es activa y capaz de oxidar sorbitol en presencia de NAD⁺ y no así otros polialcoholes.

ABSTRACT

Poly-alcohols such as mannitol, xylitol and especially sorbitol fulfill several functions in plants. Amongst these, the most studied is the transport of carbon as sorbitol in the phloem of members of the *Rosaceae* family. Other functions include a role as an osmoprotector and in micronutrient (boron) mobility. The enzymes involved in the metabolism of sorbitol, mainly NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase (SDH) have been cloned and characterised, especially in species of the *Rosaceae* family. However, similar SDHs have been identified in non-*Rosaceae* species. In one such specie, *Arabidopsis thaliana*, low concentrations of sorbitol have been detected, and thanks to the sequencing of its genome, an ORF which could encode an enzyme similar to sorbitol dehydrogenase (AtSDL) has been identified, sharing more than 75% amino-acid identity with known SDHs. In this thesis, AtSDL was characterised bioinformatically and biochemically, thus forming the ground-work for determining the physiological role of this enzyme and its substrates in non-*Rosaceae* plants.

Bioinformatic analyses revealed that AtSDL is a soluble cytoplasmatic enzyme, with two putative NAD(P)-binding domains, characteristic of alcohol dehydrogenases.

Using homology modeling and molecular docking, possible substrates of AtSDL were evaluated energetically, demonstrating that the model binds preferentially to NAD⁺ and to the poly-alcohols mentioned previously.

RT-PCR analysis showed that AtSDL mRNA is present in several organs, including leaves, stems, roots and flowers.

The AtSDL-GFP fusion protein, when expressed via agro-infiltration of *Nicotiana tabacum* leaves, was present in the cytosol. This results was confirmed using subcellular fractionation of *A. thaliana* and western blot detection using a mouse polyclonal antibody generated in this research. In order to determine the substrate specificity of the enzyme, recombinant AtSDL-His was over-expressed in *Escherichia coli*. The protein was located in inclusion bodies. After purifying the protein in non-native conditions, folding experiments were performed by dilution and dialysis. The results showed that by dilution and in the presence of zinc, the enzyme is active and is capable of oxidizing sorbitol, but not other poly-alcohols, in the presence of NAD⁺.

1.- INTRODUCCIÓN

Funciones y metabolismo de polialcoholes

Alcoholes de azúcar lineales (poli-alcoholes) tales como sorbitol, manitol y galactitol se encuentran presentes en muchas especies vegetales cumpliendo diversas funciones fisiológicas. Una de las principales y más estudiadas es el transporte de carbono en la planta desde los órganos fotosintéticos a los órganos sumideros (frutos, raíces, flores). La gran mayoría de las especies vegetales transportan sacarosa o rafinosa a través del tejido vascular (floema) hacia los tejidos sumideros, junto a cantidades menores de uno de los poli-alcoholes mencionados (Zimmermann and Ziegler, 1975). Sin embargo, existen familias de plantas en donde sacarosa o rafinosa se encuentran en cantidades minoritarias en comparación al poli-alcohol transportado. Por ejemplo, sorbitol es el principal fotosintato transportado por el floema en especies de la familia *Rosaceae* (Ej. cerezo, *Prunus cerasus*) y *Plantaginaceae* (Ej. llantén, *Plantago major*); manitol es transportado en especies de la familia *Apiaceae* (Ej. apio, *Apium graveolens*), *Oleaceae* (Ej. olivo, *Olea europaea*) y *Rubiaceae* (Ej. cafeto arábigo, *Coffea arabica*); y galactitol es transportado en especies de la familia *Celastraceae* (Ej. *Euonymus* sp.; Pommerrenig y col., 2007). El uso de poli-alcoholes como forma de transporte de carbono tiene algunas ventajas. Son compuestos químicamente estables que sólo son metabolizados dentro de los órganos sumideros. Además, permiten el uso más eficiente del carbono (Pharr y col., 1995b; Stoop y col., 1996) y tienen mayor potencialidad para generar coenzimas reducidas tales como NADPH y NADH, que a su vez pueden ser usadas en reacciones de síntesis o producción de ATP, respectivamente. Complementando las

ventajas previamente mencionadas, las plantas que presentan cantidades importantes de poli-alcoholes tienen una mejor protección contra radicales libres (Smirnoff y Cumbers, 1989; Shen y col., 1997) y una mayor eficiencia en la movilidad de boro a través de la planta, debido a la formación del complejo borato-polialcohol (Bellaloui y col., 1999; Lehto y col., 2004). Por otro lado, poli-alcoholes lineales como sorbitol y manitol son osmolitos eficientes. Su acumulación permite a la planta tener una mayor tolerancia al estrés hídrico y por salinidad (Hu y col., 2005; Rejskova et al., 2007). Este efecto se ha estudiado en varias especies del género *Plantago* en donde se ha observado el incremento de la concentración de sorbitol en condiciones de alta salinidad (Smekens y Tienderen, 2001). Los polialcoholes lineales son sintetizados primordialmente en los órganos fotosintéticos desde hexosas-6-fosfato por reductasas dependientes de NADPH y posteriormente por polialcohol-6-fosfato fosfatasas. En los órganos sumideros, la oxidación de estos polialcoholes es llevada a cabo generalmente por deshidrogenasas y oxidasas NAD⁺ dependientes (Teo y col., 2006; figura 1).

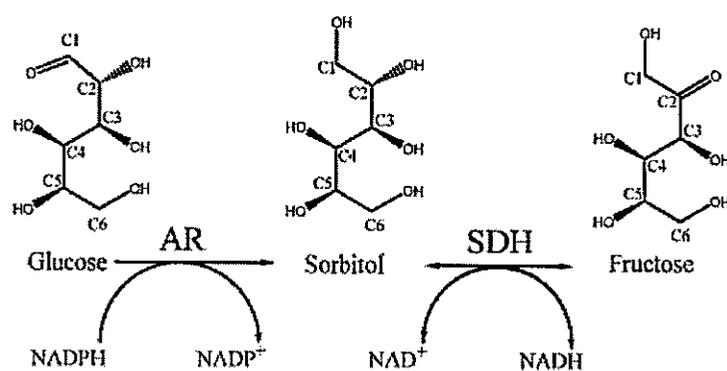


Figura 1: Metabolismo de sorbitol: La síntesis de sorbitol se realiza mediante la reducción de glucosa por una Aldosa Reductasa (AR) en órganos fotosintéticos. Sorbitol es consumido en los órganos sumideros por la Sorbitol Deshidrogenasa (SDH) mediante la reducción de NAD⁺.

En el caso de la familia *Rosaceae* se han clonado numerosas sorbitol deshidrogenasa NAD⁺ dependientes (SDH; Lo Bianco y col., 1998; Oura y col., 2000; Park y col., 2002; Yamada y col., 2001), enzimas que catalizan la conversión de sorbitol a fructosa. Dependiendo de la especie, la fructosa puede ser almacenada, proporcionando dulzor al órgano en el caso de los frutos o puede ser fosforilada e ingresada a la vía glicolítica. La caracterización de SDHs ha permitido entender el mecanismo de transporte de sorbitol en las plantas pertenecientes a esta familia. Principalmente la actividad SDH en frutos genera un gradiente de concentración de sorbitol facilitando su translocación desde los tejidos vasculares hacia éstos. En manzanas (*Malus x domestica*), se ha documentado que este proceso está controlado durante el desarrollo y maduración de los frutos mediante la regulación en la expresión de glucosa-6-fosfato reductasa en hojas y de SDH en frutos (Nosarszewski y col., 2004; Teo y col., 2006).

La actividad de SDH en plantas pertenecientes a la familia *Rosaceae* es determinante en el desarrollo de éstas y ha sido blanco de estudio en numerosos trabajos, debido principalmente a la importancia económica de algunas de las especies de esta familia (cerezo, durazno, manzana, pera, etc). Sin embargo, existen antecedentes de actividad SDH en plantas no-*Rosaceae* tales como soya y maíz (Kuo y col, 1990; Doehlert, 1987) y además se ha clonado el ADNc que codifica para una SDH en tomate (Ohta y col, 2005), especie miembro de la familia *Solanaceae*. Es importante destacar que estas especies transportan mayoritariamente sacarosa y no acumulan sorbitol. Más aun, los proyectos para conocer el genoma de diferentes plantas (158 publicados a septiembre

2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj>) han revelado que secuencias similares a SDH están ampliamente presentes en el reino de las plantas y no están limitadas solamente a especies de la familia *Rosaceae*.

Sorbitol deshidrogenasas

Se han encontrado y caracterizado enzimas con actividad SDH en extractos solubles de diferentes órganos de durazno (Lo Bianco y col., 1998), pera (Oura y col., 2000) y tomate (Ohta y col., 2005). La localización citosólica de SDH facilita el metabolismo directo de sorbitol a fructosa luego de ser importado a la célula. Sin embargo, estudios de la localización sub-celular de SDH en manzanos han revelado una distribución más compleja. En esta especie se han identificado 9 diferentes genes que codifican para distintas SDHs con identidades nucleotídicas que van desde 74 % a 96 % entre sí (Nosarszewski y col., 2004). Una publicación reciente del grupo de Wang y col. (2009) logró determinar la localización sub-celular *in situ* inespecíficamente de diferentes SDHs presentes en hojas inmaduras y frutos de manzano usando un suero poli-clonal anti-SDHs. El estudio reveló que las SDHs de manzanos se encuentran tanto en el citosol, como en los cloroplastos y, en el caso de hojas inmaduras, también en la vacuola, variando su distribución según el desarrollo del órgano. La posible función que se propone para SDH en los cloroplastos es la de controlar la síntesis de almidón al producir fructosa y la de regular el balance osmótico del organelo. También, se observó acumulación de SDH en la vacuola, posiblemente con el fin de almacenar la enzima y liberarla en el momento adecuado, como una respuesta más rápida a la síntesis de proteínas en sí. Sin embargo, no se ha documentado actualmente resultados de

experimentos que corroboren estas hipótesis, pero sin lugar a dudas la localización subcelular es un factor importante que determina la función final de la enzima en la planta.

Las SDHs caracterizadas en plantas son enzimas que reducen NAD⁺ y que además unen zinc bivalente en el sitio catalítico (Ohta y col., 2005; Park y col., 2002; Oura y col., 2000). Por otro lado también se ha determinado que son enzimas que presentan actividad deshidrogenasa con otros poli-alcoholes, aunque más baja comparado con sorbitol. Esta afinidad de SDH por otros poli-alcoholes parece favorecer más a la conformación tridimensional de sus primeros dos carbonos quirales que a su tamaño. En el trabajo de Ohta y col (2005) se determinó que LeSDH de tomate presenta actividad deshidrogenasa con L-itol, ribitol y xilitol, y la SDH de pera presenta actividad deshidrogenasa con L-itol, xilitol, L-treitol y ribitol (Oura y col., 2000). Cabe destacar además, que la reacción inversa (la reducción de D-fructosa a D-sorbitol), está desfavorecida en todas las enzimas caracterizadas. Las K_m publicadas de SDHs de plantas para las reacciones de reducción de las cetosas son entre 1 a 3 órdenes de magnitud superiores a las K_m para las reacciones de oxidación de los poli-alcoholes, revelando que las SDH de plantas, son enzimas esencialmente unidireccionales.

Los principales estudios relacionados con las SDH en plantas están orientados a la actividad de transporte de carbono ("*sink activity*") y a la expresión diferencial de SDH en diferentes estados de desarrollo de la planta y de sus órganos. La caracterización bioquímica de algunas enzimas ha permitido atribuir la actividad SDH detectada en extractos de plantas a la expresión de distintos genes con secuencias similares a poli-alcoholes deshidrogenasas. No obstante, la multi-especificidad encontrada no ha sido

estudiada molecularmente, ni tampoco la estructura global de la enzima. No se encuentran estructuras cristalográficas publicadas de SDHs provenientes de plantas y tampoco estudios de la estructura cuaternaria que puede presentar esta enzima.

Fuera del reino de las plantas, también se han encontrado enzimas con actividad SDH. Estudios bioquímicos de estas enzimas han sido realizados en animales (humano, caballo e insecto) y también en hongos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces japonicus*, etc). Por otro lado, también se han publicado dos estructuras cristalográficas de proteínas con actividad SDH. Una de ellas proviene de humano (PDB 1pl6; Pauly y col., 2003), que revela la estructura homo-tetramérica de la enzima, la unión del ión zinc al sitio activo de ésta y además se propone un mecanismo para la reacción de oxidación que cataliza esta enzima. SDH de humano presenta ~ 46% de identidad aminoacídica con SDHs de origen vegetal y se relaciona a la vía de los poli-alcoholes en humanos, blanco importante en los problemas asociados a la diabetes. Otra estructura publicada con ~ 50 % de identidad aminoacídica con SDH de plantas es la de un insecto (*Besimia agentifolii*; Banfield y col., 2001). Esta enzima también tiene una estructura homo-tetramérica y muestra la unión del ion zinc al sitio catalítico, además posee otro sitio de unión a zinc, con una función más estructural. Lo novedoso de esta enzima es que a pesar de tener una alta identidad con SDHs dependientes de NAD⁺ tanto de animales como de plantas, utiliza NADP⁺ como coenzima y la reacción de reducción de D-fructosa es ampliamente favorecida sobre la reacción de oxidación de D-sorbitol, siendo nominada, por lo tanto, como una cetosa reductasa (Salvucci y col., 1998).

La información disponible sobre las SDHs recopilada a lo largo de publicaciones de trabajos realizados en diferentes especies permite entender la función de esta enzima en cada una y comprender que la oxidación de sorbitol juega un papel importante y variado dependiendo del contexto en que ocurra la reacción.

Sorbitol Deshidrogenasa en *Arabidopsis thaliana*.

El papel que juega SDH en plantas no-*Rosaceae* puede depender directamente de su localización, de su patrón de expresión en diferentes órganos, de su especificidad, del uso de cofactores, etc. También es importante conocer la presencia de los potenciales sustratos en la planta que presenta actividad SDH. En tomate, por ejemplo, sorbitol no se acumula en cantidades considerables, sin embargo, si acumula arabitol (otro sustrato para LeSDH) durante infecciones por hongos patógenos. Posiblemente LeSDH juega un papel en su metabolismo (Ohta y col, 2005). También existe evidencia de actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en tomate (Mehta y col., 1991), enzima responsable de la síntesis de sorbitol desde glucosa y como tomate no acumula sorbitol, LeSDH posiblemente se encarga de consumir la producción de sorbitol.

Usar tomate como planta modelo en el estudio de la actividad SDH en plantas no-*Rosaceae* presenta algunas dificultades. Actualmente, existe un proyecto en curso para secuenciar el genoma de tomate. Sin embargo y aunque se han publicado diferentes secuencias de sus cromosomas en bruto, aun no hay un orden ni se ha determinado las secuencias codificantes, por ende el desconocimiento de su genoma presenta grandes limitantes en la profundización del estudio. Por otro lado, el ciclo de vida del tomate es

muy largo (80 a 100 días) lo que dificulta aún más la investigación *in vivo*. Como modelo de especies no-*Rosaceae*, *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) presenta numerosas ventajas. Esto se debe a su rápido crecimiento, en comparación a la mayoría de la plantas; a su genoma completamente secuenciado y a la rápida forma de transformarla genéticamente, obteniendo una F2 homocigota en pocos meses, debido a que sus flores son hermafroditas y auto-compatibles. Además, existen líneas transgénicas con genes específicos interrumpidos por inserciones de ADN, tipo transposones. Como en la mayoría de las plantas, *A. thaliana* utiliza sacarosa como principal forma de carbono transportado por el floema (Haritatos y col., 2000) con pequeñas cantidades de rafinosa y no acumula polialcoholes. Sin embargo, en el cromosoma 5, locus At5g51970 del genoma de esta especie, se encuentra un único marco de lectura abierto que codifica para una potencial SDH, la que hemos llamado AtSDL (“sorbitol deshidrogenasa-like”). La secuencia aminoacídica de esta enzima comparte un ~80 % de identidad con SDHs conocidas y caracterizadas en plantas (tabla I), siendo la única enzima en *A. thaliana* con potencial actividad SDH, dado que el segundo ortólogo más cercano (At5g63620) comparte solamente ~23 % con SDHs conocidas.

Tabla I: Porcentaje de identidad de aminoácidos entre diferentes SDH y AtSDL. AtSDL (*Arabidopsis thaliana* SDH-like), LeSDH (*Solanum lycopersicum* SDH), MdSDH9 (*Malus x domestica* SDH 9), FaSDH (*Fragaria x ananassa* SDH), PpSDH (*Prunus persica* SDH), PsSDH (*Prunus salicina* SDH), ZmSDH (*Zea mayz* SDH).

%	AtSDL	LeSDH	MdSDH9	FaSDH	PpSDH	PsSDH	ZmSDH
AtSDL	-	83	82	82	80	79	76
LeSDH		-	76	84	80	80	76
MdSDH9			-	78	84	83	73
FaSDH				-	80	80	75
PpSDH					-	97	73
PsSDH						-	75
ZmSDH							-

Aunque, a la fecha no existen publicaciones referidas a la función de esta enzima, es posible encontrar trabajos relacionados a la expresión de múltiples genes en diferentes estadios de desarrollo y condiciones de crecimiento en *A. thaliana* (Adamiec y col., 2008), en donde se revela la transcripción de *AtSDL*.

Estudios del metaboloma de *A. thaliana* han revelado la presencia de sorbitol y el aumento de su cantidad, en órganos aéreos de la planta, en condiciones de frío (4 °C), además de documentar este mismo comportamiento para otros poli-alcoholes como xilitol, eritritol, galactinol y glicerol (Kaplan y col., 2004). Por otro lado, se han clonado y caracterizado 6 potenciales transportadores de alcoholes de azúcar en *A. thaliana* (Klepek y col., 2005). Estos presentan una alta identidad con transportadores de poli-alcoholes caracterizados en frutos de cerezos (*Prunus cerasus*, Rosaceae; Gao y col., 2003) y en *Plantago major* (Plantaginaceae; Ramsperger-Gleixner y col., 2004).

En el trabajo de Klepek y col. (2005) se determinó que estos transportadores translocan una amplia gama de alcoholes de azúcar entre los que se incluyen sorbitol, ribitol, mio-inositol, manitol y numerosas aldosas como ribosa, galactosa, xilosa y glucosa. La función hipotética propuesta para estos transportadores es el reciclaje de los azúcares provenientes de la ruptura de la pared celular de células dañadas por patógenos en *A. thaliana*, rescatando los metabolitos del apoplasto. Lo relevante principalmente es la presencia de proteínas capaces de transportar sorbitol en esta especie, lo que es otra evidencia más del metabolismo de este poli-alcohol en la planta.

La síntesis de sorbitol en *A. thaliana* al igual que en las otras plantas mencionadas debe ser llevada a cabo por una aldosa-6-fosfato reductasa. Buscando en el genoma de esta planta un ORF con un alto grado de identidad con aldosa-6-fosfato reductasas conocidas se puede encontrar unos loci adyacentes (At2g21250 y At2g21260) que están anotadas como potenciales manosa-6-fosfato reductasas dependientes de NADP. Aunque no hay publicaciones asociadas, ambas son candidatos potenciales en la síntesis de sorbitol u otro poli-alcohol presente en *A. thaliana*.

Estos antecedentes nos revelan la posibilidad que AtSDL sea una sorbitol deshidrogenasa y que participe en el metabolismo de este poli-alcohol en *A. thaliana*.

Caracterización de AtSDL

El objetivo de este trabajo es caracterizar bioquímicamente AtSDL, una potencial sorbitol deshidrogenasa en *A. thaliana*, usando herramientas moleculares que permitan construir una base para el determinar la función de esta enzima en una especie no-*Rosaceae*.

Usando las herramientas bioinformáticas disponibles se determinó la presencia de dominios conservados, la localización sub-celular y la relación filogenética que AtSDL posee con SDHs actualmente conocidas y de esta forma esclarecer el escenario en el que se trabaja. Además, usando las estructuras cristalográficas disponibles se realizó un modelo tridimensional de la estructura de AtSDL para poder dilucidar mediante “*docking*” la especificidad de sustrato que posee la enzima, lo cual fue evaluado experimentalmente.

Como primera aproximación molecular, se analizó si la expresión de *AtSDL* es órgano y/o tejido específico. También se determinó su localización sub-celular *in vivo*, para elucidar si la enzima está presente en uno o múltiples compartimentos de la célula, como en el caso de manzanos (Wang y col., 2009).

La caracterización bioquímica de *AtSDL* se realizó mediante la expresión de ésta en forma recombinante en *Escherichia coli* y *S. cerevisiae*. La elección del primero se basó en el trabajo de Ohta y col. (2005) debido a la alta identidad de *AtSDL* y *LeSDH*, y la segunda opción se consideró por ser un sistema eucarionte mas similar a *A. thaliana*. Con todas estas herramientas se comenzó una investigación respecto a la función de las sorbitol deshidrogenasas en plantas no-*Rosaceae* y en particular en *A. thaliana*.

2.- HIPÓTESIS.

“En el locus At5g51970, en el genoma de *A. thaliana*, existe un marco de lectura abierto que codifica para una poli-alcohol deshidrogenasa NAD⁺ dependiente soluble, con alta afinidad para sorbitol, que cataliza la conversión de sorbitol a fructosa”

2.1.- HIPÓTESIS ALTERNATIVA:

“En el locus At5g51970, en el genoma de *A. thaliana*, existe un marco de lectura abierto que codifica para una poli-alcohol deshidrogenasa NAD⁺ dependiente soluble que posee mayor especificidad por otros poli-alcoholes en vez de sorbitol.

3.- OBJETIVOS:

3.1- Objetivos General:

“Determinar la localización sub-celular y precisar la especificidad de sustrato de la enzima AtSDL caracterizándola teórica y bioquímicamente desarrollando y usando herramientas moleculares para su estudio”

3.2.- Objetivos Específicos:

1. Predecir la función y la localización de AtSDL, y además, encontrar proteínas relacionadas mediante el uso de herramientas bioinformáticas.
2. Desarrollar un modelo tridimensional por homología de AtSDL evaluado energéticamente y estudiar la especificidad de sustrato mediante “*docking*”.

3. Determinar la expresión de *AtSDL* en diferentes órganos de *A. thaliana*.
4. Localizar *AtSDL*-GFP mediante transformación transitoria por agro-infiltración de hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*).
5. Expresar *AtSDL* recombinante en *E. coli* y *S. cerevisiae* y determinar la actividad enzimática de la proteína purificada.
6. Desarrollar un anticuerpo poli-clonal contra *AtSDL* como herramienta para corroborar los resultados de localización sub-celular (Objetivo 1) y determinar la presencia de *AtSDL* en diferentes órganos de *A. thaliana*.

4.-MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Material Biológico

4.1.1.- Crecimiento de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia y *Nicotiana tabacum*

Se crecieron ambas especies en medio hidropónico. El medio 100X pH 5,0 contenía KNO₃ 125 mM, Ca(NO₃)₂ 150 mM, MgSO₄ 75 mM, KH₂PO₄ 50 mM, KCl 5 mM, H₃BO₃ 5 mM, MnSO₄ 1 mM, ZnSO₄ 200 µM, CuSO₄ 150 µM, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 7,5 µM, Na₂SiO₃ 10 mM, Sprint 330 7,2 mM (Fe quelado en DTPA) ajustando el pH a 5,0 con KOH 10 M. El medio fue utilizado a una concentración de 1X, diluyendo el stock con agua destilada no estéril. Las plantas utilizadas se mantuvieron a 22 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz (intensidad lumínica 4.500-6.500 Lux) y 8 h oscuridad.

4.1.2.- Crecimiento de bacterias *Escherichia coli* (cepas *DH5α* y *BL21(DE3)pLys*) y *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101).

Las bacterias *E. coli* de la cepa *DH5α* fueron crecidas en medio LB líquido [triptona 1% (p/v), extracto de levadura 1% (p/v), NaCl 0,8 % (p/v), pH 7,0 a 25 °C] o sólido [a la mezcla anterior se le agrega agar-agar 1.5 % (p/v)] durante 14-16 h, a una temperatura de 37 °C, con agitación de 250-300 rpm en el caso de cultivo líquido.

Para la cepa BL21, las bacterias fueron crecidas en medio SOC [triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 0,05% (p/v), KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7.0 a 25 °C] durante 14-16 h, a 37 °C, con agitación de 250-300 rpm, para los pasos de transformación génica de esta cepa. Para la expresión de la proteína recombinante las condiciones fueron modificadas (sección 4.3.1)

La cepa GV3101 de *A. tumefaciens*, fue crecida en medio LB líquido y sólido durante 36-48 h, a 28 °C. Esta cepa es resistente a rifampicina (selección cromosómica de la cepa) y a gentamicina (selección del plasmido Ti).

4.1.3.- Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* cepa SC-29 (Δ ura).

S. cerevisiae fue crecido en YEPD líquido [triptona 2% (p/v), extracto de levadura 1 % (p/v), glucosa 5% (p/v)] o sólido [a la mezcla anterior se le agrega agar 1.5 % (p/v)] durante 14-20 h, a 30 °C, con agitación de 250-300 rpm en el caso de cultivo líquido.

Para seleccionar las células de levaduras transformadas genéticamente se usó la selección por auxotrofia de uracilo. El medio mínimo usado consistía en: Base de nitrógeno de levadura 0.7% (p/v), glucosa 2% (p/v) y agar 1.6 % (p/v) en el caso de medio sólido y "Dropout mix" 0.08 % (p/v). *Dropout mix* es una mezcla de aminoácidos y bases nitrogenadas esenciales preparada en forma seca y estéril, compuesta por: Hemisulfato de Adenina 5 % (p/p), Arginina-HCl 5 % (p/p), Histidina-HCl 5 % (p/p), Isoleucina 5 % (p/p), Leucina 5 % (p/p), Lisina-HCl 5 % (p/p), Metionina 5% (p/p), Serina 5 % (p/p), Treonina 5 % (p/p), Fenilalanina 8% (p/p), Triptofano 8% (p/p), Tirosina 5% (p/p), Valina 24% (p/p) y Uracilo 3% (p/p). Para el caso de esta investigación no se le añadió Uracilo a la mezcla, con el fin de seleccionar a las colonias de levadura transformadas. Los cultivos fueron incubados a 30 °C durante 20 a 24 h con agitación (250 – 300 rpm) en el caso del cultivo líquido.

4.1.4.- Transformación de *E. coli* (*DH5a* y *BL21(DE3)pLys*) quimio-competentes

El protocolo de preparación de células quimio-competentes es ligeramente distinto para cada cepa usada. En el caso de la cepa *DH5a*, se sembró una alícuota de 10 μ L en medio LB sólido de tal forma de obtener colonias aisladas. Se escogió una colonia y ésta se incubó toda la noche en 5 mL de medio LB líquido (sección 4.1.2). Ya alcanzada una $DO_{600nm} \sim 1.6$, se diluyó el cultivo 40 veces en medio LB líquido. Se incubó (250-300 rpm, 37 °C) hasta alcanzar una $DO_{(600nm)}$ de 0,5. Luego se colocó el cultivo en hielo por 15 min y se lo centrifugó (4000 x g, 10 min, 4 °C). Al eliminar el sobrenadante, las células fueron resuspendidas cuidadosamente en 15 mL de $CaCl_2$ 0.1 M estéril y frío e incubadas en hielo por 15 min. Se repitió el paso anterior de centrifugación, resuspendiendo las células en 4 mL de $CaCl_2$ 0.1 M y glicerol 20 % (v/v) estéril y fría, congelando alícuotas de 200 μ L en nitrógeno líquido almacenándolas finalmente a -80°C.

En el caso de *BL21(DE3)pLys*, se aisló una colonia de la misma forma explicada más arriba. El cultivo de esta cepa requiere el antibiótico cloranfenicol (CAM, 25 μ g/mL) para mantener el plásmido pLys. El cultivo de una colonia aislada se diluyó en 250 mL de LB-CAM dejándolo crecer (25 °C, 250 - 300 rpm) hasta una $DO_{600nm} \sim 0.5$. Luego, se colocó el cultivo en hielo por 15 min y se lo centrifugó (4000 x g, 10 min, 4 °C). El sobrenadante fue descartado y se resuspendieron suavemente las células en 80 mL de TB (Pipes 10 mM, $CaCl_2$ 15 mM, KCl 250 mM, pH 6.7 con KOH, al final se añade $MnCl_2$ 55 mM) estéril y frío. Se incubó en hielo por 10 min. Se repitió la centrifugación, volviendo a resuspender las células en 20 mL TB + 1.5 mL DMSO. Se congelaron

alícuotas de 200 μ L en nitrógeno líquido y se las guardó a -80°C . Las alícuotas de 200 μ L de ambas cepas fueron descongeladas en hielo. Se añadió 10 a 20 ng de ADN plasmidial o la totalidad de la reacción de ligación (sección 4.2.6 y 4.2.8), incubando la mezcla a 4°C por 30 min, después se colocó el tubo a 42°C por 1 min terminando nuevamente a 4°C por 5 min. Finalizado el tiempo, se agregó 1 mL LB al tubo y se dejó incubando a 37°C durante 1 h con agitación. Luego, se centrifugaron las células a $5000 \times g$, resuspendiéndolas en 100 μ L LB. Se sembró 100 μ L en LB sólido más el antibiótico requerido para seleccionar las células transformantes (Tabla II).

Tabla II: Vectores utilizados: En la tabla se presentan detalles de los vectores usados y una breve descripción de su utilidad.

Vector	Resistencia en bacteria	Concentración final del antibiótico	Tamaño	Descripción
pET-28a	Kanamicina, Kan ^R	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5369 pb	Expresión en <i>E.coli</i> (DE3). Agrega epítipo His6X N y C-terminal.
pET-24d	Kanamicina, Kan ^R	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5301 pb	Expresión en <i>E.coli</i> (DE3). Agrega epítipo His6X C-terminal.
pGEX-5X-1	Ampicilina, Amp ^R	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4900 pb	Expresión en <i>E.coli</i> (DE3). Agrega epítipo GST N-terminal.
pCR8 [®]	Espectinomicina, Spec ^R	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2817 pb	Clona productos de PCR. Vector de entrada Gateway [®]
pGWB5	Kanamicina, Kan ^R	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	17 kb	Vector destino Gateway [®] . Expresión en plantas. Agrega epítipo GFP C-terminal
p426-GPD	Ampicilina, Amp ^R	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	6637 pb	Expresión en levaduras (Δ ura ⁻). Agrega epítipo His6X C-terminal.

4.1.5.- Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* quimio-competentes

La quimio-competencia de *A. tumefaciens* se logró aislando una colonia desde un cultivo sólido y creciéndola hasta una $DO_{600nm} \sim 0.4$ según sección 4.1.2.

Se mezclaron ~ 50 ng de cada vector, obtenidos mediante una mini-preparación de DNA plasmidial, con 100 μ L de células competentes previamente descongeladas en hielo. La mezcla se incubó en hielo por 10 min y luego se congeló rápidamente en nitrógeno líquido durante 5 min y finalmente se dejó descongelar a TA. Se agregó 1 mL de LB incubando a 28 °C con agitación (>16 hrs). Al día siguiente, se sedimentó las bacterias (5000 x g, 5 min), se resuspendieron (100 μ L LB) y se sembraron todas las células en LB sólido, suplementado con kanamicina (100 μ g/mL) para la selección de pGWB5, gentamicina (100 μ g/mL) y rifampicina (10 μ g/mL, sección 4.1.2). Se dejaron crecer por 2 días a 28 °C hasta que las colonias se hicieran visibles.

4.1.6.- Transformación de *S. cerevisiae* cepa SC-29 (Δ ura) electro-competentes.

La competencia de las células de levadura se logró aislando una colonia y dejándola crecer en 20 mL de YEPD, hasta una $DO_{600nm} \sim 1.5$. Se centrifugó el cultivo (3000 x g, 5 min, 4 °C), se descartó el sobrenadante y se lavó las células con 1 volumen de agua fría (4 °C) y estéril, agitando la suspensión suavemente. Se repitió el paso de centrifugación, lavando las células en 0.5 volumen de agua fría y estéril. Nuevamente se repitió el paso de centrifugación, resuspendiendo las células en 4 mL de sorbitol 1 M estéril y frío. Finalmente, se centrifugó la suspensión y se resuspendieron las células en 100 μ L sorbitol 1 M, guardando alícuotas (40 μ L) a 4 °C no más de 2 días.

A la alícuota de células se le añadió 50 ng de ADN plasmidial (p426-GPD) y 1 μ L de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM). Esta mezcla se dejó incubando en hielo por 10 min antes de ser traspasada a una cubeta de electroporación (o electropermeabilización) de 2 mm. El electroporador usado fue Gene Pulser Xcell[®] Electroporation System de Bio-Rad. Las condiciones usadas en la transformación fueron: una diferencia de potencial de 1.5 kV, 25 μ F de capacitancia y 200 ohm de resistencia con una caída de 4.5 ms. Luego de la electroporación las células fueron incubadas en 1 mL YEPD durante 1 hora a 30 °C. Se tomaron 100 μ L del cultivo y se sembró en medio mínimo “Dropout” (sin uracilo) sólido. Se dejó incubando a 30°C por 2 a 3 días.

4.1.7.- Agro-infiltración de hojas de *Nicotiana tabacum*

Un clon de *A. tumefaciens* transformado con el vector pGWB5 fue crecido en LB líquido suplementado con kanamicina (100 μ g/mL), gentamicina (100 μ g/mL) y rifampicina (10 μ g/mL) durante 16 h a 28°C con agitación hasta una DO_{600nm} 0,6 - 0,8. Se sedimentaron las bacterias centrifugándolas (5000 x g, 5 min, TA) y se resuspendieron hasta DO_{600nm} ~0,8, en un medio de infiltración (MMA) que consiste en MES 10 mM pH 5,7, MgCl₂ 10 mM y acetosiringona (3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenona) 150 μ M. La suspensión fue incubada a 28 °C por 2 h antes de la agro-infiltración.

La agro-infiltración se realizó en *N. tabacum* en donde se perfundió la suspensión de *A. tumefaciens* por la cara abaxial de hojas jóvenes usando una jeringa de 5 mL sin aguja. Luego de 4 días, las hojas fueron cosechadas para los análisis posteriores.

4.2.- Biología molecular

4.2.1.- Diseño de partidores.

Para el diseño de los partidores se usó la secuencia del ADNc correspondiente al gen ubicado en el locus *At5g51970* del genoma de *A. thaliana* publicado en www.arabidopsis.org, que codifica para una potencial sorbitol deshidrogenada (AtSDL). La extensión de la secuencia codificante obtenida es de 1095 nucleótidos. Todos los partidores diseñados incluyen el codón de inicio (Metionina, ATG), para el partidador sentido y el ultimo codón codificante (Leucina, CTC), en el caso del partidador Anti-sentido. En la Tabla III se detalla los partidores utilizados en esta tesis.

Los partidores que incluyen el codón de término fueron diseñados para los vectores de expresión heteróloga pET-28a y pGEX-5X-1 en donde el vector le agrega un epítopo N-terminal His6X y GST respectivamente a la proteína recombinante para su posterior detección y purificación. Los partidores que no contiene el codón de término fueron diseñados para los vectores pET-24D y p426-GPD que incluyen el epítopo His6X en el extremo C-terminal de la proteína recombinante. Además, se utilizó para poder realizar la fusión AtSDL-GFP en el vector pGWB5 vía pCR8[®].

Tabla III: Partidores utilizados en la Tesis: En la tabla se detalla el nombre usado para cada partidor, su secuencia y una pequeña descripción de su uso. En azul se destaca la secuencia de corte para la endonucleasa usada y en rojo el codón de inicio y término, en el caso que lo incluya.

Nombre del Partidor	Secuencia	Descripción
S-AtSDL- <i>Bam</i> HI-pET28a	5'-GGACGGATCCATGGGG AAAGGAGGGATG-3'	Sentido. Agrega un epítipo His6X N-terminal a AtSDL al clonarlo en pET-28a.
A-AtSDL- <i>Not</i> I-pET28a	5'GGACGCGGCCGCTCAGAG ATTGAACATAACTTTG-3'	Anti-sentido. Contiene el codón de término, para clonar AtSDL en los vectores pET-28a y pGEX-5X-1
A-AtSDL- <i>Not</i> I-p426	5'-GGCAGCGGCCGCAAGAG ATTGAACATAACTTTGATG-3'	Anti-sentido. Sin codón de término. Agrega un epítipo His6X C-terminal al clonarlo en p426-GPD.
S-AtSDL- <i>Bam</i> HI-pET24d	5'-GGCAGGATCCAAATGGGG AAAGGAGGGATG-3'	Sentido. Al clonar AtSDL mantiene el marco de lectura de los vectores pET-24d, pGEX-5X-1 y pCR8®
A-AtSDL- <i>Not</i> I-pET24d	5'-GGACGCGGCCGCGAG TTGAACATAACTTTCATG-3'	Anti-sentido. Sin codón de término. Mantiene el marco de lectura de los vectores pET-24d, pGEX-5X-1 y pCR8®.
S-LeSDH- <i>Bam</i> HI-pGEX	5'-GGCAGGATCCTAATGGGT AAAGGAGGCAG-3'	Sentido. Agrega la proteína GST N-terminal a LeSDH al clonarlo en pGEX-5X-1.
A-LeSDH- <i>Not</i> I-pGEX	5'-GGCAGCGGCCGCTTTTACA AATTAACATGAC-3'	Anti-sentido. Contiene el codón de término. Permite clonar LeSDH en pGEX-5X-1.
Oligo-dT	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT -3'	Anti-sentido. Partidor usado en la reacciones de RT.
A-GFP	5'-CAGGTAATGGTTGTCTGG-3'	Anti-sentido. Partidor específico para amplificar desde el 3' la secuencia de GFP

4.2.2.- Extracción de ARN total de *A. thaliana*.

Para realizar la reacción de RT-PCR se extrajo ARN total desde diferentes tejidos de *A. thaliana* utilizando RNA-Solv[®] Reagent de Omega Bio-tek. Se pesaron 10-50 mg de hojas rosetas, hojas caulinares, tallos, raíces y flores de *A. thaliana* cultivadas como se indica en la sección 4.1.1. Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido (5 min) y luego fueron maceradas con un pistilo. Al polvo resultante de cada muestra se le añadió 1 mL de RNA-Solv[®] Reagent homogeneizándolas con el mismo pistilo e incubándolas (5 min, TA). Posterior a esto, se le agregó 200 µL cloroformo, se homogenizaron vigorosamente las fases por 15 s, seguido por la incubación de las muestras en hielo por 10 min. Las muestras fueron centrifugadas (12000 x g, 15 min, TA) y la fase acuosa fue recuperada y transferida a otro tubo de microcentrifuga. La precipitación del ARN fue realizada agregando 500 µL de isopropanol a -20 °C e incubando a esta misma temperatura por 20 min. Después de esto, se centrifugó (12000 x g, 10 min, 4 °C) y se descartó el sobrenadante, cuidando de no perder el pellet. Por último, éste fue lavado con 1 mL de etanol al 80% (v/v) en agua DEPC y posteriormente centrifugado, secado y resuspendido en 30 µL de agua DEPC a TA. Después de esto se prosiguió a cuantificar el ARN extraído usando un espectrofotómetro (NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis), que mide la absorbancia a 260 nm de 1 µl de muestra. Además, se comprobó la pureza de las extracciones de ARN, usando las relaciones 260 nm/280 nm y 260 nm/230 nm que el programa del espectrofotómetro entrega. El valor relación 260 nm/280 nm tiene que estar entre 1,8 y 2,0. Es generalmente aceptado que valores cercanos a 1.8 y 2,0 indican extracciones puras de ADN y ARN, respectivamente;

valores más bajos que estos, señalan la presencia de contaminantes como proteínas, fenoles u otros compuestos que absorben a 280 nm. Para la relación 260/230 los valores para muestras puras de ARN o ADN son ligeramente mayores, comúnmente en el rango de 1,8 y 2,2. Valores más bajos revelan la presencia de solventes orgánicos, algunas sales y proteínas.

La integridad del ARN total se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) (sección 4.2.3), verificando la presencia de las bandas de ARNr de 28S y 18S.

4.2.3.-Electroforesis en geles de agarosa

Para determinar la integridad de las extracciones de ARN, verificar las reacciones de PCR y analizar las digestiones enzimáticas de ADN plasmidial, se utilizó la electroforesis de geles de agarosa. El gel de agarosa al 1% (p/v) se preparó con tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) y bromuro de etidio 1 µg/mL. Se mezcló 1 µL de tampón de carga [Azul de bromofenol 0.25% (p/v), xilene cianol 0.25% (p/v) y glicerol 80% (v/v), preparada en TAE 1X] por cada 5 µL de muestra analizada. El gel se colocó en una cámara de electroforesis embebida con tampón TAE 1X en donde se generaba un potencial (80 V a 100 V) durante 30 min aproximadamente.

4.2.4.- Reacción de retro-transcriptasa (RT) desde RNA extraído desde *A. thaliana*.

Las reacciones de retrotranscriptasa (RT) se llevaron a cabo usando el sistema ImProm-II[®] Reverse Transcription System de Promega. Cada reacción se realizó en un volumen de 20 µL. La composición final de la mezcla, incluyendo 2 µg del ARN, fue la siguiente: Tampón ImProm-II[®] RT 1X; MgCl₂ 3 mM; dNTPs 0,5 mM; oligo-dT 0,5 µM y 20 U

inhibidor de ribonucleasas recombinante RNasin[®] de Promega. En un comienzo la mezcla está separada en dos volúmenes, el primero contenía el ARN total y los partidores Oligo-dT, y el segundo el resto de los componentes de la reacción.

La reacción se realizó en un termociclador, cuyo programa consiste en incubar 5 min a 70 °C al volumen que contiene el ARN y el Oligo-dT. Inmediatamente después, los tubos son incubados en hielo, añadiéndoles el resto de la mezcla de reacción. Luego de 5 min, se volvió a colocar en el termociclador y se incubaron por 5 min a 25 °C. La mezcla fue posteriormente incubada a 42 °C (60 min) y luego a 70 °C (15 min).

4.2.5.- Reacción de PCR con el objetivo de amplificar el cDNA de AtSDL y LeSDH.

Para la reacción de PCR se usaron 3 µL del producto de la reacción de RT (ADNc) en un volumen total de 20 µL que estaba compuesto por: 1X Tampón de reacción Taq-Polimerasa Favorgen[®]; MgCl₂ 5 mM; dNTPs 0,2 mM; 0,5 µM de cada partidor (Tabla II) y 1 U de Taq polimerasa Favorgen[®]. El protocolo de reacción incluyó: 3 min en "Hot-Start" a 94 °C, luego 1,5 min a 94 °C en presencia de Taq-polimerasa, seguido por 42 ciclos (30 s a 94 °C, 1 min a 55 °C, 1,5 min a 72 °C). Esto finalizó con un ciclo de 10 min a 72 °C y finalmente a 4 °C. Este protocolo se usó para todos los partidores diseñados específicos para *AtSDL* (Tabla II), usando como molde tanto ADNc de *A. thaliana* como ADN plasmidial.

En el caso del ADNc de LeSDH se utilizó como molde de la reacción de PCR el vector pCambia 1302 35S-LeSDH, realizado en mi seminario de título (Mandujano, 2008) utilizando las mismas condiciones de amplificación explicadas más arriba.

Para las reacciones de PCR de colonias se usó como ADN molde las colonias de células a analizar (*E. coli*, *A. tumefaciens* y *S. cerevisiae*) diluidas en 5 μ L agua estéril. Se usó 3 μ L de esta suspensión como molde (condiciones de PCR detalladas arriba). Los 2 μ L restantes sirvieron como inóculo para mantener el clon en el caso de que este fuera positivo.

4.2.6.- Clonamiento en pCR8[®].

pCR8[®] (Invitrogen) permite clonar los productos de PCR que incluyan en sus extremos 3' una adenina desapareada que es agregada por la Taq-Polimerasa. pCR8[®] está linealizado y en los extremos fosfatos 5' posee una timina desapareada que está unida covalentemente a una tirosina 274 de una Topoisomerasa. Cuando el producto de PCR hibrida sus adeninas con las timinas, la Topoisomerasa cataliza la reacción en donde se rompe el enlace que une al fosfato 5' a la tirosina 274 y se forma el enlace fosfodiéster entre el vector y el producto de PCR, liberando así la enzima al medio (Shuman, 1994).

Este vector permite ser vía de clonamiento para los vectores de expresión heteróloga bacteriana (pET-28a, pET-24d y pGEX-5X-1) y de levadura (p426-GPD), al no poseer los sitios de corte de *Bam*HI y *Not*I incorporados en los partidores. Además, al clonar productos PCR que mantengan el marco de lectura del vector, permite que funcione como vector de entrada en el sistema Gateway[®] explicado más adelante (sección 4.2.9).

Para la reacción de ligación se usó 20 ng del producto de PCR, 1 μ L de solución salina (NaCl 1.2 M y MgCl₂ 0.06 M), 1 mL del vector pCR8[®] [10 ng en: glicerol 50% (v/v), Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 (25°C), EDTA 1 mM, DTT 1 mM, Triton X-100 0.1% (v/v),

BSA 100 µg/ml] y se completó con agua libre de nucleasas hasta un volumen de 6 µL.

La mezcla se incubó a 4 °C toda la noche para formar pCR8-AtSDL.

4.2.7.-Digestión de ADN plasmidial con las endonucleasas *Bam*HI y *Not*I y purificación de fragmentos de ADN liberados.

Para clonar el ADNc de AtSDL en los vectores de expresión pET-28a, pET-24d, pGEX-5X-1 y p426-GPD fue necesario digerirlos con las enzimas *Bam*HI y *Not*I (Fermentas[®]) al igual que al vector pCR8-AtSDL.

Debido a la incompatibilidad de las soluciones tampón de estas enzimas no fue posible realizar una digestión doble; por lo tanto, se realizaron digestiones en serie.

Para la reacción con *Not*I se usó 500 ng de ADN plasmidial, con 1X tampón Tango[®], 5 U *Not*I completando con agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 20 µL. La mezcla se incubó a 37 °C por 16 hrs, con el fin de asegurar la linealización completa de los plasmidios. Después se le agregó 10 µL de una solución de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1). Se agitó vigorosamente y se centrifugó (10000 x g, 5 min, 4 °C). Se rescató el sobrenadante cuidadosamente y se agregó 20 µL de isopropanol frío y se dejó incubando a -20 °C por 10 min. Finalmente se centrifugó (14000 x g, 30 min, 4°C), el sobrenadante fue descartado y se secó el ADN precipitado a TA o en un concentrador por vacío (High Speed Vacuum). Cuando el ADN esté libre de alcohol se resuspendió en agua libre de nucleasas a 40 °C para facilitar la solubilización. Esta solución sirvió de sustrato para la segunda reacción de digestión con *Bam*HI. La

extracción anteriormente detallada recupera alrededor del 80 % del ADN inicial. Por lo tanto, se realizó la segunda digestión usando 400 ng de ADN plasmidial linealizado, 1X del tampón de *Bam*HI Fermentas[®], 5 U *Bam*HI y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 20 µL. La mezcla se incubó a 37 °C por 2 hrs.

La verificación de la reacción de digestión se realizó por electroforesis de geles de agarosa (sección 4.2.3). Una vez separados los fragmentos de ADN digeridos se prosiguió a purificar los fragmentos de interés. En el caso de pCR8-AtSDL se purificó el fragmento de ~1kb correspondiente al ADNc de AtSDL, para el caso de los vectores de expresión usados se purificó el fragmento de mayor tamaño que corresponde al vector linealizado (tabla I). Se cortó y purificó el fragmento de interés desde gel mediante el kit de purificación de ADN desde geles Wizard[®] PCR Preps Resin de Promega. El fragmento purificado fue recuperado en 15 µL de agua libre de nucleasas.

4.2.8.- Reacción de ligación con ADN ligasa T4

La reacción de ligación se llevó a cabo usando una relación molar 3:1 ente el vector linealizado y el ADNc de AtSDL. En este trabajo se comprobó que la eficiencia de ligación aumentaba al calentar la mezcla del vector linealizado y el inserto a 50 °C por 5 min y luego enfriándola rápidamente a 4 °C en hielo, antes de agregar la ADN ligasa T4. La reacción comenzó agregando 1 X de tampón ADN ligasa T4 y 1 U ADN ligasa T4 Fermentas[®]. La mezcla se dejó incubando a 4 °C toda la noche.

4.2.9.- Sistema de clonamiento Gateway® y construcción de pGWB5-AtSDL-GFP.

El sistema de clonamiento por recombinación Gateway® de Invitrogen elimina los pasos intermedios de clonación usando endonucleasas y ligasas, y en un solo paso, se clona el gen de interés en el vector de destino. Además, manteniendo el marco de lectura del vector de entrada permite que el vector de destino agregue diferentes epítodos a la proteína.

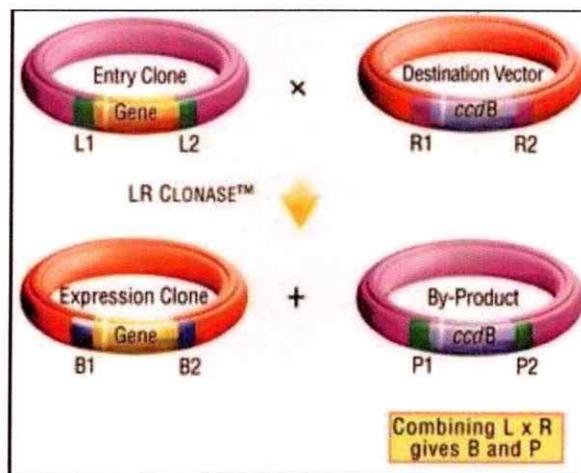


Figura 2: Sistema de clonamiento Gateway®. La recombinación sitio específica entre los sitios *attL* y *attR* permite traspasar la secuencia de interés desde el vector de entrada al vector expresión final. La selección de los clones se hace mediante el gen *ccdB*, letal para la cepa *DH5α* de *E. coli*.

El sistema se basa en la recombinación del vector de entrada (pCR8®) y el vector de destino (pGWB5) a través de las secuencias *att* ("attachment site") en donde se intercambian las secuencias que estos sitios flanquean. La reacción es llevada a cabo por la LR Clonasa® II que cataliza la recombinación entre los sitios *attL* del vector de entrada y los sitios *attR* del vector de destino en forma sitio-dirigida en donde el *attL1*

recombina con *attR1* y *attL2* recombina con *attR2*. En la figura 2 se esquematiza la reacción y los productos generados.

Se mezcló de 50 a 150 ng del vector de entrada pCR8[®]-AtSDL (< 7 µL), 150 ng del vector de destinación pGWB5, 8 µL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1mM) y 2 µL del “mix” LR Clonasa[®] II de Invitrogen. Se agitó vigorosamente y se incubó a 25 °C por 2 hrs. La reacción se detuvo agregando 1 µL de Proteinasa K e incubando a 37 °C por 10 min.

4.2.10.-Mini-preparaciones de ADN plasmidial desde *E. coli* cepa *DH5α*.

Las colonias de bacterias fueron crecidas en 5 mL de LB (sección 4.1.2). De los 5 mL, 1 mL fue guardado en stock con glicerol al 20% (v/v) a -80 °C como respaldo. Los plásmidos bacterianos fueron aislados de los 4 mL restantes, mediante mini-preparaciones siguiendo las instrucciones del fabricante (AxyPrep Plasmid Miniprep Kit, Axygene[®]). Al final, se resuspendieron los plásmidos en 50 µL de Tris-HCl 2,5 mM, pH 8,5 a 37°C. La cuantificación se llevó a cabo según sección 4.2.2.

4.3.-Bioquímica y Biología Celular

4.3.1.- Expresión de AtSDL y LeSDH recombinante en *E. coli* cepa *BL21(DE3)pLys*

La producción de las proteínas recombinantes AtSDL, His-AtSDL, GST-AtSDL y GST-LeSDH se realizó mediante un protocolo de inducción por IPTG. Los clones de *E. coli* cepa *BL21(DE3)pLys* transformados con pET-28a-AtSDL (His-AtSDL), pET-24d-AtSDL (AtSDL), pGEX-5X-1-AtSDL (GST-ATSDL) y pGEX-5X-1-LeSDL (GST-

LeSDH) fueron crecidos en 5 mL de medio SOC según sección 4.1.2. El cultivo fue diluido 50 veces con medio SOC fresco, traspasado a un matraz de 250 mL e incubado (37 °C, ~3 hrs) hasta alcanzar una $DO_{600nm} \sim 0.8$. Se agregó IPTG a una concentración final de 0.5 mM y se volvió a incubar (37 °C, 4 hrs). Posteriormente, se centrifugaron las células (3000 x g, 5 min, 4 °C), se resuspendieron en 20 mL de un tampón de lisis [Tris-HCl 100 mM pH 7.4, EDTA 1mM, NaCl 50 mM, Triton X-100 0.1% (v/v), DTT 1 mM y PMSF 0.1 mM] frío y estéril, traspasando la suspensión a un tubo de 50 mL. Las células fueron lisadas por un sonicador Misonix[®] Microson xl2000 Ultrasonic Cell Disruptor a 30 Watts rms. Se aplicaron 10 pulsos de 30 s cada uno en intervalos de 1 min en donde las células se mantuvieron en hielo. Cuando la suspensión celular se observó clarificada se centrifugó a 20000 x g por 30 min a 4 °C. Tanto AtSDL como LeSDH se expresaron formando cuerpos de inclusión y se encontraron en el precipitado de la centrifugación. Siguiendo las especificaciones del trabajo de Ohta et al, (2005), las proteínas fueron recuperadas solubilizándolas en 10 mL de un tampón que contenía Tris-HCl 100 mM pH 7.4, urea 6 M y DTT 1 mM a 4 °C por >12 hrs. Finalmente, se ajustó el volumen manteniendo una concentración de proteínas de ~0.5 mg/mL.

4.3.2.- Purificación de His-AtSDL por cromatografía de afinidad de ión metálico (Ni) inmovilizado.

Se purificó His-AtSDL en condiciones desnaturantes en presencia de urea 6 M. Una vez solubilizado el agregado de proteínas donde se encontraba His-AtSDL, se centrifugó a 8000 x g para clarificar la solución. La columna HisTrap HP de GE Healthcare[®] de 5 mL fue preparada haciendo fluir Tris-HCl 100 mM pH 7.4, urea 6 M y DTT 1 mM a 2

mL/min (15 min, TA). Una vez ambientada la columna se hizo pasar la solución con las proteínas solubilizadas en urea al mismo flujo. La columna fue lavada con 10 volúmenes de Tris-HCl 100 mM pH 7.4, urea 6 M, DTT 1 mM y imidazol 30 mM. Una vez lavada, His-AtSDL fue liberado aumentando la concentración de imidazol a 350 mM. Se recolectaron fracciones de 1.5 mL y se detectó la presencia de la proteína de interés mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) y SDS-PAGE (sección 4.3.5).

4.3.3.- Re-plegamiento de AtSDL y LeSDH recombinante.

Re-plegamiento mediante diálisis: De acuerdo a Ohta et al, (2005), se dializó el solubilizado de proteínas (AtSDL, His-AtSDL, GST-AtSDL o GST-LeSDH) contra el tampón Tris-HCL 100 mM pH 8.0, urea 2 M, EDTA 1mM, ZnSO₄ 1mM y DTT 1 mM (2 hrs, 4 °C). Luego, se volvió a dializar contra el tampón Tris-HCL 100 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, EDTA 1mM, ZnSO₄ 1mM y DTT 1 mM (12 hrs, 4 °C). Finalmente se centrifugó la solución (8000 x g, 10 min, 4 °C) y se almacenó el sobrenadante a 4°C.

Es importante destacar que al preparar las soluciones de diálisis, el ZnSO₄ se agrega al final, una vez ya solubilizado el EDTA. Esto se debe a que ZnSO₄ es insoluble a pH básicos y solo es soluble en presencia de EDTA.

Re-plegamiento mediante dilución: Siguiendo las especificaciones del trabajo de Rudolph y col. (1978) se probaron diferentes condiciones de re-plegamiento mediante dilución. La solución de las proteínas solubilizadas en urea 6 M fue diluida 10 veces con un tampón Tris-HCl 100 mM pH 8.0, NaCl 100 mM y DTT 2 mM o un tampón fosfato

de Na 100 mM pH 8.0, 100 mM NaCl y 2 mM DTT a TA. Después de 15 min, se agregó $ZnCl_2$ (0, 1, 3, 6 y 10 μM) a TA. Luego se incubaron las diluciones a 4 °C toda la noche.

4.3.4.- Expresión de AtSDL-His en *S. cerevisiae* cepa SC-29 (Δura^+)

Dado que el vector de levadura p426-GPD es episomal, siempre se mantuvieron los clones en medio mínimo “*Dropout*” (sin uracilo) para su crecimiento. La expresión de AtSDL-His en este vector está controlada por un promotor de expresión constitutiva y fuerte GPD (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa).

Para producir la proteína AtSDL-His recombinante, se crecieron las células en 100 mL medio mínimo “*Dropout*” (sin uracilo, sección 4.1.3). Luego se centrifugaron (3000 x g, 5 min, 4 °C) resuspendiendo las células en 5 mL de tampón de lisis [Tris-HCl 100 mM pH 7.4, EDTA 1mM, NaCl 50 mM, Triton X-100 0.1% (v/v), DTT 1 mM y PMSF 0.1 mM] fría y estéril. A la suspensión de células se le agregó 1 volumen de bolitas de vidrio (106 μm , Sigma[®]) esterilizadas por ácido y se mezclaron en un *vortex* a máxima velocidad por 5 min y se dejó incubando en hielo por 1 min repitiendo este paso 5 veces. Luego de romper las células, se centrifugó la suspensión (5000 x g, 5 min, 4 °C), y se guardó el sobrenadante a 4 °C.

4.3.5.- Ensayos de actividad sorbitol deshidrogenasa (SDH)

Para detectar la actividad SDH de las enzimas recombinantes se usó una mezcla de reacción con un tampón Tris-HCl 100 mM pH 9.0, sorbitol 150 mM, NAD⁺ o NADP⁺ 0.5 mM en un volumen de 1.5 mL. La reacción se iniciaba agregando la proteína recombinante (AtSDL, His-AtSDL, GST-AtSDL o GST-LeSDH) en diferentes

cantidades. Como control positivo de la reacción se usó la SDH de oveja (Sigma[®]), agregando 0.1 U por reacción. La reacción se siguió en un espectrofotómetro como el aumento de absorbancia a 340 nm. Para el análisis de otros sustratos (xilitol, eritritol, arabitol, manitol o inositol, 150 mM), se reemplazó sorbitol en la solución de reacción.

Para la reacción de reversa, se usó una mezcla de reacción con un tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.0, fructosa 300 mM y NADH 0.1 mM. La reacción se siguió en un espectrofotómetro como la disminución en la absorbancia a 340 nm.

4.3.6.- Preparación de un antisuero de ratón contra AtSDL

La solución con GST-AtSDL solubilizada después de la diálisis (sección 4.3.3) fue dializada nuevamente contra un tampón PBS (NaCl 134 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM pH 7.4) y diluida a 0.2 mg proteína/mL. La inmunización de los ratones fue realizada por Leonardo Vargas Hernández (Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile). Para la inmunización intraperitoneal de los ratones, se preparó un extracto utilizando 75 µg de proteínas en tampón PBS mezclado con Adyuvante Completo de Freund (ACF; 1:1). El volumen total inyectado no superó los 200 µL. Las inmunizaciones intraperitoneales se repitieron cada 7 d durante cinco semanas. Se inmunizaron en total 3 ratones. Estos fueron controlados cada 2 semanas, extrayéndoles 50 µL de suero sanguíneo y constatando la presencia de anticuerpos contra AtSDL mediante el método de ELISA y Western-Blot. Finalmente a la quinta semana, se extrajo 200 µL de suero sanguíneo de cada ratón los que fueron usados para los experimentos realizados en esta tesis.

4.3.7.- Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE)

Con el fin de seguir la expresión, purificación y re-plegamiento de las proteínas recombinantes se usó SDS-PAGE. El gel separador fue preparado al 12 % (p/v) usando 1.7 mL de agua desionizada, 2 mL de una solución de acrilamida 30 % (p/v) y bis-acrilamida 0.8 % (p/v); 1,3 mL de un tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 50 μ L de SDS 10% (p/v), 50 μ L de APS 10 % (p/v) fresco y 5 μ L de TEMED. El gel concentrador fue preparado al 5 % (p/v) usando 0.68 mL de agua desionizada, 170 μ L de una solución de acrilamida 30 % (p/v) y bis-acrilamida 0.8 % (p/v); 130 μ L de un tampón Tris-HCl 0.5 M pH 6,8; 10 μ L de SDS 10% (p/v), 10 μ L de APS 10 % (p/v) fresco y 1 μ L de TEMED. El tampón de corrida fue preparado con Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 192 mM, SDS 0.1 % (p/v). Se mezclaron las muestras con una solución 2X de tampón de carga [Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 20 % (v/v), β -mercaptoetanol 2% (v/v), Azul de bromofenol 0.1 % (p/v) y SDS 4 % (p/v)] y hervidas por 10 min. Se cargaron ~15 μ g de proteínas de cada muestra y se corrió por dos horas con un potencial de 100 V. Los geles fueron revelados mediante tinción de Coomassie (Merril, 1990). Los pesos moleculares esperados de las proteínas recombinantes están en la tabla IV.

Tabla IV: Tamaños de las proteínas recombinantes: En la tabla se detalla las construcciones generadas, su producto génico y el tamaño estimado.

Construcción	Proteína recombinante	Peso molecular
pET-28a-AtSDL	His-AtSDL	43 kD
pET-24d-AtSDL	AtSDL	42 kD
pGEX-5X-1-AtSDL	GST-AtSDL	65 kD
pGEX-5X-1-LeSDL	GST-LeSDH	58 kD
p426-GPD-AtSDL	AtSDL-His	43 kD

4.3.8.- Inmunodetección mediante Western-Blot

Una vez resuelto el gel SDS-PAGE, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa usando Trans-Blot[®] SD “Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell” (Bio-Rad). La transferencia se efectuó a 12 V por 10 min. Luego de la transferencia se lavó la membrana en TBS-T [Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 140 mM y Tween-20 0.1 % (v/v)] y se constató la transferencia incubando la membrana con una solución de Rojo de Ponceau [Rojo de Ponceau 0.1 % (p/v), ácido acético 5 % (v/v)]. Se lavó la membrana con agua destilada hasta que la tinción desapareciera, luego se incubó con TBS-T y BSA 3 % (p/v) con agitación suave (1 h, TA). Después se lavó 3 veces con TBS-T durante 5 min. La membrana fue incubada en TBS-T, BSA 1 % (p/v) y el anticuerpo primario [“Monoclonal Anti-polyHistidine antibody produced in mouse” Sigma[®] (1:3000); Suero sanguíneo anti-AtSDL generado en ratón (sección 4.3.4), usado 1:100] con agitación suave (16 hrs, 4 °C). Luego de la incubación, se lavó la membrana 3 veces con TBS-T durante 10 min. Después del último lavado la membrana fue incubada en TBS-T, BSA 1 % (p/v) y el anticuerpo secundario [“Anti-Mouse IgG (whole molecule) alkaline phosphatase conjugate” Sigma[®] (1:20000)] con agitación suave (1 h, TA). La membrana se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 min y 2 veces con tampón Alcalino (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM) durante 5 min. Para el revelado se incubó la membrana con 20 mL de tampón Alcalino, 66 µL de NBT 50 % (p/v) en DMSO y 33 µL de BCIP 50 % (p/v) en DMSO a TA, hasta que las bandas se hicieran visibles (~10 min). Finalmente la reacción se detuvo con 20 mL de EDTA 20 mM.

4.3.9.- Análisis de localización sub-celular de AtSDL-GFP por microscopia de fluorescencia

Los análisis de localización sub-celular de la quimera AtSDL-GFP expresada en forma transitoria en hojas de *Nicotiana tabacum* (sección 4.1.7), se realizaron mediante microscopia de fluorescencia. Cuatro días después de la agro-infiltración, las hojas de *N. tabacum* infiltradas fueron cosechadas y observadas bajo un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX70). La longitud de onda de la luz incidente estaba entre los 488 y 498 nm y el filtro utilizado entre 507 y 516 nm.

4.3.10.- Análisis de localización de AtSDL por fraccionamiento sub-celular y extracción de proteínas totales de diferentes tejidos de *A. thaliana*.

Para la localización sub-celular de AtSDL, en primera instancia, se cosechó 1 g de hojas rosetas de *A. thaliana*. Estas fueron congeladas en nitrógeno líquido y molidas en un mortero. Se agregó 10 mL de un tampón para protoplastos (sorbitol 400 mM, MES/KOH 20 mM pH 5,7; CaCl₂ 0,5 mM) fría y estéril mezclando vigorosamente (Somerville, 1981). La suspensión fue filtrada en un colador (diámetro de poro de 100 µm) y centrifugada (10³ x g, 20 min, 4 °C). El sobrenadante 1 fue rescatado, mientras que el precipitado 1 (células enteras y núcleos) fue resuspendido en una solución SEP [Tris-HCl 100 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaCl 100 mM, Triton X-100 1,5 % (v/v), SDS 0.1 % (p/v), DTT 1 mM y PMSF 0.1 mM] y guardado a 4 °C. El sobrenadante 1 fue centrifugado (10⁴ x g, 30 min, 4 °C), y el resultante sobrenadante 2 fue rescatado, mientras que el precipitado 2 (mitocondrias, cloroplastos, lisosomas y

peroxisomas) fue resuspendido en la solución SEP y guardado a 4 °C. El sobrenadante 2 fue centrifugado ($10^5 \times g$, 1,5 hrs, 4 °C) y el resultante sobrenadante 3 fue rescatado, mientras que el precipitado 3 (membrana plasmática y fracción microsomal) fue resuspendido en la solución SEP. El sobrenadante 3 es la fracción enriquecida con citoplasma celular. Debido a la dilución de las proteínas presentes en éste, se le agregó TCA a una concentración final de 20 % (p/v). La mezcla se dejó incubando en hielo por 30 min y posteriormente fue centrifugada ($10^4 \times g$, 15 min, 4 °C). Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de acetona. Se repitió el paso de centrifugación y se dejó secando el precipitado a TA o en un concentrador por vacío (High Speed Vacuum). Una vez secas las proteínas, se resuspendieron en 500 μ L de NaOH 0.1 M y se calentaron a 40 °C hasta completar su solubilización.

Para la localización de AtSDL en distintos tejidos de *A. thaliana* (hojas rosetas, hojas caulinares, tallo, raíz, flor, silicuas y semillas secas), se cosecharon ~100 mg de cada tejido y se congelaron en nitrógeno líquido. Cada muestra de tejido fue homogenizada en presencia de 1 mL de SEP y filtrada en un colador (diámetro de poro de 100 μ m). La suspensión fue centrifugada ($10^4 \times g$, 20 min, 4 °C) y se rescató el sobrenadante. Las proteínas presentes fueron precipitadas mediante TCA explicado anteriormente.

Cada muestra fue analizada mediante SDS-PAGE y Western-Blot (sección 4.3.6) usando el suero sanguíneo contra AtSDL producido en ratón (sección 4.3.4).

4.4.-Bioinformática

4.4.1.- Análisis preliminar de los dominios conservados en AtSDL

La secuencia aminoacídica de AtSDL (GenBank AAM91782.1) fue analizada mediante alineamientos con el objetivo de encontrar motivos conservados que permitieran dilucidar su función. La secuencia fue analizada en los servidores InterProScan (www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan) y Pfam (pfam.sanger.ac.uk/). La localización subcelular de AtSDL fue predicha usando los programas en línea disponibles en el servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/subcellular/>)

4.4.2.- Alineamiento múltiple y dendrograma

Usando la secuencia aminoacídica de AtSDL se buscó 70 proteínas con alta identidad (>40 %) mediante la herramienta PSI-BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov). PSI-BLAST genera una matriz de puntaje posición específica en el primer alineamiento múltiple, esta matriz se usa para continuar la búsqueda en cada iteración. De esta manera se privilegia secuencias que se alineen con un mínimo de “gaps” a la secuencia objetivo, entregando más información de ésta en forma comparativa.

Las secuencias seleccionadas fueron alineadas mediante ClustalX 2.0 con un “Gap Opening” de 10 y un “Gap Extension” de 0,3 usando la matriz BLOSUM, iterando en cada paso de alineamiento y en el alineamiento final. El archivo de alineamiento final fue guardado en formato GCG/MSF y editado con el programa GeneDoc 2.7. El dendrograma se realizó mediante Bootstrap Neighbor-Joining Tree con 100 inicios

estocásticos y 1000 repeticiones. El dendrograma finalmente fue dibujado mediante el servidor iTOL (<http://itol.embl.de/>).

4.4.3.- Modelo de la estructura molecular de AtSDL y experimentos de dinámica molecular

El modelamiento por homología es una técnica que permite generar y evaluar un modelo de la estructura molecular de una proteína en estudio, mediante alineamiento de secuencias de proteínas cristalografiadas (PDB, www.rcsb.org).

Para el modelo de AtSDL se usaron de molde 3 estructuras resueltas por cristalografía por rayos x. El uso de 3 moldes permitió determinar la estructura de sectores de AtSDL que no alineaban con cada secuencia por separado. Los códigos PDB y sus identidades con AtSDL son: 1E3J (*Bemisia argentifolii* SDH, 51 %, Banfield y col., 2001), 1PL6 (*Homo sapiens* SDH, 46 %, Pauly y col., 2003), 2DFV (*Pyrococcus horikoshii* TDH, 32%, Ishikawa y col., 2007). Mediante el programa Modeller 9v3 se generaron 50 modelos los cuales fueron evaluados mediante los programas Verify3D (nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/), Anolea (swissmodel.expasy.org/anolea) y ProSA 2003 (<http://www.came.sbg.ac.at>). Al modelo generado mejor evaluado se le calculó su estado de protonación a pH 9,0 (pH de reacción óptimo para SDHs, Lo Bianco y col, 1998) mediante el servidor H⁺⁺ (biophysics.cs.vt.edu/H++/). Una vez determinado su estado de protonación, se le asignó una carga formal mediante campos de fuerza CHARMM (Brooks y col, 1983) y fue sometido a un experimento de dinámica molecular para minimizar su energía mediante NAMD 2.6 (www.ks.uiuc.edu/Research/

namd). El sistema fue solvatado en una esfera de agua, cuyo límite se dispuso a 10 Å por sobre la superficie de la proteína. Este sistema fue minimizado por 5000 iteraciones, utilizando el algoritmo de gradiente conjugado. Luego, el sistema fue equilibrado por 50 ps a 300 K y la simulación fue extendida por 0.5 ns.

4.4.4.- Análisis de ligandos en la estructura tridimensional de AtSDL usando Autodock.

Usando el modelo energéticamente minimizado de AtSDL, se realizaron experimentos *in silico* de especificidad de sustrato y cofactor mediante AutoDock 4 con AutoDockTools-1.5.2. Para determinar la especificidad de cofactor, a NAD⁺ y a NADP⁺ se le asignaron una carga formal mediante asignación de cargas parciales Gasteiger (Gasteiger y Marsili, 1980). Al modelo de AtSDL se le agregó un ión de Zn²⁺ en forma manual coordinado por los aminoácidos descritos en el trabajo de Klimacek y col (2007) con una carga formal de +0.95. Una vez listo el modelo, se le asignaron cargas parciales a los residuos mediante CHARMM (Brooks y col, 1983). Se dejaron 5 torsiones libres (carbono-carbono) a los cofactores analizados y ninguna a los residuos aminoacídicos del modelo de AtSDL. Finalmente se configuraron $2,5 \times 10^7$ evaluaciones energéticas. Los resultados fueron entregados en un histograma de energía.

Para el análisis de especificidad de sustrato *in silico*, se realizó un “Virtual screening” con distintos polialcoholes. Los experimentos de “Docking” se realizaron asignando cargas parciales a los sustratos mediante Gasteiger y al modelo de AtSDL por CHARMM. Fueron dejadas libres las torsiones carbono-carbono de los polialcoholes y

rígidas las de los grupos OH. Por otro lado, en el modelo de AtSDL se permitió libertad de torsión a los aminoácidos que participan en la unión de sustrato (Klimacek y col, 2007). Finalmente se configuraron $2,5 \times 10^7$ evaluaciones energéticas. Los resultados fueron entregados en un histograma de energía. Las conformaciones resultantes fueron discriminadas usando como criterio los datos entregados en el trabajo de Klimacek y col (2007). Una vez determinadas las conformaciones de los sustratos y cofactor, y sus respectivas energías de unión con el modelo de AtSDL, se prosiguió a realizar experimentos de dinámica molecular, usando las especificaciones descritas anteriormente, para constatar la estabilidad de unión del ligando al modelo.

4.3.8.- Inmunodetección mediante Western-Blot

Una vez resuelto el gel SDS-PAGE, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa usando Trans-Blot[®] SD “Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell” (Bio-Rad). La transferencia se efectuó a 12 V por 10 min. Luego de la transferencia se lavó la membrana en TBS-T [Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 140 mM y Tween-20 0.1 % (v/v)] y se constató la transferencia incubando la membrana con una solución de Rojo de Ponceau [Rojo de Ponceau 0.1 % (p/v), ácido acético 5 % (v/v)]. Se lavó la membrana con agua destilada hasta que la tinción desapareciera, luego se incubó con TBS-T y BSA 3 % (p/v) con agitación suave (1 h, TA). Después se lavó 3 veces con TBS-T durante 5 min. La membrana fue incubada en TBS-T, BSA 1 % (p/v) y el anticuerpo primario [“Monoclonal Anti-polyHistidine antibody produced in mouse” Sigma[®] (1:3000); Suero sanguíneo anti-AtSDL generado en ratón (sección 4.3.4), usado 1:100] con agitación suave (16 hrs, 4 °C). Luego de la incubación, se lavó la membrana 3 veces con TBS-T durante 10 min. Después del último lavado la membrana fue incubada en TBS-T, BSA 1 % (p/v) y el anticuerpo secundario [“Anti-Mouse IgG (whole molecule) alkaline phosphatase conjugate” Sigma[®] (1:20000)] con agitación suave (1 h, TA). La membrana se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 min y 2 veces con tampón Alcalino (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM) durante 5 min. Para el revelado se incubó la membrana con 20 mL de tampón Alcalino, 66 µL de NBT 50 % (p/v) en DMSO y 33 µL de BCIP 50 % (p/v) en DMSO a TA, hasta que las bandas se hicieran visibles (~10 min). Finalmente la reacción se detuvo con 20 mL de EDTA 20 mM.

4.3.9.- Análisis de localización sub-celular de AtSDL-GFP por microscopia de fluorescencia

Los análisis de localización sub-celular de la quimera AtSDL-GFP expresada en forma transitoria en hojas de *Nicotiana tabacum* (sección 4.1.7), se realizaron mediante microscopia de fluorescencia. Cuatro días después de la agro-infiltración, las hojas de *N. tabacum* infiltradas fueron cosechadas y observadas bajo un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX70). La longitud de onda de la luz incidente estaba entre los 488 y 498 nm y el filtro utilizado entre 507 y 516 nm.

4.3.10.- Análisis de localización de AtSDL por fraccionamiento sub-celular y extracción de proteínas totales de diferentes tejidos de *A. thaliana*.

Para la localización sub-celular de AtSDL, en primera instancia, se cosechó 1 g de hojas rosetas de *A. thaliana*. Estas fueron congeladas en nitrógeno líquido y molidas en un mortero. Se agregó 10 mL de un tampón para protoplastos (sorbitol 400 mM, MES/KOH 20 mM pH 5,7; CaCl₂ 0,5 mM) fría y estéril mezclando vigorosamente (Somerville, 1981). La suspensión fue filtrada en un colador (diámetro de poro de 100 µm) y centrifugada (10³ x g, 20 min, 4 °C). El sobrenadante 1 fue rescatado, mientras que el precipitado 1 (células enteras y núcleos) fue resuspendido en una solución SEP [Tris-HCl 100 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaCl 100 mM, Triton X-100 1,5 % (v/v), SDS 0.1 % (p/v), DTT 1 mM y PMSF 0.1 mM] y guardado a 4 °C. El sobrenadante 1 fue centrifugado (10⁴ x g, 30 min, 4 °C), y el resultante sobrenadante 2 fue rescatado, mientras que el precipitado 2 (mitocondrias, cloroplastos, lisosomas y

peroxisomas) fue resuspendido en la solución SEP y guardado a 4 °C. El sobrenadante 2 fue centrifugado ($10^5 \times g$, 1,5 hrs, 4 °C) y el resultante sobrenadante 3 fue rescatado, mientras que el precipitado 3 (membrana plasmática y fracción microsomal) fue resuspendido en la solución SEP. El sobrenadante 3 es la fracción enriquecida con citoplasma celular. Debido a la dilución de las proteínas presentes en éste, se le agregó TCA a una concentración final de 20 % (p/v). La mezcla se dejó incubando en hielo por 30 min y posteriormente fue centrifugada ($10^4 \times g$, 15 min, 4 °C). Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de acetona. Se repitió el paso de centrifugación y se dejó secando el precipitado a TA o en un concentrador por vacío (High Speed Vacuum). Una vez secas las proteínas, se resuspendieron en 500 μ L de NaOH 0.1 M y se calentaron a 40 °C hasta completar su solubilización.

Para la localización de AtSDL en distintos tejidos de *A. thaliana* (hojas rosetas, hojas caulinares, tallo, raíz, flor, silicuas y semillas secas), se cosecharon ~100 mg de cada tejido y se congelaron en nitrógeno líquido. Cada muestra de tejido fue homogenizada en presencia de 1 mL de SEP y filtrada en un colador (diámetro de poro de 100 μ m). La suspensión fue centrifugada ($10^4 \times g$, 20 min, 4 °C) y se rescató el sobrenadante. Las proteínas presentes fueron precipitadas mediante TCA explicado anteriormente.

Cada muestra fue analizada mediante SDS-PAGE y Western-Blot (sección 4.3.6) usando el suero sanguíneo contra AtSDL producido en ratón (sección 4.3.4).

4.4.-Bioinformática

4.4.1.- Análisis preliminar de los dominios conservados en AtSDL

La secuencia aminoacídica de AtSDL (GenBank AAM91782.1) fue analizada mediante alineamientos con el objetivo de encontrar motivos conservados que permitieran dilucidar su función. La secuencia fue analizada en los servidores InterProScan (www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan) y Pfam (pfam.sanger.ac.uk/). La localización subcelular de AtSDL fue predicha usando los programas en línea disponibles en el servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/subcellular/>)

4.4.2.- Alineamiento múltiple y dendrograma

Usando la secuencia aminoacídica de AtSDL se buscó 70 proteínas con alta identidad (>40 %) mediante la herramienta PSI-BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov). PSI-BLAST genera una matriz de puntaje posición específica en el primer alineamiento múltiple, esta matriz se usa para continuar la búsqueda en cada iteración. De esta manera se privilegia secuencias que se alineen con un mínimo de “gaps” a la secuencia objetivo, entregando más información de ésta en forma comparativa.

Las secuencias seleccionadas fueron alineadas mediante ClustalX 2.0 con un “Gap Opening” de 10 y un “Gap Extension” de 0,3 usando la matriz BLOSUM, iterando en cada paso de alineamiento y en el alineamiento final. El archivo de alineamiento final fue guardado en formato GCG/MSF y editado con el programa GeneDoc 2.7. El dendrograma se realizó mediante Bootstrap Neighbor-Joining Tree con 100 inicios

estocásticos y 1000 repeticiones. El dendrograma finalmente fue dibujado mediante el servidor iTOL (<http://itol.embl.de/>).

4.4.3.- Modelo de la estructura molecular de AtSDL y experimentos de dinámica molecular

El modelamiento por homología es una técnica que permite generar y evaluar un modelo de la estructura molecular de una proteína en estudio, mediante alineamiento de secuencias de proteínas cristalografiadas (PDB, www.rcsb.org).

Para el modelo de AtSDL se usaron de molde 3 estructuras resueltas por cristalografía por rayos x. El uso de 3 moldes permitió determinar la estructura de sectores de AtSDL que no alineaban con cada secuencia por separado. Los códigos PDB y sus identidades con AtSDL son: 1E3J (*Bemisia argentifolii* SDH, 51 %, Banfield y col., 2001), 1PL6 (*Homo sapiens* SDH, 46 %, Pauly y col., 2003), 2DFV (*Pyrococcus horikoshii* TDH, 32%, Ishikawa y col., 2007). Mediante el programa Modeller 9v3 se generaron 50 modelos los cuales fueron evaluados mediante los programas Verify3D (nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/), Anolea (swissmodel.expasy.org/anolea) y ProSA 2003 (<http://www.came.sbg.ac.at>). Al modelo generado mejor evaluado se le calculó su estado de protonación a pH 9,0 (pH de reacción óptimo para SDHs, Lo Bianco y col, 1998) mediante el servidor H++ (biophysics.cs.vt.edu/H++/). Una vez determinado su estado de protonación, se le asignó una carga formal mediante campos de fuerza CHARMM (Brooks y col, 1983) y fue sometido a un experimento de dinámica molecular para minimizar su energía mediante NAMD 2.6 (www.ks.uiuc.edu/Research/

namd). El sistema fue solvatado en una esfera de agua, cuyo límite se dispuso a 10 Å por sobre la superficie de la proteína. Este sistema fue minimizado por 5000 iteraciones, utilizando el algoritmo de gradiente conjugado. Luego, el sistema fue equilibrado por 50 ps a 300 K y la simulación fue extendida por 0.5 ns.

4.4.4.- Análisis de ligandos en la estructura tridimensional de AtSDL usando Autodock.

Usando el modelo energéticamente minimizado de AtSDL, se realizaron experimentos *in silico* de especificidad de sustrato y cofactor mediante AutoDock 4 con AutoDockTools-1.5.2. Para determinar la especificidad de cofactor, a NAD⁺ y a NADP⁺ se le asignaron una carga formal mediante asignación de cargas parciales Gasteiger (Gasteiger y Marsili, 1980). Al modelo de AtSDL se le agregó un ión de Zn²⁺ en forma manual coordinado por los aminoácidos descritos en el trabajo de Klimacek y col (2007) con una carga formal de +0.95. Una vez listo el modelo, se le asignaron cargas parciales a los residuos mediante CHARMM (Brooks y col, 1983). Se dejaron 5 torsiones libres (carbono-carbono) a los cofactores analizados y ninguna a los residuos aminoacídicos del modelo de AtSDL. Finalmente se configuraron $2,5 \times 10^7$ evaluaciones energéticas. Los resultados fueron entregados en un histograma de energía.

Para el análisis de especificidad de sustrato *in silico*, se realizó un “Virtual screening” con distintos polialcoholes. Los experimentos de “Docking” se realizaron asignando cargas parciales a los sustratos mediante Gasteiger y al modelo de AtSDL por CHARMM. Fueron dejadas libres las torsiones carbono-carbono de los polialcoholes y

rígidas las de los grupos OH. Por otro lado, en el modelo de AtSDL se permitió libertad de torsión a los aminoácidos que participan en la unión de sustrato (Klimacek y col, 2007). Finalmente se configuraron $2,5 \times 10^7$ evaluaciones energéticas. Los resultados fueron entregados en un histograma de energía. Las conformaciones resultantes fueron discriminadas usando como criterio los datos entregados en el trabajo de Klimacek y col (2007). Una vez determinadas las conformaciones de los sustratos y cofactor, y sus respectivas energías de unión con el modelo de AtSDL, se prosiguió a realizar experimentos de dinámica molecular, usando las especificaciones descritas anteriormente, para constatar la estabilidad de unión del ligando al modelo.

5.-Resultados

5.1.- Bioinformática

5.1.1.- Estudio de la secuencia aminoacídica de AtSDL

La secuencia de AtSDL fue analizada mediante el servidor InterProScan (www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan) con el objetivo de obtener información de sus dominios y dilucidar así preliminarmente su función (Figura 3).

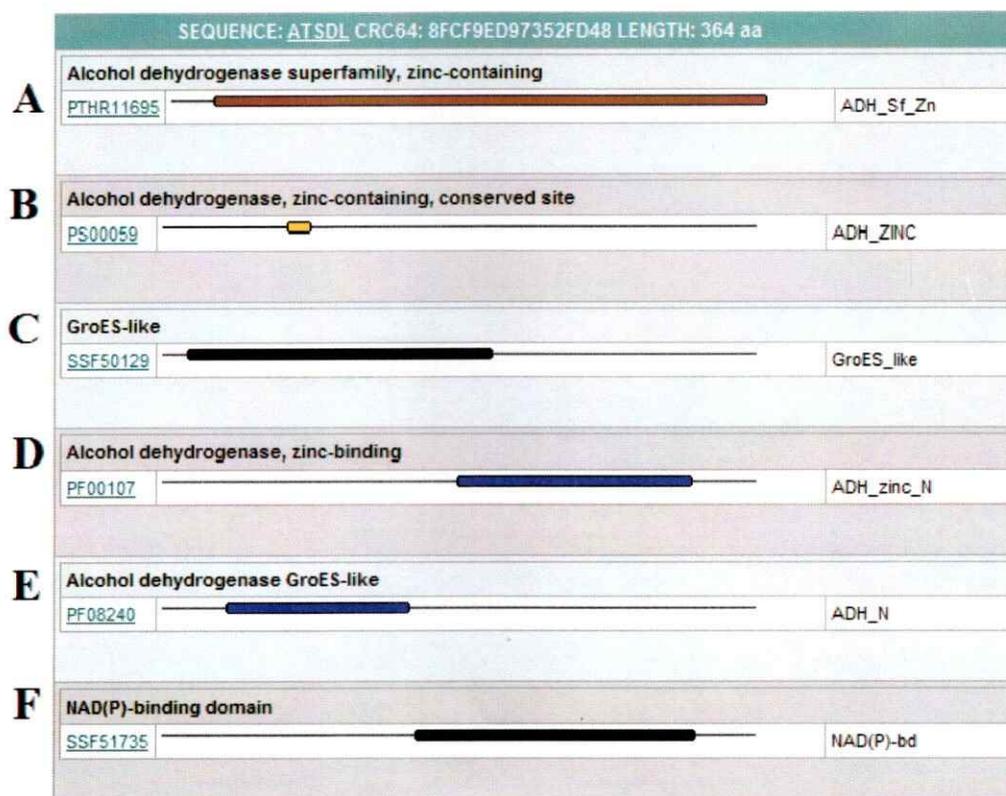


Figura 3: Dominios conservados en AtSDL. (A) Súper-familia alcohol deshidrogenasa dependiente de Zinc. La secuencia de AtSDL está estrechamente relacionada con enzimas ADHs (EC. 1.1.1.1). (B) Sitio predicho por alineamientos de unión al ión Zn^{2+} . (C) Dominio de plegamiento tipo GroES (Chaperona 10, *E. coli*). (D) Dominio catalítico alcohol deshidrogenasa predicho con unión al ión Zn^{2+} . (E) Dominio de plegamiento tipo GroES y GroEL de enzimas alcohol deshidrogenasas. (F) Dominio de unión a dinucleótidos NAD^+ o $NADP^+$.

La secuencia de AtSDL posee >85% de identidad con alcoholes deshidrogenasas (ADH) conocidas. Como se muestra en la figura 3-A existe una clasificación muy bien caracterizada agrupada en una súper-familia. Las ADHs se caracterizan por utilizar el ión zinc en el sitio catalítico y además en otros sitios para estabilizar la estructura nativa de la proteína (Rudolph y col. 1978).

AtSDL presenta dos dominios muy conservados. Del aminoácido 41 al 154 se encuentra el dominio ADH de plegamiento tipo GroES. La caracterización estructural de este dominio se presenta en el trabajo de Murzin (1996). Del aminoácido 181 al 324 se encuentra el dominio de unión a zinc con la actividad catalítica deshidrogenasa. Típicamente este dominio se encuentra en el C-terminal de la proteína y presenta un tipo de plegamiento clásico Rossmann comunes en enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción y que permite la unión reversible de di-nucleótidos como NAD⁺ o NADP⁺ (Bashton y Chothia, 2002).

Entre los aminoácidos 78 y 92 se encuentra conservado un sitio de unión al ión zinc. Este sitio se encuentra fuera del dominio catalítico de unión a zinc mencionado anteriormente. Posiblemente el zinc unido a este sitio participe en el plegamiento y la estabilidad de la estructura tridimensional de la enzima (Rudolph y col., 1978).

Para obtener un indicio de la localización sub-celular de AtSDL, se utilizaron diversos programas en línea para analizar *in silico* la secuencia de AtSDL (Tabla V).

Tabla V: Análisis *in silico* de la localización sub-celular de AtSDL.

Herramienta en línea	Descripción del método	Resultados	Detalles
WoLF-PSORT	Localización sub-celular en eucariontes	Citosol y Cloroplastos	CP: 4.0, CS: 4.0, MP: 2.0, VA: 2.0, VS: 1.0.
PrediSi	Predicción de péptidos-señales en eucariontes	Sin péptido señal	Posible sitio de corte en el aminoácido 203. Bajo puntaje.
The Protein Prowler	Localización sub-celular en eucariontes analizando la secuencia N-terminal	Citosol	VS: 0.01, MT: 0.06, CP: 0.00, PX: 0.00. OT: 0.93
SVMtm	Predicción de dominios trans-membranas.	Sin DTM	-
ESLpred	Predicción mediante alineamientos y propiedades fisicoquímicas	Citosol	94% de precisión esperada
SubLoc	Localización sub-celular en eucariontes	Citosol	91% de precisión esperada
LOctree	Localización sub-celular en plantas, usando maquinas de vectores de soporte (SVM)	Citosol	No vía secretora, no localización nuclear
TMHMM	Predicción de dominios trans-membrana (DTM)	Sin DTM	-
TargetP	Localización sub-celular en plantas	Citosol	VS: 0.06, MT: 0.14, CP: 0.09, OT: 0.86
SignalP	Predicción de péptidos-señales en eucariontes.	Sin péptido señal	-

*Se analizó la secuencia de AtSDL usando las herramientas en línea del servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/subcellular>). CP: Cloroplasto, CS: Citosol, MP: Membrana plasmática, VA: Vacuola, VS: vía secretora, PX: Peroxisoma, MT: Mitocondria, OT: Otro. Los valores que entregan **WoLF-PSORT** hacen referencia directamente al número de secuencias en la base de datos que se asemejan a la secuencia objetivo y que se ubican en el compartimento sub-celular mencionado, los valores de **The Protein Prowler** se refieren a la probabilidad de encontrar esa proteína en el compartimento sub-celular indicado y los valores de **TargetP** hacen referencia a un puntaje arbitrario que entrega el método con una valor máximo de 1 y mínimo de 0.

En casi todas las predicciones los resultados de mayor probabilidad y/o puntaje dilucidaban una localización soluble y citosólica de la proteína, consistente con los trabajos experimentales de la localización sub-celular de diferentes SDHs de plantas (Lo Bianco y col., 1998; Ohta y col., 2005; Oura y col., 2000; Park y col., 2002; Wang y col., 2009; Yamada y col., 2001). Además, se determinó que la secuencia de AtSDL no posee

péptidos de señalización para las vías secretorias o sistema de endo-membranas descritas en plantas.

Muchas secuencias de SDH han sido descritas bioquímicamente en el último tiempo. El análisis de bases de datos revela que las poli-alcoholes deshidrogenasas se encuentran ampliamente distribuidas en muchas especies de planta y en otros organismos. Se alineó la secuencia de AtSDL con 12 secuencias de SDH conocidas identificando algunos de los aminoácidos que están en el sitio activo y que unen zinc (figura 4).

AtSDL se encuentra relacionado con secuencias de SDH de plantas más que con las enzimas de especificidad distinta a sorbitol (xilitol deshidrogenasa de *S. cerevisiae* o cetosa (fructosa) reductasa (KetRED) de *Besimia agentifolii*). Los aminoácidos que participan en la oxidación del poli-alcohol y en la unión al ion zinc descritas en el trabajo de Klimacek y col (2007), se encuentran conservados no solamente en secuencias cercanas en plantas sino también en secuencias más distantes como por ejemplo SDH de *D. melanogaster*. Esto revela la importancia de estos aminoácidos en la catálisis en las secuencias analizadas. Sin embargo, la razón de la diferencia en la especificidad y en la actividad de cada una de las enzimas solo se podrá determinar con un estudio más detallado y meticuloso de las secuencias mostradas en la figura 4. Una posible aproximación para determinar la especificidad de sustrato se puede observar en la posición 73 (numeración alineamiento), en donde se observa que todas las enzimas que poseen actividad SDH tienen una tirosina muy conservada. No obstante, L-idoDH de vid presenta una histidina en esa posición, este aminoácido posiblemente estabilice el grupo carboxilo del L-Idonato.

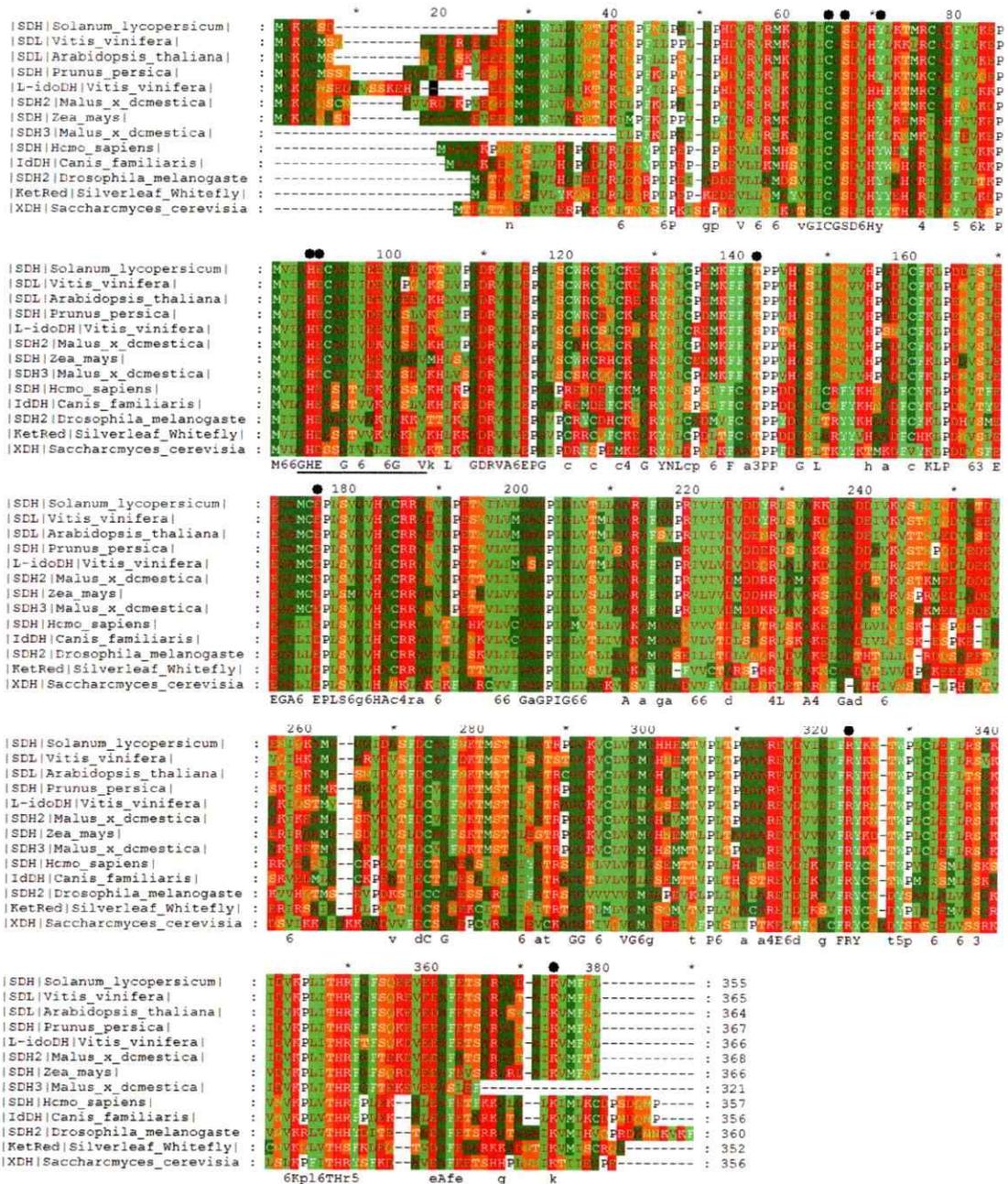


Figura 4: Alineamiento múltiple de AtSDL. Se utilizaron secuencias de SDH caracterizadas y no caracterizadas (SDLs). Los aminoácidos fueron coloreados según sus propiedades fisicoquímicas. Bajo el alineamiento se encuentra la secuencia consenso y demarcada con una línea el sitio de unión al ion zinc. Marcados con círculos negros están los aminoácidos presentes en el sitio activo. *S. lycopersicum* (GI:78183416), *A. thaliana* (GI:15242240), *V. vinifera* (GI:225469310), *P. persica* (GI:7416846), L-idoDH *V. vinifera* (GI:74273318), SDH3 *Malus x domestica* (GI:37935727), SDH2 *Malus x domestica* (GI: 37932831), *Zea mays* (GI: 77378040), *Homo sapiens* (GI:156627571), *Canis familiaris* (GI:74000494), *D. melanogaster* (GI:17737897), *B. argentifolii* (GI: 13096215), *S. cerevisiae* (GI:6323099).

5.1.2.- Dendrograma

Usando la herramienta PSI-BLAST se seleccionaron 70 secuencias de diferentes organismos que posean identidades mayores a 40 % a AtSDL. Estas fueron elegidas tanto por la actividad descrita como por el organismo que expresa la proteína. El árbol fue realizado mediante una matriz de distancia Bootstrap Neighbor-Joining Tree (figura 5). En el dendrograma se muestran claramente 4 grupos que divergen tempranamente. El más pequeño está compuesto por bacterias, otro conformado por hongos, uno en que se agrupan las SDHs de las plantas analizadas y un último grupo donde se encuentran SDHs de animales. Por otro lado, se observa que las secuencias también se agrupan según su especificidad. Las poli-alcoholes deshidrogenasas con alta especificidad para L-arabinitol (AraDH) están cercanamente relacionadas formando un sub-grupo dentro de las secuencias provenientes del reino Fungi. De la misma manera las secuencias que tienen mayor especificidad para meso-xilitol (XDH) forman un sub-grupo dentro de las secuencias agrupadas en este mismo reino.

AtSDL se encuentra más relacionada con SDH de especies de familias no-*Rosaceae* como *S. lycopersicum* (tomate), *Ricinus communis* (ricino) y *Vitis vinifera* (vid). Las poli-alcoholes deshidrogenasas descritas en plantas tienen a sorbitol como principal sustrato sugiriendo que AtSDL posiblemente tenga una mayor especificidad por este sustrato también. Como se observa, se han caracterizado más SDHs provenientes de especies de la familia *Rosaceae* que en especies de otras familias, debido a su mayor prevalencia y al papel fisiológico que cumple esta enzima en esta familia y a la información que se dispone respecto a esta.

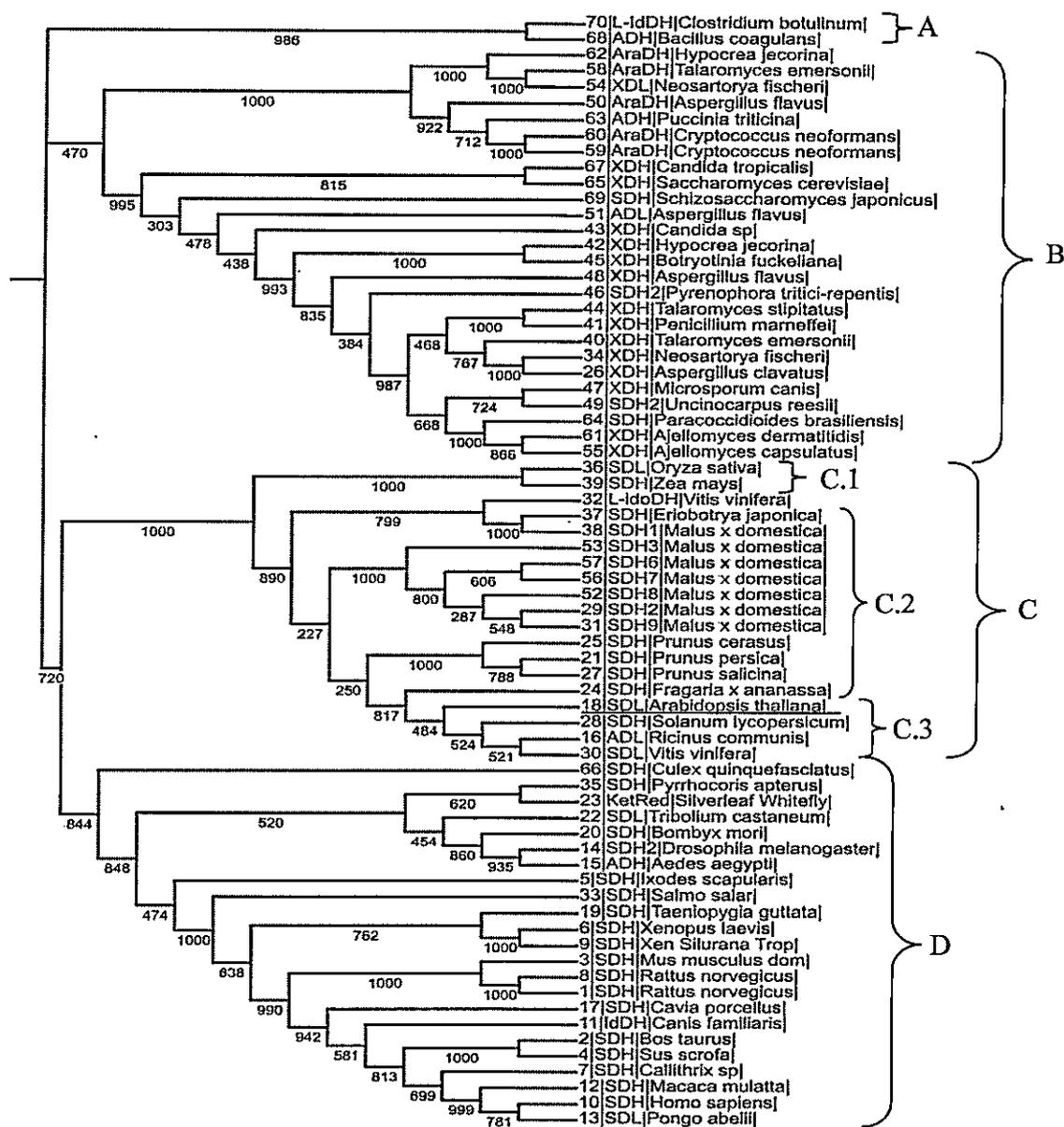


Figura 5: Dendrograma. Fue generado por el método de matriz de distancia “Bootstrap Neighbor-Joining Tree” de secuencias relacionadas con AtSDL encontradas mediante PSI-BLAST. Se pueden apreciar 4 grandes grupos (A) Bacteria, (B) Fungi, (C) Planta, (D) Animal. En plantas se han destacado 3 sub-grupos; (C.1) Gramíneas (monocots), (C.2) Rosáceas, (C.3) No Rosáceas (dicots). AtSDL esta demarcado en rojo. En cada nodo podemos observar el valor de “bootstrap” obtenido con 1000 repeticiones y 100 inicios estocásticos. El árbol fue dibujado por la herramienta en línea iTOL (<http://itol.embl.de/>). El número de acceso para las proteínas acá mostradas se encuentra en el Anexo.

5.1.3.- Generación y evaluación del modelo de AtSDL.

Se realizó un modelo de AtSDL por homología como primera aproximación para los estudios de especificidad de sustrato. Se usaron tres estructuras cristalográficas como moldes con códigos PDB: 1E3J, 1PL6 y 2DFV (sección 4.4.3). Los 50 modelos que se generaron fueron evaluados energéticamente seleccionando el de menor energía. En la figura 6-A se graficó la energía total del modelo de AtSDL mediante el programa ProSa 2003 y se comparó con las estructuras usadas de molde, usando tres parámetros: la energía asociada a la interacción C^{β} - C^{β} (z-pair), la energía asociada a la interacción C^{β} -superficie (z-surf) y la energía combinada de ambos sistemas (z-comb).

La energía global para el modelo de AtSDL que se muestra en la figura 6-A es ligeramente mayor en comparación a las estructuras 2DFV, 1E3J y 1PL6 debido a que la estructura de AtSDL fue energéticamente minimizada en presencia de solvente (agua). El algoritmo de ProSA no considera la estabilización del solvente y por ende las energías por residuo del modelo minimizado son ligeramente más altas a las estructuras cristalográficas. Este efecto se observa más claramente al comparar la energía a C^{β} -superficie (z-surf) de AtSDL con la energía asociada a la interacción C^{β} - C^{β} (z-pair), en donde se observa que el modelo de AtSDL tiene una diferencia ligeramente mayor en el primer caso. Por otro lado, el modelo está muy bien evaluado por el método utilizado por ProSA 2003, ubicando a la estructura de AtSDL dentro del rango de energía de estructuras resueltas por difracción de rayos X y RMN (figura 6-B).

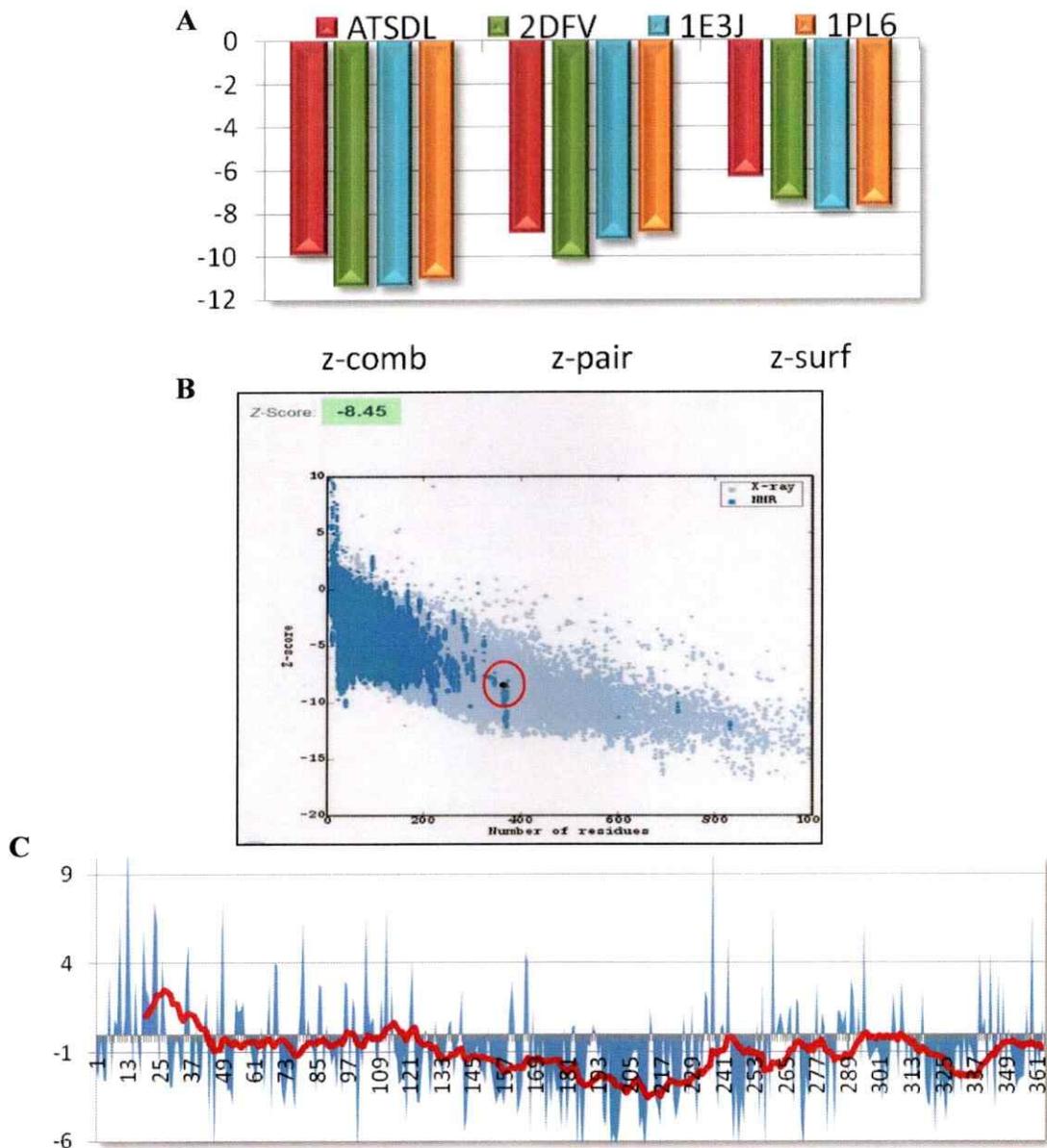


Figura 6: Z-score para el modelo de AtSDL. (A) Z-score total en cada parámetro (C^{β} - C^{β} , z-pair; C^{β} -superficie, z-surf; y la energía combinada, z-comb) para el modelo de AtSDL, y los moldes 2DFV, 1E3J y 1PL6 (Sección 4.4.3). (B) Gráfico de z-score versus número de residuos para estructuras resueltas por RMN y difracción por Rayos X. El modelo generado de AtSDL se encuentra demarcado por el círculo rojo. (C) Z-score (energía asociada combinada) para cada residuo en el gráfico de área azul, se muestra la media móvil para cada 20 residuos en rojo. Los valores de z-score no tienen unidades y se usan en forma comparativa.

La energía calculada por residuo presenta regiones de alta energía ubicadas en el extremo N-terminal de la proteína debido a que estas regiones no se alinean

completamente con las secuencias usadas de molde y además por encontrarse más expuestas al solvente. Otro punto a considerar es que las estructuras usadas de molde forman homo-tetrámeros y posiblemente AtSDL también lo haga, aunque no se ha demostrado aún, por lo tanto al modelar únicamente el monómero, este expone parches que posiblemente sean estabilizados en la estructura cuaternaria.

Otros programas fueron usados para robustecer el análisis energético del modelo de AtSDL. Mediante el análisis por Anolea los resultados entregaron una energía global (la suma de las energía asociada a cada aminoácido) de -3155,243 kcal/mol a 293 °K con un promedio por residuo de -8,668 kcal/mol usando un umbral de 0 kcal/mol por defecto. Energías superiores a 0 kcal/mol se encontraron en los primeros 30 residuos del modelo de AtSDL. El método de Anolea usa bases de datos para conocer la energía asociada a cada residuo mediante sus interacciones dentro de una esfera de 0.7 nm en la estructura tridimensional.

Otro programa usado para verificar la validez del modelo fue Verify-3D. Esta es una herramienta que analiza la correlación energética de la estructura tridimensional y su secuencia. Usando una base de datos, se clasifica cada residuo según su entorno y la estructura secundaria a la que pertenece asociándole una energía respectiva. La secuencia es alineada y evaluada energéticamente por residuo según esta clasificación y posteriormente se compará con la energía por residuo de la estructura analizada. Los puntajes van de -10,0 a +10,0 en donde los puntajes cercanos a "0" tienen una mayor compatibilidad modelo-secuencia. El análisis del modelo de AtSDL y sus estructuras moldes se muestran en la tabla VI.

Tabla VI: Puntajes entregados por Verify-3D:

Estructura	Puntaje menor	Puntaje mayor
AtSDL	-0.28	0.77
1E3J	-0,03	0,81
1PL6	0,09	0,82
2DFV	0,14	0,8

*Se evaluó tanto el modelo de AtSDL como las estructuras moldes usadas. Los puntajes entregados representan el mínimo y máximo para todos los residuos de cada secuencia.

Los puntajes entregados por Verify-3D para el modelo de AtSDL son muy similares a los moldes usados (2DFV, 1E3J y 1PL6). La mayor diferencia se encuentra en el puntaje menor, en donde el modelo de AtSDL es más bajo en comparación a las otras estructuras. Este puntaje aparece en los primeros 30 residuos de la secuencia (aminoácidos 15 a 30), confirmando lo predicho por los otros validadores anteriormente mencionados. Sin embargo, este sector del modelo está en un rango aceptable comparándolo con las estructuras molde. En forma global el modelo está muy bien evaluado energéticamente, lo que sirvió para proseguir con los estudios de especificidad de sustrato *in-silico* y dinámica molecular.

5.1.4.-Análisis *in silico* de especificidad de sustrato

Una vez analizado energéticamente el modelo tridimensional de AtSDL se realizaron experimentos de dinámica molecular con el fin de seguir la estabilidad del modelo en un sistema acuoso. Al comparar el modelo antes y después de 0.1 ns de simulación se observó que la estructura se mantuvo estable variando, respecto a los carbonos alfa, en una media cuadrática de 2.7 Å (RMS).

En el análisis de especificidad de sustrato mediante “*docking*” se examinó inicialmente la preferencia de AtSDL por NAD⁺ y por NADP⁺, dado que ortólogos de humano e insecto utilizan estos cofactores, respectivamente. Los resultados revelaron que la energía de unión de NAD⁺ al modelo fue de -6.49 kcal/mol con una constante de unión asociada de 17.38 μM (k_i), valor dentro del orden de magnitud entregado por el trabajo de Klimacek y col. (2007) para SDH de humano. La energía de unión de NADP⁺ al modelo fue de -2.92 kcal/mol con una constante de unión asociada de 7.19 mM (k_i). Es importante mencionar que la conformación final del ligando en la estructura de AtSDL fue muy importante para discriminar los resultados que el método entrega. En la figura 7 se observa la conformación más frecuente de NAD⁺ y D-sorbitol dentro del modelo de AtSDL.

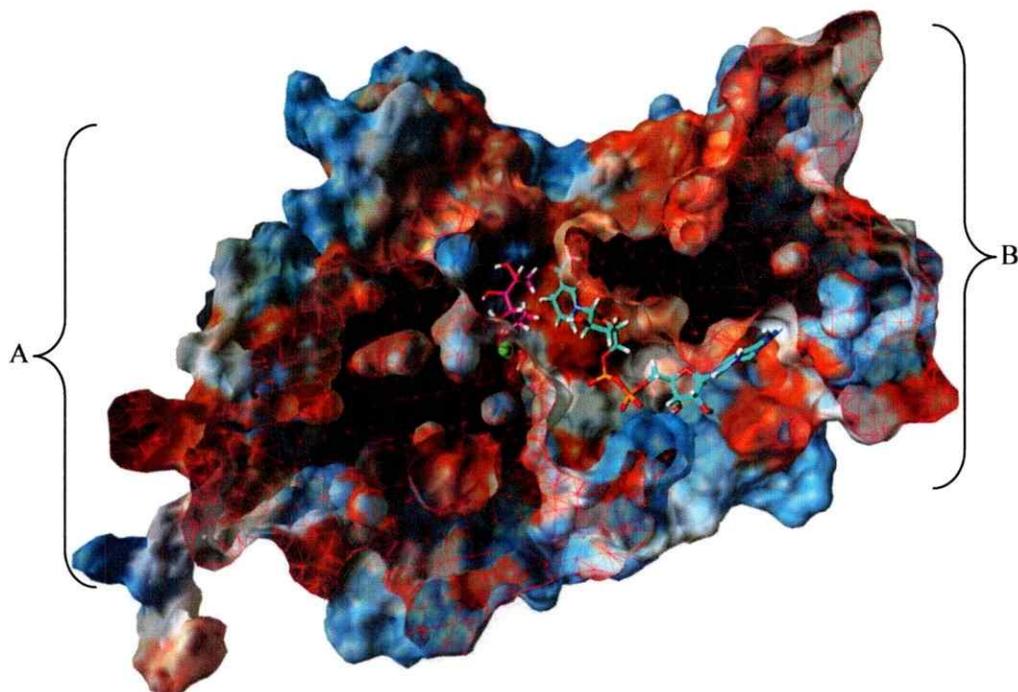


Figura 7: Modelo de AtSDL. Corte longitudinal del modelo de AtSDL mostrando su superficie hidrofóbica. En rojo se observan la superficie de los residuos hidrofóbicos, en azul la superficie de los residuos hidrofílicos y en blanco residuos con características intermedias. **(A)** Se señala el dominio catalítico de unión a zinc y **(B)** el dominio de unión a NAD(P)⁺. El modelo muestra el resultado de los experimentos de “*docking*” en donde se observa la conformación de NAD⁺ (celeste) y D-sorbitol (violeta) después de agregar el ion zinc al modelo (esfera verde).

En el análisis realizado a los poli-alcoholes más comunes encontrados en plantas como ligandos mediante “*docking*” en el modelo de AtSDL, se seleccionaron las conformaciones de menor energía que convergían espacialmente cerca del ion zinc. Las posiciones elegidas de cada polialcohol compartían la ubicación del OH del carbono 1 de éste cerca del residuo Glu-164 y el OH del carbono 2 cerca del ion zinc (Klimacek y col., 2007). Los valores de energía y constante de unión para cada polialcohol analizado y presente en *A. thaliana* (Kaplan y col., 2004) se detallan en la tabla VI.

Tabla VI. Energías y constantes de unión asociadas a diferentes polialcoholes como ligandos del modelo de AtSDL.

Substrato	Energía de unión (kcal* mol^{-1})	Ki (mM)
L-Iditol	-3.29	3.9
*D-Sorbitol	-3.69	2.0
*meso-Xylitol	-3.66	2.1
*meso-Erythritol	-4.16	1.1
L-Arabitol	-4.13	0.9
D-Mannitol	-3.44	3.0

* Con un asterisco se destacan los poli-alcoholes encontrados en *A. thaliana* (Kaplan y col., 2004).

Para un análisis más detallado del sitio de unión, se usó D-sorbitol y NAD⁺ como ligandos, de manera de comparar los resultados con el publicado por Klimacek y col. (2007). El sistema fue analizado en forma independiente para cada ligando, después de observar la estabilidad de la unión de cada uno al modelo mediante dinámica molecular (NAMD). La unión de NAD⁺ al modelo es estable (2.7 Å RMS, al igual que AtSDL) moviéndose durante la dinámica junto a AtSDL. Esto es debido principalmente por el gran tamaño de la NAD⁺ (663.43 Da) y a la existencia de 15 torsiones, de las cuales 10 pertenecen al eje longitudinal del cofactor. En contraste, D-sorbitol a pesar de ser un alcohol de azúcar lineal muy pequeño (182.17 Da) posee 11 torsiones de las cuales 7 corresponden al eje longitudinal de la molécula. Esto tiene como consecuencia que las conformaciones posibles divergían más en el caso de D-sorbitol que en el caso de NAD⁺.

Se identificaron 16 aminoácidos involucrados en la unión de NAD⁺ en el modelo de AtSDL (figura 8-A) de los cuales 13 están conservados respecto a la secuencia de SDH humano usada como molde en el modelamiento por homología. Para el caso de D-sorbitol se identificaron 5 aminoácidos que participan en su unión al modelo de AtSDL (figura 8-B) que se encuentran conservados respecto al SDH humano. Sin embargo, se observó que el residuo Try-60 no se encuentra conservado en la secuencia de L-idonato deshidrogenasa de *V. vinífera* (figura 4). Se conoce por el trabajo de DeBolt y col (2006) que esta enzima tiene baja especificidad por sorbitol, por ende este residuo podría estar involucrado en la especificad de sustrato de esta enzima.

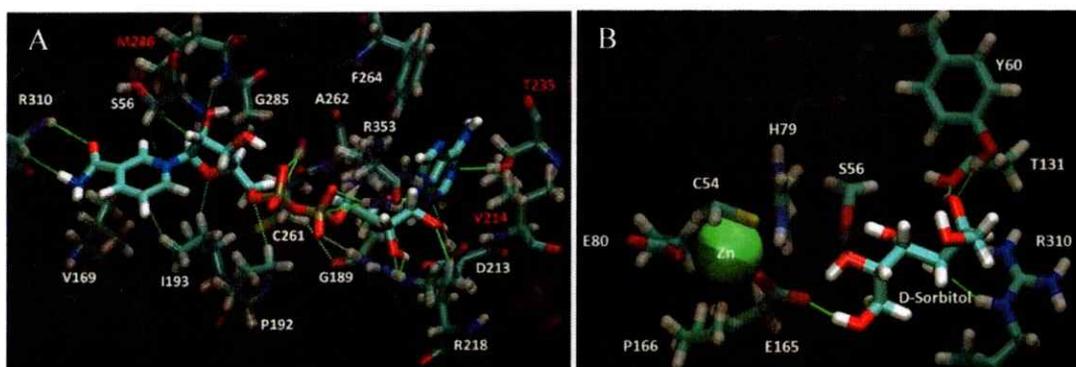


Figura 8: Análisis del sitio de unión a NAD⁺ y D-Sorbitol. (A) Sitio de unión a NAD⁺ en el modelo de AtSDL. Los puentes de hidrógenos formados por los residuos mostrados (oscurecidos) y NAD⁺ (claro) se denotan con líneas verdes. (B) Sitio de unión de D-Sorbitol en el modelo de AtSDL. D-Sorbitol se muestra más claramente que los residuos involucrados en su unión. El ion de zinc (esfera verde) está coordinado por los residuos His-79, Cys-54, Glu-80 y D-Sorbitol. En blanco se destacan los residuos conservados entre AtSDL y la secuencia de SDH humano y en rojo residuos no conservados.

La unión de D-sorbitol al modelo de AtSDL fue analizada en detalle observando los cambios provocados por la unión de NAD⁺. El sistema completo fue minimizado energéticamente y se calcularon las distancias entre los átomos involucrados en la unión

de D-sorbitol al sitio catalítico predicho en el modelo de AtSDL. En la figura 9 se observan las distancias entre el hidroxilo del carbono 2 y el ión zinc coordinado por los residuos His-79, Cys-54 y Glu-80. Las distancias y la conformación final de D-sorbitol en el modelo son similares a las documentadas en SDH de humano (Pauly y col., 2003; Klimacek y col., 2007). En la estructura cristalográfica de SDH humano publicada por Pauly y col (2003), el residuo Glu-164 (usando la numeración de AtSDL) coordina al ión zinc por medio de una molécula de agua. En el modelo de AtSDL la distancia entre este residuo y el ión zinc es de 3,61 Å muy superior a la necesaria para formar alguna interacción débil, la que posiblemente sea estabilizada también mediante una molécula de agua.

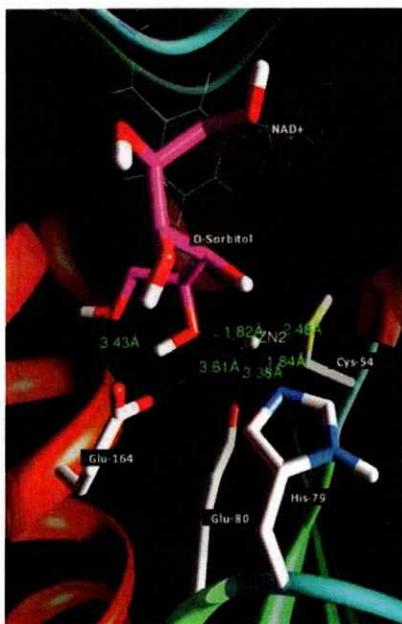


Figura 9: Sitio activo del modelo de AtSDL. El esqueleto de carbono de la molécula de NAD⁺ se muestra con líneas celestes en el fondo. D-Sorbitol en el primer plano (violeta) se observa cercano a los residuos His-79, Cys-54, Glu-80 y Glu-164. Las distancias medidas en Angstroms (Å) se muestran en verde.

El sistema completo queda estructurado de tal forma que el grupo nicotinamida de NAD⁺ queda alineado con el carbono 2 de D-sorbitol y el ión zinc. La distancia entre el grupo hidroxilo del carbono 2 de D-sorbitol y el ión zinc es de 1,84 Å, suficiente para debilitar el enlace O-H y promover la oxidación del carbono 2. Aparentemente el sistema teórico completo se asemeja sustancialmente al mecanismo de acción de SDHs descritas en la literatura.

En resumen, el análisis bioinformático sugiere que AtSDL es soluble con una posible localización citosólica, además de unir preferentemente NAD⁺ y a los polialcoholes mencionados. Esta información obtenida y el modelo generado nos permiten tener una aproximación acerca de las propiedades de AtSDL y sentar las bases para estudiar en más detalle las diferencias en especificidad, proponiendo mecanismos y mutaciones que afectarían la afinidad de AtSDL por distintos poli-alcoholes. Sin embargo, es necesario corroborar la información obtenida con estos modelos teóricos mediante diseños experimentales *in vitro* y posteriormente *in vivo*, y usar la información obtenida mediante la bioinformática como herramienta para entender mejor los fenómenos observados.

5.2.- Construcción de los vectores de expresión de AtSDL en bacterias, levadura y plantas.

5.2.1.-Clonamiento del ADNc de AtSDL en pCR8®

Con el fin de obtener el ADNc de AtSDL para su posterior clonación en pCR8®, se extrajo ARN de diferentes órganos de *A. thaliana* lo cual se usó como molde para las reacciones de RT-PCR (Figura 10). Los tejidos usados se seleccionaron principalmente por la facilidad en la extracción de su RNA total.

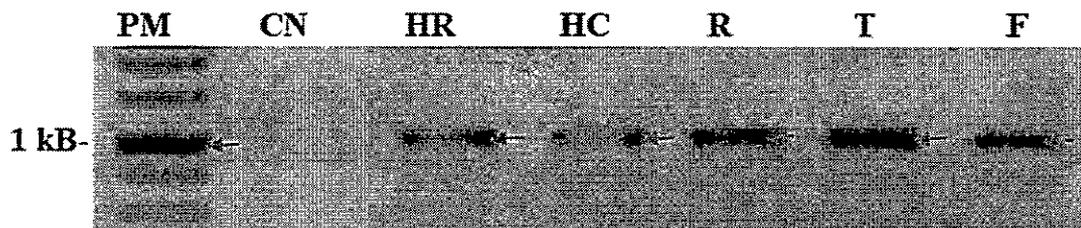


Figura 10: Expresión del RNAm de AtSDL. Reacción de RT-PCR para amplificar el ADNc de AtSDL a partir de ARN extraído de diferentes órganos. Control negativo (CN), hoja roseta (HR), hoja caulinar (HC), raíz (R), tallo (T), flor (F). El tamaño del amplificado esperado es de ~ 1 kb (flechas rojas).

El resultado obtenido revela que el ARNm de AtSDL se expresa (no es un pseudogen) y que además el ARNm está presente en todos los órganos analizados.

En la figura 10 se muestra el resultado de la reacción de PCR usando los partidores S-AtSDL-*Bam*HI-pET28a y A-AtSDL-*Not*I-pET28a. El procedimiento se repitió para todos los partidores específicos para el ADNc de AtSDL detallados en la tabla II, con el fin de obtener el ADNc de AtSDL en marco de lectura para cada uno de los plásmidos usados. El producto PCR fue purificado y clonado en el vector pCR8®. Los clones

obtenidos fueron analizados usando la técnica de PCR de colonias (datos no mostrados) y reacciones de digestión de las mini-preparaciones usando las endonucleasas *BstEII* y *XbaI* para determinar la orientación de inserto en el vector (figura 11).

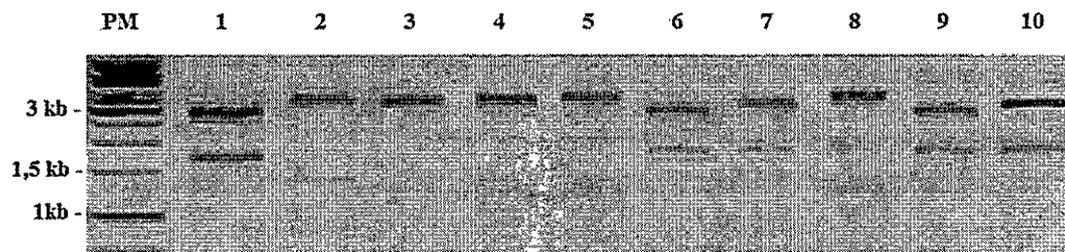


Figura 11: Reacciones de digestión enzimática de pCR8-AtSDL. Las endonucleasas usadas fueron *BstEII* y *XbaI*. La primera corta a 290 pb del codón de inicio ADNc de AtSDL y la segunda a 900 pb desde el extremo *attL2* del vector pCR8[®]. Los clones con el ADNc de AtSDL en sentido liberan una fragmento de ~ 1,7 kb, los clones en anti-sentido liberan una fragmento de ~ 1,2 kb.

De los 10 clones analizados 5 poseían el ADNc de AtSDL clonado en sentido (clones 1, 6, 7, 9, y 10), posición requerida para el clonamiento en el vector de expresión en plantas pGWB5. El clon 2 muestra un fragmento liberado no predicho, posiblemente un falso positivo en el PCR de colonias a causa de una contaminación.

5.2.2.- Construcción de vectores para expresar AtSDL en bacteria (pET-28a, pET-24d y pGEX-5X-1)

Una vez obtenido la construcción pCR8-AtSDL, se digirió este vector con las endonucleasas *Bam*HI y *Not*I liberando el ADNc de AtDL (~1 kb) y de esta manera ligarlo en los distintos vectores de expresión bacteriana, pET-28a y pET-24d. Las construcciones pET-28a-AtSDL (His-AtSDL) y pET-24d-AtSDL (AtSDL) fueron analizadas por PCR de colonias (datos no mostrados) y por digestión con las enzimas *Pst*I, *Bam*HI y *Not*I (figura 12). La endonucleasa *Pst*I corta en dos sitios dentro del ADNc de AtSDL y no en los vectores pET. De esta manera se comprobó que se había clonado el ADNc de AtSDL. Es importante mencionar que los vectores pET circulares migraban más lentamente a la esperada (figura 12, columna CN). Sin embargo, una vez digeridos por cualquier endonucleasa, los tamaños de los fragmentos liberados correspondían a los predichos.

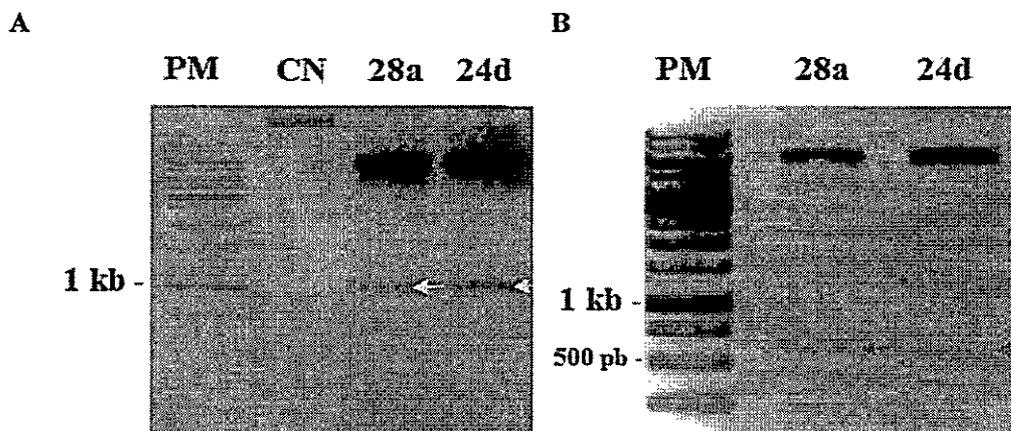


Figura 12: Reacciones de digestión para los vectores pET usados. Las endonucleasas usadas fueron *Pst*I, *Bam*HI y *Not*I. CN: Vector pET-28a-AtSDL sin digerir. (A) Se analizó los vectores pET-28a-AtSDL (28a) y pET-24d-AtSDL (24d) digiriéndolos con *Bam*HI y *Not*I. Estas enzimas liberan el ADNc de AtSDL (~1 kb, flechas amarillas). (B) Se analizaron los vectores con *Pst*I que corta dos sitios únicamente dentro del ADNc de AtSDL liberando un fragmento de ~ 550 pb (flechas rojas).

La construcción pGEX-5X-1-AtSDL (GST-AtSDL) se analizó igualmente por PCR de colonias y digestión con las endonucleasas *Bam*HI y *Not*I. Los resultados de la digestión y del PCR de colonia se detallan en la figura 13.

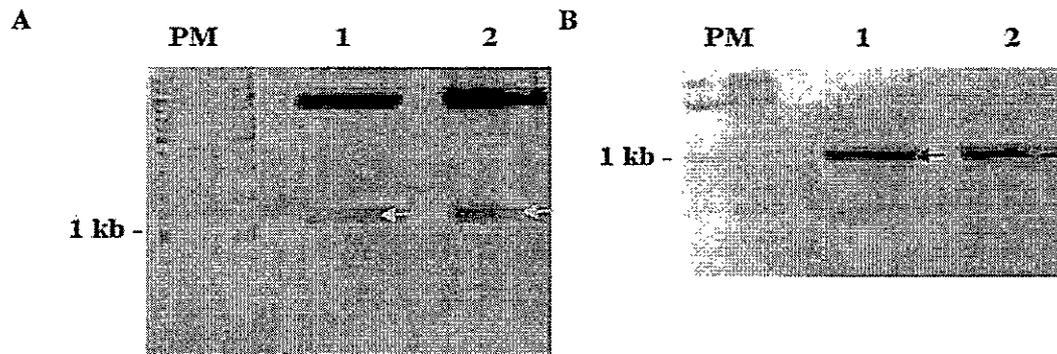


Figura 13: Análisis de pGEX-5X-1-AtSDL. Se muestra el análisis a dos clones positivos. (A) Se digirió el vector con las enzimas *Bam*HI y *Not*I. Estas enzimas cortan los sitios de clonamiento usados liberando el ADNc de AtSDL (~1 kb, flechas amarillas). (B) usando PCR de colonias con partidores específicos para AtSDL, se comprobó el clonamiento del ADNc de AtSDL en pGEX-5X-1 (flechas rojas).

Los clones mostrados en la figura 13 fueron secuenciados usando los partidores sentido y anti-sentido T7. Los resultados constataron la ausencia de mutaciones durante las etapas de clonamiento. Posteriormente la cepa *BL21(DE3)pLys* fue transformada independientemente con las construcciones pET-28a-AtSDL, pET-24d-AtSDL y pGEX-5X-1-AtSDL y posteriormente analizando cada una mediante PCR de colonias (datos no mostrados).

5.2.3.- Construcción del vector de expresión en levaduras p426-GPD-AtSDL-His

Usando el clonamiento vía *E. coli* se insertó el ADNc de AtSDL, liberado en la reacción de digestión con las endonucleasas *Bam*HI y *Not*I de pCR8@-AtSDL, en el vector p426-GPD. Los clones positivos fueron analizados mediante PCR de colonias (datos no mostrados) y por ensayos de digestión usando la combinación de las endonucleasas *Bst*EII y *Not*I. Como se mencionó anteriormente *Bst*EII corta únicamente en el ADNc de AtSDL y *Not*I corta en el sitio de clonamiento usado.

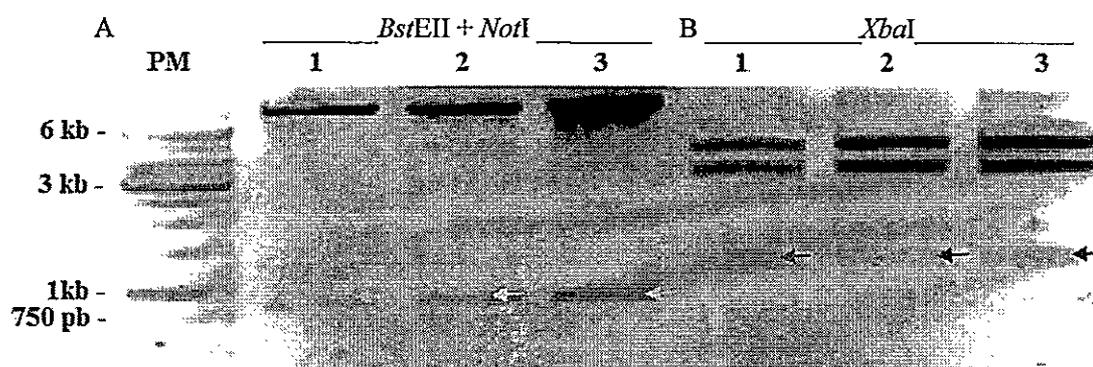


Figura 14: Análisis de p426-GPD-AtSDL. Análisis de tres clones positivos. (A) Se verificó la construcción con las enzimas *Not*I y *Bst*EII. Estas enzimas cortan en el vector y dentro del inserto respectivamente liberando un fragmento de ~ 800 pb (flechas amarillas). (B) La enzima *Xba*I corta en tres sitios en el vector original liberando fragmentos de aproximadamente 4 kb, 3 kb, 1 kb. Este último corresponde al ADNc de AtSDL clonado en este vector, mostrado con una flecha roja.

La combinación de estas dos enzimas corta a p426-GPD-AtSDL en dos sitios, liberando un fragmento de ~800 pb correspondiente a un tramo del ADNc de AtSDL y un fragmento de ~7 kb que corresponde al resto del vector (figura 14). A modo de asegurar que el ADNc de AtSDL estaba clonado en p426-GPD se realizó un segundo ensayo de digestión con la endonucleasa *Xba*I. Esta enzima corta en el vector p426-GPD en sitios que flanquean la inserción, liberando en este caso un fragmento de ~1 kb y además a ~6

kb desde el origen de replicación bacteriano liberando dos fragmentos de ~4 kb y ~3 kb (figura 14).

El vector p426-GPD-AtSDL fue secuenciado con el partidor anti-sentido M13 para verificar que el inserto se encontraba en marco de lectura con el vector. Una vez corroborado el éxito en el clonamiento se prosiguió a transformar *S. cerevisiae* cepa SC-29 (Δ ura⁻), analizando los clones positivos mediante PCR de colonias (datos no mostrados).

5.2.4.- Construcción del vector de expresión en plantas pGWB5-AtSDL-GFP

Usando el vector pCR8-AtSDL sentido como vector de entrada, se clonó el ADNc de AtSDL en el vector de expresión en planta pGWB5 mediante el sistema de clonamiento por recombinación Gateway (sección 4.2.9). Este vector agrega un epítipo GFP C-terminal a la proteína recombinante. Para corroborar el correcto clonamiento del ADNc de AtSDL en este vector, se usó la técnica de PCR utilizando un partidor 5' sentido específico para *AtSDL* y un partidor 3' anti-sentido específico para GFP (figura 15). El amplificado esperado tiene un tamaño de ~1.5 kb, usando las condiciones descritas en la sección 4.2.5.

Una vez corroborado el clonamiento exitoso de AtSDL en pGWB5, se procedió a transformar *A. tumefaciens* con pGWB5-AtSDL. Los transformantes fueron evaluadas por PCR de colonia utilizando los mismos partidores empleados en figura 15 (datos no mostrados)

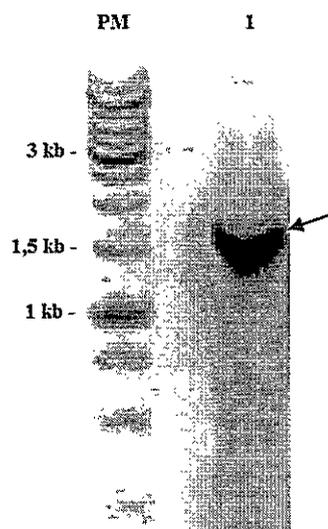


Figura 15: Análisis de pGWB5-AtSDL. Usando los partidores 5' sentido S-AtSDL-*Bam*HI-pET28a y 3' anti-sentido GFP se realizó una reacción de PCR usando la construcción pGWB5-AtSDL como ADN molde. El producto generado es un fragmento de 1,5 kb que corresponde al ADNc de AtSDL más un segmento de GFP.

5.2.5.-Construcción del vector pGEX-5X-1-LeSDH

Como control positivo para los ensayos posteriores de plegamiento y actividad utilizando pGEX-5X-1-AtSDL, se clonó el ADNc de LeSDH, una SDH previamente caracterizada (Ohta et., 2005) en el mismo vector mediante PCR usando el vector pCambia 1302 35S-LeSDH (sección 4.2.5) como molde. Vía pCR8 se clonó el ADNc en el vector pGEX-5X-1 utilizando las endonucleasas *Bam*HI y *Not*I, obteniendo una construcción similar al del trabajo de Ohta et al, (2005). pGEX-5X-1-LeSDH (GST-LeSDH) fue usado para transformar *E. coli* cepa *BL21(DE3)pLys* y los clones fueron analizados mediante PCR de colonias contra LeSDH usando los partidores S-LeSDH-*Bam*HI-pGEX y A-LeSDH-*Not*I-pGEX (Tabla III).

5.3.-Análisis de expresión de las proteínas recombinantes AtSDL y LeSDH

Originalmente, se clonó el ADNc de AtSDL en el vector pET-24d sin el codón de término usando el partidor A-AtSDL-NotI-pET24d (Tabla II), con el fin de agregar el epítipo His6X C-terminal a la proteína recombinante. Una vez analizado los extractos mediante Western Blot, utilizando un anticuerpo anti-His6X, se observó la presencia de múltiples bandas (figura 16-A). La explicación salió a la luz al analizar la secuencia nucleotídica del ADNc de AtSDL. Se encontraron múltiples codones que codifican para metionina en marco de lectura con el codón de inicio de AtSDL cercanos a secuencias procariontes de unión de ribosoma (Shine y Dalgarno, 1975). Por lo tanto, al expresar el ADNc en un sistema procarionte (*E. coli*), el ribosoma bacteriano se une a estas secuencias y traduce el ARNm partiendo en diferentes puntos de ese. Ya que tanto la proteína completa como las proteínas parciales comparten el extremo C-terminal, el anticuerpo anti-His6X los detecta a todos. Como consecuencia, se decidió no seguir con esta construcción dado que al purificar la AtSDL por su extremo C-terminal His6X, no sería posible separar la proteína completa de las proteínas truncadas.

Para solucionar el problema que provocaría la co-purificación de los fragmentos truncados, se clonó el ADNc de AtSDL con el codón de término en el vector pET-28a, que agrega el epítipo His6X en el extremo N-terminal de la proteína recombinante y a su vez se volvió a clonar en el vector pET-24d también con el codón de término para obtener la AtSDL recombinante sin epítipo alguno con el fin de verificar si estos interferían en su re-plegamiento o su actividad.

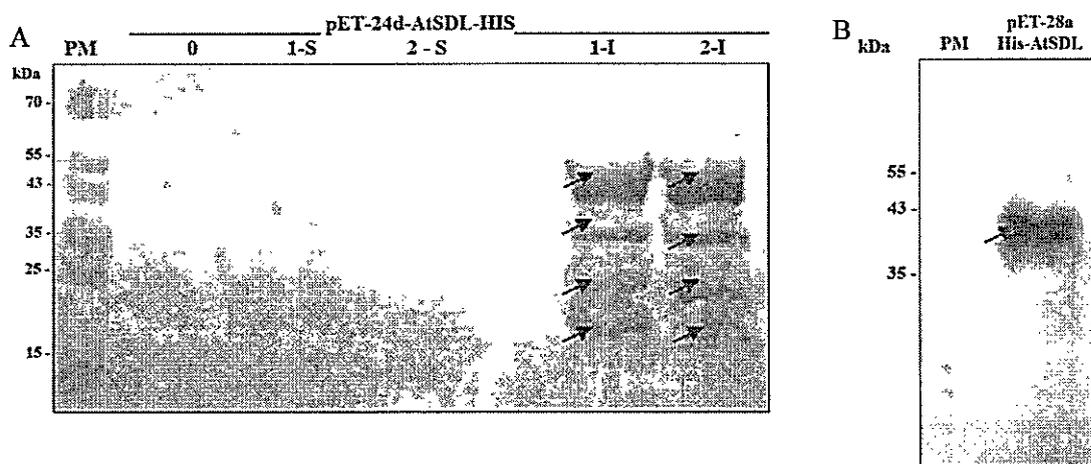


Figura 16: Análisis de Western Blot de AtSDL recombinante. (A) Los extractos de proteínas de *E. coli* transformada con el vector pET-24d-AtSDL-His. Se muestran (0) antes de la inducción, (S) la fracción soluble y (I) la fracción insoluble para dos clones analizados (1 y 2). Se observan múltiples bandas detectadas (flechas rojas) por el Anticuerpo anti-His6X que migran más rápidamente que la proteína completa (flecha azul). (B) Fracción insoluble de extracto de *E. coli* transformada con el vector pET-28a-His-AtSDL. Al estar el epítipo His6X en el extremo N-terminal solamente la proteína entera es detectada, flecha roja.

La expresión de AtSDL y LeSDH recombinantes (AtSDL, His-AtSDL, GST-AtSDL y GST-LeSDH) fue inducida por IPTG (sección 4.3.1). Las proteínas bacterianas fueron extraídas, analizadas por SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie (figura 17). Todas las proteínas recombinantes fueron encontradas en la fracción insoluble.

Se descartó de lleno posibles mutaciones que originaran proteínas truncadas, al constatar empíricamente los pesos moleculares predichos de AtSDL y LeSDH recombinantes. Adicionalmente, tanto AtSDL como His-AtSDL recombinantes tienen un peso molecular similar. Esto se debe a que el vector pET-24d (para la producción de AtSDL) agrega 13 aminoácidos en el extremo N-terminal de la proteína recombinante, agregando ~ 2 kDa.

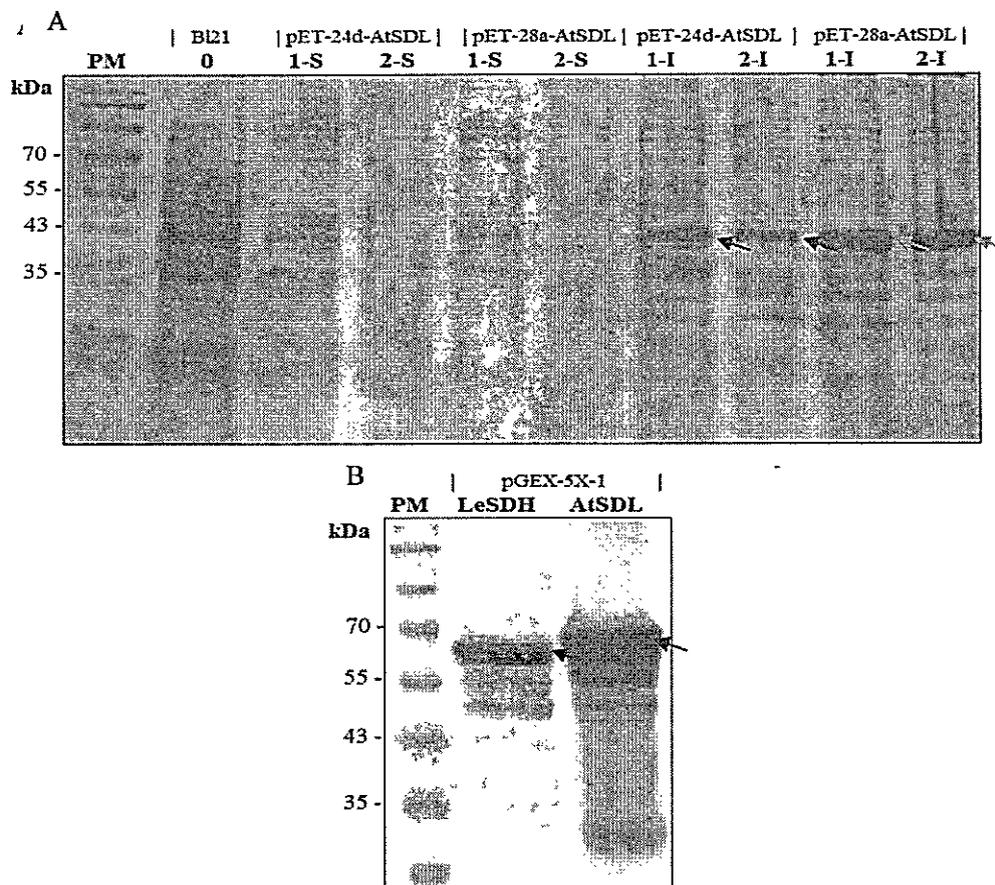


Figura 17: Análisis de SDS-PAGE de AtSDL y LeSDH recombinantes. (A) Gel de proteínas para monitorear la expresión de AtSDL (pET-24d-AtSDL) y His-AtSDL (pET-28a-AtSDL) respectivamente, que muestra (0) extracto antes de la inducción, (S) fracción soluble y (I) fracción insoluble de dos clones analizados para cada vector. Con flechas rojas se destacan la proteína recombinante AtSDL y con flechas amarillas His-AtSDL (~43 kDa). (B) Gel de proteínas para la fracción insoluble de *E. coli* expresando GST-LeSDH (pGEX-5X-1-LeSDL, ~58 kDa) y GST-AtSDL (pGEX-5X-1-AtSDL, ~65 kDa) destacadas con flechas rojas.

Desafortunadamente, y a pesar de numerosos intentos modificando la temperatura de inducción, la concentración de IPTG y utilizando diferentes DO_{600nm} , no se logró obtener AtSDL o LeSDH recombinantes en forma solubles. Por esta razón, se tuvo que solubilizar la fracción insoluble en urea 6 M para el posterior re-plegamiento de las proteínas producidas.

Mediante el análisis de Western Blot anti-His6X para el extracto insoluble de *E. coli* transformada con pET-28a-AtSDL se detectó específicamente una proteína del tamaño esperado al de His-AtSDL recombinante (figura 16-B).

Una vez solubilizada mediante urea 6 M, la fracción donde se encontró His-AtSDL, se prosiguió a purificar la proteína recombinante mediante una columna de afinidad en condiciones no nativas (sección 4.3.2). El proceso fue monitoreado mediante SDS-PAGE. Los resultados se muestran en la figura 18.

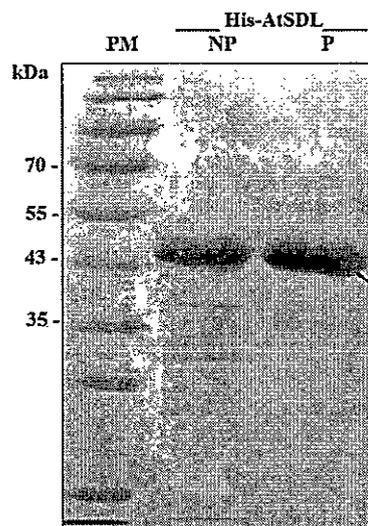


Figura 18: Purificación de His-AtSDL. Luego de haber solubilizado His-AtSDL en urea 6M se pasó el extracto proteico por una columna de afinidad de Ni. Luego de varios lavados con imidazol 30 mM se liberó la proteína con imidazol 350 mM. Se separaron las muestras por SDS-PAGE, y se tificaron las proteínas con Azul Brillante de Coomassie. (NP) Fracción proteica insoluble antes de la purificación; (P) Fracción proteica insoluble luego de la purificación. Se puede observar la banda correspondiente a His-AtSDL (flecha roja).

Para verificar la calidad de la purificación se cargó en el gel SDS-PAGE 20 μ g de proteína, de tal forma de poder detectar impurezas remanentes. Esta cantidad de

proteína, casi exclusivamente His-AtSDL, provocó que esta proteína migrara a pesos moleculares sutilmente mayores, como se puede observar en la figura 18.

5.4.-Experimentos de re-plegamiento de AtSDL recombinante.

En resumen, usando como referencia el trabajo de Ohta et al, (2005) se clonó el ADNc de LeSDH en pGEX-5X-1 con el fin de producir esta proteína recombinante y usarla como control (Figura 17-B). Por otro lado se produjo tres diferentes tipos de AtSDL recombinante: His-AtSDL, GST-AtSDL y AtSDL. La primera es de muy fácil y rápida purificación, lo que permite estudiar a la enzima, tanto en su re-plegamiento como en su actividad, sin la interferencia de otras proteínas provenientes de *E. coli* y de los fragmentos truncados de esta, que se generan en la expresión en el sistema procarionte (figura 16). La segunda también es de fácil y rápida purificación, empero es necesaria la conformación nativa de la proteína fusión GST para llevar a cabo esto. Además, se eligió también este sistema siguiendo las especificaciones del trabajo de Ohta et al, (2005) debido a la alta identidad aminoacídica de AtSDL con LeSDH (> 80 %). La última proteína recombinante generada, AtSDL sin epítipo alguno, se produjo con el objetivo de estudiar el efecto de los epítipos His6X y GST, agregados a la proteína recombinante, en forma comparativa.

Usando las especificaciones detalladas en la sección 4.3.3, se realizaron los experimentos de re-plegamiento para todas las proteínas producidas incluyendo a GST-LeSDH. En el caso del método por diálisis, todas las proteínas recombinantes fueron exitosamente solubilizadas en tampón Tris-HCl 100 mM en ausencia de urea. El

procedimiento fue altamente dependiente de la temperatura, siendo 4 °C la temperatura óptima para la solubilización en ausencia de urea de las proteínas generadas. Sin embargo, no se detectó actividad SDH para ninguna de ellas, incluyendo a GST-LeSDH (datos no mostrados). Además, cabe mencionar que las proteínas recombinantes se agregaban nuevamente luego de dos semanas ocurrida la diálisis, proceso que se retardaba al disminuir la concentración de proteínas y/o reemplazando DTT por β -mercaptoetanol a la misma concentración.

Dado estos resultados con el método de diálisis, se realizó una solubilización mediante dilución, siguiendo las especificaciones del trabajo de Rudolph y col. (1978) con modificaciones detalladas en la sección 4.3.3. Las proteínas recombinantes GST-AtSDL y GST-LeSDH precipitaron visiblemente al cabo de 20 min efectuada la dilución y no se detectó actividad SDH finalizado el procedimiento descrito (datos no mostrados). AtSDL precipitó al cabo de 1 h y de igual manera no se detectó actividad SDH. Sin embargo, His-AtSDL no purificado (condición que se mantuvo para comparar los resultados obtenidos con GST-AtSDL, AtSDL y GST-LeSDH) se mantuvo soluble durante todo el transcurso del procedimiento. Finalizado este proceso, se realizaron ensayos de actividad SDH en donde se detectó la reducción de NAD⁺ con sorbitol como sustrato (tabla VIII).

Tabla VIII: Actividad SDH de His-AtSDL.

Tampón	0 μM ZnCl_2	1 μM ZnCl_2	3 μM ZnCl_2	6 μM ZnCl_2	10 μM ZnCl_2
Tris-HCl	0	0.065	0.123	0.087	0.087
Fosfato	0	0.08	0.073	0.087	0.087

Usando diferentes concentraciones de ZnCl_2 durante el re-plegamiento por dilución se midió actividad SDH usando las condiciones descritas en la sección 4.3.5 (sorbitol = 150 mM). Los resultados se muestran en μM de $\text{NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹)

No se detectó actividad usando NADP^+ como cofactor y tampoco usando xilitol, eritritol, arabitol, manitol e inositol como sustrato a la misma concentración que sorbitol.

Se demostró la importancia del ion Zn^{2+} tanto en el re-plegamiento como en la recuperación de la actividad, siendo un resultado consistente con los análisis *in silico* explicados anteriormente. Aunque no se observó una relación directa entre la concentración Zn^{2+} y la recuperación de la actividad, en contraste con el trabajo de Rudolph y col (1978), al agregar Zn^{2+} a concentraciones mayores a 10 μM , la proteína His-AtSDL precipitaba y la actividad no se volvía a recuperar.

Al intentar repetir el método de dilución con His-AtSDL purificado, se observó que la proteína se mantenía en solución durante el procedimiento. Sin embargo, no se logró recuperar o detectar una actividad SDH. Esto revela la importancia de la concentración de His-AtSDL durante el re-plegamiento por dilución, ya que durante los experimentos de purificación se observó que la proteína se diluye aproximadamente entre 5 a 10 veces.

La alternativa de que una proteína insoluble proveniente de *E. coli* haya conferido actividad SDH queda descartada, debido a que no se ha descrito a la fecha actividad SDH en *E. coli*. Asimismo, no se detectó actividad con las proteínas recombinantes, no purificadas, GST-LeSDH, GST-AtSDL y AtSDL, teniendo cada una de ellas el mismo fondo proteico insoluble proveniente de *E. coli*.

5.5.-Análisis de la expresión de AtSDL en *S. cerevisiae* cepa SC-29 (Δ ura)

El vector p426-GPD permite la expresión de proteínas recombinantes en levadura. Este sistema eucarionte más parecido al de planta confiere el ambiente adecuado para el correcto plegamiento de AtSDL. Sin embargo, los niveles de expresión son más bajos en comparación con *E. coli*, siendo necesario volúmenes de cultivo mayores para obtener la proteína recombinante. El sistema de expresión es constitutivo controlado por el promotor GPD de fuerte expresión (Mumberg y col, 1995). El plásmido además agrega un epítipo His6X C-terminal para la purificación del producto.

Las células de levadura transformadas con el vector p426-GPD-AtSDL se mantuvieron en crecimiento en un medio mínimo carente de uracilo (sección 4.1.3). Después de la ruptura celular mecánico (sección 4.3.4), se analizó la producción de AtSDL-His mediante Western Blot utilizando un anticuerpo anti-His6X. Los resultados dieron negativos en todos los intentos y en todos los clones analizados. Dado este resultado inesperado, se secuenció la construcción. El resultado reveló un corrimiento en el marco de lectura en el sitio de corte para la endonucleasa *NotI* usado en el clonamiento del ADNc de AtSDL en p426-GPD. Esto no permitió detectar AtSDL-His, mediante el

anticuerpo anti-His6X ya que se generó un codón de término fortuito 6 aminoácidos después del último aminoácido de AtSDL y por consecuencia, tampoco se logró purificar la enzima para los ensayos de actividad, ya que *S. cerevisiae* posee un SDH endógeno (Sarthy y col, 1994). A pesar de esto, se analizaron de igual manera 4 clones midiendo el aumento de la actividad SDH sobre la endógena (figura 19-A).

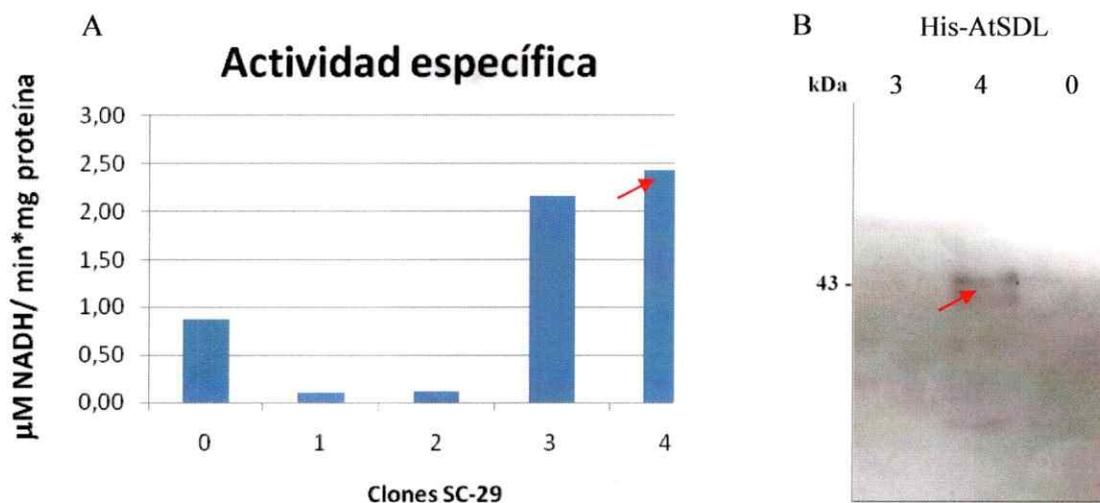


Figura 19: Expresión de AtSDL en *S. cerevisiae*. (A) Se muestra el análisis de 4 clones de SC-29, midiendo la actividad SDH desde extractos. El control usado (0) fue un clon de SC-29 transformado con p426-GPD vacío. El clon con mayor actividad específica SDH fue el clon 4 (rojo). (B) Se analizaron los dos clones con actividad SDH mayor a la basal (3 y 4) mediante Western-Blot usando suero anti-AtSDL.

En la figura 19-A se observa que los clones 1 y 2 tenían menor actividad SDH al control. La extracción de proteínas de estos dos clones fue muy pobre y por esto el factor de dilución aparentemente fue importante durante los ensayos de actividad tanto para AtSDL-His recombinante como para SDH endógeno de *S. cerevisiae*. Este resultado se discutirá más adelante. Por otro lado, la actividad de SDH, utilizando sorbitol y NAD^+ como sustrato y cofactor, fue 2,5 – 2,8 veces más alta en dos transformantes (clones 3 y

4) que en levadura transformada con el vector vacío (Figura 19-A), lo que fue un resultado promisorio. El desarrollo en paralelo de un suero sanguíneo poli-clonal de ratón anti-AtSDL (sección 4.3.6 y 5.6) permitió detectar que efectivamente había acumulación de AtSDL en un transformante (clon 4) de levadura. La señal obtenida en este experimento fue de baja intensidad, revelando dos bandas cercanas al tamaño esperado (figura 19-B, flecha roja) posiblemente a causa de glicosilaciones. Análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de AtSDL revela la presencia de al menos 10 sitios de glicosilación (NetNGlyc 1.0 Server). Por otro lado, tanto los patrones como la cantidad de glicosilaciones pueden variar de clon en clon (Verachtert y De Mot, 1990), siendo esta una posible explicación a las diferencias obtenidas en cuanto a actividad y/o inmunodetección.

5.6.-Localización sub-celular de AtSDL-GFP

El objetivo de estos experimentos fue determinar si AtSDL se localiza en algún compartimento sub-celular o en el citoplasma como análisis *in silico* (5.6.1) y trabajos previos han descrito (Fayek y Wayne, 1979; Wang y col., 2009; Yamada, 2001). La proteína de fusión AtSDL-GFP, codificada por la construcción pGWB5-AtSDL, fue expresada en plantas mediante la agro-infiltración de hojas de *Nicotiana tabacum*. Luego de 4 días, las hojas fueron cosechadas y analizadas mediante microscopía de fluorescencia (figura 20).

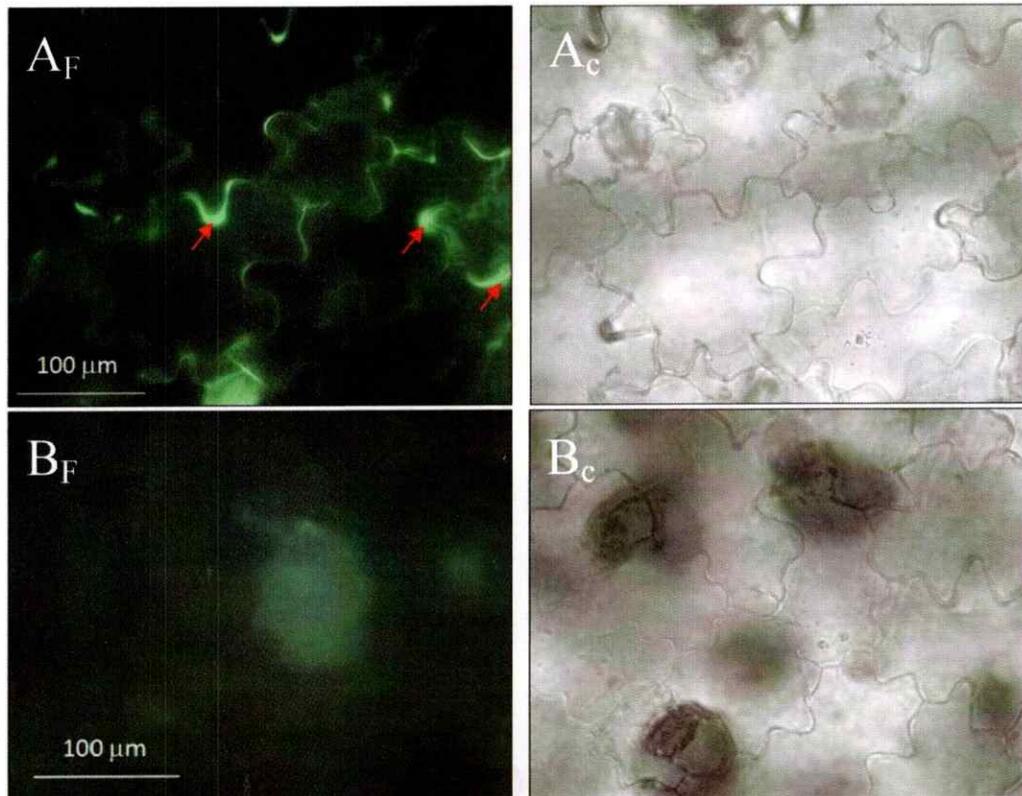


Figura 20: Fluorescencia de AtSDL-GFP. (A_F) Fluorescencia de hojas de *N. tabacum* expresando AtSDL-GFP (tiempo de exposición 80 ms) y (A_c) campo de la microfotografía. (B_F) Auto-fluorescencia de hojas de *N. tabacum* agro-infiltradas con *A. tumefaciens* sin el vector. (B_c) Campo claro de la microfotografía (tiempo de exposición 200 ms). Las microfotografías fueron capturadas con un aumento de 600X.

Los resultados en esta primera aproximación de la localización de AtSDL-GFP revelan que esta proteína no se encuentra en compartimentos sub-celulares de fácil reconocimiento (aparato de Golgi, cloroplastos, vacuola, RE, lisosomas, núcleo).

A causa del enorme volumen que ocupa la vacuola en la célula vegetal, el citoplasma queda desplazado hacia los bordes, lo que impide determinar si la localización de AtSDL-GFP es citosólica, está asociada a la membrana plasmática o a la pared celular. Experimentos donde se utilizaron soluciones isotónicas (400 mOsm) durante la captura

de las microfotografías arrojaron resultados similares. Al incubar las muestras en soluciones hipertónicas (> 400 mOsm), la fluorescencia se observaba distribuida erráticamente en la célula, siendo imposible determinar su ubicación dentro de las células observadas (datos no mostrados). En la figura 20-A_F se observa sectores en donde la fluorescencia parece ser más intensa (flechas rojas). Estos corresponden a pliegues de la célula en donde se encuentra más citoplasma. Esto sugiere que la localización de AtSDL-GFP es citoplasmática y no está asociada a membrana o a pared celular. En estos dos últimos casos, se verá una fluorescencia distribuida homogéneamente y/o polarizada, rodeando la célula (Speth y col, 2009).

5.7.-Preparación de un antisuero de ratón contra AtSDL

Usando el método de re-plegamiento descrito por Ohta et al, (2005) para las proteínas recombinantes producidas, se logró solubilizarlas, y en el caso de His-AtSDL, se logró recuperar su actividad. Para generar una herramienta molecular para poder determinar con mayor precisión la localización subcelular de AtSDL, se generó un anticuerpo contra esta proteína. Para lograr esto, se inmunizaron ratones con la solución de GST-AtSDL para así obtener un suero sanguíneo anti-AtSDL. Este fue analizado usando His-AtSDL purificado como antígeno (sección 4.3.6).



Figura 21: Análisis de Western-Blot anti-AtSDL. (A) Análisis a la semana del suero sanguíneo de un ratón inmunizado por primera vez con GST-AtSDL. (B) Análisis del suero sanguíneo del mismo ratón luego de 5 inmunizaciones. Se observa GST-AtSDL destacado con una flecha roja y His-AtSDL destacado con una flecha azul. Migrando más rápido (flecha negra), se encuentra una banda que corresponde a alguna proteína de *E. coli* que generó una fuerte respuesta inmune en el ratón.

En la figura 21 se observa el aumento de la señal en la detección de GST-AtSDL y His-AtSDL purificada luego de 5 inmunizaciones. Además se observa que se logra limpiar la detección de otras proteínas provenientes de *E. coli*.

5.7.1-Detección de AtSDL en diferentes órganos de *A. thaliana* mediante Western-Blot

Como se constató en sección 5.1.1, el RNAm de AtSDL se expresa ampliamente en los órganos analizados. Con la generación de un suero anti-AtSDL, se utilizó esta herramienta para determinar el patrón de acumulación de AtSDL en extractos proteicos totales de los distintos órganos de *A. thaliana* (figura 22).

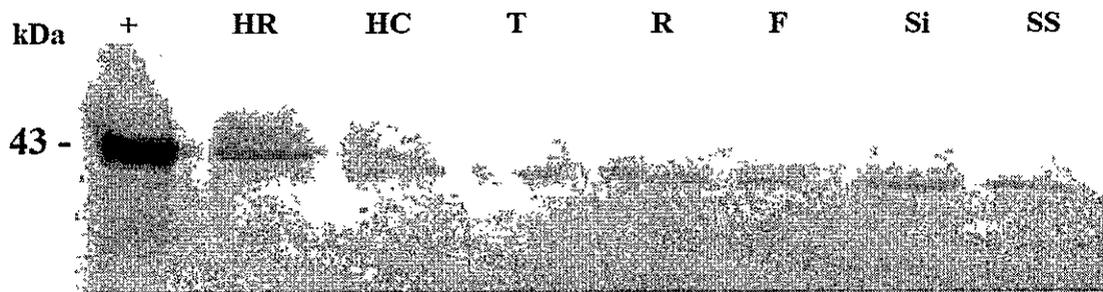


Figura 22: Acumulación de AtSDL en diferentes órganos de *A. thaliana*. Western-blot utilizando el anti-AtSDL antisuero contra extractos proteicos totales de diferentes órganos: **(HR)** hojas rosetas, **(HC)** hojas caulinares, **(T)** tallo, **(R)** raíz, **(F)** flor, **(Si)** silicuas, **(SS)** semillas secas. Como control positivo (+), se utilizó His-AtSDL purificada

AtSDL se encuentra ampliamente distribuida en los órganos de *A. thaliana*, siendo consistente con el resultado obtenido en la sección 5.1.1. Es importante mencionar que el tamaño esperado para la proteína endógena es de ~40 kDa y que esta se encontró en todos los órganos analizados a excepción de las hojas rosetas en donde migró de igual forma que el control utilizado, His-AtSDL. Esto pudo haber sido causado por problemas en el gel SDS-PAGE, dado que al repetir el experimento solamente con extractos de hojas roseta, se obtuvo el resultado esperado (sección 5.7.2).

5.7.2.- Localización de AtSDL por fraccionamiento sub-celular e inmunodetección

En la sección 5.5 se determinó que la localización de AtSDL-GFP era probablemente citoplasmática. Para descartar la posibilidad que sea una proteína asociada a membrana o a pared celular, se realizó un fraccionamiento sub-celular de hojas rosetas de *A. thaliana* y se detectó la presencia de AtSDL endógena mediante Western-blot con el anti-AtSDL antisuero.

En la figura 23 se observa que AtSDL se encuentra efectivamente en la fracción soluble de las fracciones obtenidas, lo cual corresponde a una fracción enriquecida en citosol. El tamaño de AtSDL endógeno corresponde al predicho, siendo menor que el de la proteína His-AtSDL recombinante y el experimento fue repetido 3 veces con resultados exactamente iguales.

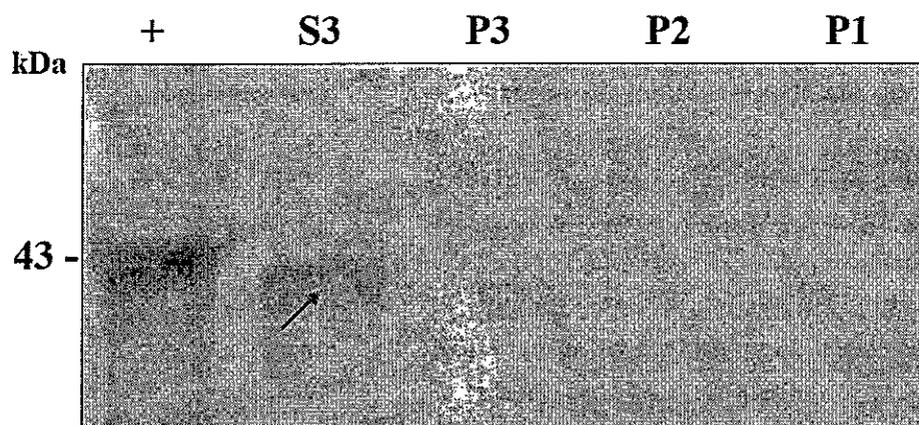


Figura 23: Análisis de la localización de AtSDL mediante fraccionamiento sub-celular. Se sometieron hojas rosetas de *A. thaliana* a fraccionamiento subcelular y se detectó la presencia de AtSDL utilizando el anti-AtSDL antisuero. (S3) sobrenadante de la centrifugación a 10^5 x g, (P3) sedimentado de la centrifugación a 10^5 x g, (P2) sedimentado de la centrifugación a 10^4 x g, (P1) sedimentado de la centrifugación a 10^3 x g. (+) His-AtSDL purificado. AtSDL se encuentra en la fracción soluble (citosol) de la célula (flecha roja).

6.-DISCUSIÓN

Usando las secuencias de SDH conocidas (tomate, manzano, durazno) para realizar una búsqueda usando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se puede encontrar una única secuencia con alta identidad (~80 %) que podría ser una potencial SDH en *A. thaliana*. Al buscar el gen que codifica para esta potencial SDH dentro del genoma de *A. thaliana* se encuentra un único locus (At5g51970) en donde se encuentra un marco de lectura abierto que codifica para esta enzima.

El análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de AtSDL permite agruparlo y clasificarlo mediante alineamientos. La súper-familia de alcoholes deshidrogenasas contiene troninas, quinonas y alcoholes deshidrogenasas entre otras y se caracterizan por ser enzimas dímeras o tetraméricas que unen de uno o dos iones zinc por cada subunidad (Jornvall y col., 1987; Jornvall y col., 1993). AtSDL posee dos dominios conservados; el dominio N-terminal catalítico de alcoholes deshidrogenasa con plegamiento tipo GroES y el dominio C-terminal de unión a di-nucleótidos con plegamiento tipo Rossmann (Figura 3). El plegamiento tipo GroES es propio en quinonas oxidoreductasas (QOR), en alcoholes deshidrogenasas (ADH), glucosas deshidrogenasas (GDH) y chaperonina-10 (cpn10, GroES) (Murzin, 1996). Se caracteriza por poseer 4 hebras beta que forman un barril con un fuerte núcleo hidrofóbico bien conservado, en donde las conexiones para cada hebra son "loops" que varían en tamaño y secuencia según la proteína (Bhupesh y Shekhar, 1999). El plegamiento tipo Rossmann se caracteriza por poseer una sabana beta formada por tres hebras en conformación paralela unidas cada una por dos hélices alfa. Este motivo une un único nucleótido y para la unión de di-nucleótidos como NAD⁺

se presenta dos motivos tipo Rossmann seguidos. El modelo generado por homología reveló la presencia de estos dos motivos conservados y predichos en los alineamientos realizados, estos se mantuvieron estables luego de experimentos de 1 ns de dinámica molecular con solvente implícito y con una esfera de agua (explícito), lo que revela que la identidad de AtSDL con los moldes usados durante el modelamiento no es solo una aproximación de su estructura sino que la misma secuencia de AtSDL permite mantener y estabilizar estos motivos en las simulaciones mencionadas.

Los motivos estructurales mencionados arriba son bastantes conservados dentro de las familias de poli-alcoholes deshidrogenasas. Por otro lado, el estudio más detallado de la secuencia de AtSDL reveló que también posee conservados los aminoácidos claves en la unión del ión zinc y en la oxidación de D-sorbitol (Glu 164, Glu 80, His 69 y Cys 54; Figura 8), los cuales están presentes tanto en SDH de plantas como en hongos y mamíferos. Además cabe destacar que AtSDL tiene una alta identidad (>40 %) con SDHs descritos en especies de diferentes reinos (Animalia, Plantae y Fungi), lo que indica fuertemente que AtSDL también es una sorbitol deshidrogenasa.

La relación de AtSDL y algunas poli-alcoholes deshidrogenasas presentes en bacterias, hongos, animales y plantas en el dendrograma mostrado en la figura 5, constata la cercanía de AtSDL con SDHs de especies no-*Rosaceae* tales como tomate y vid; y además ampliando el rango, con especies que transportan principalmente sorbitol en el floema (Ej: *Malus x domestica*). El dendrograma fue realizado mediante "Bootstrap Neighbor-Joining Tree" que solo agrupa las secuencias por cercanía (mayor identidad). Para hacer un estudio filogenético más detallado, con el fin de encontrar los orígenes de

AtSDL dentro del reino de plantas, es necesario realizar un árbol filogenético mediante algoritmos más complejos tales como máxima verosimilitud y análisis Bayesiano. Estos fueron realizados, y aunque no caben dentro de los objetivos de esta tesis, muestran que las SDHs tienen su origen en el reino de las plantas y desde ahí, y de alguna manera, se distribuye en bacterias, hongos y animales (datos no mostrados).

Un caso particular que se puede observar en el dendrograma es el de L-idonato deshidrogenasa de vid. Esta enzima, clonada y caracterizada bioquímicamente en el trabajo de DeBolt y col. (2006), muestra una muy baja actividad con sorbitol, alrededor de 15 veces menor que con L-idonato. Sin embargo, comparte > 70% de identidad con SDHs de plantas. Al observar la secuencia de L-idonato deshidrogenasa de vid en la figura 4, se puede observar que también posee conservados los aminoácidos Glu 164, Glu 80, His 69 y Cys 54 presentes en el sitio activo. No obstante, en la posición 71 (numeración en el alineamiento) se destaca en esta enzima una histidina en vez de una tirosina, la que está presente en todas la demás secuencias de SDHs. Esta diferencia se puede deber la necesidad de estabilizar al grupo carboxilato ubicado en el carbono 1 del L-idonato y así oxidar el hidróxilo del carbono 5 a un carbonilo, formando 5-keto gluconato. Por contraparte, la histidina en esta posición también puede desestabilizar la unión de sorbitol al sitio activo, siendo esta la virtual explicación por la baja actividad con este sustrato. Esta explicación se puede observar mejor en la figura 8-B en donde en el modelo de AtSDL se observa que la tirosina 71 (Tyr 60 en la numeración de AtSDL) interactúa con el hidroxilo del carbono 5 del sorbitol y en donde habría una histidina interactuando con un grupo carboxilato del L-idonato en el caso de L-idoDH de vid.

AtSDL es cercana a nivel de secuencia a L-idonato deshidrogenasa de vid, pero específicamente en la posición 71 presenta una tirosina como las demás SDHs, revelando que posiblemente AtSDL tenga una muy baja actividad con L-idonato. Esta hipótesis sería más robusta al comparar más secuencias de L-idonato deshidrogenasa y constatando si este patrón se repite, lo que no fue posible debido a que L-idoDH de otras especies presentan muy baja identidad con los SDHs, lo que dificultó su alineamiento. Por otro lado, análisis metabolómicos en *A. thaliana* no han demostrado la presencia de L-idonato en esta especie (Kaplan y col., 2004). Este compuesto es un intermediario en la síntesis de ácido tartárico en vides (DeBolt y col, 2006), un compuesto que tampoco ha sido detectado en *A. thaliana*. Más aun, L-idonato no se encuentra comercialmente por lo que realizar análisis de actividad de AtSDL con este sustrato resulta dificultoso por la necesidad de sintetizarlo y purificarlo.

El estudio de la secuencia de AtSDL, en forma preliminar, permitió dilucidar, como ya se mencionó, su función, como también así su localización. Los servidores usados para predecir la ubicación de AtSDL dentro de los compartimentos sub-celulares de las células de *A. thaliana* fueron bastante consistentes entre sí. La ubicación citosólica soluble de AtSDL entregada por los programas también es consistente con algunos trabajos mencionados en otras especies vegetales (Lo Bianco y col., 1998; Ohta y col., 2005; Oura y col., 2000; Park y col., 2002; Wang y col., 2009; Yamada y col., 2001). No obstante y en particular, el trabajo de Wang y col. (2009) ahonda en la localización de las SDH presentes en manzanos, en donde demuestra que aparte de la localización citosólica comúnmente encontrada, existen pruebas de que hay SDHs dentro de

cloroplastos y vacuolas. Por esta razón y con el mismo objetivo se demostró experimentalmente en esta tesis que AtSDL-GFP no se localiza en ningún organelo membranosos ya sea cloroplasto o vacuola. En la figura 20 se observa fluorescencia en la periferia celular que no concuerda con la esperada si la proteína se ubicara en la membrana plasmática o en la pared celular la cual tendría que ser continua, por el contrario en la imagen se destacan regiones de mayor o menor fluorescencia debido a la heterogénea distribución del citosol. La inmunodetección de AtSDL en el fraccionamiento sub-celular de órganos de *A. thaliana* confirma la hipótesis al detectar a la enzima en la fracción soluble (figura 23). Estos resultados, consistentes en todos los niveles analizados, indican que AtSDL posiblemente actúa con sustratos que ingresan directamente a la célula o que salen de esta, descartando por este lado su participación en la regulación de la síntesis de almidón dentro del cloroplasto propuesta en el trabajo de Wang y col. (2009).

Se generó un modelo por homología de la estructura tridimensional de AtSDL, lo cual fue evaluado energéticamente en forma global como también para cada aminoácido según su posición en la estructura tridimensional. Como se mencionó anteriormente la energía global de la AtSDL fue de aproximadamente un 10 % sobre el promedio de las estructuras usadas de molde (1E3J, 1PL6 y 2DFV; ver sección 4.4.3) usando el validador ProSa y al compararla con muchas estructuras resueltas tanto por cristalografía como por RMN la estructura de AtSDL queda dentro de la dispersión normal mostrada en la figura 6-B.

El modelo de AtSDL muestra la topología de los dominios predichos mediante el alineamiento de su secuencia aminoacídica. En la figura 7, la superficie hidrofóbica calculada muestra algunos parches de residuos apolares expuestos en la superficie de la proteína, sugiriendo posiblemente la interacción con otras subunidades de esta misma para conformar una estructura cuaternaria. Una vez obtenida la enzima AtSDL en forma soluble y activa se puede determinar mediante cromatografía de exclusión molecular (infiltración en geles) el tamaño de la estructura cuaternaria de esta enzima y así inferir si AtSDL forma dímeros o tetrameros.

Los estudios de especificidad de sustrato *in-silico* mostraron que el sitio activo predicho en el modelo de AtSDL une en forma energéticamente favorable diferentes polialcoholes presentes de *A. thaliana*. Aunque las energías y las constantes de unión son bastante similares entre los polialcoholes analizados, la capacidad de AtSDL de oxidar a cada uno de ellos no se puede determinar mediante estos análisis teóricos *in-silico*. Sin embargo, estos resultados orientan y permiten tener una base teórica para explicar futuros experimentos *in vitro*, tales como mediciones de actividad de AtSDL con diferentes mutaciones sitio-dirigidas.

Los experimentos de RT-PCR demostraron que el ADNc de AtSDL se expresa en diferentes tejidos de *A. thaliana*. El análisis mediante Western-blot demostró que AtSDL está presente en los tejidos que expresan su ADNc, y concuerda con un análisis proteómico que mostró la acumulación de AtSDL en hojas de esta especie (Wienkoop y cols, 2004). No se encontró una expresión diferencial importante en los tejidos ensayados, lo que indica que AtSDL no estaría generando un gradiente de su sustrato a

través de la planta, a diferencia de su papel en manzanos (Nosarszewski y col., 2004; Teo y col., 2006). Por otro lado, se detectó AtSDL en semillas secas de *A. thaliana*. En estas, no se ha documentado la presencia de sorbitol, sin embargo si hay estudios del metabolismo de azúcares durante su desarrollo, principalmente de la sacarosa y su catabolismo para la liberación de glucosa y fructosa (Odunlami, 2009). Por otro lado, se ha detectado actividad SDH en semillas de maíz (Morais de Sousa y col., 2008) y de soya (Kuo y col., 1990), plantas que no acumulan sorbitol principalmente. La función propuesta de SDH en las semillas de maíz es la del control del estado de oxidoreducción de las semillas en condiciones de alta concentración de azúcares y baja disponibilidad de oxígeno. La reducción de fructosa a sorbitol oxida NADH a NAD⁺ manteniendo la disponibilidad de aceptores de electrones en las células. En el caso de las semillas de soya, sorbitol es el intermediario en la inter-conversión de glucosa a fructosa y viceversa, en donde juega un papel modulador en el metabolismo de los azúcares, debido a la inhibición que sufren algunas fructosas kinasas de plantas por exceso de fructosa (Copeland y Morell, 1985). La presencia de AtSDL en semillas de *A. thaliana* nos lleva a pensar que el papel posible que esta enzima podría estar realizando en este órgano esté relacionado con los mencionados anteriormente, aunque a la fecha no hay estudios publicados que ahonden en esta interrogante para esta especie.

Durante el desarrollo experimental de este trabajo se realizaron extracciones crudas de proteínas desde hojas de *A. thaliana* con el fin de detectar actividad SDH con resultados negativos (datos no mostrados), posiblemente por interferencias y/o que la actividad

específica de AtSDL sea muy baja. Por esta razón se decidió producir la proteína en forma recombinante usando los sistemas conocidos en *E. coli* y *S. cerevisiae*.

La producción de AtSDL recombinante se realizó siguiendo el método documentado en el trabajo de Ohta y col. (2005). Las proteínas recombinantes generadas GST-AtSDL, His-AtSDL y AtSDL fueron encontradas formando cuerpos de inclusión. Estas lograron ser solubilizadas en presencia de 6 M de urea y replegadas usando el método de diálisis y de dilución rápida. El método de diálisis explicado en el trabajo de Ohta y col. (2005) logró retirar el agente caotrópico y mantener las proteínas solubles. Sin embargo, la actividad SDH no fue encontrada tanto en AtSDL como LeSDH, usada como control positivo. Posiblemente durante el re-plegamiento se llegó a un poso energético no funcional, algún intermediario estructural sin actividad. Se descartó la interferencia generada por los epítomos adheridos a las proteína recombinante al encontrar el mismo resultado en AtSDL recombinante sin epítomo alguno. Por otro lado, GST-LeSDH pudo ser solubilizada al extraer la urea pero sin recuperar su actividad. Una de las posibles causas por la que no se llegó al resultado expuesto en el trabajo de Ohta y col. (2005) es debido a que no se encontró experimentalmente ni bibliográficamente la concentración de proteínas óptimas para el re-plegamiento de esta enzima. Además, las diferentes condiciones de laboratorio también podrían haber afectado los resultados. En conclusión LeSDH, usado como control de re-plegamiento, permitió no descartar que AtSDL oxidara sorbitol.

Se probó el re-plegamiento de AtSDL mediante dilución rápida, con diferentes concentraciones de zinc con resultados positivos para la oxidación de sorbitol y la

consecuente reducción de NAD⁺. La actividad encontrada solo se logró con His-AtSDL recombinante sin purificar y solamente usando D-sorbitol y NAD⁺ como sustratos. Aunque son resultados preliminares es un buen indicio para empezar la investigación de la función de esta enzima.

La actividad SDH encontrada es similar a la documentada en trabajos como el de Yamada y col (2001) en donde se midió directamente en extractos proteicos de frutos, lo que es muy bajo, considerando que AtSDL correspondía a ~ 80% de las proteínas presentes en el extracto (tabla VIII). Cabe la posibilidad de que un pequeño porcentaje de las enzimas re-plegadas estén en una conformación funcional y que la mayoría haya caído en algún estado intermediario de re-plegamiento sin actividad. Por otro lado, AtSDL puede tener una muy baja actividad SDH lo que se correspondería con la nula actividad encontrada en extractos de hojas rosetas de *A. thaliana*, en donde la enzima esta mucho mas diluida y hace que la actividad caiga bajo el rango de detección. Además no se detectó actividad usando NADP⁺ como cofactor y tampoco usando xilitol, eritritol, arabitol, manitol e inositol como sustrato a la misma concentración que sorbitol. Eso puede deberse a que las condiciones de re-plegamiento favorezcan la oxidación exclusiva de sorbitol o que AtSDL no tenga actividad con estos sustratos. Por esta razón no se puede descartar que AtSDL tenga actividad con otros polialcoholes en vez de sorbitol en condiciones nativas.

La expresión recombinante de AtSDL en *S. cerevisiae* se realizó con la intención de generar la proteína en un ambiente más similar al de la planta y así evitar la formación de cuerpos de inclusión. Por problemas inesperados en la síntesis del partidor 3' utilizado en el clonamiento, no se logró detectar la proteína recombinante mediante Western-blot contra el epítipo His6x. Sin embargo, usando el suero poli-clonal anti-AtSDL se logró encontrar un clon de levadura que expresaba AtSDL-His recombinante con un correlativo aumento de actividad SDH sobre la endógena (figura 19-B). Debido a que no se realizaron más pruebas a cada clon, no hay una valides estadística del aumento de actividad debido a AtSDL recombinante en la levadura, no obstante, la inmunodetección permite atribuir el aumento de esta a la presencia de AtSDL.

AtSDL recombinante re-plegado mediante dilución rápida o expresado en levadura oxida D-sorbitol reduciendo NAD⁺ en el proceso. Empero, no hay aun valor definitivo de los parámetros bioquímicos de la enzima (V_{max} , K_m etc). A pesar de un enfoque multifacético (distintas sistemas de expresión, distinto identidad y posición de epítipo etc), lamentablemente no se logró obtener suficiente enzima AtSDL en forma estable para poder realizar todos los ensayos pertinentes. Sin embargo, existe la prueba de que AtSDL tiene actividad SDH, lo que no se había mostrado en otros trabajo

7.-CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

En *A. thaliana*, se encuentra un único marco de lectura que codifica para un potencial sorbitol deshidrogenasa. Siendo *A. thaliana* una planta que no acumula sorbitol, la función de esta enzima está distante a la entendida en trabajos relacionados al estudio de SDHs en plantas *Rosaceae*. El estudio de la secuencia aminoacídica indica que esta posee los dominios característicos a polialcoholes deshidrogenasas que utilizan NAD⁺/NADP⁺ como cofactores y que está relacionada mas cercanamente a SDHs de plantas que no acumulan sorbitol. La localización tanto órgano-específica como la subcelular es importante para sentar bases en el entendimiento de la función que esta enzima desempeña. Los análisis experimentales y teóricos sugieren que AtSDL se encuentra ampliamente distribuida en la planta en forma soluble dentro del citosol de cada célula en las condiciones estudiadas. Se realizó un modelo de la estructura tridimensional de AtSDL mediante homología, con el fin de determinar la especificidad de sustrato *in-silico* e identificar los aminoácidos que participan tanto en la catálisis como en la determinación de la especificidad de sustrato. Los experimentos de "docking" revelaron que el sitio activo predicho une preferentemente a NAD⁺ sobre a NADP⁺ en presencia de zinc. Los polialcoholes analizados tuvieron una dispersión conformacional mayor que en la de los cofactores debido a la mayor libertad de torsión de las moléculas. La convergencia energética de las conformaciones se acopló a una selección manual de éstas con la información bibliográfica disponible.

La expresión recombinante de AtSDL reveló que esta enzima presenta bastantes complicaciones tanto en su expresión heteróloga como en los protocolos de re-

plegamiento. Sin embargo, se logró detectar actividad SDH en la enzima recombinante producida tanto en *E. coli* como *S. cerevisiae*, apuntando a que AtSDL posea preferencia por NAD⁺ como cofactor y por sorbitol como sustrato sobre otros polialcoholes analizados en las condiciones manejadas en el presente trabajo. No obstante, no se descarta la posibilidad de que AtSDL pueda oxidar otros poli-alcoholes en condiciones nativas, aunque esto aun no se ha demostrado.

Se produjo un suero poli-clonal de ratón anti-AtSDL que fue evaluado satisfactoriamente y que además permitió confirmar la distribución de AtSDL en la planta y su localización sub-celular. La importancia de este avance radica en que se inició el proceso para la producción del anticuerpo monoclonal específico a AtSDL con el fin de realizar análisis *in-situ* de la ubicación de AtSDL en diferentes tipos de células y en diferentes estadios de desarrollo de *A. thaliana* detallando con más énfasis los vacíos que aún quedan en el entendimiento de la función de esta enzima. Más aun es importante corroborar los resultados de actividad obtenidos sobre-expresando AtSDL en *A. thaliana* en forma constitutiva para lograr determinar su actividad específica y los valores de los parámetros bioquímicos (V_{max} y K_m) para cada potencial sustrato que está presente en la planta. Por otro lado, es importante conocer el origen filogenético de esta enzima y por qué razón está presente en plantas que no acumulan sorbitol. Para esto ya se ha realizado análisis filogenéticos que necesitan perfeccionarse para tener una mayor confiabilidad en los resultados obtenidos, pero que serán de suma utilidad para entender en un contexto más global la función de AtSDL.

8.-BIBLIOGRAFÍA

Adamiec M, Drath M y Jackowski G (2008). Redox state of plastoquinone pool regulates expression of *Arabidopsis thaliana* genes in response to elevated irradiance. *Acta Biochimica Polonica*: 55(1), 161–173.

Banfield M J, Salvucci M E, Baker E N y Smith C A (2001). Crystal structure of the NADP(H)-dependent ketose reductase from *Bemisia argentifolii* at 2.3Å resolution. *J.Mol.Biol.* 306; 239-250.

Bashton M y Chothia C (2002). The geometry of domain combination in proteins. *J Mol Biol.* 315: 927-939.

Bellaloui N, Brown P H, Dandekar A M (1999) Manipulation of in vivo sorbitol production alters boron uptake and transport in tobacco. *Plant Physiol* 119: 735–742

Bhupesh T y Shekhar C M (1999) Conserved structural features and sequence patterns in the GroES fold family. *Protein Engineering*, 12 (10): 815-818

Bradford M M (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Brooks B R, Bruccoleri R E, Olafson B D, States D J, Swaminathan S, Karplus M (1983). CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comp Chem* 4: 187–217.

Copeland L, Morell M (1985). Hexose kinases from the plant cytosolic fraction of soybean nodules. *Plant Physiol* 79: 114-117.

DeBolt S, Cook D R y Ford C M (2006). L-Tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. 103 (14): PNAS 5608–5613.

Doehlert D C (1987). Ketose reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol.* 84: 830–834.

Fayek B N And Wayne H L (1979). Detection and Characterization of Sorbitol Dehydrogenase from Apple Callus Tissue *Plant Physiol.* 64: 69-73.

Gao Z, Maurousset L, Lemoine R, Yoo S D, Van Nocker S y Loescher W (2003). Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. *Plant Physiol*: 131, 1566–1575.

Gasteiger J, Marsili M (1980). Iterative partial equalization of orbital electronegativity: a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*, 35 (22): 3219–3222.

Haritatos E, Medville R and Turgeon R (2000) Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211: 105-111

Hu L, Lu H, Liu Q, Chen X, Jiang X (2005) Overexpression of *mtID* gene in transgenic *Populus tomentosa* improves salt tolerance through accumulation of mannitol. *Tree Physiol* 25: 1273–1281

Ishikawa K, Higashi N, Nakamura T, Matsuura T, Nakagawa A (2007).The first crystal structure of L-threonine dehydrogenase. *J.Mol.Biol.* 366: 857-867.

Jornvall H, Persson B, Du Bois GC, Lavers GC, Chen JH, Gonzalez P, Rao PV, Zigler JS Jr (1993). Zeta-crystallin versus other members of the alcohol dehydrogenase super-family. Variability as a functional characteristic. *FEBS Lett.* 322: 240-4

Jornvall H, Persson B, Jeffery J. (1987) Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 167 195-201

Kaplan F, Kopka J, Haskell D, Zhao W, Schiller K C, Gatzke N, Sung D Y y Guy C L (2004). Exploring the Temperature-Stress Metabolome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*: 136, 4159–4168.

Klepek Y S, Geiger D, Stadler R, Klebl F, Landouar-Arsivaud L, Lemoine R, Hedrich R y Sauera N (2005). Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER 5, a New Member of the Monosaccharide Transporter-Like Superfamily, Mediates H⁺-Symport of Numerous Substrates, Including myo-Inositol, Glycerol and Ribose. *The Plant Cell*:17, 204 - 218.

Klimacek M, Hellmer H, Nidetzky B (2007). Catalytic mechanism of Zn²⁺-dependent polyol dehydrogenases: kinetic comparison of sheep liver sorbitol dehydrogenase with wild-type and Glu154→Cys forms of yeast xylitol dehydrogenase. *Biochem. J.* 404: 421–429.

Kuo T M, Doehlert D C y Crawford C G (1990). Sugar metabolism in germinating soybean seeds. Evidence for the sorbitol pathway in soybean axes. *Plant Physiol.* 93: 1514–1520.

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

Lo Bianco R y Rieger M y Sung S J S (1998). A simple, rapid extraction and assay procedure for NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase (SDH) in peach. *J Am Soc Hortic Sci.* 123:1065–1068.

Mehta R A, Parsons B L, Mehta A M, Nakhasi H L, Mattoo A K (1991). Differential protein metabolism and gene expression in tomato fruit during wounding stress. *Plant Cell Physiol*:32,1057–1066.

Merril C R (1990). Gel-staining techniques. In Deutscher MP (Ed): Guide to protein purification. *Methods in Enzymology.* Academic press Inc. volume 182: 50–68.

Morais de Sousa S, Giúdice Paniago M, Arruda P y Yunes J A (2008). Sugar levels modulate *sorbitol dehydrogenase* expression in maize. *Plant Mol Biol.* 68

Mumberg D, Müller R, Funk M (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene.*;156:119–122.

Murzin A G (1996) Structural classification of proteins: New superfamilies *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 386–394.

Murzin A G (1996). Structural classification of proteins: new superfamilies. *Curr Opin Struct Biol.* 6(3): 386-94

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

Odunlami B O (2009). The role of sugars and sugar metabolism genes (sucrose synthase) in arabidopsis thaliana seed development. Thesis, Northumbria University.

Ohta K, Moriguchi R, Kanahama K, Yamaki S, Kanayama Y (2005). Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant. *Phytochem.* 66: 2822–2828.

Oura Y, Yamada K, Shiratake K y Yamaki S (2000). Purification and characterization of a NAD⁺ dependent sorbitol dehydrogenase from Japanese pear fruit. *Phytochemistry* 54:567–572.

Park S W, Song K J, Kim M Y, Hwang J-H, Shin Y U, Kim W-C y Chung W-I (2002). Molecular cloning and characterization of four cDNAs encoding the isoforms of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from the Fuji apple. *Plant Sci.* 162: 513–519.

Pauly T A, Ekstrom J L, Beebe D A, Chrnyk B, Cunningham D, Griffor M, Kamath A, Lee S E, Madura R, Mcguire D, Subashi T, Wasilko D, Watts P, Mylari B L, Oates P J, Adams P D y RathIV L (2003). X-Ray Crystallographic and Kinetic Studies of Human Sorbitol Dehydrogenase. *Structure*, Vol. 11, 1071–1085

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

Pommerrenig B, Papini-Terzi F S y Sauer N (2007). Differential Regulation of Sorbitol and Sucrose Loading into the Phloem of *Plantago major* in Response to Salt Stres. *Plant Physiol* 144:1029-1038

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

Rejskova A, Patkova L, Stodulkova E, Lipavska H (2007) The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions. *J Plant Physiol* 164: 174–184

Rudolph R, Gerschitz J, Jaenlcke R (1978). Effect of Zinc(II) on the Refolding and Reactivation of Liver Alcohol Dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 87: 601-606.

Salvucci M E, Wolfe G R y Hendrix D L (1998). Purification and properties of an unusual NADPH-dependent ketose reductase from the silver-leaf whitefly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28,357-363.

Sarthy A V, Schopp C, Idler K B (1994). Cloning and sequence determination of the gene encoding sorbitol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 140:121-126.

Shen B, Jensen R G, Bohnert H J (1997) Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol* 115: 527–532

Shine J, Dalgarno L (1975). Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature* 254 (5495): 34–8.

Shuman S (1994). Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 269: 32678-32684.

Smekens M J y Tienderen P H (2001) Genetic variation and plasticity of *Plantago coronopus* under saline conditions. *Acta Oecol* 22: 187–200.

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

Somerville C R, Somerville S C, Ogren W L (1981). Isolation of photosynthetically active protoplasts and chloroplasts from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci Lett* 21: 89-96

Speth E B, Imboden L, Hauck P y Yang-He S (2009). Subcellular Localization and Functional Analysis of the Arabidopsis GTPase RabE. *Plant Physiol.* 149:1824-1837.

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

Teo G, Suzuki Y, Uratsu S L, Lampinen B, Ormonde N, Hu W K, DeJong T M y Dandekar A M (2006). Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. *PNAS.* 103: 18842–18847.

Verachtert H y De Mot R (1990). Yeast: biotechnology and biocatalysis. Estados Unidos. Marcel Dekker, Inc. 486- 487.

Wang X L, Xu Y H, Peng C C, Fan R C, Gao X Q (2009). Ubiquitous distribution and different subcellular localization of sorbitol dehydrogenase in fruit and leaf of apple. *J Exp. Bot.* 60: 1025–1034.

Wienkoop S, Glinski M, Tanaka N, Tolstikov V, Fiehn O y Weckwerth W (2004). Linking protein fractionation with multidimensional monolithic reversed-phase peptide chromatography/mass spectrometry enhances protein identification from complex mixtures even in the presence of abundant proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18: 643–650.

Yamada K, Niwa N, Shiratake K y Yamaki S (2001). cDNA clonig of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from peach fruit and its expression during fruit development. *J Am Soc Hortic Sci.* 76: 581-587.

Zimmermann M H y Ziegler H (1975). List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, M. H. Zimmermann and J. A. Milburn, Eds. (Berlin: Springer Verlag), pp. 480–503.

ANEXO

Secuencias Dendrograma:

- 1) gi|397357|emb|CAA52670.1| L-iditol 2-dehydrogenase [Rattus norvegicus]
- 2) gi|82617550|ref|NP_001032397.1| sorbitol dehydrogenase [Bos taurus]
- 3) gi|1009706|gb|AAA79043.1| sorbitol dehydrogenase precursor [Mus musculus domesticus]
- 4) gi|194034819|ref|XP_001927487.1| PREDICTED: similar to sorbitol dehydrogenase [Sus scrofa]
- 5) gi|241678672|ref|XP_002412610.1| sorbitol dehydrogenase, putative [Ixodes scapularis]
- 6) gi|148237649|ref|NP_001086483.1| sorbitol dehydrogenase [Xenopus laevis]
- 7) gi|2352843|gb|AAB69288.1| sorbitol dehydrogenase [Callithrix sp.]
- 8) gi|77404286|ref|NP_058748.2| sorbitol dehydrogenase [Rattus norvegicus]
- 9) gi|58332224|ref|NP_001011264.1| sorbitol dehydrogenase [Xenopus (Silurana) tropicalis]
- 10) gi|156627571|ref|NP_003095.2| sorbitol dehydrogenase [Homo sapiens]
- 11) gi|74000494|ref|XP_544659.2| PREDICTED: similar to Sorbitol dehydrogenase (L-iditol 2-dehydrogenase) [Canis familiaris]
- 12) gi|109080936|ref|XP_001111041.1| PREDICTED: sorbitol dehydrogenase [Macaca mulatta]
- 13) gi|55725282|emb|CAH89506.1| hypothetical protein [Pongo abelii]
- 14) gi|17737897|ref|NP_524311.1| sorbitol dehydrogenase-2 [Drosophila melanogaster]
- 15) gi|157128397|ref|XP_001655101.1| alcohol dehydrogenase [Aedes aegypti]
- 16) gi|255539581|ref|XP_002510855.1| alcohol dehydrogenase, putative [Ricinus communis]
- 17) gi|110346882|dbj|BAE97776.1| sorbitol dehydrogenase [Cavia porcellus]
- 18) gi|15242240|ref|NP_200010.1| sorbitol dehydrogenase, putative / L-iditol 2-dehydrogenase, putative [Arabidopsis thaliana]
- 19) gi|224062245|ref|XP_002193475.1| PREDICTED: sorbitol dehydrogenase [Taeniopygia guttata]
- 20) gi|95103082|gb|ABF51482.1| sorbitol dehydrogenase [Bombyx mori]
- 21) gi|7416846|dbj|BAA94084.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase [Prunus persica]

- 22) gi|91077560|ref|XP_972368.1| PREDICTED: similar to AGAP003584-PA [Tribolium castaneum]
- 23) gi|13096215|pdb|1E3J|A Chain A, Ketose Reductase (Sorbitol Dehydrogenase) From Silverleaf Whitefly
- 24) gi|155029180|dbj|BAF75466.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase [Fragaria x ananassa]
- 25) gi|14700000|gb|AAK71492.1| sorbitol dehydrogenase [Prunus cerasus]
- 26) gi|121709060|ref|XP_001272294.1| xylitol dehydrogenase [Aspergillus clavatus NRRL 1]
- 27) gi|219536271|gb|ACL18054.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase [Prunus salicina var. cordata]
- 28) gi|78183416|dbj|BAE47038.1| sorbitol related enzyme [Solanum lycopersicum]
- 29) gi|37932831|gb|AAP69750.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase 2 [Malus x domestica]
- 30) gi|225469310|ref|XP_002269895.1| PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
- 31) gi|37936009|gb|AAP69753.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase 9 [Malus x domestica]
- 32) gi|74273318|gb|ABA01327.1| L-idonate dehydrogenase [Vitis vinifera]
- 33) gi|213514212|ref|NP_001134990.1| Sorbitol dehydrogenase [Salmo salar]
- 34) gi|119489353|ref|XP_001262887.1| xylitol dehydrogenase [Neosartorya fischeri NRRL 181]
- 35) gi|156145614|gb|ABU53620.1| sorbitol dehydrogenase [Pyrrhocoris apterus]
- 36) gi|115477633|ref|NP_001062412.1| Os08g0545200 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
- 37) gi|8096347|dbj|BAA95897.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase [Eriobotrya japonica]
- 38) gi|37932507|gb|AAP69749.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase 1 [Malus x domestica]
- 39) gi|77378040|gb|ABA70761.1| sorbitol dehydrogenase [Zea mays]
- 40) gi|238915530|gb|ACR78269.1| xylitol dehydrogenase [Talaromyces emersonii]
- 41) gi|212546123|ref|XP_002153215.1| xylitol dehydrogenase [Penicillium marneffeii ATCC 18224]
- 42) gi|28394778|gb|AAO42466.1|AF428150_1 xylitol dehydrogenase [Hypocrea jecorina]
- 43) gi|3264834|gb|AAC24597.1| xylitol dehydrogenase; XDH [Candida sp. HA167]
- 44) gi|242824318|ref|XP_002488234.1| xylitol dehydrogenase [Talaromyces stipitatus ATCC 10500]
- 45) gi|154303353|ref|XP_001552084.1| xylitol dehydrogenase [Botryotinia fuckeliana B05.10]

- 46) gi|189197557|ref|XP_001935116.1| sorbitol dehydrogenase 2 [Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP]
- 47) gi|238843622|gb|EEQ33284.1| xylitol dehydrogenase [Microsporum canis CBS 113480]
- 48) gi|238504852|ref|XP_002383655.1| xylitol dehydrogenase [Aspergillus flavus NRRL3357]
- 49) gi|237908315|gb|EEP82716.1| sorbitol dehydrogenase 2 [Uncinocarpus reesii 1704]
- 50) gi|238503636|ref|XP_002383050.1| L-arabinitol 4-dehydrogenase [Aspergillus flavus NRRL3357]
- 51) gi|238494758|ref|XP_002378615.1| alcohol dehydrogenase, putative [Aspergillus flavus NRRL3357]
- 52) gi|37953330|gb|AAP69755.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase 8 [Malus x domestica]
- 53) gi|37935727|gb|AAP69752.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase 3 [Malus x domestica]
- 54) gi|119494479|ref|XP_001264135.1| xylitol dehydrogenase XdhB, putative [Neosartorya fischeri NRRL 181]
- 55) gi|240281022|gb|EER44525.1| xylitol dehydrogenase [Ajellomyces capsulatus H143]
- 56) gi|37954285|gb|AAP69756.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase 7 [Malus x domestica]
- 57) gi|37954287|gb|AAP69757.1| NAD-dependent sorbitol dehydrogenase 6 [Malus x domestica]
- 58) gi|238915532|gb|ACR78270.1| arabitol dehydrogenase [Talaromyces emersonii]
- 59) gi|58270620|ref|XP_572466.1| L-arabinitol 4-dehydrogenase [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]
- 60) gi|58269138|ref|XP_571725.1| L-arabinitol 4-dehydrogenase [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]
- 61) gi|239592397|gb|EEQ74978.1| xylitol dehydrogenase [Ajellomyces dermatitidis SLH14081]
- 62) gi|15811375|gb|AAL08944.1|AF355628_1 L-arabinitol 4-dehydrogenase [Hypocrea jecorina]
- 63) gi|31087950|gb|AAP42830.1| alcohol dehydrogenase [Puccinia triticina]
- 64) gi|226292761|gb|EEH48181.1| sorbitol dehydrogenase [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]
- 65) gi|6323099|ref|NP_013171.1| Xylitol dehydrogenase, converts xylitol to D-xylulose in the endogenous xylose utilization pathway; Xyl2p [Saccharomyces cerevisiae]

- 66) gi|170055394|ref|XP_001863562.1| sorbitol dehydrogenase [Culex quinquefasciatus]
- 67) gi|76152215|gb|ABA39795.1| xylitol dehydrogenase [Candida tropicalis]
- 68) gi|229541638|ref|ZP_04430698.1| Alcohol dehydrogenase zinc-binding domain protein [Bacillus coagulans 36D1]
- 69) gi|213401515|ref|XP_002171530.1| sorbitol dehydrogenase [Schizosaccharomyces japonicus yFS275]
- 70) gi|251781082|ref|ZP_04824002.1| L-idoitol 2-dehydrogenase [Clostridium botulinum E1 str. 'BoNT E Beluga']