



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**Determinación de la localización subcelular de
Aldosa 6-Fosfato Reductasa 2 (AtA6PR2) e identificación de
mutantes *ata6pr2*- de *Arabidopsis thaliana***

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Por

Amanda Valentina Donoso Núñez

Director del Seminario de Título: Dr. Michael Handford

Co-directora: Dra. Claudia Stange

Mayo 2016

Santiago-Chile

UCH-FC
Biotecnología
D 687
C. 1



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Amanda Valentina Donoso Núñez

"Determinación de la localización subcelular de Aldosa 6-Fosfato Reductasa 2 (AtA6PR2) e identificación de mutantes *ata6pr2*- de *Arabidopsis thaliana*"

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Director Seminario de Título:

Dr. Michael Handford

Co-directora Seminario de Título:

Dra. Claudia Stange

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión:

Dra. Lorena Norambuena

Evaluador:

Dr. Ricardo Pertuzé



Santiago de Chile,

BIOGRAFÍA



Nací un 5 de Febrero de 1990 en Rancagua, pleno verano y mi madre fabricándome la ropita para mi nacimiento. Desde ese momento, creo yo, se marcó mi destino: siempre viviendo al límite!!!. Mi madre llega corriendo a la cesaria, la entran a pabellón y 20 min después había llegado a este mundo. El doctor me vio y dijo "aquí viene una bailarina". Yo creo que era una metáfora, porque a pesar de gustarme mucho el baile, creo que se refería que nacía en ese momento un alma muy inquieta. Desde ese momento se formó la unión más linda y estrecha que pueda existir con mi madre. Crecí viéndola como con mucho esfuerzo sacaba nuestra pequeña familia adelante. A los 6 añitos llegó el mejor regalo que una niña puede recibir... una hermanita!!! Era mi muñeca, mi entretenimiento y mi máximo tesoro. Nos encantaba vestarnos iguales y mi madre nos ayudaba en eso, siempre ella muy preocupada de nuestra protección, estuvo cada momento que la necesitamos. Éramos las únicas en el colegio que si nos faltaba algo o se nos quedaba algún material en casa, mi madre en 5 min esta allá dejándonoslo.

Desde pequeña siempre tuve muy claro lo que quería y sabía que para conseguirlo debía trabajar duro. Muy disciplinada, estudiosa y bastante introvertida. Siempre aprendiendo de lo más difícil. Esta convicción fue creciendo en mí como una bola de nieve y sin importar lo que los demás dijeran, cuando algo se me ponía en la cabeza, trabajaba hasta conseguirlo. Fue así que a pesar de tener muy pocos recursos y ser de región entré a la añorada Universidad de Chile, pero por supuesto no fue fácil. Mi meta era entrar a Ingeniería en Biotecnología Molecular, quería encontrar la cura para el sida!, sin saber que dentro de mí existía un amor oculto por las plantas. Pero justo ese año subieron los puntajes y no logré entrar directo a la carrera. A pesar de muchos obstáculos y convencida que era lo que quería, alcancé mi meta y logré cambiarme a Biotecnología. En ella la vida no fue nada fácil, pero como me encantan los desafíos salí adelante y saqué mi carrera con grandes logros en el transcurso de ella. Conocí en mí la pasión que sentía por la investigación, y dentro de ella, el amor y atracción por las plantas. Fue así que muy prematuramente comencé a trabajar en laboratorio y al término de mi carrera entré al Centro de Biología Molecular Vegetal a realizar mi tesis, la cual culmina con este escrito. En cada lugar que estuve traté de aprender lo que más podía y ha sido eso lo que ha permitido ir formando mi camino como persona y profesional, junto con el apoyo incondicional de mi familia.

Este escrito, mi tesis!! cierra una etapa llena de emociones en mi vida, no ha sido fácil, pero cada cosa que no ha funcionado, cada tropiezo, cada pena ha servido para crecer y llegar a ser todo lo que soy hoy y, además, es el punto de partida de muchas aventuras más...que me llenan de emoción.

*Dedicado a mi madre por su cariño
y apoyo incondicional...*

AGRADECIMIENTOS

En esta aventura he recibido apoyo de muchas personas, es por ello que quiero agradecer en primer lugar a mi Madre y hermana Jape, por estar siempre conmigo apoyándome en mis proyectos y levantándome cada vez que había un fracaso.

A mi tía Angélica que ha sido como una segunda mamá, preocupada siempre de nuestro bienestar como familia y apoyándome cada vez que lo necesité.

A mi pareja Claudio por el gran amor que me ha entregado durante todo el tiempo juntos y a toda su familia por su apoyo y hacerme parte de ellos.

A mi abuelita Mery y toda su hermosa familia, por acogernos, amarnos, estar siempre con nosotras y considerarnos como parte de su familia.

A todos y cada uno de mis tíos: Roberto y Verónica, Haydee y José, Isabel, Luis y Teresa, José y primos por su cariño y apoyo.

A María José, por su amistad incondicional, apoyo familiar y generosidad infinita.

A mi Abuelita Amanda y Tata Luis, que a pesar de no estar en esta tierra, tengo la seguridad que siempre han estado conmigo.

A mis compañeros de laboratorio Panchi, Tito, Sara, Bárbara, Kari y Simón por el apoyo en la realización de mis experimentos y al Dr. Michael Handford, por guiarme en la realización de mi Seminario de Título.

Y a cada una de las personas que han aportado un granito de arena en este proceso: Profesores, compañeros, Ange y Seba.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Polioles en plantas: características y funciones.....	5
1.2. Metabolismo del sorbitol.....	8
1.3. Aldosa-6-fosfato reductasa (A6PR) en no-Plantagináceae y no-Rosáceae.....	9
1.4. Primera aproximación a la caracterización de AtA6PR2 y estrategia desarrollada.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo general.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	15
3.1.1. Identificación de mutantes insercionales potenciales en la colección SALK.....	15
3.1.2. Propagación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
3.1.3. Propagación de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> para agroinfiltración.....	16
3.1.4. Cultivo de bacteria.....	16
3.1.4.1. <i>Escherichia coli</i>	16
3.1.4.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
3.1.5. Obtención de células quimiocompetentes.....	17
3.1.5.1. <i>Escherichia coli</i>	17
3.1.5.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
3.2. EXTRACCIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS A PARTIR DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	18
3.2.1. Extracción de DNA genómico a partir de <i>A. thaliana</i>	18
3.2.2. Extracción de RNA total a partir de flores de <i>A. thaliana</i>	19
3.2.3. Extracción de DNA plasmidial a partir de células quimiocompetentes transformadas.....	20
3.2.4. Extracción de RNA total a partir de hojas de <i>N. tabacum</i> agroinfiltradas.....	20
3.3. CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE ACIDOS NUCLEICOS EXTRAÍDOS.....	21

3.3.1. Cuantificación.....	21
3.3.2. Integridad y calidad de ácidos nucleicos extraídos.....	21
3.4. OBTENCIÓN DE cDNA A PARTIR DE RNA.....	22
3.4.1. Tratamiento DNasa.....	22
3.4.2. RT-PCR.....	23
3.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	24
3.5.1. Partidores utilizados.....	24
3.5.2. Fragmentos amplificados.....	25
3.5.3. Reacciones con DNA polimerasas.....	26
3.5.3.1. <i>Pfu</i> DNA polimerasa.....	26
3.5.3.2. Paq5000 DNA polimerasa.....	27
3.5.3.3. Taq DNA polimerasa.....	27
3.5.3.4. GoTaq Flexi DNA polimerasa.....	28
3.5.4. Programas termociclador.....	29
3.6. TRANSFORMACIÓN DE CELULAS QUIMIOCOMPETENTES.....	30
3.6.1. <i>E. coli</i>	30
3.6.2. <i>A. tumefaciens</i>	31
3.7. VECTORES UTILIZADOS.....	31
3.7.1. Vector de clonación pCR™8/GW/TOPO®.....	31
3.7.2. Vectores de expresión, binarios o de destinación.....	33
3.7.2.1. pMDC43 y pMDC85.....	33
3.7.2.2. pGWB5.....	34
3.7.2.3. pEarlyGate202.....	34
3.8. OBTENCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN QUE POSEAN AtA6PR2 FUSIONADO A UN TAG EN SU EXTREMO N- Y C-TERMINAL.....	35
3.8.1. Purificación de <i>Ata6pr2</i> a partir de gel de agarosa.....	35
3.8.2. Adición de dATP 3' sobresaliente a <i>AtA6PR2</i>	35
3.8.3. Ligación de <i>AtA6PR2</i> al vector de clonación pCR™8/GW/TOPO®.....	36
3.8.4. Recombinación de pCR™8-AtA6PR2 con vectores binarios.....	36
3.9. ANÁLISIS MOLECULARES DE LOS VECTORES GENERADOS.....	37
3.9.1. PCR.....	37
3.9.2. Digestión enzimática.....	38
3.9.2.1. Vector de clonación.....	38
3.9.2.2. Vector de expresión.....	38
3.9.3. Secuenciación.....	39
3.10. DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE AtA6PR2.....	39
3.10.1. Análisis <i>in silico</i>	39
3.10.1.1. Predicción de localización subcelular de AtA6PR2.....	39

3.10.2. Análisis <i>in vivo</i>	40
3.10.2.1. Marcadores de compartimentos subcelulares.....	40
3.10.2.2. Transformación transitoria de hojas de <i>N. tabacum</i>	41
3.10.2.3. Observación de fluorescencia de células transformadas por microscopía confocal.....	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. CLONACIÓN DEL cDNA DE <i>AtA6PR2</i> Y GENERACIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN QUE POSEAN <i>AtA6PR2</i> FUSIONADO A TAGs EN SU EXTREMO N- Y C-TERMINAL.....	43
4.1.1. Extracción de RNA total y obtención de cDNA a partir de flores de <i>A. thaliana</i> silvestre.....	43
4.1.2. Amplificación y clonación de <i>AtA6PR2cs</i> en pCR8.....	44
4.1.3. Amplificación y clonación de <i>AtA6PR2cs</i> y <i>AtA6PR2ss</i> en pCR8.....	46
4.1.4. Digestión enzimática de pCR8- <i>AtA6PR2cs</i> y pCR8- <i>AtA6PR2ss</i>	48
4.1.5. Secuenciación de pCR8- <i>AtA6PR2cs</i> y pCR8- <i>AtA6PR2ss</i>	50
4.1.6. Recombinación de pCR8- <i>AtA6PR2cs</i> y pCR8- <i>AtA6PR2ss</i> con vectores de expresión tipo pMDC.....	52
4.1.7. Digestión enzimática de minipreparaciones de células de <i>E. coli</i> transformadas con pMDC.....	53
4.1.8. Recombinación de vectores pCR8- <i>AtA6PR2cs</i> y pCR8- <i>AtA6PR2ss</i> con vectores de expresión pEarlyGate202 y pGWB5.....	56
4.1.8.1. Generación de vector de expresión pEarlyGate202- <i>AtA6PR2cs</i>	56
4.1.8.1.1. Recombinación de pCR8- <i>AtA6PR2cs</i> con pEarlyGate202.....	56
4.1.8.1.2. Verificación por PCR de pEarlyGate202- <i>AtA6PR2cs</i>	57
4.1.8.1.3. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con pEarlyGate202- <i>AtA6PR2cs</i> y su verificación mediante PCR de <i>AtA6PR2cs</i>	58
4.1.8.2. Generación de vector de expresión pGWB5- <i>AtA6PR2ss</i>	60
4.1.8.2.1. Recombinación de pCR8- <i>AtA6PR2ss</i> con pGWB5.....	60
4.1.8.2.2. Verificación por digestión enzimática de pGWB5- <i>AtA6PR2ss</i>	60
4.1.8.2.3. Verificación por PCR de pGWB5- <i>AtA6PR2ss</i>	62
4.1.8.2.4. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con pGWB5- <i>AtA6PR2ss</i> y su verificación mediante PCR de <i>AtA6PR2ss</i>	63
4.1.8.2.5. Transformación de células de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> quimiocompetentes con pGWB5 vacío.....	64
4.2. DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE <i>AtA6PR2</i> -GFP, MEDIANTE LA TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE HOJAS DE TABACO.....	65
4.2.1. Predicción de la localización subcelular de <i>AtA6PR2</i> por análisis <i>in silico</i> . 65	

4.2.2. Determinación de la funcionalidad transcripcional de pGWB5-AtA6PR2ss mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco.....	65
4.2.3. Determinación de la localización subcelular de AtA6PR2-GFP mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco.....	68
4.3. OBTENCIÓN DE MUTANTES INSERCIONALES HOMOCIGOTAS DE LA COLECCIÓN SALK DE <i>A. thaliana</i> PARA EL GEN QUE CODIFICA PARA AtA6PR2.....	71
4.3.1. Genotipificación de DNA genómico a partir de líneas insercionales de la colección SALK.....	71
5. DISCUSIÓN.....	77
5.1. Clonación del cDNA de <i>AtA6PR2</i> y generación de vectores de expresión que posean <i>AtA6PR2</i> fusionado a tags en su extremo N- y C-terminal.....	78
5.2. Determinación de la localización subcelular de AtA6PR2-GFP, mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco.....	80
5.3. Obtención de mutantes insercionales homocigotas de la colección SALK de <i>A. thaliana</i> para el gen que codifica para AtA6PR2.....	83
6. CONCLUSIONES.....	86
7. PROYECCIONES.....	87
8. REFERENCIAS.....	89
9. ANEXO.....	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Partidores utilizados en este seminario de título.....	24
Tabla II. Descripción de los fragmentos amplificados por PCR durante este seminario de título.....	25
Tabla III: Descripción de programas de termociclador utilizados en este seminario de título.....	29
Tabla IV: Resumen resultados digestión enzimática.....	50
Tabla V: Resultado de secuenciación de pCR8-AtA6PR2cs y pCR8-AtA6PR2ss.....	51
Tabla VI: Constructos pCR8-AtA6PR2cs y pCR8-AtA6PR2ss elegidos para la generación de vectores de destino.....	51
Tabla VII: Resultados de la genotipificación de la generación T3 de líneas <i>ata6pr2-1</i> , <i>ata6pr2-2</i> y <i>ata6pr2-3</i>	74
Tabla VIII: Resultados de la genotipificación de la generación T4 de líneas <i>ata6pr2-1</i> y <i>ata6pr2-3</i>	75
Tabla IX: Resultados de la genotipificación de la generación T5 de la línea <i>ata6pr2-3</i>	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.: Estructura química de algunos alcoholes de azúcares y sus correspondientes azúcares.....	7
Figura 1.2.: Principales vías de síntesis y degradación del poliol acíclico, sorbitol....	9
Figura 3.1.: Vector pCR TM 8/GW/TOPO®.....	32
Figura 4.1.: Obtención y verificación de la calidad del cDNA de flores de <i>A. thaliana</i>	44
Figura 4.2.: Amplificación de <i>AtA6PR2cs</i> a partir de cDNA de flores de <i>A. thaliana</i>	45
Figura 4.3.: Amplificación de <i>AtA6PR2cs</i> a partir de minipreparaciones de colonias de <i>E. coli</i> transformadas con pCR8-AtA6PR2.....	46
Figura 4.4.: Amplificación de <i>AtA6PR2cs</i> y <i>AtA6PR2ss</i> a partir de pCR8-AtA6PR2.....	47
Figura 4.5.: Amplificación de <i>AtA6PR2cs</i> y <i>AtA6PR2ss</i> de 10 colonias transformadas con pCR8-AtA6PR2cs y 10 colonias transformadas con pCR8-AtA6PR2ss.....	48
Figura 4.6.: Digestión enzimática con <i>NcoI</i> y <i>XbaI</i> de pCR8-AtA6PR2cs y pCR8-AtA6PR2ss.....	49
Figura 4.7.: Representación esquemática del T-DNA de pMDC43 y pMDC85.....	52
Figura 4.8.: Recombinación de pCR8 con pMDC.....	52
Figura 4.9.: Digestiones enzimáticas de pMDC43-AtA6PR2cs.....	54
Figura 4.10.: Digestiones enzimáticas de pMDC85-AtA6PR2ss.....	55
Figura 4.11.: Representación esquemática de T-DNA de pEarlyGate202 y pGWB5.....	56
Figura 4.12.: Recombinación de pCR8-AtA6PR2cs con pEarlyGate202.....	57
Figura 4.13.: Representación de los vectores pEarlyGate202-AtA6PR2cs esperados producto de la recombinación entre pCR8-AtA6PR2cs (F y R) y pEarlyGate202.....	57
Figura 4.14.: Amplificación de <i>AtA6PR2cs</i> de colonias transformadas con pEarlyGate202-AtA6PR2cs.....	58
Figura 4.15.: PCR de <i>AtA6PR2cs</i> de colonias de <i>A. tumefaciens</i> transformadas con pEarlyGate202-AtA6PR2cs.....	59
Figura 4.16.: Recombinación de pCR8-AtA6PR2ss con pGWB5.....	60
Figura 4.17.: Digestiones enzimáticas de pGWB5-AtA6PR2ss.....	61
Figura 4.18.: Amplificación de <i>AtA6PR2ss</i> desde pGWB5-AtA6PR2ss.....	62
Figura 4.19.: Amplificación de <i>35S-AtA6PR2-GFP</i> desde pGWB5-AtA6PR2ss.....	63
Figura 4.20.: PCR de <i>AtA6PR2ss</i> de colonias de <i>A. tumefaciens</i> transformadas con pGWB5-AtA6PR2ss.....	64

Figura 4.21.: Predicción de la localización subcelular de AtA6PR2 utilizando programa PSORT II.....	65
Figura 4.22.: Representación esquemática de los vectores utilizados para determinar la localización subcelular de AtA6PR2-GFP.....	66
Figura 4.23.: Obtención y verificación de la calidad de RNA total y cDNA a partir de hojas de tabaco transformadas transitoriamente.....	67
Figura 4.24.: Determinación de la funcionalidad transcripcional de los vectores generados para estudiar la localización subcelular de AtA6PR2-GFP.....	68
Figura 4.25.: Imágenes obtenidas por microscopía confocal de hojas de tabaco transformadas transitoriamente.....	70
Figura 4.26.: Genotipificación de líneas insercionales de <i>AtA6PR2</i> de la colección SALK.....	72
Figura 4.27.: Resultados teóricos de la genotipificación de líneas insercionales de <i>AtA6PR2</i> de la colección SALK.....	73
Figura 4.28.: Comparación fenotípica entre plantas silvestres y plantas homocigotas obtenidas para las líneas mutantes <i>ata6pr2-1.12</i> y <i>ata6pr2-3.3.2</i>	76
Figura 9.1.: Expresión relativa de <i>AtA6PR2</i> (At2g21260) en los distintos tejidos de <i>A. thaliana</i> tipo silvestre.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

% p/v:	porcentaje peso/volumen.
% v/v:	porcentaje volumen/volumen.
°C:	grados Celsius.
3'UTR:	región 3' no traducida.
5'UTR:	región 5' no traducida.
A6PR:	aldosa-6-fosfato reductasa.
AtA6PR2:	aldosa-6-fosfato reductasa 2 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
<i>ata6pr1-</i> :	<i>Arabidopsis</i> mutantes en el gen de la aldosa-6-fosfato reductasa 1.
<i>ata6pr2-</i> :	<i>Arabidopsis</i> mutantes en el gen de la aldosa-6-fosfato reductasa 2.
ATP:	adenosín trifosfato.
cDNA:	ácido desoxirribonucleico complementario
Col-0:	Columbia-0.
CTAB:	Bromuro de cetil-trimetil-amonio.
DEPC:	Dietil Pirocarbonato.
DMSO:	dimetilsulfóxido.
DNA:	ácido desoxirribonucleico.
DNAg:	ácido desoxirribonucleico genómico.
DTT:	ditiotreitól.
EDTA:	ácido etilendiaminotetra acético.
kb:	kilo bases (1000 pb).
LB:	Medio Luria-Bertani.
M:	molar.
mM:	mili molar.
MOPS:	ácido 3-(N-Morpholino)propanesulfónico.
MS:	medio de Murashige y Skoog.
nm:	nanometros.
OD ₆₀₀ :	densidad óptica medida a 600 nm.
pb:	pares de bases.
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa.
RNA:	ácido ribonucleico.
RNA _m :	ácido ribonucleico mensajero.
RT:	reacción de la transcriptasa reversa.
S6P:	sorbitol-6-fosfato.
SDS:	dodecil sulfato de sodio.
Tris:	tris (hidroximetil) aminometano.
T-ADN:	ácido desoxirribonucleico de transfer

RESUMEN

Los polioles o alcoholes de azúcares, como manitol, sorbitol y galactitol, se encuentran ampliamente distribuidos en angiospermas, son transportados por el floema de las plantas y constituyen en algunas familias de plantas la principal forma de carbono translocado. Diversos estudios han determinado que los polioles, como principal producto fotosintético, permiten un uso más eficiente del carbono, proveen mayor tolerancia al estrés hídrico o salino, protegen contra radicales hidroxilo, facilitan la movilización de boro y actúan como osmorreguladores endógenos y sumideros de poder reductor. El sorbitol el cual se presenta mayoritariamente en especies de las familias *Plantaginaceae* y *Rosaceae*, se sintetiza en las hojas como producto primario de la fotosíntesis, a partir de glucosa-6-fosfato por la acción la aldosa-6-fosfato reductasa (A6PR), la cual es clave en la vía de biosíntesis. Enzimas similares a A6PR se han encontrado en especies no-*Plantagineaceae* y no-*Rosaceae* que acumulan sacarosa, cuya expresión se asocia principalmente a tolerancia a estrés osmótico. Una de estas especies es *Arabidopsis thaliana*, en la cual se encuentran dos marcos de lectura abiertos (*At2g21250* y *At2g21260*) que codifican para potenciales A6PR con identidad aminoacídica mayor al 65% con A6PR de otras especies vegetales, siendo denominadas AtA6PR1 y AtA6PR2 respectivamente. En estudios anteriores se había caracterizado parcialmente AtA6PR1, y por RT-qPCR se había observado que los niveles de transcrito de *AtA6PR2* son entre 10-10.000 veces menor que los de *AtA6PR1*.

En este Seminario de Título, el cual tuvo como objetivo general determinar la localización subcelular de AtA6PR2 y obtener mutantes homocigotos *ata6pr2*-de

Arabidopsis thaliana, se construyeron dos vectores de expresión que contienen el cDNA que codifica para *AtA6PR2*, pEarlyGate202-*AtA6PR2cs* que posee tag FLAG fusionado al extremo N-terminal de *AtA6PR2* y pGWB5-*AtA6PR2ss* que posee tag GFP fusionado al extremo C-terminal de *AtA6PR2*. La localización subcelular de *AtA6PR2* se determinó sólo utilizando el vector pGWB5-*AtA6PR2ss* y el vector pEarlyGate202-*AtA6PR2cs* fue generado para ser utilizado en el futuro como herramienta para corroborar la localización subcelular obtenida en este trabajo, realizando ensayos de inmunohistoquímica que permitirían avanzar en la caracterización de esta proteína. Por otro lado, pGWB5-*AtA6PR2ss* permitió determinar la localización subcelular, mediante microscopia confocal, de *AtA6PR2* en hojas de *Nicotiana tabacum* (tabaco) transformadas transitoriamente con este vector, mostrando que se localizaba tanto en el citosol como en el núcleo. Paralelamente, se identificó y genotipificó mutantes insercionales de la colección SALK para el gen que codifica para *AtA6PR2* (*ata6pr2-*), obteniendo mutantes homocigotas para 2 de las 3 líneas mutantes, las cuales serán utilizadas en estudios posteriores, para determinar el rol fisiológico de *AtA6PR2* en *A. thaliana*.

ABSTRACT

Polyols or sugar alcohols such as mannitol, sorbitol and galactitol, are widely distributed in angiosperms, are transported through the phloem of plants and in some families are the main form of translocated carbon. Several studies have found that polyols as the main photosynthetic product, allow more efficient use of carbon, provide greater tolerance to water or salt stress, protect against hydroxyl radicals, facilitate boron mobilization and act as endogenous osmoregulators and sinks of reducing power. Sorbitol, which occurs mainly in species of the *Rosaceae* and *Plantaginaceae* families, is synthesized in the leaves as a primary product of photosynthesis from glucose 6-phosphate by the action of aldose reductase-6-phosphate (A6PR) which is key in the biosynthetic pathway. A6PR-like enzymes are found in non-*Plantagineaceae* and non-*Rosaceae* species that accumulate sucrose, whose expression is mainly associated with osmotic stress tolerance. One of these species is *Arabidopsis thaliana*, which has two open reading frames (At2g21250 and At2g21260) encoding for potential A6PR with more than 65% amino acid identity with A6PRs of other plant species, called AtA6PR1 and AtA6PR2 respectively. Previous studies have characterized AtA6PR1 partially and by RT-qPCR have observed that transcript levels of *AtA6PR2* are between 10-10.000 times lower than those of *AtA6PR1*.

In this thesis, which it had as its general objective to determine the subcellular localization of AtA6PR2 and obtain homozygous *ata6pr2*- mutants of *Arabidopsis thaliana*, two expression vectors containing the cDNA encoding for AtA6PR2 were generated, pEarlyGate202-AtA6PR2cs with a FLAG tag fused to the N-terminal of

AtA6PR2 and pGWB5-AtA6PR2ss with a GFP tag fused to the C-terminal of AtA6PR2. The subcellular localization of AtAPR2 was determined only using the vector pGWB5-AtA6PR2ss, and vector pEarlyGate202-AtA6PR2cs was generated to be used in the future as a tool to confirm the subcellular localization of AtA6PR2 obtained in this work, performing immunohistochemical assays to advance the characterization of this protein. On the other hand, pGWB5-AtA6PR2ss was used to determine the subcellular localization, by confocal microscopy, of AtA6PR2 in leaves of *Nicotiana tabacum* (tobacco) transiently transformed with this vector, showing that it localized to in the cytosol and nucleus. In parallel, we identified and genotyped insertional mutant of the SALK collection for the gene coding for AtA6PR2 (*ata6pr2-*), obtaining homozygous mutants for 2 of the 3 lines, which will be used in future studies to determine the physiological role of AtA6PR2 in *A. thaliana*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Polioles en plantas: características y funciones

Los polioles o alcoholes de azúcares como manitol, sorbitol y galactitol, son polioles acíclicos, los cuales desempeñan un papel clave en el metabolismo de algunas plantas superiores. Su nombre se debe a la semejanza que poseen a los azúcares de los cuales derivan tanto en composición química (**Figura 1.1.**), como en características físicas y biológicas (Loescher, 1987). Estas moléculas se encuentran ampliamente distribuidas en distintos tipos de organismos, tales como hongos, algas, líquenes y en plantas, principalmente angiospermas, correspondiendo en algunos casos, a la única fuente importante de carbohidratos en ellos (Bielecki, 1982; Lewis, 1984).

Los polioles, además de ser una fuente de carbono y en algunas familias, la principal forma de carbono translocado a través del floema, se les ha atribuido otras funciones de gran importancia para las plantas, sobre todo para las que sintetizan estos compuestos como principal producto de la fotosíntesis. Dentro de estas funciones se encuentran:

a) Ser un reservorio de poder reductor. Esto se debe a que en su oxidación se producen más moléculas de NADH, lo que tiene como consecuencia una mayor producción de ATP en comparación a la sacarosa (Stoop y cols., 1996).

b) Actuar como solutos compatibles. Lo cual implica que se pueden acumular en altas concentraciones dentro de la célula, sin causar daños a nivel celular ni interferir en los procesos metabólicos (Stoop y cols., 1996).

c) Conferir tolerancia a estrés abióticos, principalmente a bajas temperaturas, sequía y estrés salino. Por ejemplo, se ha sugerido que los polioles funcionan como osmoprotectores, debido a que sus grupos hidroxilos les permiten formar una esfera artificial de hidratación alrededor de macromoléculas, previniendo inactivación metabólica en condiciones de bajo potencial osmótico (Galinski y Truper, 1994).

d) Conferir resistencia a estrés biótico. Se ha sugerido que el aumento de la actividad de enzimas claves de la biosíntesis de ciertos polioles, aumentaría la capacidad de síntesis de estas moléculas, proporcionando una fuente adicional de carbono y energía para la respuesta de defensa de la planta al ataque de patógenos (Williamson y cols, 1995). Además, polioles como manitol y sorbitol son considerados como potenciales inhibidores de las especies reactivas de oxígeno, producidas en respuesta a estrés biótico, lo cual permitiría el aumento de la tolerancia a este tipo de estrés por acumulación de estas moléculas (Shen y cols., 1997; Smirnov y Cumbes, 1989).

e) Permitir la translocación de micronutrientes, como el boro (B). El B se ha descrito como un micronutriente inmóvil en la mayoría de las especies vegetales, por lo que no puede desplazarse de un órgano a otro según las necesidades de la planta, por lo cual debe estar siempre presente en el suelo o en el medio de cultivo. Sin embargo, en plantas capaces de translocar polioles, se han identificado en el floema compuestos con interacciones del tipo poliol-borato-poliol, permitiendo la redistribución del B en la planta (Brown y Hu, 1996).

Lewis (1984) describió 17 alcoholes de azúcares que se producen naturalmente en plantas vasculares, 13 de los cuales se encuentran en angiospermas y de estos últimos tres se encuentran ampliamente distribuidos: familias *Apiaceae*, *Oleaceae* y *Rubiaceae*, (manitol), familia *Celastraceae*, (galactitol) y familias *Rosaceae* y *Plantaginaceae* (sorbitol) (Pommrenig y cols., 2007; Reidel y cols., 2009). El sorbitol ha sido uno de los más estudiados a nivel de metabolismo, debido a que se encuentra en especies de interés agronómico tales como manzano (*Malus pumilla*), ciruela (*Prunus salicina*), pera (*Pyrus communis*), durazno (*Prunus persica*), frutilla (*Fragaria x ananasa*), entre otras.

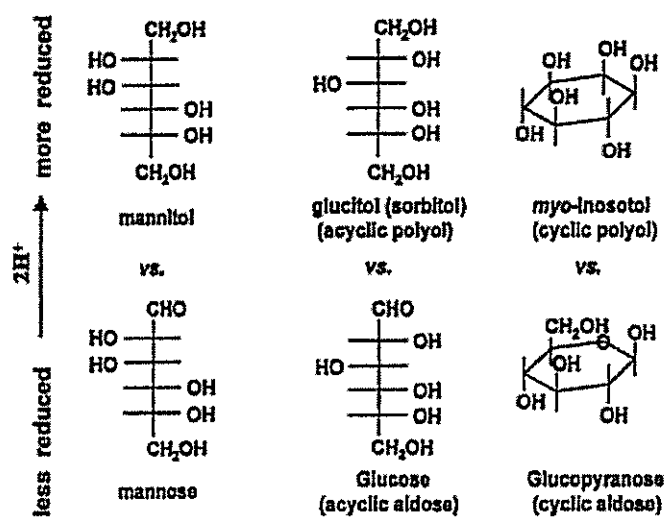


Figura 1.1.: Estructura química de algunos alcoholes de azúcares y sus correspondientes azúcares. Los alcoholes de azúcares, (manitol, sorbitol, mio-inositol) son químicamente más reducidos que sus respectivos azúcares análogos (manosa, glucosa, glucopiranososa) (Modificado de Williamson y cols, 2002).

1.2. Metabolismo del sorbitol

Lewis (1984) había sugerido que la síntesis de alcoholes de azúcares era citoplasmática. Esta hipótesis estaba en línea con los resultados de los experimentos de

fraccionamiento subcelular realizadas para el estudio de enzimas involucradas en la síntesis de manitol en *Apium graveolens* (apio) (Rumpho y cols, 1983). Sin embargo, algunos estudios han informado que la síntesis de los polioles como sorbitol ocurriría en el cloroplasto (Yamaki, 1981) y recientemente, un estudio en hojas de manzana ha reportado que este proceso podría ocurrir en ambos compartimentos subcelulares (Liang y cols, 2012), por lo que la localización de las proteínas claves en la biosíntesis del sorbitol, aun no ha sido totalmente determinada. Sin embargo, las proteínas involucradas en el metabolismo del sorbitol han sido descritas y se cuenta, hoy en día, con un modelo de cómo esto ocurriría en plantas superiores.

En plantas de las familias *Rosaceae* y *Plantaginaceae*, el sorbitol se sintetiza en hojas maduras (órgano fuente) como producto primario de la fotosíntesis a partir de glucosa-6-fosfato (**Figura 1.2.**). Mediante la acción de la aldosa-6-fosfato reductasa (A6PR), enzima clave en la síntesis de sorbitol, la glucosa-6-fosfato es reducida a sorbitol-6-fosfato utilizando como cofactor NADPH. Luego el sorbitol-6-fosfato es desfosforilado a sorbitol, mediante la acción de sorbitol fosfatasa (S6PP). El sorbitol se acumula en células acompañantes del floema, gracias a transportadores de polioles presentes en ellas (Watari y cols, 2004) y es transportado a través de éste, para posteriormente ser descargado en órganos sumideros (raíces, hojas inmaduras y frutos), en los cuales se acumula en la vacuola de las células del parénquima, pudiendo ser oxidado a fructosa por la acción de la sorbitol deshidrogenasa (SDH), para su posterior metabolismo (Ohkawa y cols, 2008).

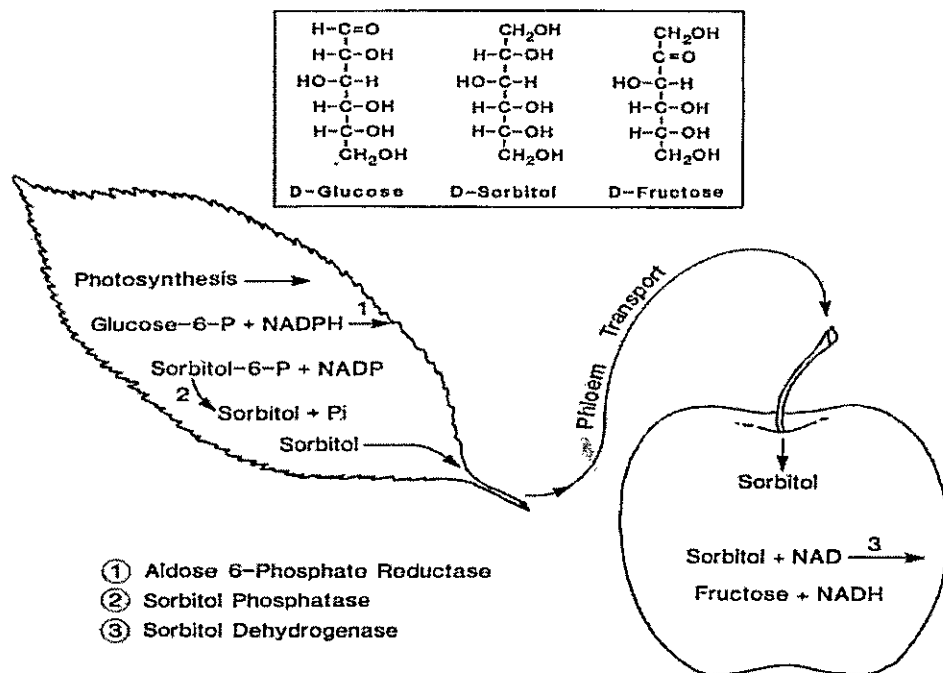


Figura 1.2.: Principales vías de síntesis y degradación del poliol acíclico, sorbitol. Las enzimas aldosa 6-fosfato reductasa (A6PR) y sorbitol fosfatasa (S6P) (①②) participan en la biosíntesis del sorbitol en órganos fuente, siendo A6PR clave en este proceso y la enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH) es responsable (③) de la oxidación del sorbitol en órganos sumidero. (Modificado de Loescher, 1987).

1.3. Aldosa-6-fosfato reductasa (A6PR) en no-Plantagináceae y no-Rosáceae

Se han identificado proteínas similares a las enzimas de la vía de síntesis del sorbitol en plantas no-Rosaceae y no-Plantaginaceae, las cuales acumulan sacarosa. Ejemplo de ello es la actividad SDH encontrada en semillas de soya, endosperma de maíz y frutos de tomate (Matsumoto, 2008; Ohta y cols., 2005). El aumento de la actividad de estas enzimas en plantas no-Rosaceae o no-Plantaginaceae se asocia principalmente a la tolerancia a estrés abiótico, participando en relaciones osmóticas de diversos organismos bajo condiciones adversas (Ahmad y cols., 1979). *Arabidopsis thaliana* pertenece a la familia Brassicaceae, transloca sacarosa, posee tolerancia a bajas temperaturas y corresponde al organismo más utilizado como modelo de estudio en

plantas. Se ha observado en ella un incremento de sorbitol en plantas expuestas a estrés por frío (Kaplan y cols., 2004), el cual altera la fluidez de las membranas, interrumpiendo la respiración aeróbica (Christie y cols., 1991). Con respecto a las enzimas de la vía de síntesis del sorbitol presentes en *Arabidopsis thaliana*, se ha encontrado un locus putativo que codifica para SDH (AtSDH, At5g51970, Mandujano, 2010), el cual tiene sobre el 75% de identidad con SDHs caracterizadas y posee los dominios característicos de la familia de las alcoholes deshidrogenasas. Además, se demostró:(1) la localización citoplasmática de la proteína AtSDH por microscopía de epifluorescencia y fraccionamiento subcelular (Mandujano, 2010), (2) expresión a través de todo el organismo por medio de la fusión de su promotor al gen reportero GUS (Parada, 2011), qRT-PCR y Western-blot (utilizando un suero policlonal α -AtSDH) y(3) que el sustrato preferente de la enzima es sorbitol (100% de actividad específica), seguido por ribitol (98%), xilitol (80%), arabitol (59%), con NAD^+ como co-sustrato, por medio de la producción de una proteína de fusión *in vitro*, His-AtSDH(Aguayo y cols., 2013). Por otro lado, análisis *in silico* ha determinado que en el genoma de *A. thaliana* existen dos marcos de lectura abiertos (ORF), At2g21250 y At2g21260, que presentan un alto nivel de homología con A6PR de diversas *Rosaceae* (entre un 65 y 82% de identidad aminoacídica), constituyendo fuertes candidatos a A6PR propios de este organismo, por lo que se denominaron AtA6PR1 y AtA6PR2, respectivamente (Zamudio, 2010). En estudios anteriores, se caracterizó parcialmente AtA6PR1, determinando que posee localización subcelular citosólica y actividad enzimática capaz de reducir NADP^+ en presencia de sorbitol 6-P, con aproximadamente la mitad de la actividad específica determinada para MdA6PR de manzana. Además, se expuso a estrés

salino mutantes insercionales para el gen que codifica AtA6PR1, observándose un efecto metabólico (Zamudio, 2010; Zamudio, 2014). Sin embargo, de AtA6PR2, que comparte 92% de identidad aminoacídica con AtA6PR1, no se tienen mayores antecedentes, salvo que es un gen que se expresa en distintos tejidos de *A. thaliana* (Figura 9.1., ANEXO) (Francisca Díaz y Michael Handford, datos no publicados), dentro de los cuales se observa mayor expresión relativa en silicuas y flores.

1.4. Primera aproximación a la caracterización de AtA6PR2 y estrategia desarrollada

Para determinar si la proteína AtA6PR2 efectivamente corresponde a una aldosa-6-fosfato reductasa en *A. thaliana*, se hace fundamental, como primera aproximación a su caracterización, analizar su localización subcelular. Consecuentemente, se hace necesario generar una herramienta para ser utilizada en futuros estudios para determinar el rol fisiológico de AtA6PR2, es decir, obtener mutantes homocigotos *ata6pr2-* de *A. thaliana*, las cuales en el futuro, podrían ser comparadas con plantas silvestres y líneas *ata6pr1-*.

Para llevar a cabo el primero de estos dos objetivos principales, se clonará el gen que codifica para AtA6PR2 en vectores de clonación y posteriormente se transferirá éste a vectores de expresión binarios que posean tecnología Gateway®, en los cuales se pueda fusionar en el extremo N- o C-terminal de *AtA6PR*, tags que permitan determinar la localización subcelular de AtA6PR2 en tejido vegetal, ya sea por microscopía confocal (ejemplo: tag GFP) o Western blot (ejemplo: tag FLAG).

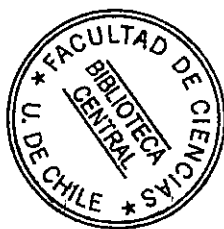
La síntesis de todas las proteínas comienza en el citoplasma, con excepción de las que son sintetizadas en ribosomas mitocondriales y plastidiales. Su destino final depende de secuencias de aminoácidos llamadas señales de destinación. Las señales de destinación de las proteínas residen en una región continua de la secuencia de aminoácidos de 15-60 residuos de longitud característica. La mayoría de estas señales de destinación se encuentran en el extremo N-terminal (secuencias de destinación a núcleo, membrana plasmática, mitocondrias, plastidios y proteínas secretadas por aparato de Golgi), aunque algunas se encuentran en el extremo C-terminal (secuencias de destinación a retículo endoplásmico y peroxisomas) (Alberts y cols., 2010).

Por lo tanto, para determinar con mayor confianza la localización subcelular de cualquier proteína, incluyendo AtA6PR2, mediante la fusión con tags, se debe considerar que las señales de destinación se pueden encontrar tanto en el extremo N- como C-terminal de las proteínas, por lo que se hace favorable fusionar a tags en ambos extremos de la proteína, de manera independiente.

El uso de la proteína fluorescente verde (GFP) en este tipo de ensayos posee grandes ventajas, tales como, ser una proteína estable durante meses, se puede visualizar fácilmente a través microscopía de fluorescencia estándar o confocal (Lippincott-Schwartz y Patterson, 2003), está fácilmente disponible en vectores de expresión, tales como los que poseen sistema de clonación Gateway® y puede ser detectado en células vivas. Sin embargo, la fusión de tags de gran tamaño, como GFP (238 aminoácidos), en el extremo cercano a señales de destinación de una proteína, podría provocar el enmascaramiento de esta señal, además de provocar un mal plegamiento de la proteína

estudiada (Hanson y Köhler, 2001). Las proteínas emergen de los ribosomas en el citoplasma desde su extremo N-terminal y chaperonas impiden el plegamiento de éstas hasta que todo un dominio (50-300 aminoácidos) hayan surgido (Hartl y Hayer-Hartl, 2002). Si GFP se encuentra fusionado al extremo N-terminal de la proteína analizada, saldrá primero de los ribosomas, lo cual podría afectar el correcto plegamiento de la proteína contigua, independientemente si la señal está en N- o C-terminal (Palmer & Freeman, 2004). Debido a esto, se sugiere fuertemente, que los tags fusionados al extremo N-terminal de proteínas sean pequeños péptidos (3-14 aminoácidos), tales como tag His (6 aminoácidos), FLAG (8 aminoácidos), c-myc (10 aminoácidos) entre otros. Según lo descrito anteriormente, se elegirán vectores de expresión que fusionen tag de forma confiable y comparable para determinar la localización subcelular de *AtA6PR2*.

Para llevar a cabo el segundo de los objetivos de este trabajo, se buscará en la colección SALK (Alonso y cols., 2003) pertenecientes al Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto SALK (SIGnAL), líneas insercionales de *AtA6PR2*. Se pedirán las semillas disponibles y se realizará una genotipificación de éstas para corroborar la homocigosis de la inserción del T-DNA en el gen *AtA6PR2*.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar la localización subcelular de AtA6PR2 y obtener mutantes homocigotos *ata6pr2*-de *Arabidopsisthaliana*.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Clonar el cDNA de *AtA6PR2* y generar vectores de expresión que posean *AtA6PR2* fusionado a tags en su extremo N- y C-terminal.

2.2.2. Determinar la localización subcelular de AtA6PR-GFP, mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco.

2.2.3. Obtener mutantes insercionales homocigotas de la colección SALK de *A.thaliana* para el gen que codifica para AtA6PR2.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Identificación de mutantes insercionales potenciales en la colección SALK

Se obtuvieron semillas provenientes de plantas de la colección SALK (Alonso y cols., 2003) pertenecientes al Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto SALK (SIGnAL). Esta colección está compuesta por plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 transformadas establemente con un T-DNA de ~4,5 kb, el cual se encuentra insertado en el genoma de esta especie. Si la inserción ocurre en la región codificante de genes, podría alterar su expresión y/o interrumpir sus funciones. Esta transformación está mediada por *Agrobacterium tumefaciens* que porta un vector pROK2, el cual a su vez contiene al T-DNA. Las semillas adquiridas son provenientes de inserciones del T-DNA en *ata6pr2*, gen para el cual hay tres líneas insercionales disponibles: SALK_001358 (*ata6pr2-1*), SALK_051379 (*ata6pr2-2*) y SALK_050803 (*ata6pr2-3*).

3.1.2. Propagación de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Se esterilizó semillas de *A. thaliana* silvestre o líneas insercionales en etanol 70% durante 1 min, se dejó secar bajo campana de flujo laminar y se sembró en placas petri estériles que contienen medio MS con vitaminas 1x [Murashige & Skoog basal medium w/vitamins, *PhytoTechnology Laboratories*®; Murashige y Skoog, 1962.], sacarosa 3% (p/v), myo-inositol 0,1% (p/v) y agar-agar 1.6% (p/v). Este medio fue llevado a pH 5,8 antes de incorporarle el agar-agar. Las placas fueron puestas horizontalmente en una cámara de crecimiento a 22°C con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad por dos semanas. Posteriormente, las plántulas fueron traspasadas a sistema AraHarvest

(SPL Life and Sciences), utilizando como medio de soporte pastillas *jiffy-7C* hidratadas (Jiffy International AS). Las plantas se dejaron crecer a 22°C y con fotoperiodo de 16 hora luz y 8 horas oscuridad, hasta aproximadamente 8 semanas de edad, cuando se realizaron la recolección de semillas.

3.1.3. Propagación de plantas de *Nicotiana tabacum* para agroinfiltración

Se sembró semillas de *Nicotiana tabacum* (tabaco) en lana de roca, regadas periódicamente con medio hidropónico descrito por Gibeaut (Gibeaut y cols., 1997). Las plantas crecieron a 22°C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, hasta una edad aproximada de 3 meses, utilizando sus hojas para agroinfiltración.

3.1.4. Cultivo de bacterias

3.1.4.1. *Escherichia coli*

Se utilizaron las cepas Mach1 y DB3.1, las cuales fueron sembradas en medio LB sólido estéril [NaCl 1% (p/v), Triptona 1% (p/v), Extracto de Levadura 0,5% (p/v), agar-agar 1,6% (p/v)] o inoculadas en medio LB líquido estéril [NaCl 1% (p/v), Triptona 1% (p/v), Extracto de Levadura 0,5% (p/v)]. Las placas con LB sólido se incubaron a 37°C por 24 horas y los cultivos en LB líquido se incubaron a 37°C con agitación a 220 rpm durante 24 horas. La selección de las colonias transformantes se realizó agregando antibiótico al medio de cultivo (espectinomicina o kanamicina 100 µg/mL, dependiendo del vector portado).

3.1.4.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizó la cepa GV3101, la cual se creció en medio LB sólido o líquido estéril suplementado con antibiótico rifampicina (12,5 µg/mL) para la selección cromosómica de la cepa y gentamicina (100 µg/mL) para la selección del plásmido Ti. Para la selección de las células transformadas con el vector de interés, además se adicionó espectinomicina o kanamicina (100 µg/mL), dependiendo del vector portado. Las placas con medio sólido y los cultivos líquidos se incubaron a 28°C por 48 horas (con agitación a 220 rpm en el caso de cultivos líquidos).

3.1.5. Obtención de células quimiocompetentes

3.1.5.1. *Escherichia coli*

Se dejó creciendo un pre-inóculo de 200 µL de *E. coli* en 5 mL de LB líquido estéril, durante 16 horas (sección 3.1.4.1.). Se inocularon 200 mL de LB líquido estéril con 1 mL del pre-inóculo y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,3. Se centrifugó a 3.000 g a 4°C durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente el sedimentado en 80 mL de *Buffer* CCMB80 estéril frío [10 mM KOAc pH 7,0, 80 mM CaCl₂·2H₂O, 20 mM MnCl₂·4H₂O, 10 mM MgCl₂·6H₂O, 10 % (v/v) glicerol, llevado a pH 6,4 con 0,1 N HCl]. Se incubó en hielo durante 20 minutos y se centrifugó a 3000 g a 4°C durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente el sedimentado en 10 mL de *Buffer* CCMB80 estéril frío. Se guardó a -80°C en alícuotas de 200 µL en tubos eppendorf de 1,5 mL.

3.1.5.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Se dejó creciendo un pre-inóculo de 40 μL de *A. tumefaciens* en 5 mL de LB líquido estéril, durante 16 horas (sección 3.1.4.2.). Se inocularon 100 mL de LB líquido estéril con 4 mL del pre-inóculo y se incubó a 28°C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 0,5 y 0,8. Se incubó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 3000 g a 4°C durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente el sedimentado en 1 mL de CaCl₂ estéril frío. Se guardó a -80°C en alícuotas de 100 μL en tubos eppendorf de 1,5 mL.

3.2. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS A PARTIR DE MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1. Extracción de DNA genómico a partir de *A. thaliana*

Para la genotipificación de líneas de *A. thaliana*, dos a tres hojas rosetas de 3,5 semanas de edad fueron congeladas en nitrógeno líquido, en tubos eppendorf de 1,5 mL y guardada a -80°C. Luego se molieron finamente con pistilo frío las hojas de las plantas *wild-type* y líneas insercionales *ata6pr2*-(sección 3.1.1.), manteniendo el tubo en N₂ líquido. Se adicionó al tubo 400 μL de *Buffer* de extracción Edward [200 mM Tris-HCl (pH 7,5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % (p/v) SDS]. Se agitó vigorosamente durante 5 segundos a temperatura ambiente y se centrifugó a 25.000 g durante 2 minutos. Se transfirió 300 μL del sobrenadante a un tubo eppendorf de 1,5 mL limpio. Se adicionó 300 μL de isopropanol frío y se incubó en hielo durante 2 minutos. Se centrifugó a 25.000 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el

sedimentado con etanol 70% (v/v). Se centrifugó a 25.000 g durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se secó el sedimentado a temperatura ambiente. Se resuspendió el sedimentado en 40 μ L Tris-HCl 10 mM pH 8 y se guardó a -20°C.

3.2.2. Extracción de RNA total a partir de flores de *A. thaliana*

Se obtuvieron flores a partir de plantas de *A. thaliana* silvestre de aproximadamente 4,5 semanas de edad. Flores (200 mg) fueron congeladas en nitrógeno líquido en tubos eppendorf de 2 mL y guardadas a -80°C. Luego se molió finamente el tejido colectado con nitrógeno líquido en mortero. Se agregó 750 μ L de *Buffer* de Extracción [0.2 M LiCl, 200 mM Tris -HCl pH 8, 20 mM EDTA y 2% (p/v) SDS] y 750 μ L de fenol pH 8 precalentados a 65°C y 2% (v/v) de β -mercaptoetanol. Se transfirió la mezcla a un tubo falcon de 15 mL y se agitó vigorosamente durante 1 minuto. Se incubó durante 15 minutos a 65°C, agitando periódicamente. Se agregaron 400 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se agitó vigorosamente. Se centrifugó a 12.000 g durante 20 minutos. Se extrajo 750 μ L de la fase acuosa y se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 mL. Se agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), y se agitó y centrifugó a 12.000 g durante 20 minutos. Se extrajo 600 μ L de la fase acuosa, se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 mL limpio y se agregó 0,25 volúmenes de 10 M LiCl. Se mezcló por inversión y se dejó precipitar a 4°C durante 16 horas. Se centrifugó a 12.000 g durante 35 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante cuidadosamente. Se resuspendió el sedimentado en 250 μ L H₂O tratada con DEPC. Se agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló. Se centrifugó a 14.000 g durante 10 minutos a 4°C, se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo

ependorf de 1,5 mL limpio. Se agregaron 2 volúmenes de isopropanol y se incubó a -20°C durante 20 minutos. Se centrifugó a 14.000 g durante 20 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimentado con 1 mL de etanol 75% (v/v). Se centrifugó a 14.000 g durante 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se secó el sedimentado a temperatura ambiente. Se resuspendió el RNA en 30 µL H₂O tratada con DEPC y se guardó a -80°C.

3.2.3. Extracción de DNA plasmidial a partir de células quimiocompetentes transformadas

Se realizó minipreparación a cultivo líquido de colonias transformantes de *E. coli* (sección 3.1.4.1.), utilizando el kit AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit de Axygen Bioscience, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.4. Extracción de RNA total a partir de hojas de *N. tabacum* agroinfiltradas

Luego de 4 días post-agroinfiltración de las hojas de *N. tabacum*, se masó 50 mg de tejido y se guardó en tubos ependorf de 1,5 mL a -80°C. Se utilizó el kit PowerPlant® RNA Isolation Kit de MoBio Laboratories Inc. para extraer RNA a partir del tejido colectado. Se molió finamente el tejido con pistilo frío, manteniendo el tubo en N₂ líquido. Se utilizó el kit siguiendo las recomendaciones del fabricante, cuidando de mantener las soluciones en hielo durante todo el proceso.

3.3. CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS EXTRAÍDOS

3.3.1. Cuantificación

Se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop®ND-1000 UV-Vis para cuantificar las extracciones de RNA y DNA. Se midieron las absorbancias a 230 nm, 260 nm y 280 nm y se determinó la pureza de las muestras según los índices obtenidos para A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . Una muestra se considera libre de contaminación por proteínas o fenoles, cuando la relación A_{260}/A_{280} es cercana a 1,8 (cuando es DNA) o cercana a 2 (cuando es RNA). Por otro lado, cuando la relación A_{260}/A_{230} está entre 1,8 y 2,2 indica que la muestra no tiene presencia de solventes orgánicos, sales y proteínas. Valores menores a los mencionados en ambos índices, indican contaminación en las muestras.

3.3.2. Integridad y calidad de ácidos nucleicos extraídos

La integridad del RNA se determinó mediante electroforesis. Para ello se preparó un gel de agarosa 1,5% (p/v) en 26,1 mL de agua tratada con DEPC, 3 mL de *Buffer* MOPS 10X [0,4 M MOPS, 0,1 M acetato de sodio, 10 mM EDTA, llevado a pH 7 con 10 M NaOH en agua tratada con DEPC] y 900 μ L de formaldehído 37% (v/v). Se mezcló 1 μ L de muestra con 1 μ L de *Buffer* de carga (2X RNA Loading Dye de Thermo Scientific™), se calentó a 70°C durante 10 minutos y luego se incubó en hielo durante 5 minutos. Se depositó el gel en una cámara electroforética con *Buffer* MOPS 1X, se cargó la muestra previamente incubada en él y se aplicó una diferencia de potencial de 70 V

durante 45 minutos. Las bandas se visualizaron en una cámara oscura equipada con un transiluminador UV y la imagen fue capturada con GeneGenius Classic (SynGene®).

La calidad del DNA y cDNA proveniente de plantas de *A. thaliana* se corroboró mediante PCR, amplificando el gen *Actina*. Para el caso de cDNA obtenido a partir de hojas de *N. tabacum* transformadas, la calidad se corroboró mediante la amplificación del gen *18S*. Ambos PCR se realizaron bajo las condiciones especificadas en la **sección 3.5**. Posteriormente, los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa 1,5% (p/v) preparado con *Buffer* TAE 1X [40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8], mezclando previamente 10 µL de muestra con 2 µL de *Buffer* de carga [6X DNA Loading Dye de Fermentas®]. El gel fue depositado en una cámara electroforética con *Buffer* TAE 1X y se aplicó una diferencia de potencial de 90 V durante 60 minutos. El gel se incubó durante 20 minutos en solución con Bromuro de etidio 1 µg/mL. Posteriormente, las bandas se visualizaron en una cámara oscura equipada con un transiluminador UV y la imagen fue capturada con GeneGenius Classic (SynGene®).

3.4. OBTENCIÓN DE cDNA A PARTIR DE RNA

3.4.1. Tratamiento DNasa

Para eliminar posibles fragmentos de DNA presentes en el extracto de RNA (**secciones 3.2.2. y 3.2.4.**), se realizó un tratamiento con DNasa. Para ello se mezcló 3 µg de RNA total, 1.5 U DNasa I de Thermo Scientific™, *Buffer* DNasaI 1X de Thermo Scientific™ y 10 U RiboLock RNase Inhibitor de Thermo Scientific™ en un volumen

total de 15 μ L. Se incubó la mezcla a 37°C durante 60 minutos, luego se mantuvo en hielo durante 5 minutos y se agregó 1 μ L 50 mM EDTA, para detener la reacción.

3.4.2. RT-PCR

Se realizó RT-PCR para sintetizar cDNA a partir de los extractos de RNA previamente tratados con DNasa utilizando ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega). Para ello, se mezcló 11 μ L de RNA tratado con DNasaI (**sección 3.4.1.**) con 0,1 mM oligoAp (**Tabla I**). Se incubó la mezcla a 70°C durante 5 minutos y luego se mantuvo en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se agregó a la mezcla 8 μ L de *Buffer* ImProm-II™ 5X, 2,5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP *mix* [10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP y 10 mM dTTP], 2 μ L Improm-II™ Reverse Transcriptase y se llevó a volumen final de 40 μ L con agua libre de nucleasas. La mezcla final se incubó en un termociclador utilizando el siguiente programa: 25°C durante 5 minutos para la hibridización del partidor, 42°C durante 60 minutos para la extensión de la primera hebra y 70°C durante 15 minutos para inactivar la enzima. Posteriormente la muestra se guardó a -20°C.

3.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

3.5.1. Partidores utilizados

Tabla I. Partidores utilizados en este seminario de título. Se muestra el nombre, la secuencia, la Tm y el largo de cada uno de los partidores utilizados.

Nombre	Secuencia	Tm	Largo
oligoAp	5'- CGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T-3'	61.5°C	37 nucleótidos
AtActin4_F	5'- CAC ACT TTC TAC AAT GAG CT-3'	50.1°C	20 nucleótidos
AtActin4_R	5'- GCA GTG ATC TCT TTG CTC AT-3'	52.7°C	20 nucleótidos
18SF	5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3'	60.6°C	21 nucleótidos
18SR	5'-ACA ATG ATC CTT CCG CAG GT-3'	60.4°C	20 nucleótidos
21260-F-cDNA	5'-ATG GAG ATT ACA CTG AAC AGT GG-3'	54.5°C	23 nucleótidos
21260-R-cDNA	5'-TCA AGC GTA GAG CTC AAT GC-3'	55.2°C	20 nucleótido
60Rsin	5'-AGC GTA GAG CTC AAT GCC-3'	55°C	16 nucleótidos
LBb1.3	5'- ATT TTG CCG ATT TCG GAA C-3'	55.8°C	19 nucleótidos
35S pCambia F(2)	5'-AAG ATA CAG TCT CAG AAG ACC-3'	51°C	21 nucleótidos
GFP-pGWB5 Rev	5'-ACT GGG TGC TCA GGT AGT GG-3'	59°C	20 nucleótidos

3.5.2. Fragmentos amplificados

Tabla II. Descripción de los fragmentos amplificados por PCR durante este seminario de título. Se indica los pares de partidores utilizados en cada reacción, donde hibrida cada uno de ellos, el templado utilizado, el nombre y tamaño esperado del fragmento amplificado.

Pares de partidores utilizados	Descripción	Templado	Fragmento amplificado	
			Nombre	Tamaño
AtActin4_F AtActin4_R	Hibridan con la región 5' y 3' del gen <i>Actina</i> , respectivamente	gDNA	Actina	849 pb 794 pb ^a
AtActin4_F AtActin4_R	Hibridan con la región 5' y 3' del cDNA de <i>Actina</i> , respectivamente	cDNA	Actina	700 pb
18SF 18SR	Hibridan con la región 5' y 3' del cDNA obtenido a partir del rRNA <i>18S</i> , respectivamente	cDNA	18S	200 pb
21260-F-cDNA 21260-R-cDNA	Hibridan con la región 5' y 3' del gen <i>AtA6PR2</i> , respectivamente	gDNA	AtA6PR2	1.615pb
21260-F-cDNA 21260-R-cDNA	Hibridan con la región 5' y 3' del cDNA de <i>AtA6PR2</i> , respectivamente	cDNA	AtA6PR2cs	930 pb
21260-F-cDNA 60Rsin	Hibridan con la región 5' y 3' sin codón de término del cDNA del gen <i>AtA6PR2</i> , respectivamente	cDNA	AtA6PR2ss	927 pb
21260-F-cDNA Lb1.3	Hibridan con la región 5' del gen <i>AtA6PR2</i> y a ~110 pb río arriba del left border (LB) del T-DNA presente en líneas insercionales de la colección SALK, respectivamente.	gDNA	Mut2-60 Mut3-60	1.846 pb 1.882pb ^b
21260-R-cDNA Lb1.3	Hibridan con la región 3' del gen <i>AtA6PR2</i> y a ~110 pb río arriba del left border (LB) del T-DNA presente en líneas insercionales de la colección SALK, respectivamente.	gDNA	Mut1-60	1.380pb
35S pCambia F(2) GFP-pGWB5 Rev	Hibridan con una región 5' interna del promotor 35S y con una región 3' interna del gen <i>GFP</i> , ambos presentes en el vector pGWB5. El tamaño del fragmento esperado se obtiene cuando el vector pGWB5 contiene el gen <i>AtA6PR2ss</i> .	Vector pGWB5	35S-GFP	2.149pb

<p>21260-F-cDNA GFP-pGWB5 Rev</p>	<p>Hibridan con la región 5' del gen <i>AtA6PR2</i> y con una región 3' interna del gen <i>GFP</i>, respectivamente. El tamaño del fragmento esperado se obtiene cuando el vector pGWB5 contiene el gen <i>AtA6PR2</i>ss en sentido con el promotor del vector.</p>	<p>Vector pGWB5-21260ss y/o cDNA</p>	<p>21260ssF-GFP</p>	<p>1.542 pb</p>
<p>60Rsin GFP-pGWB5 Rev</p>	<p>Hibridan con la región 3' sin codón de término del cDNA de <i>AtA6PR2</i> y con una región 3' interna del gen <i>GFP</i>, respectivamente. El tamaño del fragmento esperado se obtiene cuando el vector pGWB5 contiene el gen <i>AtA6PR2</i>ss en antisentido con el promotor del vector.</p>	<p>Vector pGWB5-21260ss y/o cDNA</p>	<p>21260ssR-GFP</p>	<p>1.542 pb</p>

^a Los dos fragmentos esperados corresponden a 2 isoformas de *Actina*: *Actina1* (794 pb) y *Actina 11* (849 pb)

^b Los dos fragmentos esperados corresponden al resultado de PCR Gen-LB para mutante *ata6pr2-2* (1846 pb) y mutante *ata6pr2-3* (1882 pb)

3.5.3. Reacciones con DNA polimerasas

3.5.3.1. *Pfu* DNA polimerasa

Pfu DNA polimerasa es una DNA polimerasa con actividad correctora (exonucleasa 5'→3'), aislada de *Pyrococcus furiosus*. Posee una alta fidelidad de síntesis de DNA por reacción de PCR, por lo que se utiliza en clonación. Posee una tasa de extensión de 1,5 minutos/kb.

Para llevar a cabo la reacción, se mezcló 1X *Buffer* de reacción con 20 mM MgSO₄ de Fermentas, 200 µM dNTP *mix* [10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP y 10 mM dTTP], 0,5 µM de cada partidor, 0,5 U de enzima *Pfu* DNA Polimerasa de Fermentas, ~100 ng de templado y agua de uso biología molecular hasta obtener un volumen final de 20 µL.

3.5.3.2. Paq5000 DNA polimerasa

Paq5000 DNA polimerasa es capaz de amplificar fragmentos de DNA de hasta 6 kb, de forma rápida y robusta. Posee una tasa de extensión reducida de 30 segundos/kb y altos rendimientos. Paq5000 es una alternativa a Taq polimerasa, acortando el tiempo total de ejecución del PCR.

Para llevar a cabo la reacción se mezcló 1X *Buffer* de reacción con 20 mM MgCl₂ de Fermentas, 200 µM dNTP *mix* [10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP y 10 mM dTTP], 0,2 µM de cada partidor, 0,5 U de enzima Paq5000 Polimerasa de Fermentas, ~100 ng de templado y agua de uso biología molecular hasta obtener un volumen final de 20 µL.

3.5.3.3. Taq DNA polimerasa

Taq DNA Polimerasa es una enzima termoestable derivada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*. Posee actividad DNA polimerasa 5'→3' y actividad exonucleasa 5'→3', y una tasa de extensión de 1 minuto/kb.

Para llevar a cabo la reacción se mezcló 1X *Buffer* de reacción con 15 mM MgCl₂ de Sigma-Aldrich®, 200 µM dNTP *mix* [10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP y 10 mM dTTP], 0,25 µM de cada partidor, 0,5 U de enzima Taq DNA Polimerasa de Sigma-Aldrich®, ~100 ng de templado y agua de uso biología molecular hasta obtener un volumen final de 20 µL. Para el caso de la genotipificación de las líneas insercionales de SALK de *atabpr2*-(sección 3.1.1), se utilizó 3 µL de DNA genómico (sección 3.2.1) como templado, para cada reacción de PCR.

3.5.3.4. GoTaq Flexi DNA polimerasa

GoTaq® Flexi DNA Polimerasa ofrece amplificación robusta igual, y en algunos casos superior, a la de Taq DNA Polimerasa convencional. Esta enzima permite la optimización de la concentración de MgCl₂, ya que no viene adicionado a los "buffer" de reacción, y facilita el análisis directo en geles de los productos de PCR. Esta enzima posee dos *Buffer* de reacción, uno verde y uno incoloro, ambos contienen 50% glicerol, el cual aumenta la densidad de la muestra, permitiendo que éstas se hundan fácilmente en los pocillos de geles de agarosa, lo cual permite cargar la reacción directamente en un gel después de la amplificación. El 5x *Buffer* verde GoTaq® Flexi contiene dos colorantes (azul y amarillo) que se separan durante la electroforesis para monitorear el proceso de migración de las muestras. Dadas todas sus características, esta enzima se utiliza en la genotipificación de las líneas insercionales de SALK de *ata6pr2*-(sección 3.1.1).

Para llevar a cabo la reacción se mezcló 1X *Buffer* verde GoTaq® Flexi, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP *mix* [10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP y 10 mM dTTP], 0,25 µM de cada partidor, 0,5 U de enzima GoTaq® Flexi DNA Polimerasa, 3 µL de templado y agua de uso biología molecular hasta obtener un volumen final de 20 µL.

3.5.4. Programas termociclador

Tabla III: Descripción de programas de termociclador utilizados en este seminario de título. Se detalla nombre del fragmento amplificado, enzima DNA polimerasa utilizada, tiempos y temperatura utilizados para cada etapa de los PCRs en el termociclador (programa PCR).

Etapas Fragmento amplificado /Enzima	1	2	3	4	5	6
	Denaturación inicial	Amplificación			Extensión Final	Término
		Denaturación templado	Hibridación partidores	Extensión		
<i>Actina</i> <i>Taq Pol.</i>	1 ciclo	←	35 ciclos	→	1 ciclo	1 ciclo
	94°C 5 min	94°C 25 seg	54°C 25 seg	72°C 30 seg	72°C 10 min	10°C ∞
<i>Actina</i> <i>GoTaq Pol.</i>	1 ciclo	←	35 ciclos	→	1 ciclo	1 ciclo
	95°C 2 min	95°C 5 seg	54°C 25 seg	72°C 30 seg	72°C 5 min	10°C ∞
<i>18S</i> <i>Taq Pol.</i>	1 ciclo	←	30 ciclos	→	1 ciclo	1 ciclo
	94°C 5 min	94°C 40 seg	58°C 30 seg	68°C 50 seg	68°C 10 min	10°C ∞
<i>Ata6PR2</i> <i>Taq Pol.</i>	1 ciclo	←	35 ciclos	→	1 ciclo	1 ciclo
	94°C 5 min	94°C 45 seg	55°C 40 seg	72°C 2 min	72°C 10 min	10°C ∞
<i>Ata6PR2</i> <i>GoTaq Pol.</i>	1 ciclo	←	35 ciclos	→	1 ciclo	1 ciclo
	95°C 2 min	95°C 45 seg	55°C 40 seg	72°C 2 min	72°C 5 min	10°C ∞
<i>Ata6PR2cs</i> <i>Pfu Pol.</i>	1 ciclo	←	35 ciclos	→	1 ciclo	1 ciclo
	94°C 5 min	94°C 45 seg	59°C 40 seg	72°C 1.5 min	72°C 10 min	10°C ∞
<i>Ata6PR2cs</i> <i>Paq Pol.</i>	1 ciclo	←	35 ciclos	→	1 ciclo	1 ciclo
	95°C 2 min	95°C 45 seg	59°C 40 seg	72°C 30 seg	72°C 5 min	10°C ∞
<i>Ata6PR2ss</i> <i>Pfu Pol.</i>	1 ciclo	←	35 ciclos	→	1 ciclo	1 ciclo
	94°C 5 min	94°C 45 seg	55°C 40 seg	72°C 1,5 min	72°C 10 min	10°C ∞
<i>Mut2-60y</i> <i>Mut3-60</i> <i>Taq Pol</i>	1 ciclo	←	35 ciclos	→	1 ciclo	1 ciclo
	94°C 5 min	94°C 45 seg	55°C 40 seg	72°C 2 min	72°C 10 min	10°C ∞
<i>Mut2-60y</i> <i>Mut3-60</i> <i>GoTaq Pol.</i>	1 ciclo	←	35 ciclos	→	1 ciclo	1 ciclo
	95°C 2 min	95°C 45 seg	55°C 40 seg	72°C 2 min	72°C 5 min	10°C ∞
<i>Mut1-60</i> <i>Taq Pol</i>	1 ciclo	←	35 ciclos	→	1 ciclo	1 ciclo
	94°C 5 min	94°C 45 seg	55°C 40 seg	72°C 1.5 min	72°C 10 min	10°C ∞

Mut1-60 GoTaq Pol.	1 ciclo	←	35 ciclos	→	1 ciclo	1 ciclo
	95°C 2 min	95°C 45 seg	55°C 40 seg	72°C 1.5 min	72°C 5 min	10°C ∞
35S-GFP Taq Pol	1 ciclo	←	35 ciclos	→	1 ciclo	1 ciclo
	94°C 5 min	94°C 45 seg	62°C 40 seg	72°C 2min15seg	72°C 10 min	10°C ∞
AtA6PR2ss F-GFP Taq Pol	1 ciclo	←	35 ciclos	→	1 ciclo	1 ciclo
	94°C 5 min	94°C 45 seg	57°C 40 seg	72°C 2 min	72°C 10 min	10°C ∞
AtA6PR2ss R-GFP Taq Pol	1 ciclo	←	35 ciclos	→	1 ciclo	1 ciclo
	94°C 5 min	94°C 45 seg	57°C 40 seg	72°C 2 min	72°C 10 min	10°C ∞

3.6. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES

3.6.1. *E. coli*

Para obtener un mayor número de copias de vectores de clonación o binarios que contienen el gen de interés, se transformaron células de *E. coli* quimiocompetentes, las cuales en condiciones apropiadas de temperatura y agitación (sección 3.1.4.1.), aumentan el número de células exponencialmente en un corto periodo de tiempo (2-16 horas). Para llevar a cabo la transformación, se tomaron 100-400 ng de vector de clonación o destinación (secciones 3.8.3. y 3.8.4.) y se mezcló cuidadosamente con una alícuota de células quimiocompetentes (sección 3.1.5.1). Luego se incubó en hielo durante 1 hora y se realizó un golpe térmico incubando a 42°C durante 45 segundos. Posteriormente, se incubó en hielo durante 10 minutos y se agregó 500 µL de LB líquido. Se incubó a 37°C y 220 rpm de agitación durante 2 horas. Se centrifugó a 5000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente, se eliminaron 400 µL de medio LB y se resuspendieron cuidadosamente las células en los 100 µL restantes de medio. Se sembró

en placas LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de las células transformadas según el vector utilizado (**sección 3.7.**).

3.6.2. *A. tumefaciens*

Una vez obtenido el vector binario que contiene el gen de interés (**sección 3.8.4.**), se realizó la transformación de células quimiocompetentes de *A. tumefaciens*, que posteriormente permitieron transformar células vegetales, ya sea de forma estable o transitoria. Para ello se agregaron cuidadosamente 400-600 ng de vector binario provenientes de una minipreparación de células de *E. coli* transformadas (**sección 3.2.3.**) a una alícuota de células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* (**sección 3.1.5.2.**) y se incubó en nitrógeno líquido durante 5 minutos. Se agregó 1 mL de LB líquido y se incubó a 28°C y 220 rpm de agitación durante 2 horas. Se centrifugó a 5000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente, se eliminaron 400 µL de medio LB y se resuspendió cuidadosamente las células en los 100 µL restantes de medio. Se sembró en placas LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de las células transformadas según el vector utilizado (**sección 3.7.**).

3.7. VECTORES UTILIZADOS

3.7.1. Vector de clonación pCRTM8/GW/TOPO®

El vector de clonación o de entrada pCRTM8/GW/TOPO® (**Figura 3.1.**), permite la clonación de fragmentos de DNA mediante la utilización de la tecnología TOPO TA Cloning® System de Invitrogen. Este sistema utiliza la actividad transferasa terminal de las Taq Polimerasas, independiente del DNA templado, que permite agregar una

deoxiadenina sobresaliente en los extremos 3', para la clonación rápida y eficiente de productos de PCR. El vector contiene una deoxitimina 3' sobresaliente, que hibrida con la deoxiadenina 3' sobresaliente del fragmento a clonar y al mismo tiempo, una Topoisomerasa I, que se encuentra unida covalentemente al vector, forma enlace fosfodiéster entre el vector y el extremo 5' del fragmento a insertar. Además, este vector posee un gen que codifica para resistencia a espectinomicina, lo cual permite seleccionar células de *E. coli* quimiocompetentes transformadas con este vector (**sección 3.1.4.1.**).

Este vector es compatible con la tecnología GATEWAY™ (Karimi y cols., 2002), por lo que la secuencia clonada queda flanqueada por sitios de recombinación *attL*, que por recombinación homóloga permiten transferir, con alta eficiencia, el fragmento de interés, desde el vector de entrada a vectores que posean sitios de recombinación compatibles *attR*, mediante reacción de recombinación homóloga mediada por LR Clonase™ Enzyme Mix de Invitrogen.

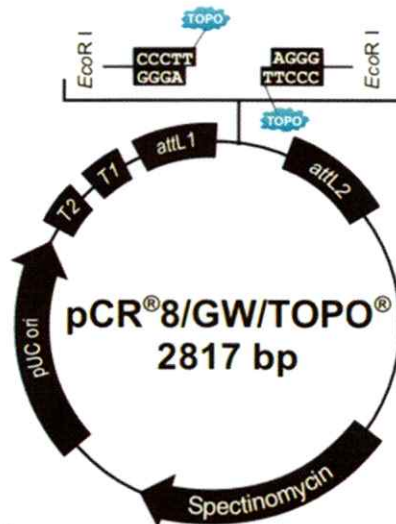


Figura 3.1.: Vector pCR™8/GW/TOPO®

3.7.2. Vectores de expresión, binarios o de destinación

Los vectores descritos a continuación reciben la denominación de "binarios" por poseer orígenes de replicación para *E. coli* y *A. tumefaciens*. Además, todos son compatibles con tecnología GATEWAY™, por lo que poseen sitios de recombinación *attR* compatibles con los sitios *attL*, que al recombinar gracias a la acción de LR Clonase, permiten transferir el fragmento de interés desde el vector de entrada o de clonación al vector de expresión o binario. Todos estos vectores permiten la transformación estable o transitoria de tejido vegetal, gracias a la presencia en ellos de regiones RB y LB, que permiten transferir la información contenida entre estos bordes al tejido vegetal, mediante la capacidad de realizar transferencia horizontal de *A. tumefaciens*.

3.7.2.1. pMDC43 y pMDC85

Los vectores pMDC43 y pMDC85 poseen doble promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S), lo cual permite una expresión del tipo constitutiva del gen de interés. Además, ambos vectores contienen el gen que codifica para la resistencia a kanamicina (*NPTII*), que permite la selección en bacterias y plantas, y el gen de resistencia a higromicina (*HPT*), para la selección en plantas. Entre los sitios *attR1* y *attR2* se encuentra el gen *ccdB*, que codifica para la toxina CcdB, la cual elimina las células transformadas con el vector sin recombinar, permitiendo solo el crecimiento de las células transformadas con el vector deseado. Este vector además agrega el gen de la proteína fluorescente verde (*6GFP*) en el extremo N-terminal (pMDC43) o C-terminal

(pMDC85) de la proteína codificada, permitiendo la observación por microscopía de la fluorescencia de la proteína fusionada (Curtis y Grossniklaus, 2003).

3.7.2.2. pGWB5

Vector pGWB5 posee el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S), que permite altos niveles de expresión de secuencias de interés. Además, contiene el gen que codifica para la resistencia a kanamicina (*NPTII*), bajo el control del promotor constitutivo Nos, que permite la selección en bacterias y plantas, y el gen de resistencia a higromicina (*HPT*), bajo el control del promotor CaMV35S, para la selección en plantas. Entre los sitios *attR1* y *attR2* se encuentra el gen *ccdB*, que codifica para la toxina CcdB (sección 3.7.2.1.). Este vector además agrega el gen de la proteína fluorescente verde (*GFP*) en el extremo C-terminal de la proteína codificada, permitiendo la observación por microscopía de la fluorescencia de la proteína fusionada (Nakagawa y cols., 2009).

3.7.2.3. pEarlyGate202

El vector pEarlyGate202 posee el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S) que permite altos niveles de expresión de secuencias de interés. Además, contiene el gen que codifica para la resistencia a kanamicina (*NPTII*), que permite la selección en bacterias y el gen de resistencia a herbicida Basta (*BAR*), para la selección en plantas. Entre los sitios *attR1* y *attR2* se encuentra el gen *ccdB*, que codifica para la toxina CcdB (sección 3.7.2.1.). Este vector además agrega el epítipo FLAG en el extremo N-terminal de la proteína codificada, permitiendo la detección de la proteína

fusionada a este epítipo por utilización de anticuerpo anti-FLAG en ensayos de Western Blot (Earley y cols., 2006).

3.8. OBTENCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN QUE POSEAN *AtA6PR2* FUSIONADO A UN TAG EN SU EXTREMO N- Y C-TERMINAL

3.8.1. Purificación de *Ata6pr2* a partir de gel de agarosa

Se realizaron 4 reacciones de PCR de 40µL cada una para amplificar *AtA6PR2cs* o *AtA6PR2ss* con *Pfu DNA Polimerasa* (sección 3.5.). Se resolvieron las reacciones en gel de agarosa 1,5% (p/v) (sección 3.3.2.). Por separado, se purificaron las bandas de 930 pb y 927 pb, respectivamente con el kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante y se cuantificó la extracción (sección 3.3.1.).

3.8.2. Adición de dATP 3' sobresaliente a *AtA6PR2*

No se puede realizar la clonación directa de *AtA6PR2cs* y *AtA6PR2ss* amplificados con *Pfu DNA Polimerasa* en vectores de clonación TOPO TA®, debido a la actividad correctora de esta polimerasa que elimina las deoxiadeninas 3' sobresalientes necesarias para TA Clonación®. Para agregar una deoxiadenina 3' sobresaliente a los genes amplificados, se utilizó aproximadamente 250ng de templado (hasta 8 µL de gen purificado)(sección 3.8.1.), se agregó 1 µL de "Buffer" de reacción 10x Taq DNA Polimerasa de Sigma-Aldrich®, 0.6 µL 25 mM MgCl₂, 0.2 µL 10 mM dATP, 0.2 µL de

Taq DNA Polimerasa de Sigma-Aldrich® y agua de uso biología molecular para un total de 10 µL. La reacción se incubó a 72°C durante 30 minutos.

3.8.3. Ligación de *AtA6PR2* al vector de clonación pCRTM8/GW/TOPO®

Para realizar la ligación de los genes *AtA6PR2cs* y *AtA6PR2ss*, con deoxiadeninas 3' sobresalientes, al vector de clonación pCRTM8/GW/TOPO®, se mezclaron 8 µL de producto de PCR, 2 µL de solución salina [1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂] y 20 ng de vector pCRTM8/GW/TOPO®. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente se transformaron células de *E. coli* quimiocompetentes (sección 3.6.1), por separado, con vector pCRTM8-*AtA6PR2cs* y vector pCRTM8-*AtA6PR2ss*, y se realizó una minipreparación de las células transformadas (sección 3.2.3.).

3.8.4. Recombinación de pCRTM8-*AtA6PR2* con vectores binarios

Dado que el vector pCRTM8 combina la Tecnología TOPO y Gateway®, es posible transferir el gen de interés (*AtA6PR2cs* o *AtA6PR2ss*) desde el vector de entrada (pCRTM8)(sección 3.8.3.) a un vector de destinación o binario que posea la misma tecnología(sección 3.7.2.), mediante una reacción de recombinación LR entre los dos vectores. Para ello se mezclaron 150 ng de vector de entrada, 150 ng de vector de destinación y 1 µL de LR ClonaseTM Enzyme Mix de Invitrogen. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 16 horas y se inactivó agregando 1 µL de proteinasa K e incubando a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente se transformaron células de *E. coli* quimiocompetentes (sección 3.6.1.) con los vectores de expresión generados y se realizó una minipreparación de las células transformadas con ellos (sección 3.2.3.).

Luego se realizó las pruebas moleculares (**sección 3.9.**) y se transformaron células de *A. tumefaciens* quimiocompetentes (**sección 3.6.2.**), a las cuales también se les realizó los análisis moleculares correspondientes (**sección 3.9.**). Posteriormente, se procedió con la transformación transitoria de hojas de *N. tabacum* (**sección 3.10.1.**).

3.9. ANÁLISIS MOLECULARES DE LOS VECTORES GENERADOS

3.9.1. PCR

Para corroborar la correcta inserción de los genes *AtA6PR2cs* y *AtA6PR2ss* en el vector de clonación pCRTM8, una vez realizada la ligación y la posterior transformación de células de *E. coli* quimiocompetentes, se realizó un PCR con Paq DNA Polimerasa de *AtA6PR2cs* y *AtA6PR2ss*, utilizando como templado las minipreparaciones de las células transformadas (**secciones 3.5. y 3.8.3.**).

Posteriormente, para corroborar la correcta inserción de los genes *AtA6PR2cs* y *AtA6PR2ss* en vectores de expresión post recombinación, se realizó PCR de *35S-21260ss*, utilizando como templado las minipreparaciones de las células transformadas (**secciones 3.5. y 3.8.4.**) y una vez obtenidas las células de *A. tumefaciens* transformadas, se realizó PCR con Paq DNA Polimerasa de *AtA6PR2ss*, utilizando como templado 1 µL de una dilución 1:10 en agua estéril de una fracción de la colonia de células transformadas (**sección 3.5.**).

3.9.2. Digestión enzimática

3.9.2.1. Vector de clonación

Para determinar la inserción y orientación de *AtA6PR2cs* y *AtA6PR2ss* en vector de clonación pCRTM8 se realizó una doble digestión enzimática con NcoI y XbaI, donde se esperó tener como resultado fragmentos de 2818 pb y 926 pb si *AtA6PR2* estaba en sentido entre los sitios de recombinación *attL1* y *attL2*, y fragmentos de 3255 pb y 489 pb si *AtA6PR2* estaba en antisentido. Para llevar a cabo la reacción, se mezclaron 5 µL de minipreparación a partir de células de *E. coli* transformadas, 0.3 µL de NcoI de Fermentas, 0.3 µL de XbaI de Fermentas, 2 µL de "Buffer" Tango 10x de Fermentas y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 20 µL. Se incubó la reacción a 37°C durante 16 horas y posteriormente se cargó toda la reacción en un gel 1,75% de agarosa (sección 3.3.2.).

3.9.2.2. Vector de expresión

Para determinar la inserción y orientación de los genes *AtA6PR2cs* y *AtA6PR2ss* en el vector de expresión pGWB5, se realizó una doble digestión enzimática con BamHI y SacI, donde se esperó tener como resultado fragmentos de 14622 pb, 1351 pb, 798 pb y 481pb si *AtA6PR2* estaba en sentido con el promotor CaMV35S, y fragmentos de 14622 pb, 1230 pb, 923 pb y 473 pb si *AtA6PR2* estaba en antisentido. Para llevar a cabo la reacción, se mezclaron 5 µL de minipreparación a partir de células de *E. coli* transformadas, 0.3 µL de BamHI de Fermentas, 0.3 µL de SacI de Fermentas, 2 µL de Buffer Tango 10x de Fermentas y agua libre de nucleasas para completar un volumen

final de 20 μ L. Se incubó la reacción a 37 °C durante 16 horas y posteriormente se cargó toda la reacción en un gel 1,5% de agarosa (sección 3.3.2.).

3.9.3. Secuenciación

Para determinar si las secuencias *AtA6PR2cs* y *AtA6PR2ss* habían sido amplificadas y clonadas de forma idéntica en vector pCR™8, se secuenciaron las minipreparaciones obtenidas a partir de células de *E. coli* transformadas con pCR™8-*AtA6PR2cs* o pCR™8-*AtA6PR2ss* (sección 3.8.3.). Para ello se utilizaron los partidores universales M13 forward y reverse (Macrogen, USA). Posteriormente se compararon los resultados con la secuencia depositada en bases de datos (TAIR, www.arabidopsis.org, At2g21260) para determinar la presencia de posibles diferencias.

3.10. DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE *AtA6PR2*

3.10.1. Análisis *in silico*

3.10.1.1. Predicción de localización subcelular de *AtA6PR2*

Para determinar la localización subcelular *in silico* se utilizó PSORT II (<http://www.genscript.com/psort/psort2.html>), un programa para predecir los sitios de localización subcelular de proteínas a partir de sus secuencias de aminoácidos, el cual utiliza el método de *k*-nearest-neighbor (*k*-NN). El método *k*-NN es un algoritmo simple de reconocimiento de patrones en la que *k* es un parámetro predefinido. En PSORT II se utiliza el algoritmo para asignar un sitio de localización de secuencias de entrada arbitrarias mediante el uso de las tendencias estadísticas que se encuentran en el

conjunto de entrenamiento (secuencias que se les han conocido los sitios de localización). En primer lugar, las distancias euclídeas (las raíces cuadradas de las sumas de las distancias al cuadrado de todas las variables) entre la secuencia de entrada y todos los datos de entrenamiento se calculan sobre la base de valores normalizados de las variables, que en este caso son cada una de las señales de destinación analizadas. A continuación, el sitio candidata que ocupa la mayor parte de los k-secuencias más cercanas se asigna a ser el sitio más probable. De esta forma, se puede predecir la localización subcelular más probable de secuencias aminoacídicas conocidas.

3.10.2. Análisis *in vivo*

3.10.2.1. Marcadores de compartimentos subcelulares

Para identificar correctamente la localización subcelular de la proteína AtA6PR2 en células de hojas de *N. tabacum*, se utilizó dos marcadores fluorescentes de compartimentos subcelulares basados en secuencias establecidas, los cuales pueden ser utilizados en estudios de co-localización. Se utilizó el marcador de tonoplasto vac-rk CD3-975, el cual posee la secuencia codificante para la proteína γ -TIP, una acuaporina de la membrana vacuolar, y en su extremo C-terminal se encuentra fusionado la secuencia codificante para la proteína fluorescente mCherry (Nelson y cols., 2007). Además, se utilizó el marcador citoplasma-núcleo pK7WGR2.0-DcAlfin2, el cual posee la secuencia codificante para un factor de transcripción del tipo Alfin 2 de *Daucus carota* y en su extremo C-terminal se encuentra fusionado la secuencia que codifica para RFP (Simpson, 2015).

3.10.2.2. Transformación transitoria de hojas de *N. tabacum*

Para realizar la transformación transitoria de hojas de *N. tabacum* se realizó un cultivo líquido de *A. tumefaciens* transformado con: 1) vector binario que contenía gen de interés en sentido (pGWB5-AtA6PR2ssF), 2) marcador tonoplasto (**sección 3.10.1.**), 3) marcador citoplasma-núcleo (**sección 3.10.2.1.**), 4) vector vacío (pGWB5) y 5) vector binario que contenía gen de interés en antisentido (pGWB5-AtA6PR2ssR), estos dos últimos utilizados como controles negativos de transformación. Para ello se inoculó 10 mL de LB líquido (suplementado con antibióticos; **sección 3.7.2.2.**) con 10 µL de cultivo líquido de *A. tumefaciens* transformado con los distintos vectores. Se incubó durante 16 horas a 28°C y 220 rpm de agitación. Se centrifugó a 5000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células cuidadosamente en agua destilada estéril hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,8. Luego se agregó 0,1 mM de acetosiringona, compuesto fenólico que exudan naturalmente las plantas por las heridas y funciona como quimioatrayente de *A. tumefaciens*. Para el caso de las co-infiltraciones, una vez resuspendidas las células en agua estéril, se mezclaron 4 mL de cada suspensión y posteriormente se agregó 0,1 mM de acetosiringona.

Una vez obtenidas las suspensiones de infiltración, se procedió a realizar la transformación de tejido vegetal. Para ello, se realizó una mínima incisión en la hoja con una aguja muy fina (jeringa de insulina) y posteriormente, con una jeringa de 5 mL sin aguja, se tomaron 3 mL de suspensión de infiltración y se procedió a presionar suavemente con la boquilla de la jeringa sobre la hoja, justo donde se realizó la incisión.

Se presionó cuidadosamente el émbolo, hasta observar que todas las células del panel de la hoja fueron infiltradas con la suspensión. Es importante considerar que se realizó infiltración panel por medio en una hoja, para que la sobrevida de ésta, post-infiltración, no se viera afectada. Una vez realizada la agroinfiltración de las hojas de *N. tabacum*, la planta se dejó en cámara de crecimiento durante 3,5 días (sección 3.1.3.), para la posterior extracción de RNA (sección 3.2.4.) y observación por microscopía confocal.

3.10.2.3. Observación de fluorescencia de células transformadas por microscopía confocal

La microscopía confocal permite la observación de muestras a una resolución mucho mayor que la microscopía óptica convencional, gracias a un sistema laser que aplica un haz de luz en forma de barrido, en una región pequeña de la muestra a observar. El laser al ser aplicado a una longitud de onda determinada produce excitación de ciertas moléculas de la muestra, las cuales emiten fluorescencia a una longitud de onda mayor a la aplicada. Debido a que el laser penetra fácilmente la muestra, el microscopio confocal permite obtener imágenes en diferentes planos focales, que al ser procesadas por programas bioinformáticos, pueden reproducir una imagen tridimensional del material observado.

Para la observación de la fluorescencia de células transformadas de hojas de *N. tabacum* (sección 3.10.2.2.), se cortó una sección de 1 cm x 1cm del panel de la hoja transformada y se pozó la cara adaxial sobre un portaobjetos. Se colocó sobre la muestra 300 µL de agua destilada y cuidadosamente se tapó con cubreobjetos. Se utilizó un

Microscopio Confocal Zeiss LSM 710 con objetivo de 40X y software Zen versión 2012 para capturar las imágenes. La edición de las imágenes se realizó con ImageJ2x 2.1.4.7 Image 1.1.

4. RESULTADOS

4.1. CLONACIÓN DEL cDNA DE *AtA6PR2* Y GENERACIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN QUE POSEAN *AtA6PR2* FUSIONADO A TAGs EN SU EXTREMO N- Y C-TERMINAL.

4.1.1. Extracción de RNA total y obtención de cDNA a partir de flores de *A. thaliana* silvestre

Tal como se expuso en la **sección 1.3.(Figura 1.3)**, el tejido en el cual hay una mayor expresión relativa de *AtA6PR2* es en silicuas, seguido por flores. Se utilizaron flores de *A. thaliana* para realizar la extracción de RNA total (**sección 3.2.2.**), debido a que no se contaba con la cantidad de silicuas necesaria para realizar la extracción de RNA a partir de ellas. Luego, se realizó una electroforesis (**sección 3.3.2.**) para corroborar la integridad de los extractos de RNA total. Posteriormente, se trató el extracto con DNasa para eliminar restos de DNA genómico, se realizó la síntesis de cDNA (**sección 3.4**) y un PCR para amplificar un fragmento de *actina* para corroborar su calidad e integridad (**sección 3.5.; Figura 4.1.**).

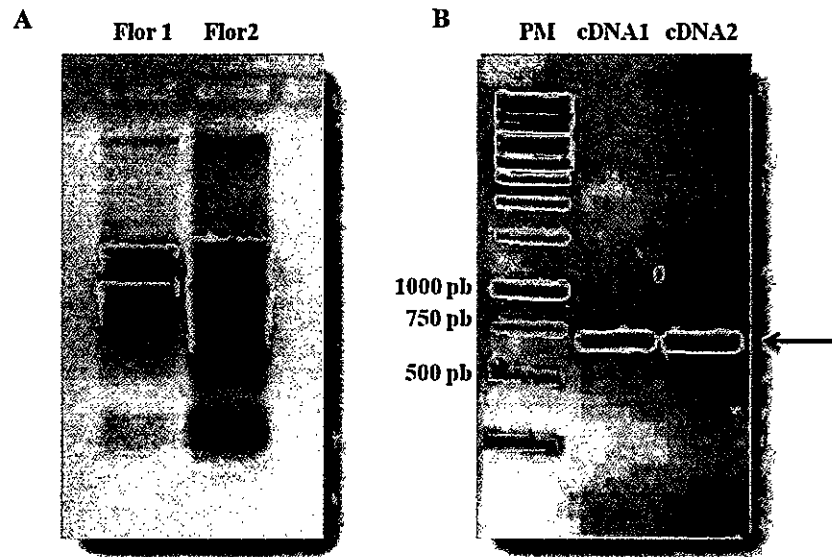


Figura 4.1.: Obtención y verificación de la calidad del cDNA de flores de *A. thaliana*. A. Se observa dos extractos de RNA total (Flor 1 y 2) de flores de *A. thaliana*. Se identifican bandas claras y definidas, lo cual indica que se encuentran íntegros los RNAs. B. Se observa la electroforesis realizada a los productos de amplificación por PCR de un fragmento de *actina* realizados a los cDNA sintetizados a partir de los extractos de RNA. Se observan en ambos carriles (cDNA1 y 2) la amplificación de un fragmento de aproximadamente 700 pb (flecha roja), correspondiente al tamaño esperado para el cDNA de *actina*, corroborando la integridad y calidad del cDNA sintetizado. PM; marcador de peso molecular.

4.1.2. Amplificación y clonación de *AtA6PR2cs* en pCR8

Una vez corroborada la calidad e integridad del cDNA (sección 4.1.1), se amplificó *AtA6PR2* con codón de término de la traducción (*AtA6PR2cs*) a partir de ambos cDNA sintetizados, utilizando *Pfu* DNA polimerasa y partidores 21260-F-cDNA y 21260-R-cDNA (con codón de término de la traducción) (sección 3.5). Dado que el carril cDNA2 mostró mayor intensidad (Figura 4.2.), la banda correspondiente fue purificada (sección 3.8.1). Luego se adicionó las dA 3' sobresalientes (sección 3.8.2.) y se ligó al vector de clonación pCRTM8/GW/TOPO® (sección 3.8.3.) obteniendo pCR8-*AtA6PR2*. Posteriormente se transformó *E. coli* (sección 3.6.1.), obteniéndose 3 colonias resistentes a espectinomicina. Para corroborar la transformación, se realizó una

extracción de DNA plasmidial a cada una de las colonias (sección 3.2.3.) y PCR para amplificar *AtA6PR2cs* utilizando como templado las minipreparaciones.

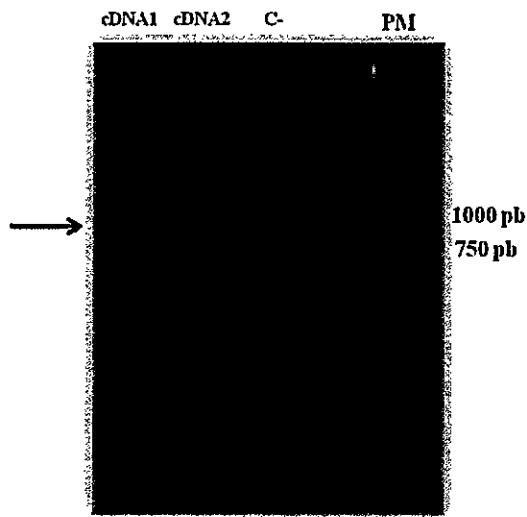


Figura 4.2.: Amplificación de *AtA6PR2cs* a partir de cDNA de flores de *A. thaliana*. Se observa una banda de aproximadamente 930 pb (flecha roja) correspondiente al tamaño esperado del cDNA de *AtA6PR2cs*, en ambos cDNAs (cDNA1 y 2). C- corresponde al control negativo de PCR utilizando agua como templado. PM, marcador de peso molecular.

En la **Figura 4.3.**, se observa que las 3 minipreparaciones de las colonias transformadas con pCR8-AtA6PR2, amplificaron un fragmento de aproximadamente 930 pb, consistente con el tamaño esperado de *AtA6PR2cs*.

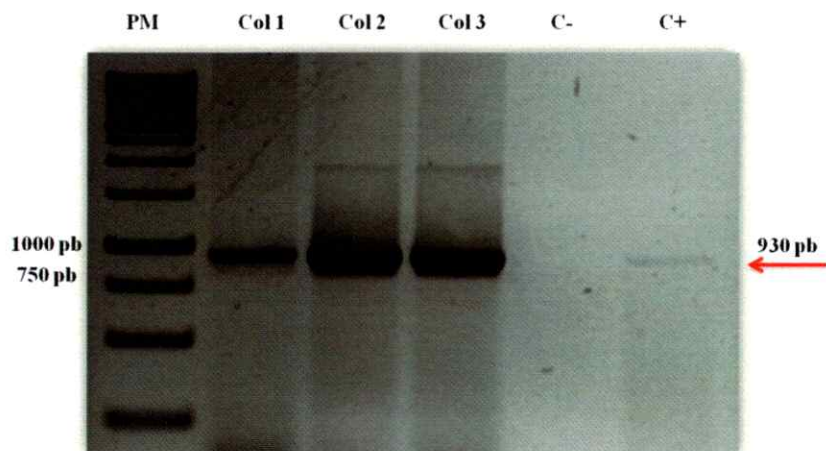


Figura 4.3.: Amplificación de *AtA6PR2cs* a partir de minipreparaciones de colonias de *E. coli* transformadas con pCR8-*AtA6PR2*. Col1-3 corresponden a minipreparaciones de colonia 1 a 3 transformada con el vector pCR8-*AtA6PR2*. C- corresponde al control negativo de PCR utilizando agua como templado. C+ corresponde al control positivo de PCR, utilizando cDNA2 como templado. PM, marcador de peso molecular.

Para determinar si el fragmento clonado en pCR8 en las distintas colonias, es efectivamente *AtA6PR2cs* y que no presenta diferencias nucleotídicas con la secuencia anotada de *AtA6PR2* en la base de datos de TAIR (www.arabidopsis.org; código de acceso At2g21260), se secuenciaron las tres minipreparaciones (Macrogen USA) (**sección 3.9.3.**). Una de ellas, la colonia 2, posee la secuencia de *AtA6PR2cs* con 100% de identidad nucleotídica comparado con la base de datos, pero la secuencia se encuentra en antisentido con respecto a los sitios *attL1* y *attL2* del vector pCR8. Por lo tanto, se utilizó esta minipreparación como templado para amplificar nuevamente *AtA6PR2*, repitiendo los pasos de esta sección, para obtener la secuencia en sentido en pCR8.

4.1.3. Amplificación y clonación de *AtA6PR2cs* y *AtA6PR2ssen* pCR8

Dado que el Objetivo Específico 1 propone la generación de vectores de expresión que poseen *AtA6PR2* fusionado a tags en su extremo N- como C-terminal, se amplificó

AtA6PR2 con (*AtA6PRcs*) y sin (*AtA6PR2ss*) codón de término de la traducción, utilizando *Pfu* DNA polimerasa (**sección 3.5.**), los partidores correspondientes y pCR8-*AtA6PR2* (colonia 2) como templado (**sección 4.1.2.**).

Tal como se observa en la **Figura 4.4.**, se amplificó *AtA6PR2cs* y *AtA6PR2ss*. Luego, se purificaron las bandas correspondientes a ~930 pb (**sección 3.8.1.**), se adicionó las dA 3' sobresaliente a cada uno de ellos (**sección 3.8.2.**) y se ligó, por separado, a pCR™8/GW/TOPO® (**sección 3.8.3.**). Posteriormente y por separado, se transformó *E. coli* con las reacciones de ligación (**sección 3.6.1.**). En seguida, para corroborar la transformación, se extrajo DNA plasmidial a 10 colonias resistentes a espectinomicina (**sección 3.2.3.**) y se realizó PCR para amplificar *AtA6PR2cs* o *AtA6PR2ss*, según correspondiese, utilizando como templado las minipreparaciones (**Figura 4.5.**).

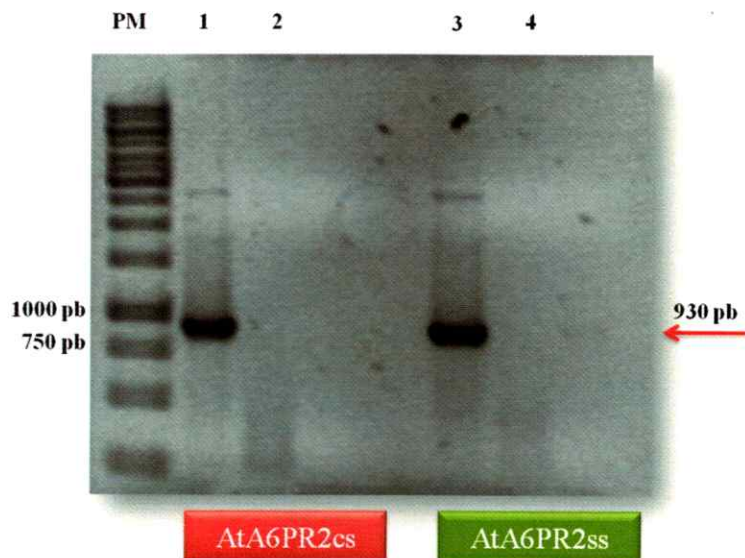


Figura 4.4.: Amplificación de *AtA6PR2cs* y *AtA6PR2ss* a partir de pCR8-*AtA6PR2*. 1. Amplificación de *AtA6PR2cs* usando partidores 21260-F-cDNA y 21260-R-cDNA. 2. Control negativo de PCR de *AtA6PR2cs* utilizando agua como templado. 3. Amplificación de *AtA6PR2ss* usando partidores 21260-F-cDNA y 60Rsin. 4. Control negativo de PCR de *AtA6PR2ss* utilizando agua como templado. PM, marcador de peso molecular.

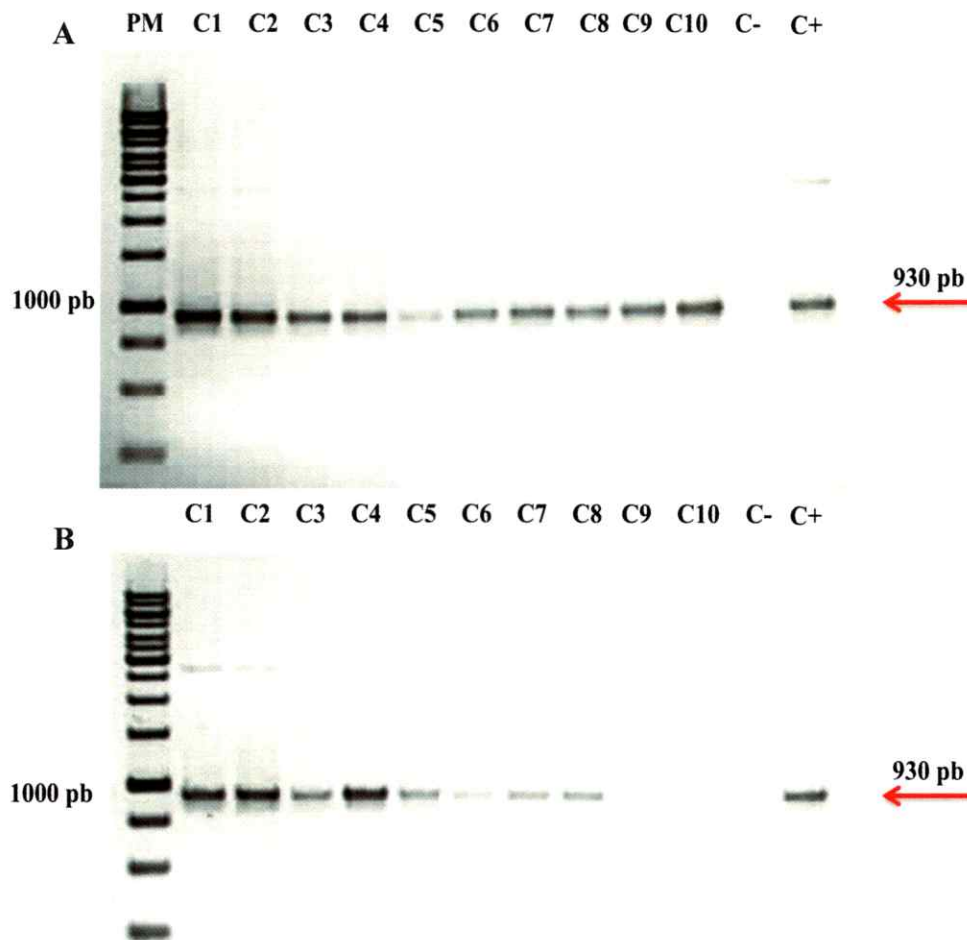


Figura 4.5.: Amplificación de *AtA6PR2cs* y *AtA6PR2ss* de 10 colonias transformadas con pCR8-*AtA6PR2cs* y 10 colonias transformadas con pCR8-*AtA6PR2ss*. A. PCR para amplificar *AtA6PR2cs* desde minipreparaciones de 10 colonias transformadas con pCR8-*AtA6PR2cs*. B. PCR para amplificar *AtA6PR2ss* desde minipreparaciones de 10 colonias transformadas con pCR8-*AtA6PR2ss*. Para ambos PCRs, C- corresponde al control negativo utilizando agua como templado y C+ al control positivo utilizando como templado la minipreparación de colonia 2 (sección 4.1.2.). PM, marcador de peso molecular.

4.1.4. Digestión enzimática de pCR8-*AtA6PR2cs* y pCR8-*AtA6PR2ss*.

Para determinar la orientación de *AtA6PR2cs* y *AtA6PR2ss* en las colonias transformadas con pCR8-*AtA6PR2cs* y pCR8-*AtA6PR2ss*, respectivamente, se realizó una doble digestión enzimática con *NcoI* y *XbaI* (sección 3.9.2.1.). Según los resultados

mostrados en la **Figura 4.6.**, se determinó que 3 de las 10 colonias de *E. coli* transformadas con pCR8-AtA6PR2cs, poseen *AtA6PRcs* en sentido con respecto a los sitios *attL1* y *attL2* del vector pCR8, y 5 de las 10 colonias de *E. coli* transformadas con pCR8-AtA6PR2ss, poseen *AtA6PR2ss* en sentido con respecto a los sitios *attL1* y *attL2* del vector pCR8, lo cual se detalla en la **Tabla IV.**

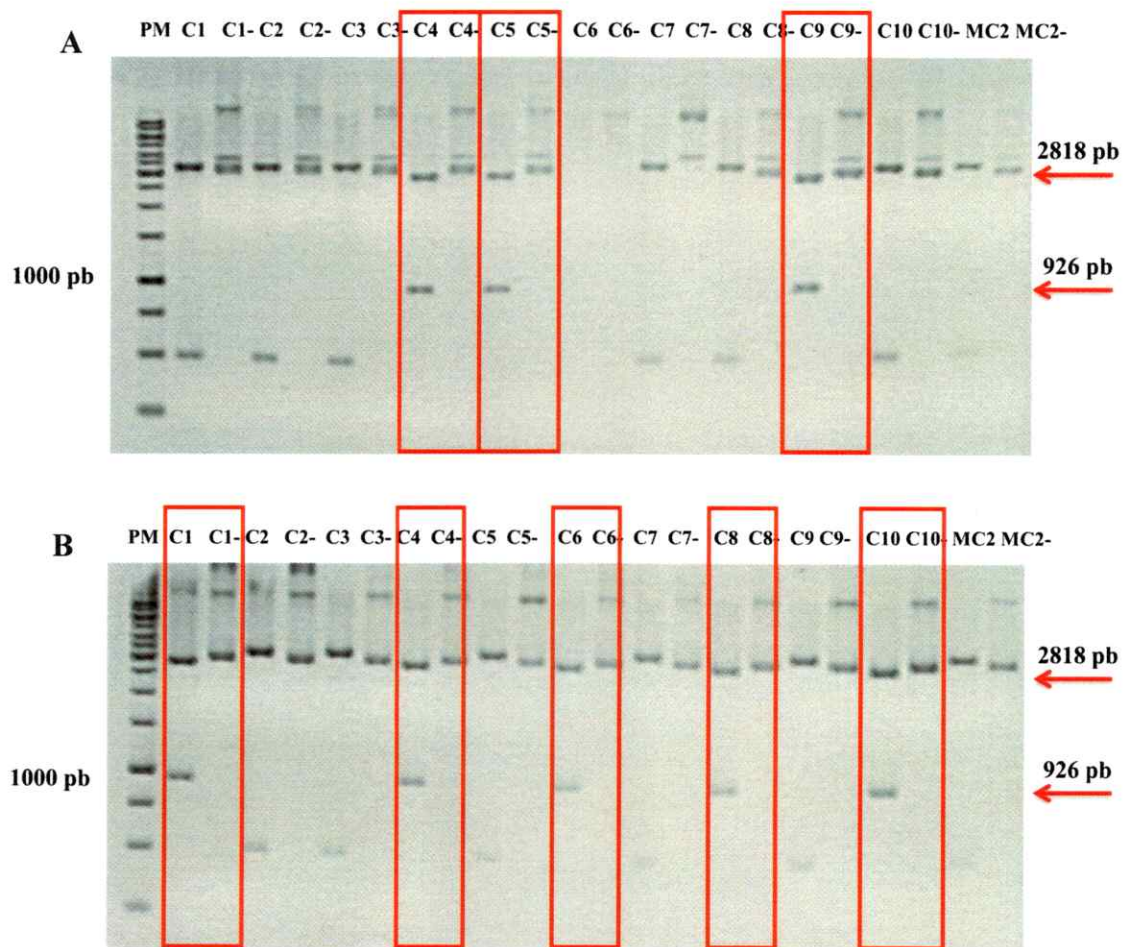

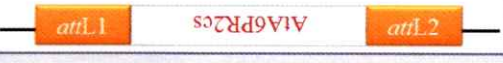

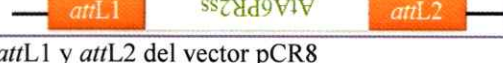


Figura 4.6.: Digestión enzimática con *NcoI* y *XbaI* de pCR8-AtA6PR2cs y pCR8-AtA6PR2ss. A. C1- C10, minipreparaciones de 10 colonias transformadas con pCR8-AtA6PR2cs digeridas con ambas enzimas. **B.** C1- C10, minipreparaciones de 10 colonias transformadas con pCR8-AtA6PR2ss digeridas con ambas enzimas. Para ambos casos, C1- a C10- corresponden a los controles de digestión para cada una de las colonias, en los cuales no hay presencia de enzimas de restricción en la mezcla de reacción. MC2 corresponde a la minipreparación colonia 2 (**sección 4.1.2.**) digerida con ambas enzimas y MC2- al control negativo de digestión de MC2. PM, marcador de peso molecular. Los recuadros rojos indican las colonias que poseen *AtA6PR2cs* o *AtA6PR2ss* en sentido respecto a los sitios *attL1* y *attL2* del vector pCR8.

Tabla IV: Resumen resultados digestión enzimática

Gen	Sentido con respecto al vector ¹	Representación	Colonias obtenidas
<i>AtA6PR2cs</i>	Sentido		4, 5 y 9
<i>AtA6PR2cs</i>	Antisentido		1, 2, 3, 6, 7, 8 y 10
<i>AtA6PR2ss</i>	Sentido		1, 4, 6, 8 y 10
<i>AtA6PR2ss</i>	Antisentido		2, 3, 5, 7 y 9

¹En sentido con respecto a los sitios *attL1* y *attL2* del vector pCR8

4.1.5. Secuenciación de pCR8-*AtA6PR2cs* y pCR8-*AtA6PR2ss*

Luego de determinar por digestión enzimática que existían colonias de *E. coli* transformadas con pCR8-*AtA6PR2cs* y con pCR8-*AtA6PR2ss* que poseían *AtA6PR2cs* y *AtA6PR2ss* en sentido con respecto a los sitios *attL1* y *attL2* del vector pCR8, respectivamente (**sección 4.1.4.**), se secuenciaron las minipreparaciones de estas 8 colonias, comparando los resultados con la secuencia de *AtA6PR2* depositada en la base de datos de TAIR (código de acceso, At2g21260) (**sección 3.9.3.**). Además, se secuenciaron minipreparaciones de 3 colonias (3, 5 y 7) transformadas con pCR8-*AtA6PR2ss* con *AtA6PR2ss* en antisentido con respecto a los sitios *attL1* y *attL2* del vector pCR8, lo cual se utilizará como control negativo en la transformación transitoria de hojas de tabaco (Objetivo Específico 2).

En la **Tabla V** se observa ennegrecidas las colonias que poseen 100% de identidad nucleotídica entre *AtA6PR2* y la secuencia depositada en la base de datos TAIR. Para la construcción de los vectores de destino (Objetivo Específico 2), con los cuales se trabajará en la **sección 4.2.** de Resultados, se eligieron los clones mostrados en **Tabla VI**.

Tabla V: Resultado de secuenciación de pCR8-AtA6PR2cs y pCR8-AtA6PR2ss





Gen	Sentido de la secuencia ^a	Colonia	Secuenciación con M13F ^b	Secuenciación con M13R ^c
AtA6PR2cs	Sentido	4	100% de identidad	100% de identidad
		5	99% de identidad	98% de identidad
		9	99% de identidad	98% de identidad
AtA6PR2ss	Sentido	1	100% de identidad	100% de identidad
		4	99% de identidad	99% de identidad
		6	99% de identidad	99% de identidad
		8	99% de identidad	99% de identidad
		10	99% de identidad	99% de identidad
	Antisentido	3	99% de identidad	98% de identidad
		5	99% de identidad	99% de identidad
		7	100% de identidad	100% de identidad

^aSentido con respecto a los sitios *attL1* y *attL2* del vector pCR8

^{b,c}Porcentaje de identidad nucleotídica del fragmento secuenciado comparado con base de datos TAIR

En negrita se destacan las colonias con 100% de identidad nucleotídica comparado con base de datos TAIR

Tabla VI: Constructos pCR8-AtA6PR2cs y pCR8-AtA6PR2ss elegidos para la generación de vectores de destino

Gen	Sentido con respecto al vector pCR8 ¹	Representación	Número de Colonia
AtA6PR2cs	Sentido		4 ^b
	Antisentido		2 ^a
AtA6PR2ss	Sentido		1 ^b
	Antisentido		7 ^b

^aClon obtenida en sección 4.1.2 de resultados

^b Clones obtenidas en sección 4.1.4 de resultados

¹Sentido con respecto a los sitios *attL1* y *attL2* del vector pCR8

4.1.6. Recombinación de pCR8-AtA6PR2cs y pCR8-AtA6PR2ss con vectores de expresión tipo pMDC

Se utilizaron vectores de expresión de la serie pMDC (Curtis y Grossniklaus, 2003), los cuales mediante tecnología Gateway permiten fusionar tag GFP en el extremo N- (pMDC43) o C-terminal (pMDC85) del gen de interés (**Figura 4.7.**).

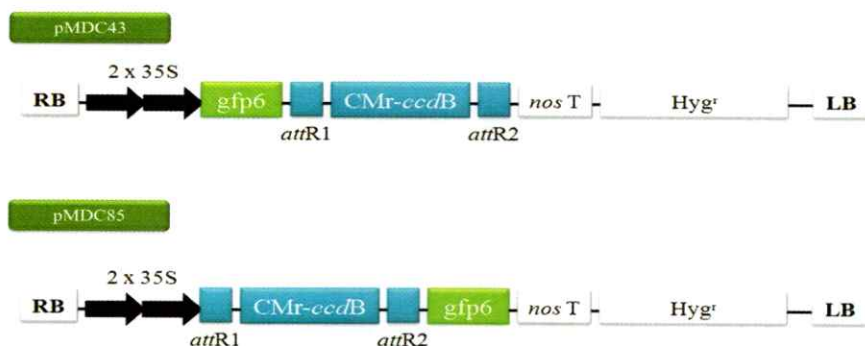


Figura 4.7.: Representación esquemática del T-DNA de pMDC43 y pMDC85. Ambos vectores poseen entre los bordes derecho (RB) e izquierdo (LB) el doble promotor 35S del virus de la coliflor, *gfp6* que codifica para la proteína fluorescente verde, terminador de la transcripción *nosT*, *Hyg^r* que codifica para la resistencia a higromicina en plantas y entre los sitios de recombinación *attR1* y *attR2*, el gen letal *ccdB* y CMr que confiere resistencia a cloranfenicol en bacterias.

Se realizaron las correspondientes recombinaciones entre los vectores de clonación expuestos en la **Tabla VI** y los vectores de expresión pMDC (**sección 3.8.4.**), lo cual se encuentra representado en la **Figura 4.8.**

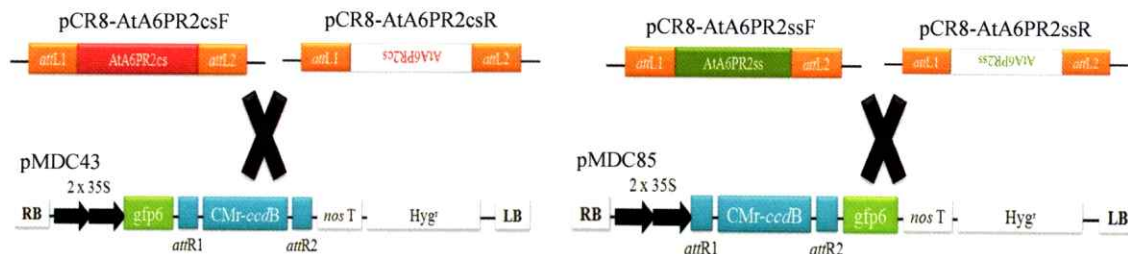


Figura 4.8.: Recombinación de pCR8 con pMDC

Se transformó *E. coli* con las reacciones de recombinación (**sección 3.6.1.**), y se realizaron minipreparaciones plasmidiales de las células resistentes a kanamicina (**sección 3.2.3.**), para su posterior análisis.

4.1.7. Digestión enzimática de minipreparaciones de células de *E. coli* transformadas con pMDC

Para determinar la correcta recombinación entre pCR8-AtA6PR2cs y pMDC43, y pCR8-AtA6PR2ss y pMDC85, se realizaron digestiones enzimáticas de las minipreparaciones (**sección 3.9.2.2.**). Para el caso de pMDC43-AtA6PRcs, se realizaron 2 digestiones, una simple con *NcoI* y una doble con *BamHI* y *SacI*. En cambio, para el caso de pMDC85-AtA6PRss se realizaron 3 digestiones, 2 de ellas son simples (solo *NcoI* o *SacI*) y la tercera digestión es doble con *BamHI* y *SacI*.

Tal como se observa en la **Figura 4.9.y4.10.**, en ninguna de las digestiones realizadas a los vectores de expresión generados se obtuvo el patrón de digestión deseado. A pesar de realizar 4 recombinaciones independientes y analizar aproximadamente 30 colonias en total, no fue posible obtener vectores pMDC43-AtA6PR2cs (F o R) o pMDC85-AtA6PR2ss (F o R). Este resultado es discutido más adelante (**sección 5.1**), y como consecuencia se decidió usar otras series de vectores, pEarleyGate y pGWB, para cumplir con los primeros objetivos de este trabajo.

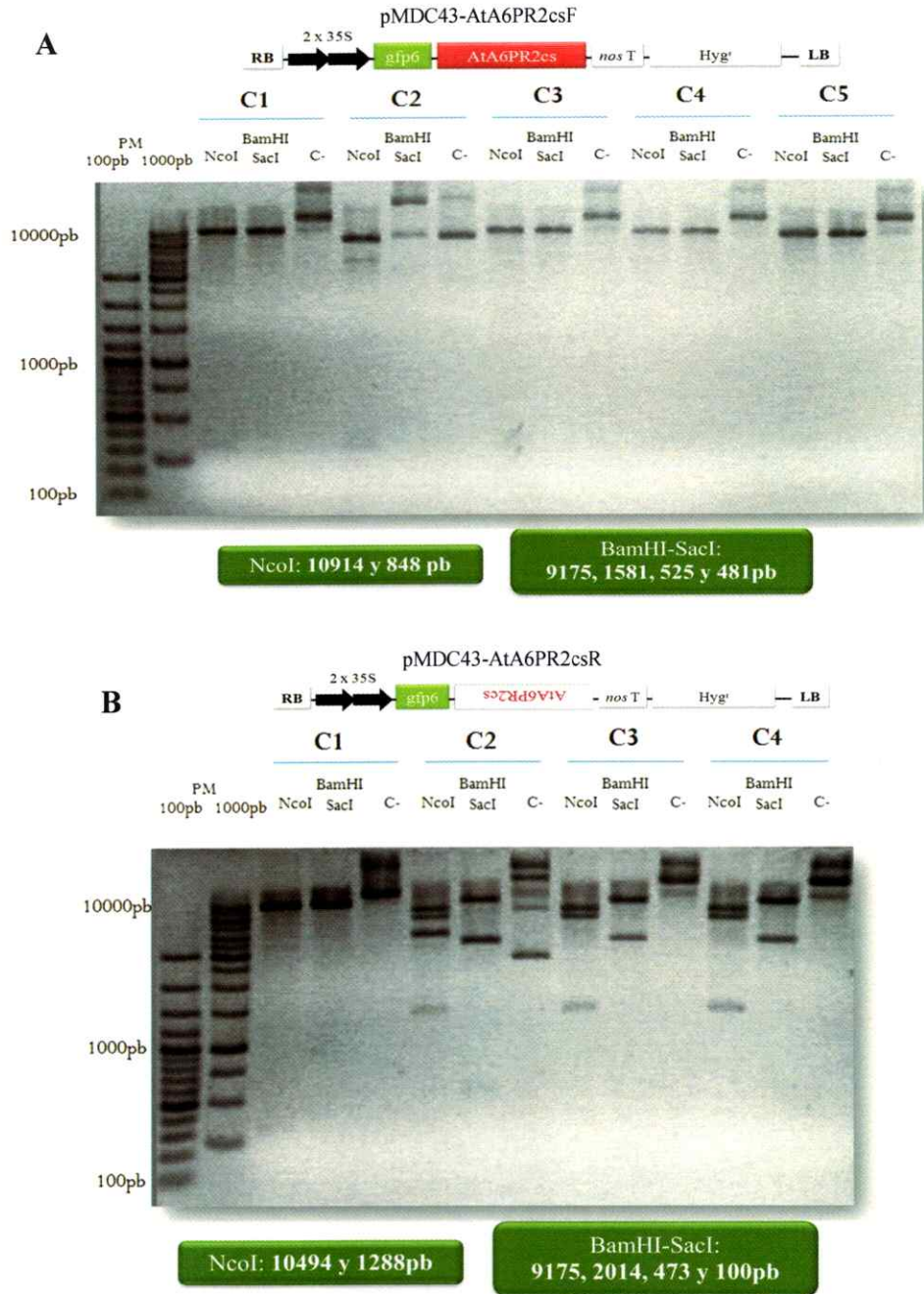
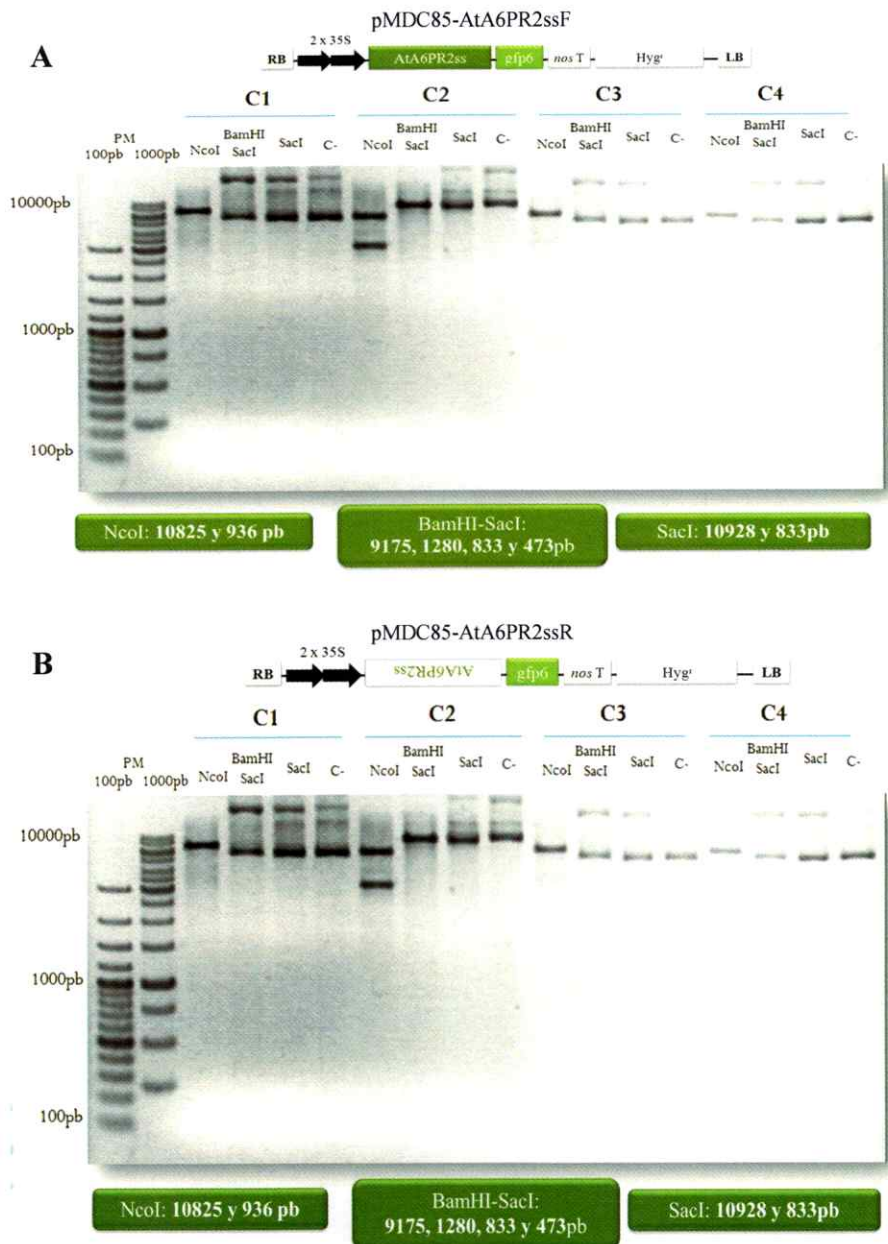


Figura 4.9.: Digestiones enzimáticas de pMDC43-AtA6PR2cs. **A.** Análisis de pMDC43-AtA6PR2csF potenciales. **B.** Análisis de pMDC43-AtA6PR2csR potenciales. Sobre cada gel se encuentra la representación del vector de expresión analizado. En las cajas verdes bajo cada gel, se indican los tamaños de fragmentos esperados según cada digestión realizada. Las minipreparaciones de las colonias transformadas están representadas por la letra C seguida del número de la colonia (C1-C5). Sobre los carriles se indican las enzimas utilizadas (*NcoI*, *BamHI*, *SacI*). C- corresponde al control negativo de digestión, el cual no posee enzimas de restricción en la mezcla de reacción. PM, marcador de peso molecular.



4.1.8. Recombinación de vectores pCR8-AtA6PR2cs y pCR8-AtA6PR2ss con vectores de expresión pEarlyGate202 y pGWB5

Dado que no fue posible obtener *AtA6PR2* fusionado a tag GFP en el extremo N- y C-terminal, mediante la utilización de vectores de expresión pMDC (sección 4.1.7.), se decidió utilizar otros 2 vectores de expresión que permiten fusionar distintos tag en N- (pEarlyGate202) y C- terminal (pGWB5) de *AtA6PR2*, debido a las características que poseen cada uno de ellos (Figura 4.11.).

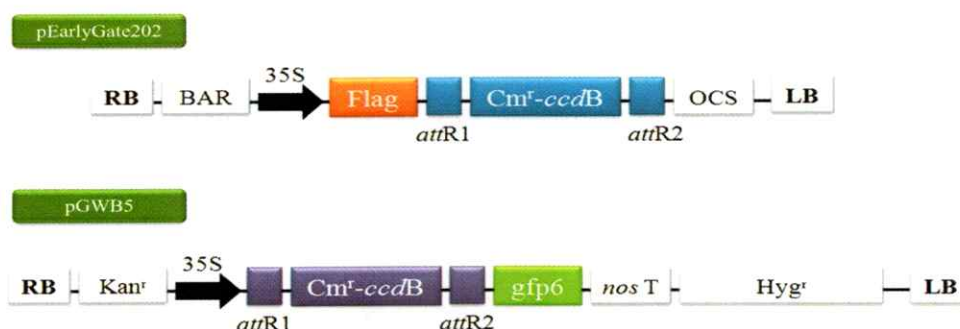


Figura 4.11.: Representación esquemática de T-DNA de pEarlyGate202 y pGWB5. Ambos vectores poseen entre los bordes derecho (RB) e izquierdo (LB) el promotor 35S del virus de la coliflor, además entre los sitios de recombinación *attR1* y *attR2*, el gen letal *ccdB* y CMr que confiere resistencia a cloranfenicol en bacterias. Vector pEarlyGate202 posee *BAR* que confiere resistencia al herbicida Basta (Glufosinato amonio) en plantas, tag Flag de fusión N-terminal al gen de interés y secuencia terminadora y de poliadenilación OCS. Vector pGWB5 poseen Kan^r que codifica para resistencia a kanamicina en bacterias y Hyg^r que codifica para resistencia a higromicina en plantas. Además, posee tag GFP6 de fusión C- terminal al gen de interés y terminador de la transcripción *nosT*.

4.1.8.1. Generación de vector de expresión pEarlyGate202-AtA6PR2cs

4.1.8.1.1. Recombinación de pCR8-AtA6PR2cs con pEarlyGate202

Se realizó la recombinación entre pCR8-AtA6PR2cs y pEarlyGate202 (sección 3.8.4., Figura 4.12.).



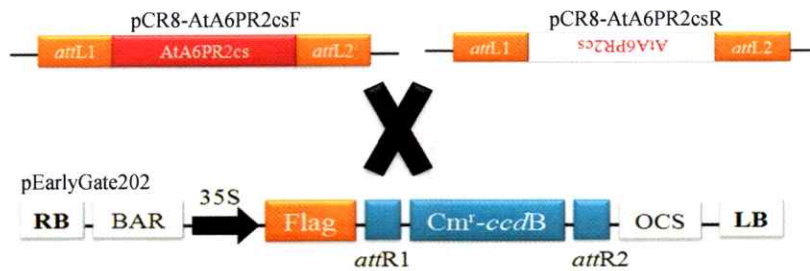


Figura 4.12.: Recombinación de pCR8-AtA6PR2cs con pEarlyGate202

Luego se transformó *E. coli* con las reacciones de recombinación (sección 3.6.1.), y se realizaron minipreparaciones plasmidiales de células resistentes a kanamicina (sección 3.2.3.), para su posterior análisis.

4.1.8.1.2. Verificación por PCR de pEarlyGate202-AtA6PR2cs

Para determinar la correcta recombinación, se amplificó *AtA6PR2* por PCR de las minipreparaciones de pEarlyGate202-AtA6PR2cs (sección 3.5).



Figura 4.13.: Representación de los vectores pEarlyGate202-AtA6PR2cs esperados producto de la recombinación entre pCR8-AtA6PR2cs (F y R) y pEarlyGate202. Los vectores esperados se diferencian sólo en el sentido de *AtA6PR2cs* con respecto al tag FLAG que antecede la secuencia de interés.

Como se observa en la Figura 4.14., todas las colonias analizadas dieron positivo para el PCR de *AtA6PR2cs*, indicando que los vectores generados son los esperados.

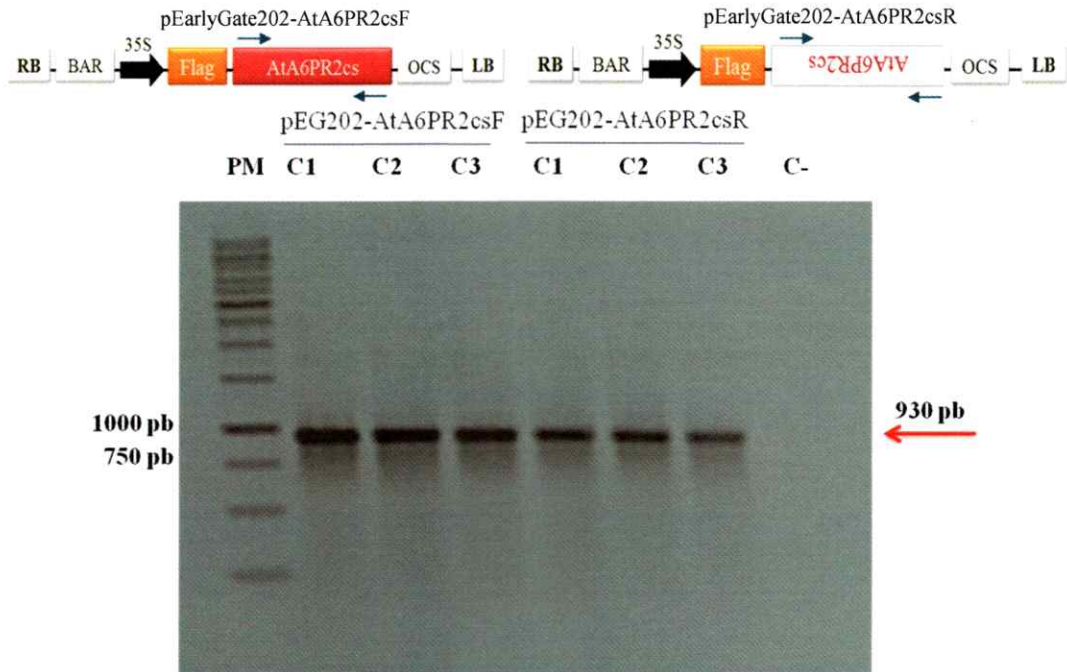


Figura 4.14.: Amplificación de *AtA6PR2cs* de colonias transformadas con pEarlyGate202-*AtA6PR2cs*. Sobre el gel se encuentra la representación de los vectores analizados. Las flechas azules indican los partidores utilizados. Las minipreparaciones de las colonias seleccionadas se encuentran representadas con la letra C seguidas del número de la colonia (C1-C3). C- corresponde al control negativo de PCR utilizando agua como templado. PM, marcador de peso molecular.

4.1.8.1.3. Transformación de *A. tumefaciens* con pEarlyGate202-*AtA6PR2cs* y su verificación mediante PCR de *AtA6PR2cs*

Una vez confirmada la obtención de pEarlyGate202-*AtA6PR2csF* y pEarlyGate202-*AtA6PR2csR*, se transformó *A. tumefaciens* con minipreparaciones a partir de la colonia 1 de *E. coli* para cada constructo (sección 3.6.2). Luego se seleccionó una colonia de *A. tumefaciens* resistente a kanamicina para cada transformación y se le realizó PCR para amplificar *AtA6PR2cs* para confirmar la presencia de los vectores de expresión en cada una de ellas (sección 3.5).

La **Figura 4.15.** demuestra que las colonias de *A. tumefaciens*, seleccionadas para cada evento de transformación, poseen efectivamente los vectores pEarlyGate202-AtA6PR2cs generados.

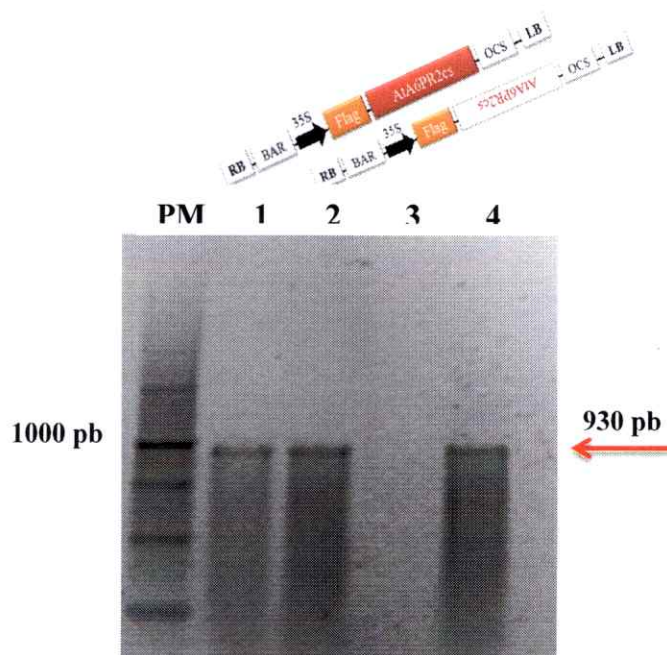


Figura 4.15.: PCR de *AtA6PR2cs* de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con pEarlyGate202-*AtA6PR2cs*. Sobre el carril 1 y 2 se observa el constructo con el cual está transformada la colonia analizada. Carril 3 corresponde a control negativo de PCR utilizando agua como templado. Carril 4 corresponde a control positivo de PCR utilizando como templado la minipreparación a partir de la colonia 1 de *E. coli* transformada con vector pEarlyGate202-*AtA6PR2cs*F. PM: marcador de peso molecular.

La generación de estos vectores permitirá determinar y/o corroborar la localización subcelular de *AtA6PR2* por ensayos de Western blot utilizando anticuerpos α -FLAG. Sin embargo, esta técnica requiere de un tiempo prolongado para su estandarización, por lo cual, en este seminario de título no fueron utilizados, sirviendo como una herramienta de gran utilidad en ensayos posteriores.

4.1.8.2. Generación de vector de expresión pGWB5-AtA6PR2ss

4.1.8.2.1. Recombinación de pCR8-AtA6PR2ss con pGWB5

Se realizó la recombinación entre pCR8-AtA6PR2ss y pGWB5 (sección 3.8.4., Figura 4.16.).

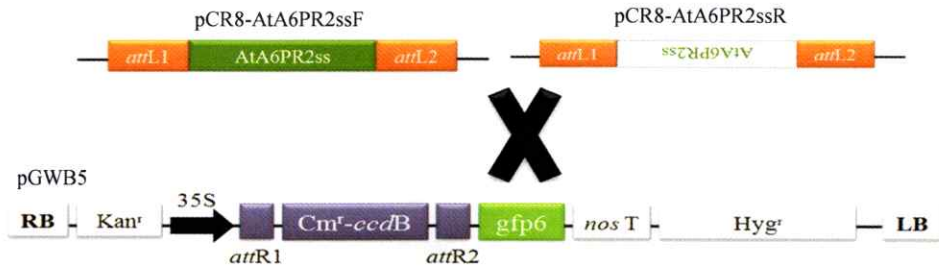


Figura 4.16.: Recombinación de pCR8-AtA6PR2ss con pGWB5

Luego se transformó *E. coli* con las reacciones de recombinación (sección 3.6.1.) y se realizaron minipreparaciones plasmidiales de células resistentes a kanamicina (sección 3.2.3.), para su posterior análisis.

4.1.8.2.2. Verificación por digestión enzimática de pGWB5-AtA6PR2ss

Para determinar la correcta recombinación entre pCR8-AtA6PR2ss y pGWB5, se realizó una doble digestión enzimática a las minipreparaciones con *Bam*HI y *Sac*I según sección 3.9.2.2.

La Figura 4.17. demuestra que los tamaños de los fragmentos esperados para la digestión enzimática de los vectores de expresión pGWB5-AtA6PR2ss generados, fueron los esperados, indicando la correcta recombinación entre vectores de clonación pCR8-AtA6PR2ss con el vector de expresión pGWB5.

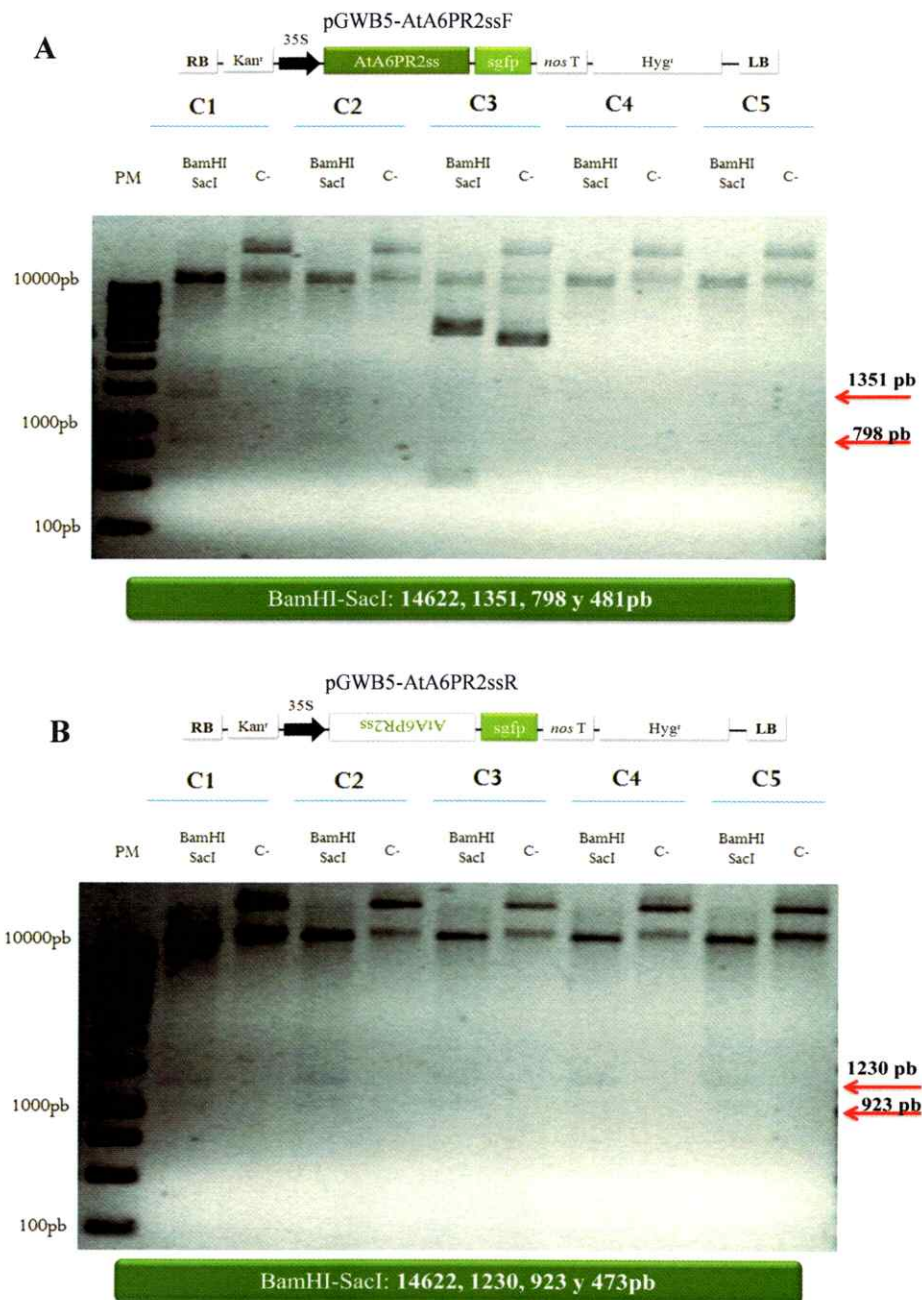


Figura 4.17.: Digestiones enzimáticas de pGWB5-AtA6PR2ss. **A.** Análisis de pGWB5-AtA6PR2ssF potenciales. **B.** Análisis de pGWB5-AtA6PR2ssR potenciales. Sobre cada gel se encuentra la representación del vector de expresión analizado. En las cajas verdes bajo cada gel, se indican los tamaños de fragmentos esperados según la digestión realizada. Las minipreparaciones de las colonias transformadas están representadas por la letra C seguida del número de la colonia (C1-C5). Sobre los carriles se indican las enzimas utilizadas para la digestión (*Bam*HI, *Sac*I). C- corresponde al control negativo de digestión, el cual no posee enzimas de restricción en la mezcla de reacción. PM: marcador de peso molecular. Los vectores esperados se diferencian sólo en el sentido de *AtA6PR2ss* con respecto al tag GFP que precede la secuencia de interés.

4.1.8.2.3. Verificación por PCR de pGWB5-AtA6PR2ss

Si bien los resultados de las digestiones enzimáticas de pGWB5-AtA6PR2ss indican fuertemente una correcta recombinación (sección 4.1.8.2.2.), se corroboró la construcción mediante 2 reacciones de PCR, uno para amplificar *AtA6PR2ss* y el otro para amplificar *35S-AtA6PR2-GFP* (sección 3.5).

El PCR de *AtA6PR2* (Figura 4.18.) sumado al PCR de *35S-AtA6PR2-GFP* (Figura 4.19.) permiten determinar la presencia del gen *AtA6PR2* en cada una de las colonias y además, si este se encuentra dentro de los vectores utilizados para la transformación de las bacterias, respectivamente.

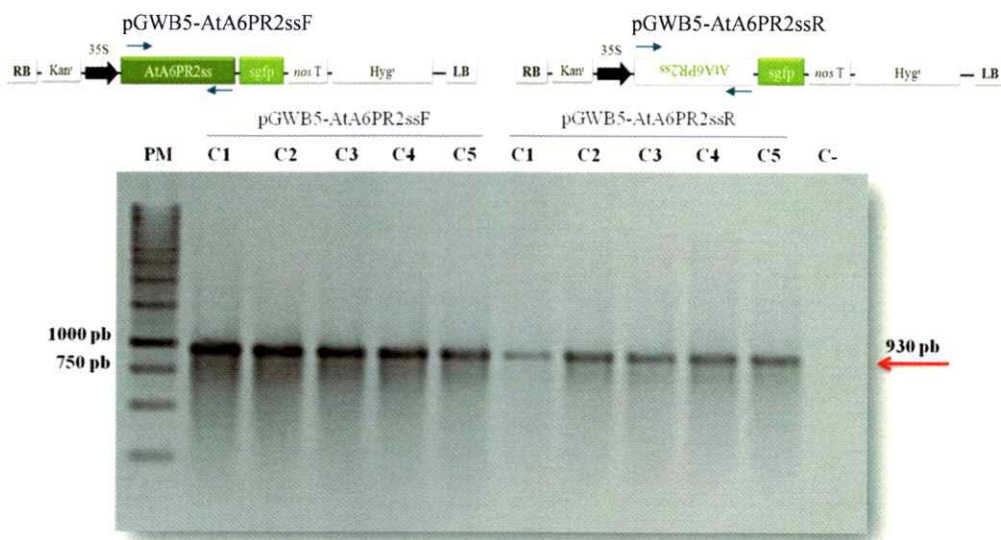


Figura 4.18.: Amplificación de *AtA6PR2ss* desde pGWB5-AtA6PR2ss. Sobre el gel se encuentra la representación de los vectores analizadas. Las flechas azules indican los partidores utilizados. Las minipreparaciones de las colonias seleccionadas se encuentran representadas con la letra C seguidas del número de la colonia (C1-C5). C- corresponde al control negativo de PCR utilizando agua como templado. PM, marcador de peso molecular.

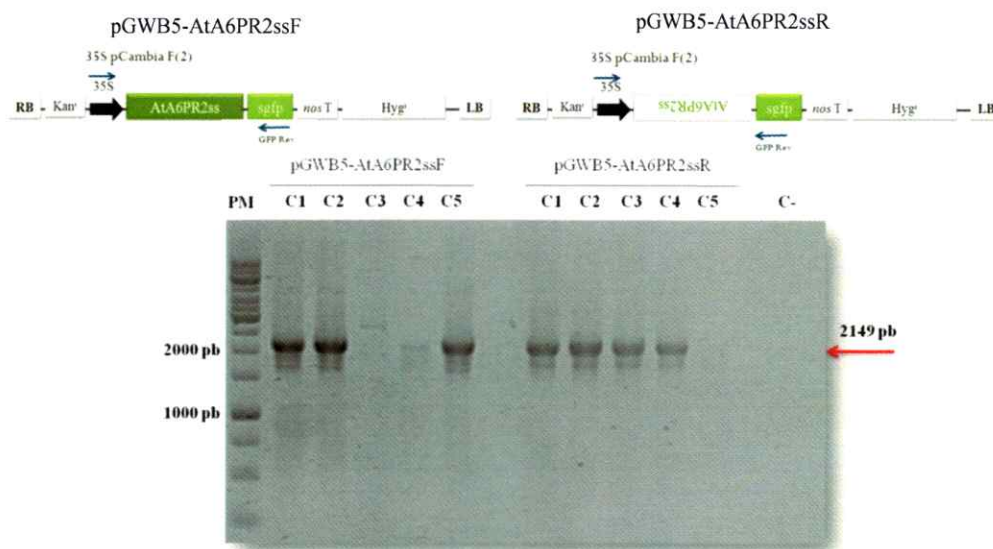


Figura 4.19.: Amplificación de 35S-AtA6PR2-GFP desde pGWB5-AtA6PR2ss. Sobre el gel se encuentra la representación de los vectores analizados y los partidores utilizados para realizar este PCR (flechas azules). Las minipreparaciones de las colonias seleccionadas se encuentran representadas con la letra C seguidas del número de la colonia (C1-C5). C- corresponde al control negativo de PCR utilizando agua como templado. PM: marcador de peso molecular.

4.1.8.2.4. Transformación de *A. tumefaciens* con pGWB5-AtA6PR2ss y su verificación mediante PCR de *AtA6PR2ss*

Dado que la minipreparación a partir de las colonias 1 (*E. coli*) para cada constructo dieron positivas para los 3 análisis realizados: digestión enzimática (sección 4.1.8.2.2.), PCR de *AtA6PR2ss* y PCR de *35S-AtA6PR2-GFP* (sección 4.1.8.2.3.), se utilizaron éstas para transformar *A. tumefaciens*(sección 3.6.2.). Luego se seleccionaron 3 colonias de *A. tumefaciens* resistentes a kanamicina para cada transformación y se le realizó PCR para amplificar *AtA6PR2ss* para confirmar la presencia de los vectores de expresión en cada una de ellas (sección 3.5).

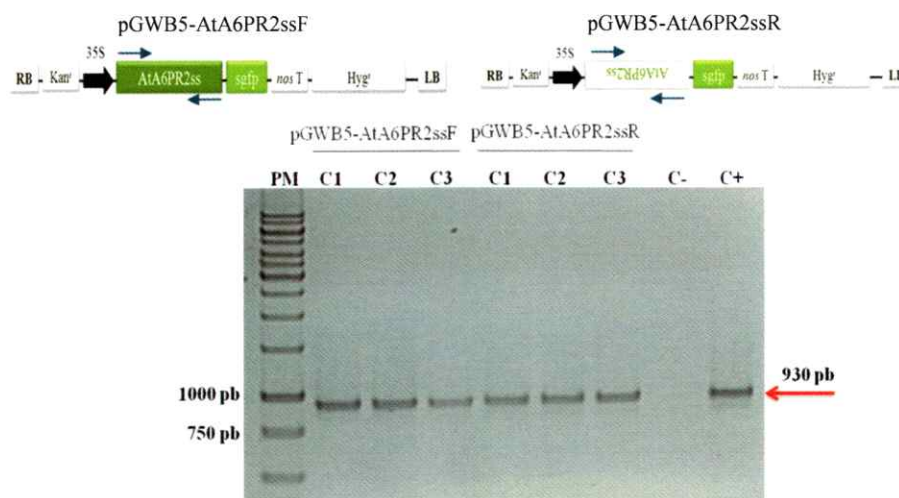


Figura 4.20.: PCR de *AtA6PR2ss* de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con pGWB5-AtA6PR2ss. Sobre el gel se encuentra la representación de los vectores analizados y los partidores utilizados (flechas azules). Las minipreparaciones de las colonias seleccionadas se encuentran representadas con la letra C seguidas del número de la colonia (C1-C3). C- corresponde al control negativo de PCR utilizando agua como templado. C+ = minipreparación colonia 1 pGWB5-AtA6PR2ssF, PM: marcador de peso molecular.

La **Figura 4.20.** demuestra que las colonias de *A. tumefaciens*, seleccionadas para cada evento de transformación, poseen efectivamente los vectores pGWB5-AtA6PR2ss generados.

4.1.8.2.5. Transformación de células de *E. coli* y *A. tumefaciens* quimiocompetentes con pGWB5 vacío

Para obtener el control negativo de los ensayos que se realizaron posteriormente, se transformó *E. coli* cepa DB3.1 (resistentes a *ccdB*) con pGWB5 vacío (**sección 3.6.1.**). Luego de realizar minipreparaciones a las colonias resistentes a kanamicina (**sección 3.2.3.**), se transformó *A. tumefaciens*, seleccionando una colonia resistente para experimentos posteriores (**sección 3.6.2.**).

4.2. DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE AtA6PR2-GFP, MEDIANTE LA TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE HOJAS DE TABACO.

4.2.1. Predicción de la localización subcelular de AtA6PR2 por análisis *in silico*

Para tener una primera aproximación sobre la posible localización subcelular de la proteína AtA6PR2 (código de acceso UniProtQ9SJV1), se utilizó el programa PSORT II (sección 3.10.1.1.). Tal como muestra la **Figura 4.21.**, se predice con un 60.9% de probabilidad que la localización subcelular de AtA6PR2 es citoplasmática y un 30,4 % de probabilidad que es nuclear. Sin embargo, es esencial corroborar estas predicciones mediante ensayos *in vivo*, utilizando pGWB5-AtA6PR2ss construido en Objetivo Específico 1 (sección 4.1.).

```

Results of the k-NN Prediction
k = 9/23
    60.9 %: cytoplasmic
    30.4 %: nuclear
    8.7 %: mitochondrial
>> prediction for QUERY is cyt (k=23)
    
```

Figura 4.21.: Predicción de la localización subcelular de AtA6PR2 utilizando programa PSORT II

4.2.2. Determinación de la funcionalidad transcripcional de pGWB5-AtA6PR2ss mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco

Para determinar la funcionalidad transcripcional de pGWB5-AtA6PR2ss, se realizó un primer ensayo en el cual se transformó transitoriamente hojas de tabaco (sección 3.10.2.2.) con *A. tumefaciens* transformado independientemente con 3 vectores

distintos: pGWB5 vacío y pGWB5-AtA6PR2ss con el gen en sentido (pGWB5-AtA6PR2ss-F) y en antisentido (pGWB5-AtA6PR2ss-R) (**Figura 4.22.**).

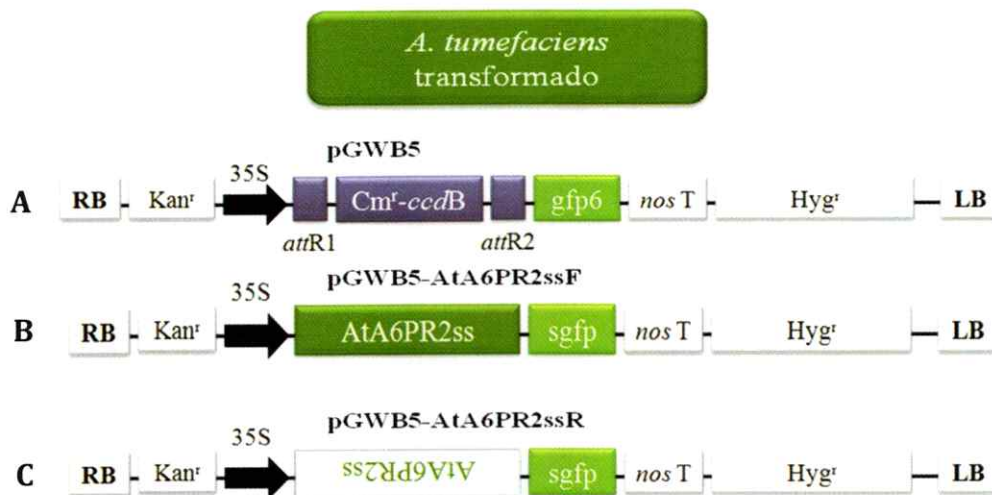


Figura 4.22.: Representación esquemática de los vectores utilizados para determinar la localización subcelular de AtA6PR2-GFP. **A.** pGWB5 vacío, es decir sin recombinar con vector de clonación. **B.** pGWB5-AtA6PR2ss-F con *AtA6PR2* insertado en sentido con respecto al promotor 35S. **C.** pGWB5-AtA6PR2ss-R con *AtA6PR2* insertado en antisentido con respecto al promotor 35S.

Luego de 3,5 días post-transformación de hojas de tabaco, se colectó 50 mg del tejido transformado, y se realizó una extracción de RNA total (**sección 3.2.2.**), verificando la integridad de los extractos por electroforesis en condiciones denaturantes (**sección 3.3.2.**). Posterior a un tratamiento con DNAsa, se realizó la síntesis de cDNA de cada una de las muestras (**sección 3.4.**) y se verificó la calidad e integridad de éstos mediante la amplificación de un fragmento de 18S por PCR (**sección 3.5.**).

Posterior a la verificación de la calidad e integridad del cDNA sintetizado (**Figura 4.23.**), se utilizaron éstos para realizar PCR de *AtA6PR2ssF-GFP* o *AtA6PR2ssR-GFP* según correspondiera (**sección 3.5.**), para determinar si la expresión del producto génico de *AtA6PR2* fusionado a *GFP* se daba en el sentido esperado.

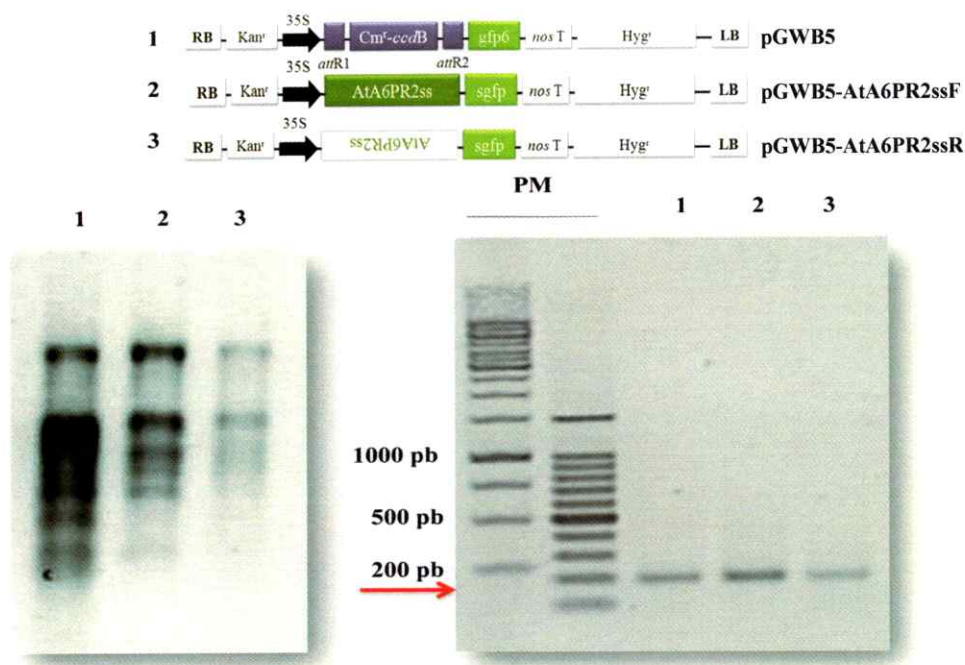


Figura 4.23. Obtención y verificación de la calidad de RNA total y cDNA a partir de hojas de tabaco transformadas transitoriamente. Sobre el gel, se encuentran representados los vectores analizados (1, 2, 3). En la imagen izquierda se observa extractos de RNA total de hojas de tabaco transformadas transitoriamente con vector 1, 2 y 3. En la imagen derecha se observa la electroforesis realizada a los productos de amplificación por PCR de un fragmento de *18S* realizados a los cDNA sintetizados a partir de los extractos de RNA. Se observan en los 3 carriles la amplificación de un fragmento de aproximadamente 200 pb, correspondiente al tamaño esperado para cDNA de *18S*, corroborando la integridad y calidad del cDNA sintetizado. PM: marcador de peso molecular

Figura 4.24. A demuestra que en hojas de tabaco transformadas transitoriamente con pGWB5-AtA6PR2ss-F, hay acumulación de transcritos de *AtA6PR2* fusionado en su extremo 3' al *GFP* (carril Fh). En cambio, en **Figura 4.24. B**, se demuestra que en hojas de tabaco transformadas transitoriamente con pGWB5-AtA6PR2ss-R, no hay acumulación de transcritos de *AtA6PR2* fusionado en su extremo 3' al *GFP* (carril Rh), lo cual corrobora que efectivamente, este constructo es un control negativo de transformación.

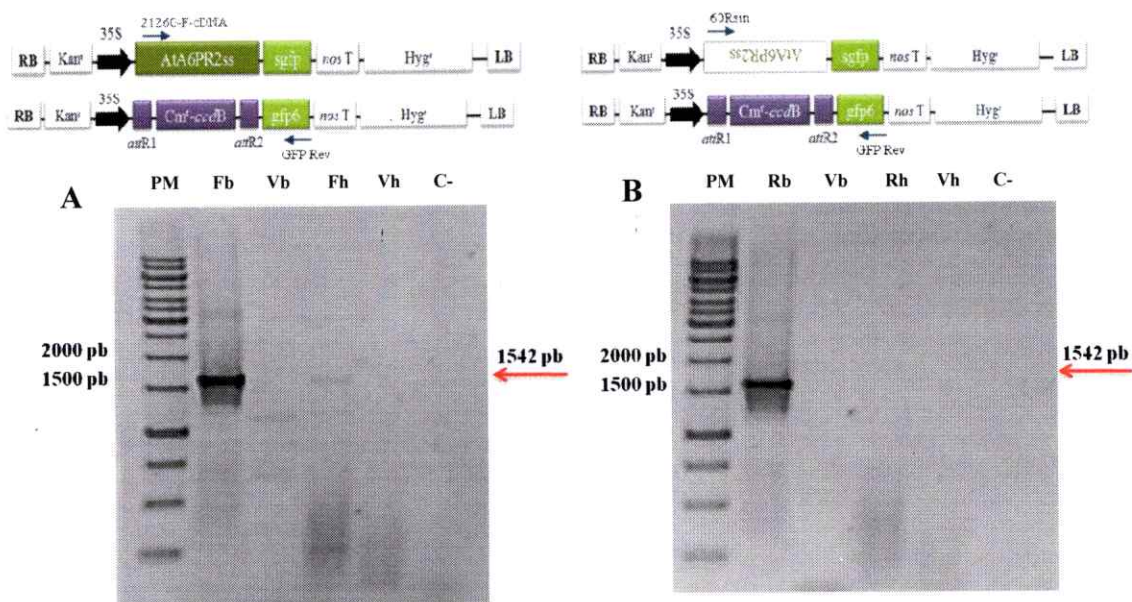
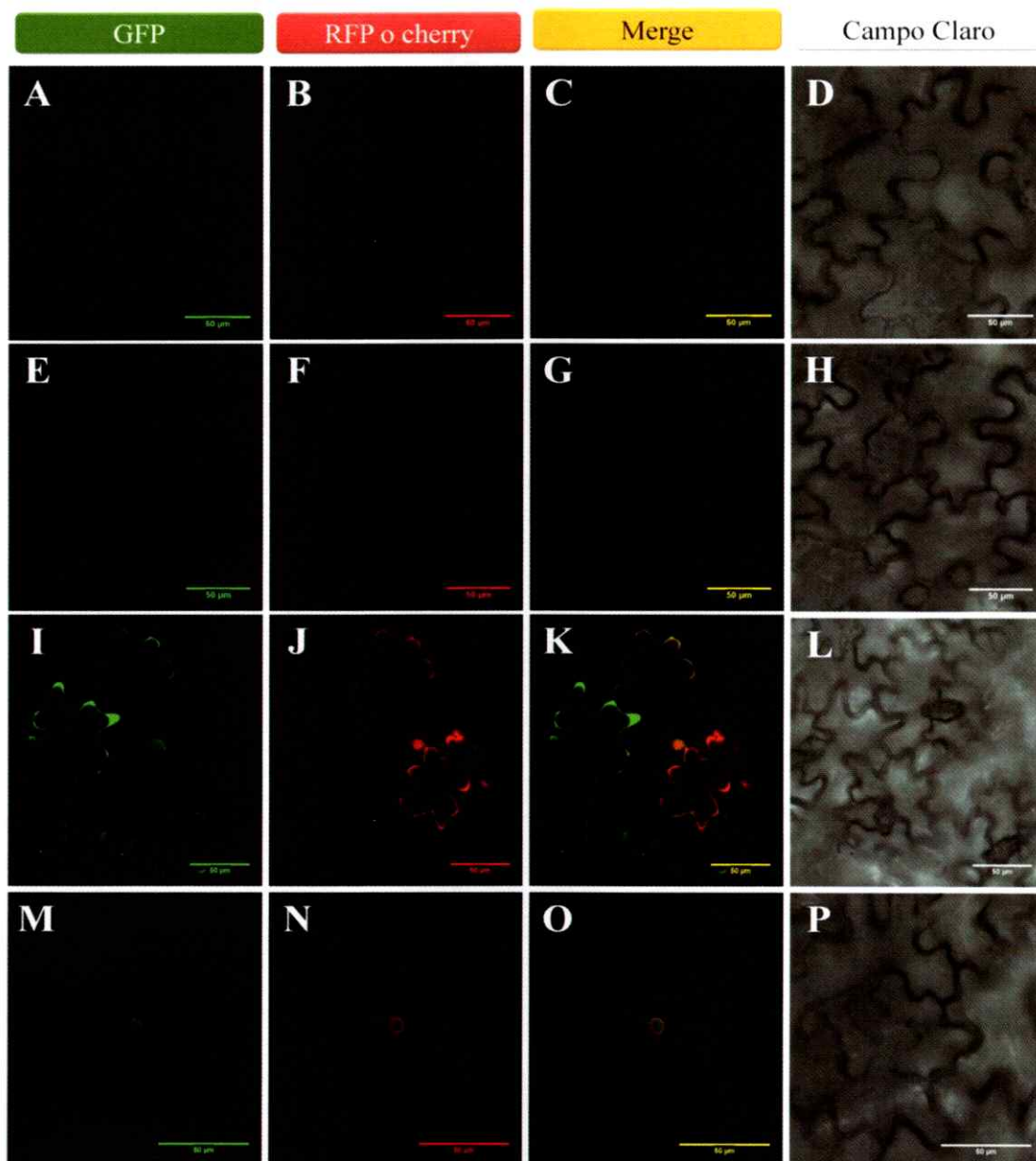


Figura 4.24.: Determinación de la funcionalidad transcripcional de los vectores generados para estudiar la localización subcelular de *AtA6PR2*-GFP. A. RT-PCR de *AtA6PR2ssF*-GFP, utilizando los partidores (fechas azules) en los esquemas de los vectores sobre el gel. Fh: cDNA de hoja de tabaco infiltrada con pGWB5-*AtA6PR2ssF*; Fb: minipreparación de *E. coli* portando pGWB5-*AtA6PR2ssF*; Vh: cDNA de hoja de tabaco infiltrada con pGWB5 vacío; Vb: minipreparación de *E. coli* portando pGWB5 vacío. C-; control negativo de PCR utilizando agua como templado. **B.** RT-PCR de *AtA6PR2ssR*-GFP, utilizando los partidores (fechas azules) en los esquemas de los vectores sobre el gel. Rh: cDNA de hoja de tabaco infiltrada con pGWB5-*AtA6PR2ssR*; Rb: minipreparación de *E. coli* portando pGWB5-*AtA6PR2ssR*; Vh: cDNA de hoja de tabaco infiltrada con pGWB5 vacío; Vb: minipreparación de *E. coli* portando pGWB5 vacío. C-; control negativo de PCR utilizando agua como templado. PM: marcador de peso molecular.

4.2.3. Determinación de la localización subcelular de *AtA6PR2*-GFP mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco

Luego de comprobar la funcionalidad transcripcional de pGWB5-*AtA6PR2ssF* (sección 4.2.2.), se procedió nuevamente a transformar transitoriamente hojas de tabaco (sección 3.10.2.2.), con este vector, o con pGWB5 vacío y pGWB5-*AtA6PR2ssR* como controles negativos. Además, se realizaron dos co-transformaciones con *A. tumefaciens* portando pGWB5-*AtA6PR2ssF* y *A. tumefaciens* portando un marcador citoplasmático fusionado a RFP (vector pK7WGR2.0-DcAlfin2) o un marcador tonoplasto fusionado a cherry (vac-rk CD3-975) (sección 3.10.2.1.).

Luego de 3,5 días post-transformación, se observó el tejido bajo microscopía confocal, detectando la señal de GFP y/o RFP o Cherry, según el constructo utilizado en la transformación (sección 3.10.2.3.). Al observar las imágenes de la **Figura 4.25.**, se verifica que los marcadores de citoplasma/núcleo (**Figura 4.25. J**) y de tonoplasto (**Figura 4.25. N**) se localizan en los compartimentos subcelulares reportados en la literatura (Simpson, 2015; Nelson y cols., 2007). Concordantemente, los controles negativos de transformación utilizados no presentan fluorescencia ni al excitar GFP, RFP o Cherry (**Figura 4.25. A, B, C, E, F y G**), confirmando su función. Al co-transformar hojas de tabaco con pGWB5-AtA6PR2ssF más alguno de los dos marcadores de compartimentos subcelulares y excitar a GFP, se observa fluorescencia en el contorno de la célula (sugiriendo localización citoplasmática) y en el núcleo (**Figura 4.25. I y M**). Adicionalmente, se observa co-localización entre la fluorescencia de GFP (AtA6PR-GFP) y la fluorescencia de RFP del marcador citoplasma-núcleo (**Figura 4.25. K**). Por lo tanto, estos resultados sugieren fuertemente que la proteína AtA6PR2 (fusionada a GFP) se localiza en el citoplasma y en el núcleo al ser expresada transitoriamente en células de hojas de tabaco, concordando con la predicción *in silico* (sección 4.2.1). De esta forma se dió cumplimiento al Objetivo Específico 2.



Imágenes	Vectores utilizados para transformación
A, B, C, D	
E, F, G, H	
I, J, K, L	
M, N, O, P	

Figura 4.25.: Imágenes obtenidas por microscopía confocal de hojas de tabaco transformadas transitoriamente. Sobre cada columna de imágenes se describe la fluorescencia observada. La tabla bajo las imágenes indica con qué vectores fueron transformadas las hojas representadas en cada una de las imágenes. Verde: fluorescencia de GFP. Rojo: fluorescencia de RFP o Cherry. Amarillo: sobreposición de Verde y Rojo. Blanco: campo claro. La barra bajo cada imagen representa 50 µm

4.3. OBTENCIÓN DE MUTANTES INSERCIONALES HOMOCIGOTAS DE LA COLECCIÓN SALK DE *A. thaliana* PARA EL GEN QUE CODIFICA PARA AtA6PR2.

Para determinar las características funcionales de AtA6PR2, se hace necesario contar con mutantes de *A. thaliana* para este gen. Para ello se identificaron 3 líneas insercionales de la colección SALK (**sección 3.1.1.**), una en exón 2 (*ata6pr2-1*) y dos en la 3'UTR (*ata6pr2-2* y *ata6pr2-3*). Sin embargo, a pesar de que las semillas entregadas son de la tercera generación (T3; <http://signal.salk.edu/>), se hace necesario verificar si corresponden a mutantes homocigotas, para utilizarlas en ensayos posteriores a este seminario de título. Cabe destacar que es fundamental obtener mutantes con inserción del T-DNA en al menos dos ubicaciones distintas dentro del gen, ya que nos permitirá tener líneas con distinto grado de funcionamiento de la proteína en cuestión, permitiendo avanzar en el conocimiento sobre posiciones claves dentro de AtA6PR2 para su correcto funcionamiento.

4.3.1. Genotipificación de DNA genómico a partir de líneas insercionales de la colección SALK

Una vez obtenidas las semillas de las líneas SALK, se sembraron aproximadamente 20 semillas según se detalla en **sección 3.1.2.**, en medio MS sin antibiótico, ya que se ha reportado que la resistencia a kanamicina que le confiere el T-DNA a los mutantes, suele silenciarse cuando está en más de una copia (O'Malley y cols., 2015). Además, se sembraron 10 semillas de *A. thaliana* tipo silvestre como control. Luego de 4 semanas, se colectaron 2 a 3 hojas roseta de cada planta y se extrajo su DNA genómico (**sección 3.2.1.**) para su posterior genotipificación.

Para llevar a cabo la genotipificación, en primer lugar se verificó la calidad e integridad de los DNA genómicos extraídos, realizando PCR para amplificar un fragmento de *actina* (sección 3.5.). Posteriormente se realizaron dos PCR, los cuales, según el patrón de bandas obtenidas, indicaran si las plantas analizadas son homocigotas o heterocigotas para la inserción del T-DNA o simplemente no presentan inserción, correspondiendo a plantas del tipo silvestre. Los PCR realizados son los denominados Gen-Gen, utilizando partidores que amplifican *AtA6PR2* completo (desde el codón de inicio al codón de término de la transcripción) y PCR Gen-LB, utilizando uno de los partidores que hibrida con la secuencia de *AtA6PR2* combinado con el partidor LBb3.1 que hibrida con la secuencia del T-DNA (Figura 4.26.).

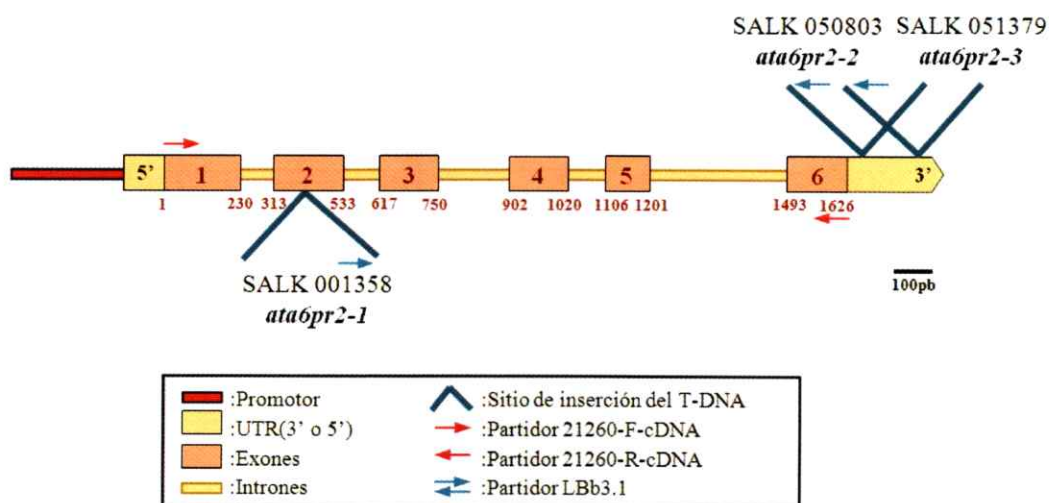


Figura 4.26.: Genotipificación de líneas insertionales de *AtA6PR2* de la colección SALK. Las V azules representan la inserción del T-DNA dentro de *AtA6PR2* en cada línea, acompañados por su código SALK y la denominación usada en este seminario de título. Barra de escala aproximada de 100 pb. PCR Gen-Gen representado al utilizar los partidores 21260-F-cDNA y 21260-R-cDNA (flechas rojas). PCR Gen-LB representado por partidor 21260-F-cDNA y LBb3.1 (flecha azul) para genotipificar líneas *ata6pr2-2* y *ata6pr2-3*, y partidores LBb3.1 y 21260R para genotipificar la línea *ata6pr2-1*. Bajo cada exón se indica el nucleótido de inicio y término de éstos.

Según lo expuesto anteriormente, un DNA genómico que amplifique un fragmento sólo en el PCR Gen-LB corresponderá a una planta homocigota para la inserción del T-

DNA. Si amplifica un fragmento tanto para el PCR Gen-Gen como para el PCR Gen-LB corresponderá a una planta heterocigota para la inserción del T-DNA y si por último, solo amplifica un fragmento en el PCR Gen-Gen corresponde a una planta del tipo silvestre (**Figura 4.27.**).

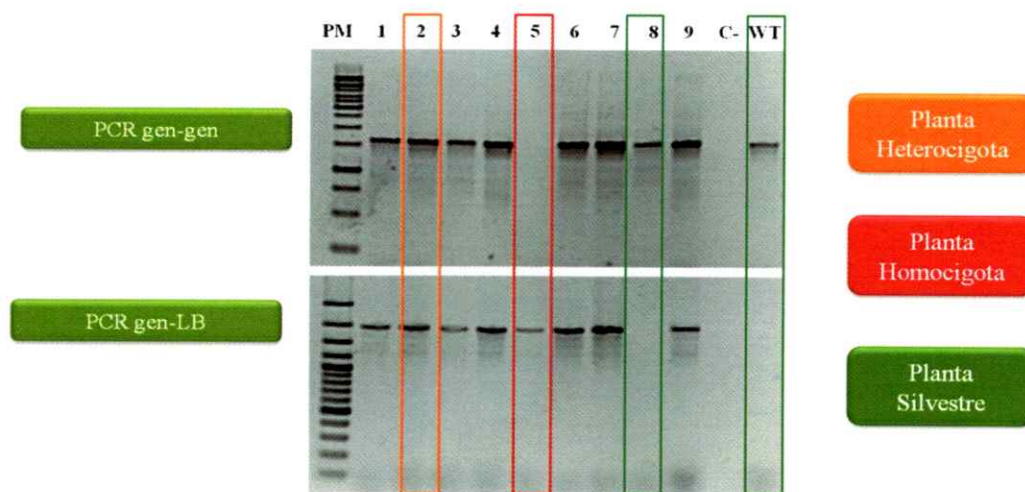


Figura 4.27.: Resultados teóricos de la genotipificación de líneas insercionales de *AtA6PR2* de la colección SALK. Una mutante homocigota (rojo) amplifica un fragmento solo para el PCR Gen-LB, mientras que una mutante heterocigota (naranja) amplifica fragmentos tanto para el PCR Gen-Gen como para PCR Gen-LB. Una planta tipo silvestre (verde, WT) amplifica un fragmento solo para el PCR Gen-Gen. Los carriles del 1-9 representan DNAg extraído a partir de plantas de la colección SALK. C- corresponde al control negativo de PCR. PM: marcador de peso molecular

Los resultados obtenidos para la genotipificación de la generación T3 de las líneas insercionales de *AtA6PR2* (**Tabla VII**), muestran que se obtuvo una planta homocigota para la inserción del T-DNA en la línea mutante *ata6pr2-3* y además, se obtuvieron 6 plantas heterocigotas para esta misma línea y 6 para la línea *ata6pr2-1*. Estas 13 líneas fueron usadas en los siguientes ensayos. Por el contrario, no se detectó la presencia del T-DNA en la genotipificación de la línea *ata6pr2-2*, a pesar de que todos los DNA genómicos fueron de buena calidad.

Se obtuvieron semillas de las trece plantas (1 homocigota, 12 heterocigota; columna "Plantas elegidas", **Tabla VII**) y se sembraron 10 semillas de cada una para analizar la siguiente generación (T4) (**sección 3.1.2.**). Luego de 8 semanas, se extrajo el DNA genómico de 2 a 3 hojas roseta de cada planta, se verificó su calidad amplificando un fragmento de *actina* por PCR (**sección 3.5.**), y se genotipificó.

Tabla VII: Resultados de la genotipificación de la generación T3 de líneas *ata6pr2-1*, *ata6pr2-2* y *ata6pr2-3*. La calidad de todos los DNA genómicos fue verificado (amplificación de un fragmento de *actina*) antes de realizar la genotipificación. Se muestra el número de plantas totales germinadas y el número de plantas homocigotas, heterocigotas y tipo silvestre luego de la genotipificación. Se identifican el número de las plantas homocigotas (**negrita**) y heterocigotas elegidas para pasar a la siguiente generación (T4).

Línea mutante	Nº total de plantas	Nº de plantas homocigotas	Nº de plantas heterocigotas	Nº de plantas silvestres	Plantas elegidas
<i>ata6pr2-1</i>	22	0	6	14	8, 11, 12, 18, 21 y 22
<i>ata6pr2-2</i>	17	0	0	0	0
<i>ata6pr2-3</i>	15	1	6	8	1, 3, 9, 11, 12, 13 y 14

Los resultados obtenidos para la genotipificación de la generación T4 de las líneas *ata6pr2-1* y *ata6pr2-3* (**Tabla VIII**), muestran que se obtuvo 5 líneas *ata6pr2-1* con un 100% de las plantas analizadas, homocigotas para la inserción del T-DNA (líneas 1.11, 1.12, 1.18, 1.21 y 1.22). Inesperadamente la línea *ata6pr2-3.1* no dio como resultado una descendencia 100% homocigota, lo cual será discutido en la **sección 5.3**. Para el resto de las líneas *ata6pr2-3* tampoco se obtuvo plantas homocigotas para la inserción del T-DNA, por lo que se eligieron ocho plantas heterocigotas para semillar y se sembraron 10 semillas de cada una para analizar la siguiente generación (T5) (**sección 3.1.2.**). Luego de 8 semanas, se extrajo DNA genómico de 2 a 3 hojas roseta de cada planta, se verificó su calidad amplificando un fragmento de *actina* por PCR (**sección 3.5.**), y se genotipificó.

Tabla VIII: Resultados de la genotipificación de la generación T4 de líneas *ata6pr2-1* y *ata6pr2-3*. La calidad de todos los DNA genómicos fue verificado (amplificación de un fragmento de *actina*) antes de realizar la genotipificación. Se listan las líneas mutantes provenientes de plantas heterocigotas y homocigotas (en negrita) en la generación T3. Se muestra el número de plantas totales germinadas luego de la siembra y el número de plantas homocigotas, heterocigotas y tipo silvestre luego de la genotipificación. En el caso de *ata6pr2-3*, se identifican el número de las líneas heterocigotas elegidas para pasar a la siguiente generación (T5).

Línea mutante	Nº total de plantas	Nº de plantas homocigotas	Nº de plantas heterocigotas	Nº de plantas silvestres	Plantas elegidas
<i>ata6pr2-1.8</i>	9	0	0	0	0
<i>ata6pr2-1.11</i>	9	9	0	0	100%homo
<i>ata6pr2-1.12</i>	8	8	0	0	100%homo
<i>ata6pr2-1.18</i>	8	8	0	0	100%homo
<i>ata6pr2-1.21</i>	7	7	0	0	100%homo
<i>ata6pr2-1.22</i>	8	8	0	0	100%homo
<i>ata6pr2-3.1</i>	10	0	0	10	0
<i>ata6pr2-3.3</i>	6	0	5	1	1 y 2
<i>ata6pr2-3.9</i>	12	0	0	1	0
<i>ata6pr2-3.11</i>	9	0	0	9	0
<i>ata6pr2-3.12</i>	9	0	9	0	2 y 6
<i>ata6pr2-3.13</i>	9	0	8	1	7 y 8
<i>ata6pr2-3.14</i>	9	0	9	0	6 y 7

Los resultados obtenidos para la genotipificación de la generación T5 de la línea *ata6pr2-3*(**Tabla IX**), muestran que se obtuvieron 2 plantas homocigotas para la inserción del T-DNA (planta 5 de la línea 3.3.2 y planta 9 de la línea 3.12.2) de todas las líneas analizadas.

Tabla IX: Resultados de la genotipificación de la generación T5 de la línea *ata6pr2-3*. La calidad de todos los DNA genómicos fue verificado (amplificación de un fragmento de *actina*) antes de realizar la genotipificación. Se muestra el número de plantas totales germinada luego de la siembra y el número de plantas homocigotas, heterocigotas y tipo silvestre luego de la genotipificación. Se identifican el número de las plantas homocigotas elegidas para semillar.

Línea mutante	Nº total de plantas	Nº de plantas homocigotas	Nº de plantas heterocigotas	Nº de plantas silvestres	Plantas elegidas
<i>ata6pr2-3.3.1</i>	7	0	4	2	0
<i>ata6pr2-3.3.2</i>	9	1	7	1	5
<i>ata6pr2-3.12.2</i>	9	1	8	0	9
<i>ata6pr2-3.12.6</i>	10	0	10	0	0
<i>ata6pr2-3.13.7</i>	10	0	8	2	0
<i>ata6pr2-3.13.8</i>	9	0	9	0	0
<i>ata6pr2-3.14.6</i>	9	0	8	1	0
<i>ata6pr2-3.14.7</i>	9	0	8	1	0

Con respecto a las características fenotípicas macroscópicas de las plantas homocigotas para la inserción del T-DNA, comparadas con las de plantas silvestres, se observa cualitativamente que plantas mutantes homocigotas de las líneas *ata6pr2-1* muestran una mayor variabilidad de fenotipos, incluso mostrando plantas con un retraso en la floración (**Figura 4.28. B**). Por el contrario, plantas homocigotas de las líneas *ata6pr2-3* no muestran diferencias aparentes en fenotipo con respecto a plantas silvestres de la misma edad (**Figura 4.28. C**).

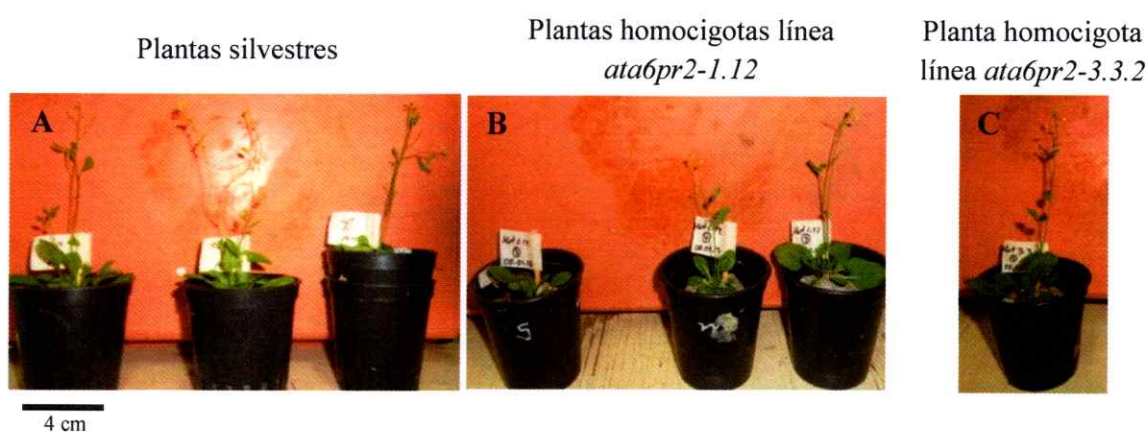


Figura 4.28.: Comparación fenotípica entre plantas silvestres y plantas homocigotas obtenidas para las líneas mutantes *ata6pr2-1.12* y *ata6pr2-3.3.2*. A. Planta silvestres B. Plantas de la línea homocigota *ata6pr2-1.12*. C. Planta homocigota de la línea *ata6pr2-3.3.2*. Todas las plantas poseen 10 semanas de edad.

Finalmente, los resultados obtenidos verifican la obtención de plantas homocigotas para la inserción del T-DNA para las líneas mutantes *ata6pr2-1* (**Tabla VIII**) y *ata6pr2-3* (**Tabla IX**) cumpliendo cabalmente con el Objetivo Específico 3.

5. DISCUSIÓN

El desarrollo de este seminario de título permitió obtener una primera aproximación en la caracterización de AtA6PR2, dando los primeros pasos para el descubrimiento del rol de esta posible aldosa-6-fosfato reductasa en *A. thaliana*. Mediante la utilización de técnicas de biología molecular fue posible la expresión *in vivo* de AtA6PR2-GFP en hojas de *N. tabacum*, lo cual permitió determinar que la localización subcelular de esta proteína es nuclear y citosólica, en el tejido estudiado, corroborando lo predicho por análisis *in silico*. Además, se obtuvieron y se verificaron molecularmente semillas provenientes de dos líneas de plantas *ata6pr2*- homocigotas de la colección SALK, mediante la genotipificación de las generaciones T3, T4 e incluso, en algunos casos, T5.

La investigación inició teniendo como antecedente previo que existen dos ORF en *A. thaliana* que poseen sobre un 65% de identidad aminoacídica con A6PRs de *Rosaceae*, lo cual es interesante considerando que *A. thaliana* es una *Brassicaceae* que transloca sacarosa como principal producto de la fotosíntesis. Además, es una planta tolerante a estrés por frío (Jarillo y cols., 1993) y se ha sugerido que la presencia de enzimas claves del metabolismo de polioles, como sorbitol, en plantas que no sintetizan estas moléculas como producto principal de la fotosíntesis, les conferiría tolerancia a estrés de tipo abiótico a éstas (Ahmad y cols, 1979). Por lo que determinar las características de AtA6PR1 y AtA6PR2 es de gran utilidad para entender el rol que cumplen estas proteínas en plantas de familias no-*Plantaginaceas* o no-*Rosaceae*.

En un estudio anterior, se caracterizó parcialmente AtA6PR1, determinando que esta proteína es citosólica (Zamudio, 2010). Además, se realizaron ensayos enzimáticos, determinando que AtA6PR1 es capaz de reducir NADP⁺ en presencia de sorbitol 6-fosfato, con aproximadamente la mitad de la actividad determinada para Mda6PR de manzana (Zamudio, 2010 y 2014). Sin embargo, de AtA6PR2 que comparte un 72% de identidad aminoácidica con AtA6PR1, no se tienen mayor antecedentes, salvo que se expresa diferencialmente en los distintos tejidos de *A. thaliana* (Figura 1.3.) y que su expresión relativa es entre 10-10.000 veces menor en cada uno de estos tejidos a la expresión de *AtA6PR1* (Francisca Díaz, datos no publicados; Zamudio, 2010). Es por ello, que para avanzar en el conocimiento de estas proteínas, se hace fundamental la caracterización de AtA6PR2.

5.1. Clonación del cDNA de *AtA6PR2* y generación de vectores de expresión que posean *AtA6PR2* fusionado a tags en su extremo N- y C-terminal.

Como primera aproximación a esta caracterización, se determinó la localización subcelular de AtA6PR2. Para ello, en primer lugar, se amplificó la secuencia nucleotídica de esta proteína a partir de cDNA sintetizado desde RNA de silicuas de *A. thaliana*. Luego de clonar AtA6PR2 con (AtA6PR2cs) y sin (AtA6PR2ss) codón de término de la traducción en pCR8, las digestiones enzimáticas de las colonias transformadas con vector pCR8-AtA6PR2cs y pCR8-AtA6PR2ss, indicaron la obtención de transformantes con el gen en sentido (F) y antisentido (R) con respecto a los sitios *attL1* y *attL2* del vector pCR8, para ambos constructos (Figura 4.6. A y B). Los vectores obtenidos que contienen el gen *AtA6PR2* en antisentido sirven como perfectos

controles negativo en ensayos posteriores, ya que sólo se diferencian en la imposibilidad de transcribir el gen *AtA6PR2* de forma completa o correcta con respecto a los que poseen el gen en sentido. La secuenciación dio como resultado una colonia con 100% de identidad nucleotídica con base de datos TAIR para *AtA6PR2csF*, *AtA6PR2csR*, *AtA6PR2ssF* y *AtA6PR2ssR* (Tablas V y VI).

Al realizar digestiones enzimáticas de las colonias putativas transformadas con las recombinaciones entre los vectores pCR8-*AtA6PR2cs* (F y R) y pCR8-*AtA6PR2ss* (F y R) con los vectores de expresión pMDC43 y pMDC85 respectivamente, no se logró obtener el patrón de bandas esperados. pMDC43 y pMDC85 pertenecen a la misma serie de vectores (Curtis y Grossniklaus, 2003), agregando GFP en el N- y C-terminal de la proteína de interés, respectivamente. Las recombinaciones fueron repetidas en 4 oportunidades, modificando la cantidad de vector de entrada y de destino, el tiempo de incubación y la temperatura de incubación (datos no mostrados), pero el resultado de la digestión enzimática siempre fue negativo. Estos resultados sugieren fuertemente que los vectores de expresión utilizados para la recombinación, no correspondían a los esperados, lo cual se podría deber a un error en la rotulación de éstos al momento de almacenarlos. Para corroborar esto, se realizó PCR con partidores que hibridan con zonas que flanquean la inserción de *AtA6PR2* en los vectores correspondientes, obteniendo una serie de bandas no coincidentes con la esperada (datos no mostrados), reafirmando la posibilidad de rotulación errónea y, por tanto, descartando definitivamente la utilización de estos vectores en este seminario de título.

Dado que no fue posible clonar *AtA6PR2* en los vectores de expresión tipo pMDC, y en la ausencia de otra serie de vectores disponible para fusionar tag GFP en el extremo N- y C-terminal de *AtA6PR2*, se eligió pGWB5 y pEarleyGate 202. Ambos vectores binarios comparten el mismo promotor (35S), pGWB5 fusiona un tag GFP en el extremo C-terminal de la proteína, y pEarleyGate202 fusiona un tag FLAG en el N-terminal, permitiendo posteriormente realizar ensayos de Western blot para detectar la proteína de interés.

Se obtuvo *E. coli* y *A. tumefaciens* transformado con vectores pEarleyGate202-*AtA6PR2cs* (F y R) y pGWB5-*AtA6PR2ss* (F y R), lo cual fue corroborado por digestiones enzimáticas y PCR. Para este seminario de título, se generaron los vectores pEarleyGate202-*AtA6PR2cs* (F y R) como una herramienta para ser utilizados en ensayos futuros, ya sea para corroborar los resultados obtenidos con pGWB5-*AtA6PR2ssF* y/o en ensayos que permitan seguir con la caracterización de *AtA6PR2*, por ejemplo en la complementación estable de las líneas *ata6pr2-*.

5.2. Determinación de la localización subcelular de *AtA6PR2*-GFP, mediante la transformación transitoria de hojas de tabaco

Al realizar la transformación transitoria de hojas de tabaco con vectores pGWB5-*AtA6PR2ssF*, pGWB5-*AtA6PR2ssR* y pGWB5 vacío, y realizar RT-PCR para corroborar la expresión de *AtA6PR2-GFP* en extractos de RNA total a partir de estas hojas, se observó que *AtA6PR2ssF-GFP* se expresa tal como se esperaba, ya que el gen *AtA6PR2* en este constructo hibrida de forma perfecta con los partidores generados para reconocer esta secuencia al estar en sentido con el promotor 35S. Por el contrario, no se

observó expresión de *AtA6PR2ssR-GFP* en hojas de tabaco transformadas transitoriamente, lo cual se esperaba debido a que el gen *AtA6PR2* en este constructo se encuentra en antisentido con respecto al promotor 35S, por lo que los partidores utilizados no reconocen la secuencia transcrita, en el caso de existir, asegurando que si ocurriera traducción, la secuencia obtenida no correspondería a la proteína *AtA6PR2* (**Figura 4.24.**). Esto último también sucedió para hojas transformadas con el vector pGWB5 vacío, donde debido a la ausencia del gen *AtA6PR2*, no se observó expresión de éste. Estos resultados determinaron que el vector construido pGWB5-*AtA6PR2ssF* debería permitir la expresión de *AtA6PR2-GFP* en hojas de tabaco transformadas transitoriamente y que los vectores pGWB5-*AtA6PR2ssR* y pGWB5 vacío, pueden ser utilizados como controles negativos de transformación, ya que no expresan *AtA6PR2-GFP*.

Para determinar la localización subcelular de *AtA6PR2-GFP*, se transformaron hojas nuevamente con los mismos vectores mencionados anteriormente, solo que esta vez se realizaron dos co-infiltraciones: pGWB5-*AtA6PR2ssF* más marcador citoplasma-núcleo y pGWB5-*AtA6PR2ssF* más marcador de tonoplasto (**Figura 4.25.**). Por microscopía confocal, se observó que *AtA6PR2-GFP* colocalizaba estrechamente con el marcador citoplasma-núcleo, sugiriendo fuertemente que la localización subcelular de *AtA6PR2* sería nuclear y citoplasmática, corroborando lo predicho por el programa PSORT II (**Figura 4.21.**).

Siguiendo lo predicho por el programa PSORT II, al utilizar el marcador de tonoplasto (membrana de la vacuola), se esperaba que la fluorescencia de *AtA6PR2-*

GFP se localizaba en la periferia de las células transformadas con este constructo (citoplasma) y que la fluorescencia del marcador de tonoplasto se localizara adyacente a éste (hacia el interior de la célula), demostrando la ubicación subcelular citoplasmática de AtA6PR2. Sin embargo, este patrón no fue obtenido de forma tan clara y evidente, lo cual se puede deber a que la separación espacial entre citoplasma y tonoplasto, en la célula, el microscopio no es capaz de distinguirla, sobrelapándose las fluorescencias de ambos fluoróforos utilizados (GFP y Cherry). Para lograr una mejor definición de la fluorescencia, se podría tratar la hoja transformada poniéndola en una solución hipertónica antes de ser observada al microscopio, lo cual produciría una reducción del tamaño vacuolar, permitiendo una mayor separación espacial entre el citosol y el tonoplasto.

Según los resultados obtenidos, la localización subcelular de AtA6PR2-GFP es citoplasmática y nuclear en células de hojas de tabaco. Si bien en otras especies vegetales aún no se ha reportado la localización de proteínas A6PRs en el núcleo, si hay evidencia de localización de estas proteínas en otros organelos, como cloroplastos (Yamaki, 1981; Liang y cols, 2012), por lo que debemos seguir trabajando para determinar por qué y qué rol, cumple AtA6PR2 en el núcleo y por qué no sólo se localiza en el citoplasma, donde ocurre normalmente la síntesis de sorbitol, lo cual podría deberse a un mecanismo de regulación de esta proteína bajo algún estímulo determinado. Otra opción poco probable, es que esta localización sea producto de un artefacto del constructo, lo cual podría ser verificado midiendo el peso molecular de ATA6PR2-GFP por Western blot contra GFP en un extracto de proteínas totales

provenientes de hojas de tabaco transformadas transitoriamente con pGWB5-AtA6PR2ssF (ver más detalles en proyecciones sección 6).

5.3. Obtención de mutantes insercionales homocigotas de la colección SALK de *A. thaliana* para el gen que codifica para AtA6PR2.

Al genotipificar la generación T3 de las tres líneas mutantes *ata6pr2*- entregadas por el Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto SALK, se obtuvo para la línea *ata6pr2-1* un 64% de plantas con genotipo silvestre y 36% con genotipo heterocigoto, para la línea *ata6pr2-2* no se pudo genotipificar las plantas, ya que los PCR no amplificaban ninguna banda, a pesar que la calidad de los DNAg a partir de ellas había sido corroborada, y para la línea *ata6pr2-3* 53% de las plantas presentaron genotipo silvestre, 40% genotipo heterocigoto y 7% genotipo homocigoto. Estos resultados, demuestran que siempre es necesario genotipificar las líneas mutantes recibidas de la colección SALK, a pesar de que las semillas entregadas provengan de la generación T3, la cual en teoría deberían ser homocigotas para la inserción del T-DNA (O'Malley y cols., 2015). Es fundamental obtener plantas homocigotas para la mutación, ya que con ellas será posible posteriormente realizar ensayos de funcionalidad del gen bajo estudio.

Para la línea *ata6pr2-1*, se eligieron las 6 plantas con genotipo heterocigoto para pasar a la siguiente generación y nuevamente genotipificar. De las 6 líneas de la generación T4, 5 pudieron ser genotipificadas y en todas ellas el 100% de las plantas presentaban genotipo homocigoto. Normalmente, se espera que en la generación T2 ocurra una segregación de tipo mendeliana de la inserción del T-DNA, es decir, 1:2:1 (homocigoto:heterocigoto:silvestre); debido a esto se esperaba en la generación T3 ver

algo de distorsión de esta relación con un aumento en el porcentaje de plantas con genotipo silvestre y homocigoto, y un agotamiento de los heterocigotos, lo cual se va evidenciando cada vez más a medida que se avanza en las generaciones (O'Malley y cols., 2015). Sin embargo, la obtención del 100% de las plantas con genotipo homocigoto, no es una proporción esperada, sugiriendo que posiblemente hayan ocurrido falsos positivos durante la genotipificación, debido a un error durante la realización de los PCRs, lo cual es poco probable ya que éstos se repitieron dos veces, obteniendo los mismos resultados. Dentro de estas líneas 100% homocigotas, se observaron fenotipos cualitativos muy distintos comparados con los observados en plantas silvestres (**Figura 4.28.**), sobre todo en el tiempo de floración y el tamaño de las plantas, por lo que se colectó semillas de al menos 2 plantas por línea, eligiendo a las que diferían mayormente en fenotipo, para su análisis en futuros ensayos.

Para la línea *ata6pr2-3*, se eligió la única planta T3 homocigota obtenida (*ata6pr2-3.1*) y las 6 plantas heterocigotas para pasar a la siguiente generación (T4). Inesperadamente, las plantas T4 provenientes de la planta homocigota no fueron 100% homocigota y por el contrario, dieron una descendencia 100% genotipo silvestre, sugiriendo fuertemente, que la planta *ata6pr2-3.1* podría corresponder a un falso positivo en la genotipificación. Por otro lado, la descendencia de 4 de las 6 líneas heterocigotas T3 dieron como resultado, en la generación T4, plantas con genotipo heterocigoto y silvestre para la inserción del T-DNA, eligiendo 2 plantas T4 heterocigotas de cada una de las cuatro líneas, para pasar a la siguiente generación (T5). De las 8 líneas resultantes para la generación T5, solo 2 plantas provenientes de dos líneas distintas, dieron

genotipo homocigoto, las cuales no presentaron un fenotipo diferente al observado en plantas silvestres.

Estos últimos resultados, sumados a la imposibilidad de genotipificar la línea mutante *ata6pr2-2*, sugieren fuertemente que al genotipificar la línea *ata6pr2-3*, simultáneamente se estaba genotipificando la línea *ata6pr2-2*, es decir, que el stock de semillas entregadas a partir de la colección SALK para *ata6pr2-3* era una mezcla entre mutantes *ata6pr2-2* y *ata6pr2-3*. Esto es factible considerando que la secuenciación de estas mutantes posee un 12,6% de error en la identificación del lugar correcto de la inserción del T-DNA y que además, existe un margen de error de 300 pb de bases de la posición real del T-DNA (O'Malley y cols., 2015). Esta posibilidad explicaría por qué fue necesario llegar a la generación T5 en la genotipificación de esta línea mutante y por qué solo se obtuvieron 2 plantas homocigotas para la inserción del T-DNA, de un total de 72 plantas. Esta predicción podría ser corroborada en un futuro, por secuenciación de los fragmentos amplificados durante la genotipificación de estas plantas.

6. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos en este seminario de título, se puede concluir que:

1. Se clonó *AtA6PR2* en vectores de expresión que fusionaban distintos tag a los extremos N- y C-terminal de la proteína, generándose los vectores pEarlyGate202-AtA6PR2cs (F y R) y pGWB5-AtA6PR2ss (F y R).

2. Se determinó la localización subcelular de AtA6PR2-GFP en células de hojas de tabaco transformadas transitoriamente con el vector pGWB5-AtA6PR2ss, la cual corresponde a citoplasmática y nuclear, corroborando lo predicho por el programa PSORT II.

3. Se genotipificaron 3 líneas mutantes *ata6pr2-*, obteniendo para dos de ellas plantas con genotipo homocigoto para la inserción del T-DNA en dos posiciones distintas del gen (exón 2 y UTR 3' en líneas 2.1 y 2.3, respectivamente).

Por lo tanto, ha sido cumplido el objetivo general y por ende, todos los objetivos específicos de esta investigación.



7. PROYECCIONES

Si bien en este trabajo se determinó por microscopía confocal la localización subcelular de AtA6PR2-GFP en hojas de tabaco, este resultado puede ser corroborado en futuros ensayos de fraccionamiento subcelular y Western blot, utilizando los vectores pEarlyGate202-AtA6PR2cs (F y R) generados en este seminario de título. Conjuntamente, se podría realizar un Western blot utilizando anticuerpo α -GFP, a un extracto de proteínas proveniente de hojas de tabaco transformadas transitoriamente con pGWB5-AtA6PR2ssF, para determinar si la proteína AtA6PR2 se está expresando en un 100% fusionada a GFP, o si existe un porcentaje en el cual se está expresando GFP separado de AtA6PR2, lo cual daría respuesta a la localización nuclear observada por microscopía, ya que debido a su pequeño tamaño, GFP puede entrar en los poros nucleares, por lo que GFP no fusionado a otros polipéptidos se encuentra tanto en el citoplasma y el núcleo en las células vegetales, animales y de levaduras (Hanson y Köhler, 2001). Además, sería interesante en el futuro, transformar de forma estable *A. thaliana* con un constructo que tuviera el promotor propio de *AtA6PR2* y el gen *AtA6PR2* fusionado a GFP, para así determinar si la localización de AtA6PR2-GFP observada en hojas de trabajo corresponde efectivamente a la que ocupa en *A. thaliana*, o este resultado corresponde a un efecto del tejido utilizado. Esto último ha sido reportado en un número muy reducido de investigaciones, en las cuales se ha observado la localización incorrecta o incompleta de proteínas fusionadas a tags expresadas heterológicamente en otra especie (Kimura y cols., 1993).

Finalmente, será de gran utilidad, en el futuro, mandar a secuenciar los fragmentos obtenidos en las plantas genotipificadas y calificadas como homocigotas

para la inserción, para así corroborar la posición exacta del T-DNA en ellas, permitiendo generar una fuente de información que servirá para comprender la importancia del sector de la secuencia de *AtA6PR2* que está siendo interrumpida por el T-DNA, en el funcionamiento de la proteína, cuando se realicen ensayos de funcionalidad. Además, para complementar esta información, se hace necesario realizar RT-qPCR para determinar los niveles de transcrito de *AtA6PR1* y *AtA6PR2* en estas líneas homocigotas, para luego someter las plantas a distintas condiciones de estrés abiótico y comparar estos perfiles de expresión.

Todos estos ensayos propuestos, permitirán avanzar en la caracterización de *AtA6PR2* en *A. thaliana*, como un modelo para comprender el rol de A6PRs en plantas de familias no-*Rosaceae* y no-*Plantaginaceae*.

8. REFERENCIAS

- Aguayo, M. F., Ampuero, D., Mandujano, P., Parada, R., Muñoz, R., Gallart, M., Handford, M. (2013). Sorbitol dehydrogenase is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 205-206, 63–75.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2010). *Biología Molecular de la Célula*, traducción al español de la 5ª edición. Editorial Omega, Barcelona. En Bs. As. distribuye Cúspide.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadriab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N.; Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. & Ecker J.R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653657.
- Ahmad, I., Lahrer, F. & Stewart, G. R. (1979). Sorbitol, a compatible osmotic solute in *Plantago maritima*. *New Phytol.* 82(3): 671-678.
- Bialeski, R.L. (1982). Sugar alcohols. In: Loewus F.A., Tanner, W. (Eds), *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. 13A. *Plant Carbohydrates I*. Springer, Berlin, pp: 158-192.
- Brown, P. H., & Hu, H. (1996). Phloem Mobility of Boron is Species Dependent: Evidence for Phloem Mobility in Sorbitol-rich Species. *Annals of Botany*, 77, 497–506.
- Christie, P. J., Hahn, M., Walbot, V. (1991). Low-Temperature Accumulation of Alcohol Dehydrogenase-1 mRNA and Protein Activity in Maize and Rice Seedlings. *Plant Physiology* 95(3): 699-706.
- Curtis M.D. & Grossniklaus U. (2003). A Gateway™ cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* 133:462-469.
- Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., & Pikaard, C. S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*, 45(4), 616-629.
- Galinski E. A. & Truper H.G. (1994). Microbial behavior in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev* 15: 95-108.

- Gibeaut, D. M.; Hulett, J.; Cramer, G. R. & Seeman, J. R.** (1997). Maximal Biomass of *Arabidopsis thaliana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. *Plant Physiology*, 115: 317-319.
- Hanson, M. R., & Köhler, R. H.** (2001). GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 52(356), 529-539.
- Hartl F. & Hayer-Hartl M.**(2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852–1858.
- Jarillo, J. A., Leyva, A., Salinas, J., Martínez-Zapater, J. M.**(1993). Low Temperature Induces the Accumulation of Alcohol Dehydrogenase mRNA in *Arabidopsis thaliana*, a Chilling-Tolerant Plant. *Plant Physiology* 101: 833-837.
- Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D. W., Zhao, W., Schiller, K. C., Gatzke, N., Sung, D. Y., Guy, C. L.** (2004). Exploring the Temperature-Stress Metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136: 4159-4168.
- Kimura, T., Takeda, S., Kyojuka, J., Asahi, T., Shimamoto, K., & Nakamura, K.** (1993). The presequence of a precursor to the delta-subunit of sweet potato [*Ipomoea batatas*] mitochondrial F1ATPase is not sufficient for the transport of beta-glucuronidase (GUS) into mitochondria of tobacco, rice and yeast cells. *Plant and Cell Physiology* 34: 345–355.
- Lewis D.H.** (1984). Physiology and metabolism of alditols. In: Lewis DH (ed), Storage carbohydrates in vascular plants, pp. 157. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Liang, D., Cui, M., Wu, S., & Ma, F. W.** (2012). Genomic structure, sub-cellular localization, and promoter analysis of the gene encoding sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from apple. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30(4), 904-914.
- Lippincot-Schwartz J. & Patterson GH.**(2003). Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 300:87–91.
- Loescher, W.H.**(1987). Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiol. Plantarum* 70:553-557.
- Mandujano, P.**(2010). Localización sub-celular y caracterización bioquímica de AtSDL una probable sorbitol deshidrogenasa. Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas mención Biología Celular, Molecular y Neurociencias. Universidad de Chile, Santiago, Chile.

- Matsumoto, T.** (2008). *Phytochemistry Research Progress*. Ed. Nova; Capítulo 4: 75-82.
- Murashige, T. & Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Nakagawa, T., Ishiguro, S., & Kimura, T.** (2009). Gateway vectors for plant transformation. *Plant biotechnology*, 26(3), 275-284.
- Nelson, B.K., Cai, X. & Nebenfuhr, A.** (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J.* 51, 1126–1136.
- Ohkawa, W., Moriya, S., Kanahama, K., Kanayama, Y.** (2008). Re-Evaluation of Sorbitol Metabolism in Fruit from *Rosaceae* Trees. *Acta Hort.*; 772: 159-166.
- Ohta, K., Moriguchi, R., Kanahama, K., Yamaki, S., Kanayama Y.** (2005). Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant. *Phytochemistry* 66: 2822-2828.
- O'Malley, R. C., Barragan, C. C., & Ecker, J. R.** (2015). A User's Guide to the Arabidopsis T-DNA Insertion Mutant Collections. *Plant Functional Genomics: Methods and Protocols*, 323-342.
- Palmer, E., & Freeman, T.** (2004). Investigation into the use of C-and N-terminal GFP fusion proteins for subcellular localization studies using reverse transfection microarrays. *Comparative and functional genomics*, 5(4), 342-353.
- Parada, R.** (2011). Análisis del patrón de expresión de AtSDL, una posible sorbitol deshidrogenasa en Arabidopsis thaliana. Seminario de título para Ingeniería en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile, Santiago. Chile.
- Pommerrenig, B., Papini-Terzi, F. S., & Sauer, N.** (2007). Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. *Plant Physiology* 144(2), 1029–38.
- Reidel, E. J., Rennie, E. a, Amiard, V., Cheng, L., & Turgeon, R.** (2009). Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiology* 149(3), 1601–8.
- Rumpho, M. E., Edwards, G. E., & Loescher, W. H.** (1983). A Pathway for Photosynthetic Carbon Flow to Mannitol in Celery Leaves Activity and Localization of Key Enzymes. *Plant physiology* 73(4), 869-873.

- Simpson, K.** (2015) "Identificación de factores de transcripción capaces de transactivar al promotor del gen PSY2 de *D. carota*" Tesis de Magister en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UCH.
- Shen B., Jensen R.G. & Bohnert H.J.** (1997). Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiology* 115:527-532.
- Smirnoff, N., & Cumbes, Q. J.** (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057–1060.
- Stoop, J., Williamson, J., & Masonpharr, D.** (1996). Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science*, 1(5), 139–144.
- Watari, J., Kobae, Y., Yamaki, S., Yamada, K., Toyofuku, K., Tabuchi, T., Shiratake, K.** (2004). Identification of Sorbitol Transporters Expressed in Phloem of Apple Source Leaves. *Plant Cell Physiology*, 45(8): 1032-1041.
- Williamson J.D., Stoop J.M., Massel M.O., Conkling M.A., Pharr D.M.** (1995). "Sequence analysis of a mannitol dehydrogenase cDNA from plants reveals a function for the pathogenesis-related protein ELI3". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (16): 7148–52.
- Williamson, J. D., Jennings, D. B., Guo, W. W., Pharr, D. M., & Ehrenshaft, M.** (2002). Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: polyols—multifunctional plant protection?. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(4), 467-473.
- Yamaki, S.** (1981). Subcellular localization of sorbitol-6-phosphate dehydrogenase in protoplast from apple cotyledons. *Plant and Cell Physiology*, 22(3), 359-367.
- Zamudio, S.** (2010) "Determinación de la localización subcelular y la expresión de *AtS6PDH*, una potencial sorbitol-6-P deshidrogenasa en *Arabidopsisthaliana*". Seminario de Título, Ing. en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, UCH.
- Zamudio, S.** (2014) "Estudios Bioquímicos y Fisiológicos de *AtA6PR*, una posible Aldosa-6-fosfato Reductasa de *Arabidopsisthaliana*". Tesis de Magister en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UCH.

9. ANEXO

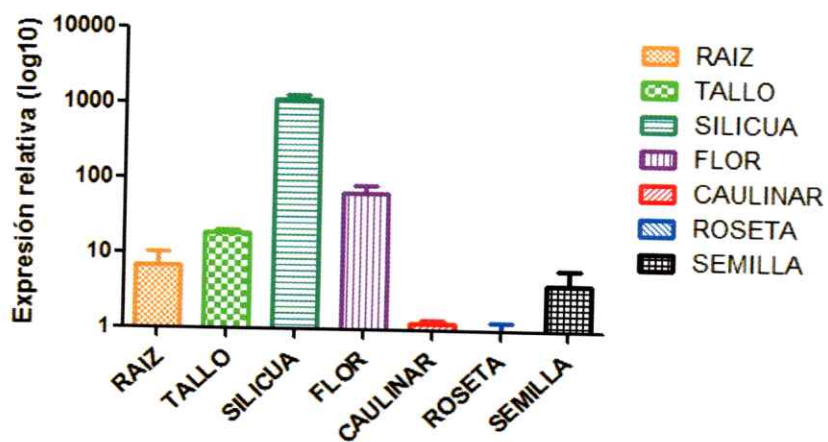


Figura 9.1.: Expresión relativa de *AtA6PR2* (At2g21260) en los distintos tejidos de *A. thaliana* tipo silvestre. Expresión génica relativa al promedio de expresión en rosetas, correspondiente al menor valor de expresión obtenido. Se utilizó como housekeeping gen 26410. Datos de Francisca Díaz.