

UCH-FC
Biotecnología
W/968
C.1



ESCUELA DE PREGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



“Generación de un anticuerpo para el estudio de AtA6PR, una enzima involucrada en el metabolismo del sorbitol en *Arabidopsis thaliana*”.

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

Joel Wurman Rodrich

Director del Seminario de Título:
Michael Handford, PhD

Enero - 2013
Santiago – Chile



ESCUELA DE PREGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION DE SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Joel Wurman Rodrich:

“Generación de un anticuerpo para el estudio de AtA6PR, una enzima involucrada en el metabolismo del sorbitol en Arabidopsis thaliana”.

Ha sido aprobado por la comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

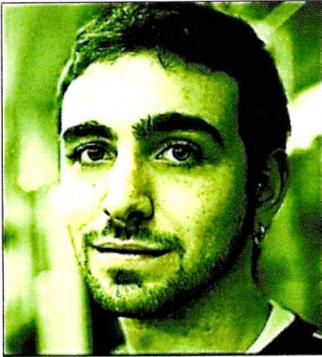
Dr. Michael Handford
Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dr. Marcelo Baeza
Presidente de la Comisión

Dra. María Rosa Bono
Evaluadora

Santiago de Chile, Enero de 2013



Me es muy extraño tener que hablar sobre mí mismo, no obstante, pienso que es bueno hacer un recuento de los hechos y eventos que te marcan la vida y te forman como persona. Nací el primero de Julio de 1988 a las 9:10 am en la clínica Las Condes, fecha y lugar que le permiten a mi madre evaluar mi carta astral con gran habilidad. Fui nombrado Joel por mis padres Eugenie Rodrich y León Wurman, y como lo dice la ley judía, fui circuncidado a los 8 días de vida. A los 2 años entré al prekindergarten Galvarino Gallardo, y a los 6 al colegio Instituto Hebreo. En esta temprana etapa de mi vida conocí a mi primer mejor amigo A. K. con quien compartí bonitos momentos tanto en el colegio como en la plaza "del Hoyo" frente al primer domicilio en dónde viví. En primaria fui reconocido como el niño que habla raro por los peruanismos que heredé de mi madre. En ese ciclo también conocí a mi actual mejor amigo M. M. quien me ha acompañado cerca (y también desde EEUU) en los mejores y peores momentos. En esos tiempos mi madre me insistió fuertemente que realizara algún deporte y que aprendiera a tocar algún instrumento musical, sin embargo, y luego de haber intentado jugar básquetbol, natación, fútbol, tenis, gimnasia olímpica, tocar guitarra y piano, no hubo forma de despegarme de mis pasatiempos más "geeks" como los videojuegos y el juego de cartas intercambiables Magic el cual depravadamente compartí con M. M. En 2007, al haber terminado mis estudios escolares entré a la carrera que quería, Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Durante la carrera participé como "Bajo" en el Coro de la facultad por 4 de los años de estudio. Habiendo cursado y aprobado todos los ramos de la carrera en primera instancia, realicé dos prácticas y también este seminario de Título en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal bajo la tutela del Dr. Michael Handford.

Actualmente sigo trabajando en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal pero con intensiones de continuar mis estudios en el extranjero.



Agradezco a las siguientes personas por la ayuda directa o apoyo incondicional que me dieron durante el desarrollo de mi seminario de Título:

Aitor de Azcuénaga, Jenny Rodrich, León Wurman, Daniel Wurman, Alan Wurman, Michael Handford, Sofía Zamudio, Diego Ampuero, M^a Rosa Bono, Leonardo Vargas, Roberto Parada, Moisés Michelow, Gonzalo Díaz, Mariene Henríquez, Sebastián Urbina, Claudia Stange, Lorena Norambuena, Angélica Vega, Jorge Araya.

ÍNDICE DE CONTENIDO.

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Polioles.....	1
1.2 Sorbitol.....	2
1.2.1 Ruta metabólica del sorbitol.....	3
1.3 Sorbitol-6-fosfato deshidrogenasas o Aldosa-6-fosfato reductasas (A6PR).....	4
1.3.1 A6PR en estrés abiótico.....	6
1.4 Sorbitol en no rosáceas y no plantagináceas.....	7
1.5 Sorbitol en Arabidopsis.....	8
1.6 Estudios previos sobre AtA6PR.....	9
1.6.1 Expresión <i>in silico</i> e <i>in vivo</i> de AtA6PR.....	9
1.7 Los anticuerpos.....	13
2. OBJETIVOS.....	15

2.1	Objetivo general.....	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1	Material biológico.....	16
3.1.1	Crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	16
3.1.2	Preparación y transformación de <i>E. coli</i> quimio-competentes.....	16
3.1.3	Crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
3.2	Biología molecular.....	17
3.2.1	Diseño de partidores.....	17
3.2.2	Electroforesis en geles de agarosa.....	18
3.2.3	Reacción de PCR y purificación de <i>AtA6PR</i>	19
3.2.4	Agregado de adenina 3' al amplificado <i>BamHI-AtA6PR-NotI</i>	20
3.2.5	Clonamiento de <i>BamHI-AtA6PR-NotI</i> en el vector <i>pCR8</i> [®]	20
3.2.6	Mini-preparación de DNA plasmidial.....	21
3.2.7	Digestión de los vectores <i>pCR8/BamHI-AtA6PR-NotI</i> y <i>pET28a/AtA6PR</i> con las enzimas de restricción <i>BamHI</i> y <i>NotI</i>	21
3.2.8	Reacción de ligación entre el fragmento <i>AtA6PR</i> y <i>pET28a</i>	22
3.3	Bioquímica.....	22
3.3.1	Expresión de His- <i>AtA6PR</i> en <i>E. coli</i> cepa <i>BL21(DE3)pLysS</i>	22
3.3.2	Extracción de proteínas de <i>E. coli</i>	23

3.3.3	Cuantificación de proteínas.....	23
3.3.4	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE).....	24
3.3.5	Inmunodetección del epítipo 6xHis mediante <i>western blot</i>	25
3.3.6	Purificación de His-AtA6PR por columna de afinidad a ion metálico (Ni).....	26
3.3.7	Preparación de un antisuero de ratón α -His-AtA6PR.....	27
3.3.8	Evaluación de afinidad del presuero por His-AtA6PR mediante ELISA, <i>dot blot</i> y <i>western blot</i>	28
3.3.9	Evaluación de afinidad del antisuero a AtA6PR mediante <i>western blot</i>	30
3.3.10	Extracción de proteínas de <i>A. thaliana</i>	31
3.3.11	<i>Western blot</i> de <i>A. thaliana</i> wt y mutantes <i>ata6pr-1</i> y <i>ata6pr-2</i> utilizando los sueros de R1 y R2.....	32
4.	RESULTADOS.....	33
4.1	Construcción del vector de expresión de His-AtA6PR en bacterias.....	33
4.1.1	Clonamiento de AtA6PR en <i>pET28a</i> mediante <i>pCR8</i>	33
4.2	Expresión de His-AtA6PR en bacterias.....	36
4.3	Purificación de His-AtA6PR.....	38
4.4	Análisis del presuero.....	41
4.4.1	ELISA.....	41
4.4.2	<i>Dot blot</i>	43

4.4.3	<i>Western blot</i>	45
4.5	Análisis del antisuero.	46
4.6	Detección de AtA6PR en <i>A. thaliana</i> wt y mutantes <i>ata6pr-1</i> y <i>ata6pr-2</i>	50
5.	DISCUSIÓN	52
6.	CONCLUSIONES.....	60
7.	CONGRESOS.....	61
7.1	Asistencia.....	61
7.2	Participación.	61
8.	REFERENCIAS.....	62

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla I: Partidores diseñados para la amplificación del fragmento <i>AtA6PR</i>	18
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Ruta metabólica del sorbitol en hojas y órganos sumidero.	3
Figura 2: Expresión in silico de AtA6PR.	10
Figura 3: Amplificación de <i>BamHI-AtA6PR-NotI</i>	34
Figura 4: Digestiones de los vectores <i>pET28a</i> y <i>pCR8/BamHI-AtA6PR-NotI</i>	35
Figura 5: Análisis de inserción y orientación del fragmento <i>BamHI-AtA6PR-NotI</i> clonado en el vector <i>pET28a</i>	36
Figura 6: Expresión de His-AtA6PR en <i>E. coli</i>	37
Figura 7: Purificación de His-AtA6PR con columna de afinidad a Ni.	39
Figura 8: Ensayos de ELISA para evaluar la afinidad de los presueros por AtA6PR. ..	42
Figura 9: <i>Dot blot</i> para la evaluación de la concentración apropiada en el uso de los presueros α -His-AtA6PR.	44
Figura 10: <i>Western blot</i> para la evaluación de afinidad de los presueros por His-AtA6PR.	45
Figura 11: <i>Western blot</i> para análisis del límite de detección.	47
Figura 12: Prueba de especificidad de los sueros de R1 y R2 mediante <i>western blot</i> . 49	
Figura 13: SDS-PAGE y <i>western blots</i> de <i>A. thaliana</i> wt y mutantes <i>ata6pr-1</i> y <i>ata6pr-2</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS.

°C	Grados Celsius
6xHis	Epítipo de 6 histidinas en tándem
A6PR	Sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa
Ac	Anticuerpo
APS	Persulfato de amonio
AtA6PR	Sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSDH	Sorbitol deshidrogenasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>
BCIP	5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato
BSA	Albúmina de suero de bovino
CB	Buffer de tapizado o "Coating Buffer"
cDNA	Ácido desoxi-ribonucleico complementario
CDS	Región codificante
DNA	Ácido desoxi-ribonucleico
dNTPs	Desoxi-nucleótidos trifosfato
DO ₄₅₀	Densidad óptica a 450 nm
DO ₅₉₅	Densidad óptica a 595 nm
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
EC	Extracto crudo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
F1	Fracción insoluble
FS	Fracción soluble
F2	Segunda progenie
gDNA	Ácido desoxi-ribonucleico genómico
GFP	Proteína fluorescente verde
G6P	Glucosa-6-fosfato
h	Horas
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
kHz	Kilohertz
LB	Medio de cultivo bacteriano "Luria Bertani"
MdA6PR	Sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa de <i>Malus domestica</i>
min	Minutos
mm	Milimetro
NBT	Cloruro de nitro-blue tetrazolium o nitroazul de tetrazolio
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la DNA polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la DNA polimerasa en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción de transcriptasa reversa
SDH	Sorbitol deshidrogenasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes
s	Segundos
S6P	Sorbitol-6-fosfato
T°	Temperatura
TAIR	" <i>The Arabidopsis Information Resource</i> "
TBS	Buffer tris salino
TBS-T	Buffer tris salino con Tween-20
TEMED	Tetrametiletilendiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidades enzimáticas
V	Volts

RESUMEN.

El transporte de sorbitol, un polialcohol reducido de glucosa, a través del floema confiere a las plantas algunas ventajas como una mejor movilidad de boro entre los órganos, y mayor resistencia a distintos estrés abióticos (ej. osmótico, salino). En rosáceas y plantagináceas, el sorbitol es sintetizado a partir de glucosa-6-fosfato, proveniente de la fotosíntesis, por la acción de sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa (A6PR) y sorbitol-6-fosfato fosfatasa, siendo A6PR la enzima clave para la generación de sorbitol. Luego, este poliol es translocado a través del floema hasta los órganos sumideros en donde puede ser transformado en fructosa por sorbitol deshidrogenasa (SDH). La expresión de A6PR aumenta en las condiciones de estrés mencionadas, sin embargo son pocos los estudios que se han realizado en plantas que no transportan sorbitol, entre estas *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), en la cual se encontró una sorbitol deshidrogenasa (AtSDH) y sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa (AtA6PR). Se desconoce la función de AtA6PR, y dado que esta especie no acumula sorbitol, existe un gran interés en estudiar el rol fisiológico que esta enzima podría estar cumpliendo. AtA6PR posee un 69% de identidad aminoacídica respecto de su homólogo en manzano. En estudios de *Nicotiana tabacum* transformadas transitoriamente, AtA6PR-GFP posee una localización citoplasmática. Sin embargo, es necesario corroborar este resultado en *A. thaliana*. Por este motivo, se pretende utilizar la técnica de inmunolocalización para entender más del rol que esta enzima pudiera estar cumpliendo en plantas que no transportan sorbitol. En este trabajo, se elaboró un sistema de expresión de His-AtA6PR en *Escherichia coli*, se purificó esta proteína mediante una columna de afinidad a Ni y se generó un anticuerpo policlonal que reconoce a AtA6PR. Con este último se analizó la acumulación de AtA6PR en

muestras obtenidas de plántulas completas de *A. thaliana* silvestre y dos mutantes insercionales *ata6pr*- crecidas durante 10 días. Con este resultado se demostró que el antisuero generado es efectivo y específico para AtA6PR, y también se demostró la presencia de AtA6PR en la planta silvestre y la disminución de la expresión de esta proteína en las mutantes insercionales.

ABSTRACT.

The transport of sorbitol, a polyol formed by glucose reduction, through the phloem confers certain advantages to plants such as improved boron mobility between organs, and increased resistance to different abiotic stresses (e.g. osmotic, saline). In *Rosaceae* and *Plantaginaceae* families, sorbitol is synthesised from glucose-6-phosphate by the action of sorbitol-6-phosphate dehydrogenase (A6PR) and sorbitol-6-phosphate phosphatase, being A6PR the key enzyme for sorbitol production. This polyol is then translocated through the phloem to sink organs where it can be oxidised to fructose by sorbitol dehydrogenase (SDH). *A6PR* expression is increased in the stress conditions mentioned. However, only a few studies have been performed in plants that do not transport or accumulate sorbitol, among these *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) in which a sorbitol dehydrogenase (AtSDH) and a sorbitol-6-phosphate dehydrogenase have been found (AtA6PR). AtA6PR's function is still unknown, and since this specie does not accumulate sorbitol, there is great interest in studying the physiological role that this enzyme could be performing. AtA6PR has an identity of 69% with respect to its apple homologue. In studies of transiently-transformed *Nicotiana tabacum* leaves, AtA6PR-GFP was localised in the cytoplasm. However, it is necessary to confirm this result in *A. thaliana*. For this reason, we intend to use immunolocalisation to understand more about the role that this enzyme could be accomplishing in non-sorbitol accumulating plants. In this work, we expressed His-AtA6PR in *Escherichia coli*; subsequently, this protein was purified using a Ni affinity column to produce a polyclonal antibody which specifically recognises AtA6PR. With this tool AtA6PR accumulation was analysed in *A. thaliana* wild-type and insertional mutants *ata6pr*-grown for 10 days. This result demonstrates that the generated antiserum is effective

and specific for AtA6PR, and also demonstrates the presence of AtA6PR in wild-type plantlets and its decrease in expression in the insertional mutants.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Polioles.

Los polioles, polialcoholes o alcoholes de azúcar son compuestos químicos orgánicos reducidos desde azúcares (aldosas o cetosas) cuya cadena de carbonos puede ser lineal o cíclica. En estos, el grupo carbonilo ha sido sustituido por un grupo hidroxilo primario o secundario siendo la fórmula general $H(HCHO)_{n+1}H$. Los polialcoholes se caracterizan por poseer tres o más átomos de carbono en su estructura, cada uno con un grupo hidroxilo (Nidal y col, 2011; Noiraud y col, 2001). Dentro del universo de los polialcoholes existe un segmento de gran importancia en el metabolismo de las plantas, y algunos se encuentran ampliamente distribuidos en angiospermas cumpliendo variadas funciones fisiológicas fundamentales (Lewis y Smith, 1967). El poliol con mayor distribución es manitol, que tiene un rol osmoprotector en *Populus tomentosa* (Álamo), donde la acumulación de este poliol permite que la planta tenga una mayor tolerancia al estrés salino (Hu y col, 2005).

No obstante, la función fisiológica principal de los polioles es transportar carbono a través del floema en ciertas familias de plantas, en donde se ha descrito que el manitol (en apiáceas, oleáceas, combretáceas y plantagináceas), galactitol (en celastráceas) y sorbitol (en plantagináceas y rosáceas) cumplen con esta función (Watari y col, 2004). Este rol permite que el carbono sintetizado en los órganos fotosintéticos (hojas maduras) llegue hasta los órganos sumideros (flores, frutos, raíces y hojas nuevas). Sin embargo, cabe destacar que en su mayoría, las plantas superiores transportan este

carbono principalmente en forma de azúcares, como sacarosa, estaquiosa y rafinosa, y no como poliol (Zimmermann, 1960).

A pesar de lo anterior, se han sugerido ciertos roles de los polialcoholes incluyendo osmoprotección, resistencia a especies reactivas de oxígeno, almacenaje de poder reductor y participación en interacciones planta-patógeno (Reidel y col, 2009). La translocación de polioles en el floema otorga ciertas ventajas como mayor protección contra radicales libres, mayor eficiencia en el uso del carbono y una mejor movilidad de boro, y además un aumento de la concentración de polioles confiere a la planta una mayor resistencia al estrés salino y al estrés hídrico (Pharr y col, 1995; Stoop y col, 1996; Smirnoff y Cumbers, 1989; Shen y col, 1997; Bellaloui y col, 1999; Lehto y col, 2004). Nuestro interés se centra específicamente en el sorbitol que en el caso de las plantas de las familias rosaceae (e.g. duraznero, manzano, níspero, almendro, entre varios otros) y plantaginaceae (e.g. llantén), es la principal forma de carbono transportado por el floema.

1.2 Sorbitol.

El sorbitol o glucitol es un alcohol de azúcar reducido desde glucosa y que tiene la particularidad de tener seis grupos hidroxilo en su estructura molecular. Estos grupos OH confieren a esta molécula la característica de ser un soluto citoplasmático compatible, proveyendo a células vegetales una manera de igualar los potenciales hídricos de citoplasma y vacuola (Ahmad y col, 1979). En efecto en varias especies del género *Plantago* (e.g. *P. coronopus*, *P. lanceolata*, *P. major*, *P. maritima*, *P. media*) se ha descrito que hay un aumento de sorbitol bajo un estrés salino (Ahmad y col, 1979; Lambers y col, 1981; Königshofer, 1983; Smekens y van Tienderen, 2001).

1.2.1 Ruta metabólica del sorbitol.

Como se mencionó anteriormente, el sorbitol en las plantas rosáceas y plantagináceas es el principal fotosintato. Es producido en las hojas maduras a partir de glucosa-6-fosfato (G6P), proveniente de la fotosíntesis, el cual es reducido a sorbitol-6-fosfato (S6P) por la enzima sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa NADP-dependiente (también denominada aldosa-6-fosfato reductasa, A6PR, EC 1.1.1.200; Negm y Loescher, 1981)

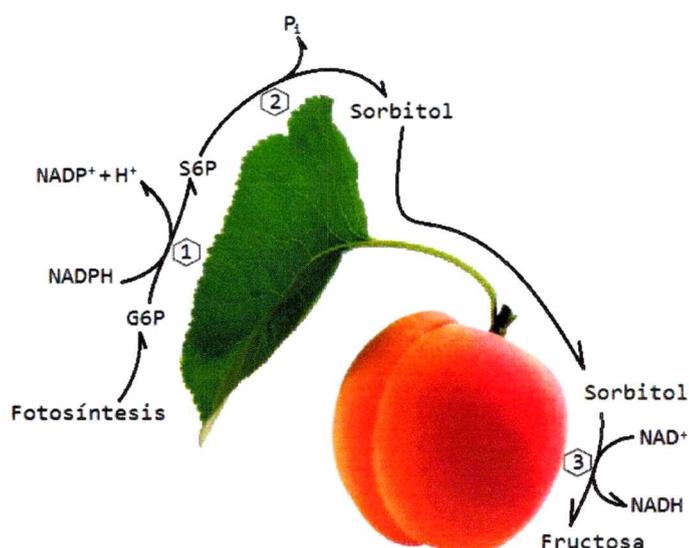


Figura 1: Ruta metabólica del sorbitol en hojas y órganos sumidero.

El sorbitol es sintetizado en hojas maduras por A6PR (1) y S6PP (2). En los órganos sumidero el sorbitol es acumulado, o transformado en fructosa por la enzima NAD-SDH (3). G6P: Glucosa-6-fosfato. S6P: Sorbitol-6-fosfato. Pi: Fosfato inorgánico.

y desfosforilado por la enzima sorbitol-6-fosfato fosfatasa (S6PP) o fosfatasa ácida sorbitol-específica (S6P-APH). Posteriormente, es translocado simplásticamente a través del floema hacia los órganos sumidero en donde es acumulado en las vacuolas de las células del parénquima, y puede ser oxidado y convertido en fructosa o glucosa por las enzimas sorbitol deshidrogenasa NAD-dependiente (NAD-SDH) o sorbitol oxidasa (SOX) respectivamente (Teo y col, 2006; Yamaki, 1995; Figura 1). Se ha descrito en manzano (*Malus domestica*) y en peral japonés (*Pyrus pyrifolia*) una vía de

síntesis de sorbitol en la que una SDH dependiente de NADP (NADP-SDH) reduce directamente glucosa a sorbitol, evitando los intermedios fosforilados. No obstante, esta vía alternativa menor sólo se encuentra activa en hojas inmaduras (Yamaki, 1995).

Igualmente interesante es el hecho de que este poliol otorga variadas cualidades a las plantas que lo sintetizan, dentro de las que se puede mencionar la capacidad de conferir a estas familias de plantas una mayor resistencia al estrés osmótico por frío y desecación, como se mencionó anteriormente, y además está intrínsecamente relacionada con el movimiento de boro dentro de la planta.

La movilidad del boro se ve aumentada en las plantas que sintetizan sorbitol ya que estas dos moléculas forman complejos que permiten que el boro sea transportado a través del floema (Blevins y Lukaszewski, 1998). Esto confiere a la planta una mayor resistencia al déficit de este micronutriente (Brown y col, 1999; Bellaloui y col, 1999). Se ha visto que la transformación de una A6PR de manzano en tabaco genera producción de sorbitol, aumenta la cantidad de boro en los tejidos y su absorción (Bellaloui y col, 1999). Esto además comprueba que esta enzima es suficiente para la generación de sorbitol, empleando una enzima endógena con actividad S6PP para desfosforilar el S6P generado.

1.3 Sorbitol-6-fosfato deshidrogenasas o Aldosa-6-fosfato reductasas (A6PR).

A6PR y SDH son las enzimas clave para la síntesis y degradación del sorbitol en los órganos fotosintéticos y sumideros, respectivamente (Teo y col, 2006). El peso molecular de A6PR calculado en filtración por gel es de 65 kDa a pH 8, pero al

visualizarla en un gel electroforético en condiciones denaturantes esta presenta alrededor de 33 kDa dejando en evidencia que a pH cercano al neutral esta enzima se encuentra formando dímeros (Hirai, 1981). Negm y Loescher (1981) demostraron en manzano que A6PR cataliza reversiblemente la reducción de G6P a S6P y que esta utiliza a NADPH como cofactor. También, estos autores sostienen que esta enzima posee mayor actividad aún al reducir galactosa a galactitol. Entre pH 7 y 9 presenta su velocidad máxima para la reacción G6P a S6P, mientras que para la reacción inversa el pH óptimo es de 9,5. Esto permite que en conjunto con S6PP o S6P-APH este equilibrio se desplace hacia la formación de sorbitol a pH citoplasmático (Hirai, 1981; Yamaki, 1995).

Las plantas que sintetizan sorbitol como principal forma de carbono, también co-sintetizan sacarosa y almidón, siendo la G6P el precursor de los primeros dos compuestos en el citoplasma. Sobre esto se ha propuesto una posible co-regulación entre estas dos vías, al ser ambos metabolitos funcionales y que comparten el mismo precursor (Zhou y Cheng, 2008). Se han realizado varios estudios con líneas transgénicas de rosáceas en las que el silenciamiento génico o sobre-expresión de A6PR en manzano presenta alteraciones en la tasa de partición del carbono entre sacarosa y sorbitol, acumulación de almidón y un incremento en los azúcares totales en las hojas, frutos y ápices meristemáticos, proponiendo una gran importancia de A6PR en la regulación y el flujo de carbono entre ambas rutas metabólicas (Everard y col, 1997; Kanamaru y col, 2004; Cheng y col, 2005).

1.3.1 A6PR en estrés abiótico.

Se ha visto en que bajo condiciones de estrés abiótico como bajas temperaturas (en peral japonés), estrés salino y estrés osmótico (en duraznero) y presencia de ácido absísico (en manzano, duraznero y peral japonés), A6PR aumenta su expresión y actividad incrementando la concentración de sorbitol en el floema (Escobar-Gutierrez, 1998; Deguchi y col, 2002; Kanayama y col, 2007). Este aumento en la producción de sorbitol se ha atribuido a su capacidad de hidro-retención ante un déficit de agua disponible otorgando así mayor estabilidad a las proteínas bajo estrés por frío, osmótico y salino (Sheveleva y col, 1998; Deguchi y col, 2002). En plantagináceas también se ha visto que en respuesta a una alta salinidad, *Plantago maritima* es capaz de igualar el potencial osmótico entre citosol y vacuola (en donde es acumulado NaCl), al incrementar la producción de sorbitol en el citoplasma junto con aumentar la expresión de transportadores de sorbitol en el floema (Pommerrenig y col, 2007; Ahmad y col, 1979).

En plantas no-rosáceas no-plantagináceas que translocan sacarosa también se ha observado esta función osmoprotectora del sorbitol. Por ejemplo, en plantas de caqui japonés (*Diospyros kaki*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformadas con el gen *A6PR* de manzano, se observó presencia de sorbitol en hojas lo que también demuestra que *A6PR* es suficiente para la síntesis de sorbitol (ver también sección 1.2.1), permitiendo además un aumento en la resistencia al estrés osmótico (Gao y col, 2001; Tao y col, 1995).

A pesar de estas ventajas que puede otorgar la presencia de sorbitol, se ha descrito que superando ciertos niveles de este poliol en caña de azúcar (*Saccharum hybrids*) y

tabaco (superiores a 15 $\mu\text{mol/g}$ peso fresco) se provocan lesiones necróticas, infertilidad, incapacidad de enraizamiento y disminución del crecimiento (Sheveleva y col, 1998; Chong y col, 2007). Estos fenotipos también han sido observados en caqui japonés pero a mayores concentraciones (entre 20 y 50 $\mu\text{mol/g}$ peso fresco) y sin lesiones necróticas (Gao y col, 2001; Deguchi y col, 2004), dejando en evidencia que existen especies más tolerantes que otras a la acumulación de sorbitol. En estos experimentos, también se obtuvieron plantas que acumulan sorbitol a menores concentraciones, y a diferencia de las que presentaron concentraciones más altas, éstas no tienen fenotipos enanos. Por esto, se ha sugerido que existe una concentración umbral a la que el sorbitol afecta el crecimiento de la planta. Se desconoce el mecanismo molecular por el cual se relaciona la acumulación de sorbitol con los fenotipos generados (Gao y col, 2001; Deguchi y col, 2002).

1.4 Sorbitol en no rosáceas y no plantagináceas.

La presencia de sorbitol se ha visto en plantas que no pertenecen a las familias Rosaceae y Plantaginaceae. Por ejemplo, en endosperma de semillas de maíz (*Zea mays* L.), en condiciones de estrés salino el sorbitol mantiene el estado Redox y energético celular previamente a ser transformado en fructosa por una SDH (de Sousa y col, 2008). La cebada (*Hordeum vulgare*) aumenta sus niveles de sorbitol bajo estrés hídrico y se ha visto que este poliol es sintetizado por una aldo-ceto reductasa monomérica a partir de glucosa. Esta enzima es acumulada durante la maduración del embrión y regulada por ácido absícico y ácido giberélico. En esta planta, el sorbitol también cumple una función osmoregulatoria manteniendo el balance osmótico y el volumen celular (Bartels y col, 1991; Roncarati y col, 1995).

1.5 Sorbitol en Arabidopsis.

A pesar de ser miembro de la familia Brassicaceae, *Arabidopsis thaliana* también posee las dos enzimas claves para la síntesis y degradación del sorbitol, A6PR y SDH. *A. thaliana* es una planta que transloca sacarosa como principal fuente de carbono, seguido por rafinosa, sin embargo, esta especie no acumula polioles (Haritatos y col, 2000). Estudios metabólicos de tolerancia adquirida a bajas temperaturas en respuesta a golpe térmico en frío demuestran, mediante cromatografía de gases y espectrometría de masa, que los niveles de sorbitol aumentan transitoriamente en respuesta al estrés mencionado junto con otros compuestos que también actúan como solutos compatibles, aumentando la tolerancia a estos tipos de estrés (Kaplan y col, 2004). En el genoma de esta planta, específicamente en el cromosoma 5 locus At5g51970, se encuentra un único marco de lectura abierto que codifica para una potencial SDH (AtSDH) cuya secuencia aminoacídica comparte un ~80% de identidad con SDHs ya caracterizadas en otras especies de plantas (e.g. tomatera y manzano; Mandujano, 2010; Nosarzewski y col, 2012). Además se han identificado seis proteínas de membrana similares a transportadores de monosacáridos que comparten homología con transportadores de polioles identificados previamente en plantas que translocan manitol y sorbitol en el floema de apio (*Apium graveolens*), llantén (*Plantago major*) y cereza ácida (*Prunus cerasus*). Uno de estos (AtPLT5) se localiza en la membrana plasmática y es capaz de transportar un gran espectro de polioles lineales (sorbitol, xilitol, eritritol, glicerol; Klepek y col, 2005).

También existen dos loci adyacentes (At2g21250 y At2g21260) descritos que codifican para posibles manosa-6-fosfato reductasas y con más de un 63% de identidad

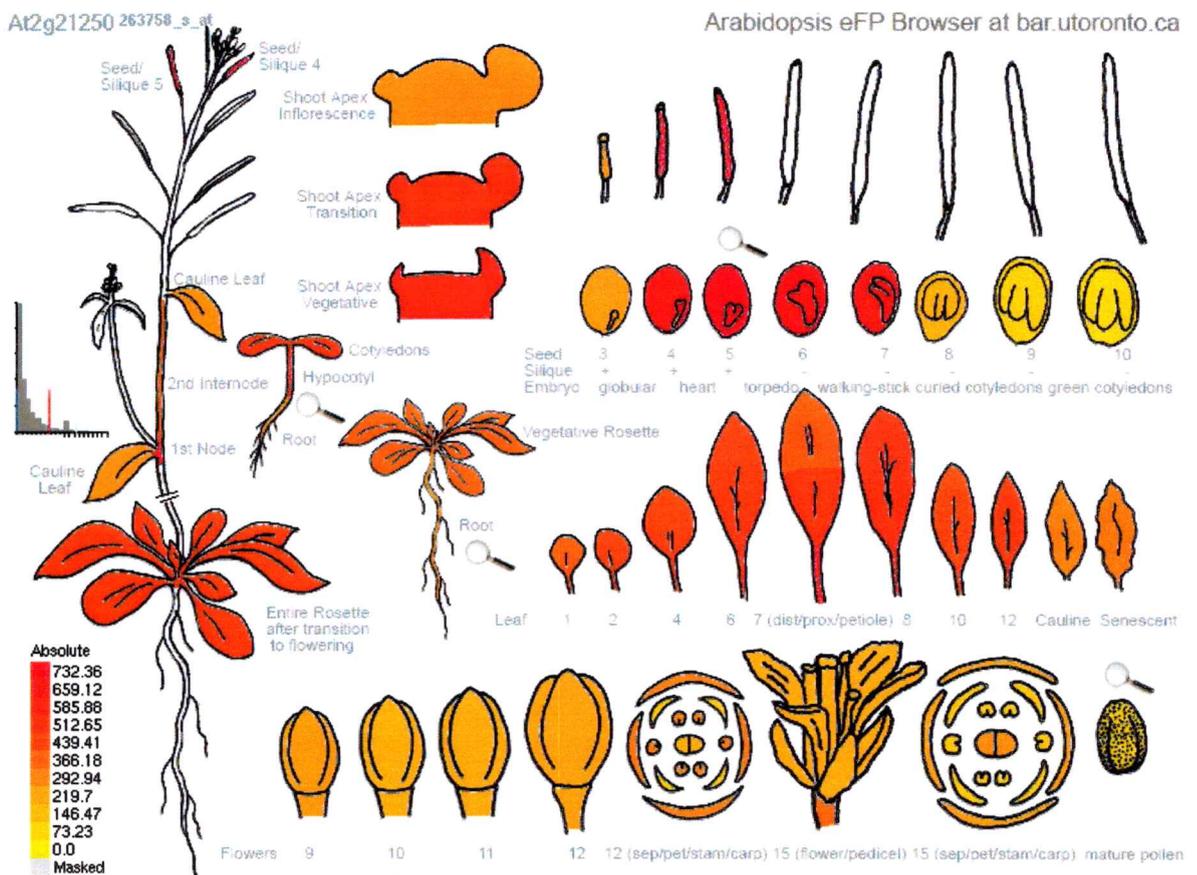
aminoacídica con esta familia de proteínas. No obstante también poseen un alto porcentaje de identidad aminoacídica (mayor al 65%) con A6PR, en su mayoría de rosáceas (Zamudio, 2010). Específicamente respecto a A6PR de manzano (MdA6PR) estos productos génicos poseen 69 y 70% de identidad, respectivamente (arabidopsis.org). En el laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile (en donde se efectuó el presente trabajo), se optó por trabajar con At2g21250 por sobre At2g21260 por dos razones (Zamudio, 2010). Primero, éste posee un mayor número de secuencias regulatorias en el promotor del gen de esta enzima, lo que permite ahondar en estudios posteriores en respuesta a más tipos de estrés. Segundo, y más importante, existe un mayor número de líneas con insertos de T-DNA o transposones interrumpiendo el gen (<http://atidb.org>). Si estas líneas tuvieran menores niveles de expresión del gen, serían útiles para determinar su función *in vivo*. A esta proteína, se le denominó inicialmente AtS6PDH por ser una posible sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa de *A. thaliana*. Sin embargo, el nombre fue corregido a AtA6PR siendo este el nombre formal de esta familia de enzimas, las Aldosa-6-fosfato Reductasas (Zamudio, 2010).

1.6 Estudios previos sobre AtA6PR.

1.6.1 Expresión *in silico* e *in vivo* de AtA6PR.

Datos de microarreglos (*Affimetrix ATH1 array*) obtenidos por Schmid y col (2005) y los datos de *AtGenExpress Consortium Data* (<http://atpbsmd.yokohama-cu.ac.jp/>) fueron analizados mediante el software eFP Browser en donde se obtuvo que *AtA6PR* se expresa durante todo el ciclo de vida de *A. thaliana* y en la mayoría de sus órganos (Figura 2). Los mayores niveles de expresión se encontrarían en semillas en estado

intermedio de desarrollo (en color rojo), seguido por meristemas apicales vegetativos y en transición a floración, seguido por cotiledones, semillas embebidas por 24 horas y hojas rosetas. Estos resultados fueron corroborados experimentalmente mediante RT-PCR a partir de RNA extraído de tallo, hoja roseta, hoja caulinar y flor, obteniéndose expresión en todos estos órganos (Zamudio, 2010). Estos resultados sugieren que este gen cumple una función asociada a la mantención del estado celular basal.



eFP Browser by B. Vinograd, drawn by J. Ails and N. Provart. Data from Gene Expression Map of Arabidopsis Development: Schmid et al., 2005, Nat. Gen. 37:501
Note that data displayed in this series were normalized by the RMA method and as such the levels are not directly comparable with other eFP Browser views.

Figura 2: Expresión *in silico* de AtA6PR.

Se indica con un patrón de colores los niveles de expresión para cada órgano, con amarillo para el valor mínimo (5,63 en la semilla seca) y rojo para el valor máximo, correspondiente a 531,36 en el estadio 6 de la semilla. Obtenido desde Arabidopsis eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; Zamudio, 2010).

Se han hecho estudios de localización subcelular *in silico* mediante varios algoritmos que han propuesto concordantemente que AtA6PR se acumularía en el citoplasma

dada la carencia de algún dominio transmembrana o algún péptido de destinación posible que se asocie a un compartimiento en particular, y por lo tanto la maquinaria celular estaría destinando este producto génico al citosol (Zamudio, 2010). Estos resultados coinciden con la localización de A6PR registrada en rosáceas (Ahmad y col, 1979; Yamaki, 1995; Bantog y col, 2000). Por otro lado, los resultados obtenidos *in silico* fueron comprobados experimentalmente mediante transformación transitoria de plantas de tabaco con un vector que produce AtA6PR fusionada con una proteína fluorescente verde (GFP) en el extremo C-terminal. Estas plantas transformadas fueron visualizadas bajo microscopía encontrándose fluorescencia en el citoplasma (Zamudio, 2010). Sin embargo, este resultado debe corroborarse utilizando otras técnicas ya que la proteína GFP fusionada posee un gran tamaño (~30 kDa) con respecto a AtA6PR (~35 kDa) y podría eventualmente generar un artefacto de localización. Además, este resultado fue obtenido en tabaco, que no es el organismo originario de este gen. Ergo, a pesar de que se haya demostrado que AtA6PR tiene una localización subcelular correspondiente al citoplasma en hojas de tabaco, esto no prueba que esta proteína tenga el mismo patrón de expresión en su organismo original (*A. thaliana*).

Además, se eligieron dos líneas mutantes insercionales de la colección SALK. Esta colección fue realizada por Alonso y col (2003) mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* el cual es capaz de integrar T-DNA presente en el plásmido T_i al azar en el genoma de esta planta. El plásmido T_i fue remplazado por el plásmido *pROK2* que además permite determinar mediante PCR el sitio de inserción de este T-DNA. De esta forma fue generada y analizada una librería de ~150.000 mutantes insercionales. A pesar de los análisis realizados para determinar los sitios de inserción, es necesario de todas formas corroborar el sitio de inserción teórico presente en la base de datos

(<http://atidb.org>). Las dos líneas insercionales electas poseen esta inserción en el gen que codifica para AtA6PR. Utilizando plantas homocigotas, se determinó que una de ellas posee un inserto en el extremo 5' del tercer intrón (SALK_021705, *ata6pr-1*), y la otra en el extremo 3' del tercer intrón (SALK_028553, *ata6pr-2*) de los 6 exones del gen. Dado que los intrones en *A. thaliana* poseen un tamaño relativamente pequeño (en promedio 173 pb y el 99% de los intrones mide menos de 1 kb; Wang y Brendel, 2006), un T-DNA insertado superior a 5 kb podría generar una disrupción en la expresión de ese gen (Radhamony y col, 2005). Se demostró mediante qPCR que las mutantes *ata6pr*-tienen respectivamente un 2 y 0,8% de expresión relativa de *AtA6PR* en relación a la planta silvestre (Zamudio, datos no publicados). Sin embargo, se desconoce si la reducción en transcritos se ve reflejada en una menor acumulación de la proteína en las líneas mutantes.

Esta línea de investigación pretende realizar con AtA6PR estudios de caracterización bioquímica, caracterización de líneas de *A. thaliana* mutantes para esta enzima, de localización *in vivo* mediante inmunodetección y localización subcelular mediante inmunohistoquímica, y mediante fraccionamiento subcelular e inmunodetección. Sin embargo no existen anticuerpos comerciales α -AtA6PR. Es por este motivo que el objetivo principal del presente seminario de título es la elaboración de esta herramienta esencial capaz de detectar a AtA6PR de *A. thaliana*. Se proyecta también la purificación de AtA6PR sin epítopos para realizar el estudio bioquímico, eliminando posibles artefactos causados por la presencia de proteínas de fusión.

1.7 Los anticuerpos.

Para hacer ensayos de inmunohistoquímica e inmunodetección, es necesaria la utilización de un antisuero (anticuerpo) que sea capaz de detectar a AtA6PR. Los anticuerpos forman parte del sistema inmune. Estos son producidos naturalmente cuando un patógeno penetra (o un antígeno es inoculado) y se genera una respuesta inmunológica adquirida frente a todos los determinantes antigénicos (epítomos) del antígeno. Existen dos tipos de sueros de anticuerpos, los policlonales y los monoclonales. Ambos tienen ventajas y desventajas dependiendo del propósito para el cual son elaborados, pero generalmente el punto de partida es la generación de un antisuero policlonal que tiene mayor capacidad para detectar pequeñas cantidades del antígeno. En el caso de inmunizar al animal con un antígeno purificado, el suero que se extraiga de ese animal contendrá un antisuero policlonal, que reconocerá a ese antígeno en todos sus epítomos (o en su mayoría). Como muchos antígenos comparten epítomos, es posible que este anticuerpo reconozca también otros antígenos, disminuyendo así la especificidad del anticuerpo frente al antígeno inmunizado.

Para lograr la elaboración de este anticuerpo, se construyó un vector para la expresión heteróloga de His-AtA6PR en *Escherichia coli*, se purificó His-AtA6PR y se inocularon 3 ratones *BALB/c*. Luego, se extrajeron y analizaron los antisueros policlonales obtenidos utilizando His-AtA6PR y extractos crudos de *E. coli*, determinado las condiciones óptimas para su uso en ELISA, *dot blot* y *western blot*. Finalmente, se demostró la utilidad de los antisueros α -His-AtA6PR utilizando extractos crudos de proteínas de plantas silvestres y *ata6pr*- de *A. thaliana*. La obtención de dichos

antisueros sería de gran utilidad en el futuro en ensayos de inmunodetección, la inmunohistoquímica y la posibilidad de purificar AtA6PR sin epítopos.

2. OBJETIVOS.

2.1 Objetivo general.

Elaboración de un anticuerpo policlonal en ratón que reconozca la proteína AtA6PR.

2.2 Objetivos específicos.

- Construcción de un vector para expresar His-AtA6PR en *Escherichia coli* cepa *BL21(DE3)pLysS*, optimización del protocolo de inducción por IPTG y purificación de la proteína His-AtA6PR del extracto celular.
- Preparación de un antisuero de ratón α -AtA6PR.
- Verificación de la especificidad del antisuero α -AtA6PR para detectar His-AtA6PR producida en *E. coli* y AtA6PR en *A. thaliana* silvestre y mutantes *ata6pr-*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Material biológico.

3.1.1 Crecimiento de *Escherichia coli*.

E. coli cepas *OneShot*[®] *Mach1*[™] y *BL21(DE3)pLysS* fueron crecidas en medio LB líquido o sólido [NaCl 1% (p/v), triptona 1% (p/v), extracto de levadura 1% (p/v) y agar-agar 1,6% (p/v), este último sólo para LB sólido, pH7 a 25 °C] a 37 °C durante ~15 h con agitación de 200 rpm en el caso del cultivo líquido. Para la cepa *BL21(DE3)pLysS* se agregó al medio cloranfenicol (34 µg/mL) para la selección del plásmido *pLysS*.

3.1.2 Preparación y transformación de *E. coli* quimio-competentes.

El protocolo de preparación de células quimio-competentes fue similar para ambas cepas. A partir de un cultivo crecido en LB sólido (3.1.1) se eligió una colonia aislada de la cepa *BL21(DE3)pLysS* y se inoculó un cultivo de 5 mL de LB líquido con cloranfenicol durante 16 h. Luego se diluyó con LB líquido hasta 50 mL de LB con cloranfenicol y se dejó crecer en un matraz de 1L hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,4$. Se transfirieron las células a tubos falcon de 50 mL y se incubó en hielo durante 20 min. Se centrifugaron las células a 3000 g durante 10 min a 4°C. Se mantuvo la cadena de frío hasta el final del protocolo de preparación de células quimio-competentes. Se eliminó el sobrenadante y se suspendieron las células en 30 mL de $CaCl_2$ 0,1 M pre-enfriado y se incubaron en hielo durante 30 min. Se centrifugaron a 3000 g durante 10 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se suspendieron las células por pipeteo en 8 mL de $CaCl_2$ 0,1 M con 15% glicerol (pre-enfriado). Se transfirieron las células a tubos eppendorf de 0,6 mL en alícuotas de 200 µL. Inmediatamente se congelaron en

nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -80 °C. Para el caso de la cepa *OneShot[®] Mach1[™]* se siguió el mismo protocolo, pero omitiendo todas las selecciones con cloranfenicol.

Para transformar las bacterias, las alícuotas de células quimio-competentes fueron descongeladas en hielo. Se agregó 5 a 20 ng de DNA plasmidial o 2 µL de la totalidad de la reacción de clonamiento (3.2.5) o ligación (3.2.8). Se incubó entre 5 y 30 min en hielo, y luego se dio un golpe térmico a 42 °C por 30 s y se incubó nuevamente en hielo por 5 min. Posteriormente se agregó 250 µL de LB líquido a cada mezcla, y se incubó a 37 °C por 1 h con 200 rpm. Se centrifugó a 3000 g por 5 min, se eliminaron 400 µL de sobrenadante y se resuspendieron las células en el líquido restante. Se sembraron las células en LB sólido con el antibiótico correspondiente para la selección de las células transformantes.

3.1.3 Crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.

Se sembraron semillas estériles de *A. thaliana* Col-0 silvestre (wt), y mutantes *ata6pr-1* (SE3) y *ata6pr-2* (SE4) en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin sacarosa. Estas fueron crecidas durante 10 días a 23 °C con 16 h de fotoperiodo a 4500-6500 lux.

3.2 Biología molecular

3.2.1 Diseño de partidores.

El diseño de los partidores se llevó a cabo utilizando la secuencia codificante del gen de una potencial sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa (AtA6PR) de *Arabidopsis thaliana* que se encuentra en el locus At2g21250 (www.arabidopsis.org). Los partidores diseñados permiten insertar esta secuencia en el vector *pET28a* de expresión en

bacterias, que además agrega un epítipo de 6 histidinas en tándem (6xHis) en la región N-terminal de la proteína recombinante para su posterior detección y purificación. Esta secuencia fue previamente aislada, clonada en el vector *pCR8*[®] y secuenciada por M^a Sofía Zamudio (*pCR8/AtA6PR*; Zamudio, 2010), teniendo una extensión de 930 pb desde el codón de inicio hasta el codón de término. Los partidores sentido y antisentido (Tabla I) diseñados incluyen al amplificado los sitios de corte para las endonucleasas *Bam*HI y *Not*I respectivamente flanqueando la región codificante. Además estos incluyen 6 nucleótidos adicionales en los extremos que permiten obtener una temperatura de *melting* teórica (T_m) similar entre ambos partidores sin alterar el marco de lectura abierto. De esta forma se obtiene una extensión teórica de 956 pb en el amplificado.

Tabla I: Partidores diseñados para la amplificación del fragmento *AtA6PR*.

Nombre del Partidor	Secuencia	Descripción
S6F-Bam	5'-GCAAAG GGATCC ATGGAG ATA ACA CTG AAC AG-3'	Sentido. Permite el clonamiento de <i>AtA6PR</i> en el vector <i>pET28a</i> agregando un epítipo His6X N-terminal.
S6R-Not1new	5'-GACTAA GCGGCCG CTCAAGC GTA GAG ATC AAT G-3'	Antisentido. Permite el clonamiento de <i>AtA6PR</i> en el vector <i>pET28a</i> conservando el codón de término.

Desde el vector de entrada *pCR8/AtA6PR* estos partidores permiten el clonamiento del fragmento *AtA6PR* en *pET28a* vía *pCR8*. Se muestra en rojo los codones de inicio (Metionina, ATG) y término (TCA), en azul las regiones codificantes correspondientes y en verde los sitios de restricción.

3.2.2 Electroforesis en geles de agarosa.

El gel se preparó con agarosa 1% (p/v) y TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Se mezcló 1 µL de buffer de carga [Azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilencianol 0,25%(p/v) y glicerol 80% (v/v), en TAE 1X] por cada 10 µL de muestra. El gel fue colocado en una cámara electroforética embebida en TAE 1X cubriendo el gel

completamente con el buffer. Se generó un potencial eléctrico constante entre 80 y 120 V durante 40 min aproximadamente hasta que ambos compuestos coloreados del buffer de carga migraron hasta subdividir el gel en tres partes similares. El revelado fue realizado de la siguiente forma: se embebió el gel en una solución de bromuro de etidio (1 mg/L) durante 20 min aproximadamente y luego se embebió en agua destilada por 10 min. Posteriormente, se obtuvo la imagen del gel mediante transiluminación con luz UV y visualización y análisis con el software GeneSnap.

3.2.3 Reacción de PCR y purificación de *AtA6PR*.

Se utilizó la enzima Pfu DNA polimerasa (Fermentas[®]), que posee actividad 3'-5' exonucleasa, para amplificar el fragmento *AtA6PR* desde el vector de entrada *pCR8/AtA6PR* (Zamudio, 2010), agregarle en sus extremos los sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Not*I, y posteriormente clonarlo en el vector *pCR8*[®]. De esta forma cada reacción de PCR se realizó en un volumen total de 20 µL compuesto por buffer de reacción con MgCl de Pfu-polimerasa 1X (Fermentas[®]), dNTPs 0,2 mM, 0,5 µM de cada partidor (Tabla I), 0,25 U Pfu DNA polimerasa, y entre 5 y 50 ng de DNA molde. El programa utilizado fue el siguiente: 4 min a 94 °C, 40 ciclos (45 s a 94 °C, 90 s a 70 °C, 3 min a 72 °C), 10 min a 72 °C, finalizando en 4 °C. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (3.2.2) con el producto completo de 3 reacciones idénticas. Se extrajo desde el gel la banda correspondiente a las 956 pb esperadas y se purificó usando el kit *Wizard*[®] *SV Gel and PCR clean-up system* siguiendo las instrucciones del fabricante. En el último paso se resuspendió el DNA en 60 µL de agua libre de nucleasas. Luego, se verificó la integridad del DNA purificado sometiéndolo nuevamente a una electroforesis en gel de agarosa.

Se utilizó la enzima Taq DNA polimerasa (Sigma®) para realizar reacciones de PCR convencional y PCR de colonias, para el análisis de la presencia y extensión del fragmento clonado en *pCR8*® y *pET28a*, y para realizar PCR direccional verificando la orientación de dicho inserto en *pET28a*. El volumen total de reacción fue de 20 µL usando buffer de reacción para Taq DNA polimerasa con MgCl 1X (Sigma®), dNTPs 0,2 mM, 0,5 µM de cada partidor (Tabla I), 1 U Taq DNA polimerasa, y la muestra de DNA [entre 5 y 50 ng de DNA plasmidial o entre 0,3 y 0,5 µL de una colonia (3.1.1) disuelta en 20 µL de agua destilada estéril]. Se utilizó el mismo programa de PCR descrito anteriormente.

3.2.4 Agregado de adenina 3' al amplificado *BamHI-AtA6PR-NotI*.

Dado que el vector de entrada en donde se clonará la secuencia *BamHI-AtA6PR-NotI* requiere que dicho fragmento posea adeninas desapareadas en los extremos 3', se sometió la banda purificada del amplificado con Pfu en 3.2.3 a la acción de la actividad adenosiltransferasa de la enzima Taq DNA polimerasa (Sigma®). En un volumen total de 10 µL por reacción se usó 250 ng de DNA amplificado, buffer de reacción para Taq DNA polimerasa con MgCl 1X (Sigma®), dATP 2 mM y 1 U de Taq DNA polimerasa (Sigma®). Se incubó a 72 °C durante 30 min. Posteriormente se procedió al paso de clonamiento (3.2.5).

3.2.5 Clonamiento de *BamHI-AtA6PR-NotI* en el vector *pCR8*®.

El vector utilizado (*pCR8/GW/TOPO*®) comercialmente linearizado posee en sus extremos 3' una timina desapareada unida covalentemente al sitio activo (Tyr 274) de una topoisomerasa. De esta forma la ligación ocurre cuando esta timina se aparea con la adenina 3' desapareada presente en el inserto (3.2.4). Se clonó *BamHI-AtA6PR-NotI*

en este vector siguiendo las instrucciones del fabricante y se transformó *E. coli* cepa *OneShot[®] Mach1[™]* (3.1.2).

3.2.6 Mini-preparación de DNA plasmidial.

Las extracciones de DNA plasmidial de ambas cepas fueron idénticas. Se hizo un cultivo de 10 mL en LB líquido (3.1.1). Se retiró una alícuota de 400 μ L para *stock* de respaldo que se guardó con glicerol al 50% (v/v) a -80 °C. La extracción se realizó a partir de los 9,6 mL restantes siguiendo las instrucciones del fabricante (*AxyPrep Plasmid Miniprep Kit, Axygene[®]*). En el último paso, se resuspendió el DNA plasmidial en 60 μ L de agua libre de nucleasas. Se verificó la integridad del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa (3.2.2) y se cuantificó comparando la densidad de pixeles de las bandas observadas en la imagen del gel entre el estándar de peso molecular (Gene Ruler[™] 1kb DNA Ladder #SMO311/2/3) y la muestra utilizando el programa ImageJ.

3.2.7 Digestión de los vectores *pCR8/BamHI-AtA6PR-NotI* y *pET28a/AtA6PR* con las enzimas de restricción *BamHI* y *NotI*.

Para el vector *pCR8/BamHI-AtA6PR-NotI* se hizo una digestión doble con ambas enzimas de restricción, y para el vector *pET28a/AtA6PR* se realizó tanto la digestión doble como las digestiones simples para cada enzima de restricción. Las digestiones doble y simples fueron realizadas simultáneamente y de forma similar para el segundo vector mencionado. Cada reacción de digestión fue realizada en un volumen total de 10 μ L utilizando 350 ng de DNA plasmidial. Para la digestión doble se mezcló el DNA con 1 μ L de buffer para *BamHI* 10X, 0,3 μ L de la enzima *BamHI* y 0,6 μ L de la enzima *NotI* (ambas 10 U/ μ L, Fermentas[®]) y se llevó a un volumen final de 10 μ L con agua

libre de nucleasas. Se incubó durante 2 h a 37 °C. Se inactivaron las enzimas de restricción incubando las muestras a 80 °C por 20 min. Para las digestiones simples se realizó el mismo protocolo que para la digestión doble pero en ausencia de *Bam*HI en la digestión con *Not*I y viceversa.

Posterior a la digestión doble del vector *pCR8/AtA6PR* se realizó una electroforesis con todo el volumen de reacción y luego se purificó la banda esperada (5337 pb) a partir del gel de igual forma que como se describe en la sección 3.2.3.

3.2.8 Reacción de ligación entre el fragmento *AtA6PR* y *pET28a*.

Una vez obtenidos el vector *pET28a* linearizado y el fragmento *Bam*HI-*AtA6PR*-*Not*I ambos con extremos cohesivos con *Bam*HI y *Not*I, se procedió a realizar una reacción de ligación. En un volumen de 7,5 µL se mezclaron ambos componentes en la razón 3:1 respectivamente y luego se agregó 2 µL de buffer para ligasa T4 10X (Promega®) y 0,5 µL de la enzima ligasa del virus T4 (Promega®). Se incubó a 4 °C durante 16 h. Con el producto de la reacción se transformaron *E. coli BL21(DE3)pLysS* como se señala en la sección 3.1.2. Como control negativo se realizó una transformación con una reacción ausente del inserto *Bam*HI-*AtA6PR*-*Not*I para descartar la posibilidad de recircularización del vector.

3.3 Bioquímica.

3.3.1 Expresión de His-*AtA6PR* en *E. coli* cepa *BL21(DE3)pLysS*.

A partir de un cultivo de 5 mL de la cepa *BL21(DE3)pLysS* transformada (3.1.2) con el vector *pET28a/AtA6PR* se realizó el siguiente protocolo de inducción con IPTG. Se diluyó el cultivo en 100 mL de medio LB fresco con cloranfenicol en un matraz de 1 L y

se incubó a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6. Se apartó 50 mL de cultivo en un segundo matraz como control negativo de la inducción (células sin inducir), y al resto se le agregó IPTG 0,5 mM (células inducidas). Se realizó el resto del protocolo de igual forma para ambos cultivos. Se incubó a 37 °C con agitación (200 rpm) durante 3 h. Se sedimentaron las células centrifugando a 5000 g por 5 min. Se lavó dos veces con buffer TEN (Tris-HCl 100 mM pH 7,4, NaCl 50 mM, EDTA 1,0 mM). Se retiró el sobrenadante y se almacenaron las células sedimentadas a -80 °C para la posterior extracción de proteínas.

3.3.2 Extracción de proteínas de *E. coli*.

A partir de las células inducidas y su respectivo control sin inducir (3.3.1) se procedió a su extracción de proteínas totales. Se resuspendieron las células en 2,5 mL de buffer A de extracción de proteínas [Tris-HCl 25 mM pH 8, NaCl 300 mM, glicerol 10% (v/v), EDTA 0,1 mM] con inhibidor de proteasas 1X ("cOmplete Mini, EDTA-free", Roche®). Se sonicaron las muestras con 5 pulsos de 1 min separados por pausas de 1 min en hielo. Se apartó una alícuota de 0,5 mL de extracto crudo (EC) de cada cultivo y se almacenó a 4 °C para su posterior análisis. Se separó la fracción soluble (FS, 2 mL) de la insoluble (FI) centrifugando a 10000 g por 15 min a temperatura ambiente. La FI se resuspendió en 2 mL de buffer A con inhibidor de proteasas.

3.3.3 Cuantificación de proteínas.

Para cuantificar las muestras de proteínas, tales como extractos crudos o proteínas purificadas se utilizó el método Bradford (Bradford, 1976). Se confeccionó una curva de calibración entre 1 y 10 µg de BSA (albúmina de suero de bovino) en 500 µL de reactivo de Bradford [azul de Coomassie 10% (p/v), etanol 5% (v/v), ácido fosfórico

8,5% (v/v)] y se rasó en 1 mL con agua destilada. Se midió la DO_{595} de cada tubo con BSA. Se confeccionó un gráfico con los valores de concentración de BSA en función de la DO_{595} registrada. La regresión lineal que se obtuvo se utilizó para calcular posteriormente las concentraciones de las muestras que fueron sometidas al ensayo de Bradford. Para medir una muestra de extracto crudo, fracción soluble o insoluble se mezcló entre 1 y 3 μL de muestra con 500 μL de reactivo de Bradford y se rasó con agua destilada en 1 mL. Para medir una muestra con proteína purificada se mezcló entre 10 y 50 μL de muestra con 500 μL de reactivo de Bradford y se rasó en 1 mL con agua destilada. Utilizando la curva de calibración obtenida se calcularon las concentraciones de las muestras.

3.3.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE).

Esta técnica de separación se usó para verificar la integridad de las proteínas en las muestras analizadas. El gel separador fue preparado al 12% usando 1,7 mL de agua desionizada, 1,25 mL de una solución de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 50 μL de una solución de SDS 10% (p/v), 2 mL de una solución de acrilamida 30%/bis-acrilamida 0,8% (p/v), 50 μL de APS 10% (p/v) y 5 μL de TEMED. El gel concentrador fue preparado al 4% usando 1,54 mL de agua desionizada, 0,625 mL de una solución de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 25 μL de una solución de SDS 10% (p/v), 335 μL de una solución de acrilamida 30%/bis-acrilamida 0,8% (p/v), 25 μL de APS 10% (p/v) y 5 μL de TEMED. Los geles fueron preparados en una cámara electroforética vertical con un grosor de gel de 1 mm.

Las muestras a analizar fueron precipitadas agregando 4 volúmenes de acetona y centrifugándolas a 10000 g por 5 min. Se resuspendieron en buffer de carga denaturante 1X [Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 20% (v/v), β -mercaptoetanol 2% (v/v), Azul de bromofenol 0,1% (p/v) y SDS 4% (p/v)] y se incubaron por 10 min a 75 °C. El buffer de corrida utilizado contiene Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v). Para las muestras EC, I y S (3.3.2) se cargaron 25 μ g de proteínas de cada muestra. Para el análisis de las fracciones purificadas (3.3.6) se cargaron 50 μ L de muestra. Las cantidades de proteína purificada utilizada para la evaluación de la afinidad del presuero y antisuero de ratón α -His-AtA6PR se detallan en 3.3.8 y 3.3.9. Se corrió el gel durante ~1,5 h bajo un potencial de 50 V y luego se corrió ~3 h con potencial 100 V hasta que el frente de migración coloreado haya llegado hasta el límite inferior del gel. Los geles de poliacrilamida fueron revelados con tinción de Coomassie (Meyer y Lamberts, 1965).

3.3.5 Inmunodetección del epítipo 6xHis mediante *western blot*.

Luego de correr el SDS-PAGE (3.3.4), éste fue transferido a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m de espesor (Pierce Biotechnology[®]) acolchonada entre papeles filtro (Whatman 1). Se embebió el gel, los papeles filtro y la membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia [Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,0375% (p/v), metanol 20% (v/v)] y se aplicó un potencial de 15 V durante 20 min. Se tiñó la membrana con una solución de rojo de Ponceau [rojo de Ponceau 0.1% (p/v), ácido acético 5% (v/v)] corroborando la correcta transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana. Todos los lavados que se indican a continuación en esta inmunodetección fueron realizados a T° ambiente y con agitación suave. Se retiró el rojo de Ponceau lavando con una solución de TBS-T [Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl

140 mM, Tween-20 0,1% (v/v)] durante 1 min. Se bloqueó la membrana con una solución de leche descremada/TBS-T 4% (p/v) a T° ambiente por 2 h con agitación suave. Se lavó la membrana dos veces con TBS-T durante 10 min. Se incubó la membrana con el anticuerpo primario ("*Monoclonal Anti-polyHistidine antibody produced in mouse*" Sigma®) en leche descremada/TBS-T 4% (1:3000) a 4 °C con agitación suave durante ~15 h. Se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 min. Luego se incubó durante 2 h con anticuerpo secundario [*Anti-Mouse IgG (Fab specific)-Alkaline phosphatase antibody produced in goat*", Sigma®, 1:25000]. Se lavó 2 veces con buffer alcalino (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl 5 mM) por 5 min. Se incubó durante 30-45 s con una solución de revelado que contiene dos sustratos para la fosfatasa alcalina - NBT 330 ng/mL y BCIP 165 ng/mL en buffer alcalino. Una vez reveladas las bandas de interés, se detuvo la reacción embebiendo la membrana en una solución de EDTA 20 mM.

3.3.6 Purificación de His-AtA6PR por columna de afinidad a ion metálico (Ni).

Se sometió a purificación el sobrenadante del extracto de proteínas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS inducida con IPTG (3.3.2) en donde se encuentra His-AtA6PR. La purificación fue realizada haciendo fluir la muestra por la columna de Ni comercial (HisTrap™ HP 1 mL, General Electric®) y eluyendo con concentraciones crecientes de imidazol de la manera que se indica a continuación. Se llevó el sobrenadante a un volumen total de 10 mL con buffer A de extracción de proteínas (descrito en 3.3.2). Se hizo pasar por la columna 20 volúmenes de agua desionizada y posteriormente se ambientó la columna haciendo fluir 10 volúmenes de buffer A con imidazol 20 mM. Luego se pasaron los 10 mL de muestra. Desde este momento se empezó a colectar las fracciones de 1 mL eluidas de la columna incluyendo el frente. Se hizo pasar 6

volúmenes de buffer A con imidazol 50 mM, luego 6 volúmenes de buffer A con imidazol 100 mM y posteriormente 6 volúmenes de buffer A con imidazol 250 mM. El final colector fue de 10 volúmenes de buffer A con imidazol 500 mM, siendo ésta la última fracción colectada. Todas las fracciones colectadas fueron analizadas mediante SDS-PAGE y *western blot* (3.3.4 y 3.3.5).

3.3.7 Preparación de un antisuero de ratón α -His-AtA6PR.

Se llevaron a cabo 3 preparaciones de antisuero α -His-AtA6PR independientes, utilizando para cada una un ratón cepa *BALB/c* (R1, R2 y R3 respectivamente). Se inmunizó una vez a cada ratón cada 7 días durante 3 semanas siendo un total de 3 inmunizaciones por ratón. Para cada inmunización se prepararon 50 μ g de His-AtA6PR purificada (3.3.6) en un volumen de 100 μ L y se mezclaron con 100 μ L de adyuvante de Freund. Para la primera inmunización se utilizó adyuvante completo de Freund, y para las siguientes dos se usó adyuvante incompleto de Freund. La mezcla fue agitada en vórtex durante 12 min hasta formar un coloide el cual fue inyectado en la cavidad peritoneal. Tres días después de la tercera inmunización se extrajeron \sim 150 μ L de sangre periférica de cada ratón para analizar la afinidad de éste por His-AtA6PR mediante ensayos de *dot blot*, ELISA y *western blot* (3.3.8). Para obtener el suero se incubó la sangre extraída por 3 horas a 37 °C, luego se centrifugó a 400 g por 10 min y se rescató el sobrenadante. Uno de los ratones (R3) falleció al día siguiente de la tercera inmunización. Una vez verificada la afinidad se procedió a inmunizar por última vez a cada ratón (con el coloide preparado con adyuvante incompleto de Freund) y 3 días después se anestesiaron los animales R1 y R2 con dióxido de carbono (0,2 L/min en una cámara de 1 L) y se extrajeron los sueros totales por eutanasia y punción cardíaca. Las inmunizaciones de los ratones y las extracciones de sangre fueron

realizadas en colaboración con la Dra. María Rosa Bono y don Leonardo Vargas, en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

3.3.8 Evaluación de afinidad del presuero por His-AtA6PR mediante ELISA, *dot blot* y *western blot*.

Se analizaron los 3 sueros extraídos de los ratones luego de 3 inmunizaciones, sometiéndolos a los ensayos de ELISA, *dot blot* y *western blot* con el fin de medir la avidéz de detección de los antisueros frente a AtA6PR. En cada prueba se sometieron distintas concentraciones de His-AtA6PR recientemente purificada (no más de 7 días). Se usó como control negativo a His-AtSDH que corresponde a una proteína que no comparte similitudes estructurales ni conformacionales significativas con respecto a AtA6PR pero que sí posee un epítipo 6xHis fusionado N-terminal (Mandujano, 2010). De esta forma se pudo calcular la diferencia entre la fracción de inmunoglobulina en el presuero que detecta sólo a AtA6PR y no al epítipo 6xHis.

3.3.8.1 ELISA.

Se usaron las siguientes cantidades (en ng) de His-AtA6PR purificada: 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6; 0,8; 0,4 y 0,2. Las mismas cantidades fueron utilizadas para el control negativo (His-AtSDH). Se incubaron las placas de ELISA con dichas cantidades de proteínas disueltas en buffer de tapizado fresco [Na_2CO_3 3,5% (p/v), NaHCO_3 5,6% (p/v), pH 9,5] durante ~15 h a 4 °C. Se lavó una vez con PBS-T [Na_2HPO_4 0,143% (p/v), KH_2PO_4 0,025% (p/v), NaCl 0,8% (p/v), KCl 0,02% (p/v), Tween-20 0,1% (v/v), pH 7,6]. Se incubó 1 h con PBS-T a T° ambiente. Se agregó el presuero en diluciones 1:1000, 1:2000 y 1:4000 en PBS-T y se incubó durante 1 h a T° ambiente. Se lavó 4 veces con PBS-T. Se incubó en oscuridad con un anticuerpo

secundario fusionado a una peroxidasa (BD Pharmingen™ “HRP Goat Anti-Mouse Ig”) en PBS-T en dilución 1:1000 durante 1 h. Se lavó 4 veces con PBS-T durante 1 min y luego 3 veces con agua destilada durante 1 min. Se agregó a cada pocillo 100 µL de una solución reveladora que contiene peróxido de hidrogeno y 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (BD OptEIA™ “TMB Substrate Reagent Set”) preparado según las instrucciones del fabricante. Luego de 3 min de reacción de revelado, ésta fue detenida agregando 50 µL de H₃PO₄ 1M a cada pozo. Se leyeron las placas de ELISA a DO₄₅₀ en un lector “Emax precision microplate reader” (Molecular Devices).

3.3.8.2 *Dot blot.*

El *dot blot* tuvo como finalidad generar una orientación *a priori* con respecto a la concentración de antisuero que se debe usar al realizar inmunodetecciones en membranas de nitrocelulosa y revelando con fosfatasa alcalina [“*Anti-Mouse IgG (Fab specific)-Alkaline phosphatase antibody produced in goat*”, Sigma®]. Se cargó directamente sobre las membranas de nitrocelulosa las siguientes cantidades de His-AtA6PR en secciones independientes: (en ng) 400; 200; 100; 50; 25 y 12,5. Se bloqueó con leche descremada/TBS-T 4% (p/v) durante ~15 h a 4 °C con agitación suave. Se lavaron las membranas dos veces con TBS-T durante 10 min. Se incubaron las membranas con los presueros como anticuerpos primarios en leche descremada/TBS-T 4% a las diluciones correspondientes (1:2000 y 1:4000) a T° ambiente con agitación suave durante 3 h. Se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 min. El revelado fue realizado como se describe en 3.3.5.

3.3.8.3 *Western blot.*

En 8 carriles de un gel de poliacrilamida (3.3.4) se resolvieron intercaladamente 1 μg de His-AtA6PR y 1 μg del control negativo, His-AtSDH. Posteriormente, se hizo una transferencia a una membrana de nitrocelulosa (3.3.5). Se cortó la membrana generando cuatro réplicas con His-AtA6PR y His-AtSDH adyacentes. Una réplica fue incubada con anticuerpo α -6xHis como control positivo de igual forma que como se describe en la sección 3.3.5. Las otras tres réplicas fueron bloqueadas con leche descremada/TBS-T 4% (p/v) durante 1 h a T° ambiente. Se lavaron una vez con TBS-T por 5 min a T° ambiente y con agitación suave. Se incubaron cada una con un presuero en dilución 1:1000 en leche descremada/TBS-T 0,4% (p/v) durante ~15 h a 4 °C con agitación suave. Se lavaron 2 veces con TBS-T por 10 min a T° ambiente y con agitación suave. El revelado de todas las réplicas fue realizado como se describe en 3.3.5.

3.3.9 Evaluación de afinidad del antisuero a AtA6PR mediante *western blot*.

Para la evaluación del suero de ratón se llevaron a cabo dos *western blots*. El primero consistió en la determinación del límite de detección en que el antisuero reconoce a AtA6PR y no al epítipo 6xHis. El segundo permitió evaluar las inespecificidades que presentan los antisueros frente a las proteínas que no hayan podido ser extraídas de la muestra en el paso de purificación (3.3.6). Además, en este último experimento se prueba la especificidad con respecto a His-MdA6PR que corresponde a una proteína homóloga a AtA6PR que comparte un 69% de identidad aminoacídica (Zamudio, 2010) y que proviene de una especie de la familia rosaceae (*Malus domestica*; Figueroa e Iglesias, 2010).

El protocolo fue similar al descrito en 3.3.5 pero con algunos cambios. Para la primera inmunodetección: Se corrió en un gel de poliacrilamida (3.3.4) distintas cantidades de His-AtA6PR (en ng) 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,3 y 15,6. Se corrió también en el mismo gel His-AtSDH como control negativo, a las mismas concentraciones y carril por medio entre las muestras de His-AtA6PR. Luego de la transferencia a la membrana de nitrocelulosa y bloqueo con leche descremada/TBS-T 4% (p/v) durante ~15 h (3.3.5), se lavó una vez con TBS-T. Se incubó con los antisueros en dilución 1:4000. Se lavó 6 veces con TBS-T durante 10 min con agitación suave a T° ambiente. El revelado fue realizado como se detalla en 3.3.5.

Para la segunda inmunodetección se corrieron dos SDS-PAGE. En el primero se cargaron 25 µg de los ECs de proteínas de *E. coli* inducidas con IPTG y sin inducir (3.3.2) y 2 µg de His-AtA6PR, His-AtSDH y His-MdA6PR purificadas [según Figueroa e Iglesias (2010) y Mandujano (2010) respectivamente]. Este gel fue teñido con azul de Coomassie para verificar la integridad de las proteínas en las muestras (3.3.4). El segundo gel fue cargado con 2,7 µg de los ECs y 100 ng de las proteínas purificadas. Luego, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se hizo un *western blot* para analizar ambos presueros junto con el control revelado con el anticuerpo primario α-6xHis, de igual manera que la que se detalla en el párrafo anterior.

3.3.10 Extracción de proteínas de *A. thaliana*.

Se cosecharon 100 mg de plántulas completas (3.1.3) y se congelaron en nitrógeno líquido. Se molió con pistilo agregando 200 µL de un buffer de extracción de proteínas descrito por Tao y col [1995; Na₂H₂PO₄ 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, tiourea 10 mM, Tween-20 0,3% (v/v), Tritón X-100 0,05% (v/v), DTT 10 mM, pH 6,8]. Se

centrifugó a 15000 g por 20 min. Se rescató el sobrenadante y se almacenó a 4 °C. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo como se describe en la sección 3.3.3.

3.3.11 *Western blot* de *A. thaliana* wt y mutantes *ata6pr-1* y *ata6pr-2* utilizando los sueros de R1 y R2.

Como prueba final de la utilización de los antisueros se realizó un *western blot* cargando en triplicado un SDS-PAGE con 25 µg de proteínas totales de *A. thaliana* wt y mutantes *ata6pr-1* y *ata6pr-2* (3.3.10) y ~5 µg de His-AtA6PR purificada (3.3.6) como control positivo. Posteriormente uno de los geles fue teñido con tinción de Coomassie (3.3.4) y a los otros dos se les realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa como se detalla en la sección 3.3.5. Se incubó una membrana con el anticuerpo α-6xHis (3.3.5), y la otra con el suero de R2 como se describe en la sección (3.3.9). Las membranas fueron reveladas de igual forma que en 3.3.5.

4. RESULTADOS.

4.1 Construcción del vector de expresión de His-AtA6PR en bacterias.

Para elaborar un vector que al introducirlo en *E. coli* le permita expresar His-AtA6PR se optó por utilizar el vector *pET28a* al cual le fue clonado el gen *AtA6PR* mediante corte y ligación con las enzimas *Bam*HI y *Not*I. Como *AtA6PR* presente en el vector *pCR8/AtA6PR* no cuenta con estos sitios de restricción flanqueantes fue necesaria la integración de estos mediante PCR convencional utilizando partidores diseñados para agregar a *AtA6PR* estas secuencias de reconocimiento. Posteriormente se clonó este amplificado en un vector de entrada (*pCR8*) para luego escindir el gen *AtA6PR* con extremos cohesivos y clonarlo en *pET28a*.

4.1.1 Clonamiento de *AtA6PR* en *pET28a* mediante *pCR8*.

Para insertar estas secuencias en los extremos del cDNA-*AtA6PR*, éste fue amplificado desde el vector *pCR8/AtA6PR* mediante PCR con Pfu usando los partidores S6F-Bam y S6R-Not1new que se muestran en la Tabla I. De esta reacción, se obtuvo un amplificado de ~950 pb (Figura 3A) correspondiente al tamaño esperado (956 pb). Posteriormente, esta banda fue purificada y sometida a una reacción adenosiltransferasa utilizando Taq, debido a que Pfu carece de esta actividad y produce amplificados romos. Dado que la estrategia utilizada requiere de la digestión de este fragmento, éste fue clonado en el vector de entrada *pCR8* de tal modo que al realizar con éxito la digestión sea posible visualizar en el gel de agarosa dos bandas correspondientes al fragmento *Bam*HI-*AtA6PR*-*Not*I y al resto del vector. Por este motivo, el producto de la reacción de PCR fue clonado en el vector *pCR8*. De los clones obtenidos, 8 fueron analizados mediante PCR de colonias con los partidores

S6F-Bam y S6R-Not1new para la verificación de la presencia del inserto en el vector. De esto, se obtuvo la misma banda de ~950 pb correspondiente al tamaño esperado para las 8 colonias analizadas (Figura 3B), indicando que la amplificación y clonación fueron realizadas con éxito.

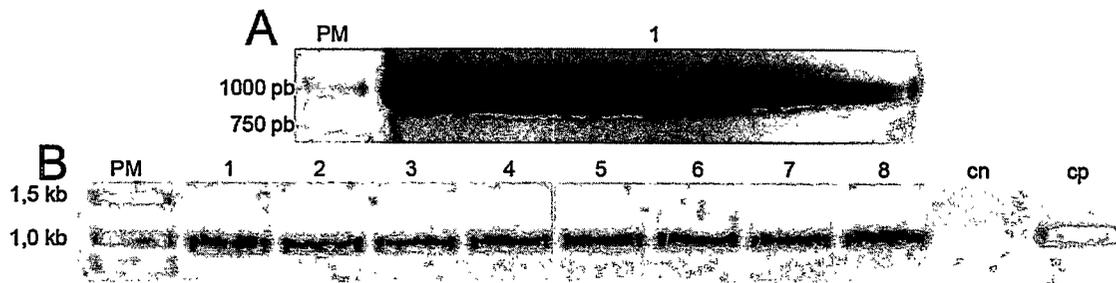


Figura 3: Amplificación de *BamHI-AtA6PR-NotI*.

(A) *BamHI-AtA6PR-NotI* amplificado desde *pCR8/AtA6PR* con partidores S6F-Bam y S6R-Not1new agregando los respectivos sitios de corte para las enzimas *BamHI* y *NotI* flanqueando el gen *AtA6PR*. (B) PCR de colonias transformadas con *pCR8/BamHI-AtA6PR-NotI* (carriles 1-8). cn es el control negativo del PCR sin agregar DNA a la reacción y cp el control positivo en donde se amplificó *AtA6PR* desde una colonia transformada con el vector *pCR8/AtA6PR*.

Ambos vectores fueron digeridos con ambas enzimas de restricción. Esto permitió preparar el vector *pET28a* linearizándolo con extremos cohesivos y obteniéndose el tamaño esperado (5337 pb) observable en Figura 4A. También se escindió el fragmento *BamHI-AtA6PR-NotI* del vector *pCR8* (937 y 2836 pb, respectivamente; Figura 4B), confirmando la correcta inserción del cDNA en este vector. Este fragmento fue purificado y luego ligado al vector *pET28a* linearizado.

Se analizaron 3 clones obtenidos de la transformación con este vector mediante PCR de colonias (no mostrado), y posteriormente PCR convencional a partir de una minipreparación de DNA plasmidial (Figura 5A), con los partidores universales T7 promotor y T7 terminador, para verificar la correcta inserción del fragmento *AtA6PR* en el vector *pET28a*. De esta forma, se obtuvo el amplificado esperado (1222 pb) para las

3 colonias analizadas y se obtuvo un amplificado de menor tamaño (317 pb) para el control negativo correspondiente al amplificado del vector *pET28a* sin el inserto.

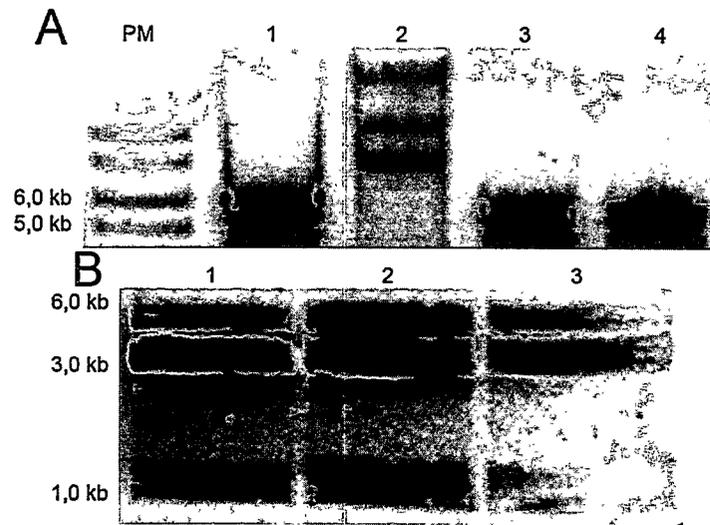


Figura 4: Digestiones de los vectores *pET28a* y *pCR8/BamHI-AtA6PR-NotI*.

(A) Digestiones simples y doble de *pET28a* con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Not*I: carril 1 digestión doble, carril 2 vector sin digerir, carriles 3 y 4 digestiones simples con *Bam*HI y *Not*I respectivamente. El tamaño esperado en todas las digestiones es de ~5300 pb correspondiente al tamaño del vector. (B) Digestiones dobles de *pCR8/BamHI-AtA6PR-NotI* con las enzimas *Bam*HI y *Not*I. Los carriles 1, 2 y 3 son tres vectores analizados provenientes de clonaciones independientes.

Luego de corroborar lo anterior, se sometieron a estos mismos clones a un análisis de orientación de inserción mediante PCR direccional a partir de las minipreparaciones de DNA plasmidial utilizando para esto el partidor universal T7 promotor (5' al gen) y los partidores S6R-Not1new (3') y S6F-Bam (5'; Tabla I) en donde debería observarse un amplificado dependiendo de si el fragmento *AtA6PR* fue integrado en sentido o antisentido con respecto al promotor, respectivamente. El resultado de este análisis fue el esperado en donde se observó amplificación de un producto del tamaño deseado (1127 pb) sólo en la reacción de PCR con partidores T7 promotor y S6R-Not1new correspondiente a la configuración en sentido del inserto con respecto al promotor en *pET28a* (Figura 5B).

Posteriormente estos clones fueron secuenciados (MACROGEN) y comparados con el CDS de *AtA6PR* depositada en www.arabidopsis.org (*At2g21250*) obteniéndose un 100% de identidad nucleotídica entre todos los clones y la secuencia de referencia.

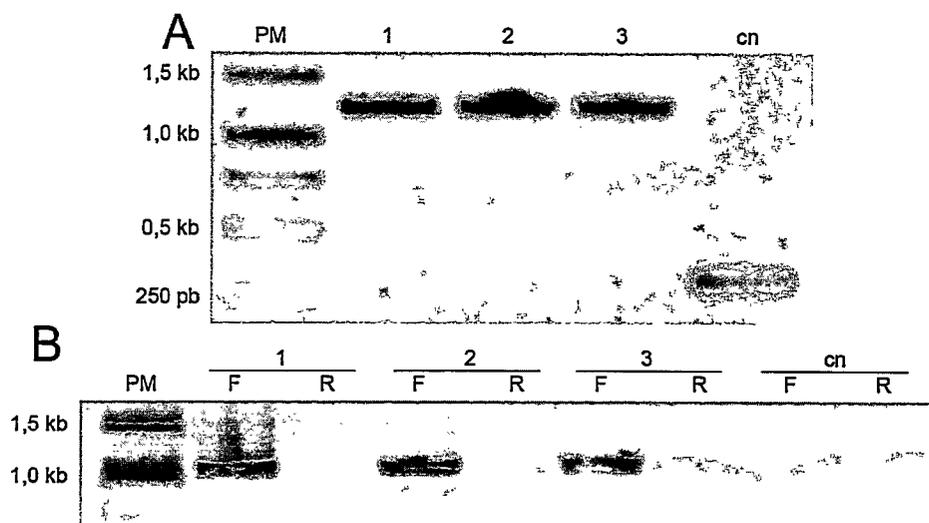


Figura 5: Análisis de inserción y orientación del fragmento *Bam*HI-*AtA6PR*-*Not*I clonado en el vector *pET28a*.

1, 2 y 3 son tres vectores analizados de clonaciones independientes. cn es el control negativo en donde se usó el vector *pET28a* sin inserto. (A) PCR convencional utilizando los partidores universales T7 promotor y T7 terminador externos al inserto amplificando el gen *AtA6PR* clonado en el vector. (B) PCR direccional para verificar orientación del inserto *AtA6PR* en *pET28a*. En los carriles con la letra F los partidores utilizados para la reacción de PCR fueron T7 promotor y S6R-*Not*1new, mientras que en los que están señalados con la letra R se utilizó T7 promotor y S6F-*Bam*.

4.2 Expresión de His-*AtA6PR* en bacterias.

Una vez clonado *AtA6PR* correctamente en *pET28a*, lo cual debería agregar un epítipo 6xHis en su N-terminal, se procedió a transformar la cepa *BL21(DE3)pLysS* con dicho vector (*pET28a/AtA6PR*; 3.1.2) para luego inducir la producción de la proteína recombinante. Estas células fueron sometidas a una inducción con IPTG, se extrajeron las proteínas totales y se separaron las fracciones soluble e insoluble (3.3.2). Tanto el extracto crudo inducido con IPTG y el extracto sin inducir, como las fracciones solubles e insolubles correspondientes de cada uno fueron evaluadas mediante SDS-PAGE, para corroborar la integridad de las proteínas en la muestra, y

western blot, para verificar la presencia de His-AtA6PR. Como se puede apreciar en la imagen del SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (Figura 6A), fue posible separar las proteínas presentes en las muestras analizadas pudiéndose observar una banda con el tamaño esperado de His-AtA6PR (38,56 kDa, flecha negra) de mayor intensidad

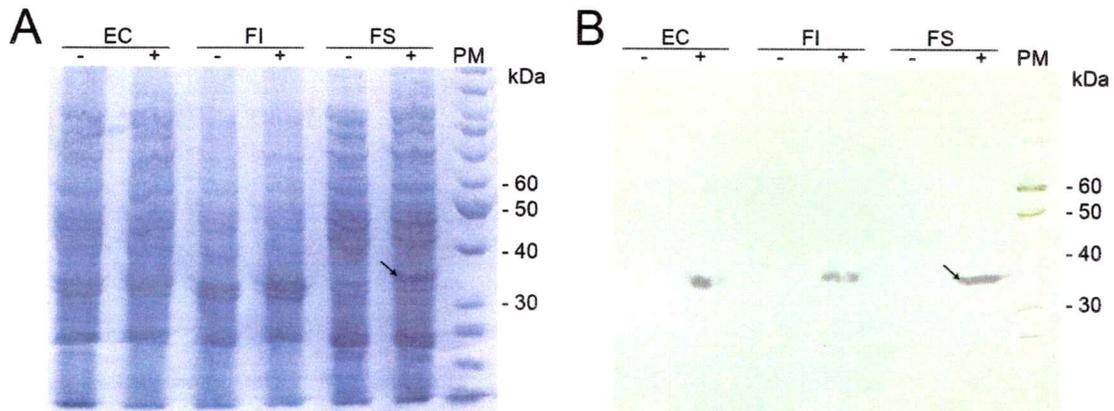


Figura 6: Expresión de His-AtA6PR en *E. coli*.

SDS-PAGE (A) y *western blot* (B) del sistema de expresión de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada con el vector pET28a/AtA6PR inducible con IPTG. Se muestran extractos crudos (EC) de células inducidas (+) y sin inducir (-) y sus respectivas fracciones solubles (FS) e insolubles (FI). El *western blot* fue incubado con anticuerpo primario α -6xHis.

en la FS de las células inducidas y que no se encuentra en la FS de las células no inducidas. Esto da indicios *a priori* de que se trata de His-AtA6PR, siendo corroborado por la detección de esta banda en el *western blot* (Figura 6B, flecha negra). Análisis bioinformático y experimental previos indican que AtA6PR es una proteína citoplasmática (Zamudio, 2010; sección 1.6.1). Por lo tanto, era de esperar que esta proteína se encontrase en la fracción soluble al ser expresada en bacteria; sin embargo, fue posible detectarla con similar intensidad tanto en FS+ como en FI+. La imagen del SDS-PAGE teñido fue analizada con el programa ImageJ, determinando el porcentaje de His-AtA6PR con respecto a las proteínas totales en la fracción soluble. Se obtuvo que ~9% de esta fracción corresponde a His-AtA6PR, siendo ésta una

cantidad suficiente (>5%) para continuar con el proceso de purificación sin la necesidad de optimizar el sistema de expresión de His-AtA6PR.

4.3 Purificación de His-AtA6PR.

Previo a la inmunización de los ratones fue necesaria la purificación de His-AtA6PR disminuyendo las probabilidades de encontrar inespecificidades en el anticuerpo policlonal generado, además de las que son proporcionadas por el adyuvante de Freund. Para esto se aplicó la fracción soluble, en donde se encuentra His-AtA6PR, a una columna de afinidad a Ni, y las proteínas adheridas fueron eluidas con imidazol 250 mM (3.3.6). Luego, se resolvieron las fracciones eluidas mediante SDS-PAGE y se tñieron con azul de Coomassie (Figura 7A, C y E). Estos geles también fueron analizados mediante *western blot* utilizando el anticuerpo α -6xHis (Figura 7 B, D y F, respectivamente).

La flecha negra (Figura 7 A y B) apunta a la banda correspondiente a His-AtA6PR en FS (~38,5 kDa), sin embargo, en la Figura 7B se observa una leve detección en la fracción frente (F; flecha roja) indicando que una proporción de His-AtA6PR no fue retenida en la columna llegando esta última a su máxima capacidad. Luego, en las fracciones 4 a 7 eluidas con imidazol 100 mM (Figura 7C y D) el peso de las bandas observadas en el SDS-PAGE (~27 kDa) no coincide con el de las observadas en el *western blot* (~38 kDa) en las mismas fracciones. Esto indica que a esta concentración de IPTG, His-AtA6PR comienza a desprenderse de la columna pero en menor cantidad

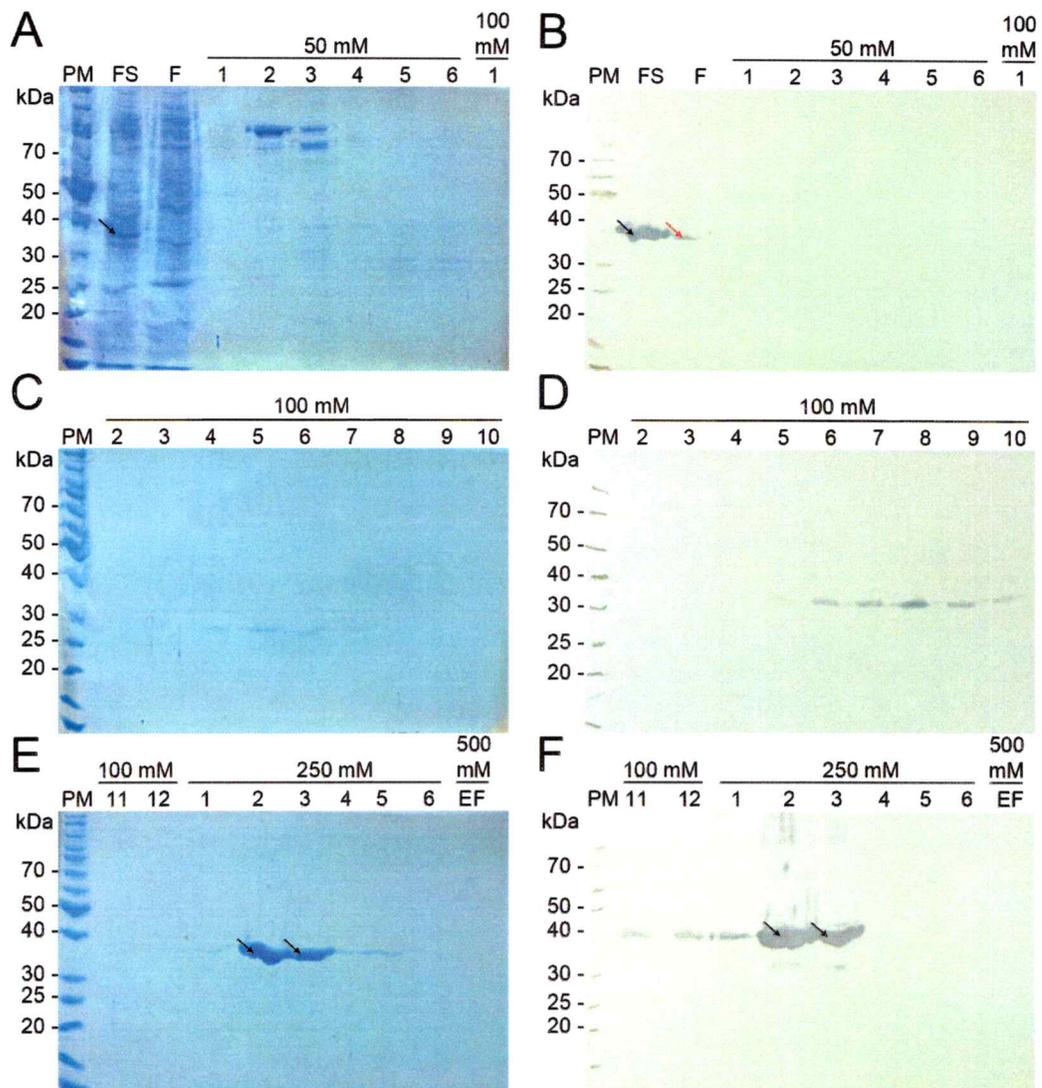


Figura 7: Purificación de His-AtA6PR con columna de afinidad a Ni. En A, C y E se muestran SDS-PAGEs y en B, D y F sus respectivos *western blots* revelados con el anticuerpo α -6xhis. En A se muestra la fracción soluble FS de las células inducidas con IPTG y en el siguiente carril (F) corresponde a la muestra luego de haber pasado a través de la columna. Los siguientes seis carriles (1-6) corresponden a las primeras seis fracciones obtenidas al eluir con imidazol 50 mM. El último carril corresponde a la primera fracción eluida con imidazol 100 mM. En C se muestran las fracciones 2 a 10 eluidas con imidazol 100 mM. En E se muestran las fracciones 11 y 12 de la elución con imidazol 100 mM, y luego se muestran las fracciones 1 a 6 de la elución con imidazol 250 mM.

que el contaminante visible en el SDS-PAGE. En la Figura 7E, en las fracciones 11 y 12 eluidas con imidazol 100 mM ya no es posible observar el contaminante de ~27 kDa sugiriendo que este fue eluido en su mayor parte.

Se puede observar una única proteína con el peso molecular esperado (~38,5 kDa) entre las fracciones 2 y 3 de elución con imidazol 250 mM (Figura 7E, flechas negras), y en otras purificaciones, siempre fue detectada entre las fracciones 1 y 4 por leves cambios en el montaje experimental. Al someter las mismas fracciones a un análisis de *western blot* (Figura 7F), se detectó una banda de igual tamaño con el anticuerpo α -6xHis, demostrando que ésta corresponde a His-AtA6PR (Figura 7F, flechas negras). Aunque se pudo detectar His-AtA6PR en el análisis de *western blot*, hubo también detección de una banda de menor tamaño y menor intensidad que también fue eluida en imidazol 250 mM (~30 kDa; Figura 7F, imidazol 250 mM fracciones 2 y 3). Como control, se pudo observar la misma banda en el EC y su respectiva FS no purificada provenientes de células inducidas con IPTG y no está presente en las fracciones de células no inducidas (no fue posible captar dicha banda en la Figura 6B). Por lo tanto, se estima que la banda inespecífica es una fracción de His-AtA6PR proveniente de la ruptura mecánica que se producen el proceso de sonicación.

Aparentemente, la cantidad de His-AtA6PR cargada en la columna de afinidad fue superior al máximo que ésta es capaz de retener, lo cual se ve reflejado en la banda del mismo peso molecular pero de menor intensidad detectada en el frente de migración (Figura 7B, carril F). A pesar de esto, y en consulta con don Leonardo Vargas (Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile), la cantidad y pureza de His-AtA6PR fue suficiente para seguir con las inmunizaciones de los ratones.

4.4 Análisis del presuero.

Cada ratón fue inmunizado 3 veces, y cada inmunización contuvo 50 µg de His-AtA6PR purificada y mezclada con adyuvante de Freund. De esta forma, teóricamente, se genera una respuesta inmune adaptativa más ávida frente al antígeno. Mientras mayor sea la especificidad del suero del ratón, y más inmunoglobulina contenga que reconozca al antígeno, las detecciones que se realicen con el suero que se extraiga tendrán menos inespecificidades y un límite de detección más bajo. Es por esto que previo a la extracción total del suero, fue necesario evaluar su afinidad por el antígeno (His-AtA6PR) y la especificidad por éste, extrayendo una pequeña muestra de sangre, de tal forma que para los animales no sea letal. Con este propósito, se extrajeron 50 µL de suero (presuero) de cada ratón tres días después de la tercera inmunización y se evaluó su efectividad mediante ELISA, *dot blot* y *western blot*.

4.4.1 ELISA.

Se realizó el ensayo de ELISA de forma convencional en donde se evaluaron 3 diluciones de cada presuero (1:1000, 1:2000 y 1:4000) para detectar distintas concentraciones del antígeno (His-AtA6PR) y del control negativo (His-AtSDH). Al revelar con peroxidasa, hubo una clara preferencia de detección del antígeno sobre la detección del control con los tres presueros. Como se muestra en la Figura 8, con los presueros de R1 y R3 se detectó inespecíficamente la proteína control (siendo más alta la inespecificidad detectada por R1 que por R3). Sin embargo, el presuero de R2 apenas detectó el control negativo, indicando que, medido por este ensayo, R2 podría estar produciendo el presuero con mayor afinidad y especificidad a AtA6PR.

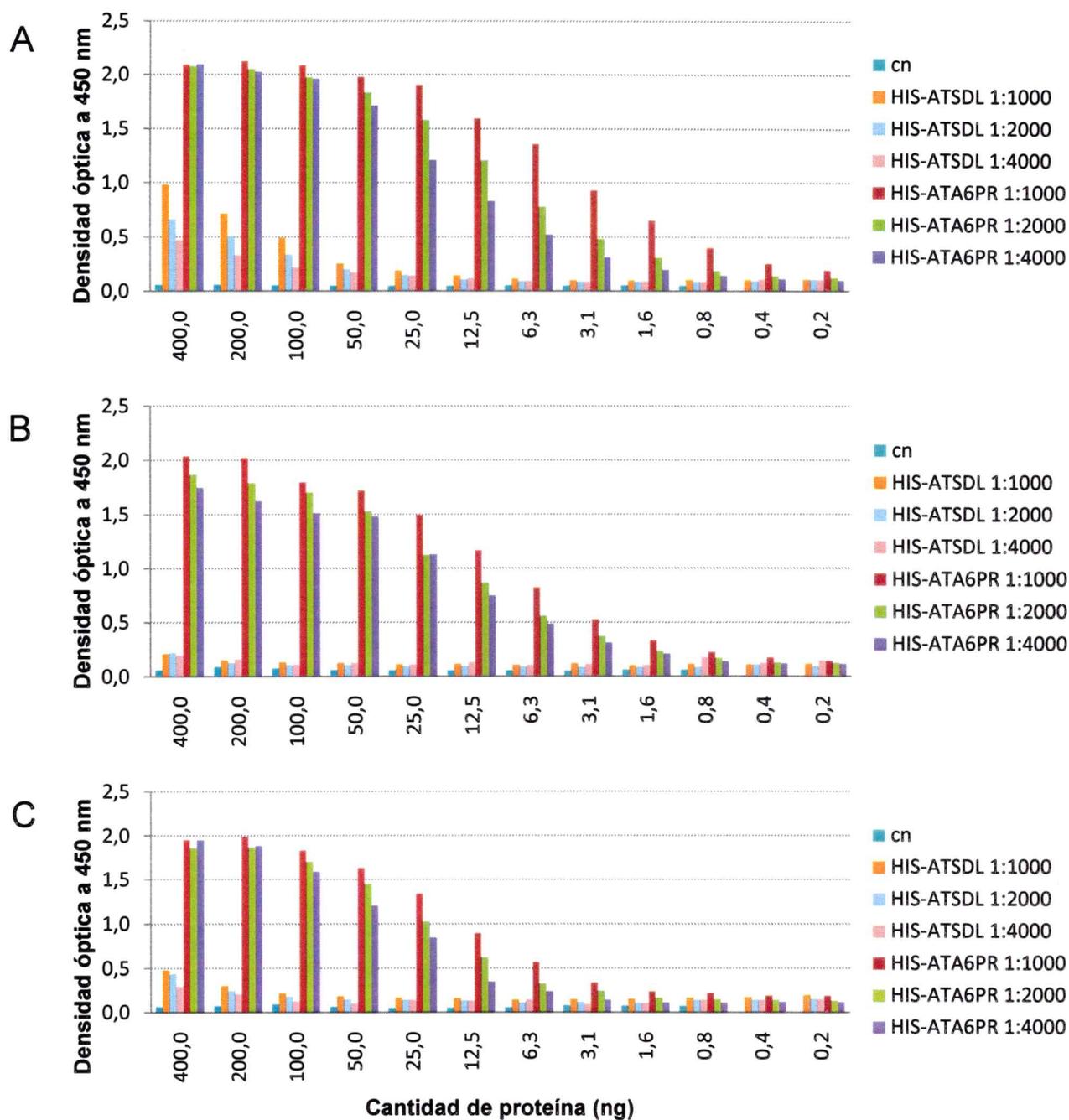


Figura 8: Ensayos de ELISA para evaluar la afinidad de los presueros por AtA6PR. Los gráficos muestran los niveles de densidad óptica a 450 nm registrada en función de la cantidad de proteína cargada en el pocillo. Se muestra el control negativo (cn) al que no se agregó anticuerpo primario, por lo tanto las mediciones registradas corresponden en promedio al límite de detección de la placa. Se cargaron desde 400 ng hasta 0,2 ng de His-AtA6PR como antígeno, y de His-AtSDH como control. Los gráficos A, B y C muestran los resultados obtenidos al utilizar los antisueros provenientes de R1, R2 y R3 respectivamente. Cada uno fue utilizado en diluciones 1:1000, 1:2000 y 1:4000.

A pesar de que las diluciones 1:1000 y 1:2000 presentan un menor límite de detección, al usar la dilución 1:4000, el control His-AtSDH tiene un mínimo de detección a mayores cantidades que al usar las otras dos diluciones. Es decir, al realizar una inmunodetección usando las diluciones 1:1000 y 1:2000 es posible detectar cantidades menores de His-AtA6PR, sin embargo, es posible que sean detectadas también un mayor número de inespecificidades. En cambio al utilizar una dilución de 1:4000, estas inespecificidades debieran disminuir, restringiendo el límite de detección de His-AtA6PR. Por otro lado, al utilizar una mayor dilución se disminuye el uso excesivo de antisuero.

4.4.2 *Dot blot.*

El *dot blot* permitió determinar la concentración adecuada de presuero necesaria para una mejor detección del antígeno sobre una membrana de nitrocelulosa. De esta forma puede disminuir aún más el uso excesivo de anticuerpo en los *western blots* posteriores. Se agregó una serie de diluciones de His-AtA6PR purificada en una membrana de nitrocelulosa y se realizó un ensayo de detección con distintas diluciones de los tres presueros (3.3.8.2). En la Figura 9 se puede observar que hay detección de His-AtA6PR en membranas con los 3 presueros. Para los 3 ratones hubo detección hasta los 50 ng de antígeno cuando se usó una dilución de presuero de 1:2000, y hasta los 100 ng cuando se usó 1:4000. Incluso, con el presuero de R2 utilizado a una concentración 1:1000 fue posible detectar hasta 25 ng del antígeno (no mostrado).

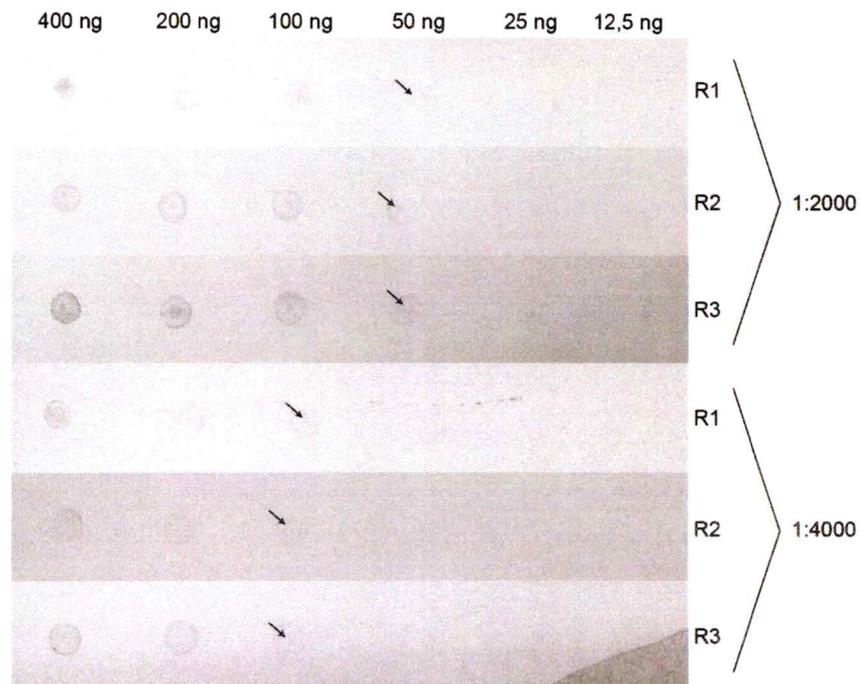


Figura 9: *Dot blot* para la evaluación de la concentración apropiada en el uso de los presueros α -His-AtA6PR.

Se muestran seis membranas en las cuales se adhirió His-AtA6PR en forma puntual directamente sobre la superficie en las cantidades señaladas en la parte superior (400 a 12,5 ng). Cada lámina se incubó con el presuero que se señala a la derecha (R1, R2 o R3) en dilución 1:2000 o 1:4000. Las flechas indican las cantidades mínimas de His-AtA6PR detectadas a cada dilución de presuero utilizada. Los tres presueros presentaron el mismo límite de detección: 50 ng de His-AtA6PR al ser aplicados en dilución 1:2000, y 100 ng cuando son aplicados 1:4000.

Considerando este resultado, se puede afirmar que los tres presueros están detectando una proteína en la muestra de His-AtA6PR purificada, y que los tres presueros pueden ser utilizados a la misma concentración en las condiciones de experimentales utilizadas. Sin embargo, podría ser que hayan detectado un contaminante en la muestra (Figura 7), por lo que debió ser demostrado el peso molecular de las proteínas detectadas por *western blot* (0). De todas formas se obtuvo que, utilizar una dilución de 1:4000 de cualquiera de los tres sueros es suficiente para los ensayos posteriores de inmunodetección en membranas de nitrocelulosa.

4.4.3 Western blot.

Dado que los tres presueros fueron capaces de detectar proteínas directamente adheridas a la membrana de nitrocelulosa en el *dot blot* (4.4.2), se procedió a realizar un análisis de *western blot* contra la proteína His-AtA6PR y contra una proteína control (His-AtSDH), ambas purificadas.

Como se puede apreciar en la Figura 10, al utilizar el anticuerpo α -6xHis ambas proteínas (His-AtA6PR y His-AtSDH) fueron detectadas (flechas negra y roja respectivamente). Sin embargo, al revelar usando cada uno de los tres presueros se detectó solamente el antígeno (His-AtA6PR, flechas azules) y no así la misma cantidad de la proteína control (His-AtSDH) demostrándose para los tres presueros una mayor afinidad por AtA6PR que por el epítipo 6xHis.

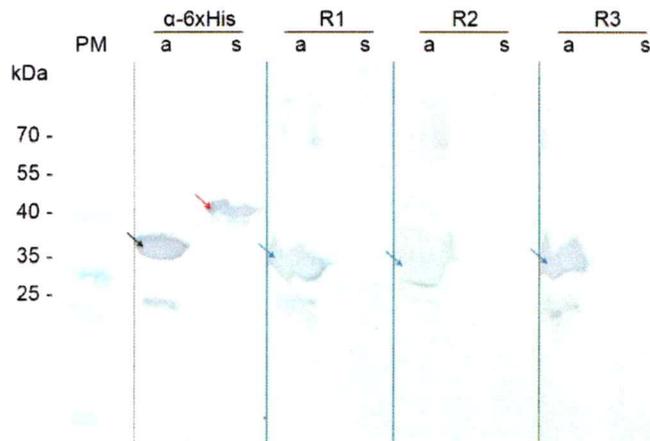


Figura 10: *Western blot* para la evaluación de afinidad de los presueros por His-AtA6PR. Se muestran cuatro *western blots* en donde se cargó 1 μ g de His-AtA6PR (a; ~38,5 kDa) y 1 μ g de His-AtSDH (s; ~43 kDa) purificadas. El primero fue incubado con el anticuerpo primario α -6xHis como control. Las siguientes tres membranas fueron incubadas con los respectivos presueros de R1, R2 y R3 en dilución 1:1000.

Aunque se pueden observar bandas inespecíficas en los tres presueros cercanas a los ~70 kDa, lo anterior comprueba que estas bandas sólo se deben a que las inmunizaciones realizadas no contuvieron al antígeno 100% puro, sino que este fue mezclado con el adyuvante de Freund para luego realizar las inmunizaciones. Este adyuvante contiene otras proteínas capaces de generar respuestas inmunes adaptativas y conllevar a que los sueros presenten inespecificidades a la hora de detectar a AtA6PR. Además, se puede observar que el presuero de R2 tiene varias inespecificidades que los otros dos presueros no tienen. Esto puede deberse a que el suero de cada ratón es diferente de cualquier suero de otro ratón, aunque ambos hayan sido expuestos al mismo antígeno.

Este *western blot* demuestra que los sueros de los tres ratones ya habrían generado la respuesta inmune suficiente para detectar a His-AtA6PR y con suficiente especificidad para realizar una última inmunización y posteriormente extraer el suero final.

4.5 Análisis del antisuero.

Luego de analizar los presueros, se realizó una última inmunización de los tres ratones (3.3.7). Lamentablemente, un ratón falleció en este proceso, pero 3 días después, se procedió a extraer el suero final de los dos ratones restantes (R1 y R2). Ambos antisueros fueron analizados mediante dos *western blots*. La primera inmunodetección consistió en resolver las proteínas purificadas y analizar el límite en que los antisueros

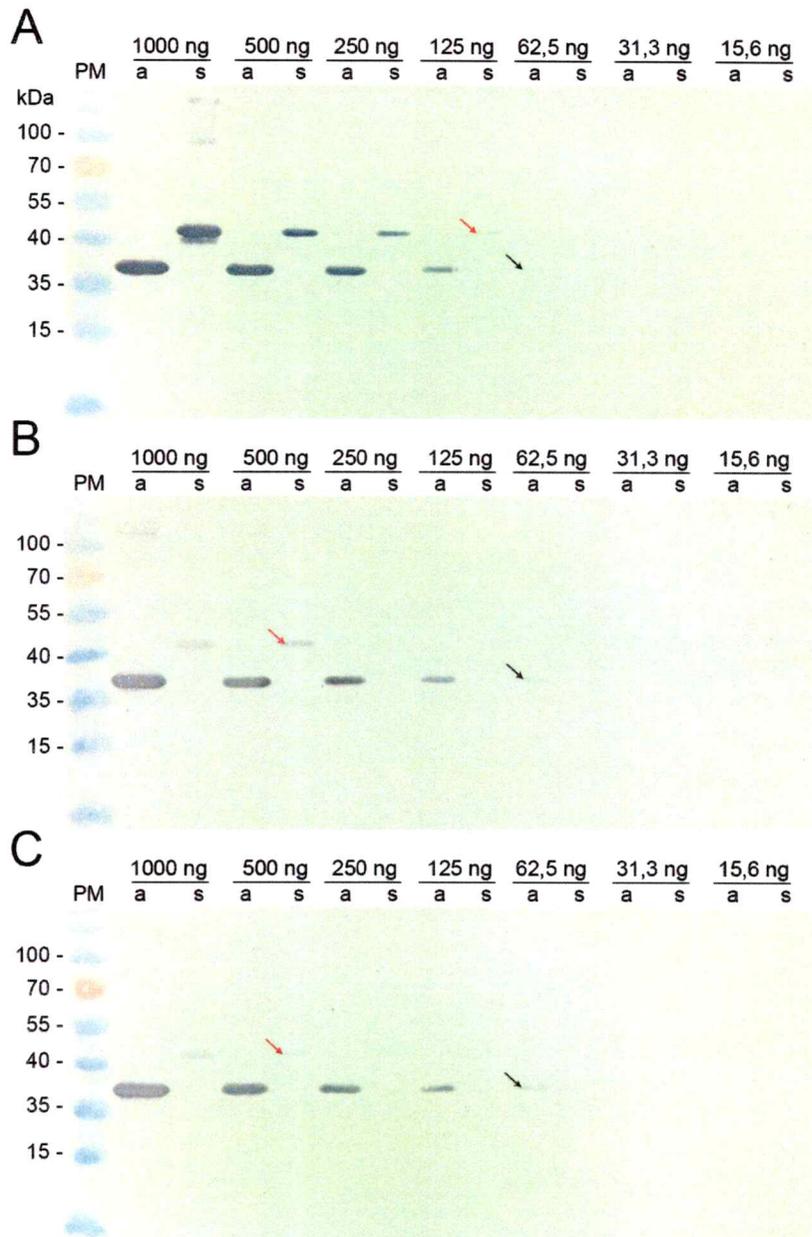


Figura 11: *Western blot* para análisis del límite de detección.

Se cargaron distintas cantidades de His-AtA6PR (a) y His-AtSDH (control, s) desde 1000 ng (carriles 1 y 2 respectivamente) hasta 15,6 ng (carriles 13 y 14 respectivamente). En A se usó el anticuerpo primario α -6xHis como control. B y C Antisueros de R1 y R2 respectivamente usados en dilución 1:4000.

detectan a AtA6PR exclusivamente y no así al epítipo 6xHis. El control incubado con anticuerpo primario α -6xHis (Figura 11A) muestra un límite de detección de His-AtA6PR y del control His-AtSDH de 62,5 ng (flecha negra) y 125 ng (flecha roja) respectivamente. Como se muestra en la Figura 11 (B y C) ambos antisueros fueron

capaces de detectar el antígeno hasta los 62,5 ng (flechas negras) y el control negativo (His-AtSDH, flechas rojas) sólo hasta los 500 ng. Esto fue realizado con una dilución de 1:4000 de los antisueros y los mismos 6 lavados post incubación primaria. Se puede observar también que a cantidades menores a 1000 ng, no fueron detectadas bandas inespecíficas en la muestra con His-AtA6PR ni en el control His-AtSDH con ambos antisueros ni con el anticuerpo α -6xHis.

El segundo *western blot* consistió en evaluar la especificidad de los antisueros con respecto a AtA6PR, tomando en cuenta que el antígeno con el que fueron elaborados contiene el epítipo 6xHis y además fue mezclado con el adyuvante completo de Freund. También se añadió en el ensayo una proteína homóloga de manzano (His-MdA6PR) con la que AtA6PR comparte un 69% de identidad aminoacídica, obtenida utilizando un sistema de expresión y purificación similar al que se usó para AtA6PR [*E. coli* BL21Star(DE3)/MdA6PR; Figueroa e Iglesias, 2010]. El resultado se muestra en la Figura 12 en donde se observa que bajo las condiciones utilizadas (3.3.9), hubo detección de 100 ng del antígeno His-AtA6PR y no de los 100 ng del control His-AtSDH con ambos antisueros. Además se puede observar que hubo detección de His-AtA6PR en la muestra de EC inducido y no hubo detección de ésta en el EC proveniente de células sin inducir. En el *western blot* control (Figura 12A) incubado con anticuerpo primario α -6xHis se observa detección de His-AtA6PR en las fracciones EC+ y purificada (flechas negras) y no en la fracción EC-. También se observa detección de las proteínas purificadas His-AtSDH (flecha roja) y His-MdA6PR (flecha naranja).

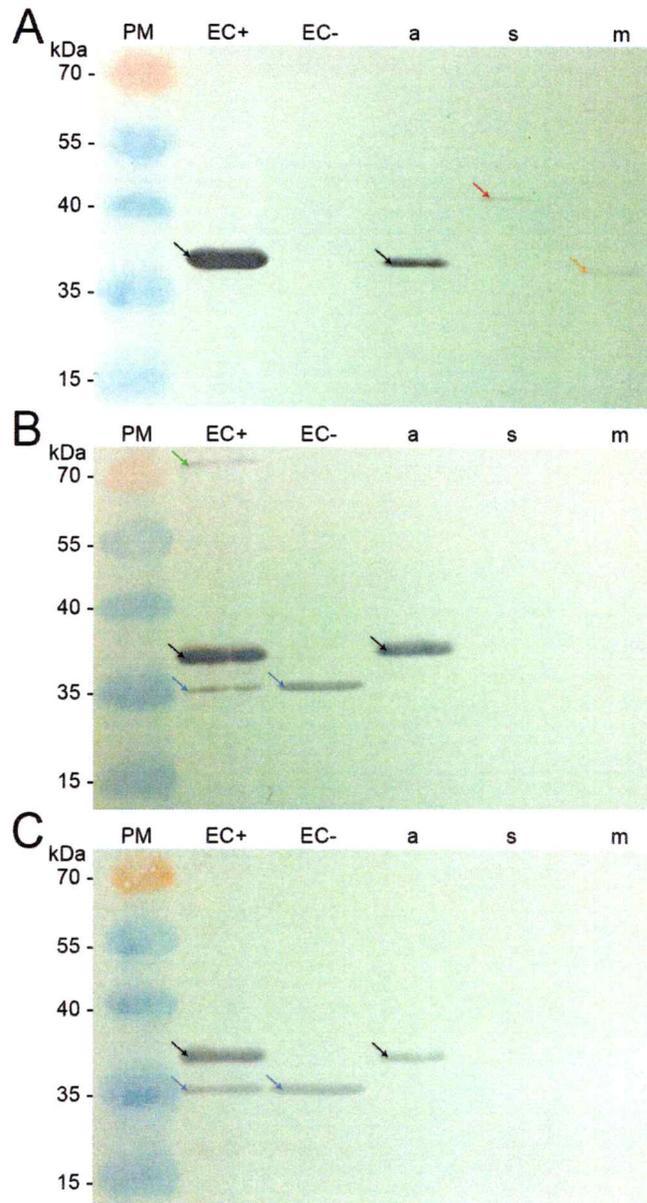


Figura 12: Prueba de especificidad de los sueros de R1 y R2 mediante *western blot*. EC+ y EC- son extractos crudos de *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS productora de His-AtA6PR. EC+ proviene de células inducidas y EC- de células sin inducir. Se cargaron 25 μ g de proteínas de cada extracto. En los carriles a, s y m fueron cargados 100 ng de His-AtA6PR, His-AtSDH y His-MdA6PR respectivamente. His-AtA6PR corresponde a la posible sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa de *Arabidopsis thaliana*, producida en *E. coli*. His-MdA6PR corresponde a una A6PR de manzano que también comparte el epítipo 6xHis. His-AtSDH no comparte identidad con His-AtA6PR pero si posee el epítipo 6xHis. En B y C se muestra el mismo *western blot* pero incubado con los antisueros de R1 y R2 respectivamente en dilución 1:4000.

Por otro lado, se observan bandas inespecíficas en los ECs. En ambos hubo una banda inespecífica de ~35 kDa (Figura 12 B y C, flechas azules) siendo ésta la más

cercana en tamaño al antígeno. Se observan otras inespecificidades de menor tamaño para ambos sueros, habiendo en total 2 bandas inesperadas al incubar con R1, y 3 bandas inesperadas con R2 (no mostrado). Se observa también una banda inesperada en EC+ entre 70 y 85 kDa que no se encuentra en EC-. Esta banda también fue observada en (C) sin embargo con muy baja intensidad y no fue posible captarla en la imagen.

Con el suero de R1 fue posible detectar los 100 ng de His-MdA6PR y no así con el suero de R2. His-AtSDH no fue detectada con los sueros R1 y R2, sin embargo hubo repeticiones de este resultado (no se muestra) en donde si hubo detección de esta proteína con ambos antisueros.

Con los resultados obtenidos en estos dos *western blots* se demuestra la alta especificidad de los antisueros de R1 y R2 frente a la sección AtA6PR en comparación con el epítipo 6xHis y la proteína homóloga MdA6PR, al aplicarlos en las condiciones mencionadas.

4.6 Detección de AtA6PR en *A. thaliana* wt y mutantes *ata6pr-1* y *ata6pr-2*.

El resultado de este último *western blot* permite probar la efectividad de los sueros de R1 y R2, y la expresión de AtA6PR en *A. thaliana* wt y en las mutantes insercionales *ata6pr-1* y *ata6pr-2* (Figura 13 C y D). De esta forma, se utilizó como control positivo a His-AtA6PR purificada desde el sistema de expresión en *E. coli*, y además se realizó un *western blot* paralelo incubado con el anticuerpo α -6xHis, también como control (Figura 13B). De acuerdo a lo esperado, se muestra con flechas rojas la detección del control positivo bajo la aplicación del anticuerpo α -6xHis como de los antisueros de R1

y R2. Se puede observar también que no hubo detección alguna en las muestras de proteínas de *A. thaliana* al utilizar el anticuerpo control α -6xHis. Pero al revelar con los antisueros de R1 y R2, se obtuvo una banda de ~ 35 kDa (flechas negras) en el carril wt que corresponde al peso hipotético de AtA6PR (sin el epítipo 6xHis). Esta banda se encuentra ausente en los carriles 1 y 2 correspondientes a las muestras de *ata6pr-1* y *ata6pr-2*, indicando que no existe una expresión detectable de AtA6PR en las mutantes insercionales en las condiciones utilizadas.

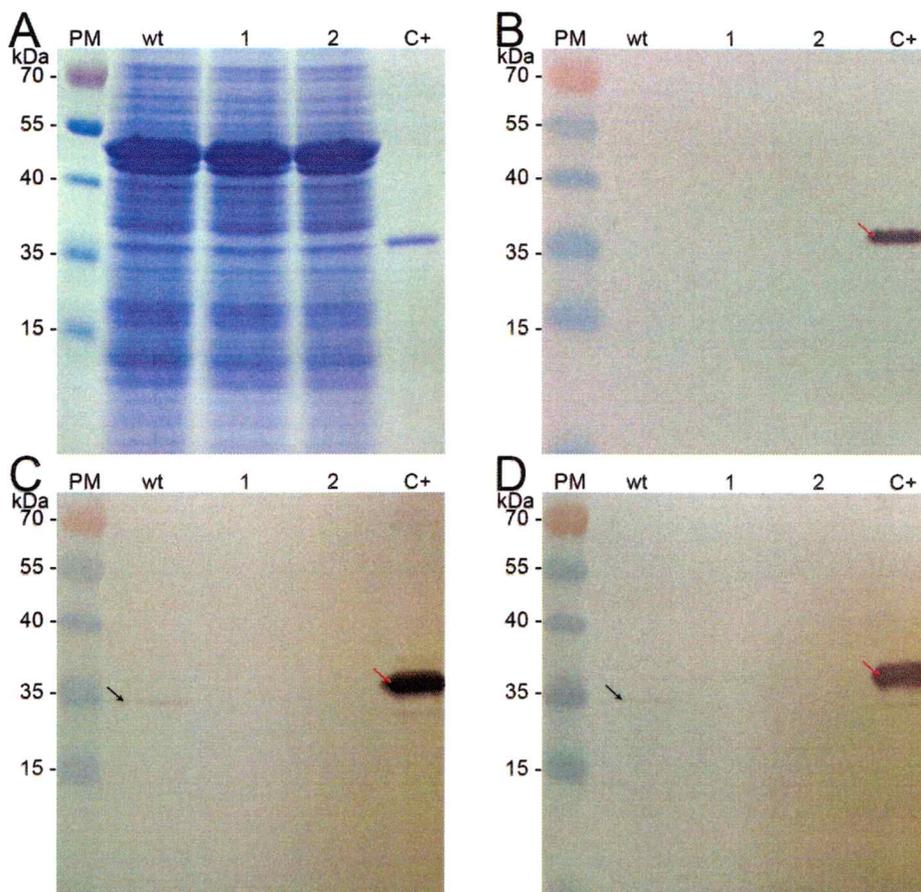


Figura 13: SDS-PAGE y *western blots* de *A. thaliana* wt y mutantes *ata6pr-1* y *ata6pr-2*. Los carriles wt, 1 y 2 corresponden a las muestras de proteínas de *Arabidopsis thaliana* silvestre y las mutantes insercionales *ata6pr-1* y *ata6pr-2* respectivamente. C+ es el control positivo que corresponde a His-AtA6PR purificada desde el sistema de expresión en *E. coli* (véase sección 3.3.6). PM corresponde al estándar de peso molecular. En A se muestra el SDS-PAGE. En B se muestra el *western blot* control incubado con anticuerpo α -6xHis. En C y D se muestran los *western blots* incubados con los sueros de los ratones R1 y R2 (α -His-AtA6PR) respectivamente. Las flechas rojas muestran la banda correspondiente a la detección de His-AtA6PR ($\sim 38,5$ kDa). Las flechas negras muestran la banda correspondiente a AtA6PR (~ 35 kDa).

5. DISCUSIÓN

En este seminario de título, se elaboraron dos sueros de ratón que reconocen a AtA6PR, una posible sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa de *Arabidopsis thaliana*. Esto se llevó a cabo mediante la generación de un sistema de expresión heterólogo de AtA6PR en *E. coli*. Posteriormente, esta proteína fue purificada mediante el uso de una columna de afinidad a Ni que retiene a AtA6PR por el epítipo 6xHis fusionado en su N-terminal. Con esto se realizaron cuatro inmunizaciones totales a cada ratón y finalmente se extrajeron y analizaron ambos sueros generados.

A pesar de tratarse de una proteína proveniente de un organismo eucarionte, se usó a *E. coli* dada su facilidad de manipulación y alta tasa de producción de proteínas que se puede lograr en conjunto con el sistema pET. Otros sistemas de expresión como *Pichia pastoris* o *Saccharomyces cerevisiae* (levaduras) que permiten el correcto plegamiento de proteínas provenientes de organismos eucariontes, fueron descartados dado que se ha reportado que para la generación de un antisuero que reconoce una proteína citoplasmática homologa a AtA6PR de manzana (MdA6PR; Figueroa y col. 2010), este sistema es adecuado para la generación de un antisuero policlonal. Al tratarse de una proteína que se localiza en el citoplasma (Zamudio, 2010) esta reductasa no presentaría modificaciones post-traduccionales que varíen significativamente su estructura y epítopos al ser expresada en este organismo procarionte. A pesar de esto, el correcto plegamiento no es trascendental para la generación de un anticuerpo, cuando el propósito de la elaboración de éste es la inmunodetección mediante *western blot*. En este tipo de ensayos, lo que se detecta es la proteína en estado denaturado, por lo tanto al activar la respuesta inmune adquirida en un ratón para que éste produzca anticuerpos, no es necesario que la proteína se encuentre en estado nativo.

En el momento de elegir la cepa de *E. coli* a usar para la generación de His-AtA6PR recombinante, se barajó la posibilidad de utilizar otros vectores, como por ejemplo *pGEX* el cual fusiona el epítipo GST a la proteína de interés, en vez de epítipo 6xHis que agrega el vector pET. Sin embargo, el sistema de expresión electo [vector *pET28a* con la cepa *BL21(DE3)pLysS*] posee cualidades que se ajustan a lo que se requiere para realización de este trabajo, y se detallan a continuación. Una vez transformado, este sistema actúa mediante tres componentes principales: el lisógeno DE3 que posee el gen de la RNA polimerasa del virus T7 comandado por el promotor del operón *lac*, el plásmido *pLysS* que posee el gen que codifica para la lisozima de T7, y *pET28a* que contiene el gen de interés a expresar (en este caso *His-AtA6PR*). El promotor del operón *lac* se encuentra inhibido por el producto génico de *lacI* en condiciones óptimas de crecimiento y ausencia de lactosa. Cuando este promotor es activado - en presencia de lactosa o su análogo no hidrolizable IPTG - la RNA polimerasa de T7 transcribe el gen presente en el vector *pET28a*. En ausencia del plásmido *pLysS*, cuando el promotor T7 se encuentra inhibido por *lacI*, de todas formas existe una expresión basal de la RNA polimerasa de T7, ocasionando que el control negativo, que no debiera tener expresión de His-AtA6PR, se exprese, aunque en menor cantidad. Sin embargo, en presencia del plásmido *pLysS*, la producción de la lisozima de T7 elimina la expresión basal de la RNA polimerasa, permitiendo que haya acumulación de la proteína de interés solamente al agregar IPTG, y no en el control negativo. De esta forma se comprueba que lo que se está expresando (y posteriormente purificando) es realmente His-AtA6PR (Figura 6), y no otra proteína bacteriana de similares características.

Como primeros análisis de los presueros se realizaron un ensayo de ELISA (4.4.1; Figura 8) y un *dot blot* (4.4.2; Figura 9). El propósito de estos ensayos fue obtener una primera evidencia de la efectividad y eficiencia de los sueros. En estos ensayos se probó que los sueros fueron capaces de detectar a His-AtA6PR purificada al aplicarlos en las diluciones utilizadas. Sin embargo, según los resultados obtenidos por *western blot* (Figura 10) no sólo se observa una banda esperada para His-AtA6PR, sino también otras bandas, indicando que His-AtA6PR no se encuentra pura en su totalidad y por lo tanto las señales detectadas en los ensayos de ELISA y *dot blot* no corresponden únicamente a His-AtA6PR, sino también a estas proteínas contaminantes. No obstante, la señal obtenida para His-AtA6PR en los *western blots* es notoriamente mayor al de los contaminantes, por lo tanto, las señales obtenidas en el ELISA y *dot blot* corresponden, de todas formas, mayoritariamente a His-AtA6PR.

Teniendo esto presente, con el ensayo de ELISA se obtuvo que con los tres presueros es posible detectar a His-AtA6PR, sin embargo, se destaca la diferencia entre los presueros por la intensidad con la que detectan a His-AtSDH y a la proteína control (His-AtSDH) bajo las distintas diluciones con las que fueron aplicados. Con esto se obtuvo que las mayores diluciones de presuero detectaron al epítipo 6xHis con menor avidéz sin disminuir sustancialmente la afinidad por la fracción AtA6PR. El *dot blot*, por otro lado, mostró correspondencia con el resultado obtenido en el ensayo de ELISA, en el cual se vio que las diluciones mayores son suficientes para la detección de His-AtA6PR en membranas de nitrocelulosa. No obstante, sin duda el *western blot* corroboró concluyentemente lo obtenido en los otros dos ensayos, demostrando que los tres presueros son capaces de detectar a His-AtA6PR por la banda que se observa con mayor intensidad, a pesar de las inespecificidades. Además se confirma que los

preseros tienen mayor afinidad por la fracción AtA6PR que por el epítopo 6xHis. De todas maneras, se esperaba obtener algunas inespecificidades dado que son sueros policlonales, y por lo tanto al reconocer varios epítopos de la proteína de interés, estos también pueden ser compartidos con otras proteínas presentes en el extracto bacteriano. Pese a esto, más adelante con los sueros finales se ajustó el número de lavados necesarios para eliminar la detección de la mayoría de estas inespecificidades.

El gen electo para llevar a cabo la generación de los anticuerpos fue aislado previamente por M^a Sofía Zamudio (2010) a partir de cDNA de *A. thaliana* y corresponde a At2g21250, el cual posee un 69% de identidad aminoacídica con respecto a una sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa de manzano (MdA6PR). Dada esta situación era de esperar que alguno de los anticuerpos generados en el presente trabajo fuera capaz de detectar a esta proteína homóloga. A pesar de que el resultado que se muestra en la Figura 12 (B y C) indica que los anticuerpos no son capaces de detectar His-MdA6PR purificada, si fue posible observar una leve señal al incubar la membrana de nitrocelulosa a la solución reveladora por ~5 min en vez de los 30-45 s mencionados en la sección 3.3.5 (no mostrado), sin embargo al realizar esto también es detectado el control negativo His-AtSDH. Esto da luces de que la variación de las condiciones a las que se realiza el *western blot* podría permitir la detección de MdA6PR con el uso de los antisueros de R1 y R2. De todas formas, esto también indica que los antisueros generados son capaces de detectar el epítopo 6xHis, que es una de las desventajas esperables de los anticuerpos policlonales mencionadas en la sección 1.7. Como His-AtA6PR - la proteína utilizada para inmunizar a los ratones - posee un epítopo de 6 histidinas en tándem, el animal genera anticuerpos tanto para la fracción AtA6PR como para el epítopo 6xHis, y por lo tanto, el antisuero que se extrajo

posee afinidad por ambas fracciones. Con esto se explicaría que también pueda tener afinidad por proteínas que compartan epítopos con His-AtA6PR. De hecho está descrito que *Arabidopsis thaliana* posee una bomba P-ATPasa de metales pesados (AtHMA1) cuya secuencia aminoacídica contiene varios residuos de histidina cercanos, incluyendo seis yuxtapuestos (Moreno y col, 2008) cercano a su extremo N-terminal. Es por este motivo que aunque en el resultado que se muestra en la Figura 13 no se ven inespecificidades en la detección, de todas formas es necesario, para los próximos experimentos que se realicen con estos antisueros, usar como control negativo un anticuerpo α -6xHis para descartar la posibilidad de detección de proteínas vegetales no-blancos con este epítipo. También en el futuro podría utilizarse el sitio de corte con trombina que otorga el vector *pET28a/AtA6PR* al expresar His-AtA6PR para escindir el epítipo 6xHis para generar un anticuerpo α -AtA6PR evitando que éste reconozca este péptido.

En el *western blot* que se muestra como resultado en la Figura 12B realizado con el suero final de R1 se observa una banda inesperada que está presente en el carril EC+ y no en el carril EC- (flecha verde, ~72 kDa). Esta banda podría ser un dímero de His-AtA6PR, dada la coincidencia de tener un peso molecular correspondiente al doble de la de esta proteína de fusión (~70 kDa). Además se ha descrito que una A6PR de níspero sí presenta dimerización (Hirai, 1981). Sin embargo, existen dos razones para postular que la banda de 70 kDa no correspondería a un dímero de His-AtA6PR. Primero, esta banda no está presente al utilizar el suero de R2 (Figura 12C). Segundo, el tratamiento de las muestras previamente a realizar la electroforesis es potente [β -mercaptoetanol 2% (v/v) y SDS 4% (p/v), 75 °C por 10 min], y por lo tanto, capaz de romper las interacciones no covalentes, impidiendo que en la muestra persistan

proteínas en forma de dímeros. Por lo tanto, probablemente esta banda inesperada proviene de alguna fracción proteolizada de la enzima T7 RNA polimerasa (~98 kDa; [http://www.neb.com/nebecomm/products /productm0251.asp](http://www.neb.com/nebecomm/products/productm0251.asp)), la cual se encuentra únicamente en la fracción EC+ o alguno de los componentes del sistema pET diferencial entre las células inducidas y no inducidas. De todas maneras, se requiere de un estudio con mayor profundidad realizando, por ejemplo, un modelamiento bioinformático de AtA6PR y comparación con MdA6PR en conjunto con una cromatografía de exclusión molecular en condiciones nativas y denaturantes, para poder afirmar o descartar que AtA6PR en su forma nativa se encuentre formando dímeros.

Los antisueros de R1 y R2 producidos en el presente trabajo son capaces de detectar una proteína en *A. thaliana* con un tamaño similar al peso hipotético de AtA6PR (~35 kDa) y además no detectan esta proteína en las mutantes insercionales *ata6pr-* que poseen expresión disminuida del gen *AtA6PR*, por lo tanto es posible afirmar que muy probablemente esta proteína se trata de AtA6PR. Según está descrito en la base de datos TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*), un gen adyacente a *AtA6PR* (*At2g21260*) codifica para otra posible sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa cuyo porcentaje de identidad aminoacídico con respecto a AtA6PR es de 92%, y de un 70% con respecto a MdA6PR. Además de esto, el alto porcentaje de identidad nucleotídico (93%), su posición adyacente, orientación 5'-3' idéntica, mismo tamaño (930 pb) y la alta duplicación génica en el cromosoma 2 de *A. thaliana* en donde el 60% de los genes posee un porcentaje de identidad significativo con respecto a otro gen (Lin y col, 1999), sugieren fuertemente que estos dos genes se tratan de una duplicación génica. Dada esta situación, era de esperar que los anticuerpos generados detectasen al

producto génico de At2g21260 además de AtA6PR. No obstante, en el resultado que se muestra en la Figura 13, bajo las condiciones experimentales empleadas no se observa una banda con el peso molecular esperado (~35 kDa) para At2g21260 en las mutantes insercionales *ata6pr-1* y *ata6pr-2*. Se sabe, por qPCR, que se expresan ambos genes; sin embargo la acumulación absoluta de transcritos de *At2g21260* es menos del 0,2% que la de *AtA6PR* (Zamudio, datos no publicados). A pesar de que no siempre existe correlación entre la cantidad de transcrito y la cantidad de proteína, es posible que esta vez sí haya correlación y que este gen no se exprese en suficiente cantidad para ser detectado mediante este método. Además esto avala la utilidad de los anticuerpos provenientes de R1 y R2 para detectar únicamente a AtA6PR.

Cabe destacar que las mutantes insercionales *ata6pr-1* y *ata6pr-2* presentan un fenotipo en donde se ve una germinación reducida y una disminución en el crecimiento frente a estrés salino (NaCl 50 mM) con respecto a *A. thaliana* silvestre (Zamudio, datos no publicados). Esto demuestra la importancia fisiológica de AtA6PR en la planta, y los antisueros generados en este seminario de título son capaces de detectar a AtA6PR nativa en plantas silvestres (Figura 13). Por lo tanto, como proyección, sería posible utilizar estos antisueros policlonales para detectar AtA6PR en condiciones de crecimiento normales y de estrés, desde extracciones de órganos específicos y en estadíos de desarrollo diferentes de la planta, pudiendo profundizar aún más esta investigación.

La existencia de estas dos líneas mutantes insercionales y los resultados que ya se han obtenido sobre estas facilita los estudios que se realicen en esta especie. Al tratarse de una planta que no transloca sorbitol es posible que la actividad de AtA6PR

sea menor que las otras A6PR ya descritas, y por lo tanto, su uso biotecnológico e introducción posibilitaría en otras especies la acumulación de sorbitol confiriéndoles las ventajas asociadas a la acumulación de este poliol y no las desventajas asociadas a las altas concentraciones de este (Sheveleva y col, 1998).

Por otro lado, ya generado este anticuerpo, también se proyecta la purificación de AtA6PR sin el epítipo 6xHis para la elaboración de un anticuerpo monoclonal. Existe una técnica descrita por Köhler y Milstein (1975) que permite inmortalizar un Linfocito B aislado al fusionarlo con una célula de mieloma (hibridoma). Los linfocitos B activados (o células plasmáticas) son las células que secretan los anticuerpos (inmunoglobulina), y cada uno de estos produce moléculas de inmunoglobulina (anticuerpos) bioquímicamente idénticas. El suero que un hibridoma genera es un anticuerpo monoclonal. Para la producción de un anticuerpo monoclonal que detecte específicamente a un antígeno, es necesario seleccionar entre un gran número de hibridomas aquel que produzca la inmunoglobulina capaz de reconocer al antígeno. Los anticuerpos monoclonales pueden tener una alta especificidad, pero los anticuerpos policlonales tienen por excelencia una gran capacidad para detectar pequeñas cantidades del antígeno. En el futuro se pretende generar un anticuerpo monoclonal con el cual se puedan realizar estudios de inmunohistoquímica que corroboren los resultados que se obtengan con los fraccionamientos subcelulares e inmunodetecciones que se realicen con el antisuero generado en este trabajo.

6. CONCLUSIONES

Mediante *western blot* se demostró que la proteína His-AtA6PR se expresa en el sistema de expresión heterólogo en *E. coli* (BL21(DE3)pLysS/pET28a/AtA6PR) generado en el presente trabajo, y que esta se encuentra en la fracción soluble. La purificación fue llevada a cabo mediante el uso de una columna de afinidad a Ni y se demostró mediante *western blot* que dicha proteína eluye entre las primeras cuatro fracciones al utilizar imidazol 250 mM. Logrado esto y habiendo inmunizado a los ratones se extrajeron dos antisueros finales capaces de detectar eficientemente mediante la técnica de *western blot* a His-AtA6PR purificada, contenida en un extracto de proteínas de *E. coli*, y desde muestras de proteínas de plántulas completas de *A. thaliana*.

La acumulación de la proteína paróloga a AtA6PR codificada por At2g21260 se encuentra bajo los niveles de detección de los antisueros obtenidos. Además se verificó que las mutantes *ata6pr-1* y *ata6pr-2* no poseen niveles detectables de AtA6PR mediante *western blot*.

7. CONGRESOS.

7.1 Asistencia.

María Sofía Zamudio, **Joel Wurman**, Roberto Parada, Michael Handford. 2011. Characterisation of AtA6PR, a putative aldose-6-phosphate reductase from *Arabidopsis thaliana*. IIV Reunión de Biología Vegetal, Pucón, Región de La Araucanía, Chile. 3-6 de Diciembre de 2011. Premio a la mejor presentación en formato poster.

Joel Wurman, María Sofía Zamudio, Michael Handford. 2012. Production of an antisera against AtA6PR, a putative sorbitol-6-phosphate dehydrogenase involved in sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*. XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina. 17-20 de Septiembre de 2012.

7.2 Participación.

María Sofía Zamudio, **Joel Wurman**, Michael Handford. 2012. Characterisation of AtA6PR, a putative aldose-6-phosphate reductase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Biology Congress Freiburg 2012. Freiburg, Baden-Württemberg, Alemania. 30 de Julio - 3 de Agosto de 2012.

8. REFERENCIAS.

- Ahmad, Larher, Stewart. 1979. Sorbitol, a compatible osmotic solute in *Plantago maritima*. New Phytologist. Vol 82(3) pp 671-678.
- Alonso, Stepanova, Leisse, Kim, Chen, Shinn, Stevenson, Zimmerman, Barajas, Cheuk, Gadrinab, Heller, Jeske, Koesema, Meyers, Parker, Prednis, Ansari, Choy, Deen, Geralt, Hazari, Hom, Karnes, Mulholland, Ndubaku, Schmidt, Guzman, Aguilar-Henonin, Schmid, Weigel, Carter, Marchand, Risseeuw, Brogden, Zeko, Crosby, Berry, Ecker. 2003. Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. Science. Vol 301(5633) pp 653-657.
- Bantog, Yamada, Niwa, Shiratake, Yamaki. 2000. Gene expression of NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase and NADP⁺-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase during development of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. Vol 69(3) pp 231-236.
- Bartels, Engelhardt, Roncarati, Schneider, Rotter, Salamini. 1991. An ABA and GA modulated gene expressed in the barley embryo encodes an aldose reductase related protein. The EMBO Journal. Vol 10(5) pp 1037-1043.
- Bellaloui, Brown, Dandekar. 1999. Manipulation of in vivo sorbitol production alters boron uptake and transport in tobacco. Plant Physiology. Vol 119(2) 735-742.
- Blevins y Lukaszewski. 1998. Boron in plant structure and function. Annual Review. Plant Physiology. Plant Molecular Biology. Vol 49 pp 481-500.
- Bradford. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical biochemistry. Vol 72, pp 248-254.
- Brown, Bellaloui, Hu, Dandekar. 1999. Transgenically Enhanced Sorbitol Synthesis Facilitates Phloem Boron Transport and Increases Tolerance of Tobacco to Boron Deficiency. Plant Physiology. Vol 119(1) pp 17-20.
- Cheng, Zhou, Reidel, Sharkey, Dandekar. 2005. Antisense inhibition of sorbitol synthesis leads to up-regulation of starch synthesis without altering CO₂ assimilation in apple leaves. Planta. Vol 220(5) pp 767-776.
- Chong, Bonnett, Glassop, O'Shea, Brumbley. 2007. Growth and metabolism in sugarcane are altered by the creation of a new hexose-phosphate sink. Plant Biotechnology Journal. Vol 5(2) pp 240-253.
- De Sousa, Paniago, Arruda, Yunes. 2008. Sugar levels modulate sorbitol dehydrogenase expression in maize. Plant Molecular Biology. Vol 68(3) pp 203-213.
- Deguchi, Koshita, Gao, Tao, Tetsumura, Yamaki, Kanayama. 2004. Engineered sorbitol accumulation induces dwarfism in Japanese persimmon. Journal of Plant Physiology. Vol 161(10) pp 1177-1184.
- Deguchi, Watanabe, Kanayama. 2002. Increase in Sorbitol Biosynthesis in Stressed Japanese Pear Leaves. Acta Horticulturae. Vol 587 pp 511-517.
- Escobar-Gutiérrez, Zipperlin, Carbonne, Moing, Gaudillière. 1998. Photosynthesis, carbon partitioning and metabolite content during drought stress in peach seedlings. Australian journal of plant physiology. Vol 25(2) pp 197-205.
- Everard, Cantini, Crumet, Plummer, Loescher. 1997. Molecular cloning of Mannose 6P reductase and its developmental Expression in Celery. Plant Physiol. 11(3): 1427-1435.
- Figuroa, Iglesias. 2010. Aldose-6-phosphate reductase from apple leaves: Importance of the quaternary structure for enzyme activity. Biochimie. Vol 92(1) pp 81-88.

Gao, Tao, Miura, Dandekar, Sugiura. 2001. Transformation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant Science*. Vol 160(5) pp 837-845.

Haritatos, Medville, Turgeon. 2000. Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. Vol 211(1) pp 105-111.

Hirai. 1981. Purification and Characteristics of Sorbitol-6-phosphate Dehydrogenase from Loquat Leaves. *Plant Physiology*. Vol 67(2) pp 221-224.

Hu, Lu, Liu, Chen, Jiang. 2005. Overexpression of *mtlD* gene in transgenic *Populus tomentosa* improves salt tolerance through accumulation of mannitol. *Tree Physiology*. Vol 25(10) pp 1273-1281.

Kanamaru, Ito, Komori, Saito, Kato, Takahashi, Omura, Soejima, Shiratake, Yamada, Yamaki. 2004. Transgenic apple transformed by sorbitol-6-phosphate dehydrogenase cDNA: Switch between sorbitol and sucrose supply due to its gene expression. *Plant Science*. Vol 167(1) pp 55-61.

Kanayama, Moriguchi, Deguchi, Kanahama, Yamaki. 2007. Effects of Environmental Stresses and Abscisic Acid on Sorbitol-6-phosphate Dehydrogenase Expression in Rosaceae Fruit Trees. *Acta Horticulturae*. Vol 738 pp 375-382.

Kaplan, Kopka, Haskell, Zhao, Schiller, Gatzke, Sung, Guy. 2004. Exploring the Temperature-Stress Metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. Vol 136(4) pp 4159-4168.

Klepek, Geiger, Stadler, Klebl, Landouar-Arsivaud, Lemoine, Hedrich, Sauera. 2005. Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER5, a New Member of the Monosaccharide Transporter-Like Superfamily, Mediates H⁺-Symport of Numerous Substrates, Including *myo*-Inositol, Glycerol, and Ribose. *The Plant Cell*. Vol 17 pp 204-218.

Köhler, Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. Vol 256(5517) pp 495-497.

Königshofer. 1983. Changes in ion composition and hexitol content of different *Plantago* species under the influence of salt stress. *Plant and Soil*. Vol 72(2-3) pp 289-296.

Lambers, Posthumus, Stulen, Lanting, van de Dijk, Hofstra. 1981. Energy metabolism of *Plantago major* ssp. *major* as dependent on the supply of mineral nutrients. *Physiologia Plantarum*. Vol 51(3) pp 245-252.

Lehto, Räisänen, Lavola, Julkunen-Tiitto, Aphalo. 2004. Boron mobility in deciduous forest trees in relation to their polyols. *New Phytologist*. Vol 163(2) pp 333-339.

Lewis, Smith. 1967. Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants I: Distribution, physiology and metabolism. *New Phytologist*. Vol 66(2) pp 143-184.

Lin, Kaul, Rounsley, Shea, Benito, Town, Fujii, Mason, Bowman, Barnstead, Feldblyum, Buell, Ketchum, Lee, Ronning, Koo, Moffat, Cronin, Shen, Pai, Van Aken, Umayam, Tallon, Gill, Adams, Carrera, Creasy, Goodman, Somerville, Copenhaver, Preuss, Nierman, White, Eisen, Salzberg, Fraser, Venter. 1999. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. Vol 402 pp 761-768.

Mandujano. 2010. Localización sub-celular y caracterización bioquímica de AtSDL una probable sorbitol deshidrogenasa. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas. Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Meyer, Lamberts. 1965. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol 107(1) pp 144-145.

- Moreno, Norambuena, Maturana, Toro, Vergara, Orellana, Zurita-Silva, Ordenes. 2008.** AtHMA1 Is a Thapsigargin-sensitive Ca^{2+} /Heavy Metal Pump. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 283(15) pp 9633-9644.
- Murashige, Skoog. 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. Vol 15(3) pp 473-497.
- Negm, Loescher. 1981.** Characterization and Partial Purification of Aldose-6-phosphate Reductase (Alditol-6-Phosphate:NADP 1-Oxidoreductase) from Apple Leaves. *Plant Physiologist*. Vol 67(1) pp 139-142.
- Nidal, Mahmoud, Adnan. 2011.** Pharmaceutical excipient, method for its preparation and use thereof. European Patent Application. EP2384742. <http://www.freepatentsonline.com/EP2384742A1.html>.
- Noiraud, Maurousset, Lemoine. 2001.** Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol 39(9) pp 717-728.
- Nosarzewski, Downie, Wu, Archbold. 2012.** The role of sorbitol dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*. Vol 39(6) pp 462-470.
- Pharr, stoop, Williamson, Feusi, Massel, Conkling. 1995.** The dual role of mannitol as osmoprotectant and photoassimilate in celery. *Hort Science*. Vol 30(6) pp 1182-1188.
- Pommerrenig, Papini-Terzi, Sauer. 2007.** Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. *Plant physiology*. Vol 144(2) pp 1029-1038.
- Radhamony, Mohan, Srinivasan. 2005.** T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol 8(1) pp 82-106.
- Reidel, Rennie, Amiard, Cheng, Turgeon. 2009.** Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. Vol 149(3) pp 1601-1608.
- Roncarati, Salamini, Bartels. 1995.** An aldose reductase homologous gene from barley: regulation and function. *The Plant Journal*. Vol 7(5) pp 809-822.
- Schmid, Davison, Henz, Pape, Demar, Vingron, Schölkopf, Weigel y Lohmann. 2005.** A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature genetics*. Vol 37(5) pp 501-506.
- Shen, Jensen, Bohnert. 1997.** Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiology* Vol 115(2) pp 527-532
- Sheveleva, Marquez, Chmara, Zegeer, Jensen, Bohnert. 1998.** Sorbitol-6-Phosphate Dehydrogenase Expression in Transgenic Tobacco. *Plant Physiology*. Vol 117(3) pp 831-839.
- Smekens, van Tienderen. 2001.** Genetic variation and plasticity of *Plantago coronopus* under saline conditions. *Acta Oecologica*. Vol 22(4) pp 187-200
- Smirnoff, Cumbes. 1989.** Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*. Vol 28(4) pp 1057-1960.
- Stoop, Williamson, Pharr. 1996.** Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in plant science*. Vol 1(5) pp 139-144.
- Tao, Uratsu, Dandekar. 1995.** Sorbitol synthesis in transgenic tobacco with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant Cell Physiology*. Vol 36(3) pp 525-532.
- Teo, Suzuki, Uratsu, Lampinen, Ormonde, Hu, DeJong, Dandekar. 2006.** Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. *PNAS*. Vol 103(49) pp 18842-18847.

Wang, Brendel. 2006. Genome-wide comparative analysis of alternative splicing in plants. PNAS. Vol 103(18) pp 7175-7180.

Watari, Kobae, Yamaki, Yamada, Toyofuku, Tabuchi, Shiratake. 2004. Identification of Sorbitol Transporters Expressed in Phloem of Apple Source Leaves. Plant and Cell Physiology. Vol 45(8) pp 1032-1041.

Yamaki. 1995. Physiology and metabolism of fruit development. Acta Horticulturae. Vol 398 pp 109-120.

Zamudio. 2010. Determinación de la localización subcelular y la expresión de *AtS6PDH*, una potencial sorbitol-6-P deshidrogenasa en *Arabidopsis thaliana*. Seminario de Título Ing. en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Zhou, Cheng. 2008. Competitive inhibition of phosphoglucose isomerase of apple leaves by sorbitol 6-phosphate. Journal of Plant Physiology. Vol 165(9) pp 903-910.

Zimmermann. 1960. Transport in the Phloem. Annual Review of Plant Physiology. Vol 11 pp 167-190.