



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA *At1g28290* EN
SUSPENSIONES DE CULTIVOS CELULARES DE *Nicotiana
tabacum Bright yellow 2* (TBY-2) Y EN *E.coli***

TESIS presentada por

LILIANA DEL ROCÍO CISNEROS CASTILLO

**A la División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Ingeniería Química como
requisito parcial para obtener el
grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN
INGENIERÍA QUÍMICA**

Morelia, Michoacán

Febrero 2009



*División de estudios
de posgrado*



Asunto: Aprobación de Impresión de Tesis

Oficio número. 294/2009.

C. Ingeniero Roberto Chávez Pérez
Jefe del Departamento de Titulación de la
U.M.S.N.H.
P r e s e n t e.-

Por este medio nos dirigimos a usted de la manera mas atenta para notificarle que después de haberle dado seguimiento al desarrollo de la tesis: "Producción de la proteína *Atlg28290* en suspensiones de cultivo celulares de *Nicotiana tabacum Bright yellow 2* (T-BY2) y en *E.coli*" y después de haber revisado el manuscrito que presentó la Ingeniero **Liliana del Rocío Cisneros Castillo**, concluimos que cumple con los requisitos académicos y con lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado para el desarrollo de tesis.

Por lo anterior este Comité Tutorial da el aval para su impresión final.

A t e n t a m e n t e.
Morelia, Michoacán a 04 de Marzo de 2009.

Presidente:

Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga 07001002

Secretario:

Dr. Mario Rodríguez Monroy 930953

Vocal:

Dra. Mariana Ramos Estrada 04002199

Vocal:

Dr. Agustín Jaime Castro Montoya 0100017-9

Vocal:

Dr. Rafael Maya Yescas 0400204-0

Resumen

“PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA *At1g28290* EN CULTIVOS DE SUSPENSIONES CELULARES DE *Nicotiana tabacum Bright yellow 2* (T-BY2) Y EN *E.coli*”

Por

Liliana del Rocío Cisneros Castillo

Febrero del 2009

Dirigida por: Ma. del Carmen Chávez Parga

La biotecnología moderna junto con los conocimientos genéticos, se han aplicado en diversas áreas del conocimiento, como en el mejoramiento de las especies en la agricultura, mediante la extracción, purificación, estudio, caracterización y obtención de proteínas contenidas en plantas. La producción de estas proteínas recombinantes se realiza en sistemas biológicos como bacterias y suspensiones de cultivos celulares de plantas. La proteína de interés producida codificada por el gen *At1g28290* (*AtAGP31*) esta conferida a las células de hipocótilos etiolados de *Arabidopsis thaliana* del compartimiento llamado pared celular. A fin de realizar un estudio preliminar del proceso de producción de la estructura de la *AtAGP31* completa, así como también de versiones incompletas, en este trabajo se obtuvieron diferentes construcciones que permiten la producción de dos proteínas en suspensiones de cultivos celulares de *Nicotiana Tabacum Bright Yellow 2* (T-BY2): *At1g28290c* y *At1g28290ps+PAC*; y una proteína en *E. coli*; *At1g28290PAC*. La proteína recombinante contiene además 6x etiquetas de His en C-terminal que permiten la purificación por cromatografía de afinidad, y el epítipo V5 mediante el cual se realiza el reconocimiento por anticuerpos específicos. Se han establecido las condiciones iniciales de producción de la proteína en la bacteria *E. coli* las cuales son: 0.002% de arabinosa inducida a 37°C por 4h. Se obtuvo la transformación estable de TBY-2 para el clon 4I.1 perteneciente a la construcción *At1g28290c/6His/V5* la cual fue verificada por microscopía de fluorescencia

invertida. En el caso de la construcción *At1g28290ps+PAC/6His/V5*, el clon 1G.1 fue seleccionado de las células *A. tumefaciens* para usarse en la transformación de T-BY2, la cual esta aun en desarrollo.

Summary

“PRODUCTION OF THE PROTEIN *At1g28290* IN CELLS SUSPENSIONS CULTURES OF
Nicotiana tabacum Bright yellow 2 (T-BY2) AND IN *E.coli*”

by

Liliana del Rocío Cisneros Castillo

February 2009

Advisor: Dr. Ma. del Carmen Chávez Parga

The modern biotechnology with the genetics has been applied in different areas as the improvements of the crops in agriculture, thought study, characterization and obtaining of plant proteins. Production of recombinant proteins has been realizing in biological systems such as bacteria and plant cells suspension cultures. The interesting protein belongs to hypocotils etiolated cells of *Arabidopsis thaliana* cell walls; a previous work determined these cells at growing stage have an abundant O-glycoprotein codified by the *At1g28290* gene (AtAGP31). In order to perform a preliminary study of the protein production process at different types of versions (complete and truncated protein structure), it was necessary at this project to get several constructions allowing production of two proteins in *Nicotiana Tabacum Bright Yellow 2* (T-BY2) cells suspensions cultures: *At1g28290c* y *At1g28290ps+PAC*; and one protein in *E. coli*; *At1g28290PAC*. The recombinant protein AtAGP31 has also 6x tags His in C-terminal which allow purification process by affinity chromatography; and the epitope V5 allowing immuno detection of specific antibodies. As results, this work has established initial conditions of protein production: 0.002% of Arabinose induction at 37°C for 4h, besides stable transformation of T-BY2 cells has been achieved in construction *At1g28290c/6His/V5* with clone 4I.1; results also was analyzed in invert fluorescence microscopy. Clone 1G.1 from construction

*At1g28290*ps+PAC/6*His*/V5 was screening from transformed *A. tumefaciens*. After, this clone was used in stable transformation of T-BY2 which is still in developing.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi amorosa Mamá quien siempre me ha apoyado en mis decisiones con amor y devoción, sin importar lo difíciles que estas sean. Mi Papá quien me ha enseñado que el médico de las tristezas es el tiempo... sí es verdad. Mi tía, quien siempre me recuerda tener fe. Mi hermano Raúl Guillermo, cuya memoria estará siempre en mi corazón, y a mi novio Raúl. Desde el fondo de mi Corazón, este capítulo de mi existencia es para ustedes; son mi más bella inspiración en la vida...

Índice

RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	xi
NOMENCLATURA	xii
AGRADECIMIENTOS	xiv
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Objetivo	3
1.3 Objetivos particulares	3
1.4 Justificación	4
1.5 Hipótesis	4
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Biotecnología: Producción de proteínas recombinantes	5
2.2 La pared celular	6
2.3 Componentes de la pared celular	8
2.4 Organización de la pared celular	9
2.5 Plasticidad de la pared celular	11
2.6 Estudio sistemático proteómico	11
2.7 Estructura y propiedades de <i>At1g28290</i>	14

CAPÍTULO 3. MATERIALES	17
3.1 Material de plantas	17
3.2 Secuencias de ADN complementario	17
3.3 Oligonucleótidos iniciadores específicos	18
3.4 Cepas bacterianas	19
3.5 Medios de cultivo bacterianos	20
3.6 Medios de cultivo para células de tabaco	22
3.7 Vectores usados para clonación	22
CAPÍTULO 4. MÉTODOS	26
4.1 Diseño de oligonucleótidos iniciadores para la amplificación por PCR	26
4.2 Preparación del plásmido <i>pda 19846</i>	28
4.3 Transformación de bacterias por electroporación	28
4.4 Purificación de ADN plásmido	28
4.5 Transcripción reversa (RT)-PCR	28
4.6 Amplificación del ADN por PCR	29
4.7 Extracción de ADN del gel de agarosa	32
4.8 Incorporación de 3' <i>A-overhangs</i> (extremos) después de la amplificación de ADN por PCR	32
4.9 Clonación pBAD TOPO® cloning	33

4.10 Transformación de bacterias con la mezcla reaccionante de pBAD TOPO y selección de los clones recombinantes	33
4.11 Clonación Gateway®	34
4.12 Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	36
4.13 Transformación estable de células T-BY2	36
4.14 Producción de la proteína <i>At1g28290</i> PAC con la etiqueta V5/6His en bacteria	37
4.15 Purificación de la proteína recombinante <i>At1g28290</i> PAC con la etiqueta V5/6His por el sistema HisLink™ Spin Protein Purification	38
4.16 Separación de proteínas por SDS-PAGE y Western blotting	38
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	40
5.1 Obtención de la secuencia de ADN complementaria	40
5.2 Obtención de construcciones funcionales en células transgénicas de tabaco	41
5.3 Obtención de una construcción funcional en bacteria	52
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	58

Lista de figuras

Figura 2.1	Vista general de la pared celular de plantas	7
Figura 2.2	Estructura de la pared primaria	10
Figura 2.3	Análisis de las proteínas extraídas por CaCl_2 y LiCl de paredes celulares de hipocótilos etiolados de 11 días	13
Figura 2.4	Estructura de <i>At1g28290</i>	15
Figura 2.5	Árbol filantrópico	16
Figura 3.1	Plasmido pda 19846	17
Figura 3.2	Vector pBAD TOPO®	22
Figura 3.3	Vector pDONR™207	24
Figura 3.4	Vector pK7WG2D, 1	25
Figura 4.1	Secuencia codificada por el <i>insert pda 19846</i> y posiciones de los oligonucleótidos iniciadores para la amplificación por PCR de los fragmentos de ADN de interés	26
Figura 4.2	Estrategias para la amplificación por PCR de los fragmentos de DNA de interés	27
Figura 4.3	Reacción de recombinación Gateway® BP	34
Figura 4.5	Reacción de recombinación Gateway® LR	35
Figura 5.1	Amplificación por PCR de los fragmentos de ADN correspondientes a las secuencias <i>At1g28290c</i> y <i>At1g28290c-PAC</i>	42
Figura 5.2	Amplificación por PCR de los fragmentos de ADN correspondientes a la secuencia <i>At1g28290ps+PAC</i>	43
Figura 5.3	PCR de selección del los clones pBAD-TOPO	45
Figura 5.4	Amplificación por PCR de <i>At1g28290c/V5/6His</i> y <i>At1g28290ps+PAC/V5/6His</i>	47
Figura 5.5	Amplificación por PCR de <i>At1g28290c/V5/6His</i> y <i>At1g28290ps+PAC/V5/6His</i>	47
Figura 5.6	PCR de amplificación y selección después de la reacción BP	48
Figura 5.7	PCR de amplificación y selección después de la reacción LR	49
Figura 5.8	PCR de amplificación y selección después de la transformación <i>A. tumefaciens</i>	50

Figura 5.9	Análisis de microscopía por fluorescencia invertida después de la transformación estable de células de T-BY2 de la proteína <i>At1g28290</i> c/6His/V5	51
Figura 5.10	PCR de amplificación de los fragmentos de ADN de <i>At1g28290</i> PAC	52
Figura 5.11	PCR de selección en los clones de pBAD-TOPO	53
Figura 5.12	Detección de las proteínas <i>At1g28290</i> PAC/V5/6His en bacterias por <i>Western Blot</i>	55

Lista de tablas

Tabla 3.1	Secuencias de los oligonucleótidos iniciadores	18
Tabla 3.2	Oligonucleótidos iniciadores específicos Gateway®	18
Tabla 3.3	Secuencias de los oligonucleótidos iniciadores universales Gateway®	19
Tabla 4.1	Parámetros para la amplificación del ADN por PCR	31

NOMENCLATURA

1D-E/2D-E: electroforesis en una o dos dimensiones

AGP: arabinogalacto proteína

AGP-PRP: arabinogalacto proteína-proteína rica en prolina

Ara: arabinosa

ATPasa: adenosin trifosfatasa

BSA: albumina serum de bovino

BY2: bright yellow 2 (*Nicotiana tabacum*)

cDNA: DNA complementario

C^{mR}: Cloramfenicol

Col 0: ecotipo Columbia 0 de *A.thaliana*

CWP: proteína de pared celular

dNTP: desoxinucleotido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

DTT: ditioteritol

EDTA: ácido etilen diamino tetra acético

Gal: galactosa

H/PRP: proteína rica en hidroxiprolina/prolina

H: p-hidroxifenil (unidad de la lignina)

kDa: kilo Dalton

LB medium: medio Luria-Bertani

MALDI-TOF: desorción/ionización mediante láser asistida por matriz en analizador de tiempo de vuelo.

MS: espectrometría de masas

MS medio: Medio Murashige y Skoog

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

pb: pares de bases

PCR: reacción de polimerización en cadena

PMEs : metil pectina esterasa

PRP: proteína rica en prolina

PTM: modificaciones pos-traslacionales

PVDF: fluoruro de polivinilo

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: transcripción reversa de reacción en polimerización en cadena

SDS: do-decil sulfato de sodio

Amortiguador TE: amortiguador Tris EDTA

Tris: trishidroximetilaminometano, ó 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

U: unidad

Agua UHQ: agua des-ionizada

XTH: xiloglucano endotransglucosilasa-hidrolasa

Agradecimientos

Agradezco sinceramente a mi asesora en Francia la Dra. Elisabeth Jamet por aceptarme en su grupo de trabajo y lograr realizar este proyecto; así como también su guía, motivación, constante crítica y fe en mí persona.

Agradezco especialmente a mi asesora en México la Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga por su apoyo invaluable para la realización de este proyecto.

Mi gratitud al Dr. Rafael Pont-Lezica por su valiosa ayuda hasta el último momento y por creer en mí.

Reflejo mi agradecimiento al Biólogo molecular David Roujol, ya que sin su ayuda hubiera sido imposible lograr este trabajo, agradezco su inmensa paciencia y sus enseñanzas.

A los equipos *“Protéines Pariétales”* y *“Calmodulines et stress”* por sus invaluables sugerencias durante mi estancia en el laboratorio y ayuda técnica.

Ofrezco un especial agradecimiento a *“services communs”* de la Unidad Mixta de Investigación (UMR) 5546, Toulouse, Francia; por su cooperación durante el trabajo en el laboratorio.

A los revisores de esta tesis: Dr. Agustín Jaime Castro Montoya, Dra. Mariana Ramos Estrada, Dr. Mario Rodríguez Moroy y Dr. Rafael Maya Yescas por sus sugerencias y valiosas aportaciones a este trabajo.

Estoy profundamente agradecida al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada, a la SEP-PROMEP-PTC140, CIC-UMSNH y Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el financiamiento otorgado.

Mi agradecimiento a todo mi equipo de trabajo en la oficina 196: Irshad, Saima y Masood quienes cada día me ofrecieron su apoyo incondicional estando a kilómetros de mi país.

Gracias a todos mis amigos: Montserrat, Nina, Renia, Mathieu, Louis Jerome, Nicholás quienes se preocuparon por mí y se convirtieron en mi pequeña familia durante mi estancia en Francia.

Agradezco a mi compañero más especial, Raúl; tu mi gran amigo estuviste a mi lado cuando más lo necesitaba; tu amor fue mi luz durante días tristes.

Y agradezco finalmente, pero no por eso de menor importancia, a mi familia, su gran apoyo, sacrificio, paciencia y amor fueron mi mejor inspiración.

Capítulo 1. Introducción

1.1 Generalidades

La biotecnología junto con los conocimientos genéticos, se han aplicado en diversas áreas del conocimiento [Sasson, 2004] tal como en la agricultura, cuyo objetivo es la creación de cultivos resistentes a virus, herbicidas y ciertas clases de insectos [Manicard, 1999]. Esto se puede lograr mediante el estudio, caracterización y producción de proteínas contenidas en los sistemas biológicos a utilizar, que en este caso son las plantas. La producción de proteínas recombinantes para su estudio y aplicación, se puede realizar conjuntando técnicas implícitas en la genética, así como también principios de ingeniería química. Los sistemas en los que se pueden producir dichas proteínas recombinantes son: en las bacterias y en suspensiones de cultivos celulares de plantas, cuyas líneas celulares estén bien caracterizadas. El uso de plantas como sistemas para la síntesis de proteínas recombinantes ha recibido gran atención recientemente, debido a las ventajas económicas, de escalamiento y seguridad que presentan. Sin embargo, los sistemas de producción que utilizan la planta completa carecen de varios beneficios intrínsecos que los cultivos celulares poseen, incluyendo el control preciso de las condiciones de crecimiento, la consistencia de producción, el alto nivel de contención y la habilidad de producir proteínas recombinantes de acuerdo a un régimen ingenieril de proceso, [Hellwing y col., 2004], es por ello que dichos sistemas se usan comúnmente para los estudios de caracterización; se sabe que los sistemas de producción bacteriana son las formas más comunes y económicas de producción de proteínas utilizadas hasta ahora, pero al emplear estos sistemas el producto obtenido presenta problemas de solubilidad en la mayoría de los casos, es por esto que también se requiere utilizar otros sistemas alternativos de producción de proteínas, como los cultivos de suspensiones celulares de plantas [Mee-Jung y col., 2006].

Las proteínas en particular, pertenecen a algún compartimiento celular específico, en este caso la proteína de estudio se encuentra en un compartimiento extracelular de la planta *Arabidopsis thaliana*, llamado pared celular. La pared celular de plantas exhibe un desempeño importante debido a que no solo fortalece la estructura de la planta, también tiene funciones centrales en la diferenciación celular, comunicación intracelular, crecimiento, transporte de agua [Cosgrove, 2005] y defensa en la planta [Day, 2007].

La pared celular está compuesta de: celulosa, que es el resultado de uniones (1,4)- β -D glucosídicas; además de xiloglucano y arabinoxilano, que son las dos hemicelulosas más importantes; pectina que es un complejo grupo de polisacáridos entre los que destacan homogalacturonano y ramnogalacturonano I y II, covalentemente unidos [Sticklen, 2008]; proteínas estructurales como glicoproteínas ricas en Hidroxi-Prolina (HRGPs), proteínas ricas en HidroxiProlina/Prolina (H/PRPs) y proteínas ricas en Glicina (GRPs) [Showalter, 1993]; y lignina que es un material hidrofóbico [Fry y col., 1992]. Estos complejos polisacáridos y proteínas estructurales se entrelazan [Vorwerk y col., 2004] formando una estructura fibrosa [Cosgrove, 2005] donde las microfibrillas de celulosa estarán adheridas [Vorwerk y col., 2004]. La construcción de esta red compleja involucra interacciones físicas y químicas entre los polisacáridos después de su secreción en el espacio intracelular y las enzimas las cuales son probablemente las reguladoras del ensamble de la pared [Carpita y col., 1993].

Más de 400 proteínas de pared celular (CWPs) de *Arabidopsis thaliana* han sido descritas gracias al análisis sistemático proteómico [Willats y col., 2001]. Otro tipo de proteínas han sido clasificadas considerando su interacción con los componentes de la pared celular, así como también las diferentes maneras de separarlas: CWPs que pueden o no tener una mínima interacción con los componentes de pared celular (proteínas “lábilas”), CWPs que pueden estar débilmente adheridas a la matriz de polisacáridos y CWPs que tienen una fuerte interacción con la matriz [Vincken y col., 2003]. Un estudio proteómico realizado en el laboratorio mostró la presencia de una proteína abundante localizada en la pared celular de los hipocótilos etiolados de *A. thaliana*, este tipo de células son un interesante modelo para estudiar el fenómeno de elongación debido a que su tamaño se incrementa rápidamente durante la germinación especialmente en la oscuridad [Willats y col., 2001]. Esta proteína es codificada por *At1g28290* y clasificada como una arabinogalacto proteína no clásica (AGP) en base a su marcada reactividad con el agente Yariv [Tierney y col., 1987]. Varias líneas de evidencia han sugerido que este tipo de proteína tiene un desempeño importante en la división celular, interacción y la expansión celular, pero en cualquier caso no se le ha asignado ninguna función biológica o actividad en particular.

At1g28290 codifica una proteína rica en prolina de 359 amino ácidos, con 4 diferentes dominios: una señal péptida; un dominio rico en prolina donde se encuentran un módulo

APAPAP y 6 dupletes solos AP, distribuidos en el dominio PRP (los sitios AP sugieren posibles sitios O-glicosiolados); un dominio central repetitivo en donde el cuadripéptido degenerado PP(A/V/T) (K/Y) es característico de una clase de AGPs no clásicas y un dominio C-Terminal nombrado PAC (por PRP y AGP, que contiene cisteínas) [Tierney y col.,1987; Cassab y col., 1988], que contiene 6 cisteínas conservadas, existiendo dos potenciales sitios N-glicosilados en la región PAC.

1.2 Objetivo

Realizar un estudio preliminar del proceso de producción de la proteína *At1g28290* en suspensiones de cultivos celulares de *Nicotiana tabacum Bright Yellow 2* (T-BY2) y en la bacteria *E. coli*.

1.3 Objetivos particulares

Lograr la obtención de un ADN complementario (ADNc) ‘completo’ que cubra toda la secuencia codificada por el gen *At1g28290* para la producción de la proteína.

Realizar la clonación de las construcciones *At1g28290c/V5/6His* y *At1g28290ps+PAC/V5/6His* mediante las reacciones catalíticas descritas en el sistema pBAD TOPO®, y fermentaciones en bacterias *E. coli*.

Obtener Cepas de *A. tumefaciens* que contengan el plásmido inducido en las construcciones clonadas, que permitan la producción de la proteína completa y el dominio PAC en las suspensiones de cultivos celulares de T-BY2.

Producir la proteína *At1g28290* completa, así como también otras versiones incompletas entre las que se encuentre solo el dominio PAC en suspensiones de cultivos celulares de tabaco (T-BY2).

Desarrollar las construcciones requeridas que contengan el dominio PAC en fusión con la etiqueta 6His y el epítipo V5, así como lograr la producción de la proteína codificada por dicho dominio en la bacteria *E. coli*.

1.4 Justificación

Algunas aplicaciones de la biotecnología, como la producción de metabolitos secundarios en las suspensiones de cultivos celulares de plantas, preparación de biomasa en procesos industriales, conversión de celulosa para la producción de bioetanol; en los sistemas agrícolas, para el mejoramiento de los cultivos mediante transformaciones que incrementen la resistencia a los ataques de patógenos y la reducción de los requerimiento de agua; entre otros, se enmarcan en el uso de las proteínas como materia prima.

Es por ello, que es necesario el estudio de sistemas de producción que permitan obtener grandes cantidades de proteína tanto en suspensiones de cultivos celulares de plantas como en bacterias, para que en estudios posteriores de caracterización se proporcione información acerca del desempeño que puede tener la proteína, y por tanto lograr descifrar sus posibles aplicaciones biotecnológicas a futuro.

1.5 Hipótesis

La utilización de reacciones catalíticas, fermentaciones y técnicas biológicas permitirán la producción de la proteína *At1g8290*, así como distintas versiones truncadas entre las que se encuentre el dominio PAC en suspensiones de cultivos celulares de T-BY2 y en la bacteria *E. coli*, las cuales serán empleadas para estudios de caracterización y funcionalidad de la misma.

Capítulo 2. Marco teórico

2.1 Biotecnología: Producción de proteínas recombinantes

La biotecnología moderna no es algo milagroso sino la consecuencia de más de 50 años de investigaciones biológicas, desde el descubrimiento de la estructura del ADN; algo que produjo una avalancha de resultados y avances en todas las ramas de la biología, microbiología, genética, fisiología entre otros, tanto de los microorganismos como de las plantas y los seres humanos [Sasson, 2004].

La biotecnología se divide en tres partes: la médica-farmacéutica; la verde, que trata de los cultivos, la agroindustria y la alimentación; y la ambiental o blanca, en la que se engloban todas las áreas que tratan los desechos y trabajan para descontaminar el ambiente, además de la biotecnología industrial, que estudia los bioplásticos y biocarburantes [Manicard, 1999].

La producción de proteínas recombinantes es parte de la biotecnología verde, y diferentes técnicas para lograr su obtención han sido desarrolladas en las últimas cinco décadas, iniciándose con la aplicación de las suspensiones de cultivos celulares de plantas en la producción de proteínas de bajo peso molecular. Aunque se ha considerado recientemente la idea del desarrollo de técnicas de producción de proteínas recombinantes utilizando a la planta como sistema, las posibilidades de contaminación con agroquímicos, el impacto de virus y enfermedades, así como también la variabilidad en las condiciones de cultivo; hacen parecer estos sistemas poco viables en comparación con la aplicación de las suspensiones de cultivos celulares como sistemas de producción; ya que eliminan las desventajas antes descritas, y además, mantienen características deseables como la aplicación de estos sistemas a escalas industriales, menos cantidad de equipo y bajo costo de producción, reducción del tiempo de producción; características de calidad iguales en todos los productos debido a que sus condiciones de cultivo son controlables fácilmente. El uso de las suspensiones de cultivos celulares de plantas en la producción de proteínas recombinantes se ha enfocado solo en cierto número de líneas celulares cuyo genoma se conoce, siendo las más utilizadas las suspensiones de cultivos celulares de tabaco, ya que se han producido más de 20 proteínas recombinantes en T-BY2, entre algunos ejemplos podemos mencionar anticuerpos, enzimas, hormonas, entre otras; que tienen aplicaciones en distintos campos desde el farmacéutico hasta el industrial [Hellwing y col., 2004].

Los cultivos celulares como sistemas de producción seleccionados pueden mantener como en las bacterias seleccionadas, un medio de síntesis que permita producir las proteínas; sin embargo, una de las ventajas que contienen los cultivos celulares es que pueden producir proteínas tan complejas como las glicoproteínas. Por tanto las suspensiones de cultivos celulares de T-BY2 son utilizadas como productoras de proteínas debido a su estabilidad y características favorables durante el proceso de transformación. Una de las maneras más comunes de producción de proteínas recombinantes es mediante la bacteria *E. coli*, ya que esta al igual que la suspensión de cultivos celulares de plantas pueden mantenerse fácilmente, logrando producir grandes cantidades de proteína y dicha producción es lograda también a nivel industrial, evitan la degradación de las proteínas recombinantes producidas por medio de sus proteasas; sin embargo, una de sus mayores desventajas es la presentada durante el proceso de producción final y purificación; ya que en el primero algunas proteínas complejas pueden no alcanzar su conformación estructural original, sintetizando con ello cuerpos proteicos oclusados que hacen que el proceso de purificación pierda su eficiencia [Mee-Jung y Sang., 2006].

2.2 La pared celular

La pared celular de plantas tiene funciones importantes no solo en el fortalecimiento de la estructura de la planta si no también en la diferenciación celular, la comunicación intracelular, el crecimiento de la planta, el intercambio de agua [Cosgrove, 2005], y defensa [Day y Graham., 2007]. La pared celular de plantas constituye la materia prima usada en la manufactura de diferentes productos industriales tales como textiles, papel, películas, madera y etanol, esperando este último se convierta en el combustible más usado en el mundo [Sticklen, 2008]. La pared celular primaria representa la interface dinámica entre la célula de la planta y su ambiente, el cual incluye células que se encuentren cercanas (Figura 2.1).

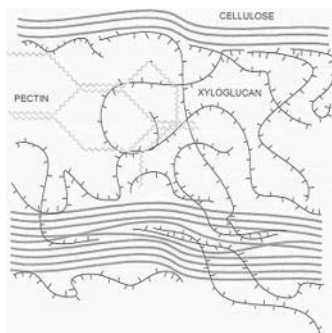


Figura 2.1. Vista general de la pared celular de plantas (Cosgrove, 2005).

Las paredes celulares de plantas son como un concreto reforzado hecho a base de celulosa (grava), impregnada en la matriz de polisacáridos y proteínas (cemento) [Showalter, 1993]. Sin embargo, esta analogía no permite capturar la dinámica natural de la pared celular y su habilidad para alterar su composición física y sus propiedades. A medida que la célula crece, adquiere una estructura y forma, así como también sirve de almacenaje [Fry y col., 1992], y además está involucrada directamente en la división y diferenciación celular. La pared celular protege contra los diferentes estreses bióticos y abióticos [Vorwerk y col., 2004]

En ciertos tipos de células, una vez que se ha alcanzado el máximo punto de desarrollo, una pared celular secundaria es construida entre la pared celular primaria y la membrana plasmática.

Entonces, tres estratos se pueden encontrar en la pared celular de plantas:

- La pared celular primaria, la cual generalmente es una capa delgada, flexible y extensible formada mientras la célula está en crecimiento.
- La pared celular secundaria, formada una vez que la célula ha dejado de crecer; es una capa densa la cual no todos los tipos de células la poseen. En algunas células tales como xilemas, la pared celular secundaria contiene lignina la cual da fortaleza a la estructura y defensa en contra del agua.
- La lamela media, rica en pectinas, es la capa más extensa formada en la interface entre las células adyacentes, manteniéndolas a estas unidas.

2.3 Componentes de la pared celular

La pared celular está compuesta de polisacáridos complejos y proteínas estructurales que se entrelazan longitudinalmente y forman estructuras cristalinas de celulosa [Carpita y Gibeau, 1993]:

Celulosa. La celulosa es el resultado de uniones (1,4)- β -D-glucosídicas. Numerosas cadenas paralelas de estas uniones se encuentran fuertemente adheridas por puentes de hidrógeno formando una microfibrilla cristalina, la cual es mecánicamente fuerte y altamente resistente al ataque enzimático. Las microfibrillas se encuentran incrustadas en la red hecha de complejos polisacáridos.

Hemicelulosas. Xiloglucano y arabinoxilano son las dos más abundantes hemicelulosas. El xiloglucano tiene una estructura básica similar a la de la celulosa, pero es decorado con ramificaciones de xilosa. El arabinoxilano consiste en una estructura base formada de unidades D-xilosa unidas mediante enlaces β (1, 4) decorado con ramificaciones de arabinosa.

Pectinas. Es un complejo y heterogéneo grupo de polisacáridos los cuales se encuentran covalentemente unidos [Willats y col., 2001]. Los componentes de la pectina son: Ramnogalacturonano I, que consiste en residuos de ácido D-galacturónico enlazado en α (1-4) con restos de L-ramnosa intercalados con un enlace α (1-2); homogalacturonano compuesto de residuos de ácido D-galacturónico unidos por un enlace α (1,4) [Vincken y col., 2003]. Ramnogalacturano II, el cual es un complejo dominio que contiene 11 diferentes tipos de azúcares residuales.

Proteínas. Las proteínas estructurales, pueden ser clasificadas en tres grupos de acuerdo con su composición aminoácida predominante: Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP), como las extensinas, las cuales se convierten en insolubles dentro de la pared celular primaria; proteínas ricas en HidroxiProlina/Prolina (H/PRP); y proteínas ricas en glicina (GRP) [Tierney y Varner, 1987].

Lignina. Lignina es un complejo material hidrofóbico, el cual rellena los espacios vacíos entre los componentes de la pared celular primaria: celulosa, hemicelulosa y pectina,

formando así la pared secundaria. Esta solo se puede encontrar en ciertos tipos de células: *traqueidas*, *sclereidas* y *xilemas*. La Lignina esta covalentemente unida a la hemicelulosa y entrecruza diferentes tipos de polisacáridos de la planta, confiriendo con esto fortaleza mecánica a la pared celular [Cassab y Varner., 1998].

2.4 Organización de la pared celular

La pared celular tiene una estructura similar a la fibra de vidrio [Cosgrove, 2005], donde la celulosa se encuentra incrustada en una matriz compleja de polisacáridos, en las que se encuentran las pectinas y las hemicelulosas. Los polisacáridos que unen a la celulosa son las hemicelulosas, formando juntos una primera red la cual es muy fuerte. Una segunda red es formada por proteínas estructurales como las extensinas, estas últimas junto con la primera red se encuentran incrustadas en la matriz de pectinas. Las pectinas tienen diferentes funciones entre las que destaca la formación de hidrogeles, los cuales empujan y separan a las microfibrillas, facilitando el deslizamiento de estas durante el proceso de crecimiento celular, y fijándolas una vez que el crecimiento de la célula ha cesado [Thomson y Fry., 2000]. Las hemicelulosas y pectinas tienen una función muy importante en la determinación del grosor y la porosidad. Las pectinas son también los primeros blancos de ataque de los patógenos y así como también, las respuestas de defensa de las plantas [Vorwerk y col., 2004]. En la figura 2.2 se muestra a la celulosa localizada en las microfibrillas (barras moradas), la cual es sintetizada por largos hexámeros complejos en la membrana plasmática, mientras que las hemicelulosas y pectinas son sintetizadas en el aparato de Golgi y depositadas en la superficie de la pared celular por las vesículas. Para una mayor claridad la red de hemicelulosas es mostrada en la parte izquierda de la pared sin las pectinas, sin embargo estas últimas se encuentran enfatizadas en la parte derecha de la figura 2.2. En la mayoría de las especies de plantas, la hemicelulosa más importante es el xiloglucano (azul), mientras que en las hemicelulosas arabinoxilano (gris) y manosas (las cuales no se muestran) se encuentran presentes en menor cantidad. Dentro de los principales polisacáridos de la pectina se encuentran los ramnogalacturonanos I y II, y el homogalacturonano, con pequeñas cantidades de xilogalacturonano, arabinano, arabinogalactano I (no mostrado). Se cree que los dominios pertenecientes a la pectina están covalentemente unidos entre ellos, sin embargo, también se encuentran unidos mediante enlaces no covalentes a

xiloglucanos. Polisacáridos neutrales de la pectina (verde) pueden ser capaces de unirse a la superficie de la celulosa.

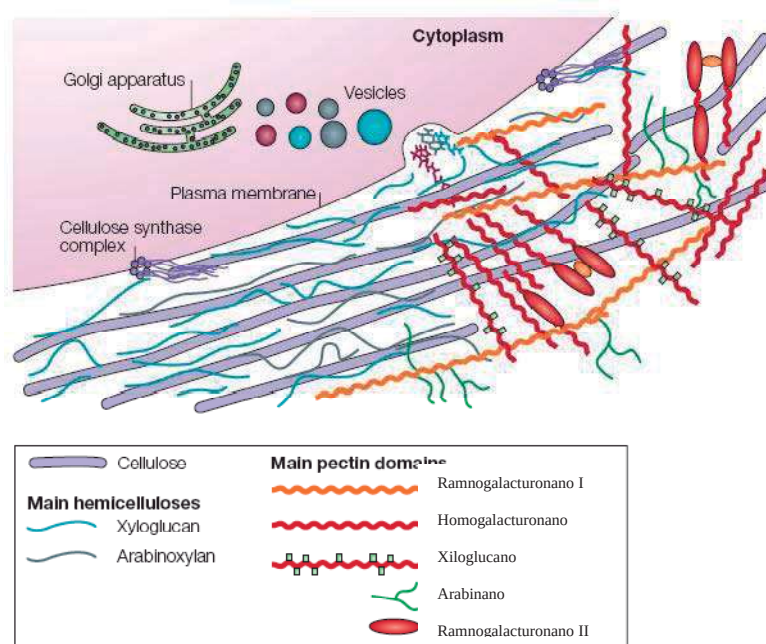


Figura 2.2. Estructura de la pared celular primaria (Cosgrove, 2005).

Ensamble de la pared: Después su secreción hacia el espacio extracelular, los polímeros deben de ser ensamblados dentro de una estructura, con un específico arreglo y ensamble. La matriz de polisacáridos se asocia entonces con las microfibrillas de celulosa para formar una extensible y fuerte red. No se cuenta con un conocimiento amplio acerca de la construcción de esta compleja red. Dicha construcción involucra interacciones físicas y químicas entre los polisacáridos localizados en la pared y los catalizadores que median el ensamble. Por ejemplo, el xiloglucano es una hemicelulosa abundante en la pared celular primaria, y se cree se entrelaza con las microfibrillas [Lloyd y Chan, 2004]. La integración de la matriz de polisacáridos secretados a la superficie puede ser también mediada mediante catalizadores tales como las endotransglicosas las cuales cortan y ligan juntas a las glucosas. Un ejemplo de esta clase de catalizadores son las XTHs (xiloglucano endo trans glicosas/hidrolasas) que específicamente cortan la estructura base resultado de la unión glucosídica con la xilosa, construyéndose con las nuevas estructuras glucosídicas una unión con otra cadena de xiloglucano libre [Cosgrove, 2005].

2.5 Plasticidad de la pared celular durante la elongación

La expansión de la pared celular puede ocurrir a través de diferentes mecanismos, ya sea un crecimiento difuso que permita la expansión isodiamétrica o una elongación dirigida. Este último tipo puede ocurrir de manera difusa o dirigido con una trayectoria (enfocado en una región precisa de la célula). Sin embargo, con un crecimiento difuso diferentes paredes se pueden alargar a diferentes velocidades o direcciones dependiendo de las condiciones de estrés y las variaciones estructurales. Cualquiera que sea el tipo de crecimiento, la integración polimérica, la relajación del estrés y el corte deben ocurrir [Lloyd y Ray, 1992].

- Síntesis de la pared. La expansión de la pared celular es coordinada generalmente con la síntesis polimérica y la secreción, a un potencial de hidrógeno (pH) bajo en el compartimiento extracelular (crecimiento ácido) cortado por auxinas vía activación por adenosin trifosfatasa (ATPasa). El efecto de la disminución del pH es la activación hidrolítica, específicamente la hidrólisis del xiloglucano [Cosgrove, 1997].
- Relajación del estrés y extensibilidad: La relajación del estrés es una propiedad de las paredes celulares en crecimiento como consecuencia de la turgencia de la célula. Esta presión de turgencia, es la fuerza generada por el agua y ejercida en la membrana plasmática y en la pared celular resultando en la rigidez de la planta. La relajación del estrés en la pared permite el corte y deslizamiento de los polímeros de la pared celular, así como también reduce la presión de turgencia y el potencial agua. Sin dicha relación, el proceso de síntesis y expansión de la pared no podría realizarse. Posibles agentes de la relajación del estrés y extensibilidad son endo-1,4- β -D-glucanasas, XTHs, metil pectina esterasas (PMEs) y expansinas las cuales todas actúan en los polisacáridos de la pared celular [Cosgrove, 1999].

2.6 Estudio sistemático proteómico

Uno de los objetivos particulares del análisis sistemático proteómico en los compartimientos celulares es la identificación de las proteínas que están presentes. Este objetivo puede ser alcanzado usando un eficiente proceso de separación para cada compartimiento celular de interés. En el caso de la pared celular, los procesos de separación seleccionados deben reducir

las pérdidas de las proteínas de pared celular y evitar la contaminación con proteínas intracelulares [Feiz y col., 2006; Borderies y col., 2003].

En años recientes, los estudios proteómicos han dado un nuevo significado a la composición proteica de la pared celular. Alrededor de 400 CWP's de *A. thaliana*, el cual representa un cuarto de su proteómica estimada en la pared celular, ha sido descrita [Irshad y col., 2008].

En otro tipo de proteínas, como las enzimas; se ha reportado que poseen diferentes variedades de funciones centrales. Se han dividido en tres tipos considerando sus interacciones con los componentes de la pared celular, y las diferentes maneras de separarlas. CWP's que pueden o no tener una mínima interacción con los componentes de la pared celular, llamados proteínas "lábil", las cuales se mueven libremente en el espacio extracelular. CWP's que pueden estar débilmente unidas a la matriz con fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones de tipo hidrofóbico o iónico. Finalmente las CWP's más difíciles de identificar son aquellas que tienen una fuerte interacción con la matriz.

Todas las proteínas de pared celular poseen una señal péptida a fin de poder ser secretadas.

Por tanto, utilizando la proteómica y la bioinformática, ha sido posible la clasificación de las proteínas lábil, así como también de las proteínas que están débilmente unidas, en grupos en base de sus funciones bioquímicas y biológicas predictivas [Thomson y Fry., 2000]:

- Proteínas que actúan en los polisacáridos incluyendo hidrolasas glicosiladas, esterasas, liasas y expansinas (29.5%).
- Oxido-reductasas, como peroxidases (13.5%)
- Proteínas estructurales (1.5%)
- Proteínas involucradas en la señalización (8%)
- Proteasas (10%)
- Proteínas con dominios interactivos (10%)
- Proteínas variadas (16.5%)
- Proteínas con función desconocida (10%)

Debido a los recientes estudios proteómicos, la pared celular ha sido mostrada como una estructura dinámica y es importante considerar que las proteínas varían en su abundancia, dependiendo del tipo de célula, del grado de maduración y del estrés previo al que haya sido sometida la célula.

Un estudio proteómico realizado en el laboratorio [Irshad y col., 2008], mostró la presencia de una abundante proteína localizada en las paredes celulares de los hipocótilos etiolados de *A. thaliana*, como se muestra en la figura 2.3, donde la proteína codificada por *At1g28290* fue aislada e identificada y posteriormente separada de las proteínas extraídas por cromatografía de intercambio iónico y análisis *1D-E* por *MALDI-TOF MS*. En la derecha se indican los marcadores de masa molecular. Esta proteína está codificada por *At1g28290* y clasificada como una arabinogalacto proteína no clásica (AGP) en base a su marcada reactividad con el agente Yariv [Cosgrove, 1999]. Este tipo de proteína es rica en galactosa (Gal) y arabinosa (Ara). Las arabinogalacto proteínas (AGPs) constituyen una clase particular de HRGPs. Estas son altamente glicosiladas. Múltiples formas de AGPs han sido encontradas en las hojas de las plantas, ya sean en la pared ó asociadas a la membrana plasmática, estas despliegan los mismos patrones de expresión específicos.

Varias líneas de investigación sugieren que este tipo de proteína tiene un desempeño importante en la división celular, en la interacción célula-célula y en la expansión celular, pero en cualquiera de los casos ninguna función biológica o participación de una clase particular AGP le ha sido asignada.

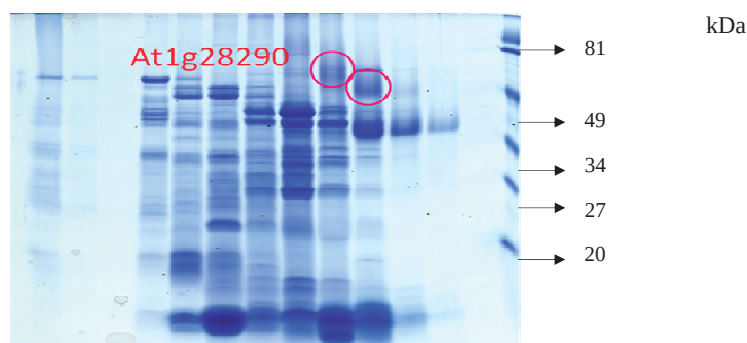


Figura 2.3. Análisis de proteínas extraídas por CaCl_2 y LiCl de paredes celulares de hipocótilos etiolados de 11 días

[Irshad y col., 2008].

2.7 Estructura y propiedades de *At1g28290*

At1g28290 codifica una proteína rica en prolina de 350 aminoácidos con 4 distintos dominios funcionales:

- Una señal péptida
- Un dominio rico en histidina
- Un domino central repetitivo rico en prolina
- Un dominio C-terminal no rico en prolina

En el dominio rico en prolina existen solo cinco tipos de amino ácidos: 45% de prolina, 18.2% de lisina, 15.7% de valina, 6.3% de alanina y 3.8% de tirosina, formando unidades exactas diferentes repetitivas [van Hengel y col., 2003].

Existen dos repeticiones con 31 amino ácidos traslapados con 4 repeticiones cortas de 20 aminoácidos compuestos de diferentes variantes de las unidades repetitivas básicas PP (A/V/T) (K/Y). Este cuadripéptido degenerado es diferente del típico pentapéptido PPVX (K/T) de las PRPs y es característico de una clase de AGPs no clásicas. También *At1g28290* tiene una región C-terminal con 6 residuos conservados de cisteína, siendo nombrada como PAC (por PRP y AGP, conteniendo cisteínas) [Liu y Mehdy, 2007; Sambrook y col., 1989]. Este dominio también existe en el OLE E 1 alérgenos de *Olea europea*.

Precediendo el dominio rico en histidina, existe un módulo APAPAP con 6 dupletes AP distribuidos en el dominio PRP, sugiriendo que estos AP son sitios de adhesión de carbohidratos (posibles sitios O-glicosilados). Existen 2 posibles sitios N-glicosilados en la región PAC (Figura 2.4)



Figura 2.4. Estructura de *At1g28290* (comunicado personal de E. Jamet).

Las proteínas que tienen una estructura similar, una señal péptida predictiva, un segmento N- terminal rico en histidina, una región rica en prolina y un dominio PAC, han sido identificadas según el árbol que ha sido generado (Figura 2.5) por el alineamiento de la secuencia completa de aminoácidos de muchas proteínas que han sido identificadas como homólogas a la proteína *AtGP31* (*At1g28290*): PVPRP1 (Frijol francés), HyPRP1 (algodón [*Gossypium hirsutum*]), DcAGP1 (zanahoria [*Daucus carota*]), NaPRP4, NtTTS1 y NtTTS2 (tabaco). Los números indican el porcentaje de arranque de 1000 repeticiones. Dos genes han sido encontrados en el genoma de *Arabidopsis* y estos comparten características similares con *At1g28290*, estos genes son *AtAGP30* y *At2g34700*, el primero no posee el dominio rico en histidina [Laemmli, 1989] y el segundo solo tiene el dominio PAC.

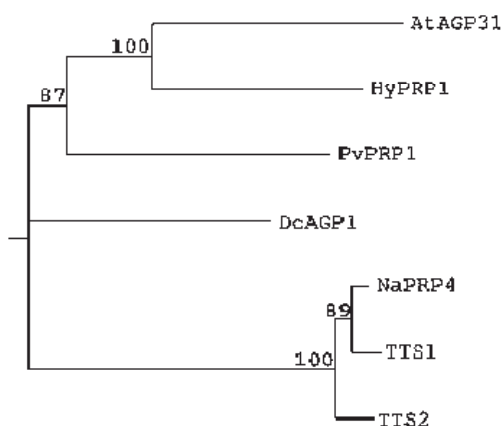


Figura 2.5. Árbol filantrópico (comunicado personal de E. Jamet).

Esta *O*-glicoproteína codificada por *At1g28290* fue encontrada muy abundantemente en las paredes celulares de los hipocótilos etiolados elongados. Las células de hipocótilos etiolados de *A. thaliana* son un interesante modelo para estudiar la elongación. Cerca de 20 capas de células constituyen a los hipocótilos en estado embrionario. Su tamaño se incrementa rápidamente y de manera considerable durante la germinación, especialmente en la oscuridad.

Capítulo 3. Materiales

3.1 Material de plantas

Se usaron Plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Colombia 0 (Col 0).

Cultivos de suspensiones celulares de *Nicotiana Tabacum Bright Yellow 2* (T-BY2) fueron usadas para producir las proteínas recombinantes [Liu y col., 2007].

3.2 Secuencias de ADN complementario

ARN total de 11-días de hipocótilos etiolados de *A. thaliana* fueron usados a fin de obtener los fragmentos de ADN esperados por transcripción reversa-reacción de polimerización en cadena (RT-PCR).

Plásmido *pda19846* (clone RAFL 16-52-105) fue obtenido de RIKEN BioResource Center (www.brc.riken.jp/inf/en/index.html). Este clon contiene un ADN complementario (cADN) que corresponde al gen *At1g28290* (Figura 3.1).

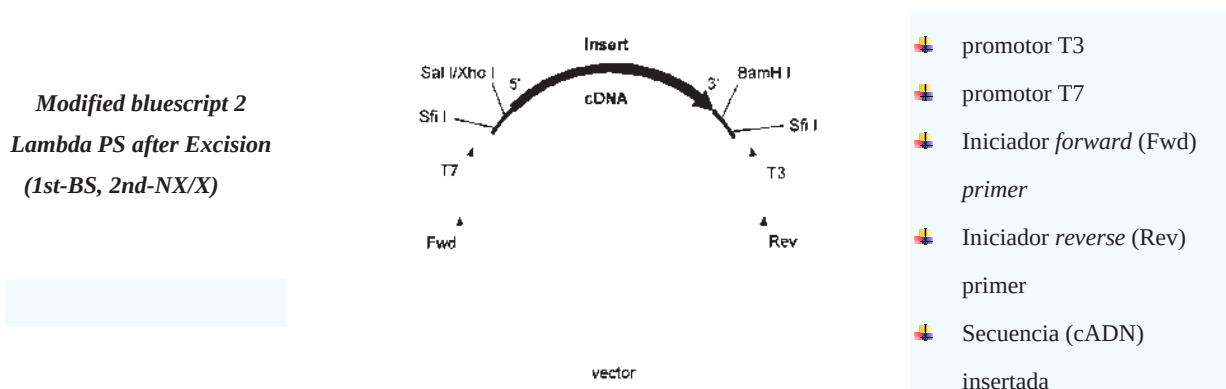


Figura 3.1. Plásmido pda 19846; ([http:// www.brc.riken.jp/inf/en/index.html](http://www.brc.riken.jp/inf/en/index.html)).

3.3 Oligonucleótidos iniciadores específicos

3.3.1. Diseño de oligonucleótidos iniciadores específicos.

Se diseñaron oligonucleótidos iniciadores específicos para la secuencia correspondiente a *At1g28290* (Tabla 3.1) y ordenados a EUROGENTEC S.A. (Seraing, Bélgica).

Tabla 3.1. Secuencias de los oligonucleótidos iniciadores.

Oligonucleótidos iniciadores específicos	T _m [=] °C	Número de nucleótidos	Secuencias de los nucleótidos escritas en dirección 5' a 3'
S1	58.0	22	ATGGGTTTCATTGGTAAGAGTG
AS1	66.2	22	TTTGGGGCAAGACGGGTAAAG
S2	63.7	22	TTCAACCGTAGTCTAGTCGCCG
AS2	70.3	21	CTTAGGCGGGTAAACCGGCGG
S3	66.3	30	TCCTCTGTCTTCACTTTCAACCGTAGTCTA
AS3	66.3	30	TAGACTACGGTTGAAAGTGAAGACAGAGGA

3.3.2. Diseño de oligonucleótidos iniciadores específicos Gateway®.

Se obtuvieron oligonucleótidos iniciadores internos Gateway® de EUROGENTEC S.A. (Seraing, Bélgica). El diseño de estos iniciadores internos fue previamente realizado en el laboratorio (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Oligonucleótidos iniciadores específicos Gateway®.

Oligonucleótidos iniciadores internos Gateway®	T _m [=] °C	Número de nucleótidos	Secuencias de los nucleótidos escritas en dirección 5' a 3'
GTW-Int-S1	60	30	GGAGATAGAACCATGGGTTTCATTGGTAAG
GTW-Int-AS1	62	33	CAAGAAAGCTGGGTCTCAATGGTGATGGTGATG

3.3.3. Integración de sitios *attB*.

Para generar los fragmentos de ADN adecuados para ser utilizados como sustratos en la reacción recombinante BP de Gateway® con el vector donador, será necesario incorporar los sitios *attB* dentro de los fragmentos de ADN. Se diseñaron las secuencias de los oligonucleótidos iniciadores universales Gateway® (Tabla 3.3)

Tabla 3.2. Secuencias de los oligonucleótidos iniciadores universales Gateway®.

Oligonucleótidos iniciadores universales Gateway®	Tm [=] °C	Número de nucleótidos	Secuencia de los nucleótidos escritas en dirección 5' a 3'
<i>GTW-Universal-attB1 forward primer</i>	70	49	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC GAAGGAGATAGAACCATG
<i>GTW-Universal-attB2 reverse primer</i>	62	33	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC

3.4 Cepas bacterianas

3.4.1. Cepas *Escherichia coli* DH5α™

Se usaron Cepas pertenecientes a Library Efficiency® Chemically Competent *Escherichia coli* DH5α™ (ref. 18262-014, Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA, EUA). La selección de esta cepa fue realizada bajo las siguientes condiciones:

- La sensibilidad a los antibióticos gentamicina y espectinomicina permitieron la selección de las bacterias resistentes transformadas.
- Alta eficiencia en la recuperación de los clones obtenidos por la sensibilidad del producto generado por el gen *ccdB* (presente en los vectores donador y destinación antes de la recombinación). Las condiciones de cultivo fueron: Agitación a 250 rpm, temperatura de 37 °C en el medio líquido LB (Luria–Bertani) con gentamicina a 7.5 µg·mL⁻¹ y espectinomicina a 100 µg·mL⁻¹ (ver apartado 3.5).

3.4.2. Cepas Top 10® Chemically Competent *E. coli*

Se utilizaron cepas Top 10® Chemically Competent *E. coli* (KNM 4600-04, Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA, EUA) para la clonación y expresión de las proteínas recombinantes en el vector pBAD TOPO® TA Expression (ref: K4300-01, Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA, EUA).

Las condiciones de crecimiento fueron 37 °C y 250 rpm en medio LB (Luria-Bertani) con ampicilina a la concentración de 100 µg·mL⁻¹.

3.4.3. Cepas LBA 4404 de *A. tumefaciens*

Se usaron cepas LBA 4404 de *A. tumefaciens* para la transformación en plantas. Este tipo de cepas posee resistencias contra la estreptomicina rifampicina. Cuando las cepas se transforman con el vector Gateway® expresión, estas adquieren resistencia a la espectinomicina.

3.5 Medios de Cultivo bacterianos

3.5.1. El medio Luria-Bertani (LB)

Es un medio nutricionalmente rico, usado principalmente para el crecimiento bacteriano. También es conocido como caldo Luria. Este medio fue utilizado para el mantenimiento y cultivo de las cepas de *E. coli* y *A. tumefaciens*. La formulación del medio LB (Sambrook y col., 1989) es:

Para 1 L:

a 950 mL de agua desionizada, agregar:

- Bacto-triptona 10 g
- Extracto de bacto-levadura 5 g
- Cloruro de sodio (NaCl) 10 g

Ajustar el volume a 1 L con agua desionizada y fijar el pH a 7.0 con hidróxido de sodio (NaOH) 5 N (~ 0.2 mL).

El medio que contiene agar (medio sólido LB) fue preparado de acuerdo a las instrucciones anteriores excepto que se agregó agarosa a $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ antes de introducirse a la autoclave. La esterilización del medio fue realizada por 20 min a 120°C y 14.5 psi [Guzzard y col., 2004].

Durante la selección de las bacterias transformadas diferentes concentraciones y clases de antibióticos fueron utilizados para preparar los medios LB líquido y sólido:

- Ampicilina a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
- Cloramfenicol a $70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
- Gentamicina a $7.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
- Estreptomicina a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
- Espectinomicina a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
- Kanamicina a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
- Rifampicina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

3.5.2. Medio de cultivo SOC

El medio SOC es un medio nutricionalmente rico utilizado en el crecimiento bacteriano, quizás es el segundo medio más utilizado para el cultivo de *E. coli* en biología molecular después del medio LB. Este medio fue utilizado durante la transformación de las cepas de *E. coli* por el vector pBAD TOPO® y los vectores de Gateway® Technology

La composición del medio SOC es:

- 2% triptona
- 0.5 g de extracto de levadura
- 10 mM NaCl
- 2.5 mM KCl
- 10 mM MgCl_2
- 10 mM MgSO_4
- 20 mM glucosa.

La temperatura de almacenamiento fue a 4°C .

El medio fue esterilizado por 20 min a 120°C y 14.5 psi.

3.6 Medio de cultivo para células de Tabaco (medio T-BY2)

Se preparó el medio LS (Linsmaier y Skoog, 1965) (ref: L0230.0050 DUCHEFA, Haarlem, Netherlands) con sacarosa ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) para el sub-cultivo de células de tabaco. Se agregaron dos antibióticos al medio líquido: kanamicina ($50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y carbenicilina ($500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Para el medio sólido, la preparación es la misma exceptuando que se agregó agarosa a la concentración de $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ antes de la esterilización. Además que la concentración de la kanamicina fue de $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se incluyó kanamicina debido a que los fragmentos de ADN de interés deben de ser insertados en vector pK7WG2D, 1 el cual posee resistencia a este antibiótico. Carbenicilina fue añadida para prevenir el crecimiento *A. tumefaciens* [Guzzard y col., 2004].

3.7 Vectores usados en la clonación

3.7.1. Vector pBAD TOPO®

Es específicamente diseñado para la clonación en un paso, así como también para la regulación de la expresión procariótica de los productos resultantes del PCR por la amplificación del catalizador *Taq* (Figura 3.2).

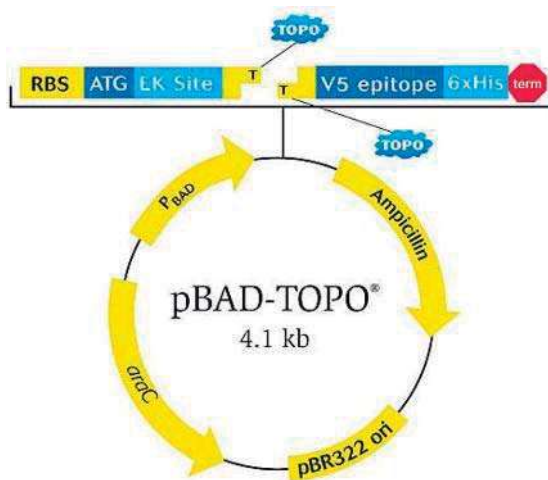


Figura 3.2. Vector pBAD TOPO®, (<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>).

- ✚ Promotor de Arabinosa y elementos reguladores (pBAD): bases 4-276
- ✚ Sitios de los iniciadores pBAD forward (RBS): bases 208-227
- ✚ Codón inicial ATG: 345-347
- ✚ Sitios de reconocimiento de Enteroquinasas (EK): bases 363-377

- ✚ Sitios de clonación pBAD-TOPO® cloning site: bases 387-388
- ✚ Epítipo V5: bases 402-443
- ✚ Región de polihistidina(6xHis): bases 453-470
- ✚ Sitio de los iniciadores pBAD reversing: bases 526-543
- ✚ Terminadores transcripcionales rrnB T1 y T2: bases 576-733
- ✚ Gen que expresa resistencia a ampicilina : bases 1013-1873
- ✚ Origen de replicación pBR 322: bases 2018-2691
- ✚ *araC* codifica la proteína regulatoria del promotor pBAD: bases 4100-3222

Tras la activación del estado linealizado por la Topoisomerasa I, pBAD TOPO® está listo para una clonación rápida y la subsecuente expresión en *E. coli* por una marcada regulación del promotor arabinosa del vector pBAD TOPO® (araBAD). Usando este vector se asegura la adición la etiqueta C-terminal de polihistidina (6xHis) la cual permite la purificación de la proteína producida por cromatografía de afinidad de níquel, y la etiqueta del epítipo V5 que permite la inmuno detención. Los sitios de corte de la enteroquinasa (EK) permiten la eliminación de la región N-terminal del péptido.

3.7.2 Vectores Gateway® Technology

3.7.2.1. Vector pDONR™ 207

Se utilizó el vector pDONR™ 207 (Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA, USA) en Gateway® Technology (Figura 3.3). Cuando los fragmentos de ADN extendidos con los sitios *attB* son recombinados con el vector en la reacción BP se produce un clon entrante. Las principales características de este vector son:

- Gen que expresa resistencia a la gentamicina permitiendo la selección positiva de células bacterianas que contengan al plásmido de interés.
- A fin de poder realizar una selección eficiente de los clones recombinados y evitar la transformación celular por producto, se usa el gen *ccdB* para una selección negativa y el gen de la resistencia al cloramfenicol (C^{mR}) para la selección inversa. Después de la reacciones de recombinación BP y LR, estos genes son remplazados por los fragmentos de ADN de interés.

El vector, con sus respectivos sitios se puede visualizar en la figura 3.3.

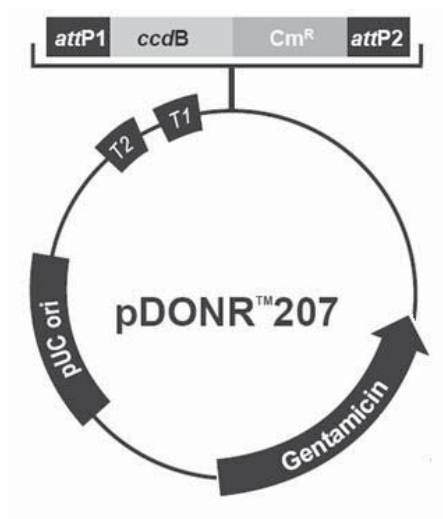


Figura 3.3. Vector pDONR™ 207, (<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>)

- ✚ rrnB T2 Terminación de la transcripción: bases: 73-100
- ✚ rrnB T1 Terminación de la transcripción: bases 232-275
- ✚ attP1: bases 332-563
- ✚ Gen *ccdB*: bases 959-1264
- ✚ Gen de la resistencia al cloramfenicol (Cm^R bases 1606-2265)
- ✚ attP2: bases 2513-2744
- ✚ Gen de la resistencia a la gentamicina: bases: 3528-4061.
- ✚ pUC ori: bases 4909-5582

3.7.2.2. Vector pK7WG2D,1

Se utilizó el vector Gateway® pK7WG2D,1 (Universidad de Ghent, www.psb.ugent.be/gateway) para obtener el clon expresión después de la reacción de recombinación LR. Los fragmentos de ADN están flanqueados por los sitios *attB* (ver apartado 4.1). Este vector contiene:

- Sitios de recombinación: *attR1* y *attR2* los cuales reaccionan respectivamente con los sitios *attL1* y *attL2* en el clon entrante.

- Genes de resistencia a la kanamicina usadas para la selección de plantas y espectinomycin para la selección bacterial.
- Presencia del gen *ccdB* el cual es eliminado después de la reacción de recombinación ya que está localizado entre los sitios de recombinación.
- GFP (Green Fluorescent Protein) secuencia codificante bajo el control del promotor 35S RNA del virus del mosaico del Coliflor (CaMV).
- Promotor 35S RNA de CaMV para la sobre producción de la proteína de interés.
- Terminador T35S del 35S RNA de CaMV.

El vector se presenta en la figura 3.4.

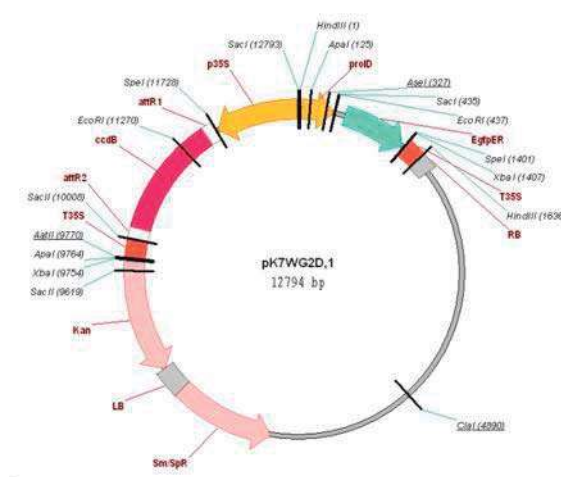
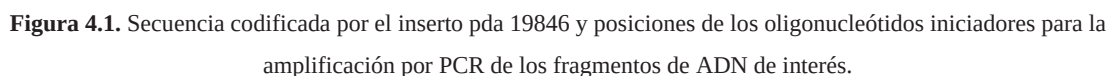


Figura 3.4. Vector pK7WG2D, 1

(http://wwwpsb.ugent.be/gateway/index.php?NAME=pK7WG2D&_app=vector&_act=construct_show&)

- Sitio attB1
- Gen *ccdB*
- Gen de la resistencia a la estreptomycin y espectinomycin (Sm/SR).
- Sitio attB2
- Gen de la resistencia a la kanamicina (Kan) bases: 3528-4061
- Secuencia codificante del gen GFP
- EgfpER: parte del gen GFP bajo el control del promotor rolD
- proID: promotor del gen rolD de *A. tumefaciens*
- p35S: promotor RNA 35S del virus del mosaico del Coliflor (CaMV)
- T35S: terminador RNA 35S del CaMV

Los oligonucleótidos iniciadores fueron diseñados para obtener los fragmentos de ADN de interés por amplificación por PCR. En la figura 4.1 se muestra la posición de cada oligonucleótido, donde las líneas superiores corresponden a la secuencia de aminoácidos escritas con una letra código.



En la figura 4.2 se muestran las estrategias de amplificación seleccionadas.

- *At1g28290c* (secuencia completa); oligonucleótidos iniciadores S1 y AS1 (Figura 4.2 A).
- *At1g28290c*-PAC (secuencia completa menos el dominio PAC); oligonucleótidos iniciadores S1 and AS2 (Figura 4.2 B).
- *At1g28290ps*+PAC (señal péptida más el dominio PAC); se utilizaron cuatro diferentes oligonucleótidos iniciadores para la amplificación de las secuencias de acuerdo a las estrategias diseñadas en el paso (Figura 4.2 C1-3):
 - S1 y AS3 oligonucleótidos iniciadores (Figura 4.2 C1).
 - S3 y AS1 oligonucleótidos iniciadores (Figura 4.2 C2).
 - S1 y AS1 oligonucleótidos iniciadores (Figura 4.2 C3).
- *At1g28290PAC* (sólo dominio PAC) S2 y AS1 oligonucleótido iniciadores (Figura 4.2 D)

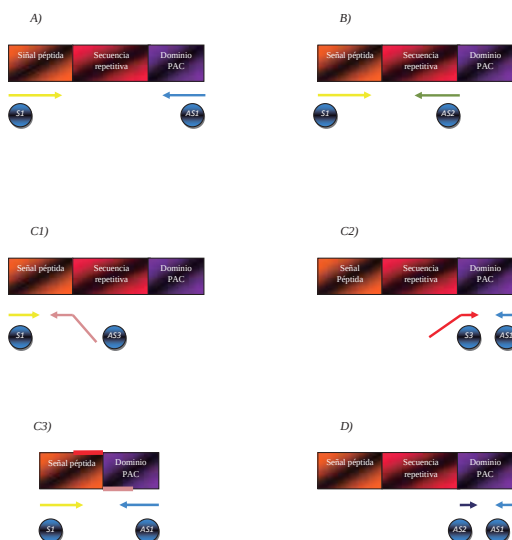


Figura 4.2. Estrategias para la amplificación por PCR de los fragmentos de ADN de interés.

Posiciones de los oligonucleótidos iniciadores para:

- A) Amplificación de *At1g28290c*
- B) Amplificación de *At1g28290c*-PAC
- C1-3) Amplificación de *At1g28290ps*+PAC
- D) Amplificación de *At1g28290PAC*

4.2 Preparación del plásmido *pda 19846*

En un tubo que contiene 100 ng del plásmido *pda 19846*, se agregaron 200 μL del amortiguador TE (pH 8.0) a fin de obtener una concentración de ADN de $50 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

4.3 Transformación de bacterias por electroporación

La electroporación de la cepa DH5 α^{TM} *E. coli* fue requerida para obtener las cepas que tuvieran el plásmido *pda 19846* en su interior. Las cuvetas para la electroporación (0.1 cm) fueron colocadas en hielo. Se mezclaron 2 μL de solución ADN con 50 μL de bacterias electro-competentes e incubadas por 10 minutos en hielo. La mezcla fue colocada en las cubetas, las cuales tienen dos electrodos de aluminio en cada lado. Las celdas se colocaron en un electroporador a 1.5 kV (voltaje), 200 Ω (resistencia) y 25 μF (capacitancia). Inmediatamente después de la electroporación, se agregó 1 mL de medio líquido LB en la bacteria y fermentado por 1 hora a 37 °C. Después, 100 μL y 200 μL de este cultivo fueron rociados en dos platos que contienen agar con ampicilina ($50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). La incubación fue realizada toda la noche. Después de la fermentación, se realizó la selección de un clon para posteriormente llevar a cabo la purificación del ADN.

4.4 Purificación de ADN plásmido

Se purificó el ADN plásmido usando el kit QIAprep spin miniprep (ref: 27104, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) y siguiendo las recomendaciones del protocolo. Se realizaron lecturas en el Nanodrop (Labtech International Ltd, Wilmington, EUA) para cuantificar el ADN después de la purificación y para asegurar la concentración de ADN requerida, la razón de las longitudes de onda 260nm/280nm que asegura la calidad de la purificación debe de ser >1.8 para continuar.

4.5 Transcripción reversa (RT)-PCR

Se obtuvieron los fragmentos de ADN deseados por transcripción reversa (RT)-PCR de RNAs totales de hipocótilos etiolados bajo las siguientes condiciones: 0.5 μL de Oligo (dT)₁₅ iniciador (ref: c1101, Promega Hollow Road Madison, WI, EUA) a $500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 5.0 μL de RNAs totales a $500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.5 μL de dNTP mix a 10 mM cada uno y 1.7 μL de

DMSO. La mezcla reaccionante se incubó a 70 °C en un baño de agua por 10 minutos (para desnaturalizar las RNAs) e inmediatamente refrigeradas en hielo por 2 minutos. Después, 2.0 µL del amortiguador 5x First strand (Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA, EUA), 1.0 µL de DTT a 0.1 M (Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA, EUA) y 0.5 µL del inhibidor RNasin plus RNase (ref: N2611, Promega, Hollow Road Madison, WI, EUA) a 40 µ·L⁻¹ se agregaron a la mezcla reaccionante e incubados a 42°C en un baño de agua durante 2 minutos. Se agregaron 0.5 µL del catalizador Super Script II Reverse Transcriptase (ref: 91681 Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA, EUA) a toda la mezcla reaccionante e incubada a 42°C por 1 hora. Para alcanzar la desnaturalización enzimática fue necesaria la incubación de la mezcla final a 70 °C por 15 minutos. El ADNc resultante se almaceno a -20 °C.

4.6 Amplificación del ADN por PCR.

4.6.1 Amplificación por PCR con el catalizador *Pfu* DNA polimerasa®

A fin de clonar los fragmentos de ADN de interés, fue necesario realizar la amplificación de ADN. En un volumen total de 50 µL, la reacción fue hecha bajo las siguientes condiciones: 40.5 µL de agua destilada (dH₂O), 1.0 µL de ADN base a 50 ng·µL⁻¹, 5.0 µL de amortiguador 10x *PfuUltra*TM II Fusion HS DNA Polimerasa (ref: 600670, Stratagene, Agilent Technologies, Inc.2850 Centerville RoadWilmington, DE 19808, EUA), 1.0 µL de dNTPs (10 mM cada uno), 1.0 µL del oligonucleótido iniciador S (*sense*) (10 µM) y 1.0 µL del oligonucleotido iniciador AS (*antisense*) (10 µM) y 0.5 µL del catalizador *PfuUltra*TM II Fusion HS DNA Polimerasa® (ref: 600670 Stratagene, Agilent Technologies, Inc.2850 Centerville Road Wilmington, DE 19808, EUA). Los parámetros para el PCR de amplificación son mostrados en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Parámetros para la amplificación del ADN por PCR.

A. *At1g28290c* y *At1g28290c-PAC*

Paso	Temperatura [=] °C	Tiempo [=] s	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	120	1
Desnaturalización	95	60	30
Alineamiento	52	30	
Extensión	73	75	
Extensión final	73	300	1
Almacenamiento	4	Indefinido	1

B. *At1g28290PAC*

Paso	Temperatura[=] °C	Tiempo [=] s	Número de ciclos
Denaturalización inicial	95	120	1
Desnaturalización	95	60	28
Alineamiento	57	30	
Extensión	73	60	
Extensión final	73	300	1
Almacenamiento	4	Indefinido	1

C. *At1g28290ps*

Paso	Temperatura [=] °C	Tiempo [=] s	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	120	1
Desnaturalización	95	60	20
Alineamiento	53	30	
Extensión	73	60	
Extensión Final	73	300	1
Almacenamiento	4	Indefinido	1

Tabla 4.1. Parámetros para la amplificación del ADN por PCR (*continua*).

D. *At1g28290* PAC

Paso	Temperatura [=] °C	Tiempo [=] s	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	120	1
Desnaturalización	95	60	20
Alineamiento	50	60	
Extensión	73	60	
Extensión final	73	300	1
Almacenamiento	4	Indefinido	1

E. *At1g28290* ps+PAC

Paso	Temperatura [=] °C	Tiempo [=] s	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	60	1
Desnaturalización	95	120	20
Alineamiento	50	60	
Extensión	73	60	
Extension final	73	300	1
Almacenamiento	4	Indefinido	1

4.6.2 PCR de análisis con *Taq* DNA polimerasa®

A fin de revisar si los fragmentos de ADN de interés fueron clonados, fue necesario realizar un PCR de análisis. En un volumen total de 50 µL de reacción, el PCR fue realizado bajo las siguientes condiciones: 40.5 µL de agua destilada (dH₂O), 1.0 µL de ADN base (plantilla) a 50 ng·µL⁻¹, 5.0 µL del amortiguador *Taq* DNA Polimerasa 10x con MgSO₄ (Promega, Hollow RoadMadison, WI, EUA), 1.0 µL de dNTPs (10mM cada uno), 1.0 µL del oligonucleótido iniciador S (10 µM) y 1.0 µL del oligonucleótido iniciador AS (10 µM) y 0.5 µL del catalizador *Taq* DNA Polimerasa® (Promega Hollow Road Madison, WI, EUA).

4.7 Extracción de ADN del gel de agarosa

Para la extracción de los fragmentos de ADN del gel de agarosa, se utilizó “QIAEX II kit” (ref: 20021, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La banda de ADN revelada fue cortada del gel de agarosa con un escarpelo. Usando el protocolo de “QIAEX II kit” el ADN requerido se extrajo del gel de agarosa. Los fragmentos de ADN purificados fueron revisados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, en el amortiguador TAE 1x, seguido del revelado en la solución de Bromuro de Etidio (EtBr) a $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. El tamaño de los fragmentos de ADN se analizó comparándolos con el marcados de ADN (ref: G5711, Promega, Hollow Road Madison, WI, EUA) a $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La cuantificación fue hecha usando el NANODROP (Labtech International Ltd, Wilmington, EUA).

4.8 Incorporación de 3' A-overhangs (extremos) después de la amplificación de ADN por PCR

El catalizador *Taq* DNA polimerasa® es el único del cual se obtienen productos de PCR con extremos de A (desoxiadenina). Esta propiedad se encontró que es muy utilizada, y fue muy explotada para producir la clonación TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA, EUA). La linearización del vector pBAD TOPO®, consiste en que dicho vector contiene extremos 3' T (desoxitiaminas) residuales. Esto permite que la ligación sea rápidamente realizada usando topoisomerasa o ADN ligasa con los extremos del producto obtenido por PCR. Sin embargo, por otro lado, una de las mayores desventajas de utilizar *Taq* DNA polimerasa® es la baja fidelidad de replicación. Como el catalizador *Taq* DNA polimerasa® no tiene las exonucleasas 3' a 5' las cuales forman un mecanismo de corrección de pruebas que reemplaza los desajustes accidentales en la recién sintetizada cadena de ADN, produce por tanto más errores que las polimerasas que contienen los mecanismos de corrección tal como *Pfu* DNA polimerasa® [Liu y col., 2007].

Por tanto se uso primero el catalizador *Pfu* DNA polimerasa® para amplificar los fragmentos de DNA de interés. Después, fue necesario agregarle a $7 \text{ }\mu\text{L}$ de los fragmentos ya purificados generados de la amplificación usado *Pfu* DNA polimerasa® (Promega, Hollow Road Madison, WI, EUA) $2 \text{ }\mu\text{L}$ del amortiguador *Taq* DNA polimerasa® 10x

(Promega, Hollow Road Madison, WI, EUA), 1 μL MgCl_2 (25mM), 1 μL dATP (concentración final de 0.2 mM), 1 μL del catalizador *Taq* DNA Polimerasa®, y 8.0 μL de agua destilada (dH_2O) para alcanzar un volumen total de reacción de 10 μL . Esta reacción fue incubada a temperatura ambiente por 30 minutos.

4.9 Clonación pBAD TOPO®

Para clonar los fragmentos purificados resultantes del PCR después de agregar los extremos 3' A, se siguió el protocolo establecido por pBAD TOPO® TA expression Kit (ref: K4300-01, Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA, EUA). La mezcla reaccionante estaba compuesta de 0.5 μL del producto resultante del PCR, 3 μL solución no diluida de sales (pBAD TOPO® TA expression Kit), 1.5 μL de agua destilada (dH_2O) y 0.5 μL del vector pBAD TOPO®, se mezcló e incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

4.10 Transformación de bacterias con la mezcla reaccionante de pBAD TOPO® y selección de los clones recombinantes

Se mezcló un volumen de 3 μL de la mezcla reaccionante de pBAD TOPO® cloning con 25 μL de Top 10® Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA, USA) en un tubo Eppendorf® de 1.5 mL estéril y frío e incubado en hielo por 30 minutos. El tubo fue incubado a 42 °C en un baño de agua por 30 segundos e inmediatamente refrigerados con hielo. Se agregó medio SOC (450 μL) en condiciones estériles e incubado a 37°C por 1 hora bajo agitación a 250 rpm. Se agregaron en cajas Petri que contienen medio LB con agar y ampicilina 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 50 μL y 200 μL del producto transformado y se fermentó toda la noche a 37°C. Cinco colonias fueron seleccionadas y la presencia del ADN insertado fue checado por PCR usando los oligonucleótidos iniciadores y el catalizador *Taq* DNA polimerasa®.

4.11 Clonación Gateway®

4.11.1. Amplificación de ADN

Para generar los fragmentos de ADN adecuados para usarse como sustratos en la reacción de recombinación BP Gateway® con el vector donador, fue necesario la incorporación de los sitios *attB* en los fragmentos de ADN.

4.11.2. Reacción BP en el vector pDONR™ 207

El vector pDONR™ 207 fue usado para obtener el clon entrante. Se tomo 1 µL del fragmento de ADN de interés. Se agregaron 2 µL del amortiguador 5x BP clonase™ (Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA, EUA), 4 µL del amortiguador TE (pH 8), y 40 fentamol de ADN a 0.5 µL del vector pDONR™ 207 ($180 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), además de 2 µL del catalizador BP clonase™ (Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA, EUA). Esta mezcla fue mantenida a la temperatura ambiente durante toda la noche (Figura 4.3).

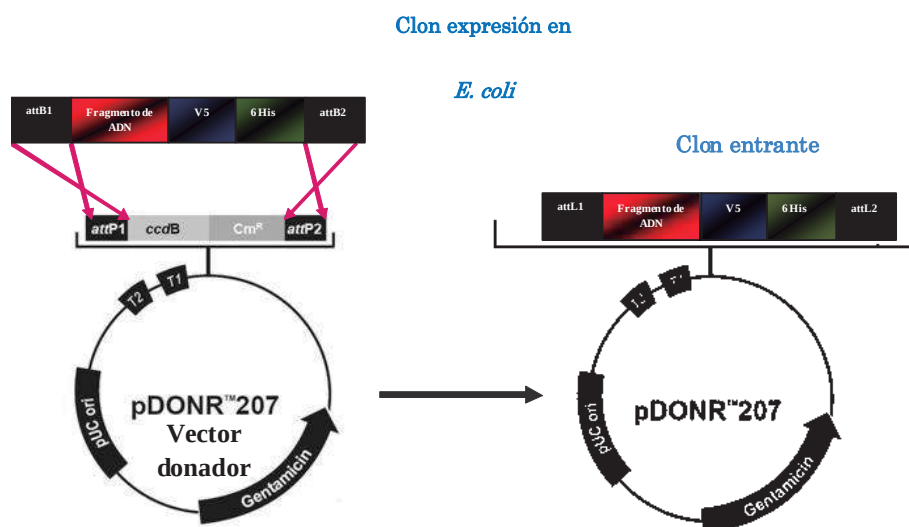


Figura 4.3. Reacción de recombinación Gateway® BP.

4.11.3. Trasformación de bacterias con el producto de la reacción BP

Dos µL del producto de la reacción BP fueron suavemente mezclados con 50 µL de Efficiency™ DH5α™ Chemically Competent *E.coli* (Invitrogen, Carlsbad, San

Diego, CA, EUA). Cajas Petri que contienen medio LB con agar y $7.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de gentamicina fueron rociadas con 50 μL y 200 μL de ese cultivo y fermentados toda la noche a 37°C . Después de la fermentación se seleccionaron 5 colonias y la presencia de los fragmentos de ADN de interés se revisó por amplificación por PCR usando los oligonucleótidos iniciadores pDONR *forward* y *reverse* así como también, el catalizador Taq DNA polimerasa®.

4.11.4. Purificación del ADN plásmido

Se purificó ADN plásmido proveniente de *E. coli* usando el BIOBASIC INC KIT (Torbay Road Markham, Ontario Canadá) para la purificación de una baja cantidad de copias de ADN plásmido. Las instrucciones recomendadas fueron seguidas. Posteriormente, 400 ng de cada plásmido fueron enviadas a secuenciar a Toulouse Génopole® Midi Pyrénées (Castanet-Tolosan, Francia).

4.11.5. Reacción LR en el vector pK7WG2D,1

Se muestreo 1 μL del clon entrante. Se realizó la reacción LR a $100 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ mezclando este ADN con 2 μL de el catalizador LR clonase™ (150 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 2 μL del amortiguador LR clonase™ (Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA, EUA), 4 μL del amortiguador TE (pH 8.0) y 1 μL del vector pK7WG2D,1. Esta mezcla fue mantenida a temperatura ambiente toda la noche (Figura 4.4).

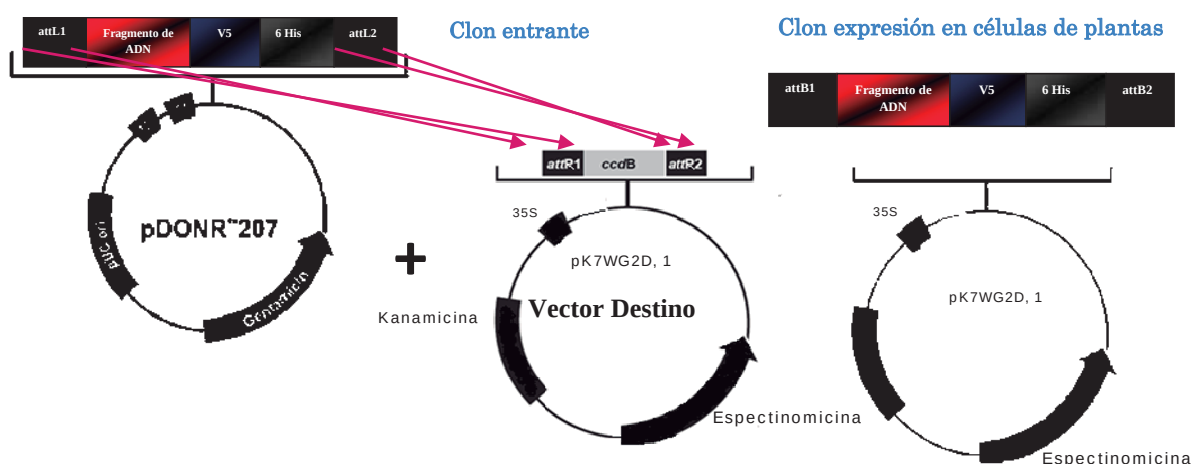


Figura 4.4. Reacción de recombinación Gateway® LR.

4.11.6. Transformación de la bacteria con el producto de la reacción LR

Para la transformación de la cepas Chemically Competent DH5 α TM *E. coli*, se utilizó el protocolo descrito anteriormente en la sección 4.11.2, excepto que se usaron los productos de la reacción LR en vez del producto de la reacción BP. Después de la transformación de las bacterias, cajas Petri con medio LB, agar y 100 μ L de espectinomicina fueron rociadas con 50 μ L y 200 μ L de las bacterias transformadas.

4.12 Transformación de *A. tumefaciens*

Se preparó un cultivo de *A. tumefaciens* LB 4404 en 5 mL de medio líquido LB con 50 μ g $\cdot$ mL⁻¹ rifampicina y 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹ estreptomicina a 28°C con agitación constante a 200 rpm durante 24 horas. Cuando el Densidad óptica (OD_{600nm}) se encontró entre 0.5-1 unidades, el cultivo fue enfriado en hielo y centrifugado por 6 min a 3000 rpm y 4°C. El medio líquido fue desechado y la pastilla fue suspendida en 300 μ L de CaCl₂ 20 mM frío y estéril. Esta suspensión bacterial fue distribuida en tubos Eppendorf® previamente enfriados como alícuotas de 100 μ L. A cada tubo, se le agregaron 2 μ g del ADN plásmido. Los tubos fueron congelados por 1 minuto en nitrógeno líquido y descongelados posteriormente por incubación en un baño de agua a 37 °C por 4 min. Después, se agregó 1 mL de medio LB a cada tubo e incubado a 28°C por 4 horas con agitación a 200 rpm. Los tubos fueron centrifugados por 30 segundos a 13,000 rpm. La pastilla fue re-suspendida en 200 μ L de medio LB y las bacterias fueron rociadas en medio LB sólido con los siguientes antibióticos: espectinomicina 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹, rifampicina 50 μ g $\cdot$ mL⁻¹ y estreptomicina 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹.

4.13 Transformación estable de células T-BY2

- Pre-cultivo de *A.tumefaciens*: Dos mL of *A. tumefaciens* (transformadas con el vector recombinante pK7WG2D, 1) fueron pre-cultivadas en medio YEB con rifampicina a 100 μ g $\cdot$ μ L⁻¹, estreptomicina a 50 μ g $\cdot$ μ L⁻¹ y espectinomicina a 5.0 μ g $\cdot$ μ L⁻¹ e incubadas 24 horas a 28 °C con agitación constante a 200 rpm.

- Lectura OD: Después de la incubación, la lectura de OD_{600nm} fue hecha. El Pre-cultivo de *A. tumefaciens* fue centrifugado por 10 min a 3000 rpm y la pastilla fue re-suspendida a fin de obtener una relación de OD₆₀₀ de 0.8/1.
- Co-cultivo de *A.tumefaciens*: Sobre 3 cajas Petri con medio LS, 4 mL de suspensión T-BY2 y 50, 100 y 200 µL del pre-cultivo de *A. tumefaciens* fueron agregados y fermentados por 2 días sin presencia de luz a 28 °C.
- Lavados celulares: El co-cultivo fue recuperado, suspendido en medio T-BY2 y centrifugado por 10 min a 1500 rpm en un tubo Falcon. El sobrenadante fue desechado y la pastilla fue suspendida con 50 µL del medio T-BY2. Dos lavados de las células fueron realizados en las mismas. Después de los lavados, las pastillas fueron re-suspendidas en 5 mL de medio T-BY2 con carbenicilina (500 µg·mL⁻¹).
- Cultivo de células: Uno y 2 mL de células fueron rociadas en dos platos Petri con medio T-BY2 y 2 antibióticos carbecilina (500 µg·mL⁻¹) y kanamicina (100 µg·mL⁻¹) y fermentados durante 2 días a 28 °C en la oscuridad.

La presencia del vector en las células transformadas de T-BY2, se revisara mediante el análisis de microscopía por fluorescencia invertida utilizando el microscopio Nikon eclipse, TE2000-S (Universal Imaging Corporation Ltd, Marlow, Buckinghamshire, Reino Unido), en donde se pretende visualizar la bioluminiscencia emitida en el espectro verde visible de la proteína de fluorescencia (GFP). Esto es debido a que las secuencias de ADN codificadas para el GFP se pueden manipular recombinando la tecnología ADN para crear fusiones de genes entre el GFP y la proteína de interés. Tales construcciones de ADN se han inducido en las células de T-BY2 para producir la marcación del GFP fluorescente en la proteína.

4.14 Producción de la proteína *At1g28290* PAC con la etiqueta V5/6His en bacteria de acuerdo al protocolo HisLink™

Se utilizó el vector pBAD TOPO® (ref: K430040 Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA, USA) para inducción de la producción de la proteína *At1g28290* PAC con la etiqueta V5/6His en la cepa Top 10® *E. coli*. Las concentraciones finales de arabinosa

usadas para la inducción de acuerdo al protocolo de HisLink™ (part no. TM280, Promega Corporation, Madison, WI, EUA) fueron: 0.2%, 0.02%, 0.002%, 0.0002% ó 0.00002%, a una temperatura de 37°C y con un tiempo de incubación de 4 horas. El control negativo fue realizado con una muestra sin arabinosa.

4.15 Purificación de la proteína recombinante *At1g28290* PAC con la etiqueta V5/6His por el sistema HisLink™ Spin Protein Purification

Se utilizó para la purificación de proteínas expresadas en las cepas Top 10® Chemically Competent *E-coli*, HisLink™ Spin Protein Purification System (part no. TM281, Promega Corporation, Madison, WI, EUA). El principio de este sistema es que la proteína puede estar directamente purificada del medio de cultivo que contiene las células bacteriales las cuales expresan la proteína que contiene la polihistidina. Las células bacteriales pueden ser lisadas usando FastBreak™ Cell Lysis Reagent, seguido esto inmediatamente de la adición de la resina HisLink™ Protein Purification Resin al cultivo. La adición de este regente resulta en la simultánea lisis bacteriana, así como también en la unión de la polihistidina de la proteína. Las muestras son transferidas a la columna HisLink™ Spin donde las proteínas que no se unen a la columna son eliminadas y las proteínas fijadas son recuperadas por elución. Este método permite la purificación de proteínas recombinadas a partir de muestras de 700 µL de células *E. coli*. Las instrucciones del fabricante fueron seguidas en este proceso.

4.16 Separación de proteínas por SDS-PAGE y Western blotting

Las proteínas colectadas a diferentes pasos del proceso de purificación descrito anteriormente fueron analizadas por electroforesis de acuerdo a Laemmli, (1970). Se utilizaron geles- SDS de Poliacrilamida. Se realizó el *Western blotting* por el método de tanque de transferencia utilizando Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell. (Bio-Rad Laboratories, 1000 Alfred Nobel Drive Hercules, CA 94547, EUA); en el cual una membrana PVDF (0.2 µm, Schleicher & Schüll, Dassel, Alemania) fue primeramente inmersa en etanol puro, lavada dos veces con agua UHQ y equilibrada con un amortiguador de transferencia frío previamente preparado (0.025M Tris, 0.192M glicina). Las almohadillas de fibra y el papel filtro Whatman® 3 MM también fueron inmersos en el

amortiguador de transferencia frío. Del cátodo hacia el ánodo, el orden fue: almohadillas de fibra, 2 bloques de papel filtro Whatman® 3MM, gel, membrana PVDF, 2 bloques de papel filtro Whatman® 3MM . Cuando el *cassette* estaba completo, fue insertado en el tanque junto con un cubo de hielo, y el tanque fue completamente llenado con el amortiguador de transferencia frío. La transferencia se llevo a cabo en un cuarto frío a un voltaje constante de 75 V durante 2 horas 15 minutos.

El bloqueo de los sitios de unión no específicos fue logrado colocando la membrana en una solución diluida de leche libre de grasa al 10% (w/v) diluida con una solución con TBST 1x (Tris 2 mM, NaCl 15 mM, Tween 20 0.05% (v/v) por 1 hora bajo agitación.

Para la detección, se añadieron 2 μ L anticuerpos monoclonal en contra del epítipo V5, dichos anticuerpos fueron diluidos 10,000 veces (ref: R-960-25, Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA, EUA) en solución TBST 1x con BSA 1% (w/v) y 200 μ L NaN_3 2% por 2 membranas. La incubación con los anticuerpos primarios fue realizada durante 24 h a 4°C.

La incubación con los anticuerpos secundarios Anti-Mouse IgG HRP (ref: R-960-50, Invitrogen, Carlsbad, San Diego, CA, EUA) fue realizada por 3 horas a temperatura ambiente. La composición de la solución fue la misma que la utilizada en los anticuerpos primarios.

La detección colorimétrica fue utiliza para el análisis de la membrana con un sustrato de la enzima reportada que se une con los anticuerpos secundarios. La composición de la solución del sustrato fue la siguiente: NBT (ref: S380, Promega, Hollow Road Madison, WI, EUA) 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en DHF 70% (v/v), 66 μ L de BCIP (ref: S381, Promega, Hollow Road Madison, WI, EUA) 25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 132 μ L of DMF 100% (v/v) y TBS 1x pH 9.5 usado para alcanzar un volumen de 20 mL (preparación para 2 membranas).

Capítulo 5. Resultados y discusiones

5.1 Obtención de la secuencia de ADN complementaria

A fin de caracterizar la estructura de la *O*-glicoproteína codificada por *At1g28290*, se decidió producir la proteína completa, así como también versiones incompletas en cultivos de suspensiones celulares de tabaco. Estas construcciones fueron obtenidas usando secuencias de ADN complementarias como matrices:

Como primera aproximación se pensó en utilizar el plásmido *pda19846* para obtener los fragmentos de ADN de interés, es decir que, se pudiese realizar a partir de este, las construcciones requeridas para una transformación estable de plantas y bacterias. Sin embargo, una previa secuenciación reveló que este plásmido corresponde a un ADNc en cuya secuencia no se encuentra el dominio repetitivo rico en prolina. Por esto, fue necesario, obtener otra matriz como base para producir la proteína completa así como una de sus versiones incompletas que cubra el dominio repetitivo rico en prolina remanente. Por tanto, la estrategia inicial tuvo que ser modificada.

El plásmido *pda19846* de *Riken BioResource Center* que contiene el ADNc correspondiente al gen *At1g28290* fue usado como matriz para la construcción del dominio PAC con o sin la señal péptida. Sin embargo, debido a que el ADNc contiene una supresión en su secuencia codificante localizada en el dominio rico en prolina, no fue posible usar dicho vector para obtener la secuencia completa de la proteína.

Un ADNc completo fue obtenido por transcripción reversa y reacción de polimerización en cadena (RT-PCR) usando RNAs total de 11-días de hipocótilos etiolados de *A. thaliana* (ver apartado 4.5), con esto se solucionó el problema de obtener el resto de las construcciones funcionales requeridas para el trabajo, sin la supresión de la secuencia que contenía la prolina.

5.2 Obtención de construcciones funcionales en células transgénicas de tabaco

5.2.1 Amplificación de los fragmentos de ADN de interés por PCR

Usando los oligonucleótidos iniciadores específicos para la secuencia *At1g28290* (Tabla 3.1), 3 fragmentos de ADN fueron amplificados por PCR. Estos fragmentos se describen a continuación:

5.2.1.1 *At1g28290c* y *At1g28290c*-PAC

At1g28290c y *At1g28290c*-PAC fueron amplificados usando como matriz ADNc completo obtenido por RT-PCR descrito en 5.1.

La amplificación por PCR usando el catalizador biológico *Pfu Ultra*TM II Fusion HS ADN Polimerasa® (ver apartado 4.6.1) y los oligonucleótidos iniciadores descritos en la tabla 3.1, el ADN fue separado exitosamente por electroforesis en gel de agarosa (1%) y revelado con bromuro de etidio. El marcador de ADN se muestra al lado izquierdo de los geles.

Los parámetros se presentaron en la tabla 4.1.

Los resultados arrojaron el tamaño esperado de los fragmentos de ADN como se sigue a continuación, dichos fragmentos fueron previamente calculados por el software *Basic Local Alignment Search Tool*® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

- *At1g28290c* (secuencia completa), con un tamaño de 1077 pb, utilizando los oligonucleótidos S1 y AS1 (Figura 5.1 A).
- *At1g28290c*-PAC (secuencia completa menos el dominio PAC), con un tamaño de 672 pb, usando los oligonucleótidos S1 y AS2 (Figura 5.1 B).

El tamaño esperado fue previamente calculado, con ello se demuestra que el usar como matriz el RNA de 11 días de hipocótilos etiolados funciona para el caso de tener secuencias con suficiente cantidad de prolina, durante el proceso

RT-PCR no se presentó ningún problema, lo que hacer suponer que el sistema es estable.

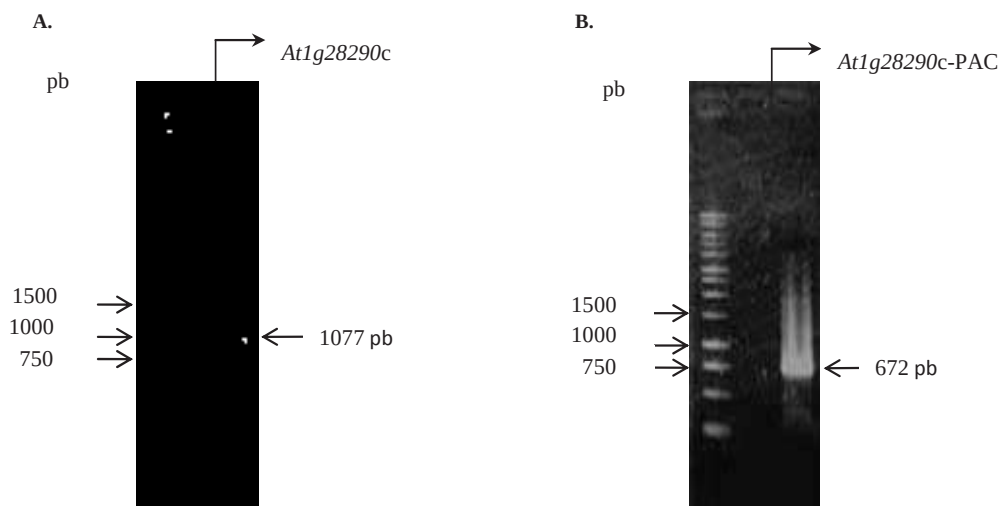


Figura 5.1. Amplificación por PCR de los fragmentos de ADN correspondientes a las secuencias *At1g28290c* y *At1g28290c-PAC*.

5.2.1.2 Amplificación por PCR de *At1g28290ps*+PAC

La secuencia *At1g28290ps*+PAC fue amplificada usando el plásmido *pda19846* como matriz, y el catalizador *Pfu Ultra*TM II Fusion HS DNA Polimerasa® (ver apartado 5.6.1); así como, los oligonucleótidos iniciadores descritos en la tabla 1. Los parámetros del PCR son mostrados en la tabla 4.1E, el marcador de ADN se muestra al lado izquierdo de los geles.

Se diseñó a fin de obtener los fragmentos de ADN con la secuencia de la señal péptida y PAC juntas, una estrategia de amplificación en 3 pasos (Figura 5.2 C1-3):

1. Amplificación por PCR de la secuencia de la señal péptida (*At1g28290ps*) usando S1 y AS3 como oligonucleótidos iniciadores (Figura 5.2 A) con un tamaño de 77 pb.

2. Amplificación por PCR de la secuencia PAC (*At1g28290ps*), usando S3 and AS1 como oligonucleótidos iniciadores (Figura 5.2 A) con un tamaño de 405 pb.
3. Fusión de fragmentos de ADN obtenidos en los pasos 1 y 2 (Figura 5.2 B).

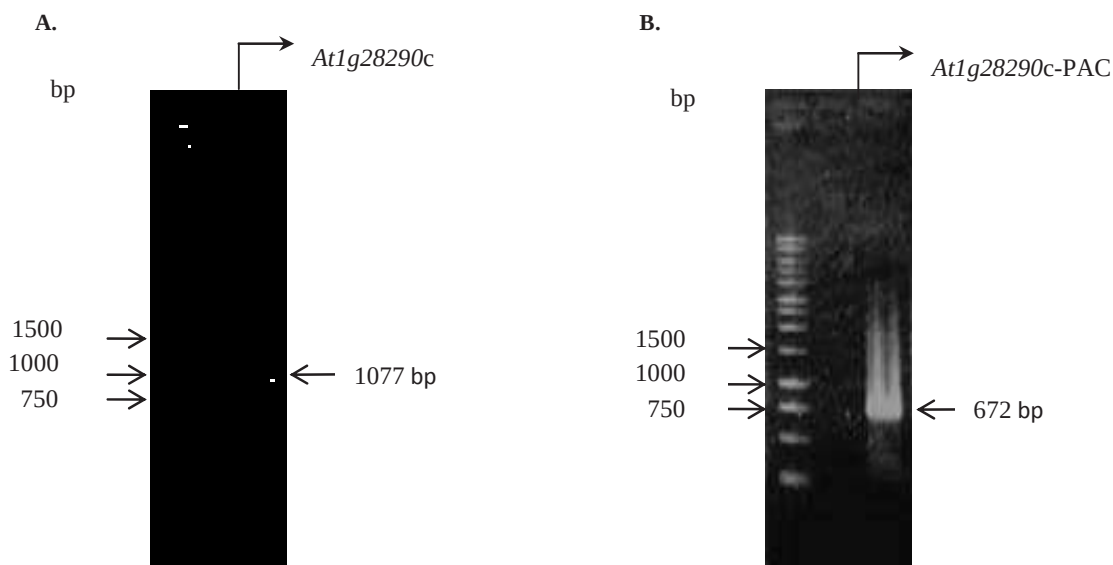


Figura 5.2. Amplificación por PCR de los fragmentos de ADN correspondientes a las secuencias *At1g28290ps*+PAC.

Los tamaños esperados de los fragmentos de ADN fueron obtenidos en cada paso. Finalmente el fragmento de ADN *At1g28290ps*+PAC fue obtenido con un tamaño de 477 pb usando el diseño de amplificación con los oligonucleótidos iniciadores adecuados, se presentaron dificultades durante la obtención de esta última construcción, ya que se diseñaron diversas estrategias para poder obtenerla debido a que es complicado lograr la unión de dos secuencias que se encuentran en los extremos de la proteína, esto porque es factible la presencia de contaminaciones; sin embargo esta estrategia utilizada asegura exitosamente la unión y amplificación de la señal péptida y el dominio PAC.

5.2.2 Clonación en el vector pBAD TOPO®

Se clonaron los fragmentos obtenidos por PCR en el vector pBAD-TOPO® a fin de producir las proteínas etiquetadas con el epítipo V5 y la etiqueta 6His. La

selección de los clones recombinantes de cada fragmento de ADN de interés se realizó con gentamicina como antibiótico.

Se revisó la presencia de los fragmentos apropiados de ADN por amplificación por PCR con los específicos iniciadores usando la polimerasa *Taq* DNA:

✚ Para *At1g28290c/V5/6His*, se realizaron dos selecciones: clones 1B a 5B con los oligonucleótidos iniciadores S1 y AS1, el 80% de los insertos mostraron el tamaño esperado; clones 6B a 25B con S1 y pBAD *reverse* como oligonucleótidos iniciadores en el que el 10% de los insertos mostraron también el tamaño deseado.

✚ Para *At1g28290c-PAC/V5/6His*, dos selecciones fueron realizadas: clones 1C a 5C con los oligonucleótidos iniciadores S1 and AS2, con un 100% de inserción, mostraron los tamaños esperados; clones 6C a 35C con los oligonucleótidos iniciadores pBAD *forward* and AS2 en los cuales ninguno mostró el tamaño esperado.

✚ Para *At1g28290ps+PAC/V5/6His*, selección de los clones 1D a 5D con los oligonucleótidos iniciadores S1 y AS1, con el 10% de los insertos mostraron el tamaño deseado.

Finalmente, los clones secuenciados usando los oligonucleótidos iniciadores pBAD-TOPO® *forward* and *reverse*.

Después de esta segunda selección, los resultados fueron:

- ✚ Para *At1g28290c/V5/6His*, clon 16B fue el correcto (Figura 5.3 A) con el tamaño esperado de 1257pb.
- ✚ Para *At1g28290ps+PAC/V5/6His*, el clon 5D fue el correcto (Figura 5.3 B) con el tamaño esperado de 852 pb.
- ✚ Para *At1g28290c-PAC/V5/6His*, ningún clon correcto fue obtenido, ya que los clones exhibían el inserto de ADN pero en la orientación opuesta o correspondiente a otro fragmento de ADN, los cuales eran parte de ADNc de *At5g20250* (Figura 5.3 C).

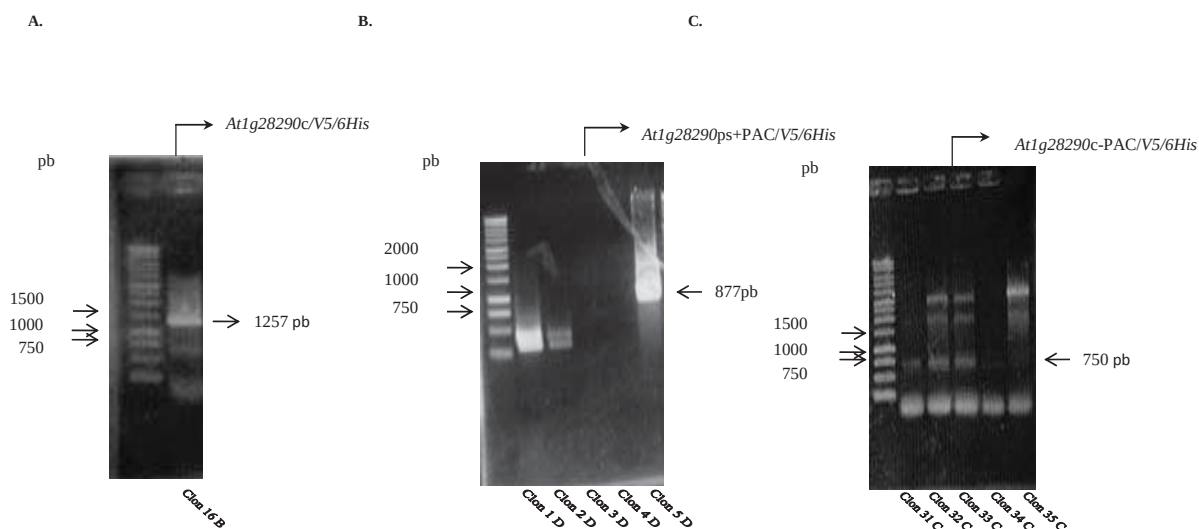


Figura 5.3. PCR de selección de los clones pBAD-TOPO.

Fueron encontradas tres diferentes clases de problemas durante el proceso de clonación en el vector pBAD-TOPO®: (1) El vector pBAD-TOPO® no permite seleccionar la orientación de la inserción de los fragmentos ya que la linearización del vector exhibe la presencia de desoxitiamida en cada extremo que pueden ser ligados con cualquiera de las desoxyadeninas presentes en cada extremo de los fragmentos de ADN de interés a ser clonados. En cualquiera de los casos, la mitad de los clones pudieran contener el inserto del fragmento en la orientación opuesta. (2) La secuencia que codifica a *At1g28290* comprende un dominio repetitivo rico en prolina, el cual es codificado por una secuencia repetitiva de ADN, la cual puede provocar recombinaciones no deseadas en *E. coli* [Guzzardi y col., 2004]. Tales eventos de recombinación pueden resultar en obtener fragmentos más pequeños que los esperados. Esto ocurrió en el caso de las construcciones: *At1g28290c/V5/6His* y *At1g28290c-PAC/V5/6His*. (3) Cuando los fragmentos de ADN de interés son obtenidos con RT-PCR a partir de ADNc, existe un riesgo de contaminación del fragmento durante la amplificación. Esto sucedió con la construcción *At1g28290c-PAC/V5/6His* debido a que se clonó un fragmento perteneciente al ADNc de *At5g20250*. Para resolver los primeros problemas, los clones correctos fueron seleccionados después de una amplificación por PCR con los específicos oligonucleótidos iniciadores. Solo el último problema no pudo resolverse. La clonación de *At1g28290c-PAC/V5/6His* debe de realizarse de nuevo para obtener el

inserto correcto en la orientación correcta. Esto puede ser logrado empezando de la construcción *At1g28290c/V5/6His*.

5.2.3 Clonación Gateway®

En cuanto a los resultados de la clonación, los sitios *attB* se agregaron exitosamente, así como las secuencias de la translación inicial usando los oligonucleótidos iniciadores internos de Gateway® *internal oligonucleotide primers* (Tabla 3.2) y los oligonucleótidos iniciadores (Tabla 3.3). Los productos del PCR (*At1g28290c/V5/6His* y *At1g28290ps+PAC/V5/6His*) fueron revisados por electroforesis en gel de agarosa. Cada uno de estos productos fue exitosamente extraído del gel, purificado y verificado por electroforesis. Se realizó la adición de los sitios *attB* y las secuencias de translación inicial en dos pasos, el primero es mostrado en la figura 5.4 A donde la secuencia de *At1g28290c/V5/6His* con una parte de los sitios de *attB1* y *attB2* fue obtenida con el tamaño esperado de 1191 pb y en la figura 5.4 B para *At1g28290ps+PAC/V5/6His* la secuencia con una parte de los sitios *attB1* y *attB2* fue obtenida con el tamaño de 591 pb. El segundo paso es mostrado en la figura 5.5, la secuencia *At1g28290c/V5/6His* con los sitios completos *attB* fue obtenida con el tamaño esperado de 1240 pb donde se agregó completamente el sitio *attB*, en la figura 5.5 B la secuencia *At1g28290ps+PAC/V5/6His* con los sitios completos *attB* fue obtenida con el tamaño esperado de 690 pb.

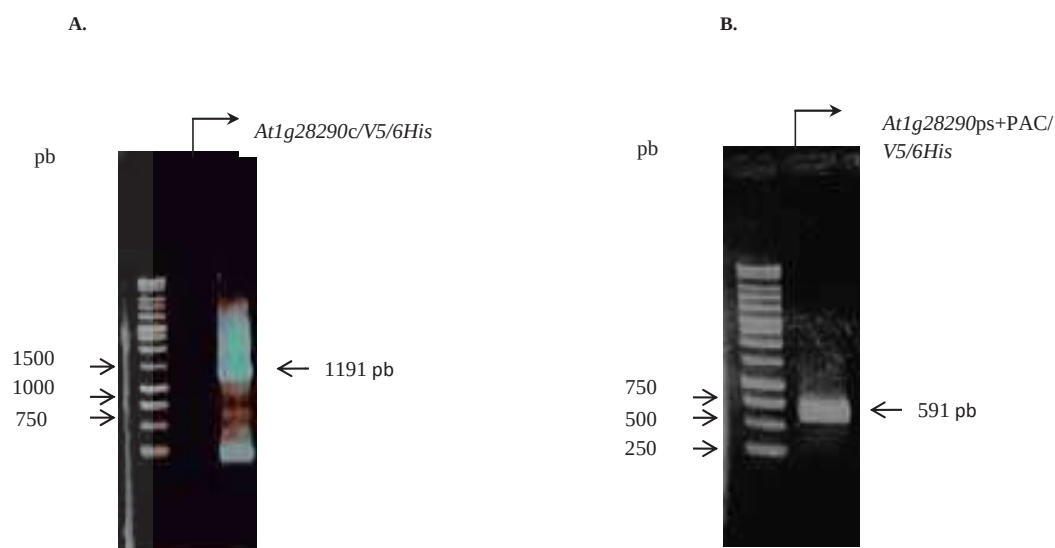


Figura 5.4. Amplificación por PCR de *At1g28290c/V5/6His* y *At1g28290ps+PAC/V5/6His*.

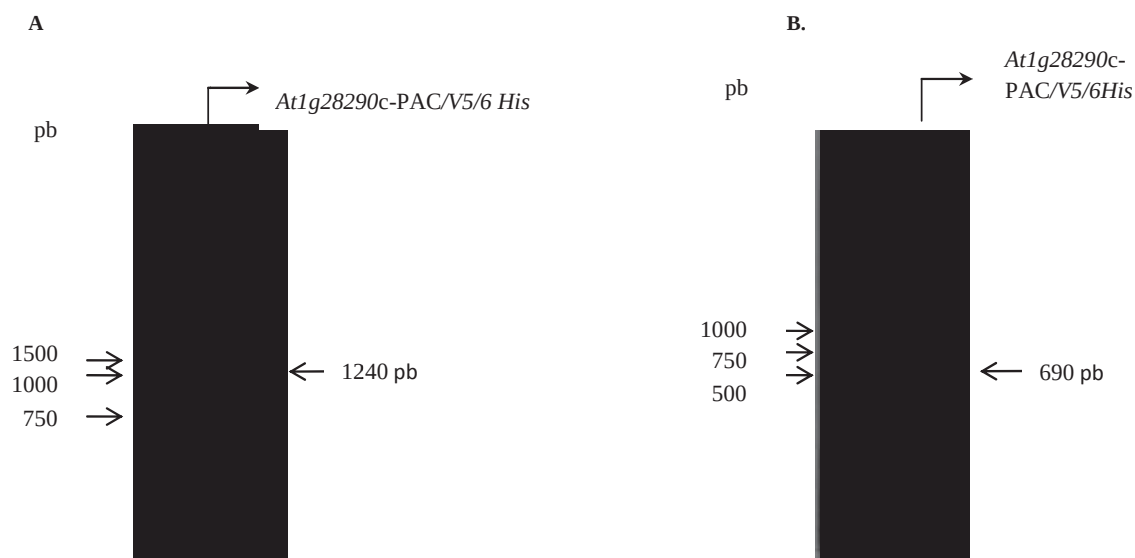


Figura 5.5. Amplificación por PCR de *At1g28290c/V5/6His* y *At1g28290ps+PAC/V5/6His*.

Después, estos fragmentos de ADN de interés se indujeron en el vector pDONR-207 gracias a la reacción BP. Esta manipulación se siguió exitosamente por la transformación de las cepas de la bacteria Efficiency™ DH5α™ Chemically

Competent E. coli con el producto BP a fin de obtener los clones entrantes. De aproximadamente 100 colonias obtenidas, 5 se seleccionaron y se revisó la presencia de los fragmentos de ADN de interés por amplificación por PCR usando los oligonucleótidos iniciadores pDONR *forward* y *reverse* así como también, el catalizador *Taq* polimerasa (Figura 5.6). Todos estos clones fueron positivos presentando el tamaño deseado de 1464 pb (Figura 5.6 A) para *At1g28290c/V5/6His* y de 860 pb para *At1g28290ps+PAC/V5/6His* (Figura 5.6 B). La reacción de secuenciación fue realizada a fin de completar la primera selección. Un clon fue seleccionado después de que el análisis muestra similitud en la secuencia de nucleótidos y la secuencia original del cDNA: clon 2H para *At1g28290c/V5/6His* y el clon 1F para *At1g28290ps+PAC/V5/6His*.

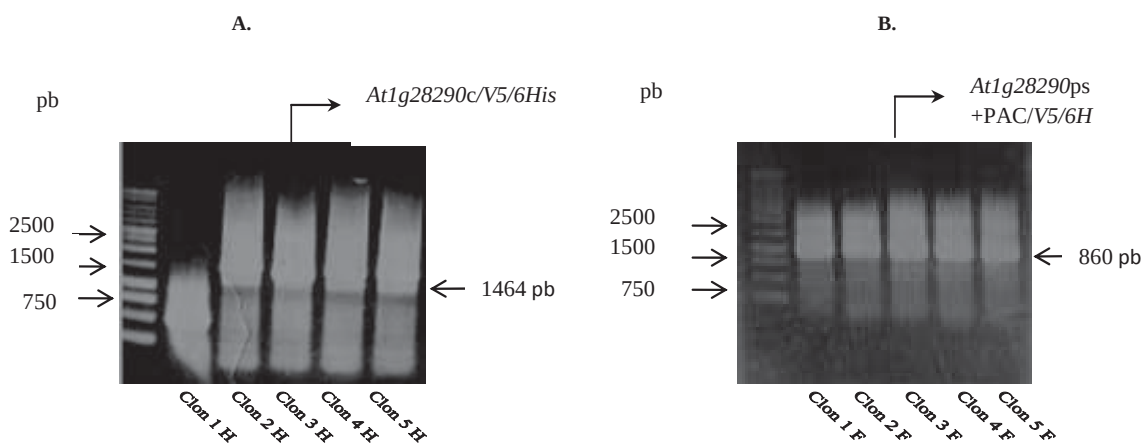


Figura 5.6. PCR de amplificación y selección después de la reacción BP.

Los plásmidos recombinados con el fragmento de ADN de interés se purificaron. Después se transfirieron al vector destino (pK7WG2D, 1) a fin de obtener el vector expresión.

Los resultados de la transformación de las bacterias Efficiency™ DH5α™ Chemically Competent *E. coli* con el producto de la reacción LR. Un PCR de selección y control fue hecho en 5 clones de cada secuencia codificada, se presentan en la figura 5.6, donde se puede mostrar que posiblemente estos clones contienen

nuestro fragmento de ADN de interés. Después, a estos 5 clones se les realizó la secuenciación. Los resultados mostraron que el 40% de estos clones eran interpretables ya que tenían el tamaño esperado de 1239 pb, seleccionándose entonces el clon 1G correspondiente a *At1g28290ps+PAC/V5/6His* (Figura 5.7B). Por otro lado, 20% de los clones fueron interpretables (tamaño esperado de 591 pb) para el caso de *At1g28290c/V5/6His*, el clon 4I fue seleccionado (Figura 5.7 A).

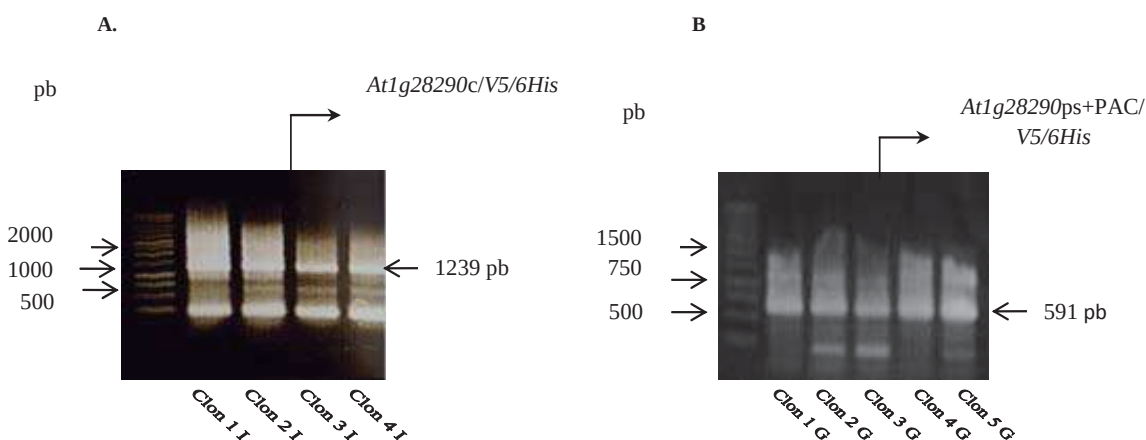


Figura 5.7. PCR de amplificación y selección después de la reacción LR.

En el sistema Gateway®, todos los clones recombinados obtenidos después de las reacciones BP fueron positivos para ambas construcciones funcionales debido a que: (i) La clonación se realizó por recombinación; y (ii) las posiciones de los sitios *attB*, y su secuencia inicial de translación aseguraban la correcta orientación de los fragmentos de ADN de interés. Sin embargo, después de la transformación de la bacteria con la reacción LR requerida para la clonación de *At1g28290c/V5/6His*, cuatro diferentes clones recombinantes contenían una omisión en sus secuencias. Como se mencionó anteriormente, este tipo de fenómenos ocurre debido a que este fragmento de ADN contiene una secuencia repetitiva rica en prolina, que causa de recombinaciones intramoleculares entre secuencias homólogas de ADN en *E. coli*. Sin embargo, en el caso de *At1g28290ps+PAC/V5/6His* todos los clones obtenidos después de la reacción LR fueron positivos, ya que esta construcción no presenta la secuencia repetitiva rica en prolina evitando la presencia de recombinaciones

intermoleculares. El uso de este sistema asegura exitosamente el proceso de transformación de los fragmentos de ADN de interés, aunque exista la presencia de reacciones intermoleculares.

5.2.4 Transformación de *A. tumefaciens*

La cepa LBA 4404 fue transformada con el plásmido 1G (*At1g28290ps*+PAC/V5/6His) y 4I (*At1g28290c*/V5/6His), seleccionándose estas con el antibiótico espectinomicina. Los clones transformados por *A. tumefaciens* fueron seleccionados por PCR y los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa, encontrándose que todos los insertos contenían el tamaño esperado (Figura 5.8). Dos clones fueron seleccionados ya que contienen el tamaño deseado que corresponde al fragmento de ADN de interés: 4I.1 para *At1g28290c*/V5/6His, con un tamaño de 1239 pb (Figura 5.8 A) y 1G.1 para *At1g28290ps*+PAC/V5/6His con un tamaño de 602 pb (Figura 5.8 B).

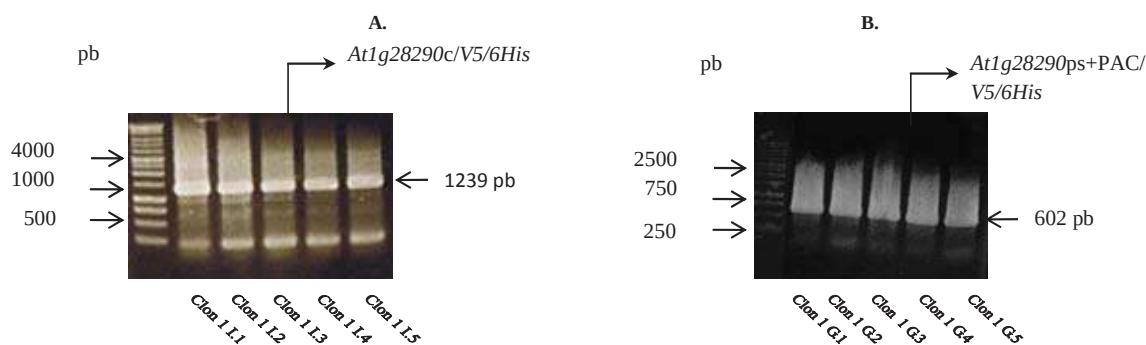


Figura 5.8. PCR de amplificación y selección después de la transformación de *A. tumefaciens*.

La transformación de *A. tumefaciens* fue lograda exitosamente, encontrando que todos los clones tienen integrados el plásmido correcto: *At1g28290c*/V5/6His y *At1g28290ps*+PAC/V5/6His, por tanto la eficiencia de la transformación fue del 100%. Las construcciones funcionales han sido utilizadas para la transformación estable de células de tabaco.

5.2.5 Transformación estable de células de *Nicotiana tabacum* Bright yellow 2 (TBY-2)

Dicha transformación fue realizada con las siguientes construcciones:

CaMV 35S promotor::*At1g28290c/V5/6His*

CaMV 35S promotor::*At1g28290ps+PAC/V5/6His*.

Las células fueron colocadas en presencia de kanamicina y carbencilina.

Después de 48 horas de transformación estable de T-BY2, las líneas producidas para el caso de la proteína *At1g28290/6His/V5*, se analizaron por medio del microscopio de fluorescencia invertida Nikon eclipse, TE2000-S a una longitud de onda entre los 495-570 nm (espectro verde visible), mostrando que la construcción diseñada para esta proteína se pudo producir en las células de tabaco, debido a que contienen fusionado el gen que expresa a la proteína de fluorescencia y que produce bioluminiscencia a esta longitud de onda (Figura 5.9 B), esta misma construcción fue probada en la longitud de onda 380 nm, observándose que dicha emisión es por el gen GFP y no por otro factor siendo este el control positivo de que la construcción ha funcionado (Figura 5.9 C). En la figura 5.9 A se muestra el control negativo de células de T-BY2 sin transformar analizadas en el espectro verde visible, percibiéndose la ausencia de GFP.

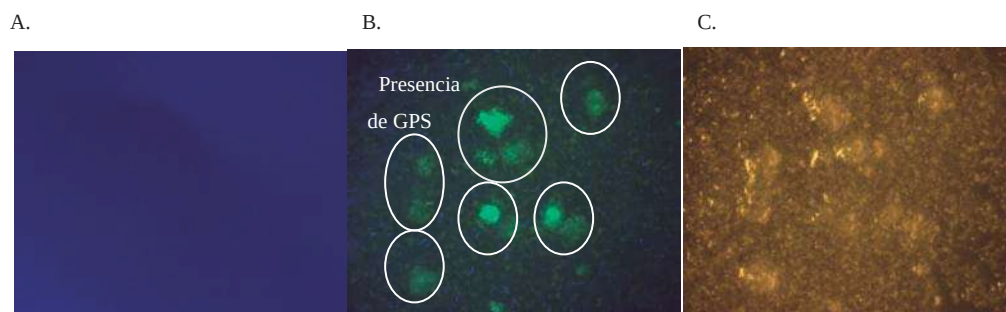


Figura 5.9. Análisis de microscopía por fluorescencia invertida después de la transformación estable de células de T-BY2 de la proteína *At1g28290 c/6His/V5*.

La transformación de T-BY2 se pudo lograr en el caso de la construcción funcional *At1g28290c/V5/6His*, debido a que en la figura 5.9 se muestra la presencia del fragmento de ADN de interés en grandes cantidades, sin presencia de contaminaciones, en este punto se puede asegurar que la metodología seguida ofreció resultados para este caso.

5.3 Obtención una construcción funcional en bacteria

Utilizando los oligonucleótidos iniciadores específicos para la secuencia *At1g28290PAC* (Tabla 3.1), el fragmento de ADN se amplificó usando el plásmido *pda 19846* como matriz. La amplificación por PCR se realizó con el catalizador *Pfu Ultra™ II Fusion HS DNA Polymerase®* (ver en apartado 4.6.1). Los parámetros para PCR se presentan en la tabla 4.1 D. Se obtuvieron los fragmentos de ADN del tamaño esperado de 405 pb (Figura 5.10).

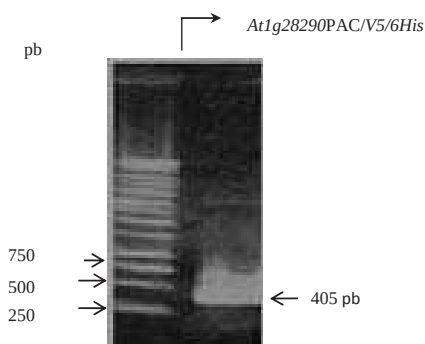


Figura 5.10. PCR de amplificación de los fragmentos de ADN de *At1g28290PAC*.

5.3.2 Clonación en el vector pBAD-TOPO®.

Se utilizó el sistema pBAD TOPO® TA *expression* Kit (ver apartado en 4.9) para la clonación dirigida. Se realizó la transformación de Top 10® *Chemically Competent E. coli* con la mezcla reaccionante de pBAD TOPO cloning y se realizó la selección de los clones recombinantes usando ampicilina.

Utilizando la amplificación por PCR, el catalizador *Taq* DNA polymerase®, y los oligonucleótidos iniciadores apropiados (ver apartado 4.10), se revisó la presencia de las secuencias codificadas esperadas en los 5 clones obtenidos después de la transformación (Figura 5.11). El PCR de selección se ejecutó usando los oligonucleótidos iniciadores S2 y AS1, en los clones 1E a 5E no mostraron ningún resultado positivo. Para los clones 6E a 25 E se usaron los oligonucleótidos iniciadores pBAD *forward* y AS1, el 50% de los clones fue positivo. También la reacción de secuenciación fue realizada en 5 clones seleccionados después del PCR, en donde el resultado fue un clon positivo: clon 13 E, que contó con el tamaño esperado de 750 pb. Los otros clones carecieron de fragmento de ADN de interés esto es debido a que con el uso de oligonucleótidos se pueden amplificar otros fragmentos de ADN de interés los cuales no son deseados y en la reacción de competición presentada durante la ligación de los fragmentos en el vector el ADN indeseado se combina con el vector dejando fuera los fragmentos de nuestro interés.

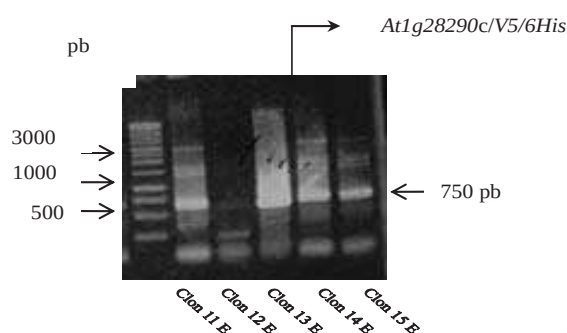


Figura 5.11. PCR de selección en los clones pBAD-TOPO.

5.3.3 Producción de proteínas en bacterias

Para la inducción de la producción de la proteína codificada por *At1g28290PAC/V5/6His* en *E. coli*, se probaron diferentes concentraciones de arabinosa como lo marca el protocolo HisLink™ (ver apartado 4.14) del sistema. Las condiciones probadas fueron inducción con 0.2%, 0.002%, 0.0002%, 0.00002% de L

(-) arabinosa durante 4 horas a 37°C. Las condiciones seleccionadas encontradas, después de la inducción fueron: 0.002% of L(-) arabinosa inducida a 37°C por 4 horas. Esta proteína puede ser purificada por la unión de la polihistidina con la resina del kit (HisLink™, ver apartado 4.15). Después de la purificación, dos productos fueron obtenidos: una fracción diluida la cual contiene proteínas soluble que han sido unidas a la resina y una fracción no diluida la cual contiene a la proteína como cuerpo oclusado, los componentes celulares y las proteínas solubles que no se unieron a la resina. Después de la purificación, las proteínas recolectadas fueron sujetas al SDS-PAGE y al *Western blotting* utilizando los apropiados anticuerpos contra el epítipo V5 fusionado con la proteína recombinante y el anticuerpo secundario, anti-ratón vinculado con la fosfatasa alcalina, y el marcador proteico Eurodemex Preistaided; la masa molecular se muestra en la parte izquierda de la membrana (Figura 5.12). Las proteínas de interés se encontraron distribuidas como cuerpos oclusados (fracción no diluida) como lo muestra la figura 5.12 A, y en la fracción soluble, es decir retenidas en la columna de afinidad (Figura 5.12 B).

Cabe mencionar que todos los clones, aproximadamente 750, obtenidos desde el inicio de la metodología hasta este punto no se presentan.

Finalmente, los resultados mostraron que alrededor del 90% de la proteína no se unió a la columna de afinidad del sistema de purificación de proteínas (HisLink™). Esto puede ocurrir debido a que la proteína se presenta en mayor cantidad como cuerpos oclusados. Otra posible explicación es la creación de puentes disulfuro en el dominio PAC por la presencia de las 6 cisteínas residuales, pudiendo reducir la eficiencia del proceso de unión de la polihistidina a la columna de afinidad, disminuyendo también la calidad de la proteína que puede ser obtenida de la fracción soluble. Por tanto, diferentes soluciones amortiguadoras están siendo probadas para determinar las interacciones e incrementar la eficiencia de la purificación.

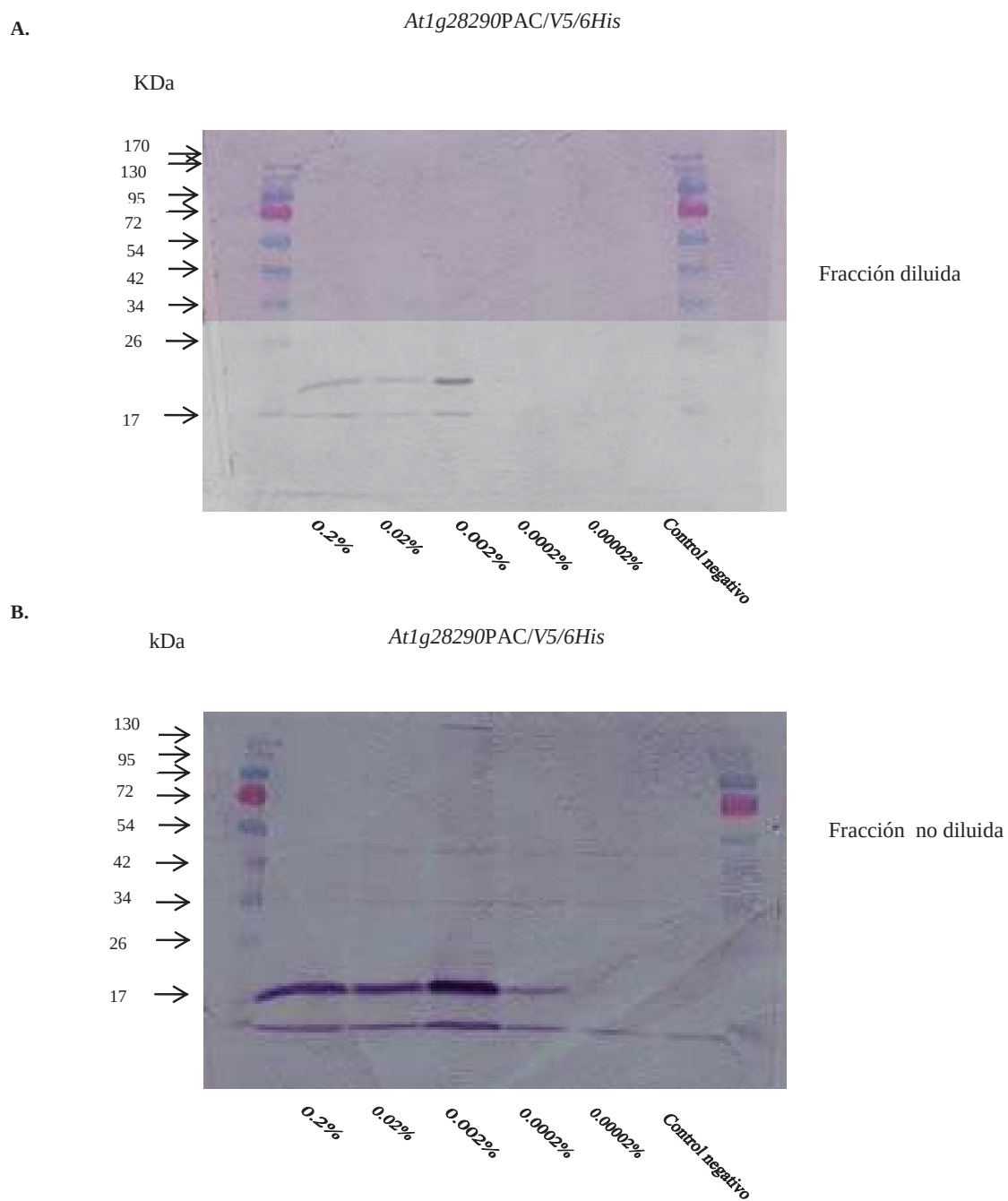


Figura 5.12. Detección de las proteínas *At1g28290 PAC/V5/6His* en bacteria por *Western Blot*.

Capítulo 6. Conclusiones

Mediante las técnicas de biología molecular como amplificaciones por PCR, secuenciaciones y ligaciones por reacciones topoisomerasa dirigidas fue posible obtener un DNAC completo el cual cubre toda la secuencia codificada por el gen *At1g28290*, permitiendo con esto producir todas las secuencias planeadas: *At1g28290c*, *At1g28290c-PAC*, *At1g2829ps+PAC* y *At1g28290PAC*, las cuales se utilizaron en el presente trabajo.

Las reacciones catalíticas definidas por el sistema pBAD TOPO®, y las fermentaciones realizadas de las bacterias *E. coli*, permitieron lograr la clonación de las construcciones requeridas para la producción de la proteína en las suspensiones de cultivos celulares de tabaco de manera exitosa: *At1g28290c/V5/6His*, *At1g28290ps+PAC/V5/6His* y *At1g28290PAC/V5/6His* seleccionándose en la primera construcción el clon 16B, para la segunda construcción antes mencionada el clon 5D, y en la tercera construcción el clon 13E respectivamente. Para *At1g28290c-PAC/V5/6His*, ningún clon correcto fue obtenido, debido a posibles contaminaciones, la utilización de la construcción funcional completa obtenida en esta etapa se está utilizando actualmente para poder producir dicha construcción.

Las Cepas de *A. tumefaciens* producidas que contienen el plásmido permitieron la producción de la proteína completa y el dominio PAC, dichas cepas fueron verificadas por medio de un PCR de control y una secuenciación completa de los clones seleccionados que en cada caso fueron 4I.1 y 1G.1, después de la transformación; lo que confirmo la presencia del plásmido dentro de las células obtenidas.

Las transformaciones de las suspensiones de cultivos celulares de plantas de tabaco realizadas, mostraron que las suspensiones de cultivos celulares de T-BY2 contienen el vector que permitirá la producción de la proteína *At1g28290c/6His/V5* en un mayor volumen para estudios futuros, sin embargo para el caso de la proteína *At1g28290ps+PAC/6His/V5*, el resultado de la transformación en las suspensiones de los cultivos celulares de plantas de tabaco se encuentra en desarrollo.

Las construcciones requeridas para la expresión del dominio PAC en fusión con la etiqueta 6His y el epítipo V5 en bacteria fueron producidas mediante el sistema pBAD TOPO®, utilizándose de todos los clones obtenidos, el clon 13E. De acuerdo al protocolo HisLink™ a una temperatura de 37°C y a un tiempo de incubación de 4 horas se encontraron las condiciones de producción de proteínas para diferentes concentraciones de inducción de arabinosa, obteniéndose en este estudio preliminar, que la concentración de arabinosa que induce la mayor expresión de proteína es de 0.002%.

Por tanto, se cumplieron los objetivos propuesto dentro del presente estudio.

Bibliografía

Basic Local Alignment Search Tool®, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (2008).

Borderies, G., Jamet, E., Lafitte, C., Rossignol, M., Jauneau, A., Esquerré-Tugayé, M.-T., Pont-Lezica, R. Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: A critical analysis. *Electrophoresis* **24**, 3421-3432 (2003).

Carpita, N. C., Gibeaut, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* **3**, 1-30 (1993).

Cassab, G. I., Varner, J. E. Cell wall proteins. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **39**, 321-353 (1998).

Cosgrove, D. J. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 171-201 (1997).

Cosgrove, D. J. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 391-417 (1999).

Cosgrove, D. J. Growth of the plant cell wall. *Nature Rev Mol Cell Biol* **6**, 850-860 (2005).

Day, B. Graham, T. The plant host pathogen interface: cell wall and membrane dynamics of pathogen-induced responses. *Ann N Y Acad Sci* **1113**, 123-134 (2007).

Feiz, L., Irshad, M., Pont-Lezica, R. F., Canut, Jamet, E. Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Methods* **2**, 10 (2006).

Fry, S.C., Smith, R.C., Renwick, K.F., Martin, D. J., Hodge, S.K., Matthews, K.J. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem J* **282**, 821-828 (1992).

Guzzardi, P., Genot, G., Jamet, E. The *Nicotiana sylvestris* extensin gene, Ext 1.2A, is expressed in the root transition zone and upon wounding. *Biochim Biophys Acta* **1680**, 83-92. (2004).

Hellwing, S., Drossard, J., Twyman, M., Fischer, R. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins, *Nature Rev Gen*, **22**, 1415-1422 (2004).

Invitrogen., [www. invitrogen.com/site/us/en/home.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html)

Irshad, M., Canut, H., Borderies, G., Pont-Lezica, R., Jamet, E. A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*, confirmed across and newcomers. *BMC Plant Biology* **8**: 94 (2008).

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1989).

Liu, C., Mehdy, M. C. A Nonclassical arabinogalactan protein gene highly expressed in vascular tissues, AGP31, is transcriptionally repressed by methyl jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **145**, 863-874 (2007).

Lloyd, C., Chan, J. Microtubules and the shape of plants to come. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 13-23 (2004).

Lloyd, D., Ray, P. M. Molecular size and separability Features of pea cell wall polysaccharides: Implications for models of primary wall structure. *Plant Physiol* **98**, 357-368 (1992).

Manicard, G., CGIAR and the private sector: Public good versus proprietary technology in agricultura research, *Biotechnology and Development Monitor*, **37**, 8-13 (1999).

Mee-Jung, H; Sang, Y. L. The *Escherichia coli* Proteome: Past, Present, and Future Prospects. *Microbiology and Mol. Biol. Rev* **70**, 362-439 (2006).

RIKEN BioResource Center., www.brc.riken.jp/inf/en/index.html

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory (1989).

Sasson, A., Biotechnologies in developing countries: present and future. *Regional and national survey* **1**, 764 (2004).

Showalter, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* **5**, 9-23 (1993).

Sticklen, M. Plant genetic engineering for biofuel production: Towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Rev Gen* **9**,433-444 (2008).

Tierney, M. L., Varner, J. E. The extensins. *Plant Physiol* **84**, 1-2 (1987).

Thomson, J. E. & Fry, S.C. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acid pectins in suspension-cultured rose cells. *Plant. J* **211**, 275-286 (2000).

van Hengel, A. J., Roberts, K. AtAGP30, an arabinogalactan-protein in the cell walls of the primary root, plays a role in root regeneration and seed germination. *Plant J.* **36**, 256-270 (2003).

Vincken, J. P., Schols, H. A., Oomen, R. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G., Visser, R. G. Homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol* **132**, 1781-1789 (2003).

Vorwerk, S., Somerville, S., Somerville, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci* **4**, 203-209 (2004).

Willats, W.G., McCartney, L., Mackie, W., Knox, J. P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* **47**, 9-27 (2001).