



Tesina para optar por el grado de Licenciado en
Ciencias Biológicas.

Producción de una proteína de papa en un
sistema de expresión en levaduras.

Bruno Rafael Mozzo Muhlethaler.

Tutor: Dr. Marcos Montesano.

Facultad de Ciencias
Universidad de la República
Uruguay.

○ Resumen.

Las plantas en el entorno natural se enfrentan constantemente a amenazas de diferente naturaleza. Entre ellas se encuentran las enfermedades causadas por microorganismos patógenos como bacterias, hongos y virus. Las plantas han desarrollado complejos mecanismos moleculares y sistemas de defensa que le permiten combatirlos y evitar las enfermedades. Por su parte los microorganismos patógenos han desarrollado diferentes estrategias para sobrepasar o evadir las defensas de las plantas.

Las interacciones planta-patógeno cobran especial importancia cuando el consumo humano puede verse afectado por las mismas. Las enfermedades en plantas generan grandes pérdidas económicas, por lo que es de suma importancia el conocimiento de los mecanismos de defensa vegetal y un entendimiento completo acerca de las interacciones entre planta-patógeno a nivel molecular.

En el presente trabajo, se expresó una proteína de papa (*Solanum tuberosum*) denominada *dru13* (*defense related UDP glicosil-transferase*). Investigaciones anteriores sugirieron que esta proteína podría tener un rol importante en la defensa de la planta de papa frente al patógeno bacteriano *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*. Se realizó una construcción génica clonando la secuencia codificante de *dru13* en el vector de expresión PYES2, se transformó una cepa de levadura con dicha construcción y se expresó la proteína *dru13* de forma soluble en dicho hospedero, lo que podría permitir en un futuro cercano la determinación de la función precisa de la proteína. Este resultado abre las puertas a nuevas investigaciones, las cuales permitirán dilucidar la participación de *dru13* en la respuesta defensiva de la planta de papa.

○ Índice.

-Resumen.....	1.
-Índice.....	2.
-Abreviaciones.....	3.
-Introducción.....	4.
Interacciones planta-patógeno.....	4.
Evasión de la respuesta de defensa por parte del patógeno.....	8.
Inmunidad inducida por efector.....	9.
Respuestas de defensa.....	10.
Respuestas sistémicas.....	12.
UDP-glicosiltransferasas.....	14.
La papa.....	19.
<i>Pectobacterium sp.</i>	20.
-Resultados previos (no publicados).....	23.
-Objetivo general.....	24.
Objetivos específicos.....	24.
-Resultados y discusión.....	24.
Construcción de <i>dru13</i> -PYES2.....	24.
Transformación de <i>E. coli</i> con <i>dru13</i> -PYES2 y análisis de la construcción.....	27.
Transformación de levaduras con <i>dru13</i> -PYES2 y análisis.....	29.
Expresión proteica en levaduras.....	29.
Detección de DRU13 mediante <i>western blot</i>	32.
-Conclusiones finales.....	34.
-Materiales y métodos.....	35.
Cepas utilizadas en el estudio.....	35.
Cultivo de bacterias y levaduras.....	35.
Gliceroles de bacterias y levaduras.....	36.
Aislamiento de ADN plasmídico bacteriano.....	36.
Medición de la concentración de ADN.....	37.
PCR.....	37.
Purificación de los productos de PCR.....	38.
Electroforesis en geles de agarosa.....	39.
Extracción de bandas en geles de agarosa.....	39.
Análisis de ADN mediante ensayos con enzimas de restricción.....	40.
Ligaciones de las secuencias de ADN para las construcciones.....	40.
Transformación genética de bacterias.....	41.
Secuenciación de ADN.....	41.
Transformación genética de levaduras.....	42.
Aislamiento de ADN plasmídico de levaduras.....	42.
Inducción proteica en levaduras.....	43.
Lisis de levaduras y preparación de muestras proteicas.....	44.
Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE.....	44.
Purificación proteica por medio de columnas de NiNTA.....	45.
Protocolo de <i>western blot</i>	46.
-Bibliografía.....	48.

○ Abreviaciones.

-ABA.....	Ácido absísico.
-cDNA.....	ADN codificante.
-CF.....	Filtrado de cultivo.
-DAMPs.....	Patrones moleculares asociados al peligro.
-DON.....	Deoxinivalenol.
- <i>dru13</i>	Glicosiltransferasa relacionada con la defensa 13.
-ET.....	Etileno.
-ETI.....	Inmunidad inducida por efector.
-ETS.....	Susceptibilidad inducida por efector.
-hpi.....	Horas post inducción.
-HR.....	Respuesta hipersensible.
-IRH.....	Inmunidad inducida por herbívoros.
-ISR.....	Resistencia sistémica inducida.
-JA.....	Ácido jasmónico.
-LB.....	Luria Bertani.
-LRR.....	Repetidos ricos en leucina.
-LZ.....	Cremallera de leucina.
-MAPKs.....	Proteínas quinasas activadas por mitógenos.
-MAMPs.....	Patrones moleculares asociados al microbio.
-NBS.....	Sitio de unión a nucleótido.
-NO.....	Óxido nítrico.
-PAMPs.....	Patrones moleculares asociados a patógenos.
- <i>Pcc</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subs. <i>Carotovorum</i> .
-PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa.
-PCWDE.....	Enzimas degradadoras de la pared celular de las plantas.
-PR.....	Relacionadas con la patogenicidad.
-PRR.....	Receptor de reconocimiento de patrones.
-PSPG.....	Motivo glicosiltransferasa de productos secundarios de la planta.
-PTI.....	Inmunidad inducida por PAMP.
-RLKs.....	Receptores tipo quinasas.
-RLP.....	Receptores tipo proteínas.
-ROS.....	Especies reactivas del oxígeno.
-SA.....	Ácido salicílico.
-SAR.....	Resistencia sistémica adquirida.
-SC-URA.....	Medio sintético completo sin uracilo.
-UGTs.....	UDP glicosiltransferasas.
-wt.....	Tipo salvaje.
-YP.....	Medio con extracto de levadura y peptona.
-YPD.....	Medio con extracto de levadura, peptona y dextrosa.

○ **Introducción.**

Interacciones planta-Patógeno.

Las plantas deben convivir con una variedad de organismos, los cuales pueden ser benéficos, neutrales o patógenos. Cuando las plantas perciben alguna amenaza, se inician inmediatamente mecanismos de señalización para manifestar respuestas defensivas. Una vez que se establece la interacción entre una planta y un patógeno, el resultado de la misma puede ser la resistencia por parte de la planta o al desarrollo de la enfermedad.

Las enfermedades que afectan a las plantas generan grandes pérdidas económicas, que obligan en algunos casos a la utilización de pesticidas y productos químicos que generan riesgos para el ambiente y la salud humana. Se han descrito aproximadamente unas 11.000 enfermedades en plantas, las cuales son causadas por cerca de 120 géneros de hongos, 30 tipos de virus y 8 géneros de bacterias (Montesinos et al., 2002). Las pérdidas en la producción mundial de cultivos alimenticios causadas por patógenos, resultan muy difíciles de calcular (Agrios, 2005).

Respecto a los patógenos, éstos pueden clasificarse en necrótrofos, biótropos y hemibiótropos, según su ciclo de vida. Dentro de los patógenos necrótrofos se encuentran aquellos en donde la célula de la planta muere a causa de la infección, y los mismos se alimentan de los restos de tejidos muertos. Generalmente liberan enzimas que degradan la pared celular vegetal y maceran los tejidos (Veronese et al., 2006). Contrariamente, los patógenos biótropos son aquellos en donde la célula de la planta permanece viva durante la infección y generalmente no producen daño extensivo en ellas. Finalmente, los patógenos hemibiótropos, son aquellos que en estadios tempranos de la infección se comportan como biotrofos y en estadios tardíos como necrótrofos (Ballaré 2011; Ponce de León y Montesano 2013).

Las respuestas de defensa vegetal pueden ser controladas directa o indirectamente por genes de la planta hospedera y por la interacción con el patógeno. Por tanto, la resistencia frente a los mismos puede ser clasificada según el número de genes involucrados en resistencia monogénica o de gen R (gen de resistencia), que involucra uno o pocos genes; y resistencia poligénica que generalmente es controlada por muchos más genes, varios de ellos importantes fisiológicamente para la planta (Agrios 2005).

Para explicar la interacción entre plantas y patógenos Harold Flor propuso el modelo gen-para-gen, el cual comprende el reconocimiento de una proteína codificada por un gen de avirulencia dominante (gen Avr) del patógeno, por una proteína complementaria codificada por un gen dominante de resistencia vegetal (R) (Flor 1971). Cuando uno de los genes Avr o el complementario gen R no se expresan, el reconocimiento por parte de la planta no ocurre, la interacción planta patógeno es compatible y la enfermedad suele ser el resultado. Cuando ambos actores están presentes, Avr y proteína complementaria R, el reconocimiento ocurre resultando en una interacción incompatible y la resistencia por parte de la planta es el resultado. (Flor 1971; Heil and Bostock 2002). Luego del mencionado reconocimiento, se desencadena una cascada de transducción de señales que conduce al establecimiento de respuestas de defensa de la planta (Staskawicz et al., 1995; Ballaré 2011; Ponce de León y Montesano 2013).

Las proteínas codificadas por los genes R podrían actuar como receptores directos o indirectos de las proteínas Avr (Staskawicz et al. 1995, Belkhadir 2004). Los genes R y homólogos generalmente se clasifican en cinco clases, según motivos estructurales comunes (Martin et al, 2003): i) genes que codifican para proteínas con sitios de unión a nucleótidos (NBS), ii) proteínas serina/treonina quinasa, iii) proteínas con dominio de interacción proteica con repetidos ricos en leucina (LRR) el cual podría participar en el reconocimiento y señalización del ataque del patógeno, iv) genes con homología amino-terminal a genes tipo Toll y receptores de interleuquina 1 (TIR: Toll/IL-1R-like) y v) proteínas con domino cremallera de leucina (LZ).

La respuesta inmune de la planta puede desencadenarse mediante el reconocimiento de ciertos patrones moleculares: i) propios del patógeno como los PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) por ejemplo la flagelina y factores de elongación bacteriano Ef-Tu, ii) patrones propios del microbio como los MAMPs (*Microbe Associated Molecular Patterns*) por ejemplo lipopolisacáridos bacterianos y quitina fúngica, y iii) patrones producto del daño tisular que la planta libera por la acción del patógeno como los DAMPs (*Danger Associated Molecular Patterns*) por ejemplo algunos galacturónidos y la sistemina del tomate (van Loon et al., 2006; Holton et al., 2007, Tor et al., 2009; Ferrari et al., 2013). Habitualmente estos patrones moleculares son llamados elicitores. Se define como elicitador todo aquel compuesto capaz de inducir una respuesta de defensa en la planta. Los elicitores son característicos de microorganismos patogénicos y pueden clasificarse en dos grupos, elicitores generales y elicitores “raza específicos” (Montesano et al., 2003; He et al., 2007).

Los mecanismos de defensa desarrollados por las plantas frente a patógenos combinan variadas estrategias, las cuales pueden clasificarse en los siguientes grandes grupos: *defensas constitutivas* y *defensas inducibles*.

Las *defensas constitutivas* involucran barreras estructurales y químicas preexistentes en la planta siendo la primer defensa con la que se encuentra el patógeno antes de invadir la misma (Agrios 2005). En general, las plantas cuentan con barreras fisicoquímicas para impedir dichas invasiones. La pared celular a la cual el patógeno debe adherirse y penetrar para causar la infección es uno de los primeros obstáculos. Sobre la misma se encuentran otras estructuras defensivas para evitar la infección. Estas estructuras comprenden la cantidad y calidad de la cera y de la cutícula que recubren las células epidérmicas vegetales. Las mismas forman una capa hidrofóbica, constituyendo a su vez una barrera física contra el organismo invasor (Agrios, 2005).

Por otra parte, las plantas producen constitutivamente una serie de metabolitos secundarios, muchos de los cuales pueden actuar como componentes antimicrobianos. Tal es el caso de las saponinas que son moléculas alcaloides glicosiladas con actividad antifúngica. Por otro lado, en los tejidos jóvenes de frutas, hojas y semillas, se encuentran a altas concentraciones, compuestos fenólicos, taninos y algunos compuestos grasos involucrados con la resistencia vegetal a microorganismos patogénicos (Agrios, 2005).

Las *defensas inducibles* son aquellas que se generan una vez que el patógeno ha sido percibido por la planta. Estas pueden ser divididas en las siguientes ramas: inmunidad inducida por PAMPs o MAMPs (*PAMP Triggered Immunity*, PTI) e inmunidad inducida por efector, o ETI (*Effector Triggered Immunity*, ETI) (Jones & Dangl, 2006).

La primer línea de respuesta inmune de la planta, PTI, es inducida luego de la percepción y el reconocimiento de patógenos a través de PAMPs o MAMPs y DAMPs (van Loon et al., 2006). Los PAMPs son reconocidos, a través de epítopes conservados específicos presentes en los mismos, por receptores de reconocimiento de patrones (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs) en la superficie celular vegetal. Dichos dominios altamente conservados de los PAMPs son funcionalmente importantes para el patógeno (Boller y He, 2009).

El genoma vegetal codifica varios tipos de receptores de PAMPs, MAMPs y DAMPs, los cuales han sido clasificados en base a sus características estructurales en diferentes categorías, incluyendo los receptores tipo quinasa (RLK) y receptores tipo

proteína (RLP). Todos los RLKs vegetales relacionados con la percepción de elicitores son serina/treonina quinasas y pueden ser clasificados en diferentes categorías de acuerdo a las características estructurales de los dominios extracelulares. Estas categorías son: (1) Xa21 de arroz y SR160 de tomate, contienen dominios ricos en leucina o LRRs y el último es un importante receptor de DAMPs, (2) *AthLecRK1* de *Arabidopsis*, contiene motivos tipo lectina, (3) PR5K de *Arabidopsis*, exhibe similitud a proteínas tipo thauamatina, (4) CHRK1 de tabaco, exhibe similitud a proteínas tipo quitinasa, (5) WAK1 de *Arabidopsis*, contiene repetidos tipo EGF (*epidermal growth factor*), (6) LRK10 de trigo, no posee homología con motivos conocidos y (7) StPRKs de papa, presentan un nuevo motivo bimodular de cisteínas (Montesano et al., 2003; Tor et al., 2009; Monaghan y Zipfel 2012). Otros receptores de PAMPs para ciertas proteínas fúngicas y fragmentos de quitina, han sido identificados como receptores de superficie celular sin dominio quinasa, estos son los denominados RLPs, compuestos solo por un dominio extracelular anclado a membrana plasmática. Existen varios ejemplos de esta clase de receptores, entre ellos uno denominado LeEix de la planta de tomate que reconoce al PAMP fúngico glucídico xilanasa (Ron & Avni, 2004).

La activación de los receptores por PAMPs converge en un limitado número de vías de señalización que están asociadas a respuestas de defensa tales como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO) y cambios en los niveles de Ca²⁺ que, en su conjunto, promueven la expresión de genes relacionados con la defensa, producción de fitoalexinas, deposición de calosa en la pared celular y eventualmente una rápida muerte celular programada localizada conocida como respuesta hipersensible (HR) (Chisholm et al., 2006; He et al.2007).

La principal vía de señalización y la más conservada evolutivamente es la cascada de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) la cual es capaz de traducir estímulos provenientes de señales extracelulares en respuestas intracelulares (He et al.2007). Un simple esquema de cómo se relaciona esta vía con los PAMPs se presenta en la figura 1.

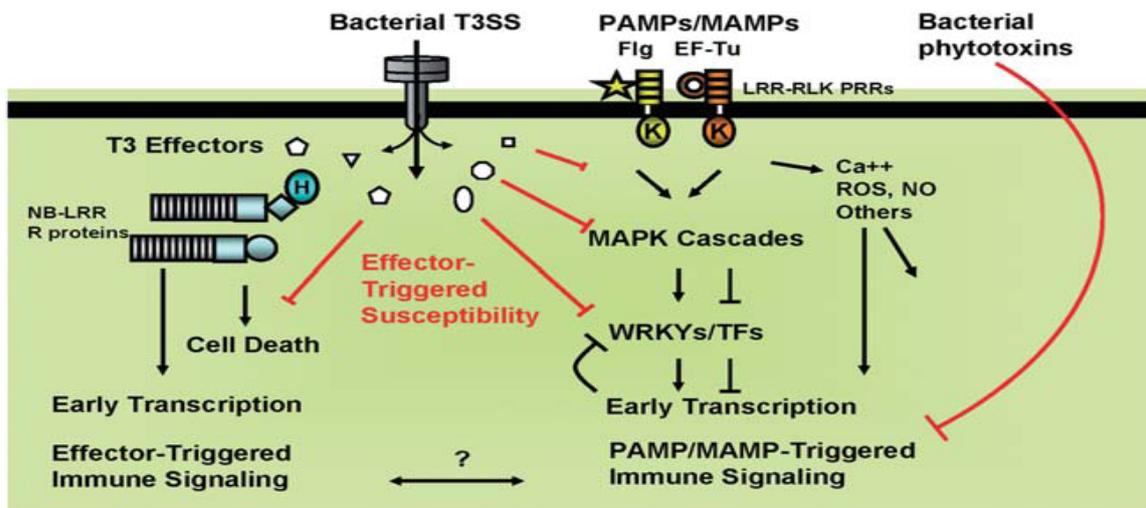


Figura 1. Esquema general de interacciones planta-patógeno. La planta reconoce los PAMPs a través de receptores presentes en la superficie celular y es activada la primera línea de respuesta de defensa (PTI). La señalización de la respuesta defensiva disparada es convergente e incluye la activación de la cascada de MAPKs y la transcripción temprana de genes de defensa. Otros eventos de señalización tempranos son los cambios en los niveles de calcio y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de óxido nítrico (NO). En caso de no eliminar al patógeno con la PTI, se expresan proteínas intracelulares de resistencia para poder detectar los factores específicos de virulencia del patógeno, y se pone en funcionamiento la segunda línea de defensa denominada inmunidad inducida por efector, ETI (tomado de He et al., 2007)

Evasión de la respuesta de defensa por parte del patógeno.

Muchos patógenos han desarrollado mecanismos mediante los cuales son capaces de evadir o suprimir activamente las respuesta de defensa primaria generadas por el reconocimiento de los PAMPs (Chisholm et al. 2006). Las bacterias fitopatógenas contienen 4 sistemas de secreción, siendo el sistema de secreción tipo III (T3SS) el más estudiado. A través del TTSS la bacteria inyecta múltiples proteínas efectoras (hasta 30 efectores al mismo tiempo) dentro del citoplasma de la célula vegetal (Jones & Dangl. 2006). Los efectores son proteínas producidas por el patógeno que alteran a la célula vegetal o su ambiente, causando enfermedad o disparando la defensa (He et al., 2009). Estos entran directamente al citoplasma de la célula hospedera y tienen como blanco diferentes procesos celulares. Muchas proteínas Avr son efectores de tipo III; AvrPto y

AvrPtoB de *P. syringae* pv. *tomato* han sido identificados como potentes supresores de PTI inhibiendo pasos tempranos en la célula vegetal previos a la cascada de MAPK (He et al. 2007) (fig. 1). Otra estrategia que han desarrollado las bacterias fitopatógenas es la producción de moléculas efectoras pequeñas que imitan hormonas vegetales. Por ejemplo, en *P. syringae*, algunas cepas de esta bacteria producen coronatina, un compuesto químico relacionado estructuralmente al ácido jasmónico y que dispara los mismos procesos celulares suprimiendo la defensa mediada por ácido salicílico frente a patógenos biótropos y estimulando la apertura de estomas para permitir que las bacterias ganen acceso al apoplasto (Agrios, 2005; Pieterse et al., 2012).

Inmunidad vegetal inducida por efector.

Una vez liberados los efectores dentro de la célula, los mismos son reconocidos por proteínas R activando la segunda línea de defensa conocida como ETI (inmunidad inducida por efector). La respuesta de la ETI es muy similar a la generada en inmunidad inducida por PAMPs (PTI) pero con mayor intensidad y en algunos casos se observa una respuesta de muerte celular programada (HR) en el sitio de infección (Boller y He, 2009). La respuesta hipersensible es localizada y se piensa que restringe el crecimiento y diseminación del patógeno (Cullis, 2004). La ETI como segundo frente de defensa, es capaz de percibir los efectores que inhiben la PTI a través de receptores adicionales (Boller y He, 2009).

La respuesta inmune de la planta puede ser representado por el modelo “zigzag” propuesto por Jones & Dangl (2006) (Figura 2). Este modelo esta dividido en cuatro fases. En la fase 1, los PAMPs son reconocidos por PRRs resultando en PTI, la cual puede evitar futuras infecciones. En fase 2, patógenos exitosos confieren efectores que contribuyen con su virulencia y pueden interferir con la PTI. Esto resulta en una susceptibilidad inducida por efector (ETS). En la fase 3, un efector específico es reconocido por una proteína NB-LRR resultando en la ETI. La ETI resulta en la resistencia a la enfermedad y frecuentemente en una HR en el sitio de infección. Por último, en fase 4, la selección natural lleva al patógeno a desarrollar nuevas estrategias para evitar la ETI, ya sea excluyendo o diversificando el gen efector reconocido o adquiriendo nuevos efectores que suprimen ETI.

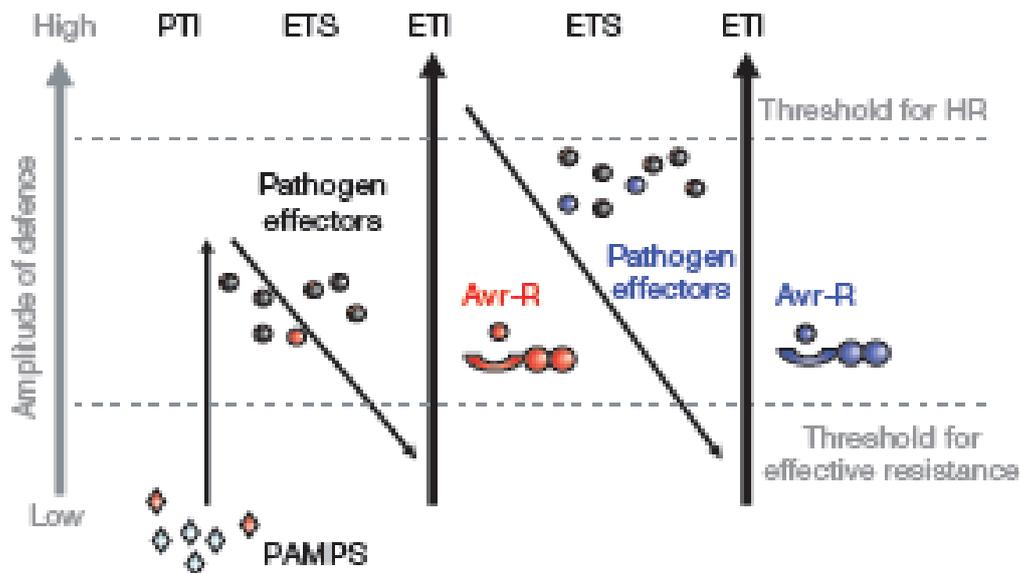


Figura 2. Ilustración de modelo “zigzag”. Se muestra el rendimiento cuantitativo de la respuesta inmune de la planta, en donde la amplitud de la resistencia o de la susceptibilidad es proporcional a (PTI-ETS+ETI) (Jones & Dangl, 2006).

Principales mecanismos de defensa vegetal.

Luego del reconocimiento del patógeno por parte de la planta, se activan diferentes respuestas vegetales para contener al patógeno, algunas de ellas involucran importantes cambios fisiológicos. Una de las respuestas más tempranas frente a dicho reconocimiento es un cambio en la permeabilidad de la membrana lo que lleva a cambios en los flujos iónicos como ser en el intercambio K^+/H^+ , eflujo de Cl^- y un importante influjo de Ca^{2+} , siendo este último un segundo mensajero clave para numerosos cambios fisiológicos y procesos celulares (White and Broadley, 2003; Jeworutzi et al., 2010). El flujo de iones lleva muchas veces a la alcalinización del medio extracelular (Agrios 2005).

También de manera temprana, los perfiles de expresión génica cambian, se acumulan compuestos antimicrobianos como las fitoalexinas y se producen ROS y NO. Estos contribuyen a la defensa por poseer acción antimicrobiana, contribuir en el reforzamiento de la pared celular así como también participar en vías de señalamiento para el caso de ROS y por ser mensajero secundario en el caso del NO (Wojtaszek 1997; Torres et al., 2006; Bolwell y Daudi 2009). En etapas tempranas de la respuesta de defensa se producen cambios en los patrones de fosforilación de las proteínas así como la activación de cascadas MAPK (He et al., 2007). Tardíamente se expresan las

proteínas de patogenicidad (PRs) las cuales poseen bajo peso molecular con probado efecto deletéreo sobre los patógenos, algunas con actividad glucanasa o quitinasa (capaces de hidrolizar paredes de bacterias y hongos respectivamente). Han sido clasificadas en 17 familias diferentes, aunque no se conoce en profundidad las funciones de algunas. Se pueden encontrar tanto en el apoplasto como en las vacuolas. Aparecen en respuestas locales y sistémicas y su producción aumenta mucho con la HR (Cohn et al., 2001; Heil y Bostock, 2002; Edreva 2005; van Loon et al., 2006). Las respuestas locales son aquellas que ocurren o se encuentran restringidas al sitio de infección. Por su parte las respuestas sistémicas ocurren en toda la planta y dependen de señales que parten desde el sitio de infección y llegan a todas las regiones de la planta. Dichas señales inducen la activación de la respuesta sistémica.

Las plantas producen un gran número de hormonas las cuales participan en diversos procesos celulares como ser el desarrollo y crecimiento, así como en la respuesta de defensa frente a la infección con microorganismos patógenos. En particular, el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA), el etileno (ET) así como el ácido abscísico (ABA) son hormonas que juegan un rol muy importante en la defensa de la planta contra diversos patógenos (Mauch-Mani y Mauch 2005; Pieterse et al., 2012).

El SA es acumulado en el sitio de infección, y participa en procesos de señalamiento que desencadenan respuestas de defensa locales así como también sistémicas, observándose un aumento de la expresión en un gran número de proteínas PR entre ellas PR1, PR2 y PR5 (Thomma 1998). El SA es de gran importancia en el establecimiento de SAR (Resistencia Sistémica Adquirida) y su aumento en los tejidos vegetales responde generalmente al ataque por patógenos biótropos y hemibiótropos (van Hulten et al., 2006; Bolwell et al., 2009).

El aumento de JA y ET responde al ataque por patógenos necrótrofos e insectos herbívoros; y muchas veces cuando se produce acumulación de JA también se observa acumulación de ET, por lo que a veces se dice que el tipo de respuesta generada es JA/ET dependiente. Una consecuencia de la acumulación de las hormonas JA/ET es la inducción en la expresión de proteínas PR antimicrobianas como PR3, PR4 y defensina PDF 1.2 (Thomma 1998). Las vías de señalamiento del JA son generalmente antagónicas a la vía del SA aunque en algunos casos, por ejemplo ante el ataque de *P.syringae* a *A.thaliana*, ambas vías actúan y se cree que mejoran la resistencia frente a dicho patógeno (Pieterse et al., 2012).

La hormona ABA también participa en la resistencia a enfermedades, y su función depende directamente del tipo de interacción establecido entre planta-patógeno. Altos niveles de ABA aumentan la susceptibilidad de plantas de *Arabidopsis* frente a la infección por patógenos biótrofos y hemibiótrofos, mientras que niveles inferiores a los encontrados en plantas wt (tipo salvaje) aumentan la resistencia a la infección por parte de patógenos necrótrofos (Mauch-Mani y Mach 2005). Esta hormona además puede tener un efecto inhibitorio sobre la vía del SA y favorece el establecimiento de la vía del JA en contra de un ataque de herbívoro (Pieterse et al., 2012).

Respuestas sistémicas.

Luego de que la planta reconoce al patógeno y se desencadenan respuestas inducibles, la planta es capaz de enviar una señal al resto de los órganos que no han sido invadidos y desencadenarse una respuesta a lo largo de toda la planta, de amplio espectro y duración. Existen dos tipos definidos: la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducible (ISR).

El fenómeno de HR en el sitio de infección promueve la posterior aparición de la SAR en toda la planta, la cual se caracteriza por ser de larga duración (desde días hasta meses dependiendo del patógeno) e inespecífica ya que proporciona resistencia a un amplio rango de patógenos (Ryals et al. 1996; Torres et al., 2006). Una característica importante de la SAR es la acumulación del ácido salicílico en las células, el cual actúa como molécula señal, así como también la activación de genes específicos a esta respuesta (genes SAR) (van Hulten et al., 2006). Estos genes SAR incluyen proteínas PR (Edreva 2005; van Houlten et al., 2006).

Investigaciones recientes han demostrado que puede existir una base epigenética heredable generación tras generación para el establecimiento de la SAR. Luna y colaboradores, compararon la progenie de una planta de *Arabidopsis* que había sido sometida al patógeno *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 con la progenie de un individuo control. Hallaron que la progenie de la primera estaba mayor capacitada para resistir infecciones de patógenos biotrofos y hemibiotrofos, dado que tendían a activar genes inducibles por SA. Análisis a nivel genético mostraron que ciertos promotores inducibles por SA como WRKY6 y WRKY53 se acetilaron y la cromatina a nivel general se encontraba hipometilada, estado relacionado con transcripción activa. Dicho

estado no fue observado en la progenie del individuo control a pesar de que se realizaron los mismos procedimientos y análisis genéticos, lo que sugiere que algunos aspectos de la regulación de la expresión de la SAR se podrían transmitir a las generaciones siguientes (Luna et al., 2012).

En el sitio de infección se produce una señal para el establecimiento de la SAR. Si bien por mucho tiempo se debatió sobre la naturaleza de dicha señal, hoy se sabe que son muy numerosas, y existen muchos genes involucrados, lo que demuestra la gran complejidad molecular de este proceso. Entre las principales señales se encuentran los siguientes metabolitos de naturaleza lipídica en general: ácido dicarboxílico azelaico, diterpenoide abietano dehidroabietinal, metil ester de ácido salicílico, factor dependiente de glicerol 3 fosfato, ácido piperónico, entre otros. Para la transferencia de señal a larga distancia mediante cualquiera de los metabolitos nombrados, se requiere de la proteína de transferencia lipídica DIR1 (deficient in resistance1) (Shah y Zeier, 2013).

Por su parte, la ISR (*Induced Systemic Resistance*) es otro tipo de resistencia a nivel sistémico. Al igual que la SAR, provee resistencia en toda la planta de manera inespecífica y muy duradera (varias semanas en algunos casos). Una diferencia importante reside en las hormonas participantes; en el caso de la ISR, el metil jasmonato (JA) y el etileno (ET). De todas maneras, para el establecimiento de la ISR en algunas especies, el SA puede ser importante (Weller et al., 2012). Otra diferencia relevante es que normalmente la misma es inducida por microorganismos que viven en la rizósfera, los cuales no necesariamente son patógenos de plantas, por ejemplo algunas especies del género *Pseudomonas*. Existen diferentes compuestos químicos y moléculas presentes o excretadas por las bacterias que son capaces de inducir ISR en la planta, entre ellos algunos componentes de la pared bacteriana como los lipopolisacáridos, flagelos, sideróforos, lipopolipéptidos, antibióticos, SA, entre otros (Weller et al., 2012). Una característica de la ISR es la gran concentración de proteínas PR y fitoalexinas presentes, comparado a una planta que no se encuentre en dicho estado (Heil and Bostock, 2002).

Existe un tipo de ISR que se activa en caso de ataque de herbívoros y en algunos casos se la denomina IRH (*Induced Resistance against Herbivores*). La ISR puede proveer resistencia a patógenos necrótrofos, biotrofos o hemibiotrofos (Heil and Bostock, 2002; Weller 2012).

UDP-glicosiltransferasas.

Dentro de las células vegetales se producen muchos productos naturales y metabolitos secundarios de diferente naturaleza, los cuales generalmente no son requeridos para procesos primarios de crecimiento y desarrollo pero son de vital importancia para su interacción con el ambiente y mecanismos de defensa. Esta diversidad química le permite a la planta afrontar desafíos como diferentes tipos de estreses, desecación, radiación UV, mantenimiento de la homeostasis y una gran variedad de amenazas de naturaleza biológica. Enzimas llamadas UDP-glicosiltransferasas (UGTs) juegan un rol muy importante en estos procesos. Gran parte de los metabolitos son generados o modificados por glicosilación, es decir por el agregado de uno o numerosos grupos glicósilo, actividad la cual es llevada a cabo por dichas enzimas (UGTs) (Wald et al., 2003; Bowles et al., 2005; Shao et al., 2005).

La glicosilación de moléculas de bajo peso molecular, ha mostrado ser muy relevante tanto para organismos procariotas como eucariotas. Se trata de un proceso crucial en la homeostasis metabólica de las células vegetales y muchos de los metabolitos secundarios generados en el proceso son centrales en la habilidad de las plantas de sobrellevar desafíos ambientales, tanto de origen biótico como abiótico (Wald et al., 2002; Grubb et al., 2004; Bowles et al., 2005) Se especula que regulan y dirigen ciertos procesos muy importantes en la fisiología vegetal, y que si bien hasta no hace muchos años eran consideradas enzimas modificadoras pero irrelevantes para la biosíntesis de moléculas, esa imagen en los últimos años ha cambiado (Bowles et al., 2006).

Las UDP-glicosiltransferasas (UGTs) de plantas son generalmente proteínas citoplasmáticas (Ross et al., 2001) que pueden además ser secretadas al exterior celular. Generalmente poseen un peso molecular mediano: entre 40 y 60 kiloDaltons (Vogt and Jones, 2000).

Las UGTs, catalizan la transferencia de un residuo azúcar proveniente de un nucleótido donador (UDP) a moléculasceptoras (Ross et al., 2001, Wald et al., 2002; Caputti et al., 2011). En plantas, generalmente el azúcar activado donador es la UDP-glucosa, pero se han descubierto otros como ser la UDP-galactosa, UDP-xylosa, UDP-rhamnosa y UDP-ac. glucurónico (Jadhav et al., 2012). Otra característica a destacar es que el azúcar transferido, puede adicionarse a átomos de O (OH- y COOH-), N (NH₂), y C (C-C) de las moléculasceptoras (Jones and Vogt, 2001).

Las UGTs al transferir un motivo azúcar afectan diferentes propiedades fisicoquímicas de sus moléculas aceptoras como ser un cambio en sus propiedades de unión a moléculas, aumento en su estabilidad y solubilidad, modulando su reactividad y por consiguiente alterando su actividad biológica (Jones y Vogt 2001; Jadhav et al., 2012). Estos cambios pueden tener grandes implicancias fisiológicas como alteraciones en la homeostasis hormonal, actividad antiherbivoría e insecticida por generación de moléculas repelentes, activación o desactivación de metabolitos secundarios, participación y regulación en la biosíntesis de pigmentos, compartimentalización de diferentes moléculas, solubilización de hidroxifenoles, detoxificación de xenobióticos, almacenaje y estabilización (generalmente en las vacuolas u otros organelos) de sustancias tóxicas, transporte de los conjugados tanto dentro como fuera de la célula, entre muchos otros (Chong et al., 1999; Vogt et al., 1999; Bowles et al., 2005; Gachon et al., 2005; Bowles et al., 2006)

Algunas UGTs de plantas, a pesar de ser diferentes; pueden reconocer al mismo sustrato (Bowles et al., 2006). En adición, la actividad es regioselectiva (Lim y Bowles 2004), donde una misma UGT puede reconocer varios sustratos, pero solo es capaz de transferir el mismo tipo de azúcar. Por su parte los posibles sustratos de las UGTs son en extremo variables. Éstos incluyen moléculas vegetales como las hormonas citoquinina, auxina, giberelina ácido absísico y brasinoesteroides, compuestos derivados de los esteroides y terpenoides como las saponinas, aminoácidos, fenoles, azúcares como la b-glucosa y xilosa, además de una gran variedad de metabolitos secundarios como flavonoides, agliconas y fenil propanoides (Vogt 1999; Brazier-Hicks y Edwards 2004; Shao et al., 2005; Bowles et al., 2006).

En la actualidad existen bases de datos con las secuencias de muchas UGTs, principalmente de *Arabidopsis thaliana*, en la cual se han encontrado 117 genes que codificarían para diferentes UGTs (Jadhav et al., 2012). Al comparar sus secuencias, se ha observado que las regiones amino terminales son mucho más variables que las carboxi terminales, lo que sugiere que el dominio involucrado en el reconocimiento molecular y especificidad de unión a los diversos sustratos se encuentra en el amino terminal mientras que la unión al complejo azúcar nucleótido (especialmente UDP-glucosa) se encuentra en el extremo carboxilo terminal (Osmani et al., 2008). Este último, forma parte de la secuencia consenso de las UGTs y es compartido en plantas, animales, levaduras y bacterias, conformándose de esta manera la superfamilia de las glicosiltransferasas (Ross et al., 2001). Las GTs hasta el presente, han sido agrupadas

por homología de secuencias en 94 familias, incluyendo GTs de plantas, animales, hongos, bacterias y hasta virus, de las cuales las pertenecientes a plantas (UGTs) conforman la familia 1 de las glicosiltransferasas y su motivo consenso, de unos 44 aminoácidos, se conoce como PSPG (motivo glicosiltransferasa de productos secundarios de la planta) (fig. 3) (Gachón et al., 2005; Caputti et al., 2011; Jadhav et al., 2012).

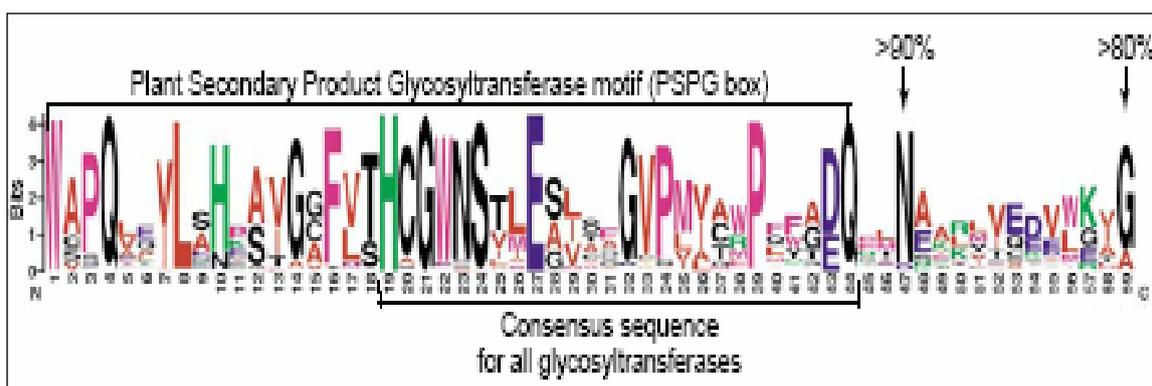


Fig. 3. Secuencia consenso de PSPG box. Se observa el motivo consenso de las GTs de todos los organismos. Corriente abajo del PSPG box se indican dos residuos conservados (N con más de 90% y G con más 80%). El tamaño de la letra es proporcional con la conservación aminoacídica. Para la determinación de la PSPG box se alinearon 216 secuencias de angiospermas (Adaptado de Gachon et al., 2005).

En los últimos 15 años se ha avanzado mucho en el conocimiento sobre las UGTs, y se han encontrado algunas nuevas que participarían en variados procesos vitales para el ciclo de vida vegetal así como en la defensa frente al estrés biótico, inducción en el crecimiento vegetal por participación directa en la biosíntesis de polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) de la pared celular (Wald et al., 2002; Anderson-Gunnerás et al., 2005), regulación del desarrollo vegetal por inactivación y almacenamiento de hormonas, regulación en la maduración por modificación pigmentaria, entre otros (Gachón et al., 2005). Lo anterior revela la importancia del conocimiento de este tipo de enzimas, ya que podrían tener aplicaciones biotecnológicas y agronómicas, incluyendo el mejoramiento de la resistencia vegetal frente a diversas amenazas.

Las UGTs podrían participar directa o indirectamente en la defensa de la planta contra patógenos. Un ejemplo muy interesante consiste en la detoxificación de xenobióticos como es el caso de la detoxificación de la toxina deoxynivalenol (DON) producida por un hongo del género *Fusarium* por parte de una UGT proveniente de *Arabidopsis*, UGT73C5. Ésta enzima es capaz de transferir una glucosa desde el UDP-

glucosa al DON. Las plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban dicha enzima mostraron un notorio aumento en la tolerancia frente al DON, debido a la baja reactividad del DON-3-O-glucósido (Poppenberger et al., 2003). Otro ejemplo es la glicosilación de escopoletín por parte de una fenil-propanoide glicosil transferasa denominada TOGT, proveniente de la planta de tabaco *Nicotiana tabacum*. La expresión de TOGT puede ser inducida por elicitores fúngicos y ácido salicílico. La glicosilación de escopoletín provoca que la molécula glicosilada sea secretada por la célula, e inmediatamente hidrolizada por una glucanasa asociada a la pared permitiendo que vuelva al estado no glicosilado. Debido a las propiedades antioxidantes de la escopoletín, al ser expulsada actuaría como un importante regulador redox ante situaciones de estrés causado por patógeno (Chong et al., 1999). Langlois-Meurinne y colaboradores (2005), demostraron que ciertas UGTs podrían tener un rol importante durante el desencadenamiento de la respuesta hipersensible (HR) (esta respuesta es efectiva contra patógenos biotrofos como *P.psyringae*). En primer lugar realizaron infecciones en *Arabidopsis thaliana* con *Pseudomonas psiringae* y analizaron los patrones de expresión de un grupo de genes que codifican para diferentes UGTs. Notaron que dos UGTs, UGT73B3 y UGT73B5, se expresaban luego de inducción con *P.psiryngae*, peróxido de hidrógeno y ácido salicílico. Al evaluar plantas mutantes defectivas en ambos genes, notaron que las mismas tenían una resistencia sumamente disminuida frente a *P.psyringae*, por lo que concluyeron que dichas UGTs podrían ser importantes en la respuesta hipersensible (Langlois-Meurinne et al.; 2005). Otro ejemplo es la antocianidin 5-O- glicosyltransferasa proveniente de la planta de papa (*Solanum tuberosum*), cuyo sustrato podrían ser flavonoides como la cianidina. Este compuesto actúa como antioxidante, y el agregado de glucosa disminuye esta capacidad, pero permite que la misma se almacene en vacuolas, donde luego podría ser movilizada para actuar frente al ataque de un patógeno. Se encontró que las plantas cisgénicas de *Solanum* que sobreexpresaban dicho gen, mostraban alrededor de 60% mas de resistencia que las plantas wt. Según los autores, la acumulación de antocianinas diglucósido sería crucial para la generación de dicha resistencia (Lorenc-Kukula et al., 2005).

En cuanto a la relación organismo hospedero-patógeno, las UGTs no solo se encuentran restringidas a los mecanismos de defensa de las células hospederas vegetales, sino que también se han encontrado UGTs que actúan como proteínas efectoras de algunos patógenos. Un ejemplo es el hongo patógeno de plantas

Colletotrichum gloeosporioides, el cual posee un grupo de genes que se induce fuertemente luego de que el hongo entra en contacto con la corteza de la planta y promueven el desarrollo del apresorio permitiendo que el mismo parasite exitosamente a la planta. Dentro de dicho grupo de genes, uno de ellos se descubrió que codifica para una UDP-glicosiltransferasa de esterol y se lo llamó *chip6*. Se generó un mutante para este gen y se infectó una fruta de palta con el mismo. Se observó que el hongo mutante, si bien fue capaz de generar la estructura del apresorio, su patogenicidad disminuyó notablemente, demostrando la importancia de la UGT en el proceso infectivo (Kim et al., 2001).

La papa.

La planta de papa (*Solanum tuberosum*) es originaria de las áreas montañosas de los Andes en América del Sur (en los alrededores del lago Titicaca). En el pasado, los cultivos indígenas antiguos de papa se distribuían en los Andes desde el oeste de Venezuela hasta el norte de Argentina, encontrándose incluso en los archipiélagos de Chiloé y Chonos (Spoonner et al., 2005). Fue introducida en Europa en los 1500 y de allí llevada al resto del mundo.

La papa pertenece a la familia de las solanáceas, al igual que el tomate, el morrón, y otros cultivos de interés. Es sensible a heladas y crece bien en climas templados, con temperaturas entre 15° y 27°C. Requiere una estación de crecimiento con un largo mínimo de 3 a 4 meses, en la cual las temperaturas no sean demasiado altas (>30°C) ni demasiado bajas (<5°C). El órgano que se consume es el tubérculo. Este es un órgano subterráneo de almacenamiento de reservas y resistencia. La planta lo forma cuando percibe del ambiente las señales de que se aproxima el invierno o la estación desfavorable para el crecimiento (Aldabadle y Dogliotti, 2002). Debido a las temperaturas extremas tanto en invierno como en verano, en nuestro país existen dos períodos para el cultivo de plantas de papa: primavera-verano y verano-otoño (Vilaró, 1990).

Para el año 2011, la secuencia del genoma de la papa se dilucidó por completo. Se secuenciaron las cepas RH89-039-16 (diploide) y DM1-3-516R44 (haploide). Su tamaño haploide es de 840 megabases y está organizado en 12 cromosomas. Codifica para al menos 40000 proteínas, de las cuales una gran parte son aún desconocidas

(www.potatoegenome.net). Las variedades de plantas de papa comercialmente importantes son tetraploides.

Actualmente, las papas son cultivadas y comidas en más países que cualquier otro cultivo siendo el tercero en alimentación humana con una producción que supera las 330 millones de toneladas al año (www.potatoegenome.net). La papa se puede utilizar de innumerables maneras en la alimentación, y además es importante en la industria de bebidas alcohólicas.

Pectobacterium sp.

Los patógenos vegetales que comprenden el género *Pectobacterium* (anteriormente *Erwinia*), son bacterias gram negativas, no esporulantes, anaeróbicas facultativas y se caracterizan por producir y liberar grandes cantidades de enzimas degradadoras de la pared celular o PCWDE (“Plant cell wall degrading enzymes”): pectinasas como pectato liasa y pectin metil estearasa, celulasas, hemicelulasas, proteasas y xylanasas, siendo las pectinasas importantes factores de virulencia (Pérombelon 2002; ; Mahmoudi et al., 2011; Moh et al., 2012; Davidson et al., 2013). El género *Pectobacterium* incluye *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (*Pcb*) *Pectobacterium atroseptica* (*Eca*). Todas fitopatógenos de papa, causantes de la enfermedad de la podredumbre blanda (“soft rot”). (Perombelon 2002; VanDerMerwe 2010; Czakowsky 2011). Ésta enfermedad es transmitida a través de múltiples vías, y puede causar pérdidas económicas significativas (Perombelon 2002; Moh et al., 2012). *Pcc* es, dentro de las especies nombradas anteriormente, la de mayor distribución geográfica (Perombelon 2002).

La entrada del patógeno puede darse principalmente por aberturas como estomas y lenticelas o por heridas. Una vez dentro de la planta, las bacterias residen en espacios intercelulares de tejidos suberizados o parenquimáticos donde permanecen en estado latente, hasta que las condiciones de temperatura y humedad se vuelvan favorables para el establecimiento de la enfermedad (Moh et al. 2012). Para poder salir de este estado de latencia, estas deben alcanzar un umbral en la densidad poblacional, y un ambiente muy húmedo con baja concentración de oxígeno. Este último, genera un ambiente de

anaerobiosis limitando las respuestas de defensa dependientes del oxígeno como ser síntesis de fitoalexinas y producción de compuestos fenólicos, además de impedir la lignificación y suberización de la pared celular que ofrecerían protección contra las enzimas líticas de la bacteria (Pérombelon 2002; Czajkowski 2009; Davidson et al., 2013). Estas condiciones favorables, terminarían promoviendo el crecimiento bacteriano y la aparición de síntomas (desarrollo de la enfermedad) (Davidson et al., 2013). La progresión de síntomas depende de la virulencia de la cepa bacteriana y de la susceptibilidad de la planta, y no menos importante de las condiciones ambientales, especialmente temperatura y humedad (Pollumaa et al. 2012).

El inicio del ataque de *Pectobacterium* y la liberación de las PCWDEs comprenden un proceso regulado finamente que involucra redes de sensores y mecanismos que traducen estímulos ambientales en cambios en la expresión génica. Las enzimas liberadas por la bacteria son potenciales activadores de la defensa por parte de la planta frente a la infección, ya que los oligogalacturónidos liberados por la lisis de la pared celular actúan como DAMP's (Davidson et al., 2013), lo que podría llevar a una interacción incompatible evitando la diseminación del patógeno. La inducción de las PCWDEs puede ser estimulada por diferentes tipos de señales incluyendo compuestos derivados de la planta y moléculas de *quórum sensing*. Éste último se trata de un sistema de señalización que regula varias respuestas fisiológicas en algunas bacterias gram negativas, siendo uno de los controles centrales de la producción de las PCWDEs. *Quorum sensing* se basa en la acumulación extracelular de moléculas señal difusibles, usualmente diferentes N-acilhomoserin lactonas (N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserin lactona en el caso de *Pcc*) que de superar una concentración umbral correlacionada con la densidad de población bacteriana, induce la expresión coordinada y específica de PCWDEs (Newton and Fray, 2004; Czajkowski 2009; Mahmoudi et al., 2011; Pollumaa et al., 2012; Davidson et al., 2013). La planta por su parte, en la etapa temprana puede responder con un rápido influjo de protones dentro de las células aumentando el PH del apoplasto de 6,4 a más de 8,3. La homoserin lactona es inestable en PHs básicos e incluso es hidrolizada a pH por encima de 8.2, por lo que en dichas condiciones es incapaz de actuar como molécula señal (Newton and Fray, 2004; Pollumaa et al. 2012). Esto demuestra la importancia del PH en la infección de *Pectobacterium*. Este proceso, así como cualquier otro capaz de interferir con el quórum sensing y con la expresión de productos dependientes del mismo, se denomina "*quórum quenching*" (Mae et al., 2001; Mahmoudi et al., 2011).

Expresión de proteínas recombinantes en levaduras.

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de hongos que incluye especies patógenas, inocuas y algunas de gran utilidad para el ser humano. Se trata de organismos unicelulares al menos en algún momento de su ciclo de vida y se multiplican por gemación o fisión. Las mismas incluyen organismos dentro del orden de los ascomycetes y basidiomicetes (Deak y Beuchat 1996).

Dentro del grupo de las levaduras, la especie *Saccharomyces cerevisiae* también conocida como “levadura de cerveza”, constituye uno de los microorganismos eucariotas más estudiados. Algunas de las ventajas que ofrece el uso de *S. cerevisiae* como modelo biológico en la investigación son: la facilidad con la que se obtienen grandes cantidades de este microorganismo dada su velocidad de crecimiento; colonias fáciles de aislar; facilidad para generar y analizar mutantes; pequeño tamaño de su genoma (alrededor de 14mb), lo que facilitó su secuenciación en 1996 (Dujon 1996; Sherman 2002). En las áreas de bioquímica, biología molecular y genética, esta levadura posee gran relevancia en estudios de función gen a gen, sistemas de uno o dos híbridos, cromosomas artificiales y como sistema de expresión de genes heterólogos.

S.cerevisiae ha jugado un papel preponderante como sistema de expresión. A diferencia de *Escherichia coli*, los genes expresados en levadura generalmente poseen actividad biológica. *S.cerevisiae* es capaz de llevar a cabo modificaciones post-traduccionales como la metilación y la acetilación de extremos amino terminales, glicosilación, procesamiento proteolítico y clivaje, característicos de la mayoría de los organismos eucariotas. Las proteínas heterólogas producidas no forman cuerpos de inclusión, generalmente se obtienen de forma soluble y, en caso de que las proteínas sean secretadas las mismas son fácilmente recuperadas del medio de cultivo (Jones et al., 1992).

○ Resultados previos (no publicados).

En investigaciones previas se logró aislar mediante *differential display* y técnicas moleculares accesorias, incluyendo rastreo de biblioteca genómica de fago lambda, un cDNA completo de 1563 nt de longitud, el cual codifica para una proteína de 443 aminoácidos (50 kiloDaltons aproximadamente de peso molecular). Por análisis de secuencia se determinó que se trataría de una UDP-glicosil transferasa (UGT), con la secuencia consenso característica (PSPG box) entre los aminoácidos 320 y 365, y se denominó *dru13* (*defense related UDP glicosil transferase 13*). Esta proteína probablemente se secrete fuera de la célula vegetal debido a la presencia de un péptido señal en el extremo N terminal de la secuencia aminoacídica correspondiente. Estudios de expresión de mensajeros mediante *northern blot* revelaron que el ARN mensajero de *dru13* se acumula en plantas tratadas con filtrado de cultivo (CF) de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. El CF es una preparación acelular de *P.c. carotovorum* que contiene todos los factores de virulencia (PCWDEs). El tratamiento de plantas axénicas de *S. tuberosum* (cv. Bintje) con CF induce la expresión de *dru13* a las 2-4 horas post inducción (hpi) con altos niveles de transcritos los cuales permanecen hasta las 24-48 hpi, según lo han revelado ensayos de *northern blot*. En plantas control (0 hs) no se inducen transcritos de *dru13*, tampoco se inducen en los tratamientos con heridas. Algunas hormonas vegetales como el ácido salicílico (SA) o el metil jasmonato (mJA) inducen puntualmente la expresión de *dru13*; SA a 8-12 hpi y mJA solo a 24 hpi. Los anteriores resultados sugieren que dicha proteína podría ser un actor relevante en la defensa de la planta frente a dicho patógeno.

Estudios anteriores trataron de extraer y purificar a DRU13 en sistemas de expresión bacterianos. Se logró expresar la proteína, pero únicamente dentro de la fase insoluble probablemente formando cuerpos de inclusión en *Escherichia coli*.

○ **Objetivo general.**

El presente estudio posee como objetivo general contribuir al análisis de la proteína de papa (*Solanum tuberosum*) que denominamos *dru13*. Para ello se propone expresar a *dru13* en sistema de expresión en levaduras, de modo de obtenerla en estado soluble.

Objetivos específicos.

Los objetivos específicos son:

- 1) realización de la construcción génica *dru13* en vector PYES2,
- 2) obtención y análisis de transformantes de bacterias con la construcción,
- 3) obtención y análisis de transformantes de levaduras,
- 4) expresión y análisis de DRU13 en levaduras,
- 5) purificación proteica y confirmación de la expresión de DRU13.

○ Resultados y discusión.

Construcción de *dru13*-PYES2.

Para la realización de *dru13*-PYES2 se hizo uso de otra construcción, *dru13* en vector de expresión eucariota pPICZb (Invitrogen, USA). En la misma, *dru13* carecía de la secuencia que codificaba para el péptido señal en la región 5' (57 nucleótidos en total, lo que corresponde a 19 aminoácidos) pero poseía los epítopes cMyc y 6His (6 histidinas). Ambos epítopes son de gran utilidad para detección por *western blot* y en el caso del epítoto his, el mismo sirve para purificación proteica por medio de columnas de NiNTA. Las secuencias de dichos epítopes se pueden apreciar en la figura 4. Se llevó a cabo una extracción de ADN plasmídico (ver materiales y métodos) a partir de un precultivo en 5 ml de medio Luria Bertani con 25ug/ml del antibiótico zeocina, de una colonia de E.coli XL1-Blue que contenía *dru13*-pPICZb. Luego de la extracción, se midió la concentración de ADN plasmídico por medio de un nanodrop. La misma resultó de 150 ng/ul. Con *dru13*-pPICZb aislado, se realizó una amplificación de *dru13*

A His tag: 5'-CATCATCATCATCATCAT -3'. S.N.
N- H H H H H H H -C. S.A

B CMyc tag: 5'-GAA CAG AAA CTG ATC TCT GAA GAA GAC CTG-3'. SN
N- E Q K L I S E E D L -C. SA

Figura 4: Secuencias de los epítopes (tags) de histidina y Cmyc. Para ambos casos, SN: secuencia nucleotídica, SA: secuencia aminoacídica.

por PCR con los cebadores PIC1 y PRK2PYES. Se realizaron 3 reacciones de PCR usando *dru13*-pPICZb como molde, de manera de asegurarnos una apreciable cantidad de producto amplificado que sería imprescindible para los ensayos posteriores. El cebador PIC1 se complementa con la parte 5' de *dru13* incluyendo el codón de inicio (AUG), la secuencia consenso para expresión proteica en levaduras y posee a su vez una secuencia nucleotídica modificada de manera de generar un sitio de corte para EcoRI. Por su parte el cebador PRK2PYES se complementa con el sitio de clonado múltiple de pPICZb, en dirección 3' del inserto. Tras la reacción de PCR se amplificó un fragmento de 1459 nucleótidos, de los cuales 1430 corresponden a la secuencia de *dru13*. Posterior

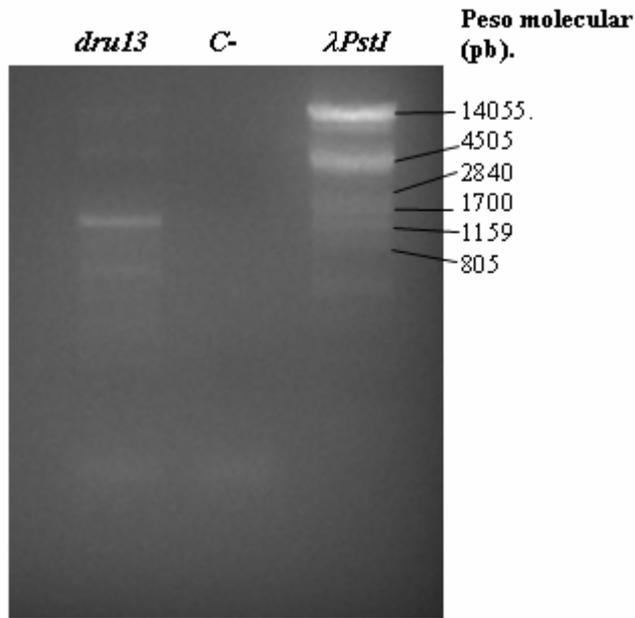


Figura 5: Visualización de *dru13* amplificado por PCR. *dru13*: Fragmento amplificado. C-: Control negativo. $\lambda PstI$: Marcador de peso molecular. Se marcan las bandas más relevantes.

a la amplificación, la misma se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó por un transiluminador UV. Se obtuvo un fragmento que coincide con el tamaño teórico del inserto, por lo que podemos concluir que la amplificación fue exitosa (figura 5). El producto de PCR fue posteriormente purificado.

Se digirió el producto de amplificación de *dru13* y vector PYES2 vacío (proveniente de una

miniprep cuya concentración de ADN plasmídico fue de 120 ng/ul) con las enzimas EcoRI y XhoI. En la figura 6 se representa el inserto que codifica para *dru13* y un esquema de PYES2. Esta reacción de restricción daría lugar a cortes con extremos cohesivos diferentes tanto en *dru13* como en el vector PYES2, permitiendo que la posterior ligación se pueda dar en una dirección específica. Se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% para poder visualizar el producto de la digestión y proseguir con la construcción *dru13*-PYES2. La reacción de restricción fue correcta, se observaron bandas únicas de ADN lineal que se corresponden con *dru13* y PYES2 vacío, con 1430 y 5900 pares de bases respectivamente (figura 7). Se cuantificó el ADN en las bandas de *dru13* y PYES2 vacío, para el posterior proceso de ligación. Se procedió con la extracción de los fragmentos de restricción y la ligación de *dru13* y

PYES2.

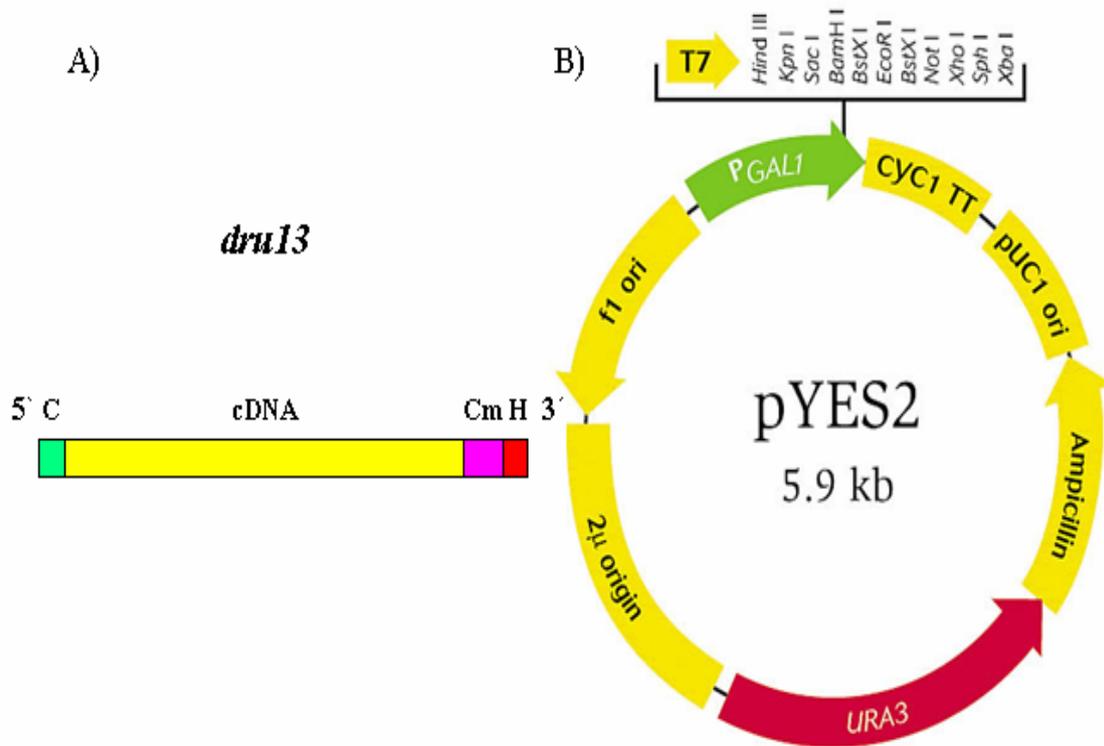


Figura 6. Ilustración de *drul3*, y esquema de PYES2. A. Dibujo de *drul3* tal cual se introdujo en vector PYES2, de 5 a 3'. C: Secuencia consenso de levaduras. cDNA: DNA que codifica para *drul3*, con el péptido señal eliminado. Cm: Epítipo Cmyc. H: Epítipo his. B. Vector PYES2 con las regiones que lo componen. Tomado de LifeTechnologies[®].

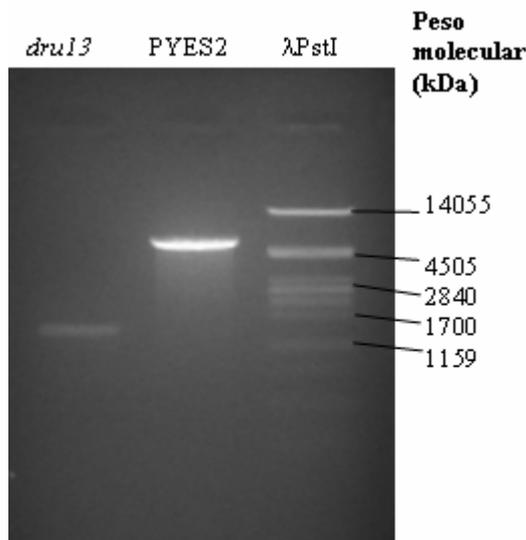


Figura 7: Visualización del ADN luego de la digestión con EcoRI y XhoI. Corrida en gel de agarosa correspondientes a *drul3* y PYES2.

Transformación de *E.coli* con *dru13*-PYES2 y análisis de la construcción.

Se transformaron células de *E.coli* XL1 Blue con el producto de ligación (Sambrook y Russell 2001) y las mismas fueron plaqueadas en medio LB agar con ampicilina empleada como antibiótico de selección a una concentración de 100ug/ml. Se aislaron 12 colonias transformantes positivas de las cuales 3 fueron seleccionadas para extracción de ADN plasmídico (Col1, Col2 y Col3). Las 3 extracciones fueron analizadas por restricción y PCR, y una de ellas fue secuenciada. Para la restricción se utilizó la enzima EcoRI y, además de las muestras de ligación se digirió el plásmido PYES2 vacío, lo que sirvió para comparar pesos moleculares y confirmar la presencia de *dru13* en PYES2. En la figura 8 se observa que las bandas de *dru13*-PYES2 están por encima de las PYES2 vacío, con una diferencia que se corresponde con el tamaño de *dru13* (alrededor de 1400pb). En la figura 8 también se muestra un esquema de la construcción *dru13*-PYES2 con su respectivo número de bases.

La PCR por su parte, fue realizada con 2 muestras de extracción plasmídica

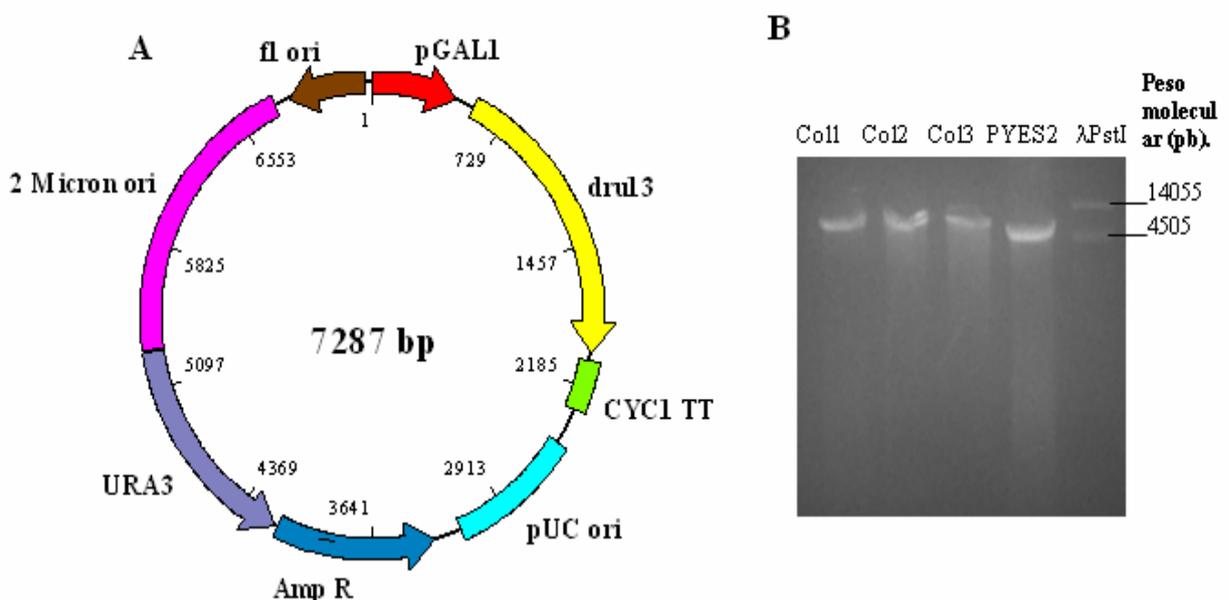


Figura 8: Esquema y análisis de restricción de la construcción *dru13*-PYES2. A. Esquema de la construcción realizada. Se observa la región codificante para *dru13* en amarillo y las diferentes regiones que componen a vector PYES2. B. Gel de agarosa con las digestiones de las colonias seleccionadas transformantes de *dru13*-PYES2 y PYES2 vacío.

(muestras provenientes de Col1 y Col2) y un control positivo, *dru13*-pPICZb (construcción de la cual se partió al principio). Se usaron igualmente los cebadores PIC1 y PRK2PYES. El producto de amplificación fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa (figura 9). Se observa que las bandas correspondientes con *dru13*-PYES2 (producto de ligación) son iguales en altura al control positivo, lo cual se esperaba.

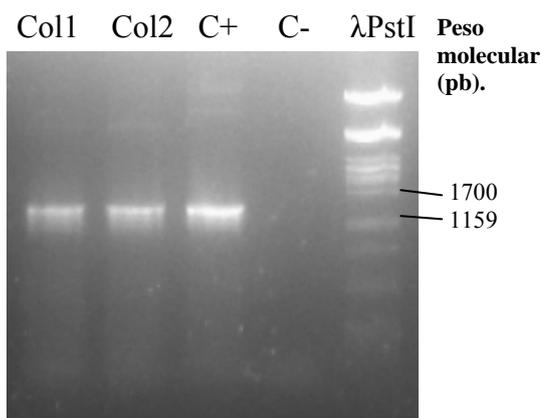


Figura 9: Amplificación por PCR de *dru13* en miniprep bacteriana. Se seleccionaron las colonias 1 y 2 transformantes de *dru13*. C+: Control positivo. C-: Control negativo.

Para confirmar que *dru13* se haya insertado en la dirección correcta, respetando el marco de lectura y confirmar que no se hayan introducido mutaciones, se secuenció la construcción utilizando los cebadores T7 y PRK2PYES por los flancos 5' y 3' respectivamente. El cebador T7 se pega en dirección 5' del sitio de clonado múltiple en el vector PYES2, lo que permitió visualizar y analizar el extremo corriente arriba de *dru13*, tarea que no podría llevarse a cabo con el

cebador PIC1. La colonia Col1 fue la seleccionada para la secuenciación. En la secuencia, se pudo apreciar en la región 5' al codón de inicio flanqueado por la secuencia consenso para la expresión en levaduras (datos no mostrados). En la región 3', se observaron las secuencias correspondientes al epítipo *his* y el *myc*, corriente arriba del codón de terminación. Se pudo advertir además, que la secuencia quedó correctamente ligada y respetando el marco de lectura.

El resultado de la secuenciación, junto a la PCR y la prueba de restricción, terminaron de confirmar que la construcción *dru13*-PYES2 y la posterior transformación bacteriana fueron exitosas.

Se realizaron gliceroles (ver materiales y métodos) de las 3 colonias transformantes analizadas.

Transformación de levaduras con *dru13*-PYES2.

Se realizó la transformación de *Saccharomyces cerevisiae* cepa W303 con *dru13*-PYES2 mediante protocolo de electroporación (Ausubel et al., 2003) (ver materiales y

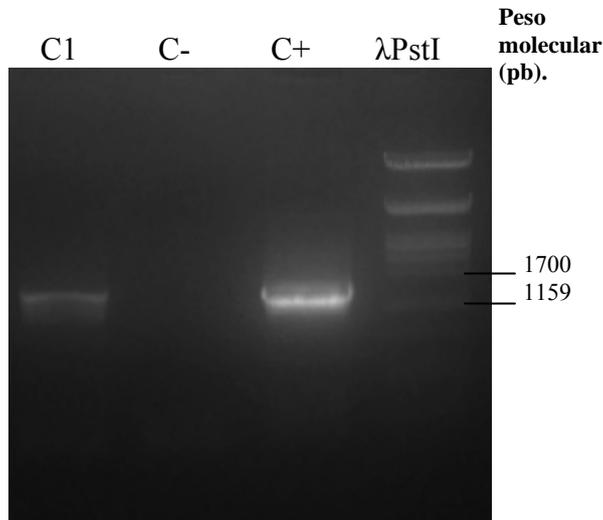


Figura 10: Amplificación por PCR de *dru13* en miniprep de levadura. Col1: colonia 1 transformante de W303. C-: Control negativo. C+: *dru13* proveniente de miniprep bacteriana.

métodos). Para ello, se utilizó una miniprep de la construcción. En las primeras 72 horas luego del proceso, ya se observaban decenas de colonias del color indicado. Se procedió a aislar 12 de las colonias obtenidas también en medio SC-U agar. Se seleccionó 1 colonia (C1) la cual fue inoculada en 5 ml de medio SC-U líquido y se dejó crecer overnight. Se le realizó la extracción de ADN plasmídico y se midió la concentración del

mismo, que fue de alrededor de 10 ng/ul. Se analizó el plásmido por PCR, de la misma manera que lo realizado en bacterias de manera de confirmar presencia de *dru13*-PYES2 en W303. El producto de PCR se corrió en una electroforesis en gel de agarosa tal como se muestra en la figura 10. Como control positivo se utilizó a *dru13*-PYES2 de miniprep bacteriana anteriormente analizada. Se pudo apreciar que la banda correspondiente a la extracción plasmídica de la colonia C1 de W303 es igual en peso molecular al control positivo, confirmando presencia de la construcción en levadura.

Expresión proteica en levaduras.

Se llevó a cabo la inducción de la producción de DRU13 en la colonia transformante C1 (con presencia confirmada de *dru13*-PYES2) seleccionada de W303, con el objetivo de analizar cambios en los patrones de expresión proteica y la posible

detección de DRU13. La inducción de la expresión de dicha proteína se realizó con el agregado del azúcar galactosa a una concentración final de 2% en medio líquido YP (yeast-peptone). El promotor Gal1 del vector PYES2, es un promotor fuerte e inducible únicamente en presencia de galactosa, por lo que su activación y por ende la expresión de su gen asociado (en este caso *dru13*) no podría darse en ausencia de dicho azúcar. Por el contrario, la glucosa es un represor del promotor, por lo que debe ser eliminada antes de comenzada la inducción. Para ello se realizó un paso de reposo y lavado en medio YP. Se sacaron muestras a las 4, 8 y 24 horas posteriores al inicio de la inducción. Se extrajo muestra equivalente a las 0 horas, antes del agregado de galactosa y por tanto antes de comenzada la inducción, de manera de asegurarnos que no existiera

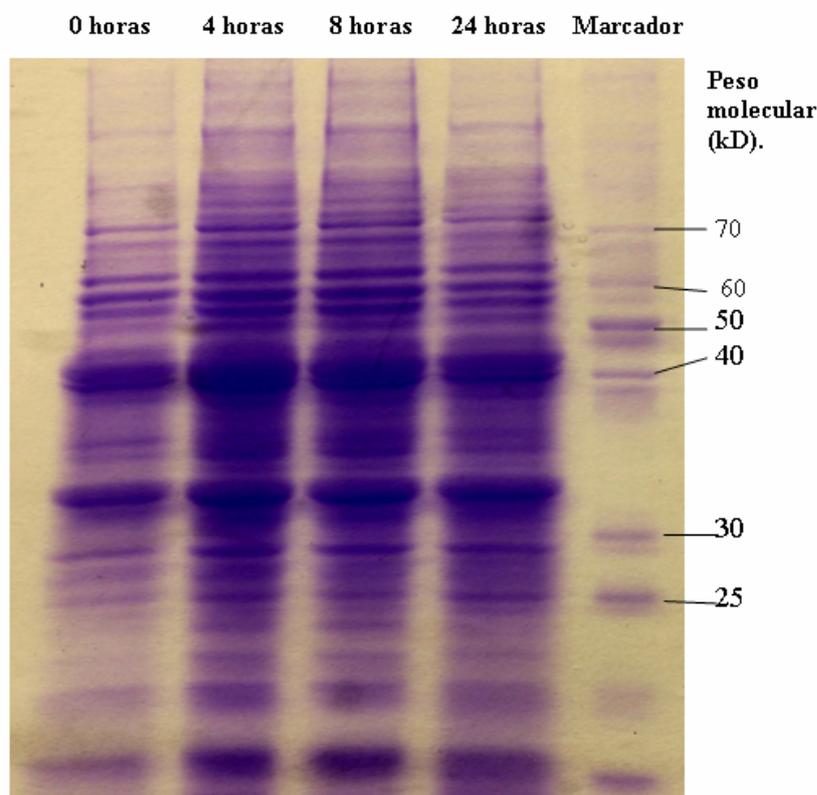


Figura 11: Análisis del patrón de expresión proteica de *dru13* en W303. Gel de poliacrilamida coloreado con Coomassie Brilliant Blue con las muestras de inducción proteica. En los carriles se observan las muestras correspondientes a control negativo de inducción (0 horas), 4, 8 y 24 horas post inducción. Se observan las bandas del marcador molecular (Thermo Scientific Unstained Molecular Marker[®]) en el quinto carril y están marcadas las más relevantes.

DRU13 en dicha muestra y poder usarla como control negativo. Se realizó paralelamente una inducción proteica con una colonia W303 transformada con vector PYES2, del mismo modo que la anterior.

Las muestras extraídas fueron lisadas, se les extrajo la fracción soluble, y fueron analizadas mediante SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al

10%. Las concentraciones proteicas fueron medidas, y en cada pocillo del gel se agregó entre 25 y 30ug de proteína (detalles en materiales y métodos). En la figura 11 se observan bandas a una altura similar a 50 KiloDaltons (tamaño teórico aproximado de DRU13), en el control 0 hay una banda similar aunque no queda claro si es la misma

que se visualiza en las demás extracciones. Debido a esto, no se pudo afirmar que DRU13 se haya expresado. Por otro lado, la expresión de proteínas foráneas en *S.cerevisiae* suele ser muy baja, en algunos casos solo detectado por *western blot* (García et al., 2007). Por lo tanto el hecho de no visualizar a DRU13 claramente en un gel de proteínas totales no es sorprendente. La claridad de las bandas en el gel mostró que con la inducción proteica los patrones de expresión en W303 prácticamente no cambiaron.

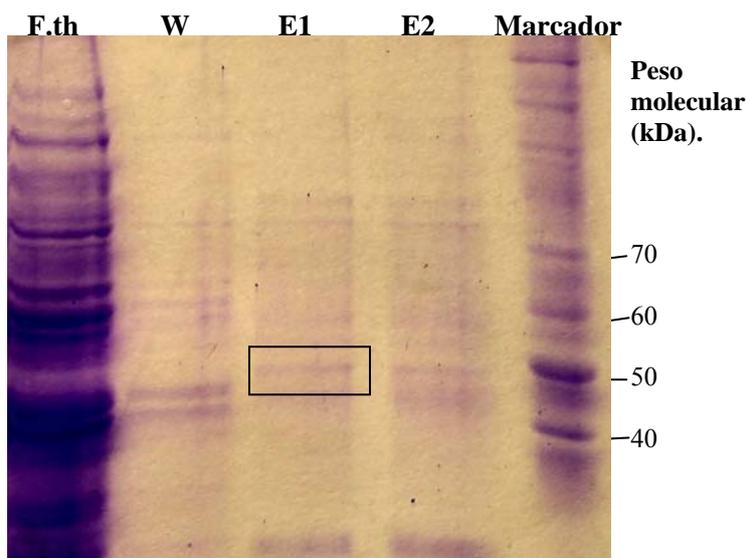


Figura 12: Análisis de las proteínas purificadas por columnas de NiNTA. F.th: *Flow Trough*. W: *Wash* o lavado. E1: Eluido 1. E2: Eluido 2. Se resalta la banda de aproximadamente 50kD con una elipse. Se observan las bandas del marcador molecular en el quinto carril y se marcan las más relevantes.

Las muestras de extracción se pasaron por columnas de NiNTA con afinidad a epítoto-histidina (his-tag) utilizando protocolo de The QiaExpressionist (materiales y métodos) con el objetivo de purificar las extracciones proteicas, aumentando las posibilidades de visualización de DRU13. Las muestras proteicas de las horas 4 y 8 fueron

puleadas y pasadas por la misma columna de manera de concentrar lo máximo posible. Luego de la purificación, las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida (figura 12) para análisis por SDS-PAGE. Se observa que tanto el eluido 1 como el eluido 2 poseen una banda muy tenue pero visible a una altura de 50 kDa. La misma banda no se observa en el lavado y tampoco en el *flow trough*. Este último presentaba una mayor cantidad de proteínas, lo que hubiera dificultado la visualización de una banda tan tenue. Por otro lado, en los eluidos también se visualizaron otras bandas tenues, probablemente debidas a pegado inespecífico en las columnas de NiNTA. El hecho de presentar bandas relativamente claras y del peso molecular indicado (50 kDa) únicamente en los eluidos, indicaban la posible presencia de DRU13 en las muestras de purificación.

Detección de DRU13 mediante *Western blot*.

Se realizó un ensayo de *Western blot* con el objetivo de confirmar la presencia de DRU13 en las muestras proteicas purificadas y en las extracciones a diferentes tiempos de la inducción. Se puso a punto la técnica anteriormente a la realización, la cual se encuentra descrita en materiales y métodos. Como anticuerpo primario, se utilizó inmunoglobulina IgG proveniente de conejo (Pierce Thermo Scientific), capaz de detectar epítopes 6his presentes en proteínas. Como se mencionó anteriormente, *dru13* posee un epítipo 6his en su región C-Terminal por lo que puede ser detectada mediante dicho anticuerpo primario. Como anticuerpo secundario, se empleó uno proveniente de cabra anti-inmunoglobulina de conejo con conjugado de peroxidasa de rabanito (Pierce Thermo Scientific). Una vez que ocurre la detección del anticuerpo primario por parte del secundario y en presencia de solución de luminol, se produce una reacción quimioluminiscente que puede ser detectada por autoradiografía. Se utilizó el marcador Prestained Molecular Marker (Pierce Thermo Scientific) debido a que el mismo se transfiere a la membrana sin perder la tinción, facilitando la posterior determinación del/los pesos moleculares de las bandas detectadas por este método.

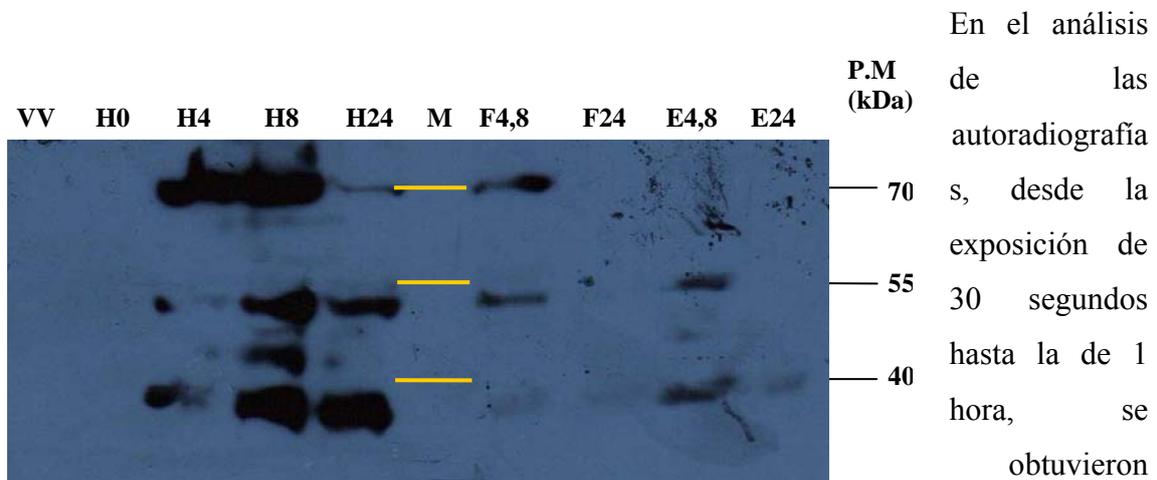


Figura 13: Visualización de bandas proteicas mediante Western blot. VV: Vector PYES2 vacío, muestra de inducción hora 0. H0: Inducción *dru13* hora 0. H4: Inducción *dru13* hora 4. H8: Inducción *dru13* hora 8. H24: Inducción *dru13* hora 24. M Marcador de peso molecular. F4,8: *Flow trough* horas 4 y 8. F24: *Flow trough* hora 24. E4,8: Eluido de horas 4 y 8. E24: Eluido de hora 24. A la derecha se encuentran indicados los pesos moleculares en kD.

En el análisis de las autoradiografías, desde la exposición de 30 segundos hasta la de 1 hora, se obtuvieron imágenes con un patrón de bandas muy claro. A las 24

horas no se detectó banda alguna. Se eligió la fotografía con 1 hora de exposición, que es la que se observa en la figura 13. Los controles negativos (*dru13* hora 0 y PYES2 vacío hora 0) no mostraron banda alguna. Tanto en las muestras de inducción como en

las purificadas por columnas de NiNTA se observó una banda clara y prominente en un peso molecular aproximado de 50 kDa, lo que podría indicar la presencia de DRU13. Con respecto a las muestras de extracto crudo de 8 y 24 horas post inducción, las bandas a la altura de 50 kDa fueron claramente visibles, mientras que en la de 4 horas se observó en menor cantidad. Las muestras purificadas correspondientes a 4 y 8 hs (mezcladas) también mostraron bandas de 50 kDa. Por otro lado, se observó que las bandas en las muestras de extracto crudo fueron mas intensas que las bandas pertenecientes a las muestras purificadas. Esto podría deberse a una posible pérdida de una fracción de la proteína con epítotope his por parte de las columnas de NiNTA, lo que puede estar indicando un probable deterioro por parte de dichas columnas. Las muestras de purificación de 24 horas no presentaron bandas claras en 50 kDa, a pesar de que en el extracto crudo correspondiente a esa hora se observó una banda con dicho peso molecular. Además de la banda de 50kDa, se observan otras 2 claras: una a un peso molecular aproximado de 70kDa y otra a menos de 40kDa. Dada la claridad de las bandas, se descarta que se trate de *background* es decir, reacciones químicas que hayan ocurrido en alguna etapa del ensayo y puedan interferir en el revelado. Podría tratarse de pegado inespecífico de los anticuerpos a otras proteínas pero algunas explicaciones probables serían las siguientes: En el caso de la banda cercana a los 70 kDa, la misma podría deberse a una forma glicosilada de DRU13. La glicosilación por glucosa y especialmente manosa son muy comunes cuando se expresa una proteína foránea en *Saccharomyces cerevisiae*. (Guerrero-Olarzán et al., 2004). Por su parte DRU13 posee 2 probables sitios de glicosilación, uno ubicado en la posición 103 y el otro en 219, ambos predichos por la aplicación de software Prosite (www.Expasy.org). Se ha reportado en algunas experiencias el fenómeno de hiperglicosilación, que consiste en el agregado de muchas unidades de monómeros de azúcar por lo cual la proteína en cuestión puede aumentar su peso molecular en docenas de kDa (Romanos et al., 1991; Guerrero-Olarzán et al., 2004). Es el caso del fragmento C de la toxina tetánica de 50kDa, que se la expresó en una forma glicosilada de 65kDa e hiperglicosilada con mas de 75kDa (Romanos et al., 1991). Esto es una desventaja que posee la expresión en este organismo, razón por la cual algunos investigadores utilizan otras especies de levadura como *Pichia pastoris*. Con respecto a la banda similar a 40kDa, una posible hipótesis es que se trate de una forma clivada o cortada de DRU13, fenómeno que ocurre en levaduras (Chong et al., 1996). Se debe tener en cuenta que existe actividad proteolítica

cuando se expresan proteínas en *S.cerevisiae*, la cual puede llevarse a cabo cuando las mismas se lisan y el contenido extracelular es liberado (Valdéz et al., 2009).

○ **Conclusiones finales.**

Los resultados del *Western blot* sugieren que hubo expresión de DRU13 en la fase soluble de proteínas en levadura. Esto puede constituir una ventaja de los sistemas de expresión eucariota con respecto a los procariota o bacterianos (Guerrero et al., 2004). Por otro lado, las bandas detectadas correspondientes a otros tamaños moleculares, nos estarían indicando que DRU13 pudo haber sufrido cambios postraduccionales.

Con respecto al sistema de expresión en *S.cerevisiae*, los procesos involucrados en la obtención de proteína son relativamente rápidos y simples. Pese a ello, observamos que la efectividad en la expresión fue relativamente baja comparada con sistemas de expresión bacterianos.

Lo realizado en el presente trabajo es un paso más en el estudio de la proteína DRU13. En un futuro muy cercano se podría llevar a cabo una inducción proteica a gran escala en W303 utilizando el protocolo ya conocido, de manera de obtener y purificar una gran cantidad de DRU13 permitiendo la realización de estudios bioquímicos asociados a espectrometría de masas para estudio de posibles sustratos, y otros que podrían ayudar a determinar la función específica de DRU13. Por otro lado, el análisis de transformantes de plantas de papa que sobreexpresan la proteína, incluyendo estudios de localización tisular y análisis de plantas cuando las mismas son enfrentadas a diferentes variedades de patógenos, son algunos emprendimientos que en un futuro cercano podrían ayudar a dilucidar el papel de DRU13 en la defensa vegetal.

○ Materiales y métodos.

Cepas utilizadas en el estudio.

La cepa bacteriana utilizada fué la “XL Blue” (*E.coli*), que posee un genotipo cromosomal *recA1* (carece de recombinasa A funcional) y es sumamente utilizada en estudios genéticos y biotecnológicos (Sambrook y Russell 2001). Con respecto a esta cepa se contaba con numerosos stocks de células competentes a -80 c. La cepa W303 de *Saccharomyces cerevisiae* fue provista por Milagros Mailhos del Instituto Pasteur. Dicha cepa es Mata (haploide estable) y con genotipo *trp1- ura3- ade2- his3-* (es incapáz de sintetizar los aminoácidos uracilo, triptófano, adenina e histidina) (Sherman, 2002). Debido a que presenta auxotrofia frente al uracilo (Ura-), fue la cepa elegida para el estudio.

Cultivo de bacterias y levaduras.

Para crecimiento de bacterias se hizo uso de medio LB (1% Peptona, 1% NaCl y 0,5% Extracto de levadura), tanto placas como líquidos. Para la selección y propagación de las bacterias portadoras de *dru13-pYES2* se agregó Ampicilina al medio LB hasta llegar a una concentración de 100 ug/ml (Sambrook y Russell 2001). Las bacterias fueron cultivadas a 37°C y 220rpm por 16hs. Respecto a la cepa de levadura, la misma fue mantenida en medio completo YPD (el cual consiste en 2% Dextrosa, 2% peptona, 1% extracto de levadura y 2% agar en el caso de las placas) (Pyes2, Invitrogen^R, USA). Para la selección posterior a la transformación, se emplearon placas con medio sintético completo sin uracilo (SC-URA) (0,67 % base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 0,192% mezcla drop out aminoacídica sin uracilo, 2% dextrosa, 1 M de sorbitol y 2% agar). Durante la purificación y propagación de colonias se usaron placas SC-Ura sin sorbitol. Para la pre-inducción proteica se utilizó en la primera etapa medio SC-Ura líquido con glucosa al 2% como fuente de carbono. Para la inducción se usó medio YP

(extracto de levadura con peptona) con galactosa al 2% (Henn 2010). Las levaduras se cultivaron a 30°C, 250 rpm por 16hs.

Gliceroles de bacterias y levaduras.

Respecto a la cepa bacteriana, los gliceroles fueron hechos de la siguiente manera: Se realizaron cultivos líquidos en medios LB (o LB Amp, según el caso), y se dejaron incubando de 16 a 18 horas a 30° C. Se agregó 0,6 ml de cultivo y 0,4 ml de glicerol estéril en un tubo *cryovial*, se mezcló utilizando un vortexeador e inmediatamente se guardó en el freezer -80°C (Sambrook y Russell 2001). Para los gliceroles de la cepas de levadura, se realizaron cultivos líquidos en medio YPD (en el caso de W303 sin transformar) y SC-URA con glucosa (caso de las colonias transformantes) y se dejaron en estufa overnight a 28°C. Luego se agregó 0,8 ml de cultivo y 0,2 ml de glicerol, se mezcló y guardó a -80°C (Pyes2, Invitrogen^R, USA).

Aislamiento de ADN plasmídico bacteriano.

Para la realización de este experimento, se utilizó el manual y los reactivos de GenCatch^R Plasmid DNA Miniprep Kit (Epoch Biosciences, USA) que se describen brevemente. Se realizaron precultivos con 5ml de medio LB con colonias aisladas frescas de placas, usando como modo de selección la ampicilina (para los vectores PYES2) a una concentración de 100 µg/mL y se incubó a 37° C toda la noche. Para la extracción del ADN plasmídico, dichos precultivos se centrifugaron por 2 minutos de manera de “pelletar” las células. Luego se resuspendieron las células en 200µl de solución MX1 y se agregaron 250 µl de Buffer MX2 invirtiendo el tubo unas 6 veces. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se agregó 350 µl de buffer MX3 invirtiendo el tubo unas 5 veces. Se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, el cual fue introducido inmediatamente en una columna GenCatch^R que había sido anteriormente colocada sobre un tubo de colección. Se centrifugó a 5000 rpm por 1 minuto y se descartó el *flow-trough*. Se agregó entonces 500µl de buffer WN, se centrifugó la columna 1 minuto a 9000 rpm y se eliminó el

flow-trough. Se colocó 700µl de buffer WS y nuevamente se centrifugó a 9000 rpm pero por 30 segundos. Se desechó el *flow-trough*. Se centrifugó a 13000 por 2 minutos con el objetivo de eliminar el etanol residual (ya que el mismo es capaz de interferir negativamente con posteriores ensayos a los que pueda ser sometido el ADN plasmídico). Por último se colocó la columna dentro de un tubo Eppendorf nuevo, se agregó 50µl de buffer de elusión y se centrifugó a 13000 rpm durante 30 segundos para permitir la correcta elusión del ADN al tubo. Se guardó la muestra conteniendo ADN plasmídico a -20°C.

Medición de la concentración de ADN.

La determinación de la concentración de ADN de las muestra se llevó a cabo con el uso de un nanodrop (Sambrook y Russell 2001) o espectrofotómetro de microvolúmenes (ACTGene^R, USA) (Sambrook y Russell, 2001), laboratorio de Interacciones Moleculares, Instituto de Bioquímica de Facultad de Ciencias.

PCR.

A partir del ADN plasmídico perteneciente al vector PYES2, se amplificó el fragmento correspondiente a *dru13*. Las amplificaciones por PCR se realizaron según Sambrook y Russell (2001) con los cebadores Pic1 y PRKPYES cuyas secuencias son 5'- TTA CCT GAA TTC ATA ATG TCT CAC ATA -3' y 5'- CAT CCT CGA GGC AAA TGG CAT TCT GAC ATC C -3', respectivamente. La secuencia consenso de levadura se encuentra en el cebador PIC1 subrayada. La misma se encuentra presente en muchos genes de levadura (*S.cerevisiae* y otras especies) y su presencia puede aumentar la expresión genética hasta 3 veces, con respecto a otro gen expresado en levadura que no la posea. (Sherman 2002). Se realizaron 3 tipos de PCRs: La primera de ellas con el objetivo amplificar *dru13* en pPICZb en la primera etapa de la construcción de *dru13*-PYES2 (figura 4). El segundo ensayo de PCR se realizó para confirmar la presencia del fragmento de *dru13* en ADN plasmídico obtenido de *E.coli* XL1-Blue transformada (con la construcción *dru13*-PYES2) utilizando como control positivo a *dru13*-pPICZb. El tercer PCR se hizo con el objetivo de confirmar la presencia de la

construcción en levadura y se empleó como control positivo a *dru13-PYES2* proveniente de miniprep bacteriana. Para todos los casos, el control negativo fue 1µL de agua miliQ y la cantidad de muestra (*dru13-PYES2* de bacterias o levaduras) fue de igualmente de 1µL. La reacción de PCR se llevó a cabo con la siguiente mezcla de reacción:

Mezcla de reacción:	
Buffer Taq 10X con MgCl ₂	3µL
Primer 5' PIC1 (10mM).....	1µL
Primer 3' PRKPYES 3' (10mM).....	1µL
DNTPs (10mM).....	0,6µL
Taq Polimerasa.....	1µL
H ₂ O PCR.....	22,5µL
ADN plasmídico.....	1µL
Total.....	30µL

Las mezclas fueron colocadas en un termociclador R225 (Eppendorf[®], USA) con el siguiente programa de ciclado:

Ciclos	Temperatura (C)	Tiempo (minutos)
1	94	5
25	94	0,5
	55	0,5
	72	1
1	72	5

Purificación de productos de PCR.

Para el procedimiento, se utilizó el manual y reactivos de GenCatch[®] PCR Purification Kit (Epoch Biosciences, USA). Brevemente, se pipeteó 100µL de producto de PCR en un tubo Eppendorf estéril y se mezcló con 0,5 ml de solución PX. Se colocó una columna GenCatch[™] en un tubo de colección y se vertió la mezcla en la columna. Se centrifugó a 5000rpm por 1 minuto y se descartó el *flow trough*. Se lavó la columna agregando 0,5mL de solución WN y centrifugando a 5000rpm por 1 minuto. Se lavó nuevamente la columna pero con buffer WS. Se centrifugó la columna a 13000rpm por

3 minutos para eliminar el etanol remanente. Se colocó la columna en un tubo Eppendorf estéril y se le agregó 30µL de Buffer de elución. Se dejó reposar la columna a temperatura ambiente por 4 minutos y se centrifugó 2 minutos a 13000rpm para eluir el ADN. Se guardó la muestra de purificación a -20°C.

Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Las electroforesis de ADN fueron realizadas según manual Current Protocols (Ausubel et al., 2003). Para los geles, se disolvió la agarosa hasta llegar a 1% en buffer TAE 1X (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 µg/ml). Las muestras se mezclaron previo a su cargado en el gel, con buffer de carga diluido a la quinta parte (Buffer carga 5X: Ficoll 20% m/v; EDTA pH 8.0 50 mM; *Bromophenol blue* 0.05 m/v; *Xylenecyanol blue* 0.1% m/v). Las corridas se realizaron en cubas electroforéticas con el gel sumergido en buffer TAE 1X a un voltaje de entre 90 y 120 Volts en fuente de poder EPS-301 (Amersham^R, GE HealthCareTM, England). Como marcador de peso molecular se utilizó ADN del fago λ digerido con la enzima *Pst*I (λ/*Pst*I) lo que permitió estimar el tamaño de los fragmentos analizados. Además, este marcador permite estimar la concentración de la muestra ya que el ADN λ tiene 48.502 nucleótidos y se siembra 1 µg del mismo, por lo que comparando la intensidad de las bandas de las muestras con las bandas del marcador se puede estimar las concentraciones de las muestras. Luego de finalizadas la corridas, los geles se visualizaron en un transiluminador UV M100 (Biorad^R, USA) en el laboratorio de Virología Molecular, donde se registraron fotográficamente.

Extracción de bandas en gel de agarosa.

Para este procedimiento se hizo uso del manual y los reactivos de QiaQuick Gel Extraction Kit (QiagenTM, Germany). Se cortó el fragmento del gel de agarosa que contenía la banda de interés con un bisturí. Se pesó el fragmento en un tubo Eppendorf y se le agregó 3 volúmenes de buffer QG a 1 volumen de gel. Se incubó a 50°C por 10 minutos de manera de disolver el gel en el buffer. Se agregó 1 volumen de isopropanol

y se mezcló por vortexeador hasta disolver. Se colocó una columna quiaQuick™ en un tubo de colección, se agregó la muestra en la columna y se centrifugó la misma 1 minuto a 13000rpm descartando posteriormente el *flow trough*. Se agregó 0,75mL de buffer PE a la columna y se centrifugó 1min a 13000rpm. Se centrifugó nuevamente por 1min a 13000rpm para eliminar el etanol residual. Se colocó la columna en tubo Eppendorf estéril y se le agregó 30μL de buffer E. Se dejó reposar 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó 1 minuto a 13000rpm. Se guardó la muestra de extracción a -20°C.

Análisis de ADN mediante ensayos con enzima de restricción.

Se digirió *dru13* (producto de PCR) y vector PYES2 (Sambrook y Russell 2001) con EcoRI y XhoI (New England Biolabs™). Se colocaron 13μL de muestra *dru13* proveniente de purificación de PCR o PYES2 de miniprep, 2μL de buffer EcoRI, 2μL de BSA10X (1mg/mL) y 1,5μL de EcoRI y XhoI (concentración inicial de 1mg/mL) sumando un volumen de reacción total de 20μL en cada reacción. Se incubó a 37°C por 3 horas. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y visualización en transiluminador UV.

Ligaciones de la secuencia de ADN para las construcciones.

Para el proceso, se siguió el manual de ligación de Molecular Cloning (Sambrook y Russell 2001) y se hizo uso de la ligasa T4 (Promega USA™). Se estimaron las concentraciones de las muestras digeridas por medio de visualización en gel de agarosa, comparando las bandas correspondientes a estas con las bandas presentes en el marcador de peso molecular (cuyas concentraciones son conocidas). Las concentraciones fueron valoradas aproximadamente en: 18ng/uL para *dru13* y 180ng/uL para PYES2. Teniendo en cuenta las concentraciones se agregaron 2μL de digestión PYES2, 15μL de digestión *dru13* (relación volumen/volumen *dru13*/PYES2 fue de 7.5

a 1), 1uL de ligasa T4 y 2uL de buffer de ligación (Promega USA TM) dando lugar a un volumen de reacción total de 20μL. Se incubó la reacción 3 horas a temperatura ambiente y posteriormente se inactivó a 70°C por 10 minutos. La muestra de ligación se guardó a -20°C.

Transformación genética de bacterias.

Para la transformación de *Escherichia coli* XL1 Blue se siguió el manual de Molecular Cloning (Sambrook y Russell 2001). Se plaquearon bacterias de la cepa XL1 BLUE en placas de LB y se las dejó incubando overnight a 37°C. Se seleccionó 1 colonia y con un ansa estéril, se colocó en un tubo Eppendorff con 100 μl de CaCl₂ 1M y se dejó reposando en hielo por una hora. Luego se agregó 4μl de *dru13*-PYES2 y se dejó también reposando en hielo por una hora. Pasado el lapso se realizó un shock de calor a 37°C por 3 minutos en el termoblock e inmediatamente se le agregó 400 ul de medio LB para dejar incubando en la estufa a 37°C con agitación. Por último las muestras fueron plaqueadas en medios selectivos LB con 1μg/mL ampicilina y se dejó creciendo overnight.

Secuenciación de ADN.

Para las secuenciaciones de ADN se contrataron los servicios de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular (UBM) del Institut Pasteur de Montevideo. La concentración aproximada de ADN plasmídico fue de 100 ng/μL en un volumen total de 7 μl, mientras que la cantidad de cebador utilizada fue de 5 picomoles. Para la secuenciación se utilizó el cebador universal T7 y el cebador PRKPYES2. Las secuencias nucleotídicas se muestran a continuación:

T7 5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'

PRKPYES 5' - CAT CCT CGA GGC AAA TGG CAT TCT GAC ATC C -3'

Se analizaron los cromatogramas de las secuencias. Se utilizó el programa informático Bioedit para análisis y comparación de las secuencias.

Transformación genética de levaduras.

Se llevó a cabo la transformación de las levaduras por medio del método de electroporación (Ausubel et al., 2003). Se seleccionó una colonia de W303 a la cual denominamos C1 y se la inoculó en 100mL de medio YPD. Se incubó a 30°C y 250rpm por 16 horas. El cultivo se dividió en dos tubos de 50ml y se centrifugó a 3000g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se los puso sobre hielo. Se resuspendió cada pellet en 50mL de agua bidestilada, se volvió a centrifugar a + 4°C y se descartó el sobrenadante. Se lavó nuevamente con agua pero reduciendo el volumen a la mitad (25mL cada uno). Se resuspendió el pellet total en 4mL de 1M sorbitol, y se pasó el contenido a un falcon de 15mL. Se centrifugó a 3000g por 5 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 0,1mL de sorbitol y se mantuvieron las células en hielo. Se mezcló 40µL de pellet resuspendido con 5µL de miniprep de *dru13-PYES2* (proveniente de XLI Blue) cuya concentración fue de 120ng/uL y se colocó la mezcla en una cubeta para electroporación. En otra cubeta se agregó una mezcla de 40µL de pellet de levadura con 5µL de miniprep de PYES2 vacío. Ambas muestras se dejaron reposar por 5 minutos en hielo. Se colocaron las cubetas en una celda y se seteó el electroporador Micropulser™ (Biorad, USA) en 1,5kV, 200Ohms, 25µF y 5useg. Se pulsó una sola vez para cada muestra e inmediatamente después se agregó 1mL de Sorbitol 1M a cada cubeta. Se plaquearon en medio SC-Ura y se incubaron a 30°C por 72 horas.

Extracción de ADN plasmídico de levadura.

Para el proceso se utilizó el manual y reactivos de QiaSpin Miniprep Kit™ (Qiagen, Germany). Brevemente, se inoculó una colonia de W303 (transformante de *dru13-PYES2*) denominada C1 en 5mL de medio líquido SC-Ura y se dejó creciendo a 30°C por 16 horas. Las células se centrifugaron a 5000g por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 250uL de buffer P1 conteniendo 0,1mg/ml de ARNasa 1. Se pasaron a un tubo Eppendorf nuevo, se agregó 0,1mL de *glass beads* (Sigma-Aldrich™, Germany) y se vortexeo la mezcla por 5 minutos. Se centrifugó nuevamente a 5000g por 5 minutos y se colocó sobrenadante en un nuevo tubo. Se agregó 250uL de buffer P2, se invirtió 6 veces y se dejó reposando a temperatura ambiente por 5 minutos. Se pusieron 350uL de buffer N3, se invirtió 6 veces. Se

centrifugó el lisado a 13000rpm por 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a una columna Qiaprep SpinTM (Qiagen) y se centrifugó 60seg a 13000rpm, descartando luego el sobrenadante. Se lavó la columna con 750uL de buffer PE, centrifugando 60 segundos a 13000rpm. Se centrifugó nuevamente para eliminar el etanol residual. Se colocó la columna sobre un tubo de microcentrífuga nuevo y se agregó 25μL de buffer EB en el centro. Se dejó reposando 1min y se centrifugó 60 segundos a 13000rpm. El eluido final conteniendo ADN plasmídico se guardó a -20°C.

Inducción proteica en levaduras.

Para inducir la producción de DRU13 se utilizó protocolo de Henn (Henn 2010). Se inoculó una colonia transformante de W303 (con *dru13*-His PYES2) en 5 ml de medio líquido SC-U con glucosa y se dejó creciendo en una estufa a 30°C 16 horas con una agitación de 250 rpm. Pasado el lapso, se inoculó ese volumen de cultivo en 250mL de SC-U y se dejó creciendo overnight. Se pasó el cultivo de levaduras a 5 tubos de 50mL y se centrifugó a 10000g, 4°C por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 10mL de medio YP (1% extracto de levadura y 2% peptona) en cada tubo. En este paso, se colecto muestra equivalente a la hora 0 y se la guardó a -80°C para asegurarnos de que en la misma no haya inducción. Se centrifugó a 10000g, 4°C por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Luego se resuspendieron las muestras en 200mL (40mL en cada tubo) de medio YPG (YP + 2% galactosa), se pasó el contenido de los tubos a un matrás de 1L y se dejó creciendo a 30°C. Se sacaron muestras a las 4, 8 y 24 horas (para cada hora se sacaron 2 muestras, cada una con alrededor de 35mL), las cuales fueron luego centrifugadas a 10000g, 4°C por 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y las muestras se guardaron a -80°C. Paralelamente se realizó una inducción proteica con una colonia transformante de W303 con PYES2 vacío de igual manera que la anterior.

Lisis de levaduras y preparación de muestras proteicas.

La lisis de levaduras se llevó a cabo siguiendo protocolo en Current Protocols (Ausubel et al., 2003). Las muestras obtenidas a partir del proceso de inducción protéica

anteriormente descrito fueron descongeladas y resuspendidas con 5 mL de buffer de ruptura (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazol, PH=8) e inmediatamente centrifugadas a 1500g por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se le agregó 350uL de buffer de ruptura. Se le agregó volumen similar de *acid-washed glass beads* (Sigma-AldrichTM), y se sometió las muestras a un ciclo de 4 repeticiones de vortexeo por 30 segundos seguido de un reposo en hielo también por 30 segundos. Se centrifugaron a 15000g por 10 minutos y los sobrenadantes conteniendo proteínas solubles fueron guardados a -80°C hasta la realización de la SDS-PAGE.

Medición de la concentración proteica.

Se estimaron las concentraciones de las muestras proteicas según protocolo de Bradford (Ausubel et al., 2003). Brevemente, se agito el reactivo de Bradford (Sigma^R), procurando su homogenización. Se prepararon los estándares proteicos de BSA (proteína de concentración conocida que se usó para estimar la concentración de la mezcla proteica cuya concentración es desconocida) agregando solución con BSA 2mg/mL y agua en diferentes tubos Eppendorf hasta llegar a 0,05mL en forma de dilución seriada. Se agregaron 0,05mL de extracto conteniendo proteínas solubles en otros tubos. Tanto a los tubos con BSA como a los que contenían muestras proteicas, se les agregó 1,5mL de reactivo de Bradford y se agitaron para homogenizar. Se pasaron los contenidos de los tubos a celdas de espectrofotometría y se midió la absorbancia de muestras y estándares a 595nm. Se compararon los valores de absorbancia de las muestras de proteínas solubles con los valores obtenidos en los estándares de BSA y se estimaron las concentraciones de dichas muestras, que estuvieron en el rango de 0,8 a 1,1mg/mL.

Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE.

Se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida al 10% para visualizar la proteína expresada (Sambrook y Russell 2001). Se procedió del siguiente modo: Gel de resolución (6 ml): 2.52 ml de H₂O miliQ, 1,5 ml de 4x lower gel buffer pH 8.8 (36.4% Tris-HCl, 0,8% SDS), 1,98 ml de acrilamida:bisacrilamida (30:8), 3 µl de Temed, 45 µl de APS 10%. Gel concentrador (3 ml): 1,75 ml de H₂O miliQ, 0.75 ml

de 4 x upper gel buffer PH=6,8 (6,05% Tris-HCl, 0,4% SDS), 0,5 ml de acrilamida:bisacrilamida, 1.5 µl de Temed, 25 µl de APS 10%. Se dejó polimerizar cada uno de los geles alrededor de 30 minutos.

Las muestras se procesaron de la siguiente manera: se tomaron 19 µl de cada una y se mezclaron con 6 µl de sample buffer 4X (3.02 g Tris Base, 40 ml glicerol, 8 g SDS, 20 mL b-mercaptoetanol, 0.004 g bromofenolblue, agua mQ hasta 100 mL), incubándose a 100 °C durante 5 minutos.

En cada pocillo del gel se sembró el mismo volumen de muestra (25 µl) cada una con una concentración de entre 0,8 y 1mg/mL. La corrida se realizó a 200 Volts. Las proteínas se corrieron con running buffer 1X (running buffer 4X + 1% SDS). La tinción se realizó con azul de Coomasie (0.4 g Coomasie brilliant blue, 250 ml de isopropanol, 100 ml ácido acético), durante 25 minutos con agitación. Por último se destiñó el gel con buffer de desteñido (40% metanol, 10% ácido acético) durante toda la noche.

Runing Buffer 4X: 12 g/L Tris base; 57.68 g/L Glicina.

Purificación proteica por medio de columnas de Ni-NTA.

Se realizó la purificación proteica mediante protocolo y reactivos de The QiaExpressionist™ (Qiagen, Germany). Esta técnica permite, mediante interacción entre epítoto histidina y átomos inmovilizados de níquel, el aislamiento de proteínas con el epítoto histidina presentes en una muestra de lisis o extracción proteica, facilitando la visualización o detección de dichas proteínas. Se colocó una columna QiaExprssionist sobre un tubo de colección. Se equilibró la columna con 600uL de buffer NPI-10 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazol, PH=8) y se centrifugó por 2 minutos a 890g. Se eliminó el *flow trough*. Se agregó 600uL de lisado de proteínas (un lisado se corresponde con las muestras de 4 y 8 horas mezcladas y otro con muestra de 24 horas) y se centrifugó por 5 minutos a 270g. Se repitió 2 veces más y se colectó el *flow trough*. Posteriormente se lavó la columna con buffer 600uL de buffer NPI-20 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM imidazol, PH=8), centrifugando 2 minutos a 890g. Se repitió éste paso. Por último se colocó la columna sobre un tubo Eppendorf estéril y se eluyó la proteína con 100uL de buffer NPI-500 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 500mM imidazol, PH=8) centrifugando 2 minutos a

890g. Se agregó nuevamente buffer NPI-500 y se centrifugó 2 minutos a 890g obteniéndose 2 eluidos. Las muestras de purificación se guardaron a -20°C.

Protocolo de *Western blot*.

Este procedimiento se utilizó para detectar a DRU13 en muestras de lisis (extracto crudo) y muestras de purificación proteica (mediante columnas de NiNTA). Brevemente, éste procedimiento consiste en la transferencia e inmovilización de proteínas desde un gel hasta una membrana sólida (por ejemplo nitrocelulosa). La membrana posteriormente es incubada con anticuerpo primario (anti-epítotope histidina en nuestro caso) y luego con anticuerpo secundario conjugado a enzima (el anticuerpo secundario es capaz de reconocer y pegarse al primario). Se agrega una solución con sustrato que es procesado por la enzima y se produce una reacción que puede detectarse por diferentes maneras, en nuestro caso es una reacción quimioluminiscente que se detecta por autoradiografía. Para la realización de este procedimiento se siguió protocolo para western blot húmedo (Ausubel et al., 2003). Las muestras proteicas que fueron sometidas a este proceso se corrieron por SDS-PAGE. Se agregó en el mismo gel 5uL de marcador coloreado (Prestained Molecular Marker, PierceTM). Posteriormente, el gel a transferir se equilibró en buffer de Towbin (6, 14g/L de Tris base, 27,8g/L de glicina, 1g/L SDS y 200mL de metanol) y se prosiguió según protocolo de miniEV Electroforesis and Electrotransfer Unit (Amersham^R, USA) Se cortó la membrana del mismo tamaño que el gel, se sumergió en agua mQ y luego se dejó reposar de 3 a 5 minutos en buffer Towbin. Se humedeció con buffer también el papel de filtro y las esponjas. Se ensambló el sándwich de transferencia de la siguiente manera: Sobre una tapa o bandeja se colocó el cassette de transferencia (miniEV Electroforesis and Electrotransfer Unit, Amersham^R) y se agregó, sobre el cátodo (electrodo negativo), esponja, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro, dos esponjas. Se cerró el cassette por el ánodo (electrodo positivo). Se colocó el cassette en la cuba de transferencia y se agregó alrededor de 350 ml de buffer de Towbin previamente refrigerado en el cassette cerrado. Se llenó la cuba de transferencia con 1,8 litros de agua mQ refrigerada. Se setó la unidad (Amersham^R EP301) a 30V, la corriente hasta 350 mA por 2 horas y se comenzó la transferencia. Cuando se cumplió el lapso de tiempo, se detuvo la transferencia y se desensambló el cassette. La membrana se colocó en una

bandeja, y se realizó tinción con colorante Ponceau S (0,1% de Ponceau S de Sigma P3504, 5% ácido acético) para visualizar el resultado de la transferencia de proteínas. Se agitó manualmente por 5 minutos y se lavó con agua destilada (Ausubel et al., 2003).

Se Colocó la membrana en una bandeja pequeña y 50ml de buffer de bloqueo (2g/L caseína; 1g/L Tween 20; 6,07g/L Tris; 8,57g/L NaCl). Se dejó agitando suavemente overnight. Se realizó la dilución del anticuerpo primario anti-histidina en buffer de bloqueo. La dilución fue de 1/1000. Se removió la membrana de la bandeja se colocó en una placa de vidrio con 5ml de dilución de anticuerpo primario. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se colocó la membrana sobre una bandeja y se lavó con 50ml de buffer de lavado (Tween 20 TBS) 15 minutos con agitación, repitiendo el proceso de 4 a 6 veces. Posteriormente se realizó la dilución del anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rabanito en buffer de bloqueo, y la misma fue 1/20000. Se colocó membrana nuevamente en placa de vidrio y se le agregó 20 ml de dilución de anticuerpo secundario dejando en agitación. Se Repitió el paso de lavado.

Se preparó *Working Solution* (la cual posee luminol, que es el sustrato de la peroxidasa) mezclando partes iguales de la solución *Luminol/enhancer* y *Stable Peroxide* (West Pico Quemiluminiscent KitTM, Pierce). Se colocó la membrana en placa de Petri y se agregó 4mL de *Working Solution*, incubando por 5 minutos. Se quitó la membrana y se la colocó sobre plástico protector, se secó brevemente pero con la precaución de que la membrana mantuviera humedad. Se cubrió la totalidad de la membrana con el protector plástico y se colocó el conjunto en un cassette para films de revelado tomando como referencia la posición de la membrana para posteriormente poder marcar posición de cada carril. Se colocó cuidadosamente una pieza de film encima de la membrana y se expuso por 30 y 60 segundos, 5, 15 y 30 minutos, 1 y 24 horas. Se reveló el film fotográfico incubándolo en solución de revelado (0,02% metilfenidona, 0,5% hidroquinona, 10% sulfito de sodio, 0,5% hidróxido de potasio, 6% tiosulfato de amonio) por 8 minutos y luego solución de fijado (15% tiosulfato de sodio, 5% sulfato de sodio) por 1 minuto.

○ Bibliografía.

- Agrios GN.** (2004). Plant Pathology. Ed.5. Academia Press, San Diego, CA. ISBN 0-12-044565-4.
- Aldabalde F, Dogliotti N.** (2002). Bases fisiológicas del crecimiento y desarrollo del cultivo de papa. Publ. fagro.
- Andersson-Gunnera S, Mellerowicz EJ, Love J, Segerman B, Ohmiya Y, Coutinho PM, Nilsson P, Henrissat B, Moritz T, Sundberg B.** (2005). Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in Populus: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. *The Plant Journal* 45, 144–165.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston R, Moore D, Smith J, Seidman J, Struhl K.** (2003). Currents protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 0-471-50338-X.
- Ballaré CL.** (2011). Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. Elsevier. *Trends in Plant Science*. Vol 16.N 5. 1360-1385.
- Belkhadir Y, Subramaniam R, Dangl JL.** (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS–LRR proteins and their partners. *Current opinion in Plant Biology*. 7:391-399.
- Boller T, He SY.** (2009). Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*. 2009 May 8; 324(5928): 742–744.
- Bolwell GP, Daudi A.** (2009). Reactive Oxygen Species in Plant–Pathogen Interactions. Signaling and Communication in Plants, DOI 10.1007/978-3-642-00390.
- Bowles D, Isayenkova J, Lim EK, Poppenberger B.** (2005). Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr Opin Plant Biol* 8: 254-263.
- Bowles D, Lim EK, Poppenberger B, Vaistij FE.** (2006). Glycosyltransferases of Lipophilic Small Molecules. *Annu Rev Plant Biol*.
- Brazier-Hicks M, Edwards R** (2004). Functional importance of the family 1 glucosyltransferase UGT72B1 in the metabolism of xenobiotics in Arabidopsis Thaliana. *The Plant Journal* (2005) 42, 556–566.
- Caputi L, Malnoy M, Goremykin V, Nikiforova S, Martens S.** (2011). A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land. *The Plant Journal* 69:6 1030-1042.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B and Staskawicz BJ.** (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* 124:803–814.
- Chong S, Shao Y, Paulus H, Benner J, Perler FB, Xu MQ.** (1996). Protein Splicing Involving the *Saccharomyces cerevisiae* VMA Intein. Vol. 271, No. 36, pp. 22159 – 22168.
- Chong J, Baltz R, Fritig B, Saindrenan P.** (1999). An early salicylic acid pathogen- and elicitor-inducible tobacco glucosyltransferase: role in compartmentalization of phenolics and H₂O₂ metabolism. *FEBS Letters* 458 (1999) 204-208.
- Cohn J, Sessa G, Martin GB.** (2001). Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol* 13: 55-62.
- Cullis CA.** (2004). Plant genomics and proteomics. John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 0-471-37314-1.

- Czajkowski R, Jafra S.** (2009). Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Act Biochim Pol* 56: 1-16.
- Czajkowski R** (2011). Ecology and control of *Dickeya* spp. in potato. Phd thesis, 1: 9-19.
- Dangl JL & Jones JDG.** (2006). The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Davidsson PR, Kariola T, Niemi O, Palva ET.** (2013). Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. *Front plant Sci* 4: 191.
- Deak T, Beuchat LR.** (1996). Handbook of food spoilage yeasts. CRS Press, Inc. Boca Raton, Fl. 210 pp.
- Dujon B.** (1996). The yeast project: what did we learn. *Trends. Genet.* 7: 263-270.
- Edreva A.** (2005). Pathogenesis related proteins: Research Progress in the last 15 years. *Gen. Apl. Plant. Physio.* 31(1-2), 105-124.
- Ferrari S, Savatin DV, Sicilia F, Gramegna G, Cervone F, De Lorenzo G.** (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Plant Pathology.* Vol 11: 1-19.
- Flor HH** (1971) Currents status of gene-for-gene. *Annv. Rev. Phytopatol.* 9: 275-296.
- Gachon CM, Langlois-Meurinne M, Saindrenan P.** (2005). Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci* 10: 542-549.
- García Ma, Sarmiento ME, Coria R, Kawasaky L, Ongay L, de la Rosa JF, Acosta A.** (2007). Expresión heteróloga de un péptido multiepitópico de células B de *M. tuberculosis* en *Saccharomyces cerevisiae*. *Vaccinmonitor* vol. 3, 1-12.
- Grubb D, Zipp BJ, Muller JL, Masuno MN, Molinski TF, Abel S.** (2004). Arabidopsis glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *The Plant Journal* 40, 893–908.
- Guerrero Olarzá M, Cab-Barrera EL, Galán-Wong LJ, Viader-Salvado JM** (2004). Biotecnología de las proteínas recombinantes para su aplicación en la acuicultura. *Memorias del 7 Simposio de nutrición acuícola.* 1-23.
- He P, Sheen J, Shan L.** (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cell. Microbiol.* 9 (6): 1385-1396.
- He SY & Boller T.** (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324: 742-744.
- Henn.** (2010). Over-expression, purification and characterization of Adh5p from *Saccharomyces cerevisiae*. Magister thesis. Faculty of Natural and Agricultural Science. 1: 1-115.
- Heil M, Bostock RM.** (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Ann Bot (Lond)* 89: 503-512
- Holton N, Caño-Delgado A, Harrison K, Montoya T, Chory J, Bishop GJ.** (2007). Tomato BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 Is Required for Systemin-Induced Root Elongation in *Solanum pimpinellifolium* but Is Not Essential for Wound Signaling. *The Plant Cell*, Vol. 19: 1709–1717.
- Jadhav SKR, Patel KA, Dholakia BB, Khan BM.** (2012). Structural characterization of a flavonoid glycosyltransferase from *Withania somnifera*. *NCBI.* 8(19): 943–949.
- Jeworutzki E, Roelfsema MRG, Anshu U, Kroll E, Elzenga JM, Felix G, Boller T, Hedrich R, Becker D.** (2010). Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels. *The Plant Journal.* 62, 367–378.

- Jones EW, Pringle JR, Broach JR.** (1992). The Molecular and Cell Biology of *Saccharomyces cerevisiae*, Vol. 2. Gene Expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.
- Jones P, Vogt T.** (2001). Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* **213**: 164-174.
- Kim Y, Wang Y, Liu Z, Kolattukudy PE.** (2002). Identification of a hard surface contact-induced gene in *Colletotrichum gloeosporioides* conidia as a sterol glycosyltransferase, a novel fungal virulence factor. *The Plant Journal*. 30(2), 177-187
- Kim J, Li X, Roden JA, Taylor KW, Aakre CD, Su B, Lalonde S, Kirik A, Chen Y, Baranage G, McLane H, Martin G, Mudgett MB.** (2009). *Xanthomonas* T3S effector XopN suppresses PAMP-Triggered immunity and interacts with tomato atypical receptor-like kinase and TFT1. *Plant cell* **21**: 1305-1323.
- Langlois-Meurinne M, Gachon CMM, Saindrenan P.** (2005). Pathogen-Responsive Expression of Glycosyltransferase Genes UGT73B3 and UGT73B5 Is Necessary for Resistance to *Pseudomonas syringae* pv tomato in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, Vol. 139, pp. 1890–1901.
- Lim EK, Bowles DJ.** (2004). A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *The EMBO Journal* 23, 2915–2922.
- Lorenc-Kukula K, Jafra S, Oszmianski J, Szopa J.** (2005). Ectopic expression of anthocyanin 5-o-glucosyltransferase in potato tuber causes increased resistance to bacteria. *J Agric Food Chem* **53**: 272-281.
- Luna E, Bruce TJA, Roberts MR, Flors V, Ton J.** (2012). Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiology*. Vol. 158, pp. 844–853.
- Mae A, Montesano M, Koiv V, Palva T.** (2001). Transgenic plants producing the bacterial pheromone N-Acyl-Homoserine-lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. *The American Phytopathology Society*. Vol 14, N 9: 1035-1042.
- Mahmoudi E, Hasanzadeh N, Sayed Tabatabaei BE, Venturi V** (2011). Isolation and identification of N-acylhomoserine lactone degrading bacteria from potato rhizosphere. *Afr J Microb Res* 5(13): 1635-1642.
- Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G.** (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 23-61.
- Mauch-Mani B, Mauch F.** (2005). The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 8:409–414.
- Moh AA, Massart S, Jijakli MH, Lepoivre P.** (2012). Models to predict the combined effects of temperature and relative humidity on *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* population density and soft rot disease development at the surface of wounded potato tubers. *Journal of Plant Pathology* 94: 181-191.
- Monaghan J, Zipfel C.** (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol*. 15(4):349-57.
- Montesano M, Broader G, Palva T.** (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol. Plant. Pathol.* **4** (1): 73-79.
- Montesinos E, Bonaterra A, Badosa E, Frances J, Alemany J, Llorente I, Moragrega C.** (2002). Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *Int Microbiol* **5**: 169-175.
- Newton JA, Fray RG.** (2004). Integration of environmental and host-derived signals with quorum sensing during plant–microbe interactions. *Cell Micro* 6: 213-224.
- Osmani SA, Bak S, Imberty A, Olsen CA, Lindberg Møller B.** (2008). Catalytic Key Amino Acids and UDP-Sugar Donor Specificity of a Plant

- Glucuronosyltransferase, UGT94B1: Molecular Modeling Substantiated by Site-Specific Mutagenesis and Biochemical Analyses. *Plant Physiology*, Vol. 148, pp. 1295–1308.
- Pérombelon MCM**. (2002). Potatoe diseases caused by soft rot *Erwinias*: overview of pathogenesis. *Plant Pathology* 51: 1-12.
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C,-Reyes AL, Van Wees CSM**. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2012. 28:28.1–28.33.
- Ponce de León I, Montesano M**. (2013). Activation of Defense Mechanisms against Pathogens in Mosses and Flowering Plants. *Int. J. mol.* 4;14(2):3178-200.
- Pöllumaa L, Alamäe T, Mäe A**. (2012). Quorum Sensing and Expression of Virulence in *Pectobacteria*. *Sensors* 12: 3327-3349.
- Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshyn D, Sieberer T, Schuhmacher R, Krska R, Kuchler K, Glossl J, Luschnig C, Adam G**. (2003). Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 278: 47905-47914.
- Romanos MA, Makoff AJ, Fairweather NF, Beesley KM, Slater DE, Rayment FR, Paynel MM, Clare JJ**. (1991). Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA. *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, No. 7 1461.
- Ron M & Avni A**. (2004). The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant cell* 16: 1604-1615.
- Ross J, Li Y, Lim E, Bowles DJ**. (2001). Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol* 2.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD**. (1996). Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, Vol. 8, 1809-1819.
- Sambrook J, Russell D**. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Shah J, Zeier J**. (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Plant Sci.* 22; 4: 30.
- Shao H, He X, Achnine L, Blount JW, Dixon RA, Wang X**. (2005). Crystal Structures of a Multifunctional Triterpene/Flavonoid Glycosyltransferase from *Medicago truncatula*. *The Plant Cell* 5 vol. 17 no. 11 3141-3154.
- Sherman F**. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 350, 3-41.
- Spooner DM, McLean K**. (2005). A single domestication of potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 14694–14699, doi: 10.1073.
- Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JDG**. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268, 661-667.
- Thomma B, Eggermont K, Penninckx I, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA, Broekaert WF**. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15107-15111.
- Tor M, Lotze2 MT, Holton N**. (2009). Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No. 13, pp. 3645–3654.
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JLG**. (2006). Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology*, Vol. 141, pp. 373–378.

- Valdés j, Mantilla E, Márquez G1, Bonilla RM, Lugo VM, Pérez M, García Y, Narciandi E.** (2009). Improving the expression of Human Epidermal Growth Factor in *Saccharomyces cerevisiae* by manipulating culture conditions. *Biotecnología Aplicada* 2009; 26:34-38.
- van der Merwe JJ, Coutinho LA, Korsten L and van der Waals JE.** (2010). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. *Euro J Plant Pathol* 126: 175-185.
- van Hulten M, Pelser M, van Loon LC, Pieterse MJ, Ton J.** (2006). Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *PNAS*. Vol103. N 14.
- van Loon VL, Rep M, Pieterse CMJ.** (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. 44:135–62.
- Veronese P, Nakagami H, Bluhm B, AbuQamar S, Xi Chen S, Salmeron J, Dietrich R, Hirt H, Mengiste T.** (2006). The Membrane-Anchored BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 Plays Distinct Roles in *Arabidopsis* Resistance to Necrotrophic and Biotrophic Pathogens. *The Plant Cell*. Vol 18. 257-263.
- Vilaró F.** (1990). Programa de mejoramiento genético de papa en Uruguay. Centro Internacional de la papa. INTA. PROCIPA. Cap 2: 19-29.
- Vogt T, Grimm R, Strack D.** (1999). Cloning and expression of a cDNA encoding betanidin 5-O-glucosyltransferase, a betanidin- and flavonoid specific enzyme with high homology to inducible glucosyltransferases from the Solanaceae. *The Plant Journal* (1999) 19(5), 509±519.
- Vogt T, Jones P.** (2000). Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci* 5: 380-386.
- Wald FA, Kissen R, du Jardin P, Moreno S.** (2003). Characterization of UDP-glucose:protein transglucosylase genes from potato. *Plant Molecular Biology* 52: 705–714, 2003.
- Weller DM, Mavrodi DV, van Pelt JA, Pieterse CMJ, van Loon LC, Bakker PAHM.** (2012). Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana* Against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas fluorescens*. *The American Phytopatologist Society*. Vol. 102, No. 4.
- White PJ, Broadley MR.** (2003). Calcium in Plants. *Annals of Botany*. 92:487-513.
- Wojtaszek.** (1997). Oxidative Burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322, 681-692.

