



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA
MEDIR EL FLUJO DE CARBONO DE HOJAS
DE PLANTAS DE *NICOTIANA TABACUM*
INFECTADAS POR EL PATÓGENO
PSEUDOMONAS SYRINGAE.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

SILVIA ARMENTA JAIME



Tutor: DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

MÉXICO, D. F.

Enero 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA MEDIR EL FLUJO DE CARBONO DE HOJAS DE PLANTAS DE *NICOTIANA TABACUM* INFECTADAS POR EL PATÓGENO *PSEUDOMONAS SYRINGAE*.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto en el laboratorio 114, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Alejandro Sosa Peinado	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM
Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM

El proyecto fue apoyado por CONACYT (90021) y PAPIIT (IN203708). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marina Gavilanes Ruiz	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dr. Blas Lotina Henksen	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, en el Laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

El trabajo se realizó con apoyos de:

PAPIIT IN203708, DGAPA, UNAM

CONACYT 90021

Beca para la realización de Tesis de Maestría otorgada por CONACYT

Beca para la terminación de Tesis de Maestría otorgada como parte del proyecto PAPIIT IN203708.

Se reconoce a la M.en C. Beatriz King Díaz por su asistencia técnica.

Se reconoce a la M. en C María Manuela Nájera Martínez por su asistencia en las técnicas de biología molecular implementadas en este trabajo.

Se reconoce a la Q. Laurel Elidé Fabila Ibarra por su apoyo en el manejo y mantenimiento de las plantas en el invernadero.

Agradecemos al Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra por proporcionarnos las semillas de *Nicotiana tabacum* además de la cepa de *Pseudomonas syringae*, así como por su apoyo a lo largo de la realización de este trabajo.

Agradecemos al Dr. Alejandro Sosa por su ayuda y sugerencias durante el transcurso del proyecto y en especial por su apoyo en la optimización de las técnicas para determinar la funcionalidad del biosensor.

Agradecemos al Dr. Martín González Andrade por su ayuda en la caracterización *in vitro* de los biosensores.

ABREVIATURAS

ABA	Acido Abscísico
AtSTP4	Transportador de Hexosas 4 de Arabidopsis thaliana
BSA	Albúmina de suero bovino
CDPK	Proteínas cinasas dependientes de calcio
CFP	Proteína Cyan Fluorescente
dpi	Días post-infección
FLIP	Proteína Indicadora Fluorescente
FLIPglu F16AΔ13	Proteína Indicadora Fluorescente de glucosa F16A Delta 13
FLIPmal	Proteína Indicadora Fluorescente de unión a maltosa
FRET	Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente
FM	Flujo Muerto
Genes PR	Genes relacionados con patogénesis
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GPA1	Proteína-G subunidad alfa 1
HR	Respuesta Hipersensible
HXK1	Hexocinasa 1
Kd	Constante de Disociación
KDa	Kilodaltons
LB	Medio Luria-Bertain
LB-Amp	Medio Luria-Bertain-ampicilina
LRR	Regiones ricas en Leucina
MST	Transportadores de Monosacaridos
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
NtMST1	Transportador de Monosacáridos 1 de <i>Nicotiana tabacum</i>
PBPs	Proteínas de Unión del Periplasma
pRSETflipglu	Vector pRSETflipglu
SAR	Resistencia Sistémica adquirida
SnRK	Proteínas cinasas tipo Snf-1
Susy	Sacarosa sintasa
TBS	Amortiguador Tris-Salino
TTBS	Amortiguador Tris-Salino-Tween 20
YFP	Proteína Yellow Fluorescente
ZmTH	Transportador de Hexosas de Maíz

1 RESUMEN

Los carbohidratos son sintetizados en plantas en los tejidos fuente y suministrados a los tejidos que demandan un aporte de nutrimentos y energía, pero además son moléculas que inducen o reprimen la expresión de genes bajo circunstancias normales del desarrollo de la planta o bajo situaciones de estrés. Está documentado que cuando ocurre la interacción de una planta con un patógeno hay un cambio en el metabolismo de carbono por lo que en este trabajo exploramos si en la interacción *Nicotiana tabacum*-*Pseudomonas syringae* se modificaba el metabolismo de carbohidratos, a través de medir el contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón, además de determinar el nivel de expresión de los transportadores de hexosas.

Las concentraciones de glucosa y fructosa aumentaron en el tejido infectado con el patógeno a los tiempos de 12 y 15 dpi, respecto al tejido control, mientras que la concentración de sacarosa no aumento de manera significativa. La cantidad de almidón fue mayor en el tejido infectado únicamente en el día uno de tratamiento.

Por otro lado el nivel de expresión de los transportadores de hexosas también fue mayor en el tejido infectado a los 12 y 15 dpi. También se analizó la expresión del transcrito NtMST1, el cual aumentó durante las primeras 72 horas en el tejido infectado. Por lo que durante la infección de *Nicotiana tabacum* por *Pseudomonas syringae* si hay una modificación del metabolismo primario de la planta para contender contra el patógeno.

Teniendo presente la importancia de la glucosa como una molécula señal y que este carbohidrato se ve incrementado durante la interacción planta-patógeno, se obtuvieron en este trabajo las herramientas experimentales para determinar las concentraciones de glucosa citoplásmicas en hojas de plantas de tabaco. El uso del biosensor se plantea para un proyecto futuro.

Para determinar si los cambios en el contenido de glucosa son a nivel intracelular se estudiaron 4 biosensores. Estos se adquirieron a la compañía ADDGENE y presentan afinidades distintas por su ligando FLIPglu700nMDelta13, FLIPglu3.2mMDelta13, FLIPglu600μMDelta13 y FLIPglu600μMDelta13Afrodita. Para usarlos *in planta* se tuvieron que clonar en un vector binario y para confirmar su capacidad de percibir glucosa se purificó la proteína y se midió su actividad por FRET. Los gráficos obtenidos para cada uno de los biosensores purificados no mostraron los espectros característicos que indican que hubo transferencia de FRET, por lo que probablemente el procedimiento utilizado daño la conformación de dichas proteínas.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Mecanismos de transducción de señales por carbohidratos.

En las plantas la síntesis de carbohidratos a través de la fotosíntesis es un proceso vital, debido a que estos son fuente de carbono, energía además de ser parte de los sistemas de transducción de señales. La sacarosa es sintetizada durante la fotosíntesis en los tejidos fuente (hojas maduras) y su exceso es transportado a través del floema hacia los tejidos demanda como son las raíces, flores, meristemos, frutos, hojas jóvenes, entre otros (Rolland, *et al.*, 2002).

La sacarosa en el tejido demanda puede ser vertida directamente en el interior de la célula o ser hidrolizada en el apoplasto por las invertasas de la pared celular. Si es transportada al interior celular como sacarosa, entonces puede seguir dos caminos, el primero es su hidrólisis a través de las invertasas citoplásmicas, vacuolares o por la sacarosa sintasa. La segunda vía es almacenarla como sacarosa en la vacuola o como almidón, en el cloroplasto o en los amiloplastos (Lalonde, *et al.*, 1999).

Las plantas se desarrollan con la influencia de estímulos que provocan la emisión de señales que pueden ser reconocidas, integradas y traducidas en respuestas a nivel celular (Rolland *et al.*, 2002). Trabajos anteriores han propuesto que la concentración y distribución de la sacarosa es percibida por la planta a lo largo de su desarrollo, pero también la glucosa, la fructosa y la trealosa 6P, todas ellas llevan a la modificación en la expresión de genes sobre todo de vías metabólicas en donde se usa el carbono (Rolland, *et al.*, 2006). Altas concentraciones de carbohidratos disminuyen la expresión de genes que fijan el CO₂, así como los involucrados en la síntesis de almidón entre otros, y de manera opuesta ocurre con el ayuno o baja concentración de carbohidratos (Koch, 2004). La distribución del carbono proveniente de sacarosa o hexosas dependerá de las necesidades fisiológicas de la planta así como de las condiciones ambientales y hormonales.

Se desconoce cuáles son las proteínas y en qué lugar se lleva a cabo la percepción de la concentración de carbohidratos, se ha sugerido que sea a nivel de las proteínas membranales así como de las citosólicas. Es factible que cambie la concentración de la glucosa y que se encuentre en zonas restringidas de la célula a tiempos en los que se necesita cambiar el metabolismo celular, como se ha descrito para los cambios localizados en las concentraciones de calcio, por lo que se hace necesario determinar si existen estos cambios y qué tipo de factores ambientales o internos modifican las

concentraciones de glucosa para favorecer la modificación global del metabolismo. La detección de cambios en la concentración de glucosa y su concentración mínima necesaria para modificar el metabolismo aún se desconoce.

Sin embargo se han propuesto algunos mecanismos donde se menciona el papel de los carbohidratos en la transducción de señales, siendo tres los sistemas principales (Figura 1). El dependiente de hexocinasa sugiere que la glucosa al ser transportada al interior es fosforilada por la hexocinasa (Figura 1a) y que el cambio conformacional de la proteína es transducido a otras proteínas para modificar la expresión de genes, de esta manera se propone que la hexocinasa participa como un amplificador o propagador de la señal en respuesta a carbohidratos. Las evidencias sobre la participación de la hexocinasa como parte de una vía de transducción de señales fueron obtenidas inicialmente por ensayos farmacológicos utilizando análogos de la glucosa como la 2-deoxiglucosa y la 6-deoxiglucosa. Se ha encontrado que en muchos casos el transporte del carbohidrato no es un paso limitante, pero que su fosforilación es el requisito indispensable para que se observen los cambios en la expresión de genes, por ejemplo se ha observado que la 2-deoxiglucosa reprime la expresión de genes involucrados en la fotosíntesis en maíz (Jang y Sheen, 1994), lo cual no sucede si se adiciona 6-deoxiglucosa análogo de glucosa no fosforilable, o bien añadiendo inhibidores de la hexocinasa, como la manoheptulosa.

Durante la senescencia de las plantas se observa una disminución en el contenido de clorofila, así como disminución de la actividad fotosintética, lo cual está relacionado con el efecto represivo de los carbohidratos sobre la expresión de genes involucrados con la fotosíntesis, y podría estar involucrado el mecanismo de señalización dependiente de la hexocinasa. La evidencia de que la hexocinasa es una de las enzimas clave en esta vía la presentó el grupo de Jan Sheen en el 2003, en el que produjeron plantas mutantes de *Arabidopsis* sin hexocinasa1 (*hxc1*), una hexocinasa mutada en el sitio de unión del ATP y otra en el de transferencia del Pi hacia la glucosa, los resultados obtenidos fueron que las mutantes en el sitio activo de la enzima no fosforilan pero sí siguen presentando una respuesta o sensibilidad a la glucosa durante su crecimiento, es decir, si se germinaban en presencia de glucosa su crecimiento se reducía, mientras que por supresión de la enzima la planta no reducía su crecimiento (Moore, *et al.*, 2003). A pesar de que se reconoce que la *hxc1* de *Arabidopsis* es una de las proteínas involucradas en la transducción de señales por carbohidratos se desconoce cuáles son las proteínas con las que se comunica y porqué se desplaza o cambia de localización subcelular.

Otro mecanismo propone que no toda la glucosa que se transporta es fosforilada, reportes que apoyan esta propuesta son los que se obtuvieron en *Chenopodium rubrum* en donde la glucosa y análogos de glucosa que no son fosforilados son capaces de inducir la expresión de genes que codifican para la invertasa de pared celular, así como para la sacarosa sintasa (SuSy) (Rolland, *et. al.*, 2001), es decir hay un sistema independiente de la hexocinasa capaz de tener un efecto regulatorio.

En levadura uno de los sistemas de transducción de señales encendido por carbohidratos, le permite a las levaduras sintetizar transportadores de hexosas con una afinidad adecuada para transportar a la glucosa del medio externo. Curiosamente las dos proteínas que se encargan de percibir la concentración de glucosa extracelular son proteínas con una semejanza estructural alta a proteínas transportadoras de hexosas, sin embargo éstas carecen de la capacidad de transportar al carbohidrato. Snf3 y Rgt2 son las dos proteínas homologas al transportador de glucosa, en donde Snf3 detecta bajas concentraciones de glucosa y activa la expresión de un transportador de glucosa de alta afinidad, mientras que Rgt2 hace lo opuesto, detecta concentraciones altas de glucosa e induce la expresión de los transportadores de baja afinidad (Rolland *et al.*, 2001; Ozcan y Johnston, 1999). Por lo descrito en levadura se ha propuesto que un mecanismo similar podría existir en plantas (Figura 1b), sin embargo no se ha encontrado que alguno de los transportadores ya sea de sacarosa o hexosas tenga la capacidad de percibir sin transportar al carbohidrato, pese a que se ha observado un cambio en la expresión de estos transportadores de carbohidratos cuando se embebe el tejido en diferentes concentraciones y/o diferentes tipos de carbohidratos (Lalonde *et al.*, 2004, Delrot, *et al.*, 2000).

La figura 1c señala otro mecanismo de señalización independiente de hexocinasa, en el que la glucosa es percibida por receptores de membrana que están acoplados a la subunidad alfa de la proteína G (GPA1). En *Arabidopsis* hay dos posibles proteínas receptoras que podrían interactuar con la proteína GPA1, la GCR1 (receptor 1 acoplado a proteínas G) y la RGS1 (proteína reguladora por señalización de proteína G). Estas dos proteínas son antagonistas, de manera que la represión de RGS1 provoca un aumento de GCR1, cambios que dan como resultado la elongación celular de hipocótilos en la oscuridad y el crecimiento celular de raíces expuestas a la luz (Chen *et al.*, 2003).

En los mecanismos de señalización por carbohidratos también están involucradas las proteínas cinasas dependientes de calcio (CDPK's) y las SnRK's (Figura 4d). Las CDPK's son inducidas específicamente por sacarosa, lo cual puede sugerir que el Ca^{++} podría ser un segundo mensajero en la señalización por carbohidratos (Rolland, *et al.*, 2006). Las SnRK's son proteínas específicas de plantas donde su regulación y función está involucrada con su activación por sacarosa, en la fosforilación de enzimas, y la activación de la síntesis de almidón en papa (Hao, *et al.*, 2003).

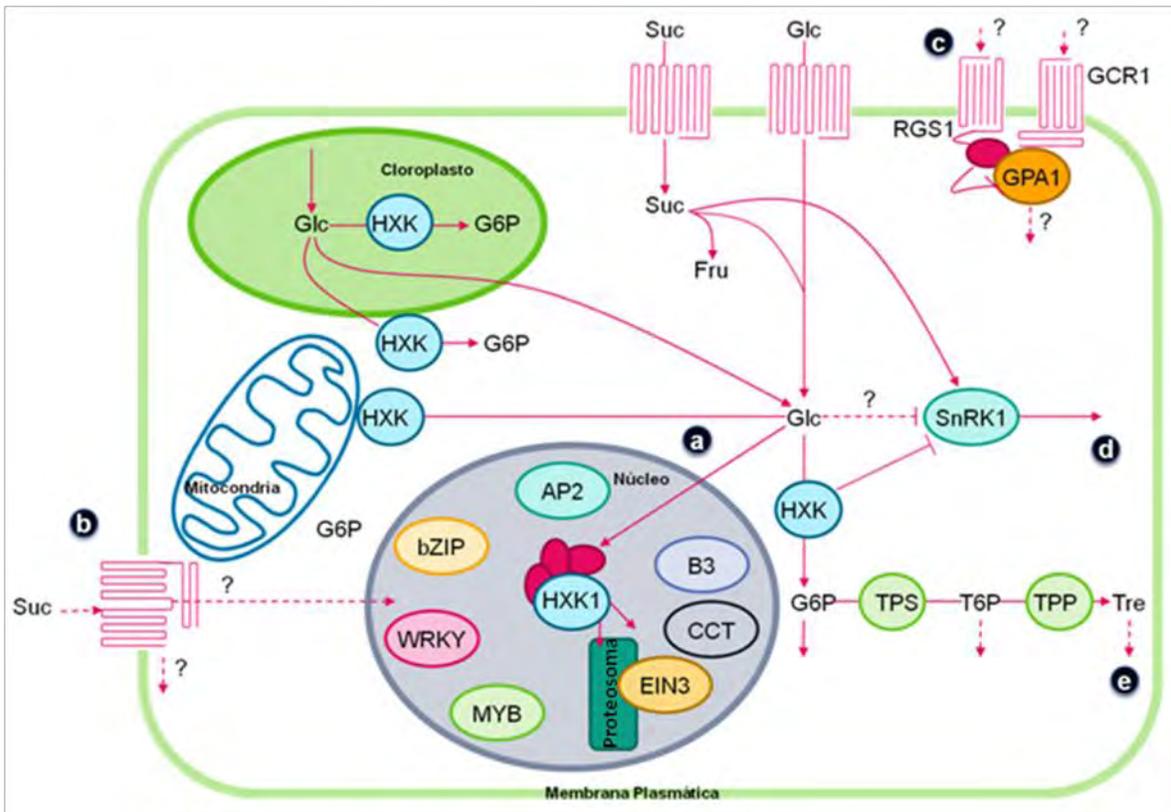


Figura 1. Modelo de los mecanismos de señalización por azúcares en plantas (Tomado de Rolland, *et al.*, 2006). (a) La HXK1 funciona como sensor de glucosa y puede estar asociada a la mitocondria, posiblemente como parte de un complejo glucolítico. Además la HXK1 podría estar asociada a un complejo proteico de alto peso molecular en el núcleo, donde se controla la transcripción y degradación mediada por el proteosoma del factor de transcripción EIN3. Otras HXK1 se asocian a la membrana externa de plastídios, incluyendo cloroplastos, o citosol, también se ha encontrado a la HXK1 en el estroma del cloroplasto. (b) La sacarosa y otros disacáridos, o bien las hexosas podrían ser detectados por homólogos de transportadores de la membrana plasmática. Los transportadores de monosacáridos podrían tener funciones similares a los receptores de membrana (c) acoplados a proteínas G. (d) Las proteínas SnRK's también tiene un papel importante en la señalización por carbohidratos, aunque aún se desconoce su regulación por la sacarosa y la glucosa 6P, pero se propone que la trehalosa-6P (e) es el carbohidrato que podría estarse percibiendo.

Generalmente las vías de señalización involucran varios elementos, los que perciben la señal, aquellos que producen el segundo mensajero y/o aquellos que forman macrocomplejos que amplifican la señal en zonas restringidas de la célula. Esto presenta grandes ventajas como poder amplificar o atenuar en mayor medida la señal original, además de que los mismos elementos pueden ser comunes en varias vías y presentar efectos sinérgicos o bien modificar la respuesta ante una gran variedad de estímulos externos (Rolland *et al.*, 2006).

La regulación del metabolismo de glucosa y la homeostasis es esencial para la sobrevivencia en todos los reinos; por ejemplo, alteraciones en la hexocinasa de humano pueden resultar en la aparición de la diabetes. Así la regulación de los niveles de carbohidratos en sangre, la óptima nutrición en levaduras, la coordinación de la actividad fotosintética y el mantenimiento de reservorios en plantas son algunos de los procesos que requieren una constante y fina regulación del metabolismo de la glucosa (Frommer, *et al.*, 2003). Visto de este modo, el conocer las vías de señalización, las proteínas sensoras de glucosa y sus metabolitos es esencial para entender la homeostasis. Para nosotros es importante determinar el nivel de los metabolitos, en particular la concentración de glucosa que es necesaria para producir un cambio en la expresión de genes involucrados en la respuesta a factores externos a la planta, como es el estrés por patógenos.

2.2 Interacción planta-patógeno

Las plantas a lo largo de su evolución han desarrollado diferentes estrategias que les han permitido adaptarse al medio ambiente en el que se encuentran, continuamente interactúan con una gran variedad de organismos con los que pueden establecer relaciones benéficas tanto para el hospedero como para el microorganismo, así como relaciones altamente perjudiciales para el hospedero. Como consecuencia de una estrecha coevolución, muchos microorganismos se desarrollan como una forma patogénica sólo en un número limitado de hospederos, frecuentemente a nivel de género, especies y subespecies. De igual manera las especies de plantas son susceptibles a pocas especies de patógenos (Heath, 2000), por lo que la interacción planta-patógeno ocurre de manera específica.

Cada patógeno desarrolla un mecanismo particular de infección en la planta, en principio lo que ocurre es la inoculación y penetración del mismo en el tejido, lo cual puede hacerlo a través de alguna apertura natural, por la secreción de enzimas hidrolíticas que producen el ablandamiento del tejido, por la presión mecánica ó invadiendo tejidos previamente dañados que llevan a la ruptura de la pared celular dando paso a la infección. Una vez dentro, el patógeno puede presentar varias estrategias de ataque, como la formación de estructuras especializadas que llevan a un estado de patogénesis crítico y a su proliferación y diseminación (Madriz, 2002).

Por ejemplo, los virus invaden los sistemas de conexión inter e intracelulares, como los plasmodesmos¹, facilitando su expansión (Figura 2). Mientras que los hongos interactúan con la planta formando estructuras de infección altamente especializadas, como la apresoria y haustorios, mientras que las bacterias utilizan un sistema de secreción especializado tipo III (**TTSS, Type-III Secretion System**) que media la translocación de proteínas dentro de las células del hospedero (Biemelt y Sonnewald, 2006).

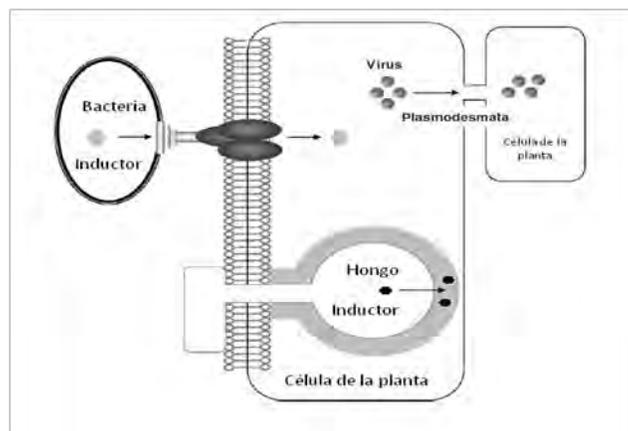


Figura 2. Mecanismos de interacción planta-patógeno. Los virus interactúan con el hospedero utilizando sus mecanismos de transporte de sacarosa para conducirse a través de las diversas células de la planta, los hongos forman estructuras de penetración y las bacterias generan inductores que son secretados en el espacio extracelular en donde interactúan con proteínas que pueden introducir estos inductores (Biemelt y Sonnewald, 2006).

Las plantas presentan diferentes mecanismos de defensa para combatir o contrarrestar el ataque de los patógenos, como es el presentar barreras estructurales, cortezas o

¹ Plasmodesmata. Son canales microscópicos que interconectan a las células de las plantas a través de la pared celular, llevan a cabo el transporte simplástico que involucra la difusión de los carbohidrato, iones y otras moléculas.

cutículas, síntesis de metabolitos secundarios tóxicos para varios organismos, como son los alcaloides, fenoles, saponinas y resinas que van a contribuir a la resistencia de la planta de manera pasiva, es decir, su síntesis se hace continua, aunque depende de la especie de la planta. Sin embargo, hay mecanismos que son inducidos por algún patógeno en particular, es decir, activan el sistema de reconocimiento en la planta e involucra cambios en el metabolismo y en la expresión de genes relacionados con la patogénesis (Madriz, 2002).

Los mecanismos de defensa inducibles se activan dependiendo del tipo de interacción entre la planta y el patógeno. En la planta hay genes que le otorgan resistencia (genes *R*), los cuales codifican para cinco clases de proteínas que puede estar asociadas o no a la membrana y que en su mayoría cuentan con regiones ricas en leucina (LRR) que funcionan como sitios de reconocimiento y regiones de interacción con otras proteínas así como de unión a nucleótidos (Figura 3, Dangl y Jones, 2001). El patógeno cuenta con genes (genes *avr*) que codifican para proteínas o para obtener como producto final una molécula señal que puede funcionar como inductor y que es capaz de unirse a un receptor de la célula del hospedero.

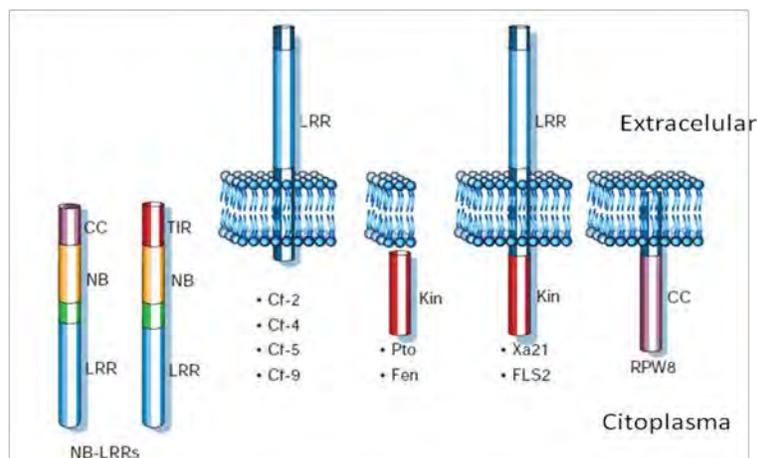


Figura 3. Representación de la localización y estructura de las cinco clases de proteínas que otorgan resistencia a la invasión de patógenos, mismas que son codificadas por los genes *R* en plantas. Estas proteínas pueden estar asociadas a la membrana como es el caso de la serie *Cf-n*, las cuales tienen una región rica en leucinas (LRR) que puede funcionar como sitio de reconocimiento del inductor, o bien citoplásmicas con zonas función de Ser/Thr cinasa como en la proteína *Pto* (Dangl y Jones, 2001).

La teoría del gen por gen, establece que por cada gen que confiere resistencia a la enfermedad en el huésped, hay un gene correspondiente en el patógeno. De acuerdo a esta teoría la interacción de un gen *R* (gen de resistencia en la planta) y un gen *avr* (gene

de avirulencia en el patógeno), puede desencadenar una cascada de respuestas de la planta hacia el patógeno. Si lo que sucede es el reconocimiento del inductor por el receptor de la célula del hospedero, la consecuencia es la activación de los mecanismos de defensa asociados a la manifestación de la respuesta hipersensible (**HR**, “**Hipersensible Response**”), a este tipo de interacción se le conoce como interacción incompatible, por lo que no se presenta enfermedad en la planta. Por otro lado si la planta no cuenta con el receptor necesario o bien si lo tiene pero no es capaz de reconocer al inductor, la respuesta de defensa no es activada y la enfermedad se establece, por lo tanto se trata de una interacción compatible (Figura 4).

La HR se presenta para contrarrestar la infección con una rápida muerte de las células circundantes a la zona de la lesión del hospedero. Típicamente incluye apariencia clorótica, lignificación de la pared celular, activación en el metabolismo oxidativo, transducción de señales, muerte celular programada y activación de genes relacionados con la defensa.

En la respuesta hipersensible están involucrados diversos inductores específicos, en bacterias se han reconocido una mayor cantidad de inductores que en hongos y virus, por ejemplo en el caso del tomate infectado con *Pseudomonas syringae*, el gen *Pto* que codifica para una proteína cinasa de la planta, interacciona con el producto del gen *avrPto* de la bacteria, una simple mutación en el gen *Pto* es capaz de reducir o no permitir la interacción entre ambas proteínas, esto es se reduce la respuesta hipersensible, éste y otros hallazgos apoyan la teoría del gen por gen (Ellis *et al.*, 2000). También en *Pseudomonas syringae* se conoce el gen *avrD* que parece ser responsable de la producción de sirindolides, que son inductores glicolipídicos de *Rpg4*, el gen *rpg4* se predice que codifica para un factor despolimerizante de actina (ADF-like factor), lo que indica que la proteína ADF2 tiene influencia en la reorganización o redirección del citoesqueleto del hospedero y que en el caso particular de soya median la muerte celular (Brueggeman *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 1998).

También relacionados con la HR hay inductores no específicos que son productos de los genes *avr* en hongos patogénicos como el ácido araquidónico, los carbohidratos de la pared celular, las glicoproteínas y las proteínas, que pueden inducir la respuesta de defensa en la planta y en algunos casos la muerte celular (Heath, 2000).

Heath (2000) señala que la respuesta hipersensible (HR) actúa más como una señal que como un mecanismo de defensa, ya que no solo está restringida a células invadidas por algún patógeno, sino que también puede presentarse cuando ocurre una lesión en algún tejido.

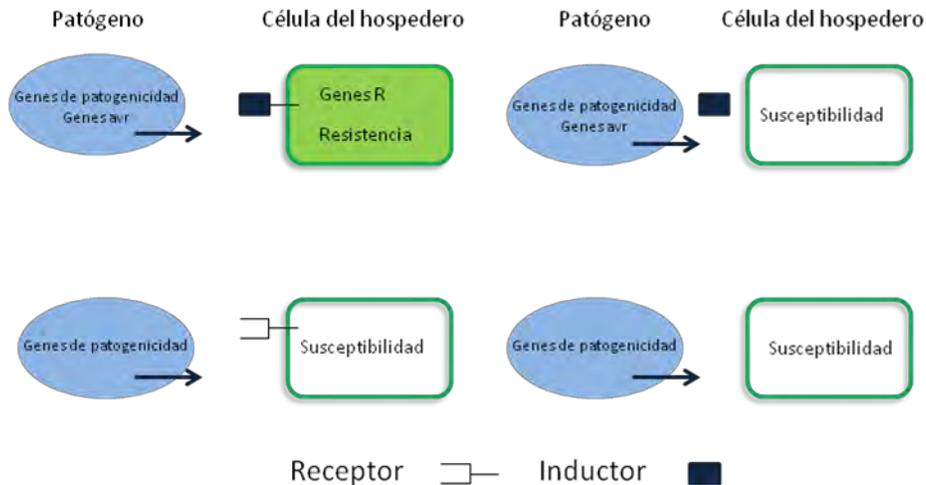


Figura 4. Relación de genes entre el patógeno y la planta, fenotipos de resistencia o susceptibilidad. La resistencia de una planta hacia un patógeno específico va a depender de la interacción molecular entre ambos, ya que si hay reconocimiento del receptor de la planta con el inductor producido por el patógeno se genera una respuesta que involucra la activación de los mecanismos de defensa, por el contrario si falta alguno de los componentes la planta es susceptible al ataque por el patógeno.

Como una forma de mantener la resistencia, las plantas al ser infectadas también desarrollan una protección contra un amplio rango de especies de patógenos a lo que se conoce como Resistencia Sistémica Adquirida (**SAR**, “**S**ystemic **A**cquired **R**esistance”). Este tipo de respuesta está asociada a una alta expresión de genes PR (de proteínas relacionadas con la patogénesis) y a algunas hormonas como el ácido salicílico, derivado del ácido benzoico, el cual cumple un papel importante al transmitir la señal del SAR a otras partes de la planta a través del tejido vascular (Heath, 2000).

Otro tipo de hormonas que están relacionadas con la invasión de patógenos a plantas son los jasmonatos (JA/MeJA) y el etileno. Los primeros se inducen por una cascada de señales originadas por la proteína pro-sistemina que después de que ocurre la invasión es hidrolizada a sistemina y transportada por el floema. La sistemina induce la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (**PR**). En las solanáceas, como *Lycopersicon sp.*, se ha reportado la inducción de JA/MeJA (jasmonato/metiljasmonato) por sistemina (Srivastava, 2002).

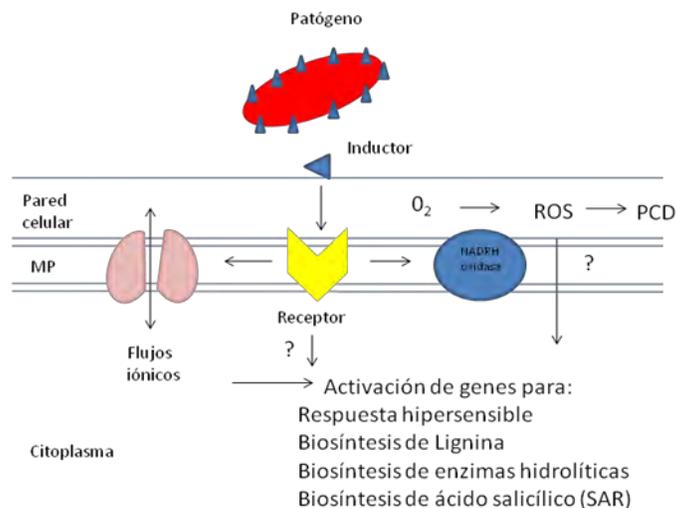


Figura 5. Asociados con la interacción planta-patógeno, la planta genera una serie de eventos para sobrevivir a la invasión. Una vez que es reconocido el inductor se envían señales que conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), activación de la respuesta hipersensible, muerte celular programada (PCD), expresión de genes relacionados con la patogénesis y de algunas hormonas como el ácido salicílico.

2.3 Metabolismo de carbono en la interacción planta-patógeno

Cuando las plantas son atacadas por algún patógeno además de activar su sistema de defensa, modifican los procesos fotosintéticos y el metabolismo primario (Moreno *et al.*, 2008) y generan una serie de mecanismos de señalización como respuesta a la infección. Varios genes relacionados con la patogénesis son inducidos por el cambio en el contenido de carbohidratos, como el caso de la proteína PR-Q que codifica para una quitinasa ácida (Herbers *et al.*, 1996), PAR-1 y PR-3 en tabaco (Hebers, *et al.*, 1995) o la represión de la proteína CAB, proteína de unión a clorofila a/b, (Herbers *et al.*, 1996).

Las plantas a lo largo de su desarrollo establecen una compleja red de relaciones fuente-demanda que aún no se logra descifrar. La demanda de carbohidratos por cada uno de los tejidos es temporal, dependiendo del estadio del desarrollo así como del número y tipo de tejidos que aportan y requieren nutrientes (Rolland *et al.*, 2006), además esta relación está influenciada por factores de estrés tanto abióticos como bióticos (Biemelt y Sonnewald, 2006) por lo que se propone que existe una regulación coordinada en respuesta al ataque por patógenos (Ehness *et al.*, 1997).

Se ha sugerido que los patógenos una vez que han colonizado el tejido del hospedero, son capaces de manipular el metabolismo de la planta en su beneficio, a fin de sustentar su replicación y extensión en la misma (Biemelt y Sonnewald, 2006). Hay patógenos que requieren que la célula hospedera esté viva, para poder obtener los nutrientes que le permitan su sobrevivencia, a estos patógenos se les conoce como biótrofos, por otro lado los patógenos que se nutren después de matar el tejido hospedero, se conocen como necrótrofos, y aquellos que llevan a cabo ambas estrategias se conocen como hemibiótrofos.

El flujo de carbohidratos en una célula está dado por al menos dos componentes, uno es el uso de los carbohidratos debido a su metabolismo y el otro es la capacidad de la célula u organelo para transportar al carbohidrato. En este último componente los transportadores son una parte esencial para concentrar o limitar la disponibilidad del metabolito. Por lo que no es difícil suponer que los transportadores estén jugando un papel importante en limitar la cantidad de sus solutos, sacarosa o hexosas en diferentes compartimentos y también en la modificación de la expresión de genes que dependen de los carbohidratos disponibles. Adicionalmente, se sabe que los transportadores pueden ser regulados a nivel transcripcional por la concentración ya sea de glucosa o de sacarosa en el medio (Lalonde *et al.*, 2004).

En hojas de las plantas de tabaco infectadas con el hongo hemibiótrofo *Phytophthora nicotianae*, se encontró que el metabolismo de carbono está alterado, ya que el flujo de sacarosa desde las células del mesófilo hacia los peciolo disminuye conforme aumenta el tiempo de exposición con el patógeno. Sin embargo el contenido de sacarosa y hexosas se ve incrementado en el apoplasto, así como la actividad de las invertasas, enzimas relacionadas con el suministro de hexosas. Lo anterior sugiere que existe un cambio en la función del tejido, es decir, que de ser un tejido fuente paso a ser un tejido demanda (Scharte *et al.* 2005).

No todos los resultados obtenidos indican incremento en el contenido de carbohidratos, en la Tabla 1 podemos distinguir algunos ejemplos de esto, ya que hay reportes en los que el proceso infectivo ocasiona una disminución en el contenido de hexosas como en las hojas de *Lycopersicon esculentum* infectadas con *Botrytis cinerea* (Berger *et al.*, 2004) o bien que no hay ningún cambio en su contenido, como ocurre en las hojas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con *Pseudomonas syringae* (Bonfing *et al.*, 2006). Se

conoce poco acerca del movimiento y la transferencia de carbohidratos de la planta hacia el patógeno, sin embargo no se hace difícil suponer que cambios sutiles y localizados en el contenido de carbono puedan mediar una modificación en la relación de los contenidos y flujos de los carbohidratos en los diferentes tejidos y compartimentos celulares durante la interacción que se establece entre la planta con el patógeno (Berger *et al.*, 2007; Fotopoulos *et al.*, 2003).

En *Arabidopsis*, el nivel de expresión del transportador de monosacáridos *AtSTP4* (*Arabidopsis thaliana Sugar Transporter Protein*) está aumentado a nivel de transcrito y de proteína, en hojas infectadas con *Erysiphe cichoracearum*, después de tres días de la inoculación (Tabla 1; Fotopoulos *et al.*, 2003). En uva la inoculación con dos diferentes tipos de hongos biotróficos induce la expresión de las invertasas de la pared celular, sin embargo, con una respuesta distinta en cuanto al efecto en la expresión de los transportadores de hexosas, resultado que sugiere que hay respuestas generales ante el ataque por un patógeno y respuestas específicas al patógeno que infecta a la planta (Hayes *et al.*, 2010).

También hay reportes en los que la expresión de los transportadores, a nivel de RNA, no se ve modificada, tal es el caso del transportador *AtSTP3* (*Arabidopsis thaliana Sugar Transporter Protein*) que no presenta cambio cuando se expone a la planta al hongo *Erysiphe cichoracearum* (Fotopoulos *et al.*, 2003).

Adicionalmente a la necesidad que la planta tiene de mantener su metabolismo de carbono, el patógeno también tiene que ser capaz de sobrevivir en las fuentes de carbono que le proporciona la planta, para probarlo Bogs y Geider (2000) estudiaron el regulón *scr* de *Erwinia amylovorae*, identificaron a los 5 genes que lo forman *scrK*, *scrY*, *scrA*, *scrB*, y *scrR* y encontraron que existe represión catabólica e inducción por la presencia de sacarosa o fructosa, desde concentraciones de 5 a 40%, mismas que pueden ser encontradas en plantas que son infectadas comúnmente por la bacteria. Cuando produjeron mutantes en el regulón *scr* e infectaron las hojas de plántulas de manzana, no observaron los característicos síntomas de la enfermedad, que sí son producidos con la bacteria silvestre, lo que destaca la importancia del metabolismo de sacarosa en el patógeno para colonizar a la planta (Bogs y Geider, 2000).

Tabla 1. Efecto en el metabolismo de carbono, contenido de carbohidratos y expresión de transportadores de hexosas, durante la interacción planta-patógeno. NR: no reportado

Organismo		Estado fisiológico	Efecto de la expresión de TH, INV's	Efecto en el contenido de CHO	Referencias
Patógeno	Planta				
<i>Phytophthora nicotianae</i> (Hemibiótrofo)	<i>Nicotiana tabacum</i>	HR (12 hpi) : hojas cloróticas en zona de infección	↑RNA la invertasa de CW	< Flujo de Sacarosa ↑ [Glu] en el apoplasto	Scharte et al., 2005
<i>Botrytis cinerea</i> (Necrótrofo)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Daño en zona específica	↓ la Expresión de genes involucrados en fotosíntesis	↓ [Glu] en hojas	Berger et al., 2004
<i>Erysiphe cichoracearum</i> (Biótrofo)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hojas cloróticas en la zona de infección	↑RNA de <i>AtSTP4</i> ↑RNA de <i>Atbfruct1</i> , así como su actividad	↑ [Glu] en hojas	Fotopoulos et al., 2003
<i>Pseudomonas syringae</i> (vir y avir) (Hemibiótrofo)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	HR (3hpi-48hpi) daño más marcado para la cepa vir	↑RNA y Actividad de la INV-V3 ↓ la Expresión de genes involucrados en fotosíntesis	No se modifica el contenido de Glu, Fru y Sac	Bonfing et al., 2006
<i>Erysiphe necator</i> (biotrófo)	<i>Vitis vinifera</i>	NR	Los transcritos de: ↑cwINV ↓GIN1 (invertasa vacuolar 1) ↑VvHT1,2,3,4 y 5	↑ [Glu] y ↑ [Fru] en la hoja infectada	Hayes et al., 2010
<i>Plasmopora viticola</i> (biotrófo)	<i>Vitis vinifera</i>	NR	Los transcritos de: ↑cwINV, ↑VvHT5 ↑ GIN1 y GIN2	↑ [Glu] y ↑ [Fru] en la hoja infectada	Hayes et al., 2010
<i>Fusarium verticillioides</i> (Necrótrofo)	<i>Zea mays</i>	Embriones de maíz en germinación	↑RNA ZmHT ↑ RNA ZmSUT	↑[Glu] tardíamente ↓ [Sac]	Guzmán-Chavéz, 2010
TMV (Virus del Mosaico del Tabaco)	<i>Nicotiana tabacum</i>	HR (<3 dpi) : lesiones necróticas en zona de infección			Lam et al., 2001

Otro ejemplo de transportadores de hexosas modificados en el patógeno al interactuar con la planta se encuentra en *Sclerotinia sclerotiorum*, los transcritos para los transportadores de hexosas Sshxt1 y Sshxt2 se sintetizan activamente durante la infección del hongo en los cotiledones del girasol, aunque solo el transcrito para Sshxt1 se incrementa conforme pasa el tiempo de infección con el hongo, lo que sugiere que este transportador es el que se encuentra implicado en el transporte de hexosas de la planta al hongo (Jobic *et al.*, 2007).

Se reconoce actualmente que las vías de transducción de señales que llevan a modificar la expresión de genes en presencia de un estrés de tipo biótico, abiótico y los azúcares, se encuentran entrelazadas. Esto es, la planta economiza, bioquímicamente hablando, al establecer redes de regulación que responden ante la presencia de cambios ambientales adversos para la planta (Hey *et al.*, 2010). Hemos visto que la presencia de un patógeno modifica la expresión de diferentes transportadores de carbohidratos y también los contenidos de algunos carbohidratos y es probable que la expresión final de estos cambios lleve a una modificación en el metabolismo general, ya que los transportadores son los encargados de mantener disponibles los carbohidratos para el metabolismo.

2.4 Monitoreo de carbohidratos *in planta*.

Actualmente se tiene poca información de cuál es el contenido *in vivo* de diferentes metabolitos en los diferentes tejidos incluyendo los carbohidratos y su localización intracelular. Los métodos que generalmente se realizan para su detección son destructivos, como la extracción etanólica de macerados de tejido, donde los extractos obtenidos de hoja incluirán los carbohidratos de todas las células que conforman a la hoja, de los apoplastos y todo el contenido intracelular, encontrándose que en las hojas hay una concentración de sacarosa y glucosa del orden de milimolar. Se ha estimado que la concentración de **glucosa** en el citoplasma de *Nicotiana tabacum* es de **2-5 mM** y de 30 mM en las hojas de *Solanum tuberosum* (Farré *et al.*, 2001). Mientras que las concentraciones de glucosa, cuantificada *in vivo*, mediante la sobreexpresión de biosensores en tejidos demanda, como la raíz, se encuentra entre 90 y 340 nM (Deuschle *et al.*, 2006); valores de concentración que son cercanos a los valores de Km que se han reportado para los transportadores de hexosas (Km entre 20 μ M y 2 mM) (Büttner y Sauer, 2000).

Por tal motivo, en el presente trabajo se propone el uso de biosensores específicos que puedan ser expresados en plantas, como una alternativa para determinar la distribución y cantidad de glucosa, y que proporcione información acerca del estado metabólico en la planta, así como los ajustes que puedan ocurrir en condiciones de estrés, en particular del estrés por patógenos.

2.5 Diseño y uso de los biosensores

En este trabajo se pretende obtener las herramientas moleculares para monitorear los contenidos de glucosa intracelular mediante el uso de biosensores, con la finalidad de encontrar la concentración mínima que es percibida como diferente para cambiar el metabolismo celular ante la presencia de un estrés extracelular.

Los biosensores se definen como máquinas moleculares que combinan propiedades de unión a ligandos con macromoléculas biológicas, para producir una señal física, la cual es seguida por los cambios conformacionales de la proteína. Los biosensores son una promesa en investigación por su eficiente introducción en varios tipos de células y organismos, se expresan de manera estable y no modifica el genotipo de la planta, son blancos para mediciones en compartimentos subcelulares, además de que se tiene un eficiente control en la producción del biosensor (Desuschle, *et al.*, 2005).

De manera general un biosensor contiene dos elementos, el primero es el de reconocimiento y el segundo elemento es el reportero. Entre los elementos de reconocimiento se encuentran las células completas, las enzimas y otras proteínas. La función en general de estos elementos es de interactuar con el metabolito de manera selectiva. Respecto a las proteínas se ha encontrado que miembros de la superfamilia de proteínas periplásmicas de unión, PBPs (*Periplasmic Binding Protein*), son capaces de reconocer varios tipos de sustratos con una alta especificidad, afinidad y estabilidad (Dwyer y Hellinga, 2004). Además, de ser proteínas que se pueden obtener fácilmente a homogeneidad, por lo que a la fecha se han desarrollado biosensores basados en las PBP. Estas proteínas evolucionaron conservando la estructura tridimensional que se caracteriza por tener dos dominios conectados por una región flexible, estructura tipo bisagra de aproximadamente 12-18 aminoácidos, región donde se localiza el sitio de unión al ligante (Figura 6A). De esta manera las proteínas adoptan dos estados conformacionales, uno es el estado de conformación abierto donde los dominios están

separados y el segundo es el estado de conformación cerrado, donde los dominios se encuentran juntos (Dwyer y Hellinga, 2004; Moschou, *et al.*, 2004).

Estas proteínas se clasifican en dos clases de acuerdo al cambio conformacional que presentan al unirse al sustrato cuando forman parte de un biosensor. Las PBP clase I difieren de las clase II en el número y orden de láminas β en cada dominio, siendo seis y cinco para cada una respectivamente, lo anterior afecta cuando se tiene el biosensor funcionando en el sistema, ya que en el primer tipo al unirse el sustrato la orientación de los grupos reporteros provoca que el FRET disminuya, mientras en el caso de las tipo II aumenta (Figura 6B).

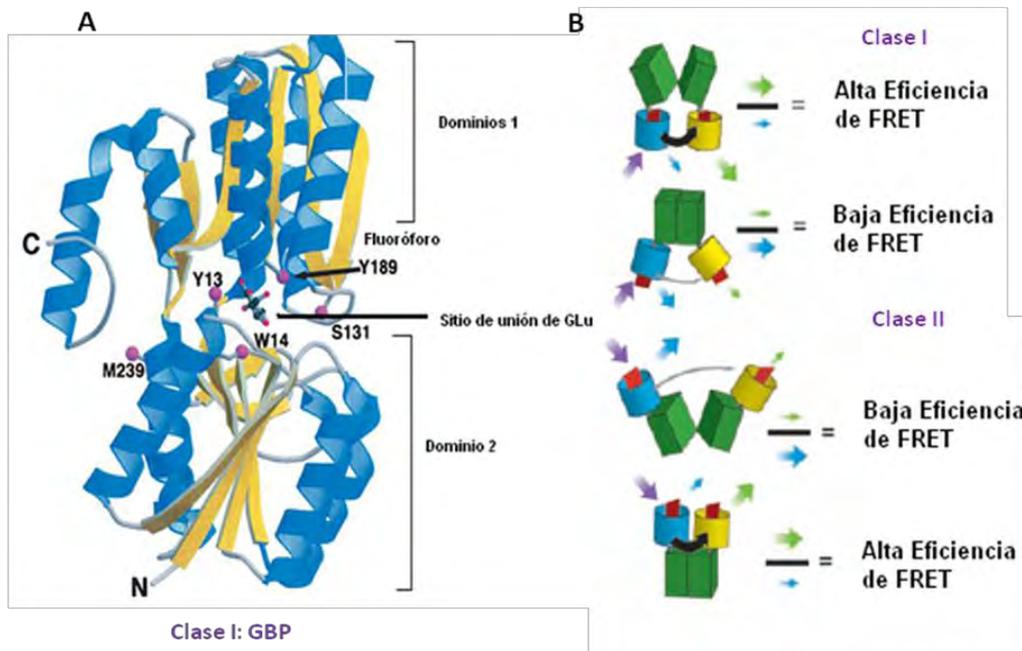


Figura 6. A) Estructura tridimensional de la proteína periplásmica GBP (clase I), donde se distinguen el dominio carboxilo terminal y el amino terminal, formando una bisagra respecto al sitio de unión de la glucosa (Tian, *et al.*, 2007). B) Eficiencia en la transferencia de energía (FRET) de acuerdo al tipo de proteína de reconocimiento PBS, en la clase I hay una mayor eficiencia en el FRET cuando la proteína de reconocimiento se une al ligando y en la clase II hay una menor eficiencia en el FRET cuando la proteína se une al ligando (Fher, *et al.*, 2003).

El cambio conformacional que se obtiene por la interacción de las PBPs a diversas moléculas como son glucosa, manosa, sacarosa, ácido glutámico, iones, entre otros, permite examinar esta característica en función de la afinidad, selectividad y propiedades intrínsecas de unión al ligando, propiedades que se toman en cuenta para el diseño y desarrollo de biosensores.

Los elementos reporteros son moléculas que interactúan con la proteína de reconocimiento; pueden ser pequeñas moléculas covalentemente unidas a la proteína, ya sea por la emisión fluorescente de un metal ambientalmente sensible o una pequeña molécula cromófora y la Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET) entre un par de moléculas pequeñas (Deuschle, *et.al.*, 2006).

Este último mecanismo es el que actualmente se está utilizando en el desarrollo de biosensores. Y como se mencionó consiste en la detección de los cambios conformacionales debidos a la unión del ligante a través de una molécula unida a la proteína sensora que es capaz de emitir fluorescencia y donarla a un receptor para amplificar la señal. El rango de detección y visualización para este fenómeno está entre 1 y 100 nm, siendo entonces un indicador con alta sensibilidad al cambio de conformación de la proteína (Deuschle, *et.al.*, 2005). Las detecciones de FRET se monitorean mediante la técnica de microscopia confocal *in vivo*, un método óptico no invasivo que puede generar información detallada acerca de la composición molecular con una alta resolución espacial, así como otras técnicas de fluorescencia.

2.6 Detección de carbohidratos con biosensores.

No obstante del ingenioso concepto de sensores FRET dependientes de la conformación que fue desarrollado hace aproximadamente 15 años, hasta ahora se han desarrollado sensores para metabolitos primarios como los carbohidratos (Fehr, *et.al.* 2004). El primer biosensor de carbohidratos que se construyó fue el FLIPmal-25 μ M (del inglés "*Fluorescent Indicador Protein for maltose*"), que es un sensor fluorescente de maltosa que presenta una Kd de 25 μ M. Este biosensor permitió la visualización de la toma de maltosa en tiempo real dentro del citosol de células de levaduras transformantes para el biosensor. Los incrementos de maltosa se detectaron mediante el FRET, basado en los cambios de emisión del par YFP/CFP (Yellow Fluorescent Protein/ Cian Fluorescent Protein; Fehr *et al.*, 2004; Lalonde *et al.*, 2004).

En la Tabla 2 podemos encontrar diferentes biosensores desarrollados a partir de estas proteínas, de algunos biosensores ya se tiene información acerca de su funcionalidad en sistemas *in vivo*.

Tabla 2. Biosensores basados en fusiones con proteínas de unión a ligando específicas y variantes de la proteína GFPs, características y aplicaciones.

Nanosensor	Metabolito	Intervalo de detección	Modelo de estudio	Referencia
FLIPrib	Ribosa > Eritrosa > Ribulosa > Alosa.	FLIPrib120μ: 1.3–105 μM FLIPrib250n: 0.03-2.3 μM	En células COS-7 donde se observa un metabolismo lento.	Lager <i>et. al.</i> , 2003.
FLIP mal	Maltosa MOS	2.78-225.13μM	Células de levadura in vivo, pero no se localiza en vacuola.	Fher, <i>et. al.</i> , 2002.
FLIPglu600μ	Glucosa Galactosa	0.07-5.3 mM 0.85 mM	Células COS-7, el biosensor se localiza en el citosol.	Fher, <i>et. al.</i> , 2003.
FLIPglu600μΔ13	Glucosa Galactosa	Hojas <10mM Raíz 1-5mM	En células guarda de hojas de <i>Arabidopsis</i> .	Deuschle <i>et. al.</i> , 2006.
FLIPglu170n	Glucosa Galactosa	0.019-1.53 μM 0.51 μM	Células COS-7, se localiza el biosensor en el citosol de las mismas.	Fher, <i>et. al.</i> , 2003.
FLIPsac90μ	Sacarosa	10-100μM	Hojas y raíces de <i>Arabidopsis</i> .	Lager, <i>et. al.</i> , 2006

En el caso particular de la detección de glucosa en plantas se han desarrollado algunos biosensores como el FLIPglu600μMΔ13, el cual como elemento de reconocimiento tiene una proteína de unión a glucosa y galactosa de *E. coli* y como elementos reporteros al par de proteínas CFP y la YFP, unidas a los extremos amino y carboxilo terminal de la proteína de reconocimiento (Deuschle *et al.*, 2006). Utilizando como modelo biológico a plantas de *Arabidopsis thaliana* deficientes en uno de los mecanismos de silenciamiento de genes, mutantes denominadas *rdr6-11* y *sgs3-11*, se determinaron la concentración de glucosa en las raíces y hojas de 100 nM y entre 25 μM a 10 mM respectivamente, la concentración es inferior a la estimada mediante las técnicas tradicionales de detección del carbohidrato, por lo que los autores no descartan que el metabolismo de las plantas mutantes se hubiera alterado (Deuschle *et al.*, 2006). Por lo anterior es importante llevar a cabo estudios en plantas silvestres para demostrar la eficiencia de los biosensores y dar certidumbre sobre los datos de concentración de glucosa.

Con las herramientas experimentales producidas en este estudio, se pretende en un trabajo futuro, conocer las concentraciones intracelulares de glucosa que se relacionen con los cambios en la concentración total de carbohidratos y en la expresión de proteínas como los transportadores de carbohidratos, o bien proteínas involucradas en la

transducción de señales, durante la interacción planta-patógeno, datos que no han sido documentados con anterioridad. Lo anterior nos llevará a entender los procesos de flujo de carbohidratos y de transducción de señales que ocurren en la planta para contener con el estrés y que nos ayudará a plantear estrategias para la mejora de la productividad en plantas.

3 JUSTIFICACIÓN

Las plantas poseen un sistema sofisticado de percepción de señales en la que responden a la concentración de diversos metabolitos, algunos de ellos azúcares como la sacarosa, la glucosa y la trehalosa. El nivel de estos metabolitos y en particular de la concentración de glucosa, impacta en la expresión de genes importantes que se encuentran involucrados en la respuesta a cambios ambientales e internos que alteran su desarrollo y provocan un estado de estrés. Por lo que conocer los componentes en las vías de transducción de señales que perciben glucosa se hace necesario para entender la homeostasis de los carbohidratos.

Cuando una planta es invadida por algún microorganismo, es capaz de reorganizar el flujo de carbono, esto es cambiar la composición y la concentración de carbohidratos en diferentes compartimentos celulares así como, modificar el transporte para asegurar su sobrevivencia. Hasta el momento varios estudios han demostrado que en tales situaciones se ve modificado el contenido de algunos carbohidratos, como las hexosas y la sacarosa (Ibañez *et al.*, 2010, Hayes, *et al.*, 2010; Bolton, 2009; Scharte *et al.*, 2005; Berger *et al.*, 2004; Fotopoulos, *et al.*, 2003), moléculas que además de aportar energía pueden modular la expresión de genes al participar en los mecanismos de señalización, por lo que se hace importante determinar si existen cambios en los contenidos de carbohidratos que sugieran que el carbohidrato es el agente causal o la señal que lleva a la modificación del metabolismo de la planta.

Los métodos que generalmente se realizan para la detección de los carbohidratos contemplan la homogenización total del tejido, por lo que no se distingue si los cambios en los contenidos de carbohidratos ocurren a nivel de apoplasto o intracelularmente, o si en realidad hubo algún cambio, entonces para contestar las interrogantes **¿existe un cambio en la concentración de glucosa durante la interacción *Nicotiana tabacum*-*Pseudomonas syringae*?** Y si la hay **¿Cuál es la concentración y localización celular de glucosa para que participe como molécula señal durante ésta interacción?** se

pretende obtener una herramienta que permita monitorear el contenido y localización intracelular de glucosa durante situaciones de estrés biótico.

Por lo anterior se solicitaron a la página <http://www.addgene.org> los plásmidos generados por el laboratorio del Dr. Wolf Frommer (Deuschle, *et.al.*, 2006; Deuschle, *et.al.*, 2005), y que codifican para las siguientes proteínas biosensoras: FLIPglu700nMDelta13 (detecta 170 nM), FLIPglu3.2mMDelta13 (detecta 3.2 mM), FLIPglu600μMDelta13 (detecta 600 μM) y FLIPglu600μMDelta13Afrodita (detecta 600 μM).

Para ser usados los biosensores en nuestro sistema experimental primero se confirmó la presencia de cada una de las secuencias en el vector, mediante a) la restricción del producto, b) la secuenciación del inserto, c) la producción de proteína recombinante *in vitro*, y verificación del espectro de emisión y d) la clonación de los genes en el vector binario para obtener las condiciones para realizar la transformación de plantas de tabaco, trabajo que se presenta en la tesis.

4 HIPÓTESIS

En las hojas de plantas de *Nicotiana tabacum* infectadas con el patógeno *Pseudomonas syringae*, se producirá la respuesta hipersensible y el contenido de carbohidratos solubles será mayor que en las hojas de plantas sin infectar, lo que modificará el nivel de expresión de los transportadores de hexosas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Determinar el efecto de la interacción *Nicotiana tabacum*-*Pseudomonas syringae* en el contenido de carbohidratos y expresión de los transportadores de hexosas, y corroborar la actividad de varios biosensores que detectan un amplio rango de concentraciones de glucosa para su posterior uso en plantas.

5.2 Objetivos particulares:

1. Determinar el efecto de la infección por *Pseudomonas syringae* en las hojas de plantas de *N. tabacum* en:
 - A) El contenido total de algunos carbohidratos solubles como glucosa, fructosa y sacarosa.
 - B) El nivel de expresión del transportador de hexosas NtMST1 en las hojas de *N. tabacum* infectadas mediante ensayos de RT-PCR.
 - C) En los niveles de los transportadores de hexosas detectados por inmunoréplica tipo Western blot.
2. Confirmar que las cepas de *E. coli*, que contienen a los vectores de expresión de los biosensores-FLIP que detectan glucosa, contengan y expresen de forma correcta a las proteínas sensoras.
 - A) Clonación de 4 biosensores-FLIP en *E. coli* BL21-A1.
 - B) Inducción de las proteínas recombinantes: FLIPglu600 μ M, FLIPglu170nM, FLIPglu3.2mM y FLIPglu600 μ MAfrodita.
 - C) Purificación de las proteínas mediante cromatografía de afinidad.
 - D) Determinación *in vitro* de la constante de disociación (Kd) de al menos un biosensor FLIP.
3. Obtención de bacterias transformantes de *Agrobacterium tumefaciens*
 - A) Clonación del gen *FLIPgluF16A Δ 13* en el vector binario pBA-DC.
 - B) Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

6 MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 La estrategia experimental para cumplir el objetivo particular 1 se presenta en el diagrama de flujo de la Figura 7.



Figura 7. Diagrama de Flujo procedimiento experimental 1.

6.1.1 Material biológico

Se utilizó como modelo de estudio plantas de *Nicotiana tabacum* L. cultivar Xanthi. Se sembraron las semillas de *N. tabacum* en un recipiente de aproximadamente 1 L con el sustrato Sunshine Mix 4, después de 1 mes de crecimiento en condiciones de temperatura 29°C y con fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. En este tiempo las plántulas alcanzaron una altura de 3 cm y se trasladaron en recipientes de 0.5 L que contenían una mezcla del sustrato sunshine Mix 4 y Vermiculita en una proporción de 2:1. A partir de las 6 semanas las plantas presentan hojas de aproximadamente 15 cm de largo las cuales fueron utilizadas para realizar los estudios descritos posteriormente.

6.1.2 Infiltración de hojas de *Nicotiana tabacum*.

La cepa utilizada para la infección de las plantas de tabaco fue *Pseudomonas syringae* (*Pst* DC3000). La bacteria se incubó en medio KB con rifampicina a una concentración de 50 µg/mL a 29°C por 48 h (Berger, *et.al.*, 2006).

Para preparar el inóculo se tomó una azada generosa de células en medio KB y se transfirió a un tubo de microfuga de 1.5 mL que contenía 1 mL de MgCl₂ 10 mM, se agitó hasta obtener una suspensión homogénea. Se tomaron 100 µL de la suspensión anterior y se llevaron a 1 mL con MgCl₂ 10 mM, se midió su absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. Tomando en cuenta que un valor de absorbancia de 0.1 corresponde a aproximadamente 1 x 10⁸ UFC/mL se preparó una suspensión de bacterias para obtener una A₆₀₀= 0.01 (1 x 10⁷ UFC/mL). La infiltración se llevó a cabo con 50 µL de la suspensión bacteriana.

Se emplearon dos plantas adultas (45 d) de tabaco por tiempo de infección, de las cuales se recolectaron seis hojas infectadas con *P. syringae* y cuatro hojas infiltradas con MgCl₂ 10mM como hojas control. De cada tiempo de infección se realizaron ocho repeticiones a partir de la extracción de los carbohidratos. El modelo experimental para llevar a cabo la infiltración consistió en tomar tres hojas de la planta a partir del segundo brote hacia arriba, además de infiltrar dos hojas más con 50 µL de MgCl₂ 10 mM, que funcionaron como control.

También se recolectaron hojas sin infiltrar y se les midió el contenido de carbohidratos, sin embargo se obtuvieron valores similares a los carbohidratos obtenidos de las hojas infiltradas con MgCl₂ 10 mM, por lo que sólo se reportan los datos obtenidos de las segundas, denominadas hojas control.



Figura 8. Infiltración de hojas de tabaco con *Pseudomonas syringae*. En una hoja se aplicaron 3 o 4 puntos de infiltración dependiendo de la respuesta de la planta. Generalmente este procedimiento se llevaba a cabo durante las primeras horas del día tiempo en el que los estomas se encuentran abiertos y reciben mayor cantidad de líquido.

6.1.3 Extracción y cuantificación de carbohidratos solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y almidón.

Se realizó el procedimiento según Martínez-Marcelo (2008), el cual consistió en moler en N_2 líquido tres hojas de *N. tabacum* hasta obtener un polvo fino. Se pesaron 0.5 g de tejido y se extrajeron los carbohidratos con 2 mL de etanol a temperatura de ebullición, la mezcla alcohólica se trasvasó a un tubo microfuga. Al remanente del mortero se le agregó 1 mL de agua a temperatura de ebullición tratando de moler perfectamente, este extracto se mezcló con el del extracto alcohólico.

Posteriormente la mezcla alcohólica se centrifugó en tubos de microfuga por 10 minutos a 2,500 rpm. El sobrenadante se separó y se colocó en un tubo de ensaye que se calentó a 70°C en un bloque de calentamiento, la pastilla obtenida se resuspendió en 200 μ l de agua destilada. El extracto se guardó a -20°C hasta su utilización.

Se extrajo el almidón del botón que se obtuvo de la primera centrifugación, para lo cual se adicionó 1.5 mL de agua destilada y se calentó a 90°C por 4 h para gelatinizar el almidón.

Posteriormente se mezcló en una proporción 1:1 con amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* disuelta en amortiguador de acetatos 0.2 M a pH 4.5 (concentración final de amiloglucosidasa 7 mg/mL), Después se incubó durante toda la noche a 37°C. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 13000 rpm durante 10 min (Centrifuga Hettich Universal 320R). Al sobrenadante se le determinó el contenido de glucosa mediante un ensayo acoplado.

Cuantificación de azúcares solubles: glucosa, fructosa y sacarosa.

La cuantificación de glucosa y fructosa se llevó a cabo a través de un método enzimático, como lo describe Ramírez-Palma (2007). En donde de 1 a 5 µl de la muestra problema se hicieron reaccionar por 20 min a temperatura ambiente, con 200 µl de una mezcla enzimática que contenía 1.0 U/ml de hexocinasa y 1.0 U/ml de glucosa-6P deshidrogenasa (G6PDH). La glucosa y la fructosa se fosforilan, y sólo la Glucosa-6P es usada por la G6PDH, se produce una cantidad equimolar de NADPH y se lee a 340nm, la absorbencia obtenida fue directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

Después de la primera lectura, se le añadió al mismo pozo de reacción 1.2 U/ml glucosa-6P isomerasa, la cual cataliza la conversión de la fructosa-6P en glucosa-6P (que no reaccionó en el paso anterior) y entonces la G6PDH utiliza este sustrato, por lo cual se hizo una segunda lectura y ahora el incremento en absorbencia a 340 nm corresponde a la sumatoria de la glucosa de la primera determinación, más la concentración de fructosa.

Para la determinación de sacarosa se realizó una hidrólisis en medio ácido de la sacarosa de la muestra (1 a 5 µL de muestra y agua destilada para alcanzar un volumen máximo de 12 µL), adicionando invertasa de levadura de SIGMA® (4 µL de una solución de 80 mg/mL de invertasa disuelta en acetato de magnesio 100 mM pH 4.5), se incubó por 2 h a 37°C y posteriormente se determinó el contenido de glucosa y fructosa de acuerdo a lo antes establecido.

EL contenido de glucosa se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{nmolGlucosa}}{\text{g tejido}} = \frac{(\text{Abs}_m - \text{Abs}_b)(0.212\text{mL})(\text{mL de suspensión})}{\left(\frac{6.22 \times 10^3 \text{mL}}{\text{mmol cm}}\right)(\text{mL de muestra})(\text{g tejido})} * 1E6$$

Donde: Abs: Absorbancia a 340 nm.

mL de la muestra usada en el ensayo.

mL de suspensión de los carbohidratos después de la extracción.

0.212 mL: Es el volumen total de ensayo en ELISA

6.1.4 Obtención de la fracción microsomal y expresión de transportadores de hexosas en hojas de *Nicotiana tabacum* infectadas con *Pseudomonas syringae*.

Obtención de la fracción microsomal.

Se utilizó el método descrito por Ramírez-Palma (2007) con algunas modificaciones. Se recolectaron 3 hojas, las cuales fueron trituradas con N₂ en un mortero hasta la obtención de un polvo fino, enseguida a 4 g de tejido se le adicionaron 12 mL de amortiguador de homogeneización (50 mM de Hepes/KOH pH 7.8, 250 mM de sorbitol, 1 mM de EDTA, 1 mM de KCl, 1 mM de DTT y 40 µg/mL del cocktail de inhibidores de proteasas según las indicaciones del proveedor MiniComplete de Roche®), se molió y se filtró a través de 4 capas de gasa. El homogeneizado se centrifugó a 4000 rpm por 15 min a 4°C (Centrífuga Hettich Universal 320R). El sobrenadante se centrifugó a 14500 rpm por 15 min a 4°C. Finalmente el sobrenadante que se obtuvo se centrifugó a 45000 rpm por 1.5 h a 4°C en la Ultracentrífuga Optima TL Beckman® con rotor TLA 100.4. El botón final se resuspendió en 400µL de amortiguador de resuspensión (50 mM de Hepes/KOH pH 7.8, 250 mM de sorbitol, 10% de glicerol y 2 mM de DTT).

Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford.

El contenido de proteína en la muestra se determinó mediante el método de Bradford (1976), usando una curva estándar de albúmina de suero bovino.

Detección de los niveles de transportador de hexosas mediante Western blot.

Se corrieron dos muestras problema y su control a los diferentes tiempos de infiltración desde 0.5 a 15 días post-infiltración en geles de poliacrilamida-SDS al 12% (Laemmli, 1970). Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas a un soporte de nitrocelulosa en una cámara de transferencia húmeda (EBU-204) a 350 mA durante 2 h a 4°C.

La membrana se lavó con TBS (Tris/ HCl 20mM, NaCl 150mM) y se incubó por 1 h con agitación rotatoria en solución bloqueadora que contiene 5% de leche Svelty® en TTBS (Tris/ HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1 %). Enseguida se removió la solución bloqueadora y se lavó con TTBS con agitación rotatoria por 10 min, este lavado se repitió 2 veces más. Posteriormente se incubó la membrana con el primer anticuerpo, diluido 1:3000 en TTBS adicionando BSA al 1 %, durante toda la noche a 4°C con agitación rotatoria. También se lavó la membrana 3 veces con TTBS, después se adicionó el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa diluido 1:42,000 en TTBS adicionando BSA al 1 % y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Al término de la incubación se lavó como se indicó anteriormente. Para revelar las bandas de proteína que reaccionaron con el anticuerpo se sumergió a la membrana en una solución de luminiscencia Immobilon™ Western Millipore durante 1 min, después se colocó en el cassette para finalmente exponer la membrana con una placa fotográfica máximo 1 min. Se realizó la densitometría en el Fluor S-TM Multimager Biorad® y el análisis de las bandas se realizó con el programa Quantity One.

El primer anticuerpo que reconoce al transportador de hexosas de la membrana plasmática fue producido por el QFB Arturo Raya Sandino (2011). Este anticuerpo reconoce la secuencia **LGWLVPEIFPLEIRSAC**, para usarlo en este trabajo se determinó la dilución y concentración óptima de la fracción microsomal.

6.1.5 PCR-semicuantitativo del transportador de hexosas NtMST1 en hojas de *Nicotiana tabacum* infectadas con *Pseudomonas syringae*.

Extracción de RNA total de hojas de *N. tabacum*.

Para la extracción de RNA total se modificó el procedimiento sugerido por Invitrogene™ (www.invitrogene.com), para lo cual se recolectaron hojas infectadas y control de los diferentes tiempos de infiltración, el material se congeló a -70°C hasta su uso. Se pesaron 130 mg y se pulverizó con N₂ líquido hasta dejar un polvo muy fino, se le agregó 1 mL de Trizol y se molió hasta tener una pasta homogénea. Se transfirió a un tubo de microfuga previamente enfriado.

Se incubó el tubo con la muestra a temperatura ambiente por 5 min y posteriormente se centrifugó a 12,210 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microfuga frío donde se le agregaron 200 µL de FCI (Fenol:Cloroformo:isoamílico) y se agitó por inversión durante 15 s, enseguida se centrifugó a 12210 rpm durante 10 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo de microfuga frío y se le agregaron 200 µL de CHCl₃, se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó nuevamente a 12210 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se colocó en un tubo de microfuga frío y se le agregaron 500 µL de isopropanol, se mezcló muy bien y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, posteriormente se centrifugó el tubo a 12210 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se decantó y el botón se dejó secar a temperatura ambiente durante 1 min.

Finalmente el botón se lavó con un 1mL de EtOH al 75 % y se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min a 4°C, eliminando el sobrenadante, se dejó secar el botón a temperatura ambiente durante 15 min. y finalmente se resuspendió en 100 µL de H₂O-DEPC. Se almacenó a -70°C hasta su uso.

RT-PCR de hojas infectadas de *tabaco*.

Síntesis de cDNA. Cada muestra de RNA se cuantificó y se calibró en un gel de agarosa al 1% con TBE 1X. En un tubo microfuga se adicionó 1 µg de RNA, oligo dT a una concentración final de 20 mM y H₂O-DEPC hasta alcanzar un volumen de 10 µL. Esta mezcla se incubó a 70°C por 5 min para desnaturalizar el RNA y se dejó en hielo por 5 min más. Enseguida se preparó la mezcla de reacción (4 µL de buffer Improm-115X, 2.4 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de dNTP's 10 mM, 1 µL de enzima TR y H₂O-DEPC cbp 10µL) que fue adicionada a cada tubo que contenía el RNA. Se incubó todo a 25°C por 5 min, después a 42°C durante 1 h y finalmente a 70°C por 15 min. Las muestras de cDNA se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Se diseñaron los oligonucleótidos para detectar al transportador de hexosas *NtMST1* con base en la secuencia anotada en el GenBank: X66856 (ver secuencia en el Apéndice I) mediante los programas PRIMER 3 en Workbench, IDT SciTool y Oligo Cal, en donde se obtuvo un par de oligonucleótidos (Tabla 3) que amplifican un fragmento de 599 pares de bases.

Tabla 3. Características de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación del RNA para el transportador de hexosas de tabaco.

Secuencias	Tm	%G/C	Número de bases
FORWARD: 5'- GTTCAGGAAGCAAAAAGGCAG -3'	60	50	20
REVERSE : 5'- CACTCGCCACGACTAAATCA -3'	60	50	20

La reacción de PCR se realizó con el amortiguador PCR master® mix de Promega, adicionando 2 µL de cDNA y 0.8 µM de cada oligonucleótido. Las condiciones de amplificación que fueron programadas en el termociclador fueron:

Fase I	Fase II	Fase III
94°C 5 min	94°C 45s 50°C 45s 72°C 55s	72°C 5 min
Número de ciclos : 1	30	1

El producto del PCR se corrió en un gel de agarosa al 1 % en TAE 1X. Se realizó la densitometría y análisis de las bandas con el programa Quantity One (Fluor S-TM Multimager Biorad®).

6.2 Comprobación de la Funcionalidad de las proteínas FLIP.

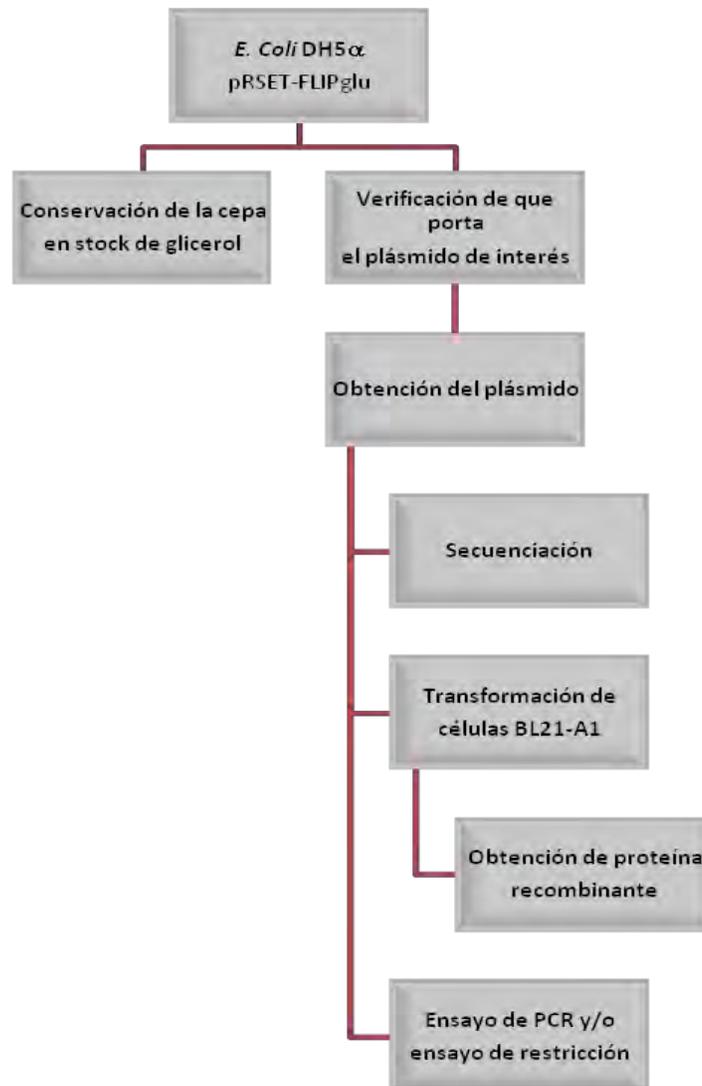


Figura 9. Diagrama de trabajo para la clonación del gen *FLIPgluF16AΔ13* en la cepa de *E. coli* BL21-A1 y posterior corroboración de la actividad de las proteínas FLIP.

6.2.1 Clonación de 4 biosensores-FLIP en *E. coli* BL21-A1

Se solicitaron a la compañía Addgene® (www.addgene.org) cuatro plásmidos que según la descripción contenían la información genética para una proteína que es capaz de unir glucosa, (mapas genéticos de los cuatro plásmidos en el Apéndice II). Los plásmidos fueron recibidos en stocks bacterianos de *E. coli* DH5 α , por lo que al momento de recibirlos se determinó realizar el diagrama de la Figura 10.

Conservación de la cepa. Se tomó una asada de cada uno de los tubos recibidos y se añadió a medio Luria-Bertani (**LB**) con ampicilina a una concentración de 100 μ g/mL, se incubó por 12 h a 37°C, parte de este cultivo se almacenó en glicerol al 15 % y se guardó a -70°C.

Purificación de DNA plasmídico (miniprep). La otra parte del cultivo descrito anteriormente se centrifugó a 10000 rpm por 3 min hasta obtener un botón celular. La purificación del DNA plasmídico se llevó a cabo de acuerdo al protocolo del proveedor QIAGEN que básicamente consiste en lisar las células para después precipitar el DNA cromosómico con hidrocloreuro de guanidina y dejar en suspensión el DNA plasmídico, posteriormente se absorbe el DNA plasmídico en una membrana de sílice para finalmente lavarlo con etanol y guardarlo en agua destilada a -20°C.

6.2.2 Verificación de la presencia del gene de interés en el vector.

A. Ensayo con enzimas de restricción. La reacción de restricción del vector purificado se llevó a cabo con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. El vector completo tiene un tamaño de 5218 pb y el gen *FLIPgluF16A Δ 13* se encuentra flanqueado por las secuencias que reconocen las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, el producto esperado es de aproximadamente 2400 pb.

Se colocó en un tubo 0.5-1 μ g de DNA con la cantidad necesaria de buffer tango 10X (Promega) para llegar a una concentración final de 1X y se incubó a 100°C por 5 min y posteriormente en hielo por 5 min más. Enseguida se añadió a cada

tubo 1 μL de cada una de las enzimas de restricción y se incubaron, posteriormente se agregó 1 μL de RNasa (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) incubándose a 37°C durante 30 min. Por último se verificó el fragmento en un gel de agarosa al 0.7 % en amortiguador TAE 1X, se aplicó un voltaje de 85 V durante 1 h y se observó en un transiluminador.

B. Secuenciación del gen *FLIPgluF16A Δ 13*. Una vez que se corroboró la presencia del fragmento en el vector se secuenció para verificar que correspondiera al gen *FLIPgluF16A Δ 13*. El análisis de las secuencias se llevó a cabo con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7-0-5-3 y BLAST 2.2.19 (ver Apéndice III).

6.2.3 Obtención de proteína recombinante.

Para estar seguros de que los biosensores fueran funcionales para su uso posterior en las determinaciones *in planta*, se purificaron cada uno de los biosensores y se hizo una caracterización preliminar *in vitro* para corroborar su valor de Kd.

Transformación de la cepa de *E. coli* BL21A1 con el vector pRSETflipglu.

A 50 μL células competentes de *E. coli* BL21-A1 se les adicionó 50 ng de plásmido. Se incubaron en hielo durante 20 min, después se incubaron a 42°C por un minuto y se pasaron a una cuba de hielo por 2 minutos. Se agregó todo el volumen a 1 mL de medio LB sin antibiótico y se incubó a 37°C durante 1.5 h con agitación. Posteriormente se plaquearon 200 μL del cultivo en medio Agar-LB-ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron a 37°C por 24 h.

Inducción de las proteínas FLIP's.

En medio LB-ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se crecieron células transformantes de *E. coli* BL21A1 durante 12 h a 37°C , parte de este cultivo se mezcló con medio LB-Ampicilina fresco en una proporción 1:20 o bien hasta obtener una densidad óptica (D.O.) a 600 nm inicial entre 0.05 y 0.1, nuevamente se incubó el medio a 37°C por aproximadamente 2 h,

esta vez hasta alcanzar una D.O. a 600nm entre 0.4 y 0.6; este cultivo corresponde al tiempo cero de inducción del cual se tomó una muestra y se guardó para realizar un análisis en gel de poliacrilamida-SDS.

Se realizó una curva temporal de inducción, adicionando al cultivo L-arabinosa a una concentración final de 0.2% e incubando a 30°C. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos de inducción y cada muestra fue centrifugada a 8000 rpm por 15 minutos a 4°C (rotor GSA) para obtener el paquete celular. Las células se resuspendieron en Tris/HCl 25mM pH 8, después se sonicaron por 30 min con pulsos de 15 s y 15 s de descanso, a una amplitud de 21 %. Para obtener la fracción soluble se centrifugó (rotor JA20) a 14 000 rpm por 7 minutos a 4°C. La fracción soluble posteriormente fue purificada mediante una cromatografía de afinidad. Se corrieron geles de poliacrilamida-SDS para verificar la aparición de la proteína.

Pese a que desde tiempos cortos de inducción había proteína recombinante, se determinó que la inducción de la proteína era óptima en el sobrenadante a las 2 h, por lo que los posteriores ensayos de inducción se realizaron incubando 2 h.

Purificación de las proteínas FLIP's mediante cromatografía de afinidad.

La purificación se realizó de acuerdo a protocolos estándar (Arnau *et al*, 2006; Chaga, 2001). Debido a que las proteínas FLIP se proteolizaban durante el proceso de purificación, se incluyó en el medio de resuspensión de las células el inhibidor de proteasas de la compañía Roche mini complete libre de EDTA (1 tableta en 10 mL de medio), previo a la sonicación de las células.

Preparación de la columna: Se adicionaron 8 mL de gel HIS-Select® Nickel affinity de Sigma, (P6611-25mL) a una columna, el gel compactado llegó a un volumen final de 5 mL. Se lavó la resina adicionando 3 volúmenes de agua desionizada, para eliminar el etanol de la resina. Posteriormente la columna se equilibró con 4 volúmenes del amortiguador A (Tris/HCl 25 mM, Imidazol 10 mM, PMSF 1 mM, NaCl 250 mM e

inhibidores de proteasas de la compañía Roche mini complete libre de EDTA 1 tableta /10 mL de medio). Enseguida se agregó el extracto soluble, aproximadamente 20 mL y se recolectó la fracción del volumen muerto (FM). Después se lavó la columna con 6 volúmenes del amortiguador B (amortiguador A con Imidazol 50 mM), y 5 volúmenes más del amortiguador A con Imidazol 50 mM, pero sin inhibidores de proteasas, o bien hasta que al medir la absorbancia a 280 nm ya no hubiera proteína, se recolectaron fracciones de 5 mL. Para eluir la proteína de interés se adicionó de 4 a 10 volúmenes del amortiguador de elución que contiene Tris/HCl 25 mM, Imidazol 250 mM, PMSF 1 mM y NaCl 250 mM. Todas las fracciones obtenidas (5 mL/fracción) se almacenaron a 4°C.

Para eliminar la glucosa del medio y lograr obtener la proteína sin ligando se dializó la fracción de elución que contenía la banda de interés. La diálisis de la fracción de elución se colocó en 3.5 L de amortiguador Tris/HCl 25 mM pH 8.0 durante 19 h a 4°C.

Visualización de la proteína FLIP en gel de poliacrilamida-SDS.

Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS al 12 % según la técnica de Laemmli (1970), se cargaron en el gel 15 µg de proteína de cada una de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación y disueltas en amortiguador de carga (Tris base 350 mM, SDS 5 %, DTT 160 mM, glicerol 7.5 % y azul de bromofenol 0.5 %), utilizando el amortiguador de corrida 1X (Tris base 50 mM, Glicina 380 mM, SDS 0.1 %). Las proteínas se separaron corriendo el gel a 15-25 mA por 1.5 h. La tinción de las proteínas en el gel se llevó a cabo agitando por 1 h con una solución de azul de comassie R250 0.125 % en metanol 50 % y ácido acético 10 %. Posteriormente se lavó el exceso de solución teñidora con una solución destañidora (metanol 45 %, ácido acético 10 %) durante 2-3 h.

Detección de las proteínas FLIP mediante Western blot.

Debido a que las proteínas FLIP presentan dos proteínas variantes de la GFP se utilizó un anticuerpo anti-GFP para seguir la purificación de la proteína. El anticuerpo se diluyó 1:15000 en TTBS adicionado con BSA 1 %, la dilución del segundo anticuerpo fue de 1:42000 con BSA 1 % en TTBS y se utilizó la solución de luminiscencia Immobilon™ Western Millipore durante 20 s, por último las bandas se revelaron en una placa fotográfica.

Determinación *in vitro* de la actividad de las proteínas mediante FRET.

La caracterización se realizó en un fluorómetro ISS PC1, usando pasos de luz de 0.1 cm en la lámpara de excitación y de 0.2 cm en la de emisión, a una temperatura de 8°C. Se ajustaron las condiciones del software a una longitud de onda de excitación de 433 nm, con un rango de emisión de 450 a 600 nm registrando la fluorescencia cada 2 nm, con lo que se obtuvo un espectro de emisión.

Se utilizó una celda de cuarzo de 2 mL con agitación, en la cual se agregó 1 mL de amortiguador Tris/HCl 25 mM pH 8 y la proteína purificada a una concentración final de 250 µM. A la solución anterior se adicionaron diferentes volúmenes de una solución stock glucosa 500 mM hasta llegar a la saturación de la proteína de esta manera se obtuvieron diferentes espectros de emisión. Los espectros de emisión esperados para las diferentes proteínas FLIP son característicos del par YFP/CFP o del par Afrodita/CFP, por lo que se observan en cada caso dos máximos de emisión (ver apéndice IV). En el caso del espectro de emisión del par YFP/CFP los máximos de intensidad de fluorescencia aparecen a los 528/485 nm y para el par Afrodita/CFP los máximos de intensidad de fluorescencia aparecen a los 533/485 nm (Deuschle, *et al.*, 2006; Deuschle, *et al.*, 2005)

6.3 Obtención de bacterias transformantes de *Agrobacterium tumefaciens*

6.3.1 Clonación del gen *FLIPgluF16AΔ13*.

Para expresar las proteínas FLIP en plantas de *Nicotiana tabacum* fue necesario clonar el gen *FLIPgluF16AΔ13* en un vector binario, debido a que no se encontraba disponible un vector que tuviera los sitios de restricción con los que contaba nuestro gen de interés, se decidió cambiar uno de los sitios de restricción, para ello se diseñaron primero los oligonucleótidos que cumplieran con las características necesarias para amplificar el gen completo con los sitios de restricción apropiados y mediante reacciones de restricción y recombinación llevar a cabo la clonación en el vector binario (Figura 10).

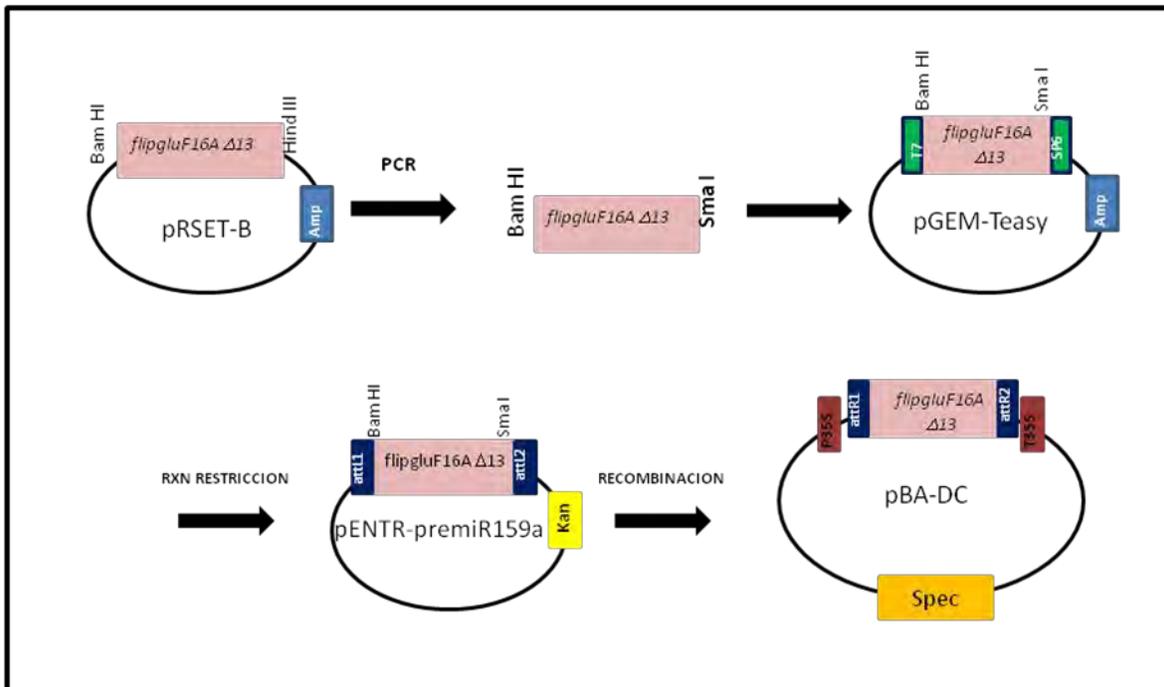


Figura 10. Clonación del gen *FLIPgluF16A Δ 13* en el vector binario pBA-DC-myc. Primeramente se amplificó el gen insertando el sitio *SmaI* en el extremo 3' mediante PCR, posteriormente se clonó en el vector pGEM-Teasy para llevar a cabo la reacción de restricción del fragmento e insertarlo en un vector pENTR con sitios de recombinación que permiten clonar el gen en el vector pBA-DC-myc.

6.3.2 Diseño de oligonucleótidos para cambiar el sitio de restricción *HindIII* por *SmaI*.

Debido a que el sitio que reconoce la enzima de restricción *HindIII* no se encontraba en el vector vehículo que utilizaríamos para la clonación de los genes FLIP en el vector binario, se diseñó una serie de oligonucleótidos, así el gen *FLIPgluF16A Δ 13* podría tener ahora el sitio de restricción para *SmaI* y realizar la clonación en el vector binario pBA-DC-myc (Figura 11).

Los oligonucleótidos de la Tabla 4 se diseñaron usando diferentes programas como el PRIMER 3 en Workbench, IDT SciTool y Oligo Cal, en donde se obtuvo el valor de Tm, % GC, así como la predicción de estructuras como los harpins y el auto-alineamiento. En el caso del oligonucleótido sentido se contempló el sitio de restricción *BamHI*, mientras que para el oligonucleótido antisentido se adicionó el sitio de restricción de *SmaI*, para lograr

insertar el gen en el vector de la serie de pENTR-premi159, el cual puede cortarse con las enzimas de restricción en menor tiempo que un vector binario, además de contener los sitios de recombinación que permiten la clonación en el vector binario en el sentido correcto, con una alta eficiencia (Invitrogen manual: Gateway™ pENTR™ Vectors).

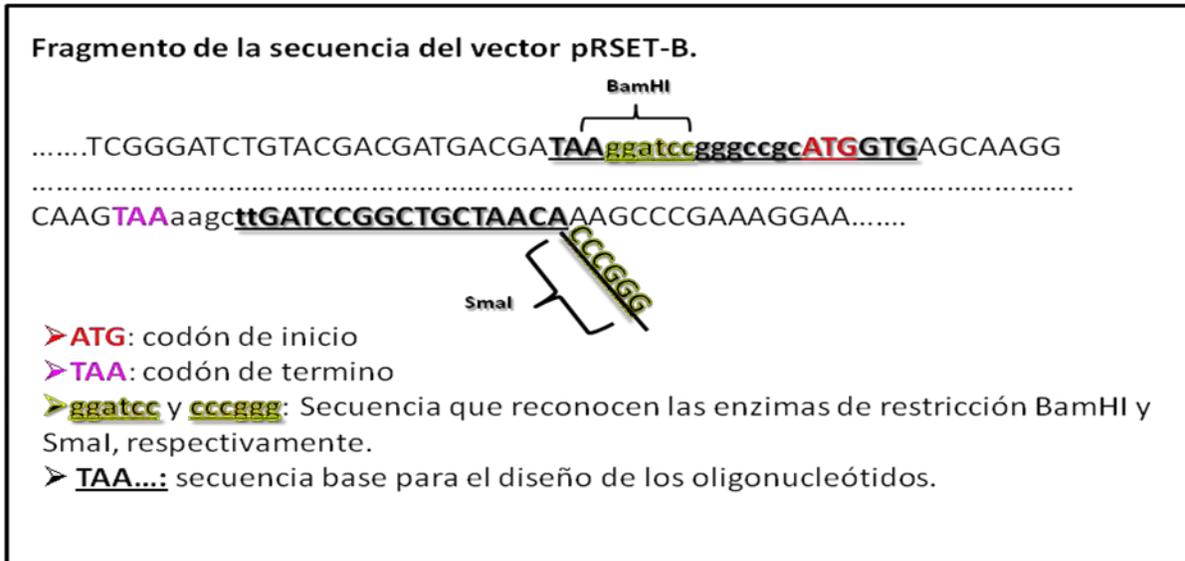


Figura 11. Fragmento de la secuencia del vector pRSET-B usada como molde para el diseño de oligonucleótidos con el que se insertó el sitio de restricción *SmaI* en el gen *FLIPgluF16AΔ13*. Se distingue de diferente color el codón de inicio (rojo) y termino (rosa), así como las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción *BamHI* y *SmaI*. Subrayado y en negritas se muestra la secuencia molde de los oligonucleótidos sentido y antisentido.

Tabla 4. Secuencias y características de los oligonucleótidos utilizados para modificar los sitios de restricción del gen *FLIPgluF16AΔ13*. La secuencia sombreada corresponde al sitio de corte por las enzimas de restricción.

Secuencias	Tm	%GC	Longitud
FORWARD:5'-TAAGGATCCGGGCCGCATGGTG-3'	60	64	22
REVERSE (a):5'-CCCGGGTGTAGCAGCCGGATCAA-3'	62	63	24
REVERSE (b):5'-CCCGGGATCAAGCTTTACTT-3'	59	50	22

6.3.3 Reacción de PCR y purificación de los productos de PCR.

La reacción de PCR se llevó a cabo con el amortiguador PCR master mix® de Promega, adicionando 50 ng de DNA y 0.5 μ M de cada oligonucleótido. Las condiciones de amplificación que fueron programadas en el termociclador fueron:

Fase I	Fase II	Fase III
94°C 8 min	94°C 1 min 59°C 45s 72°C 2.5 min	72°C 15 min
Número de ciclos : 1	30	1

El producto del PCR se corrió en un gel de agarosa al 0.7 % en TAE 1X, a partir del cual se purificó la banda de ~2.4 Kb de acuerdo al protocolo de extracción para productos de PCR de QIAGEN, el cual incluye la disolución del gel de agarosa en amortiguador y un lavado con etanol, y finalmente la disolución del DNA en agua destilada. Se almacenó hasta su uso a -20°C.

6.3.4 Clonación del producto de PCR en el vector pGEM-TEasy.

El producto de PCR obtenido se clonó en el vector de almacenamiento pGEM-TEasy de Promega (Mapa del vector en el Apéndice V) para lo cual se incubó con la T4 Ligasa durante 3 h a temperatura ambiente usando una proporción vector:inserto de 1:3, y transformando células competentes de *E. coli* DH5 α . A las células competentes se les adicionó 50 ng de plásmido después se incubaron en hielo durante 20 min, posteriormente se incubaron a 42°C por un minuto y se pasaron a una cuba de hielo por 2 minutos. Se agregó todo el volumen a 1 mL de medio LB sin antibiótico y se incubó a 37°C durante 1.5 h con agitación. Posteriormente se plaquearon 200 μ L del medio de cultivo en medio Agar-LB- ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron a 37°C por 24 h.

Preparación de células competentes *E. coli* DH5 α .

Se inoculó una colonia aislada o una asada de un stock de glicerol de la cepa de *E. coli* DH5 α en medio LB y se incubó a 37°C por 24 h con agitación. Se transfirió el cultivo saturado a medio LB fresco en una proporción de 1:100 y se mantuvo a 37°C hasta alcanzar una absorbancia a 590 nm de 0.375. Enseguida se transfirió el volumen total a tubos falcon estériles, éstos se incubaron en hielo durante 10 min, y se centrifugaron a 3000 rpm por 7 min a 4°C en la Centrífuga Hettich Universal 320R. El botón obtenido se resuspendió en una solución de CaCl₂ (CaCl₂ 60 mM, Glicerol 15 %) y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min a 4°C. Nuevamente el botón se resuspendió en una solución de CaCl₂ (CaCl₂ 60 mM, Glicerol 15 %) y se incubó en hielo durante 30 min, enseguida se centrifugó a 3000 rpm por 7 min a 4°C. Finalmente el botón se resuspendió en solución de CaCl₂ (CaCl₂ 60 mM, Glicerol 15 %) fría y se prepararon alícuotas de 100 μ L en tubos microfuga que fueron sumergidos en N₂ líquido y almacenados a -70°C.

Transformación en bacterias *E. coli* DH5 α .

La transformación se llevó a cabo según se describió anteriormente. Para la selección de las colonias que contenían el inserto se agregó a las cajas Petri con medio Agar-LB- Amp, 20 μ L de IPTG 50 mM y 20 μ L de X-gal 20 mg/mL. Las colonias que no contenían inserto presentan una coloración azul y aquellas que presentaban al inserto su apariencia era blanca.

Verificación del fragmento en el vector pGEM-TEasy. A partir de las colonias blancas se realizó un PCR picando la colonia seleccionada. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación fueron el T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y el SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3') de acuerdo a las siguientes condiciones de amplificación:

Fase I	Fase II	Fase III
94°C 8 min	94°C 1 min 50°C 45s 72°C 2.5 min	72°C 15 min
Número de ciclos : 1	30	1

El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 0.7 % en TAE 1X a 85 V por 1 h.

Para corroborar la presencia del inserto en el vector se llevó a cabo la digestión del vector con la enzima *EcoRI*. Finalmente se envió a secuenciar el vector a la unidad de Biología Molecular del instituto de Fisiología Celular, UNAM (Ver Apéndice VI).

6.3.5 Clonación del gen *FLIPgluF16AΔ13* con los sitios de restricción *BamHI* y *SmaI* en el vector pENTR-premiR159a.

Se llevó a cabo la digestión con las enzimas de restricción *BamHI* y *SmaI* de los vectores pGEM-TEasy que tienen insertado el gen que codifica para las cuatro proteínas FLIP, así como el vector pENTR-premiR159a (Ver apéndice VII).

Para la reacción de restricción se colocó en un tubo microfuga 1 μg de DNA de cada una de las muestras de interés con 2 μL de buffer REact®4 10X de *SmaI*, 2 μL de la enzima *SmaI*, 2 μL de la enzima *BamHI* y agua suficiente para 10 μL de solución. Primeramente la mezcla sólo con la enzima *SmaI* se incubó a 30°C por 1.5 h y enseguida se adicionó la enzima *BamHI* y se incubó a 37°C por 1.5 h. La muestra digerida se corrió en un gel de agarosa al 1 % en TAE 1X a 85 V.

A partir del gel (Figura 12) se cortó y purificó el fragmento de interés de acuerdo al protocolo de extracción para productos de PCR de QIAGEN. Los fragmentos purificados corresponden a ~3 Kb para el caso del vector pENTR-premiR159a y como se mencionó anteriormente, el fragmento insertado en el vector pGEM-TEasy corresponde a ~2.4 Kb. Estos fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

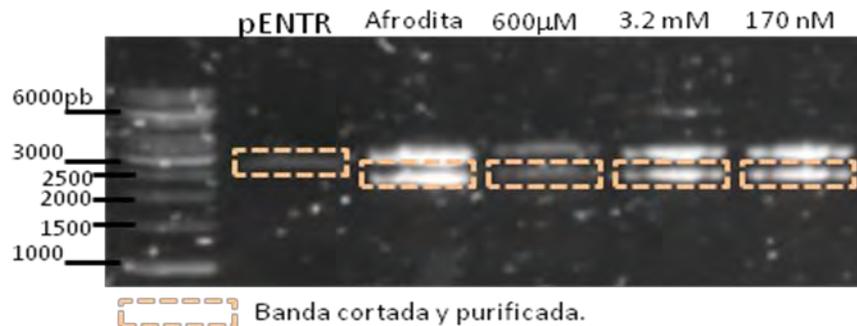


Figura 12. Reacción de restricción de los vectores pENTR y pGEM-TEasy con las enzimas *BamHI* y *SmaI*. En el cuadro se muestra la banda de interés de cada vector, la cual fue cortada y purificada para ser usadas en pasos posteriores.

Los fragmentos purificados se clonaron en el vector pENTR-premiR159a para lo cual se incubó con la T4Ligasa durante 3 h a temperatura ambiente usando una proporción vector:inserto de 1:3, y transformando células competentes de *E. coli* DH5 α . A las células competentes se les adicionó 50 ng de plásmido, después se incubaron en hielo durante 20 min, posteriormente se incubaron a 42°C por un minuto y se pasaron a una cuba de hielo por 2 minutos. Se agregó todo el volumen a 1 mL de medio LB sin antibiótico y se incubó a 37°C durante 1.5 h con agitación. Posteriormente se plaqueó 200 μ L del cultivo en cajas Petri con medio LB-kanamicina a una concentración de 50 μ g/mL y se incubaron a 37°C por 24 h. De las colonias que crecieron se purificó el plásmido de acuerdo al protocolo de QIAGEN miniprep y se guardó a -70°C hasta su uso.

Verificación del fragmento en el vector pENTR-premiR159a.

Para verificar si el inserto se encontraba en el vector se realizó la reacción de restricción con las enzimas *SmaI* y *BamHI* como se describió anteriormente, así como la reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y sentido de la Tabla 4 (5'-TAAGGATCCGGGCCGCATGGTG-3') bajo las siguientes condiciones:

Fase I	Fase II	Fase III
94°C 10 min	94°C 1 min 56°C 1 min 72°C 3 min	72°C 18 min
Número de ciclos : 1	30	1

El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1 % en TAE 1X a 85 V por 1 h.

Finalmente se envió a secuenciar el vector a la unidad de Biología Molecular del instituto de Fisiología Celular, UNAM (Ver Apéndice VI).

6.3.6 Clonación del gen *FLIPgluF16A Δ 13* en el vector binario pBA-DC-myc.

Como último paso, se clonó el gen *FLIPgluF16AΔ13*, que fue insertado en el vector pENTR, en el vector binario pBA-DC-myc (ver apéndice VIII) por recombinación. La reacción se llevó a cabo como indica el manual de Invitrogen Gateway® LR clonase™ II Enzyme Mix, adicionando 100 ng del vector pENTR-FLIP y 50 ng el vector binario, la reacción transcurrió por 1 h para posteriormente llevar a cabo la transformación con células competentes de *E. coli* DH5α como se indica anteriormente. Se plaqueó 200 μL de células en cajas Petri con medio LB-espectinomicina a una concentración final de 50 μg/mL y se dejó incubando por 24 h a 37°C. A partir de estas cajas se seleccionaron diferentes colonias que fueron picadas y transferidas a dos cajas con diferente antibiótico, la primera contenía medio LB-kanamicina a una concentración final de 50 μg/mL y la segunda medio LB-espectinomicina (50 μg/mL). Finalmente las colonias que fueron correctamente transformadas son las que crecieron en medio de LB-espectinomicina y no en el que contenía como antibiótico de selección kanamicina.

7 RESULTADOS.

7.1 Efecto de la infección con *Pseudomonas syringae* en el contenido de carbohidratos y expresión de los transportadores de hexosas de *Nicotiana tabacum*.

7.1.1 Respuesta de *Nicotiana tabacum* a la infección con *Pseudomonas syringae*.

Para determinar el efecto de la infección de *Nicotiana tabacum* con la bacteria *Pseudomonas syringae* DC3000, se llevó a cabo la infiltración de una suspensión bacteriana en hojas maduras de plantas adultas. Se seleccionaron tres hojas de la zona media de cada planta y dos plantas por cada tiempo de estudio. Se observó a las 12 h la disminución del color verde de la hoja en la zona de inoculación y en sus alrededores (Figura 13A), y a tiempos posteriores la zona de daño era clorótica, observándose la muerte celular en el tejido (Figura 13), comportamiento típico de la respuesta hipersensible de una interacción incompatible (Lam, *et al.*, 2001). El daño en el tejido persiste hasta los 12 días posteriores a la infiltración en la zona de infección (Figura 13B).

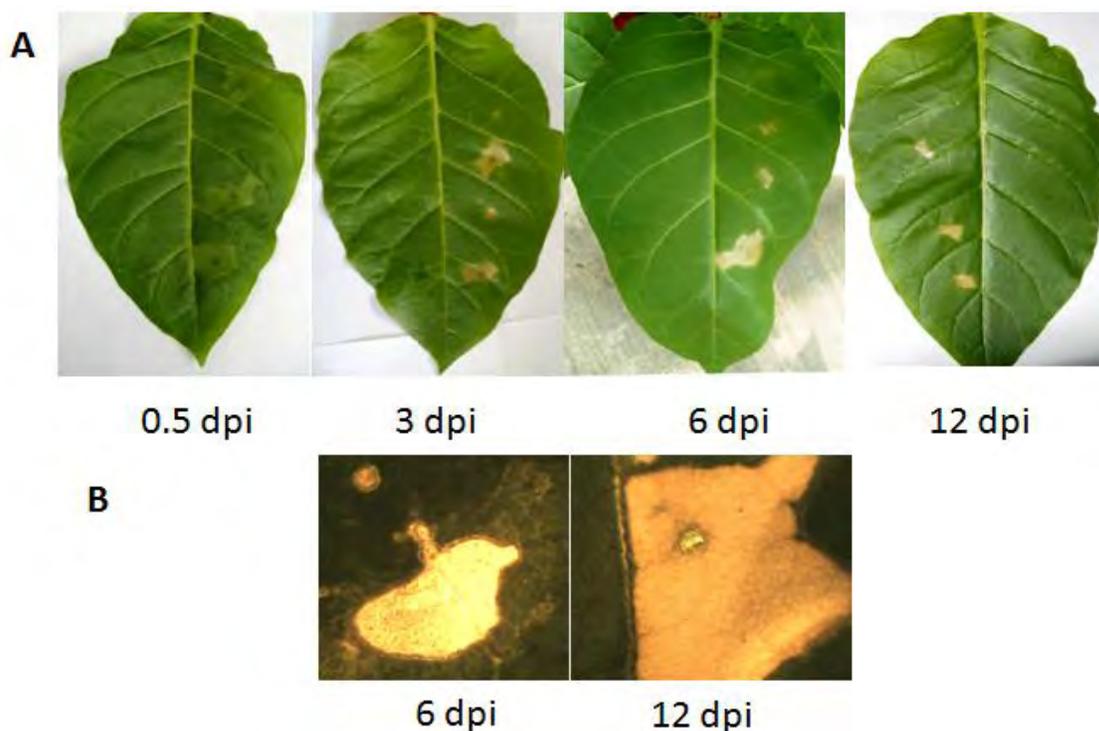


Figura 13. Curva temporal de la infección de hojas de *Nicotiana tabacum* con *Pseudomonas syringae* cv. Xanthi. A Morfología de las hojas. B. Acercamiento de una hoja a los 12 dpi, donde se puede apreciar la muerte del tejido sólo en la zona de infiltración. **dpi**= días post-inoculación

7.1.2 Efecto en el contenido de carbohidratos debido a la infección de hojas de *N. tabacum* por *P. syringae*.

Debido a que se conoce que durante la interacción planta-patógeno hay modificación en el contenido de carbohidratos (Bolton, *et al.*, 2009) se determinó el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa, así como el contenido de almidón durante 15 días después de la infección.

El contenido de los diferentes carbohidratos cambió durante los diferentes tiempos de tratamiento, observándose la mayor concentración a los días 3 y 15 (Figura 14). El perfil observado es propio del desarrollo de la planta por lo que en cada tiempo se comparó la concentración de los carbohidratos en el tejido infectado respecto al tejido sano (tejido control). La concentración de glucosa a las 12 horas de estudio fue de 3.5 mM en las hojas control, y las mayores concentraciones se encontraron los 3 días y 15 días, siendo de 7.1 mM y 6.2 mM, respectivamente (Figura 14A). Las hojas infectadas con el patógeno presentaron el mismo perfil que el observado en las hojas control, sin embargo se observaron incrementos discretos en el tejido infectado, pero el mayor aumento se encontró a tiempos largos, donde a los 12 dpi incrementó 3 veces y a los 15 dpi incrementó 1.6 veces, ambos respecto al tejido control. También la concentración de fructosa presentó el mismo perfil que el obtenido por la glucosa, ya que la mayor concentración de esta hexosa que se registro en las hojas control fue a los 3 y 15 días, al ser de 10.4 y 8.8 mM, respectivamente (Figura 14B). El contenido de fructosa en las hojas infectadas presentó aumentos discretos, donde el mayor aumento ocurrió nuevamente a los 12 días, 2 veces mayor que en las hojas control, y a los 15 días, 1.5 veces mayor que en las hojas control.

El incremento en el contenido de glucosa y fructosa a los 12 y 15 dpi podría deberse a la hidrólisis de la sacarosa en las hojas, por lo que determinamos el contenido de sacarosa. El perfil del contenido de sacarosa a través del tiempo de infección fue muy semejante a los obtenidos para la glucosa y la fructosa, ya que tienden a aumentar a los 3 y 15 días tanto en las hojas control como en las hojas infectadas, sin embargo no hay diferencias en el contenido de sacarosa entre las hojas control e infectadas (Figura 14C). Así que el exceso de hexosas que logramos detectar a los 12 y 15 dpi podría deberse a que se importa sacarosa de las células infectadas y se hidroliza en los apoplastos, otra explicación es que no se esté sintetizando la misma cantidad de sacarosa.

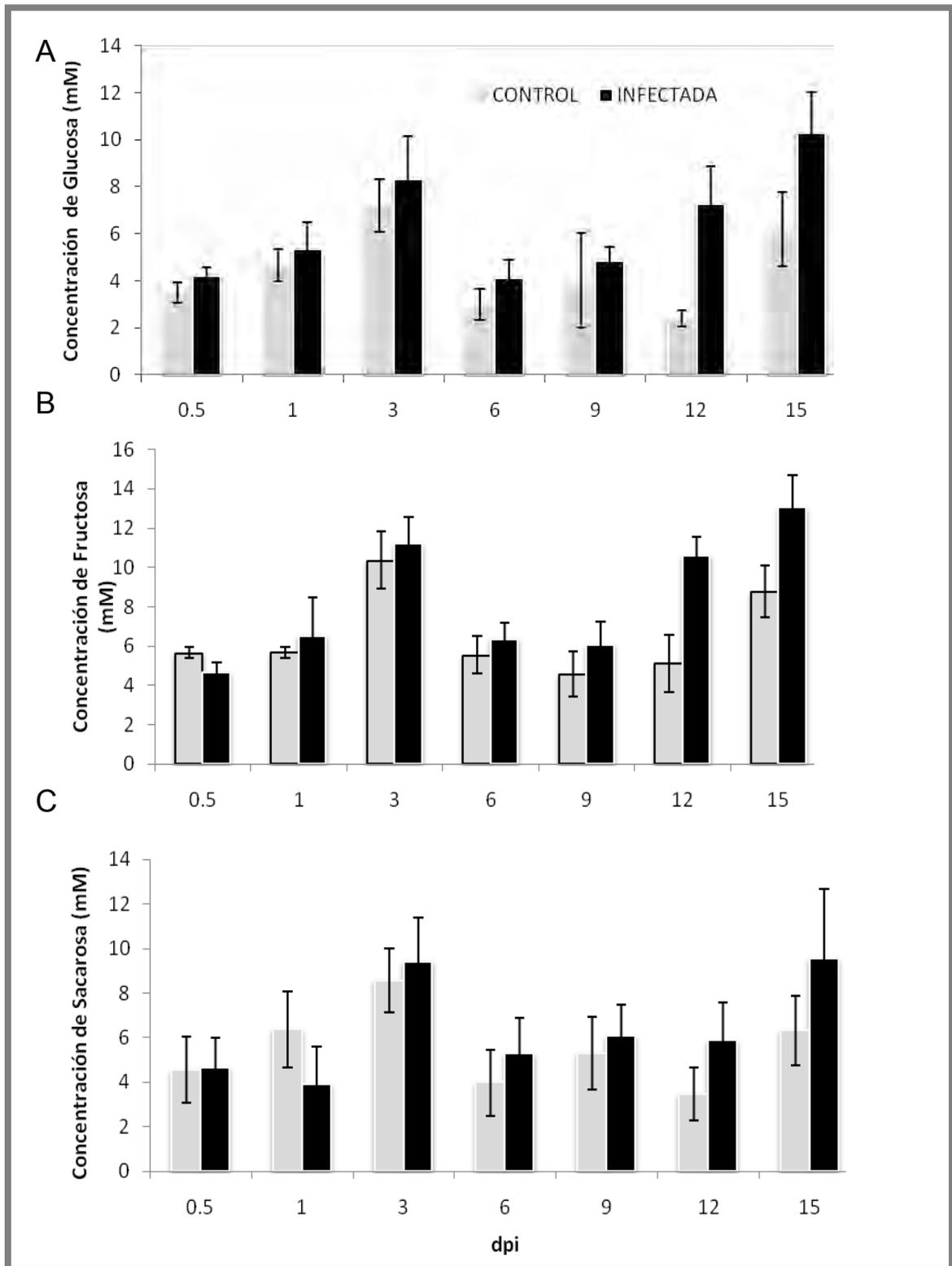


Figura 14. Contenido de carbohidratos solubles en hojas de *N. tabacum* infectadas con *Pseudomonas syringae*. A) glucosa, B) fructosa y C) sacarosa. dpi: días post-infección.

En la figura 15 se muestra la determinación del contenido de almidón. Contrario a lo que se esperábamos, se encontró que el contenido de almidón incrementó en las hojas infectadas únicamente al día uno posterior a la infección. Con base a lo anterior podemos pensar que se está afectando el metabolismo de carbono en las hojas infectadas.

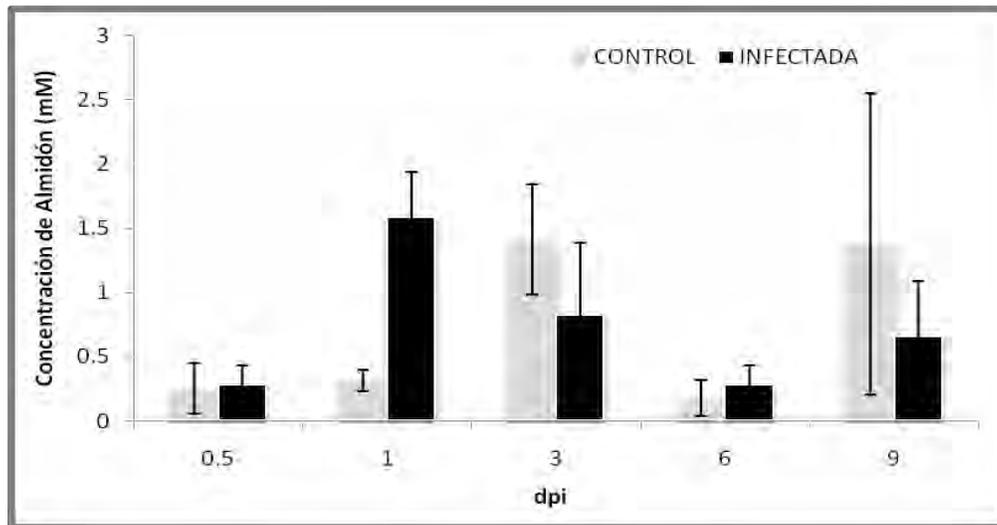


Figura 15. Contenido de almidón en hojas de *N. tabacum* infectadas con *Pseudomonas syringae*. dpi: días posteriores a la infiltración

7.1.3 Efecto en la expresión de los transportadores de carbohidratos debido a la infección de hojas de *N. tabacum* por *P. syringae*

Una de las formas en que la planta controla el contenido de carbono en los distintos compartimentos es a través de sus transportadores de carbohidratos. Además se conoce que los transportadores son sensibles a los cambios en los contenidos de carbohidratos y que existe cierta asociación entre el incremento en los contenidos de hexosas con el incremento en los transportadores de hexosas (Hayes, *et.al.*, 2010; Guzmán-Chávez, 2010; Fotopoulos, *et.al.*, 2003; Delrot *et. al.*, 2000). Por lo anterior buscamos si los niveles de los transportadores de carbohidratos se habían modificado durante la interacción *Nicotiana tabacum-Pseudomonas syringae* utilizando dos estrategias, la primera fue midiendo los niveles de los transportadores de hexosas usando un anticuerpo específico contra los transportadores de hexosas de la membrana plasmática de plantas y la segunda estrategia fue mediante el análisis de expresión del transportador de hexosas *NtMST1* mediante PCR semicuantitativo.

Como parte de la primera estrategia, se evaluó la capacidad del anticuerpo para detectar a la proteína de interés, para lo cual se utilizaron diferentes diluciones del anticuerpo que fueron de 1:1000 a 1:10 000, y se encontró que la dilución óptima para la detección de los transportadores de hexosas es de 1:3000. También se determinó la concentración óptima de la fracción microsomal para llevar a cabo la detección de los transportadores de hexosas, la concentración en la que se observó la mejor banda fue de 25 μg de proteína, como se muestra en la Figura 16.

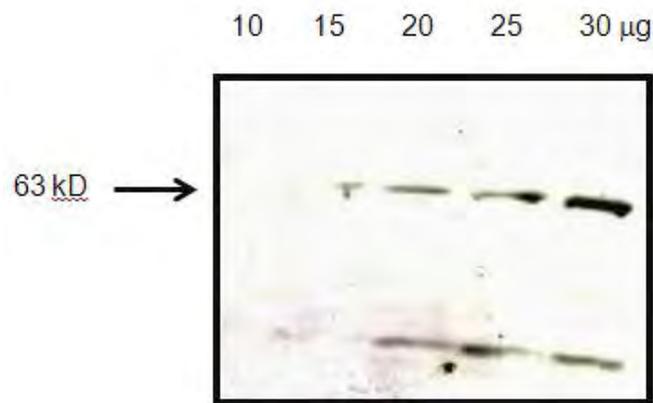


Figura 16. Efecto de la concentración de proteína en el nivel de detección de la banda de 63 kDa. Se corrieron diferentes concentraciones de proteína microsomal de hojas de tabaco en un gel de poliacrilamida-SDS, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se incubó con el anticuerpo anti-transportador de hexosas de la membrana plasmática de plantas. La concentración óptima de proteína microsomal que se reconoce con el anticuerpo es de 25 μg .

Posteriormente se detectó a los transportadores de hexosas en las fracciones microsomales de las hojas de *Nicotiana* en ausencia y presencia de patógeno (Figura 17). La figura 17A muestra el western blot obtenido de colocar las fracciones microsomales de hojas infiltradas únicamente con MgCl_2 10 mM (C), y de hojas infectadas provenientes de dos diferentes plantas (1a y 1b), durante diferentes tiempos de infección. De acuerdo a lo esperado, sólo se puede observar una banda con un peso molecular aproximado de 63 kDa (Figura 17A), el cual fue similar al peso molecular estimado para los transportadores de hexosas de la membrana plasmática (Ramírez-Palma, 2007). En la mayoría de los casos la banda obtenida en el tejido infectado es similar a la obtenida en el tejido marcado como control (C), a excepción de 1 dpi, donde las bandas en 1a y 1b son más intensas y su área es mayor que la observada en el carril C. Lo anterior lo podemos corroborar con

la figura 17B, donde al graficar el porcentaje de expresión de los transportadores de hexosas en el tejido infectado respecto al calculado en el tejido sano, vemos un máximo en 1 dpi, además el gráfico también muestra mayor expresión de los transportadores de hexosas a los 12 y 15 dpi. Como se observa hay una coincidencia en el aumento del nivel de proteína transportadora de hexosas a los 12 y 15 dpi con el aumento encontrado en la concentración de hexosas a los mismos tiempos, sin embargo no sugerimos que tienen una relación directa, ya que hubo tiempos en los que los incrementos en la proteína no coinciden con los incrementos en el contenido de estos carbohidratos.

Por otro lado, es probable que algún transportador en particular sea el causante de los incrementos encontrados en la expresión de los transportadores de hexosa en las hojas de tabaco infectadas con la bacteria. En *Nicotiana tabacum* se han identificado tres genes involucrados en el transporte de hexosas, pero sólo de uno de ellos se tiene la clona completa, la proteína producto de este gen se ha caracterizado en sistemas heterólogos mostrando ser un co-transportador de H⁺ con una alta especificidad por glucosa, galactosa y xilosa, además se expresa principalmente en tejidos demanda (raíces, flores y hojas jóvenes (Bourque *et.al.*, 2002, Sauer y Stadler, 1993), el transportador NtMST1. Se diseñaron los primers para amplificar un segmento de 599 pb del transcrito de NtMST1 y el análisis por PCR semicuantitativo mostró que la expresión de este transportador durante los diferentes tiempos analizados es muy semejante, a excepción de los 0.5 y 12 dpi, donde se observó que la banda es de menor intensidad (Figura 18A). Cuando el tejido fue infectado con la bacteria se modificó la intensidad de las bandas, ya que incrementó el nivel del transportador de hexosas principalmente a tiempos cortos de infección, es decir a los 0.5, 1 y 3 dpi en un 72.4 %, 51.7 % y 61.7 %, respectivamente (Figura 18B). El incremento en el nivel de expresión de NtMST1 coincide con el nivel de proteína transportadora de hexosas al 1 dpi, por lo que es probable que este transportador contribuya en los cambios en la expresión de la proteína en la membrana plasmática.

Con base a los resultados encontrados en el contenido de carbono y en la expresión de los transportadores de hexosas, donde se observó que la infección de hojas de tabaco con *P. syringae* provoca la modificación de los mismos, nosotros proponemos este sistema de interacción planta-patógeno como un modelo experimental para estudiar la participación de la glucosa como molécula clave en el metabolismo de carbono para que se lleve a cabo la transducción de señales.

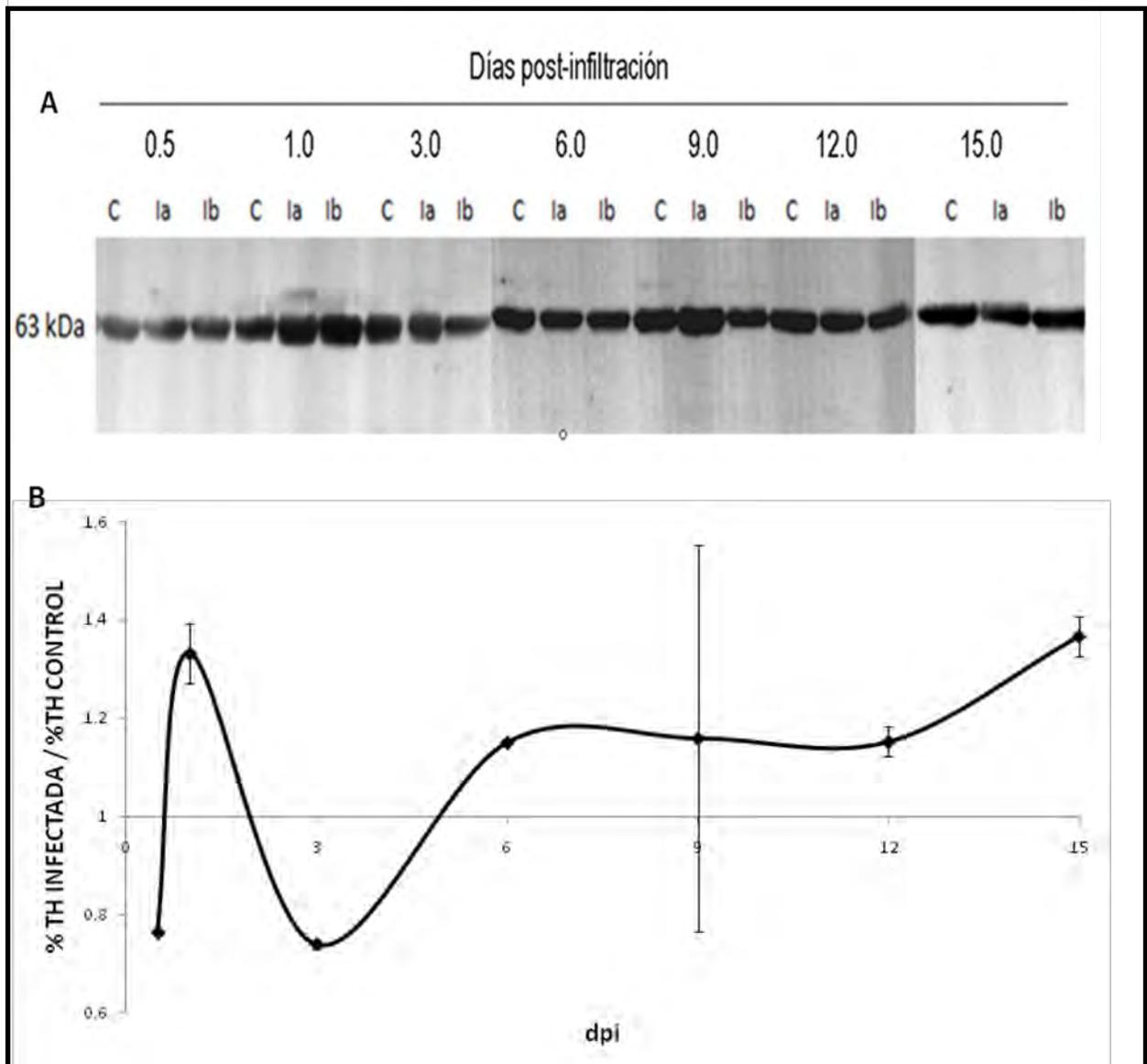


Figura 17. Nivel de expresión de los transportadores de hexosas de hojas de *N. tabacum* infectadas con *Pseudomonas syringae*. A) Detección de los transportadores de hexosas de la membrana plasmática mediante Western blot a diferentes tiempos de infección, desde 0.5 a 15 días post-infiltración. C: hojas control (infiltradas con una solución de $MgCl_2$ 10 mM), la e lb: hojas de dos plantas distintas infectadas con *P. syringae* B) Índice de expresión de los transportadores de hexosas en las hojas infectadas sobre la expresión de los transportadores de hexosas en las hojas control. El índice se calculó a partir de la densitometría de las bandas detectadas por el anticuerpo.

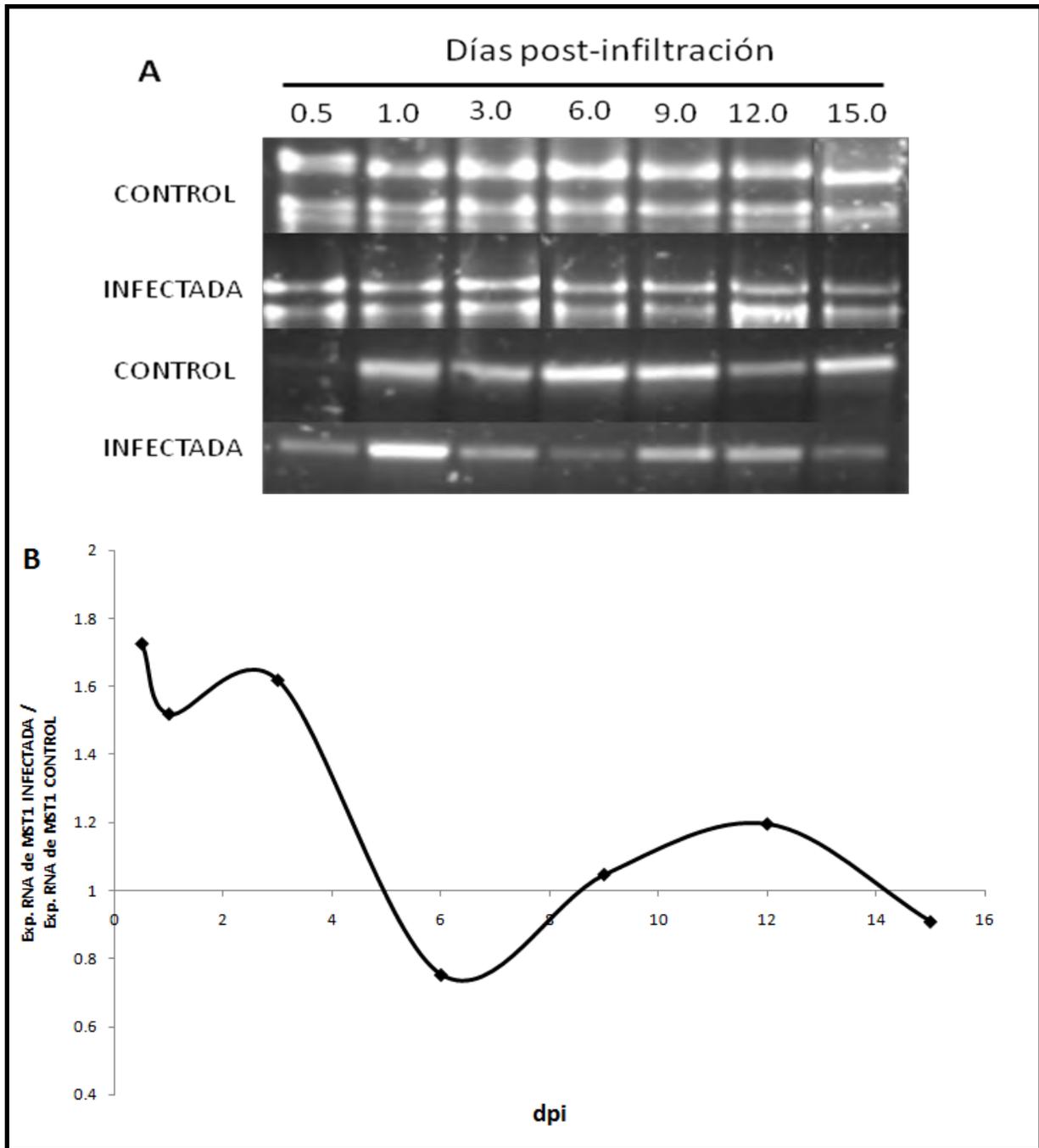


Figura 18. Análisis de la expresión del transportador de hexosas *NtMST1* mediante PCR durante la interacción *Nicotiana tabacum*-*Pseudomonas syringae*. A) Nivel de expresión del transcrito para el transportador de hexosas a diferentes tiempos de infección. Las hojas control fueron infiltradas con $MgCl_2$ 10 Mm. B) Índice de expresión del transportador *NtMST1* en hojas de plantas de tabaco control y hojas de plantas infectadas durante los diferentes tiempos de infección. El índice se calculó a partir de la densitometría de la banda de 599 nt amplificada con oligonucleótidos específicos. Experimento representativo de dos lotes diferentes de plantas.

7.2 Confirmación de la expresión funcional de las proteínas FLIP *in vitro*.

La construcción de los 4 plásmidos que usamos en este trabajo la realizó el grupo del Dr. Wolf Frommer (Deuschle, *et.al.*, 2006; Deuschle, *et.al.*, 2005), quien las puso a disposición del público a través de la compañía Addgene. Se recibieron los 4 plásmidos en los que se encuentran insertados los genes que codifican para los biosensores FLIP, el vector que funcionó como base para la construcción fue el pRSET (ver apéndice IX) y el inserto se encontraba flanqueado por las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*, el inserto contenía fusionados a los tres genes, los dos correspondientes a las proteínas fluorescentes y la proteína de reconocimiento, una variante de la proteína de unión a maltosa (Figura 19B). El plásmido fue recibido en la cepa de *E. coli* DH5 α .

Para comprobar que la expresión de los biosensores fuera correcta, se realizó la transformación de cada uno de los vectores en una cepa de expresión para la producción de proteína recombinante, la cual fue la cepa de *E. coli* BL21-A1, cepa en la que se puede inducir la expresión de la proteína recombinante al adicionar al medio arabinosa. Se secuenciaron los vectores para asegurarse que eran los correctos, así se encontró que la secuencia del gen *FLIPgluF16A Δ 13* estaba completa y correspondía a la reportada en la literatura (ver apéndice III).

Purificación de las proteínas FLIP

Para establecer la funcionalidad de la proteína primero se establecieron las condiciones óptimas de purificación de la proteína FLIPglu600 μ M, producto del gen *FLIPgluF16A Δ 13*, para posteriormente purificar las otras proteínas FLIP. Todas las proteínas FLIP, FLIPglu600 μ M, FLIPglu600 μ MAfrodita, FLIPglu170nM y FLIPglu3.2mM, presentan una cola de histidinas en el extremo amino terminal, por lo que el método usado para su purificación fue la cromatografía de afinidad usando un soporte sólido unido a níquel.

Para el establecimiento de las condiciones para la producción de proteína recombinante se determinó el tiempo óptimo de inducción de la cepa, si se encontraba en la fracción soluble o como cuerpos proteicos y si tenía el peso molecular esperado. Están reportados algunos protocolos que manejan tiempos de inducción que van de 16 horas (Fher, *et.al.*, 2002) hasta 72 horas en condiciones de oscuridad (Laboratorio del Dr. Frommer, <http://dpb.carnegiescience.edu/labs/frommer-lab/protocols/sensors>), sin embargo Lorimier y colaboradores (2002) mencionan que también es posible realizar la inducción de las proteínas durante 2-4 horas en condiciones normales. Por lo que se realizaron los experimentos por tiempos de inducción cortos.

En un matraz con células de *E. coli* BL21-1A se añadió arabinosa a una concentración final de 0.2% y a diferentes tiempos se extrajo una alícuota, se mezcló con una cantidad igual de amortiguador de muestra, y se separaron las proteínas en un gel de poliacrilamida SDS (Figura 19A). En la curva temporal de inducción de proteína recombinante, se distingue el incremento de una banda de aproximadamente 88 kDa, peso esperado para las proteínas FLIP. La mayor cantidad de la banda de 88 kDa se encuentra entre las 3 y 4 h de inducción. Adicionalmente, se centrifugaron los extractos totales ya que la proteína funcional estaría en la fracción soluble y no en la que forma parte de agregados denominados cuerpos proteicos. Desde la primera hora hasta las 5 horas de inducción en la fracción soluble está presente la banda de 88 kDa, sin embargo gran parte de ella se concentró en la fracción del pellet (Figura 19B).

Debido a que las proteínas FLIP tienen dos proteínas variantes de la GFP (la CFP y la YFP) delimitando a la proteína que reconoce a la glucosa, se realizó un ensayo de Western blot para confirmar la presencia de las FLIP en los extractos, utilizando como primer anticuerpo uno que reconoce a las GFP. Se detectó la banda de 88 kDa usando el anticuerpo en el tiempo cero (sin inducir), que corresponde a una síntesis basal de la proteína, esta banda se incrementa al colocar el inductor, tanto en el sobrenadante como en la fracción del pellet (Figura 19C). Además se observaron otras bandas de menor peso molecular que también reconoce el anticuerpo, sobre todo en las fracciones del pellet, las cuales pueden corresponder a productos de degradación de la proteína FLIP.

En vista de que la proteína FLIP debe permanecer en forma soluble y completa para detectar a la glucosa, primero se determinó inducir a la proteína usando el tiempo de 2 horas a 30°C, ya que la forma soluble de la proteína se induce más a ese tiempo, aún cuando observamos que es una fracción que presenta una cantidad más abundante de productos de degradación que a las 5 h de inducción (Figuras 19B y C), problema que podríamos superar al realizar la purificación en presencia de inhibidores de proteasas.

En la Figura 20 se muestra la comparación de la purificación de las proteínas FLIP en ausencia y presencia de inhibidores de proteasas. Es claro que la purificación de la proteína en la columna de afinidad predispone a la proteína al ataque por proteasas ya que al no colocar inhibidores, encontramos que en la fracción eluída pierde las bandas de alto peso molecular y se incrementan las de bajo peso molecular (Figura 20A).

Se realizó un nuevo extracto pero adicionando esta vez inhibidores de proteasas. En la Figura 20B se muestra el gel de poliacrilamida que corresponde a un extracto nuevo, pero adicionando esta vez inhibidores de proteasas, donde se puede ver que persiste la degradación de la proteína FLIPglu600 μ M, sin embargo, se mantiene una importante cantidad de proteína en el peso molecular esperado, 88 kDa, nuevamente se confirmó con un Western (Figura 20C).

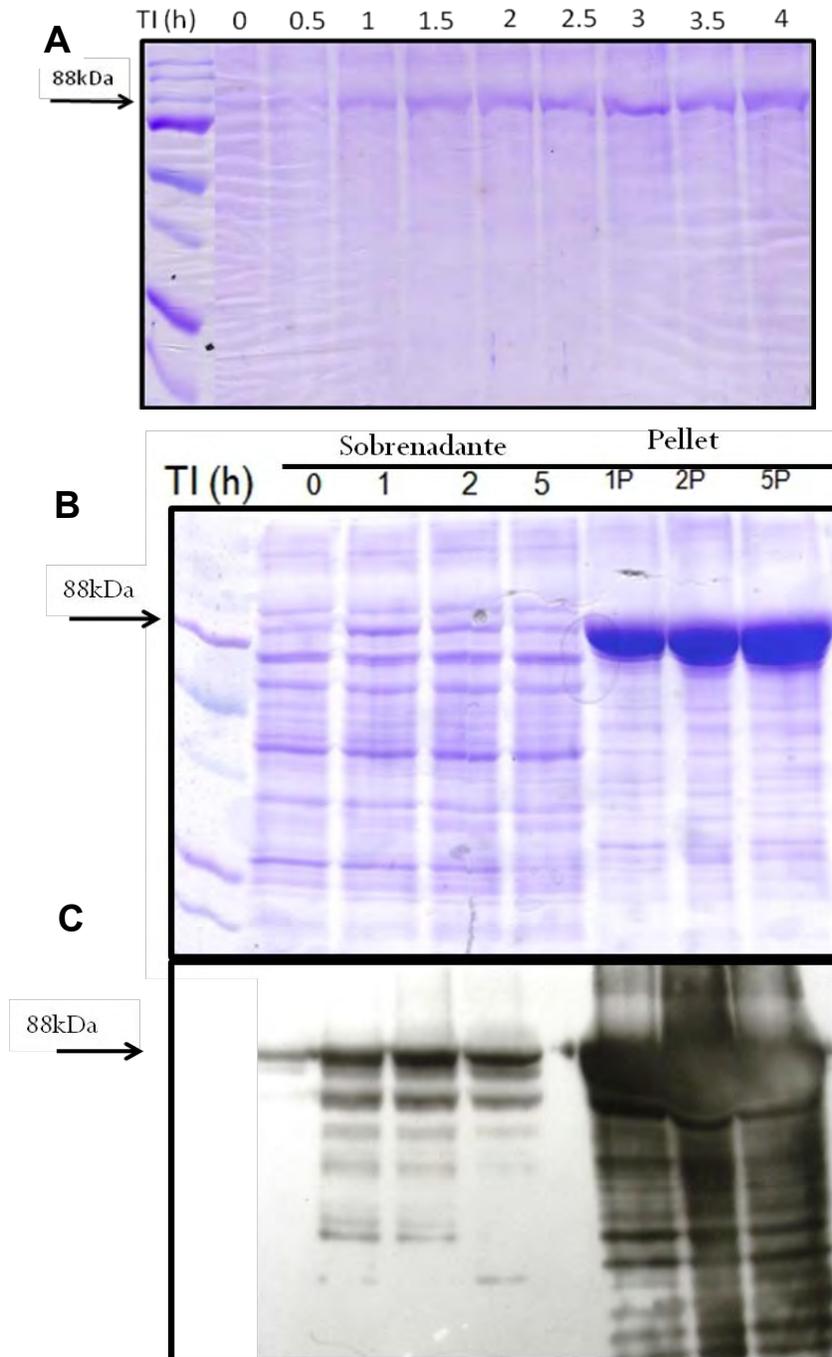


Figura 19. Curva temporal de inducción de la proteína FLIP (FLIP_{glu600}μM). **A)** Gel de poliacrilamida- SDS teñido con azul de Coomasie mostrando los extractos totales de células inducidas con arabinosa por diferentes tiempos. **B)** Gel de poliacrilamida- SDS teñido con azul de Coomasie mostrando las proteínas solubles y del pellet de muestras de células de *E. coli* BL21-A inducidas con arabinosa al 0.2% por diferentes tiempos. **C)** Detección de la proteína FLIP mediante western-blot usando anticuerpos policlonales contra las proteínas fluorescentes.

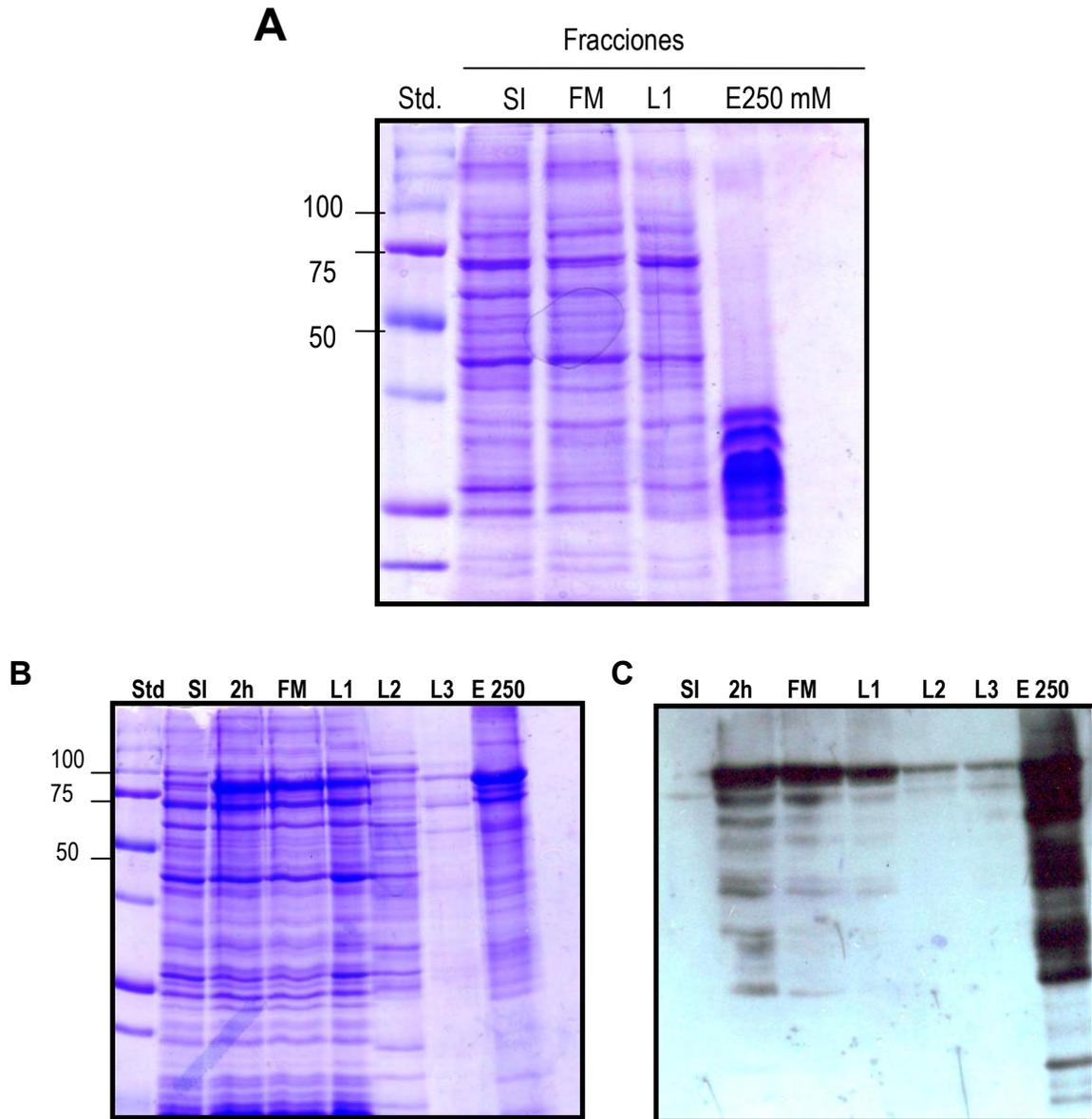


Figura 20. Purificación de la proteína FLIPglu600 μ M en ausencia y presencia de inhibidores de proteasas. Se colocó la fracción del sobrenadante de células que fueron inducidas con arabinosa al 0.2% por 2 h, se sonicaron en ausencia o presencia del cocktail de inhibidores de proteasas y el extracto soluble se colocó en una columna de cromatografía, después de varios lavados se eluyó a la proteína FLIP usando una solución que contenía 250 mM de Imidazol en ausencia o presencia de inhibidores de proteasas. **A)** Fracciones obtenidas de una purificación de la proteína FLIP en ausencia de inhibidores de proteasas. **B)** fracciones obtenidas de la purificación de la proteína FLIP adicionando inhibidores de proteasas, **C)** Inmunoréplica tipo Western del gel de poliacrilamida del panel B, usando como primer anticuerpo el anti-GFP. SI: fracción del sobrenadante sin inducir, FM: Fracción de volumen muerto L1: lavado 1 con Imidazol 10 mM, L2: lavado 2 con Imidazol 10 mM, L3: lavado 3 con Imidazol 10 mM y E250mM fracción de elución con imidazol 250 mM.

Respecto a las otras proteínas FLIP también se realizó el proceso de purificación utilizando el procedimiento antes descrito, 2 h de inducción a 30°C usando 0.2 % de arabinosa y la inclusión de los inhibidores de proteasas en el medio. Para las proteínas FLIPglu600 μ MAFRODITA y FLIPglu3.2mM se obtuvo una banda de peso molecular alto y pocas de bajo peso molecular y ya que ambos presentaron un patrón similar de purificación solo se muestra el gel de la purificación de la proteína FLIPglu3.2mM (Figura 22A). Mientras que para FLIPglu170nM se obtuvieron dos bandas en las fracciones de 100 y 250 mM de imidazol, una cerca de los 88 kDa y otra de aproximadamente 75 kDa, lo que indicaba la degradación posible de una de las proteínas fluorescentes y que si queríamos probar la funcionalidad de la proteína realizando FRET teníamos alta probabilidad de no detectarlo.

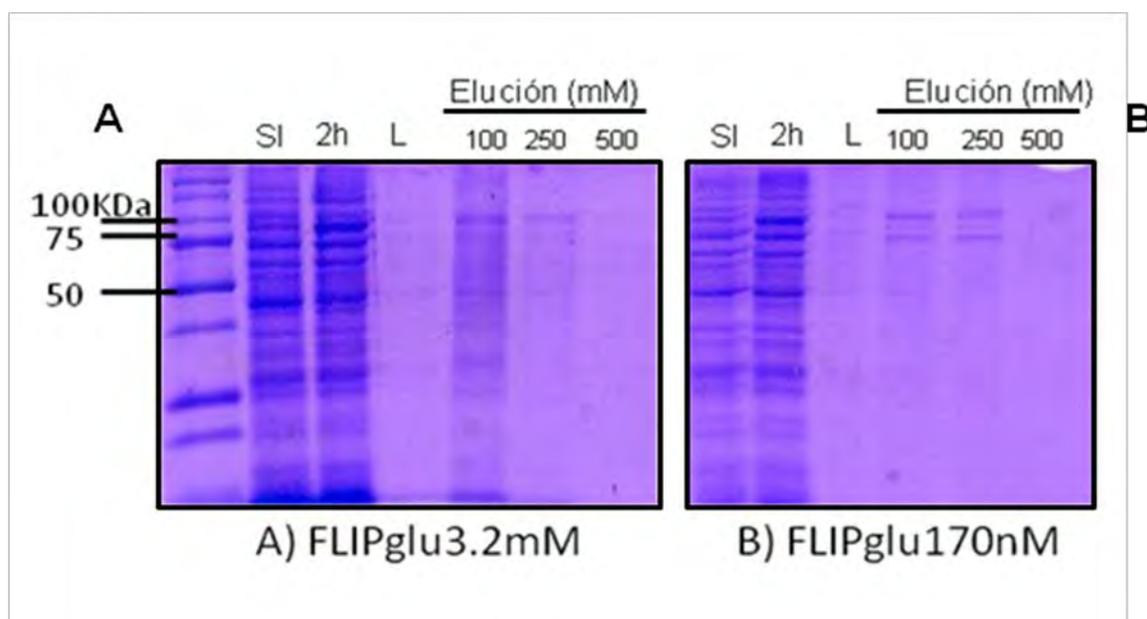


Figura 21. Purificación de las proteínas FLIPglu3.2mM y FLIPglu170nM mediante columna de afinidad. Gel de poliacrilamida al 12 % donde se muestran diferentes fracciones de purificación. A) FLIPglu3.2mM y B) FLIPglu170nM. SI: sin inducir, 2h: sobrenadante del extracto inducido por 2 horas, L: lavado con imidazol 10mM, Elución: elución de la proteína a una concentración de imidazol 100, 250 y 500 mM.

Por lo anterior se modificó la cantidad de inhibidores de proteasas y los tiempos utilizados en el proceso para disminuir el tiempo en el que el extracto estuviera en contacto con las proteasas. Se midió a cada fracción eluída la absorbancia a 280 nm, detectándose que en

la cuarta fracción de elución con Imidazol a una concentración de 250 mM, nombrada E4 es donde hay un máximo de proteína. Esta fracción así como la fracción del sobrenadante, flujo muerto y diferentes lavados de la proteína FLIP $\text{glu600}\mu\text{MAFRODITA}$ se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12 %, en el que se puede apreciar que la banda de 88 kDa se concentra y purifica conforme se lava la columna, además de que se muestra una cantidad mínima de enzima protealizada (Figura 22).

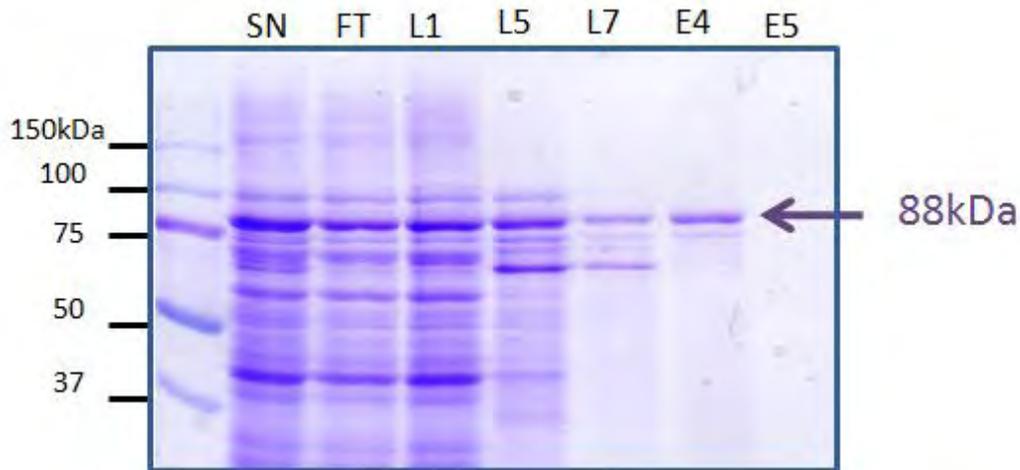


Figura 22. Purificación de la proteína FLIP $\text{glu600}\mu\text{MAFRODITA}$. Gel de poliacrilamida al 12 % donde se muestran diferentes fracciones de la purificación. SN: sobrenadante, FT: flujo muerto, L1: lavado 1 con Imidazol 10 mM, L5: lavado 5 con Imidazol 50 mM, L7: lavado 7 con Imidazol 50 mM, E4: elución de la proteína a una concentración de imidazol 250 mM y E5: elución a una concentración de imidazol 500 mM.

Comprobación *in vitro* de la actividad de las proteínas FLIP mediante la medición de FRET.

Los biosensores de glucosa FLIP tienen fusionados dos proteínas fluorescentes, la CFP y la YFP en los extremos amino y carboxilo terminal de la proteína de unión a glucosa/galactosa MgIB de *E. coli*, respectivamente (Fher,*et.al.*, 2003). Cuando se une la glucosa al biosensor existe un cambio conformacional que conduce a la interacción de las proteínas fluorescentes y a la transferencia de energía fluorescente o FRET.

Para llevar a cabo el FRET se excitó la proteína donadora (CFP) a una longitud de onda de 433 nm y se registró su emisión con un máximo en la intensidad de fluorescencia, a la longitud de onda de 485 nm, ésta transmite su energía a la proteína aceptora (YFP) la cual emite su energía de fluorescencia como un máximo a la longitud de onda de 533 nm. Lo anterior produce que la relación de la intensidad de YFP/CFP sea mayor que la que obtendría al tener por separado cada una de las proteínas fluorescentes (Dixit *et al.*, 2006). La adición de glucosa cambiará la intensidad de emisión de la fluorescencia, así conforme aumente la concentración de glucosa el índice de emisión de fluorescencia 533/433 disminuirá, de forma similar a lo que ocurre con el biosensor que detecta glutamato, el FLII⁸¹PE-1 μ (Okumoto *et al.*, 2008). El espectro de emisión de la figura 23 corresponde al obtenido por el biosensor FLII⁸¹PE-1 μ , donde se distingue que al aumentar la concentración de glutamato disminuye la intensidad de fluorescencia de la proteína YFP y aumenta la intensidad de fluorescencia de la proteína CFP, lo que conduce a una disminución de la señal de FRET.

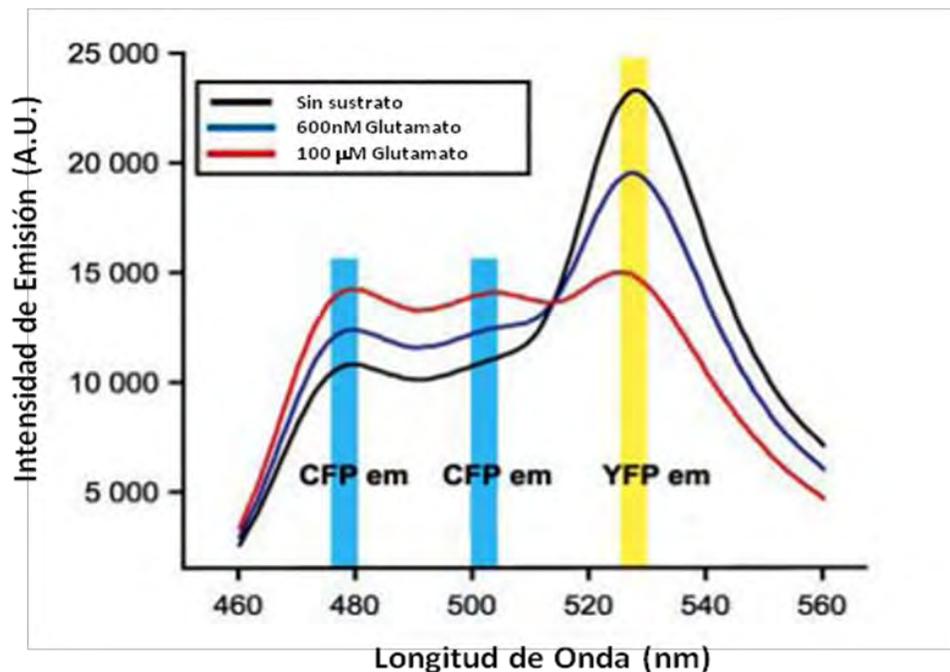


Figura 23. Espectro de emisión de fluorescencia del biosensor FLII⁸¹PE-1 μ en presencia de glutamato (modificado de Okumoto, *et.al.*, 2008). Conforme se incrementa el contenido de glutamato disminuye la relación en la intensidad de fluorescencia entre la variante YFP y la CFP, es decir, disminuye la señal de FRET.

Se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia de las proteínas FLIP purificadas, el espectro de emisión relaciona la intensidad de fluorescencia producida durante diferentes longitudes de onda, para nuestro caso fue de 450 a 600 nm, como se muestra en la figura 24. Cada una de las proteínas FLIP estudiadas detectan glucosa a diferentes intervalos de concentración, por ejemplo, para la proteína **FLIPglu600 μ MAfrodita** la concentración de 600 μ M corresponde a la cantidad de glucosa unida al biosensor cuando la relación de la intensidad de fluorescencia (YFP/CFP) es la mitad del valor de la intensidad registrada a saturación de la proteína (Deuschle *et al.*, 2005; Deuschle *et al.*, 2006).

La figura 24A muestra los espectros de emisión de la proteína **FLIPglu600 μ MAfrodita** purificada, los cuales corresponden a la proteína sin glucosa (rombo negro), con 4.3 mM de glucosa (circulo abierto) y 8.6 mM de glucosa (triángulo abierto); en los tres se distinguen dos máximos, el primero a la longitud de onda 485 nm, que es el máximo de emisión de la proteína CFP, y el segundo a la longitud de onda de 533 nm, máximo de emisión de la proteína Afrodita (también variante de la GFP, la cual en este caso sustituyó a la proteína YFP). Cabe señalar que al igual que el espectro de emisión del biosensor FLI⁸¹PE-1 μ , se observaron dos picos en la longitud de onda esperada, sin embargo, al adicionar glucosa no se observó la disminución y el aumento en la intensidad de las proteínas YFP y CFP, respectivamente, sino que ambos espectros disminuyeron su intensidad de manera similar (Deuschle, *et al.*, 2006). Esto nos indica que probablemente la proteína si esta reconociendo a la glucosa, sin embargo la conformación espacial de la proteína no es la óptima por lo que no se estaría llevando a cabo la transferencia de energía de fluorescencia. Debido a que el espectro que se obtiene de la proteína con glucosa 8.6 mM es muy semejante al obtenido durante la saturación del biosensor de glutamato (Figura 23) es probable que la diálisis no haya sido suficiente para eliminar toda la glucosa unida a la proteína por lo que se hace necesario realizar una diálisis más exhaustiva.

También se obtuvieron los espectros de emisión para la proteína **FLIPglu170nM** bajo las mismas condiciones (Figura 23B). En este caso se observó claramente el máximo correspondiente a la proteína CFP a los 485 nm, pero se obtuvo una subida discreta cerca

de los 533 nm, lo que indica que la proteína YFP no adoptó la conformación espacial necesaria para aceptar la energía que sería transferida por la CFP y emitir fluorescencia. Esta alteración podría deberse a la exposición de la proteína a la luz natural o bien que la adición de sales usadas durante la purificación, como es el caso del NaCl, provocará algún daño al fluoróforo, ya que la proteína YFP puede llegar a ser sensible a los iones Cl^- (Laboratorio del Dr. Frommer, <http://dpb.carnegiescience.edu/labs/frommer-lab/protocols/sensors>).

Al adicionar glucosa a una concentración final de 4.3 mM (triángulo abierto) hubo una disminución en la curva de intensidad de fluorescencia, es decir, si hubo una respuesta de unión de la proteína a la glucosa, aunque la concentración en la que cambió fue muy elevada en comparación con la concentración de glucosa reportada (Deuschle, *et.al.*, 2006), ya que la K_d de la proteína es 170 nM de glucosa.

Para el caso de la proteína **FLIPglu600 μM** se distinguen dos máximos, uno a los 481 nm y otro a los 509 nm (Figura 24C), sin embargo, estos son característicos sólo del espectro de emisión de la proteína CFP, por lo que es posible que la estructura conformacional de la proteína estuvo comprometida durante la purificación, provocando que la proteína YFP no emita la señal de fluorescencia. Bajo tales condiciones, se esperaba que al igual que lo observado para la proteína FLIPglu170nM, se presentara un cambio en el espectro como resultado de la adición de glucosa, lo cual en este caso no se observó.

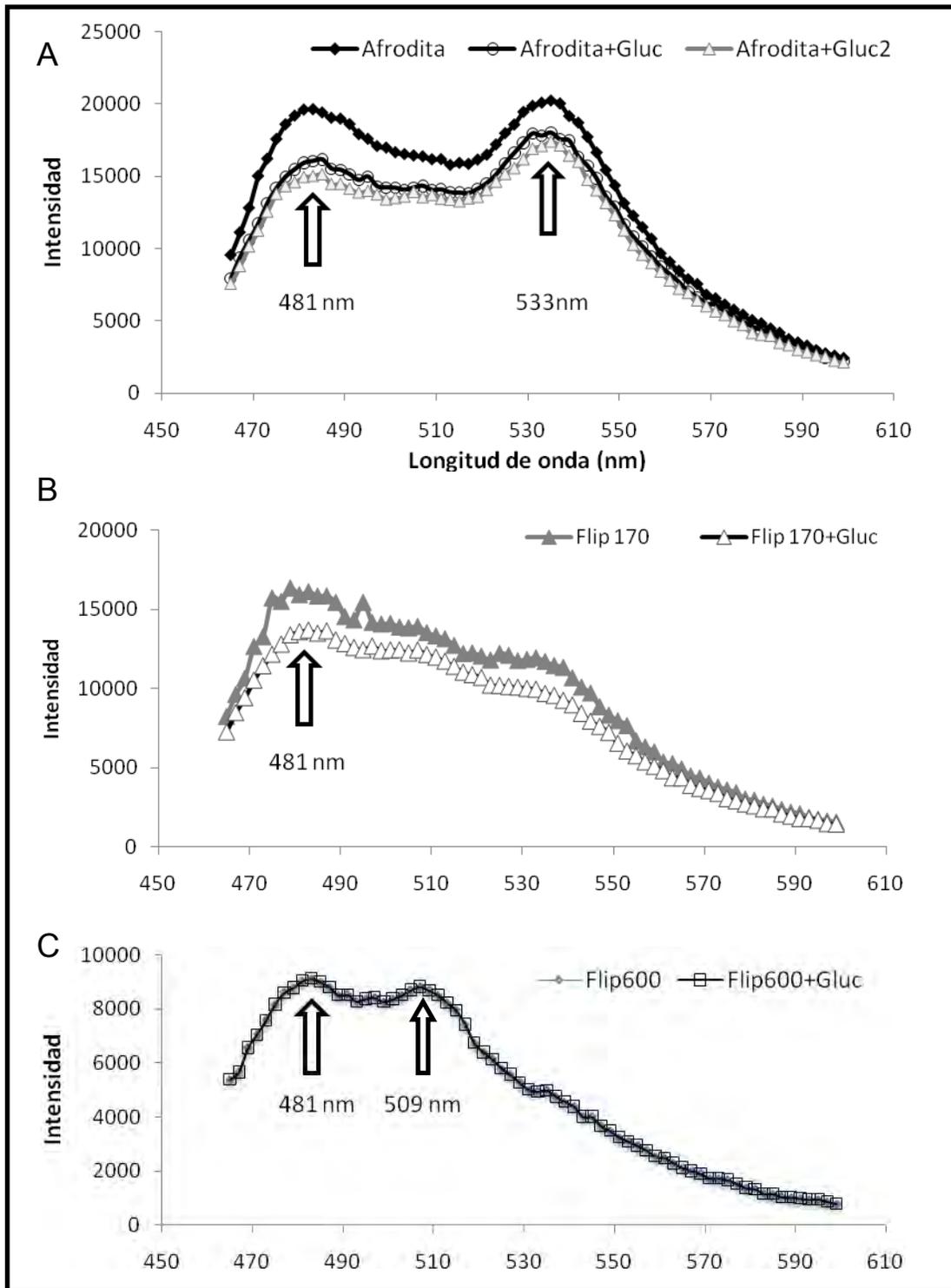


Figura 24. Espectros de emisión de fluorescencia de las proteínas A) FLIPglu600 μ MAfrodita, B) FLIPglu170nM y C) FLIPglu600 μ M.

En vista de que la proteína FLIPglu600 μ MAfrodita fue la que presentó el mejor espectro de emisión, se realizó una cinética adicionando diferentes concentraciones de glucosa, como se muestra en la figura 25. Sin embargo, los diferentes espectros obtenidos no mostraban la tendencia esperada, ya que ambos máximos disminuían al adicionar la glucosa y no mostraban la transferencia de FRET entre el par YFP/CFP (Deuschle, *et.al.*, 2006; Deuschle, *et.al.*, 2005; Fher, *et.al.*, 2003; Fher, *et.al.*, 2002)

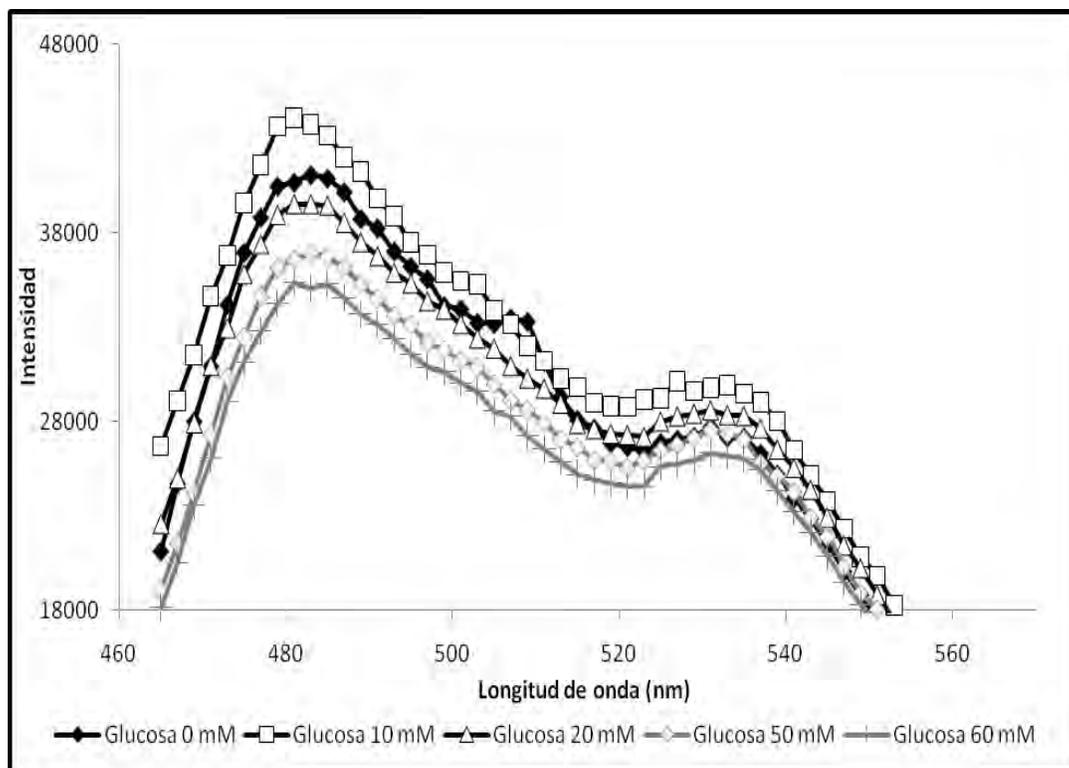


Figura 25. Espectro de emisión de la proteína FLIPglu600 μ MAfrodita libre y con diferentes concentraciones de glucosa (10, 20, 50 y 60 mM).

7.3 Clonación de los biosensores FLIP en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens*.

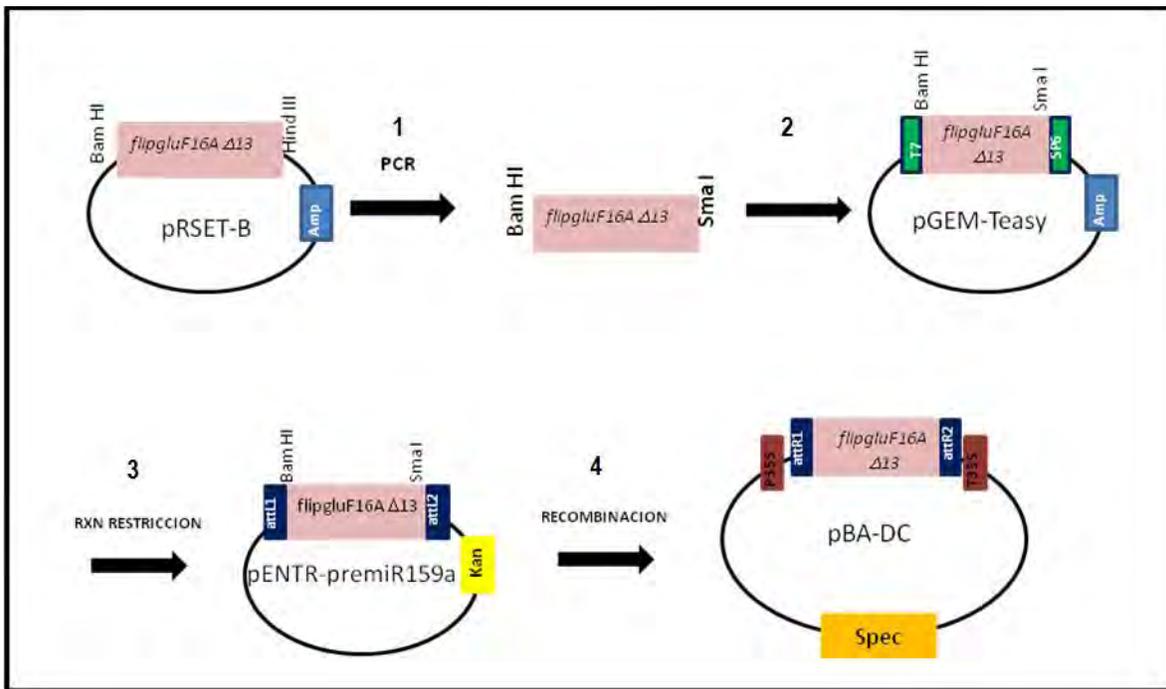


Figura 26. Estrategia para clonar a los genes *flp* en el vector Binario pBA-DC. El gen que codifica para las proteínas FLIP se encontraba clonado en el vector pRSET flanqueado por las secuencias de nucleótidos que son blancos de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. **1.** Se amplificó por PCR la secuencia completa del gen *flp* y se insertó el sitio de restricción de *Sma*I. **2.** Se clonó el fragmento de PCR en el vector pGEM-TEasy. **3.** Después se realizó la reacción de restricción y ligación para clonar el gen en el vector pENTR-premiR150a, se seleccionaron las cepas positivas mediante el fenotipo de resistencia a Kanamicina. **4.** Posteriormente por recombinación el gen se clonó en el vector Binario pBA-DC.

Para transformar las plantas de tabaco era necesario introducir los genes que codifican para los biosensores FLIP en el vector de expresión que fuera capaz de replicarse en *Agrobacterium*, es decir, clonarlos en un vector binario. Los vectores binarios contienen como marcador de selección el gen de resistencia a un antibiótico específico, el gen de interés está bajo la expresión de un promotor fuerte como es el P35S, además de la capacidad de expresarse en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* con la cual podemos llevar a cabo la transformación de plantas. Para colocar a los genes en el vector binario se realizó la estrategia de la figura 26 que contempla los siguientes pasos:

1. Amplificación de la secuencia completa del gen *flip* e inserción del sitio de restricción de *SmaI*.
2. Clonación del fragmento con los sitios de restricción distintos, en el vector pGEM-TEasy.
3. Clonación del gen en el vector pENTR-premiR150a, y
4. Clonación mediante recombinación del inserto en el vector Binario pBA-DC.

1. Amplificación de la secuencia completa del gen *FLIP* e inserción del sitio de restricción de *SmaI*.

Se amplificó una banda de aproximadamente 2.4 Kb mediante PCR que corresponde al gen *FLIPgluF16AΔ13* (Figura 27 carril 5). Sin embargo, hay dos productos de PCR de las muestras de DNA de las cepas FLIPglu600 μ M, FLIPglu170nM y FLIPglu3.2mM, una de 2.4 Kb y otra menor de 1 Kb (Figura 27 carriles 1 al 4). Se modificaron las concentraciones de magnesio pero aún así no se mejoró la intensidad de la banda de alto peso molecular y seguían apareciendo dos bandas, por lo que se rediseñaron oligonucleótidos para amplificar sólo una banda de 2.4 Kb.

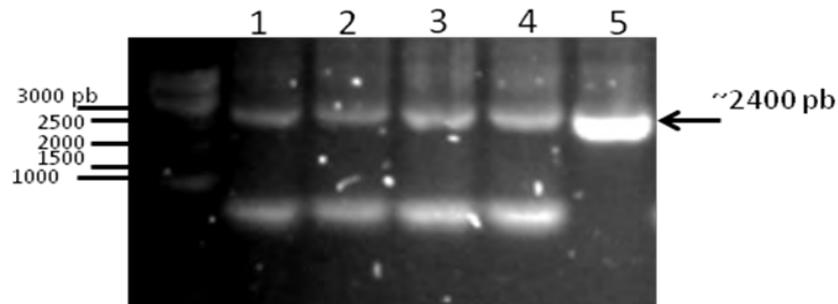


Figura 27. Productos de PCR de los genes *flip*. El producto amplificado tiene un peso molecular de aproximadamente 2400 pb. Carril 1: gen FLIPglu600 μ M (50 ng de DNA), carril 2: FLIPglu600 μ M (100ng de DNA), carril 3: FLIPglu170nM (100ng de DNA), carril 4: FLIPglu3.2mM (100ng de DNA) y FLIPglu600 μ MAfrodita (100ng de DNA).

La amplificación con el nuevo par de oligonucleótidos (sentido y antisentido, ver Tabla 4 en materiales y métodos) produjo una banda de un peso molecular cercano a los 2.5 Kb (Figura 28), sin embargo nuevamente se obtuvieron bandas de menor peso molecular. No obstante lo anterior, tanto las bandas de 2.4 Kb amplificadas con los primeros

oligonucleótidos diseñados (Figura 27) como las bandas entre 2.5Kb y 2.4Kb de la Figura 28 se purificaron y clonaron en el vector de almacenamiento pGEM-TEasy (Apéndice V).

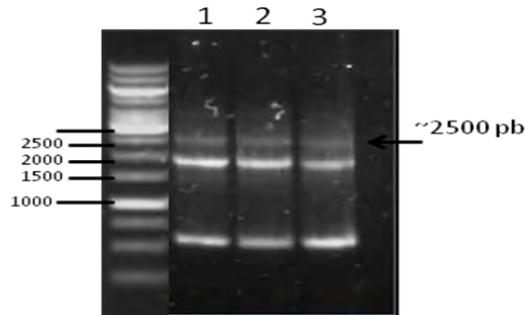


Figura 28. Productos de PCR para amplificar los genes *flip*. Se muestran los productos de PCR de aproximadamente 2500 pb de la amplificación de el vector pRSETFlipGlu. La cantidad de DNA utilizada para realizar la amplificación fue de 50ng. Carril 1: *gen FLIPglu600μM*, Carril 2: *gen FLIPglu170nM* y carril 3: *gen FLIPglu3.2mM*.

2. Clonación del fragmento con los sitios de restricción distintos en el vector pGEM-TEasy.

Se clonaron las bandas de 2.4 kb en el vector pGEM-TEasy y para corroborar que se encontraban en el vector se restringieron con la enzima *EcoRI*. Fueron 2 los productos amplificados uno 3 Kb y otro 2.4 Kb, que corresponde al vector vacío y el inserto, respectivamente (Figura 29). También se secuenció el vector recombinante, para verificar que presenta en el extremo C-terminal la inserción del nuevo sitio de restricción (GGGCCC), sitio de corte de la enzima *SmaI* (ver en el apéndice VI).

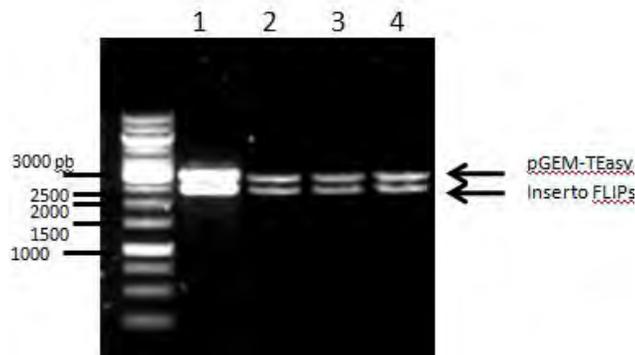


Figura 29. Reacción de restricción del vector-recombinante con las enzimas *BamHI* y *SmaI*. Se muestran los fragmentos de aproximadamente 2.4Kb que corresponden al inserto o genes FLIP y la banda de 3.0 Kb del vector de almacenamiento pGEM-TEasy. La cantidad de DNA utilizada para la restricción fue de 1μg. Carril 1: *gen FLIPglu600μM*, carril 2: *gen FLIPglu170nM* y carril 3: *FLIPglu3.2mM*, Carril 4: *FLIPglu600μMAfrodita*.

3. Clonación del gen en el vector pENTR-premiR150a.

Se realizó la clonación del inserto del vector pGEM-TEasy al vector pENTR-premiR159a. Nuevamente se corroboró mediante reacciones de restricción que el vector tuviera el gene de interés. El vector pENTR-FLIP fue restringido con las enzimas *Bam*HI y *Sma*I (Figura 30).

Para cada uno de los genes se obtuvieron varias clonas, se analizaron al menos dos clonas para cada gen, y se encontró que para las dos cepas elegidas de bacterias con el gene que codificaba para las proteínas FLIPglu600 μ MAfrodita, FLIPglu3.2mM y FLIPglu600 μ M sí tenían el producto esperado. Para las clonas con el gene que codificaba para FLIPglu170nM dos de ellas sí contenían el inserto deseado (Figura 30; carriles 1 y 3) y dos no (Figura 30; carriles 2 y 4) ya que presenta igual número de bandas que el vector pENTR-premiR159a vacío.

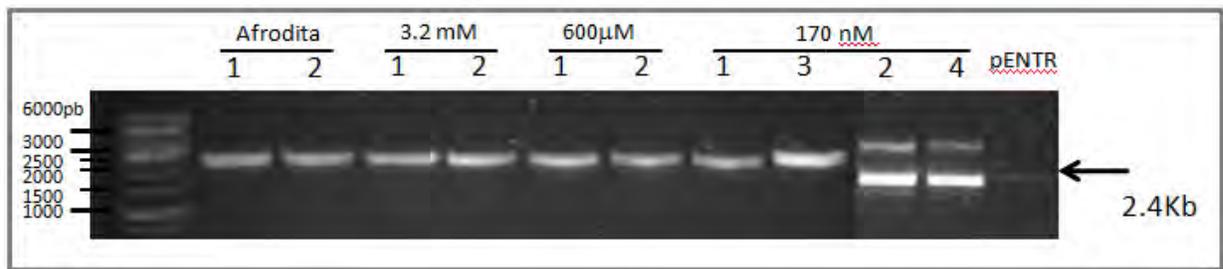


Figura 30. Reacción de restricción del vector pENTR-FLIP con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sma*I. Se muestran los fragmentos de la restricción realizada a 2 o 4 cepas de bacterias para cada uno de los genes *flip*. Las bandas obtenidas tienen un peso de aproximadamente 2.4 Kb que corresponden a los genes *flip*, en el último carril se corrió el vector pENTR-premiR159a sin clonar. La cantidad de DNA utilizada en la reacción de restricción fue de 1 μ g.

También se realizó el PCR donde se distingue la banda de 2400 pb correspondiente al inserto de interés (Figura 31). En el caso de la proteína FLIPglu170n se muestra la reacción a partir de tres cepas distintas, donde en el carril 2 se ve que en este caso no se clono el vector con el inserto.

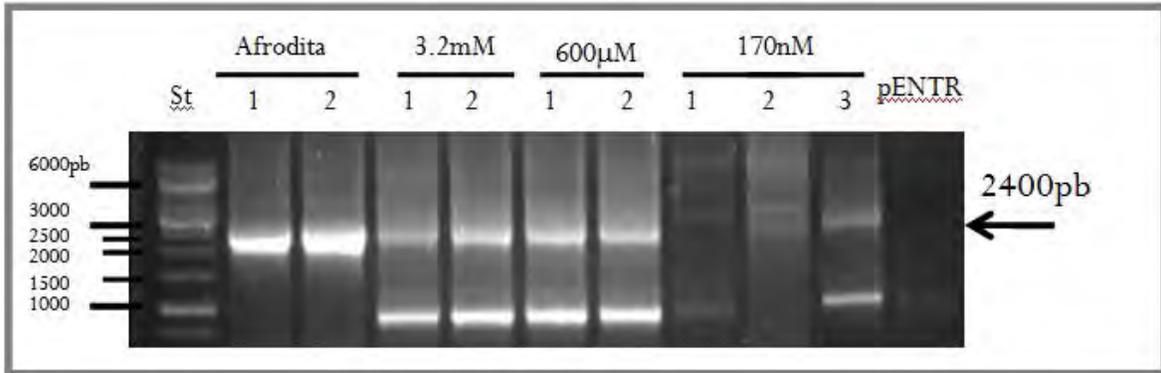
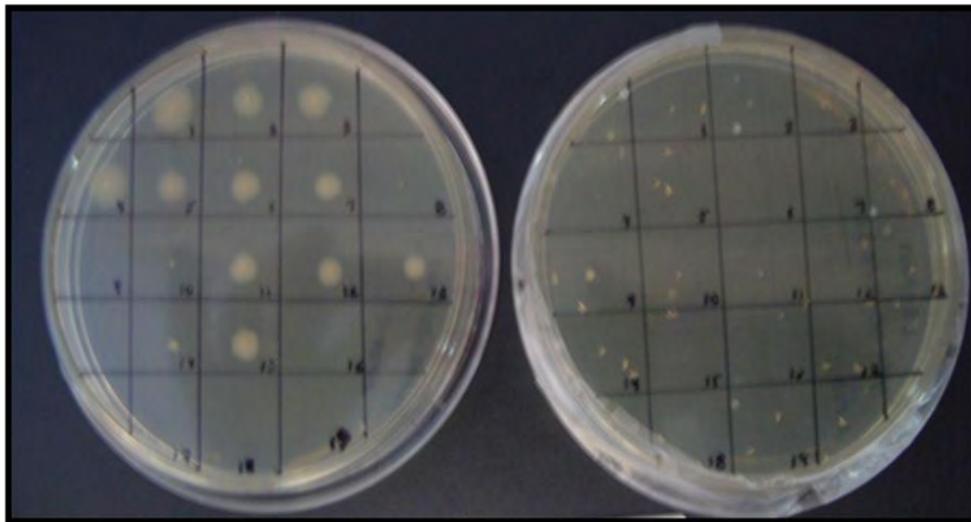


Figura 31. Reacción de PCR del vector pENTR-FLIP's. Se muestra en cada caso la banda de 2400 pb correspondiente a 2 o 4 cepas de bacterias para cada uno de los genes *flip*. pENTR-premiR159a: Vector vacío.

4. Clonación mediante recombinación del inserto en el vector Binario pBA-DC.

Por último se realizó la recombinación del vector pENTR-FLIP y el vector Binario pBA-DC, seleccionándose aquellas colonias que eran resistentes al antibiótico espectinomicina.

LB-espectinomicina 50 µg/mL LB-kanamicina 50 µg/mL



Vector pBA-DC-FLIPglu en *E. Coli* DH5 α .

Figura 32. Crecimiento de *E. coli* con el vector pBA-DC-Flipglu170nM.

8 DISCUSIÓN.

8.1 Respuesta de *Nicotiana tabacum* a la infección por *Pseudomonas syringae*.

La HR es un tipo de muerte celular programada en la cual se sacrifican unas pocas células inmediatas a la célula atacada, restringiendo el crecimiento del patógeno (Han *et al.*, 2007). En nuestro caso observamos como las plantas de *Nicotiana tabacum* respondieron formando zonas definidas de lesión en los alrededores cercanos al sitio de la infiltración del patógeno, daño que se inició a las 12 h por la reducción de la coloración verde de la hoja, hasta llegar a la muerte de esa zona; la respuesta de HR en *Nicotiana* no solo se observa con la bacteria *Pseudomonas syringae* sino también en la respuesta a virus y hongos (Scharte *et al.*, 2005; Lam *et al.*, 2001; Ellis *et al.*, 2000). Así *Nicotiana tabacum* infectada con *Phytophthora nicotianae* muestra síntomas de daño a las 48 h de infiltración (Scharte *et al.*, 2005). La inoculación con el virus del mosaico del tabaco en las plantas completas de tabaco, produce en las hojas una respuesta típica de HR, previo a los 3 días de inoculación (Lam *et al.*, 2001).

La planta de tabaco ha sido modelo de estudio de la interacción planta-patógeno, otro modelo muy usado ha sido la interacción *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae*, ya que ambos se encuentran completamente secuenciados y hay mutantes en las que se puede abordar la búsqueda de los participantes en la defensa cuando interaccionan (Han *et al.* 2007; Torres-Zavala *et al.*, 2007). Por ejemplo, dos cepas de *P. syringae*, una virulenta (*Pst* DC300 *vir*) y otra avirulenta (*Pst* DC3000 *avrRPM1*), fueron usadas para infectar a *Arabidopsis* y en ambos casos se indujo la HR en las primeras 24 h de la infiltración (Bonfing *et al.*, 2006). La inducción temprana de HR se explica debido a que las plantas tienen sistemas preformados de respuesta al ataque por patógenos aparte de los inducibles (Lucas, 1998).

En relación a la respuesta hipersensible se sabe que en la interacción con *Arabidopsis*, en *Pseudomonas* se incrementa la expresión de los genes *hrp* (*hypersensitive reaction and pathogenicity*) en *Arabidopsis*. Las Hrp son proteínas que pertenecen a alguno de los siguientes tipos: componentes del sistema de secreción tipo III, proteínas reguladoras, evocadores de tipo proteico o enzimas necesarias para la síntesis de los glucanos periplásmicos. Se conoce también que las proteínas Hrp controlan un gran número de

genes de avirulencia de bacterias, e incluso se ha sugerido que los compuestos patogénicos son excretados a través de un conducto formado por Hrp. Entonces los genes hrp pueden ser uno de los grupos más importantes de genes de patogenicidad en bacterias durante la interacción con las plantas (Lindgren, 1997).

Mientras que en la planta, dependiendo de la vía de transducción de señales empleada, la respuesta de defensa puede en algunos casos solo involucrar al tejido infectado (respuesta local) o adicionalmente incluir las partes no infectadas de la planta, la denominada respuesta sistémica (SAR), que se desarrolla para protección de la planta de ataques subsecuentes (Hoefle y Hüchelhoven, 2008).

Se conoce que el desarrollo de la HR, incluye e integra señales de defensa como son la presencia de ácido jasmónico, ácido salicílico, etileno y el óxido nítrico. Además de que ocurren otros eventos que son importantes para que ocurra la HR, como son el reforzamiento de la pared celular, la producción de fitoalexinas, la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis, la generación de especies reactivas de oxígeno y el reajuste del metabolismo primario en el que se incluye la acumulación de carbohidratos y su señalización. Siendo entonces una red compleja que determina el patrón de cambio que eventualmente ocurre cuando se presenta la interacción de la planta con el patógeno (Hoefle y Hüchelhoven, 2008; Postel y Kemmerling, 2009; Wit, 2007).

Como se mencionó hay una síntesis alta y variada de compuestos durante la respuesta de la planta al ataque por un patógeno, lo que le significa a la planta una demanda alta de energía, de equivalentes reductores y de esqueletos carbonados. Pese a esto la mayor parte de los estudios se enfocan en encontrar los genes que se encienden y participan en la defensa y pocos estudios se han llevado a cabo en estudiar el metabolismo primario (Bolton 2009; Ibañez *et al.*, 2010; Scharte *et al.*, 2005).

Dentro del metabolismo primario se reconoce que hay una coincidencia entre los cambios en el contenido de carbohidratos y la infección de la planta (Bolton 2009; Scharte *et al.*, 2005). En este estudio encontramos que los contenidos de glucosa y fructosa aumentan al infectar las hojas de tabaco con *Pseudomonas syringae*, sobre todo a tiempos prolongados de la infección, cerca de 3 y 1.6 veces a los 12 y 15 dpi. Incremento similar

para glucosa los reporta Scharte y colaboradores (2005), al infectar plantas de tabaco con el hongo *Phytophthora nicotianae*.

En contraste hay reportes en los que el contenido de hexosas disminuye, por ejemplo en plantas de jitomate infectadas con el hongo *Botrytis cinerea* (Berger, *et.al.*, 2004). También en donde no hay cambio en el contenido de los carbohidratos solubles glucosa, fructosa y sacarosa, lo cual sucede en plantas de *Arabidopsis* infectadas con la cepa avirulenta de *Pseudomonas syringae*, *Pst* DC3000 *avrRPM1* (Bonfing, *et.al.*, 2006). Respecto al contenido de sacarosa se ha encontrado que en algunas plantas aumenta como por ejemplo en plantas transformantes de tabaco, las cuales sobreexpresan de manera constitutiva genes que codifican para las proteínas PRms de maíz que otorgan resistencia a patógenos como *Ercospora nicotianae*, *Fusarium tabacum* y *Phytophthora nicotianae*, estableciendo una relación entre el contenido de carbohidratos con proteínas inducidas durante la patogénesis (Murillo *et.al.*, 2003).

El aumento que encontramos en las hexosas en este estudio, podría deberse a un incremento en la hidrólisis de sacarosa en la hoja, aunque no encontramos que la sacarosa se redujera por efecto de la infección. No obstante lo anterior y considerando que la sacarosa es producto del balance entre su hidrólisis, síntesis y transporte, podríamos sugerir que la sacarosa podría mantenerse en la zona de lesión y sus alrededores por algún tiempo con las reservas vacuolares del carbohidrato, o por la importación de sacarosa del resto de las células no infectadas y alejadas a la zona de daño a través de los apoplastos. Respecto a la movilización de la sacarosa, Scharte y colaboradores (2005) reportan que la infección de hojas de tabaco con *Phytophthora nicotianae* reduce la exportación de sacarosa de las células infectadas, pero hay un incremento en la sacarosa en los apoplastos. Si consideramos lo anterior y que se ha documentado que cuando ocurre la infección por un patógeno, se incrementa la transcripción de las invertasas apoplásticas y que la supresión de éstas invertasas reduce la invasividad del patógeno (Roitsch *et al.*, 2005; Fotopoulos *et al.*, 2003; Hebers, *et.al.*,1996), entonces el incremento en las hexosas podría deberse a una actividad aumentada de las invertasas apoplásticas sobre la sacarosa que viene de las hojas no infectadas y alejadas de la zona de daño.

Para un hemibiótrofo, como *Pseudomonas*, el aumento en las hexosas en los apoplastos, no solo mantiene el metabolismo de la planta, sino también favorece el crecimiento del patógeno. Por lo tanto, los carbohidratos juegan un papel dual para ayudar a la exitosa defensa de la planta, como combustible de las vías metabólicas y además como reguladores de la expresión de genes a través de las vías de transducción de señales que responden a carbohidratos.

La elevación en la concentración de hexosas puede llevar a suprimir genes específicos del tejido fuente como los que participan en la fotosíntesis y activar genes específicos de tejido demanda, como aquellos que tienen que ver con la respiración, o las vías del ácido shikímico y la vía oxidativa de las pentosas (Bolton *et al.*, 2009; Scharte *et al.*, 2005). Y probablemente pueda inducir la acumulación de almidón, en nuestro estudio encontramos que hubo un incremento en el contenido de almidón entre el primero y sexto dpi.

Se conoce que la enzima clave en la síntesis de almidón, la ADP glucosa pirofosforilasa es regulada por carbohidratos, la enzima presenta dos subunidades la pequeña que en *Arabidopsis* son las isoformas **ApS1** (At5g48300) y **ApS2** (At1g05610); mientras que 4 genes codifican para la subunidad grande, **ApL1** a **ApL4** (At15g19220, At1g27680, At4g39210 y At2g21590). Siendo la subunidad grande la que regula la actividad de la enzima, los genes **ApL3** y **ApL4**, son controlados por sacarosa principalmente, pero también responden a glucosa e intervienen de manera controlada en el tejido demanda (Crevillén *et al.*, 2005). Es posible que ambos genes se encuentren encendidos en tabaco cuando el patógeno se encuentra presente, lo que explicaría el incremento en el contenido de almidón.

Los cambios en el metabolismo y contenido de carbohidratos evidencian un flujo de carbohidratos modificado. Respecto a lo anterior, se ha encontrado coincidencia en el aumento de hexosas y la invertasa apoplástica con el incremento en la transcripción de los transportadores de hexosas en diversas plantas, tal vez por la canalización de las hexosas producidas, hacia los tejidos demanda (Bonfing, *et al.*, 2006; Fotopoulos, *et al.*, 2003; Delrot *et al.*, 2000).

Los transportadores de carbohidratos son proteínas que regulan su expresión a nivel transcripcional por los carbohidratos glucosa y sacarosa (Lalonde *et al.*, 2004; Delrot *et al.*, 2000). En *Arabidopsis thaliana* y *Vitis vinifera* se encontró que los transportadores de hexosas se incrementan durante la interacción con patógenos (Hayes *et al.*, 2010; Fotopoulos *et al.*, 2003).

Durante la infección de hojas de tabaco por la bacteria *P. syringae* se observó que la expresión de los transportadores de hexosas tanto a nivel de proteína como a nivel de uno de los transcritos, el de NtMST1. Existen diferencias entre los niveles de proteína y los del contenido del mensajero NtMST1, obtuvimos que a tiempos largos de la infección que hay un incremento en el nivel de proteínas transportadoras de hexosas en las membranas plasmáticas (6 a 15 dpi), mientras que a nivel de transcrito se observó el incremento a tiempos cortos de la infección (0.5 a 3 dpi). A nivel de transcrito solo analizamos el NtMST1, si bien se han reportado que tabaco también tiene al gene para el transportador NtMST2 (Sauer y Stadler, 1993), esto podría contribuir a las diferencias encontradas entre ambos perfiles. O bien que el transportador hubiera sido modificado a nivel post-traduccional.

El incremento del transcrito a los 12 dpi coincide con el incremento en el contenido de hexosas, sin embargo no es posible con estos resultados proponer que los carbohidratos regulan al transportador de hexosas de Nicotiana, o que el cambio en la expresión del transportador modifica el contenido de glucosa. En embriones de maíz infectados por el hongo *Fusarium verticillioides* hay un adelanto de 12 h en la expresión de los transcritos para el transportador putativo de hexosas ZmTH y de ZmSUT, en comparación con el tejido sano, sin embargo no coincide con el cambio en el contenido de carbohidratos en los embriones (Guzmán-Chávez, 2010). El transcrito para el transportador AtSTP4 de *Arabidopsis* se incrementó después de tres días de infección con el hongo *Erysiphe cichoracearum* no así el transportador AtSTP3, sin embargo sí hubo un incremento en el contenido de glucosa en las hojas (Fotopoulos *et al.*, 2003). Por lo que la regulación de la expresión de transportadores por carbohidratos aún no es evidente, aunque sí que la presencia del patógeno *Pseudomonas syringae* modifica el metabolismo de carbono de tabaco.

8.2 Implementación de biosensores como método de detección de glucosa en plantas *in vivo*.

Para determinar si los contenidos de carbohidratos son la señal inicial que es percibida para la modificación general o bien si son producto de la respuesta de la planta a otras señales, primero decidimos generar las herramientas para la detección de los contenidos de glucosa en el citosol, lo que nos diría la localización y contenido de glucosa en la célula. Se ha demostrado que cuando las invertasas apoplásticas se han suprimido, el patógeno tarda más en producir la enfermedad (Kocal *et al.*, 2008), por lo que se hace interesante conocer si hay una concentración de glucosa que se asocia al incremento en los niveles del transcrito para las invertasas extracelulares para dar respuesta al ataque del patógeno.

El contenido de glucosa en las hojas control fue entre 2.3 y 7.2 mM, estos valores son similares a los reportados por Farré y colaboradores (2001) que menciona que en *Nicotiana tabacum* el contenido de glucosa es de 2 a 5 mM, el contenido de glucosa aumentó como resultado de la infección por *P. syringae* en hojas de tabaco, principalmente a tiempos largos. Sin embargo, estas determinaciones comprenden el contenido de glucosa total del tejido, y no es posible conocer la concentración y localización en algún compartimento celular específico. Son diversos los trabajos donde se reporta el contenido de carbohidratos durante la interacción planta-patógeno, obteniendo resultados variables (Bonfing, *et.al.*, 2006; Scharter, *et.al.*, 2005; Fotopoulos, *et.al.*, 2003).

Hasta la fecha se han desarrollado diversas técnicas que buscan optimizar los métodos de detección de iones y moléculas claves en el metabolismo de los organismos, como son los métodos espectroscópicos, NMR y PET, que proporcionan datos dinámicos, pero con poca resolución espacial y baja sensibilidad (Chaudhuri *et al.*, 2007), además del uso de marcadores moleculares (Alexa) o las proteínas fluorescentes variantes de la GFP; por ejemplo, el monitorear cambios en la concentración citoplásmica del ion Ca^{++} usando Indo-1 en células guarda de *Arabidopsis* (Gilroy *et al.*, 1991). Debido a que los carbohidratos son moléculas clave en el metabolismo primario Deuschle y colaboradores (2005) diseñaron una familia de biosensores que detectan glucosa con diferentes afinidades, a los que nombraron biosensores FLIPglu (Fluorescent Indicator Protein for

glucose). Como parte del desarrollo de este trabajo se propuso obtener y analizar a los biosensores FLIPglu como una herramienta de estudio para entender la relación del contenido de glucosa intracelular cuando a las plantas de tabaco se les somete a un patógeno.

De acuerdo a las condiciones de purificación propuestas por Fher y colaboradores (2002) se diseñó el procedimiento de purificación de las proteínas FLIP. En la metodología reportada por Fher y colaboradores (2002) usaron la cepa *E. coli BL21(DE3)Gold*, la que presenta la característica de tener el sistema de expresión del promotor T7 y del cual se obtiene un alto nivel de expresión de proteínas que pueden ser tóxicas para otras cepas. La cepa naturalmente carece de la proteasa Lon, la cual degrada a las proteínas recombinantes, pero además se le suprimió la proteasa OmpT y se inactivó a la endonucleasa I (endA) que es la que degrada usualmente el DNA plasmídico que se aísla en la mayor parte de los protocolos reportados. Estas dos últimas mejoras aumentan la expresión de las construcciones en las que se usa la cepa *E. coli BL21(DE3) Gold* (Catalogo 230130; Boletín Invitrogen 230130-12). En el laboratorio teníamos disponible, la cepa *E. coli BL21-A1* (Catalogo C6070-03) cepa que difiere de la cepa Gold en que no se encuentra inhibida la endA y que presenta el casete de la RNA polimerasa T7 en el locus araB, por lo que la expresión de la transcripción se encuentra regulada por arabinosa.

Cuando se indujo la proteína con arabinosa al 0.2% se obtuvo una buena cantidad de proteína con el peso molecular esperado, 88 kDa, a las 5 horas de inducción. Sin embargo, la mayoría de la proteína se concentró en la fracción del pellet. Debido a que las proteínas FLIP se unen a la glucosa provocando un cambio en su conformación, era esencial conservar su estructura nativa intacta. Para reconocer que la proteína FLIP estaba presente en el extracto celular se realizó un western blot utilizando un anticuerpo anti-GFP, donde se muestra una banda de aproximadamente 88KDa que se intensifica conforme aumenta el tiempo de inducción, sin embargo también observamos un incremento en la proteólisis de la banda sobre todo al avanzar con el proceso de purificación en la columna de cromatografía de afinidad, tanto en los extractos del sobrenadante como con el pellet. La manera en la que solucionamos esto fue añadiendo mayor cantidad de inhibidores de proteasas y realizando una purificación por vez para disminuir los tiempos en los que nuestra proteína estaba expuesta a la proteasa.

Recientemente Li y colaboradores (2010) reportaron la proteólisis de proteínas unidas a la proteína de unión de maltosa (MBP) de *E. coli*. La proteólisis fue independiente de la proteína fusionada a la MBP, el análisis de los péptidos no mostró un patrón o secuencia que pudiera ser identificada como sustrato o sitio de alguna proteasa, por lo que los autores sugieren que la proteasa se encuentra reconociendo una estructura tridimensional. El sistema de expresión que utilizaron fue *Pichia pastoris* lo que llevó a proponer a los autores que es una proteasa única de *Pichia*. Sin embargo, en nuestro caso podemos plantear que la proteasa podría ser una metaloproteasa ya que el sistema de purificación utilizado involucró un metal y conforme avanzamos en la purificación aumentaba la degradación de la proteína.

Para corroborar la funcionalidad de estos biosensores se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia, los cuales de manera preliminar nos indicaron la conformación espacial de estas proteínas. Al no lograr ver en los espectros de emisión los dos máximos característicos del par YFP/CFP, inferimos que la estructura de las proteínas estaba comprometida. Lo anterior pudo ocurrir de manera inicial durante la expresión de la proteína en la bacteria o bien durante el proceso de purificación y dializado. La purificación pudo haber dañado la estructura de las proteínas debido a la utilización de NaCl, ya que YFP puede ser sensible a los iones cloruro o que haya fotosensibilidad que al exponer la proteína a la luz natural, condujera al fotoblanqueo del fluoróforo (Dixit, *et.al.*, 2006). En el caso de la diálisis pudo ocurrir que no haya sido suficiente el tiempo y lavados usados y que aun se tenía glucosa que obviamente interfiere en la emisión de fluorescencia modificando el espectro esperado. Únicamente la proteína FLIPglu600mM Afrodita mostro un espectro semejante a lo reportado en la literatura (Deuschle, *et.al.*, 2006; Deuschle, *et.al.*, 2005)

Obtención de *Agrobacterium* transformantes de sensores FLIP

Los biosensores FLIPglu (ADDGENE®) fueron proporcionados en un vector de expresión en bacteria (ver apéndice II) y mediante técnicas de biología molecular se clonaron en el vector binario pBA-DC-myc (ver apéndice VIII) con la finalidad de obtener para un trabajo futuro plantas transformantes de tabaco, que sirvan como modelo de estudio en la transducción de señales por carbohidratos en la interacción planta-patógeno. Biosensores que pueden dar información en señalización por carbohidratos, así como la inducción o

represión de hormonas como el ABA (Aguilera-Alvarado, 2010; Huertero, *et al.*, 2000), Auxinas y Etileno (Zhou, *et.al.*, 1998).

La estrategia de clonación que se llevó a cabo consistió en cuatro pasos básicos: 1) amplificar el gen de interés insertando un nuevo sitio de restricción reconocido por la enzima *Sma*I y 2) clonarlo en un vector de almacenamiento (pGEM-Teasy), 3) clonar el gen en un vector de la serie pENTR, y 4) clonarlo en el vector binario pBA-DC-myc. Esta estrategia fue similar a la utilizada por Deuschle y colaboradores (2006) al transformar plantas de *Arabidopsis* con los biosensores FLIPglu, ya que primeramente por PCR amplificaron de pRSET el gen de interés y lo clonaron en el vector pRT100 para posteriormente clonarlo en el vector binario pZP312, la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 fue usada para la transformación de las plantas de *Arabidopsis*. Con nuestra estrategia también fuimos capaces de obtener las clonas en el vector binario.

Deuschle y colaboradores (2006) usaron tres líneas de plantas de *Arabidopsis*; dos con un sistema de silenciamiento deficiente, la línea *rdr6-11* y la línea *sgs3-11*, y la línea silvestre Col-0. Seleccionaron varias plantas transformantes de cada línea y observaron que el 78% de las plantas mutantes *rdr6-11* de *Arabidopsis* expresaban al biosensor, al igual que el 90% de las mutantes de *Arabidopsis sgs3-11*, sin embargo cuando transformaron plantas silvestres de *Arabidopsis* (Col-0) sólo el 8% de las plantas analizadas presentaron fluorescencia. Lograron determinar los valores de glucosa en las raíces y hojas de las plantas mutantes y establecieron el presente para realizar futuros estudios sobre la detección de glucosa in planta. Uno de los desafortunados hallazgos de este grupo fue que solo era posible expresar a los biosensores en las plantas silenciadas. Sin embargo, se hace necesario trabajar con plantas silvestres para establecer con certeza las concentraciones del metabolito.

Una estrategia interesante para determinar las concentraciones de glucosa en el apoplasto usando los biosensores que se utilizaron en este trabajo, es la inoculación de la cepa de *E.coli* o de *agrobacterium in planta*, tal y como lo hicieron Huang y colaboradores (2006) para detectar los cambios en el ácido salicílico (SA) en la interacción tabaco-virus del mosaico del tabaco. Los autores infiltran a la cepa de *Acinetobacter* sp. la cual expresa al biosensor y en la zona en la que se encuentra el SA se observa la bioluminiscencia del biosensor. Lo anterior nos evitaría la producción de las plantas

transformantes y nos daría un indicio de los cambios en los contenidos de glucosa extracelulares.

9 CONCLUSIONES.

- Se presentó la respuesta hipersensible en la interacción incompatible de *N. tabacum*-*P.syringae* desde las primeras 12 horas de infección
- Se modificó el contenido de carbohidratos, así como la expresión de los transportadores de hexosas. La concentración de glucosa y fructosa incrementaron principalmente a tiempos largos de exposición con el patógeno, 12 y 15 dpi.
- El contenido de sacarosa no se modificó y el contenido de almidón aumentó sólo en el día 1 posterior a la infección.
- La expresión de los transportadores de hexosas, a nivel de proteína, incrementó al 1 dpi así como a los 12 y 15 dpi. El aumento en el primer día de infección coincidió con el incremento observado en la expresión del transcrito del NtMST1 durante los primeros 3 días posteriores a la infección.
- Con base a lo anterior se determinó que el sistema *Nicotiana tabacum*-*Pseudomonas syringae* es adecuado para el estudio de los carbohidratos como moléculas precursoras de la señal.
- Se purificaron los cuatro biosensores FLIP, sin embargo la estructura conformacional estuvo comprometida, ya que no se obtuvieron los espectros de emisión de intensidad de fluorescencia característicos.
- Se clonaron los genes *FLIPgluF16AΔ13*, que codifica para las proteínas FLIP's en el vector binario pBA-DC-myc para su uso futuro en plantas.

10 PERSPECTIVAS.

- A. Determinación del efecto de la infección por *Pseudomonas syringae* en la concentración de glucosa citosólica de plantas transformantes para el biosensor
- Generación de plantas transformantes transitorias, con los biosensores FLIP.
 - Obtención de plantas transformantes estables de *Nicotiana tabacum*.
 - Medición de la concentración de glucosa *in vivo* en plantas de *Nicotiana tabacum* transformantes en presencia y ausencia del patógeno
 - Efecto de la infección de plantas transformadas de *Nicotiana tabacum* por *Pseudomonas syringae* en el contenido total de carbohidratos solubles (método de macerado del tejido).
- B. Evaluación del efecto de diferentes tipos de estrés en los contenidos de glucosa de plantas de tabaco transformantes para los biosensores.
- C. Determinar si la concentración interna de glucosa es determinante en los cambios en la expresión de diferentes genes en el metabolismo.
- Metabolismo de Almidón (ADP-Glu pirofosforilasa, AGPasa).
 - Metabolismo de Sacarosa (SuSy, SPS e Invertasas).
 - Metabolismo de Glucosa (Hexocinasa, 2,6- Bifosfatasa).
 - Flujo en tejidos demanda (Transportadores de hexosas y sacarosa)

11 REFERENCIAS.

1. Aguilera-Alvarado GP. 2010. Regulación hormonal y osmótica de la expresión del transportador de sacarosa y de un transportador de hexosas putativo en embriones germinados de Maíz. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
2. Berger S, Benediktyova Z, Matous K, Bonfing K, Muller LN y Roitsch T. 2007. Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and oxylipins on *A. Thaliana*. Journal of Experimental Botany. 58: 797-806.
3. Berger S, Sinha A y Roitsch T. 2004. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interaction. Journal of Experimental Botany 58: 4019-4026.
4. Biemelt S. y Sonnewald U. 2006. Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. Journal of Plant Physiology 163: 307-318.
5. Bogs J y Geider K. 2000. Molecular Analysis of Sucrose Metabolism of *Erwinia amylovora* and influence on bacterial virulence. Journal of Bacteriology. 5351-5358.
6. Bolton MD. 2009. Primary metabolism and plant defense-Fuel for the fire. Molecular Plant-Microbe Interaction. 22: 487-497.
7. Bonfing K, Schreiber U, Gabler A, Roitsch T. y Berger S. 2006. Infection with virulent and avirulent *P.syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. Planta 225: 1-12.
8. Bourque S, Lemoine R, Sequeira-Legrand A, Fayolle L, Delrot S y Pugin A. 2002. The elicitor Cryptogein Blocks Glucose Transport in Tobacco Cells. Plant Physiology 130: 2177-2187.
9. Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
10. Bruggeman R, Steffenson BJ y Kleinhofs A. 2009. The *rpg4/Rpg5* stem rust resistance locus in barley Resistance genes and cytoskeleton dynamics. Cell Cycle 8: 1-5.
11. Büttner M y Sauer N. 2000. Monossacharide transporters in plants: structure, function and physiology. Biochimica et Biophysica Acta 1465: 263-274.
12. Chaudhuri B, Hörmann F, Lalonde S, Brady S, Orlando D, Benfey P, y Frommer W. 2008. Protonophore- and pH-insensitive glucose and sucrose accumulation

detected by FRET nanosensors in *Arabidopsis* root tips. *The Plant Journal* 56: 948-962

13. Chen JG, Willard FS, Huang J, Liang J, Chasse SA, Jones AM y Siderovski DP. 2003. A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. *Science* 301: 1728-31.
14. Crevillén P, Ventriglia T, Orea A, Mérida A y Romero J. 2005. Differential pattern of Expression and sugar regulation of *Arabidopsis thaliana* ADP-glucose pyrophosphorylase-encoding Genes. *The Journal Chemistry*. 280: 8143-8149.
15. Dangl J. y Jones J. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
16. Delrot S, Atanassova R y Maurousset L. 2000. Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*. 281-306.
17. Deuschle K, Chaudhuri B, Okumoto S, Lager I, Lalonde L y Frommer W. 2006. Rapid metabolism of glucose detected with FRET glucose nanosensors in epidermal cells and intact roots of *Arabidopsis* RNA-silencing mutants. *The Plant Cell*. 18: 2314-2325.
18. Deuschle K., Fehr M, Hilpert M, Lager I, Lalonde S, Looger L, Okumoto S, Persson J, Schmidt A y Frommer W. 2005. Genetically encoded sensors for metabolites. *Cytometry Part A* 64: 3-9.
19. Deuschle K, Okumoto S, Fehr M, Looger L, Kozhukh L, y Frommer W. 2005. Construction and optimization of a family of genetically encoded metabolite sensors y semirational protein engineering. *Protein Science* 14: 2304-2314.
20. Dixit R, Cry R y Gilroy S. 2006. Using intrinsically fluorescent proteins for plant cell imaging. *The Plant Journal* 45: 599-615.
21. Dwyer M y Hellinga H. 2004. Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering. *Structural biology* 14: 495-504.
22. Ehness R, Ecker M, Godt D y Roitsch T. 1997. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *The Plant Cell* 9: 1825-1841.
23. Ellis J, Dodds P y Pryor T. 2000. The generation of plant disease resistance gene specificities. *Trends in Plant Science* 5: 373-379.
24. Farre E, Tiessen A, Roessner U, Geigenberger P, Trethewey R Y Willmitzer L. 2001. Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides,

- sugar, organic acids, amino acids, and sugar alcohols in potato tuber using a nonaqueous fractionation method. *Plant Physiology* 127: 685-700.
25. Fehr M, Lalonde S, Ehrhardt DW, y Frommer WB. 2004. Live imaging of glucose homeostasis in nucleid of COS-7 cells. *Journal of Fluorescence*. 14: 603-609.
 26. Fehr M., Lalonde S., Lager I., Wolff M., y Frommer W. 2003. *In vivo* imaging of the dynamics of glucose uptake in the cytosol of COS-7 cells by fluorescent nanosensors. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 19127-19133.
 27. Fehr M., Frommer W., y Lalonde S. 2002. Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 9846-9851.
 28. FotopoulosV., Gilbert M., PittmanJ., Marvier A., Buchanan A., Sauer N., Hall J. y Williams L. 2003. The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, At β fruct1, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiology* 132: 821-829.
 29. Frommer WB, Schulze WX y Lalonde S. 2003. Hexokinase, jack-of-all-trades. *Science*. 300: 261-263.
 30. Gilroy S, Fricker MD, Read ND y Trewavas AJ. 1991. Role of Calcium in signal transduction of *Commelina* guard cell. *The plant Cell*. 3: 333-344.
 31. Guzmán-Chávez, F. 2010. Efecto de *Fusarium verticillioides* sobre la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación de maíz. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
 32. Hann DR y Rathjen. 2007. Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal*. 49: 607-618.
 33. Hao L, Wang H, Sunter G, Bisaro DM. 2003. Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *The Plant Cell*. 15: 1034–1048.
 34. Hayes M, Feechan A y Dry B. 2010. Involvement of Abscisic Acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiology*. 153: 211-221.
 35. Heath, Michèle. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*. 44:321-334.
 36. Herbers K, Mönke G, Badur R, Sonnewual U. 1995. A simplified procedure for the subtractive cDNA cloning of photoassimilate responding genes: Isolation of cDNAs encoding a new class of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*. 29: 1027-1038.

37. Herbers K, Meuwly P, Frommer WF, Métraux JP, y Sonnewald U. 1996. Systemic Acquired Resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *The Plant Cell* 8: 793-803.
38. Hey SJ, Byrne E, Halford NG. 2010. The interface between metabolic and stress signaling. *Annals of Botany*. 105, 197-203.
39. Hoefle C y Hüchelhoven. 2008. Enemy at the gates: traffic at the plant cell pathogen interface. *Cellular Microbiology*. 10: 12, 2400-2407.
40. Huang W, Huang L, Preston GM, Naylor M, Carr JP, Li Y, Singer AC, Whiteley S y Wang H. 2006. Quantitative in situ assay of salicylic acid in tobacco leaves using a genetically modified biosensor strain of *Acinetobacter* sp. ADP1. *The Plant journal*. 46: 1073-1083.
41. Huertero-Arenas F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J y León P. 2000. Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6* reveals a central role of plant vegetative development by sugar. *Genes and Development*. 14: 2085-2096.
42. Ibáñez AJ, Scharte J, Bones P, Pirki A, Meidau S, Baldwin IT, Hillenkamp F, Weis E y Dreisewerd K. 2010. Rapid metabolic profiling of *Nicotiana tabacum* defense response against *Phytophthora nicotianae* using direct infrared laser desorption ionization mass spectrometry and principal component analysis. *Plant Methods*. 6:1-16.
43. Jang J y Sheen J. 1994. Sugar sensing in higher plants. *The Plant Cell*. 6:1665-1679.
44. Ji C, Boyd C, Slaymaker D, Okinaka Y, Takeuchi Y, Midland SL, Sims JJ, Herman E y Keen, N. 1998. Characterization of a 34-kDa soybean binding protein for the syringolide elicitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 3306–3311.
45. Jobic C, Boisson AM, Gout E, Rasclé C, Fèvre M, Cotton P y Bligny R. 2007. Metabolic processes and carbon nutrient exchanges between host and pathogen sustain the disease development during sunflower infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Planta* 226: 251-265.
46. Kocal N, Sonnewald U y Sonnewald S. 2008. Cell Wall-Bound Invertase Limits Sucrose Export and Is Involved in Symptom Development and Inhibition of Photosynthesis during Compatible Interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Plant Physiology* 148, 1523–1536.
47. Koch K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Plant Biology* 7:235-246.
48. Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

49. Lager I, Looger LL, Hilpert M, Lalonde S y Frommer WB. 2006. Conversion of a putative *Agrobacterium* sugar-binding protein into a FRET sensor with high selective for sucrose. *The Journal Biological chemistry*. 281: 30875-30883.
50. Lager I, Fehr M, Frommer WB y Lalonde S. 2003. Development of a fluorescent nanosensor for ribose. *FEBS Letters*. 553: 85–89.
51. Lalonde, S., Wipf, D., y Frommer, W.B. 2004. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annual Review of Plant Biology* 55: 341–372.
52. Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Baker L, Patrick JW., Frommer WB, y Ward JM. 1999. The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. *The Plant Cell* 11: 707-726.
53. Lam E, Kato N y Lawton N. 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411:848-853.
54. Li Z, Leung W, Yon A, Nguyen J, Perez VC, Vu J, Giang W, Luong LT, Phan T, Salazar KA, Gómez SR, Au C, Xiang F, Thomas DW, Franz AH, Lin-Cereghino J y Lin-Cereghino GP. 2010. Secretion and proteolysis of heterologous proteins fused to the *Escherichia coli* maltose binding protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. 72: 113-124.
55. Lindgren PB. 1997. The role of hrp genes during plant-bacterial interactions. *Annual Review of Phytopathology* 35: 129-52.
56. Lorimier R, Smith JJ, Dwyer MA, Looger LL, Sali K, Paavola CD, Rizk SS, Sadgor S, Conrad D, Loew L y Hellinga HW. 2002. Construction of a fluorescent biosensor family. *Protein Science*. 11: 2655-2675.
57. Lucas JA. 1998. *Plant Pathology and plant pathogens*. Blackwell, Sciences, Oxford.pp:96-104.
58. Madriz K. 2002. Mecanismos de defensa de las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 63: 22-32.
59. Martínez-Marcelo V. 2007. Expresión de la actividad de las invertasas ácidas en la germinación de tejido embrionario de maíz en carbohidratos metabolizables y su relación con el contenido de carbohidratos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
60. Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T y Sheen J. 2003. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*. 300: 332–36.
61. Moreno L, Pineda M, Soukupová J, Macho A, Beuzón C, Barón M y Ramos C. 2008. Early detection of bean infection by *Pseudomonas syringae* in asymptomatic

- leaf areas using chlorophyll fluorescence imaging. *Photosynthetic Research* 96:27-35.
62. Moschou EA, Sharma BV, Deo SK, y Daunert S. 2004. Fluorescent glucose detection: Advances toward the ideal *in vivo* biosensors. *Journal. of Fluorescence* 14: 535-547.
 63. Murillos I, Roca R, Bortolotti C y San Segundo B. 2003. Engineering photoassimilate partitioning in tobacco plants improves growth and productivity and provides pathogen resistance. *The Plant Journal*. 36: 330-341.
 64. Okumoto S, Takanaga H y Frommer WB. 2008. Quantitative imaging for discovery and assembly of the metaboregulome. *New Phytologist* 180: 271-295.
 65. Özcan S y Johnston M. 1999. Function and regulation of yeast Hexose Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63:554-569.
 66. Postel S, y Kemmerling. 2009. Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 20: 1025-1031.
 67. Ramirez-Palma T. 2007. Estrés hídrico altera el reparto de carbono en tejidos fuente y demanda de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
 68. Rolland F, Winderickx J y Johan MT. 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 310-317.
 69. Rolland F, Moore B y Sheen J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell*. S185-S205.
 70. Rolland F, González-Baena E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*. 57:675-709.
 71. Sauer N y Stadler. 1993. A sink-specific H⁺/monosaccharide co-transporter from *Nicotiana tabacum* cloning and heterologous expression in baker's yeast. *The Plant Journal*. 4:4, 601-610.
 72. Scharte J., Shön H. y Weis E. 2005. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant, Cell and Environment*. 28: 1421-1435.
 73. Srivastava LM. 2002. Plant Growth and development. Hormones and environment. Academic Press, Sand Diego, CA, Estados Unidos. 447-464, 503-519 pp.
 74. Tian Y, Cuneo MJ, Changela A, Hocker B, Beese LS, y Hellinga HW. 2007. Structure-based design of robust glucose biosensors using a *Thermotoga maritima* periplasmic glucose-binding protein. *Protein Science* 16:1-11.

75. Torres-Zabala M, Truman W, Bennett MH, Lafforgue G, Mansfield JW, Rodriguez-Egeas P, Bögre L y Grant M. 2007. *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signaling pathway to cause disease. The EMBO Journal. 26:1434-1443.
76. Wit M. 2007. Visions and Reflections. How plants recognize pathogens and defend themselves. Cellular and Molecular Life Sciences. 64: 2726-2732.
77. Zhou L, Jang JC, Jones TL y Sheen J. 1998. Glucose and Ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant. Proceedings of the National Academy of Sciences. 95:10294-10299.

12 PAGINAS CONSULTADAS

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
2. <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>
3. <http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx>
4. http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi
5. <http://seqtool.sdsc.edu/CGI/BW>
6. <http://www.addege.org>

APÉNDICE

I. Secuencia del transportador de hexosas *NtMST1*.

Esta secuencia de RNAm del transportador de hexosas *NtMST1* con clave en el GenBank: X66856, se tomó como molde para diseñar los oligonucléotidos para la realización del RTPCR.

En negritas se observa el fragmento amplificado.

```
>gi|19884|emb|X66856.1| N.tabacum MST1 mRNA
ATTTCTACAGTTTACGATTACAGTTCTCTCTCAACTTTTTTCTTTTTTCTTGATCATTCTTGTGCCACAAGT
TGTTCTTGTGTTTGTGATCAGCTCAGAAAGATGGCTGGTGGTGGTATTGGTCCCAGCAACGGGAAAGAATA
TCCCAGCAATTTAACTCTTTATGTTACCGTTACGTGCATTGTCGCTGCCATGGGTGGTCTCATTTCGGTTAC
GATATTGGAATTTCTGGAGGTGTGACATCAATGGACTCATTCTTGAGCAGATTTTTCCCATCTGTGTTCAGGA
AGCAAAAGGCAGATGATTCAACAAATCAATACTGCAAAATTTGACAGCCAAACATTGACGATGTTACAGTCGTC
ATTGTACTTGGCTGCTCTTTTGTGCTCTCTGGTGGCATCTACTGTCACCAGAAAACTTGGACGGAGACTTTCT
ATGCTCTGTGGAGGTGTCCTCTTCTGTGCTGGAGCTTTGATCAATGGCTTTGCTCAGAATGTTGCTATGCTCA
TTGTTGGTTCGTATTTTACTAGGTTTTGGTATTGGATTGCGCAATCAGTCTGTTCCACTATACCTATCTGAAAT
GGCTCCATAACAAGTACAGAGGAGCACTCAACCTAGGTTTTCAACTGTCCATTACAATTGGTATACTTGTAGCA
AATGTGTTGAACTATTTCTTTGCCAAGATTCATTGGGGATGGAGATTAAGCTTAGGAGGTGCTATGGTACCTG
CATTGATCATCACAAATAGGCTCACTTTTCCCTTCCCAGAGACACCAAACCTCCATGATCGAACGTGGCAATCACGA
CGAAGCCAAAGCTAGGCTTAAAAGAATCAGAGGCATTGATGATGTAGACGAAGAGTTCAATGATTTAGTCGTG
GCGAGTAGGCTTCTAGGAAAATTGAGAACCCTTGGAGAAAATTTGTTGCAAAGGAAATATAGGCCACATCTCA
CAATGGCAATTATGATCCCATTTTTCCAGCAACTTACTGGAATCAATGTGATTATGTTCTATGCACCAGTTTT
GTTTAAAGACTATTGGTTTTGGTGTGATGCTTCCCTTATGTCTGCTGTTATTACTGGTGGAGTCAATGTACTT
GCAACTGTTGTTTCTATTTACTATGTTGATAAAATTGGGAAGAAGATTCTTGTTCCTTGAAGGTGGCATTCAAA
TGCTCATCTGCCAAATAGCGGTGTCAATTTGCATAGCTATAAAATTTGGAGTGAATGGAACTCCAGGGGATTT
ACCAAAGTGGTACGCGATAGTAGTGGTGATATTCATCTGTGTTTATGTAGCTGGATTTGCTTGGTCCCTGGGGA
CCTCTAGGATGGTTGGTACCTAGTGAAATTTTCCCACTTCAAATTCGATCAGCTGCTCAAAGTATCAATGTTT
CAGTGAACATGATCTTCACATTTATAGTGGCACAAGTATTCTTGACAATGTTGTGTCATTTGAAGTTTGGATT
GTTCCCTCTTCTTGCATTCTTTGTTGTGATTATGACTGTCTTCATTTACTTCTTCTTGCCTGAGACAAAGAAT
ATCCCAATTGAAGAGATGGTGATTGTGTGGAAAGAGCATTGGTTCTGGTCTAAGTTCATGACTGAAGTGGACT
ATCCTGGAACTAGGAATGGAACAAGTGTTGAAATGTCAAAAAGGGAGTGCTGGTTACAAAATAGTATGACCTAA
TTAAAGAAGATGTTTGGATTTATTTAAATTTATTTGTTGTTGATAATGTTTTAGTGGGATGATATTGTTAG
ATTTGAACTGTTTCTTGTCTCTATTGCATAGAAAATACATACTTTACTGTGTTCAATTTCAACCTCTCAAC
AATTAATATAAGATTTGTCAGAGCAAAA
```

II. Mapas y características de los vectores pRSET que tienen el gel que codifica para las proteínas FLIP's.

Tabla 5. Características de los vectores pRSET-FLIPglu.

Nombre	Gen	Tamaño vector (pb)	Tamaño del inserto (pb)	PM de la proteína	Antibiótico
FLIPglu-600 μ M Δ 13	FLIPglu F16A Δ 13	5218	2304	84.5 KDa	Ampicilina
FLIPglu-600 μ M Δ 13 Aphrodite	FLIPglu F16A Δ 13 Aphrodite	5191	2277	83.5 KDa	Ampicilina
FLIPglu-3.2mM Δ 13	FLIPglu F16A S112A Δ 13	5218	2304	84.5 KDa	Ampicilina
FLIPglu-170nM Δ 13	FLIPglu F16F Δ 13	5218	2304	84.5 KDa	Ampicilina

Los vectores se compraron a la compañía ADDGENE ® (www.addgene.org).

En seguida se muestran los cuatro mapas que codifican para cada una de las proteínas FLIP.

Los vectores PRSET-FLIPglu tienen insertado el cassette ECFP-mgIB-EYFP; ECFP y EYFP corresponde a las proteínas variantes de la GFP, la CFP y la YFP respectivamente, éstas flanquean a la proteína periplasmica de *E. coli*, mgIB, en la cual por mutagénesis dirigida se mutó la fenilalanina16 por alanina, para modificar su afinidad por la glucosa, hexosa a la que se une provocando un cambio en su conformación.

La proteína silvestre mgIB, con la fenilalanina 16 conservada, presenta una constante de disociación (Kd) por glucosa de 170 nM (Figura 34). La mutante **F16A**, presenta una Kd de 600 μ M para glucosa (Figura 35), también se eligió una proteína con el mismo valor de Kd, pero que en el extremo carboxilo terminal tiene a la proteína fluorescente Afrodita (número de acceso DQ525025) en lugar de la proteína YFP (Figura 36). La proteína Afrodita se diseño modificando la proteína fluorescente Venus, variante de la GFP.

La última proteína presenta la mutación **F16A**, adicionalmente tiene la mutación de la serina 112 por alanina (**S112A**) que le confiere la cualidad de ser menos afín por la glucosa, al presentar una Kd de 3.2mM (Figura 37).

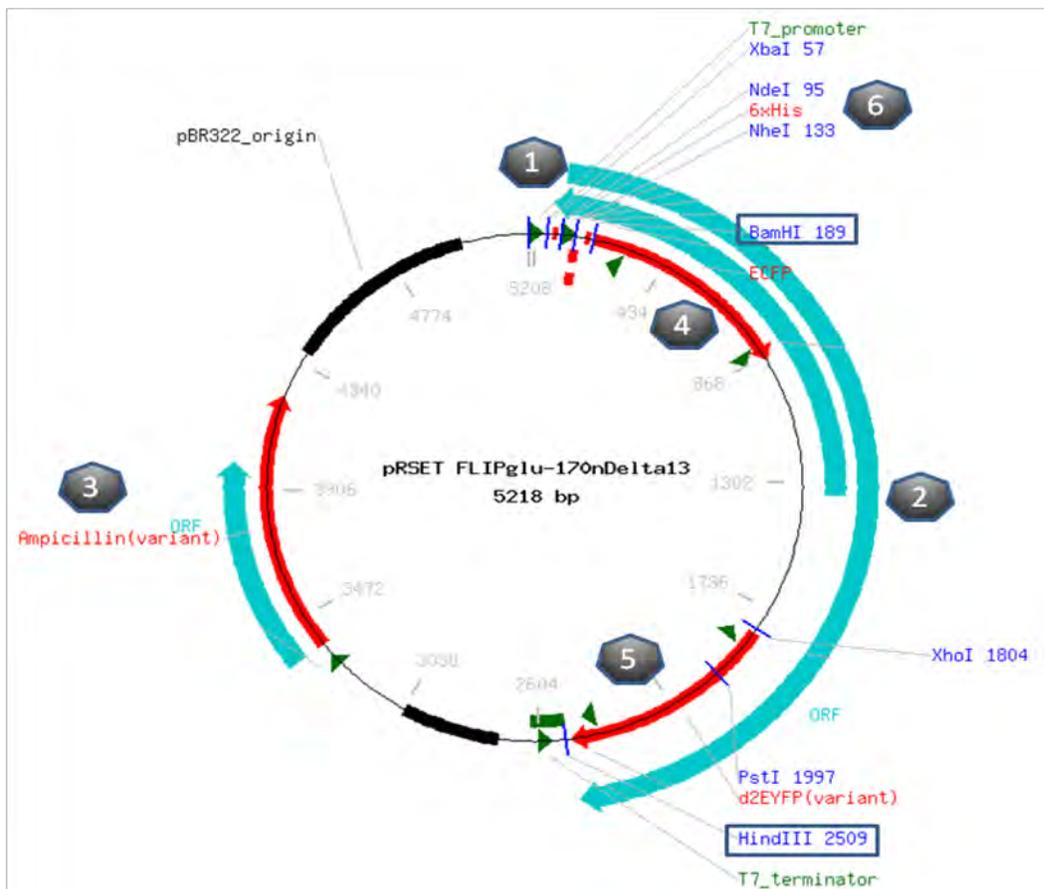


Figura 33. Mapa del vector PRSET-FLIPglu 170nM Δ 13

1. Es el inicio del gen de interés bajo el promotor T7.
2. Corresponde a todo el gen de interés que contempla las dos proteínas fluorescentes y la proteína de reconocimiento de la glucosa.
3. Es el gen que le otorga la resistencia al antibiótico Ampicilina.
4. Corresponde al gen de la proteína fluorescente en el extremo amino terminal, la CFP.

5. Corresponde al gen de la proteína fluorescente en el extremo carboxilo terminal, la YFP y en el caso de la Figura XC, Afrodita.
6. Muestra donde se encuentra la cola de Histidinas (6X).

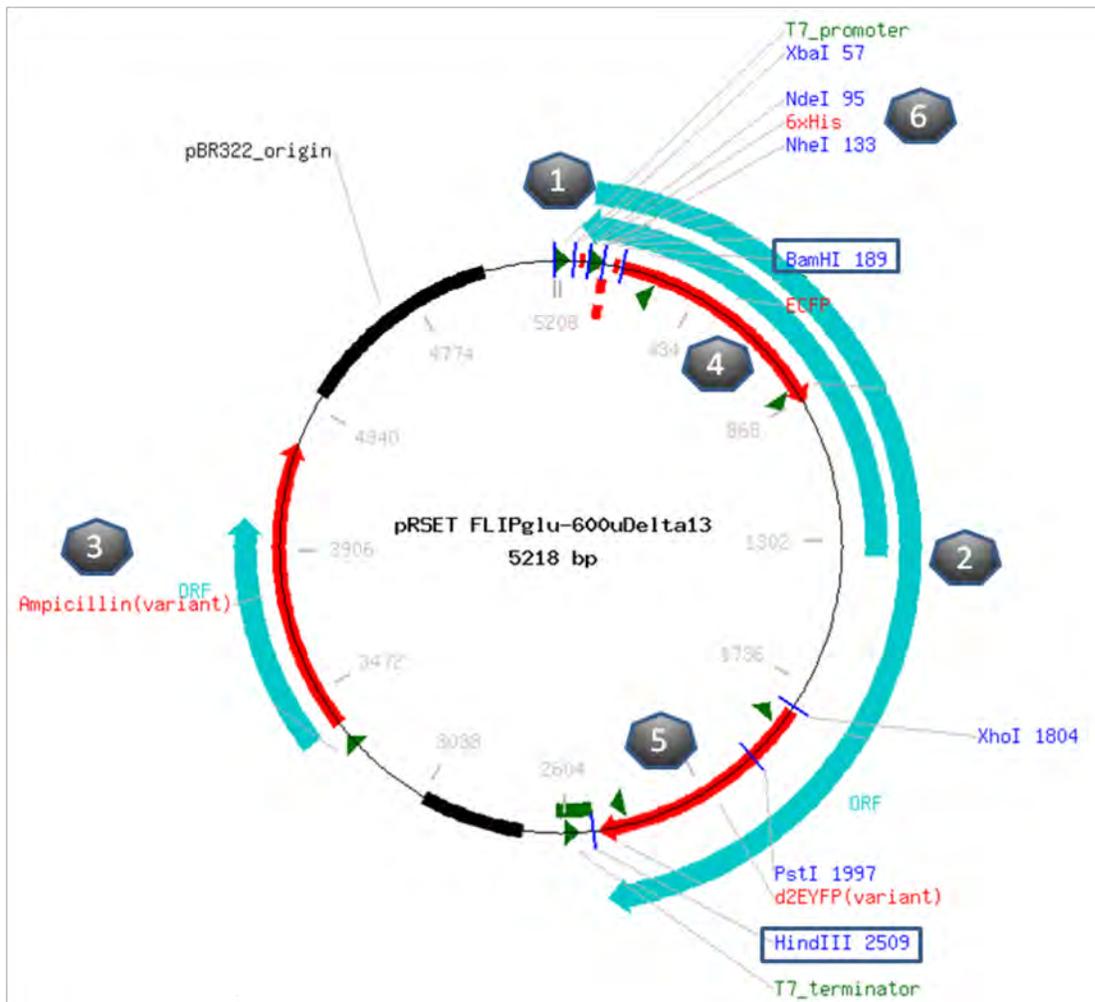


Figura 34. Mapa del vector PRSET-FLIPglu 600 μ M Δ 13

1. Es el inicio del gen de interés bajo el promotor T7.
2. Corresponde a todo el gen de interés que contempla las dos proteínas fluorescentes y la proteína de reconocimiento de la glucosa.
3. Es el gen que le otorga la resistencia al antibiótico Ampicilina.
4. Corresponde al gen de la proteína fluorescente en el extremo amino terminal, la CFP.
5. Corresponde al gen de la proteína fluorescente en el extremo carboxilo terminal, la YFP y en el caso de la Figura XC, Afrodita.
6. Muestra donde se encuentra la cola de Histidinas (6X).

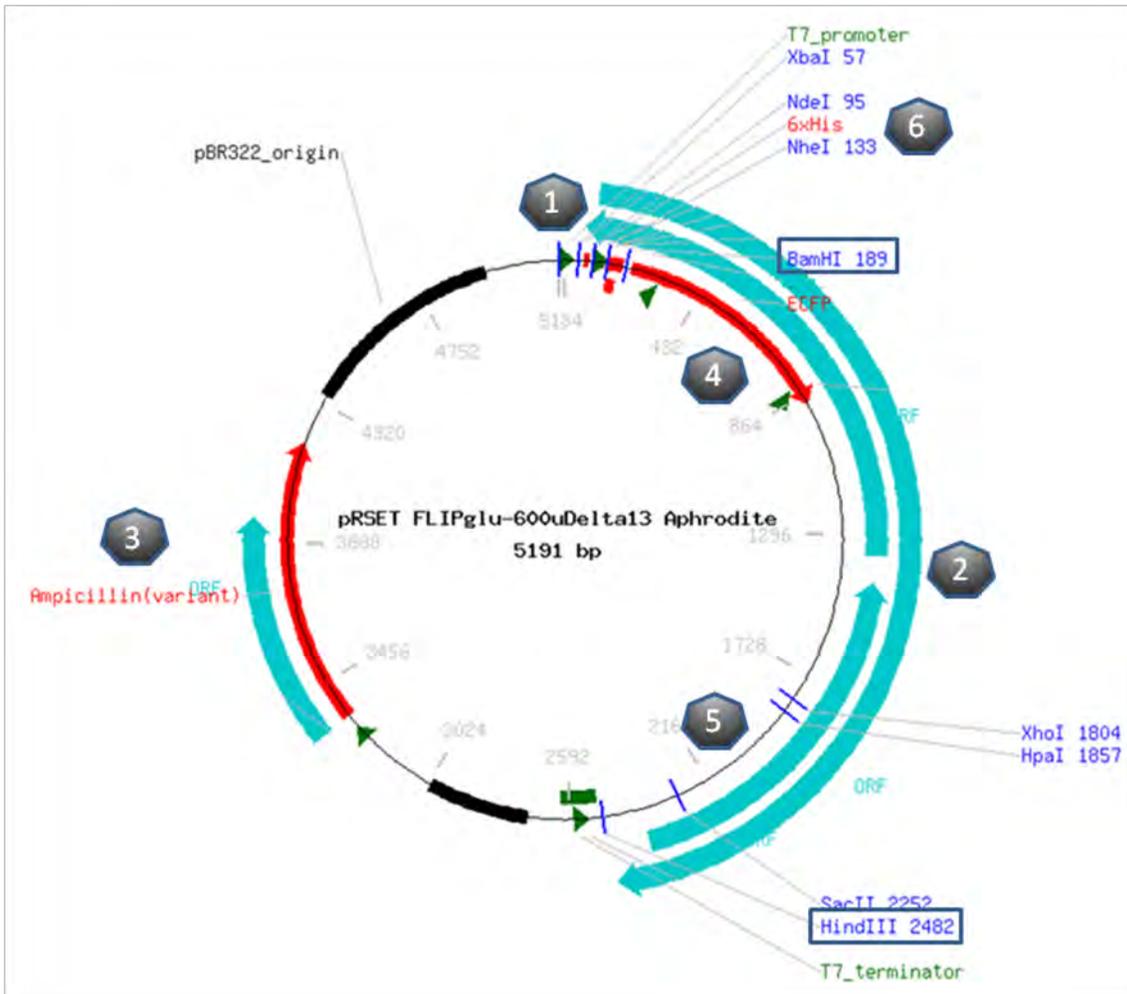


Figura 35. Mapa del vector PRSET-FLIPglu600 μ M Δ 13afrodita

1. Es el inicio del gen de interés bajo el promotor T7.
2. Corresponde a todo el gen de interés que contempla las dos proteínas fluorescentes y la proteína de reconocimiento de la glucosa.
3. Es el gen que le otorga la resistencia al antibiótico Ampicilina.
4. Corresponde al gen de la proteína fluorescente en el extremo amino terminal, la CFP.
5. Corresponde al gen de la proteína fluorescente en el extremo carboxilo terminal, la YFP y en el caso de la Figura XC, Afrodita.
6. Muestra donde se encuentra la cola de Histidinas (6X).

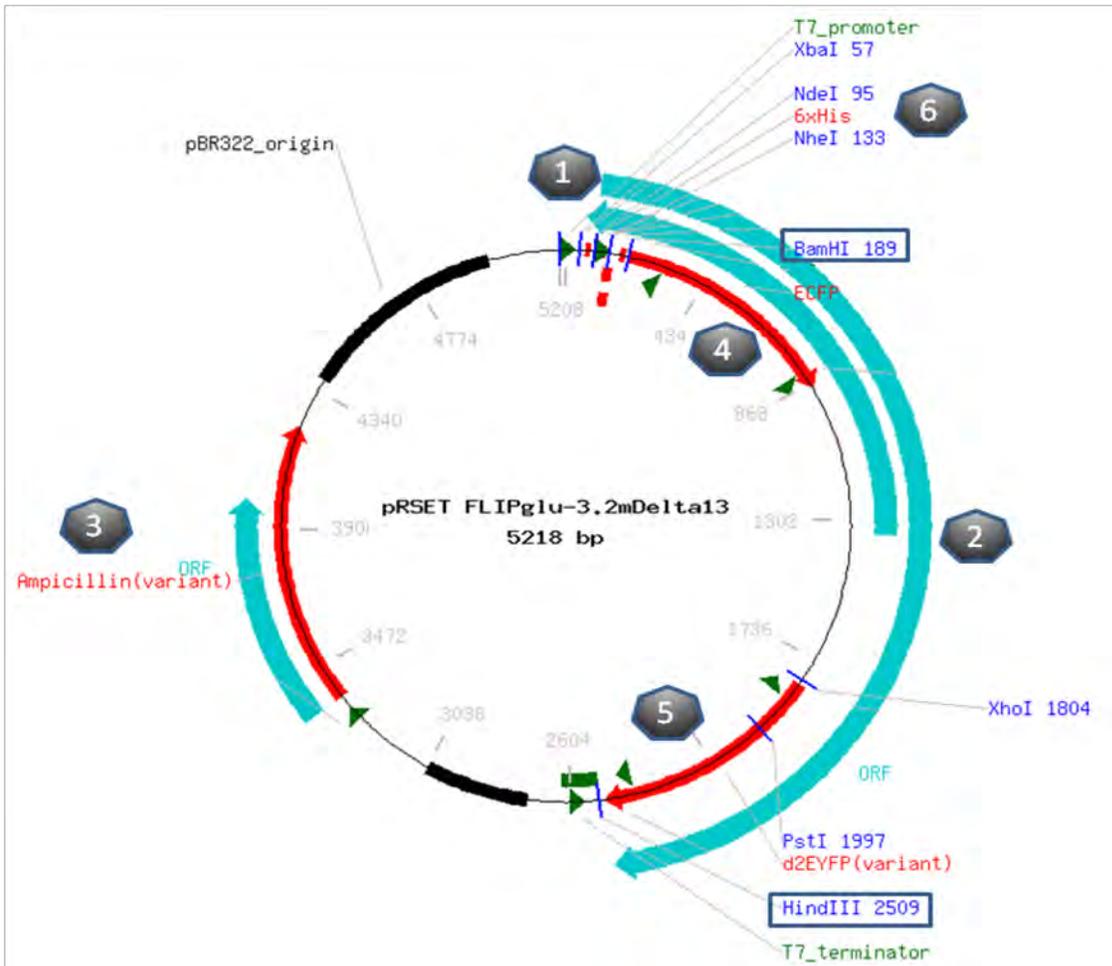


Figura 36. Mapa del vector PRSET-FLIPglu3.2mMΔ13

1. Es el inicio del gen de interés bajo el promotor T7.
2. Corresponde a todo el gen de interés que contempla las dos proteínas fluorescentes y la proteína de reconocimiento de la glucosa.
3. Es el gen que le otorga la resistencia al antibiótico Ampicilina.
4. Corresponde al gen de la proteína fluorescente en el extremo amino terminal, la CFP.
5. Corresponde al gen de la proteína fluorescente en el extremo carboxilo terminal, la YFP y en el caso de la Figura XC, Afrodita.
6. Muestra donde se encuentra la cola de Histidinas (6X).

- III. Secuenciación a partir del vector pRSET-FLIPglu.
- En las secuencias se indica los sitios de corte de las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* subrayadas .
 - En gris es la secuencia correspondiente a ECFP y EYFP
 - En gris oscuro a la zona que codifica para seis histidinas y
 - Doble subrayado los codones de inicio y termino.

Secuencia del gen *FLIPgluF16FΔ13*, (FLIPglu170nMΔ13).

GGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGTTCATCATCATCATCATCA
 TGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGGGATCTGTACGACGATGACGATAAggatccgggccgcATG
 GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGT
 TCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCT
 GCCCGTGGCCCGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG
 CAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACT
 ACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGA
 GGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAG
 AACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGA
 ACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC
 CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCGCTGATACTCGCATTGGTGTAACA
 ATCTATAAGTACGACGATAACTtttATGTCTGTAGTGCGCAAGGCTATTGAGCAAGATGCGAAAGCCGCGCCAGATGTTT
 AGCTGCTGATGAATGATTCTCAGAATGACCAGTCCAAGCAGAACGATCAGATCGACGTATGCTGGCGAAAGGGGTGAA
 GGCATGGCAATCAACCTGGTTGACCCGGCAGCTGCGGGTACGGTGATTGAGAAAGCGCGTGGGCAAAACGTGCCGGTG
 GTTTTCTTCAACAAAGAACCCTCTCGTAAGGCGCTGGATAGCTACGACAAAGCCTACTACGTTGGCACTGACTCCAAAG
 AGTCCGGCATTATTCAAGGCGATTTGATTGCTAAACACTGGGCGGCGAATCAGGGTTGGGATCTGAACAAAGACGGTCA
 GATTGATTCGTAAGGTTGAAAGGTTGAACCGGGCCATCCGGATGCAGAAGCACGTACCCTTACGTTGATTAAGAATTG
 AACGATAAAGGCATCAAACTGAACAGTTACAGTTAGATACCGCAATGTGGGACACCGCTCAGGCGAAAGATAAGATGG
 ACGCCTGGCTGTCTGGCCGAAACGCCAACAATAAATCGAAGTGGTTATCGCCAACAACGATGCGATGGCAATGGGCGCGGT
 TGAAGCGCTGAAAGCACACAACAAGTCCAGCATTCCGGTGTGTTGGCGTGCATGCGCTGCCAGAAGCGCTGGCGCTGGTG
 AAATCCGGTGCCTGGCGGGCACCGTACTGAACGATGCTAACAACCAGGCGAAAGCGACCTTTGATCTGGCGAAAAAC



CGACCACTACC
AGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCAGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAA
AGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAG
CTGTACAAGTAAAAGCTTGATCCGGCTGCTAACAAA

www.addgene.org/pgvec1?f=c&identifier=13559&atqx=FLIPglu%20600&cmd=findpl

Secuencia del gen *FLIPgluF16AΔ13*, (FLIPglu600μMΔ13AFRODITA).

ATGCGGGTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCTGTACG
ACGATGACGATAAaggatccgggcccgcATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCTGA
GCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC
CTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTGGGGCGTGCAGT
GCTTCAGCCGTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCG
CACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGC
ATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACATCAGCCACA
ACGTCTATATACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAG
CGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACCCCCATCGGGCAGGGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACCACTACCTG
AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGTGGAGTTCGTGACCGCCGCCG
GGATCGCTGATACTCGCATTGGTGTAAACAATCTATAAGTACGACGATAACcgcgATGTCGTGAGTGCGAAGGCTATTGA
GCAAGATGCGAAAGCCGCGCAGATGTTTCAAGTGTGATGAATGATTCTCAGAATGACCAGTCCAAGCAGAACGATCAG
ATCGACGTATTGCTGGCGAAAGGGGTGAAGGCACTGGCAATCAACCTGGTTGACCCGGCAGCTGCGGGTACGGTGATTG
AGAAAGCGCTGGGCAAAACGTGCCGGTGGTTTTCTTCAACAAAGAACCCTCTCGTAAGGCGCTGGATAGCTACGACAA
AGCCTACTACGTTGGCACTGACTCCAAGAGTCCGGCATTATTCAAGGCGATTTGATTGCTAAACACTGGGCGGCGAAT
CAGGGTTGGGATCTGAACAAAGACGGTCAGATTCAGTTCGTAAGGTGAAACCGGGCCATCCGGATGCAGAAG
CACGTACCCTTACGTGATTAAGAATTGAACGATAAAGGCATCAAACTGAACAGTTACAGTTAGATACCGAATGTG
GGACACCGCTCAGGCGAAAGATAAGATGGACGCCTGGCTGTCTGGCCCCAACGCCAACAAAATCGAAGTGGTTATCGCC
AACAAACGATGCGATGGCAATGGGCGCGGTTGAAGCGCTGAAAGCACACAACAAGTCCAGCATTCGGGTGTTTGGCGTCG
ATGCGCTGCCAGAAGCGCTGGCGCTGGTGAATCCGGTGCCTGGCGGGCACCGTACTGAACGATGCTAACAAACAGGC
GAAAGCGACCTTTGATCTGGCGAAAACCTGGCCGATGGTAAAGGTGCGGCTGATGGCACCACCTGGAAAATCGACAAC
AAAGTGGTCCGCTACCTTATGTTGGCGTAGATAAAGACAACCTGGCTctcgagTTGTTTACGGGCGTCTGCCGATCC
TCGTGGAACTCGACGGGGATGTTAACGGGCATAAGTTTTCGGTGAGCGGGGAGGGGAGGGGACGCGACGTATGGGAA
GCTCACTCTCAAGCTGATCTGTACGACGGGGAACTCCCGTCCCGTGGCCGACGCTGGTACGACGCTGGGATACGGG
CTCCAATGCTTTGCGAGGTATCCGGACCACATGAAACAGCATGACTTTTTCAAATCGGCGATGCCGGAGGGATACGTGC
AGGAACGGACGATCTTTTTCAAAGACGATGGGAACATAAGACGCGGGCGGAAGTCAAGTTTGAAGGGGACACGCTCGT
CAACCGGATCGAACTCAAGGGGATTGACTTCAAAGAGGATGGGAACATACTCGCCATAAGCTCGAATACAATTACAAC
TCGCATAACGTATACATCACCGCGGATAAGCAAAAGAATGGGATCAAAGCCAATTTCAAATCCGGCATAACATAGAGG
ATGGGGGGTCCAACCTGGCGGATCACTATCAGCAAAACACCGGATAGGGGATGGGCCGGTCTCTCTCCCGGATAACCA
TTACCTCTCGTACCAAAGCGGCTCTCGAAGGACCCGAATGAGAAACGGGACCACATGGTCTCTCTGGAGTTCGTACG
GCGGCGGGCATATAGTCTAGAAAGCTTATCCGGCTGCTAACAAA

www.addgene.org/pgvec1?f=c&identifier=13570&atqx=FLIPglu%20aaphodite&cmd=final

Secuencia del gen *FLIPgluF16AS112AΔ13*, (FLIPglu3.2mMΔ13).

GGTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGGTCTCATCATCATCATCATCA
TGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGGGATCTGTACGACGATGACGATAAaggatccgggcccgcATG
GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGT
TCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCT
GCCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG
CAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACT
ACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGA
GGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAG
AACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGA
ACACCCCATCGGGCAGGGCCCGTGTGCTGCTGCCCCGACAACCCTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC
CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCGCTGATACTCGCATTGGTGTAAACA
ATCTATAAGTACGACGATAACgcgATGTCTGTAGTGCACAAGGCTATTGAGCAAGATGCGAAAGCCGCGCCAGATGTTT
AGCTGCTGATGAATGATTCTCAGAATGACCAGTCCAAGCAGAACGATCAGATCGACGTATTGCTGGCGAAAAGGGGTGAA
GGCACTGGCAATCAACCTGGTTGACCCGGCAGCTGCGGGTACGGTGATTGAGAAAGCGCTGGGCAAAACGTGCCGGTG
GTTTTCTTCAACAAAGAACCCTCTCGTAAGCGCTGGATAGCTACGACAAAGCCTACTACGTTGGCACTGACgccaAAG
AGTCCGGCATTATTCAAGGCGATTTGATTGCTAAACACTGGGCGGCGAATCAGGGTTGGGATCTGAACAAAGACGGTCA
GATTCAGTTCGTAAGTGTGAAAGGTGAACCGGGCCATCCGGATGCAGAAGCACGTACCCTTACGTTAAAGAATTG
AACGATAAAGGCATCAAACTGAACAGTTACAGTTAGATACCGCAATGTGGGACACCGCTCAGGCGAAAGATAAGATGG
ACGCTGGCTGTCTGGCCCGAACGCCAACAAAATCGAAGTGGTTATCGCCAACAACGATGCGATGGCAATGGGCGCGGT
TGAAGCGCTGAAAGCACACAACAAGTCCAGCATTCGGTGTGTTGGCGTCGATGCGCTGCCAGAAGCGCTGGCGCTGGTG
AAATCCGGTGCCTGGCGGGCACCGTACTGAACGATGCTAACAACCAGGCGAAAGCGACCTTTGATCTGGCGAAAAACC
TGGCCGATGGTAAAGGTGCGGCTGATGGCACCAACTGGAAAAATCGACAACAAGTGGTCCGCGTACCTTATGTTGGCGT
AGATAAAGACAACCTGGCTctcgagCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGC
CACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCG
GCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCA
CATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGAC
GGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACT
TCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAA
GCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTAC
CAGCAGAACACCCCATCGGGCAGGGCCCGTGTGCTGCTGCCCCGACAACCCTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCA
AAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGA
GCTGTACAAGTAAAAGCTTGATCCGGCTGCTAACAAA

www.addgene.org/pgvec1?f=c&cmd=findpl&identifier=13560&attag=n

IV. Mapa del vector de clonación pGEM-TEasy (PROMEGA®).

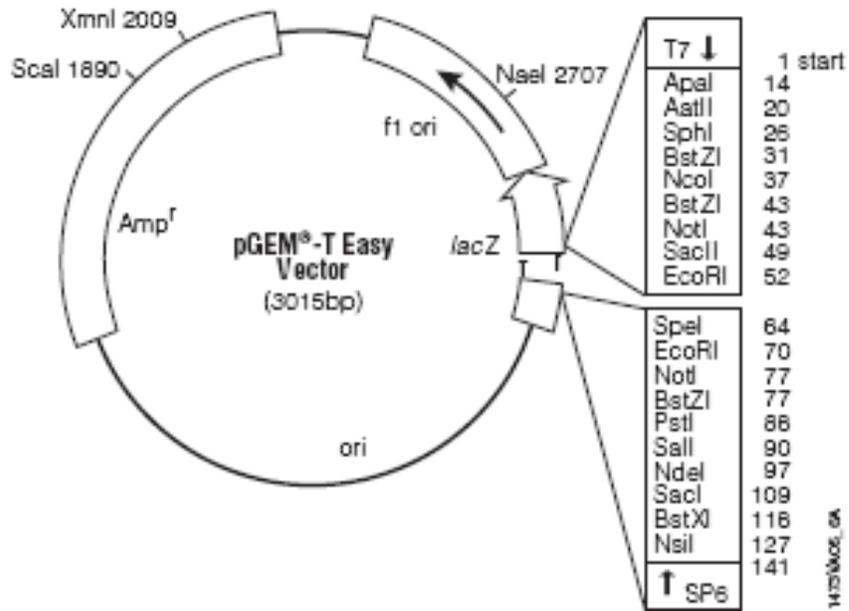


Figura 37. Mapa del vector pGEM-TEasy, PROMEGA (www.promega.com).

V. Secuenciación a partir del vector pGEM-TEasy-FLIPglu.

En el vector pGEM-TEasy se clonó el gen de cada proteína FLIP amplificado por PCR, a través del cual se inserto, después del sitio de corte de la enzima de restricción HindIII, la secuencia **CCCGGG** que reconoce la enzima de restricción SmaI, como se muestra en las siguientes secuencias.

- En las secuencias se indica los sitios de corte de las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* marcadas con gris.
- En gris claro la secuencia correspondiente a ECFP y EYFP
- Doble subrayado los codones de inicio y termino.
- Subrayado la secuencia molde de los primers usados en la amplificación.

Secuencia del gen *FLIPgluF16FΔ13*, (FLIPglu170nMΔ13).

```
GGTTTCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGGTCTCATCATCATCATCA
TGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGACGATAAAggatccggggccgcATG
GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGT
TCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCT
GCCCCTGCCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG
CAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACT
ACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGA
GGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAG
AACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGA
ACACCCCATCGGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC
CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCCGCGGGGATCGCTGATACTCGCATGGTGTAAACA
ATCTATAAGTACGACGATAACTtttATGCTGTAGTGCAGCAAGGCTATTGAGCAAGATGCGAAAGCCGCGCCAGATGTTT
AGCTGCTGATGAATGATTCAGAATGACCAGTCCAAGCAGAACGATCAGATCGACGTATTGCTGGCGAAAGGGGTGAA
GGCATAAGCAATCAACCTGGTTCGACCCGCGAGCTGCGGGTACGGTGATTGAGAAAGCGCGTGGGCAAAACGTGCCGGTG
GTTTTCTTCAACAAAGAACCGTCTCGTAAGCGCTGGATAGCTACGACAAAGCCTACTACGTTGGCACTGACTCCAAAG
AGTCCGGCATTATTCAAGGCGATTTGATTGCTAAACACTGGCGGCGAATCAGGGTTGGGATCTGAACAAAGACGGTCA
GATTCAGTTCGTACTGCTGAAAGGTGAACCGGCCATCCGGATGCAGAAGCACGTACCCTTACGTGATTAAGAATTG
AACGATAAAGGCATCAAAACTGAACAGTTACAGTTAGATACCGCAATGTGGGACACCGCTCAGGCGAAAGATAAGATGG
ACGCCTGGCTGTCTGGCCCGAACGCCAACAAAATCGAAGTGGTTATCGCCAACAACGATGCGATGGCAATGGGCGCGGT
TGAAGCGCTGAAAGCACACAACAAGTCCAGCATTCCGGTGTTTGGCGTTCGATGCGCTGCCAGAAGCGCTGGCGCTGGTG
AAATCCGGTGCCTGCGGGCACCGTACTGAACGATGCTAACAACAGGCGAAAGCGACCTTTGATCTGGCGAAAAACC
TGGCCGATGGTAAAGGTGCGGCTGATGGCACCAACTGGAAAAATCGACAACAAAGTGGTCCGCGTACCTTATGTTGGCGT
AGATAAAGACAACCTGGCTctcgagCTGTTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGC
CACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCG
GCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCTGCAGTGCTTCGCCCCTACCCCGACCA
CATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGAC
GGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACT
TCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAA
GCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTAC
CAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCA
AAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGA
GCTGTACAAGTAAAGCTTGATCCGGCTGCTAACAccgggAA
```

Secuencia del gen *FLIPgluF16AΔ13*, (FLIPglu600μMΔ13).

GGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGGTTCATCATCATCATCATCA
TGGTATGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTTCGGGATCTGTACGACGATGACGAT**TAAGgatacggggccgcATGG**
TGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGTGGTGCCTCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTT
CAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTG
CCCGTGCCTTGGCCACCCTCGTGACCACCTGACCTGGGGCGTGCAGTGTTCAGCCGTACCCCGACCACATGAAGC
AGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA
CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAGCAGAAGA
ACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAA
CACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACCCTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCC
AACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCCGCCCGGGGATCGCTGATACTCGCATTGGTGTAAACAA
TCTATAAGTACGACGATAACGcgATGTCTGTAGTGCGCAAGGCTATTGAGCAAGATGCGAAAAGCCGCGCCAGATGTTCA
GCTGCTGATGAATGATTCTCAGAATGACCAGTCCAAGCAGAACGATCAGATCGACGATTTGCTGGCGAAAGGGGTGAAG
GCACTGGCAATCAACCTGGTTGACCCGGCAGCTGCGGGTACGGTGATTGAGAAAAGCGCGTGGGCAAAAACGTGCCGGTGG
TTTTCTTCAACAAAGAACCCTCTCGTAAGGCGCTGGATAGCTACGACAAAAGCCTACTACGTTGGCACTGACTCCAAAGA
GTCCGGCATTATTCAGGCGATTTGATTGCTAAACACTGGGGCGGAATCAGGGTGGGATCTGAACAAAGACGGTCAG
ATTCAGTTCGTACTGCTGAAAGGTGAACCGGCCATCCGGATGCAGAAGCAGTACCCTTACGTGATTAAGAATTGA
ACGATAAAGGCATCAAACTGAACAGTTACAGTTAGATACCGCAATGTGGGACACCGCTCAGGGCAAGATAAGATGGA
CGCCTGGCTGTCTGGCCGAACGCCAACAATAAAGTGGTTATCGCCAACAACGATGCGATGGCAATGGGCGCGGTT
GAAGCGCTGAAAGCACACAACAAGTCCAGCATTCGGGTGTTTGGCGTCGATGCGCTGCCAGAAGCGCTGGCGCTGGTGA
AATCCGGTGCCTGGCGGGCACCGTACTGAACGATGCTAACAACCAGGGCAAGCGACCTTTGATCTGGCGAAAACCT
GGCCGATGGTAAAGGTGCGGCTGATGGCACCAACTGGAAAATCGACAACAAGTGGTCCGCGTACCTTATGTTGGCGTA
GATAAAGACAACCTGGCTctcgagCTGTTACCCGGGTGGTGCCTCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCC
ACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGG
CAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGCAGTGTCTCGCCCGCTACCCCGACCAC
ATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGACCATCTTCTTCAAGGACGACG
GCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTT
CAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAG
CAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACC
AGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACCCTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAA
AGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAG
CTGTACAAGTAAAGCT**TTGATCCGGCTGCTAACAcceggg**AA

Secuencia del gen *FLIPgluF16AΔ13*, (FLIPglu600μMΔ13AFRODITA).

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCTGTACG
ACGATGACGAT**TAAggatccgggcccgcATGGTG**AGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCTGA
GCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC
CTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGGCCCGCCACCTCGTGACCACCTGACCTGGGGCGTGCAGT
GCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCG
CACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGC
ATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACATCAGCCACA
ACGTCTATATACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAG
CGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTG
AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTTCGTGACCGCCGCCG
GGATCGCTGATACTCGCATTGGTGTAAACAATCTATAAGTACGACGATAACGcgATGTCTGTAGTGCGAAGGCTATTGA
GCAAGATGCGAAAAGCCGCGCAGATGTTTCAGCTGCTGATGAATGATTCTCAGAATGACCAGTCCAAGCAGAACGATCAG
ATCGACGTATTGCTGGCGAAAAGGGGTGAAGGCACTGGCAATCAACCTGGTTGACCCGGCAGCTGCGGGTACGGTGATTG
AGAAAGCGCGTGGGCAAAACGTGCCGGTGGTTTTCTTCAACAAAAGAACCCTCTCGTAAGGCGCTGGATAGCTACGACAA
AGCCTACTACGTTGGCACTGACTCCAAAGAGTCCGGCATTATTCAGGGGATTTGATTGCTAAACACTGGGCGGCGAAT
CAGGGTTGGGATCTGAACAAAGACGGTCAGATTCAGTTCGTAAGTGAACCGGGCCATCCGGATGCAGAAG
CACGTACCCTTACGTGATTAAGAATTGAACGATAAAGGCATCAAACTGAACAGTTACAGTTAGATACCGCAATGTG
GGACACCGCTCAGGCGAAAGATAAGATGGACGCCTGGCTGTCTGGCCCGAACGCCAACAAAATCGAAGTGGTTATCGCC
AACAACGATGCGATGGCAATGGGCGCGGTTGAAGCGCTGAAAGCACACAACAAGTCCAGCATTCGGGTGTTTGGCGTCTG
ATGCGCTGCCAGAAGCGCTGGCGCTGGTGAATCCGGTGCCTGGCGGGCACCGTACTGAACGATGCTAACAACCGGC
GAAAGCGACCTTTGATCTGGCGAAAACCTGGCCGATGGTAAAGGTGCGGCTGATGGCACCAACTGGAAAATCGACAAC
AAAGTGGTCCGCTACCTTATGTTGGCGTAGATAAAGACAACCTGGCTctcgagTTGTTTACGGGCGTCTGCCGATCC
TCGTGGAACTCGACGGGGATGTTAACGGGCATAAGTTTTCGGTGACGGGGGAGGGGAGGGGACGCGACGTATGGGAA
GCTCACTCTCAAGCTGATCTGTACGACGGGGAACTCCCGTCCCGTGGCCGACGCTGGTACGACGCTGGGATACGGG
CTCCAATGCTTTGCGAGGTATCCGGACCACATGAAACAGCATGACTTTTTCAAATCGGCGATGCCGGAGGGATACGTGC
AGGAACGGACGATCTTTTTCAAAGACGATGGGAACATAAGACGCGGGCGGAAGTCAAGTTGAAGGGGACACGCTCGT
CAACCGGATCGAACTCAAGGGGATTGACTTCAAAGAGGATGGGAACATACTCGCCATAAGCTCGAATACAATTACAAC
TCGCATAACGTATACATCACCGCGGATAAGCAAAGAATGGGATCAAAGCCAATTTCAAATCCGGCATAACATAGAGG
ATGGGGGGTCCAACCTGGCGGATCACTATCAGCAAAACACGCCGATAGGGGATGGGCCGCTCCTCCTCCCGATAACCA
TTACCTCTGTACCAAAGCGCGCTCTCGAAGGACCGAATGAGAAACGGGACCACATGGTCTCCTGGAGTTCGTACG
CGGCGGGCATATAGTCTAGAAAGC**TTGATCCGGCTGCTAACA**ccccggAA

Secuencia del gen *FLIPgluF16AS112AΔ13*, (FLIPglu3.2mMΔ13).

GGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATG
GTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAgga tcdggggcgcATGGTGA
GCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAACCGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCG
TGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCGTAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGC
CCTGGCCACCCTCGTGACCACCTGACCTGGGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACT
TCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCG
CCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC
TGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATCAGCCACAACGTCTATATACCCGCCGACAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCA
ACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGC
GCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACA
TGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGGATCGCTGATACTCGCATTGGTGTAAACAATCTATAAGTACGACGATAACg
cgATGTCTGTAGTGCAGCAAGGCTATTGAGCAAGATGCGAAAGCCGCGCCAGATGTTGAGCTGCTGATGAATGATTCAGGA
ATGACCAGTCCAAGCAGAACGATCAGATCGACGATTTGCTGGCGAAAGGGGTGAAGGCACTGGCAATCAACCTGGTTGACC
CGGCAGCTGCGGGTACGGTGATTGAGAAAAGCGCGTGGGCAAAACGTGCCGGTGGTTTTCTTCAACAAAGAACCCTCGTA
AGGGCTGGATAGCTACGACAAAGCCTACTACGTTGGCACTGACgcCAAAGAGTCCGGCATTATTCAGGGCATTGATTG
CTAAACTGGGCGCGAATCAGGGTTGGGATCTGAACAAAGACGGTCAGATTCAGTTCGTAAGGTTGAAAGGTGAACCGG
GCCATCCGGATGCAGAAGCACGTACCCTACGTTAAAGAATTGAACGATAAAGGCATCAAACTGAACAGTTACAGT
TAGATACCGCAATGTGGGACACCGCTCAGGCGAAAGATAAGATGGACGCCTGGCTGCTGGCCCCAACGCCAACAAAATCG
AAGTGGTTATCGCCAACAACGATGCGATGGCAATGGGCGCGGTTGAAGCGCTGAAAGCACACAACAAGTCCAGCATTCCGG
TGTTTGGCGTCGATGCGCTGCCAGAAGCGCTGGCGCTGGTGAATCCGGTGCACCTGGCGGCACCGTACTGAACGATGCTA
ACAACCAGGCGAAAGCGACCTTTGATCTGGCGAAAACCTGGCCGATGGTAAAGGTGCGGCTGATGGCACCAACTGGAAAA
TCGACAACAAGTGGTCCGCGTACCTTATGTTGGCGTAGATAAAGACAACCTGGCTctcgagCTGTTACCGGGGTGGTGC
CCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACG
GCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACG
GCCTGCAGTGTTCGCCCCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCC
AGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGA
ACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAGCTGGAGTACAACATAACAGCC
ACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCA
GCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGA
GCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCAGTGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGGA
TCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAAGCTTGATCCGGCTGCTAACAccegggAA

VI. Mapa del vector pENTR.

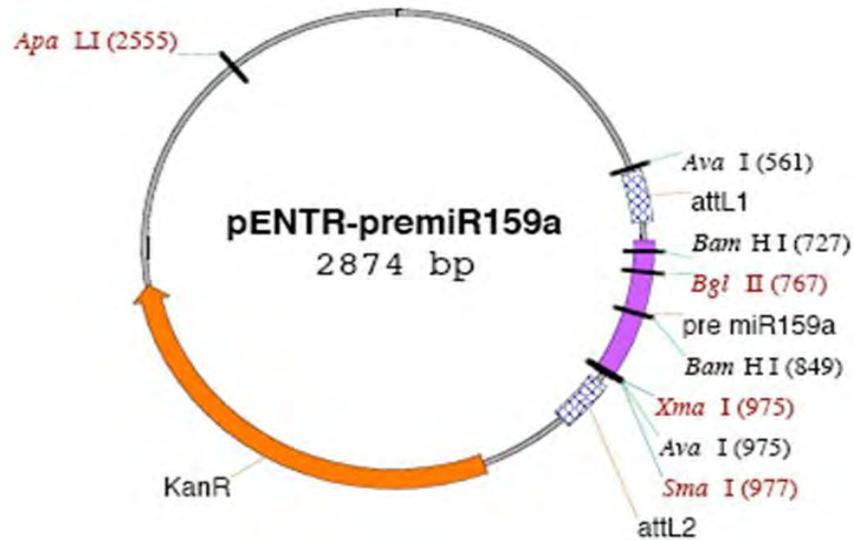


Figura 38. Mapa del vector pENTR-premiR159a INVITROGEN™ (www.invitrogen.com)

VII. Mapa del vector binario pBA-DC-myc.

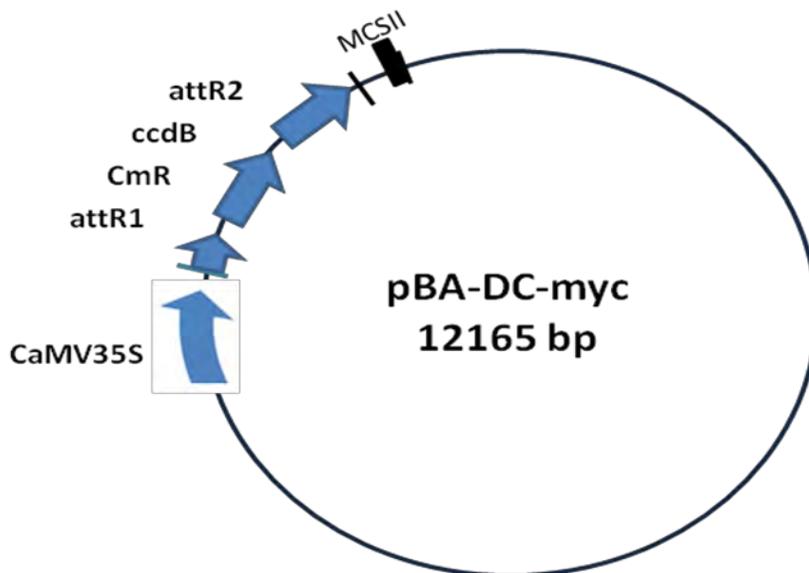
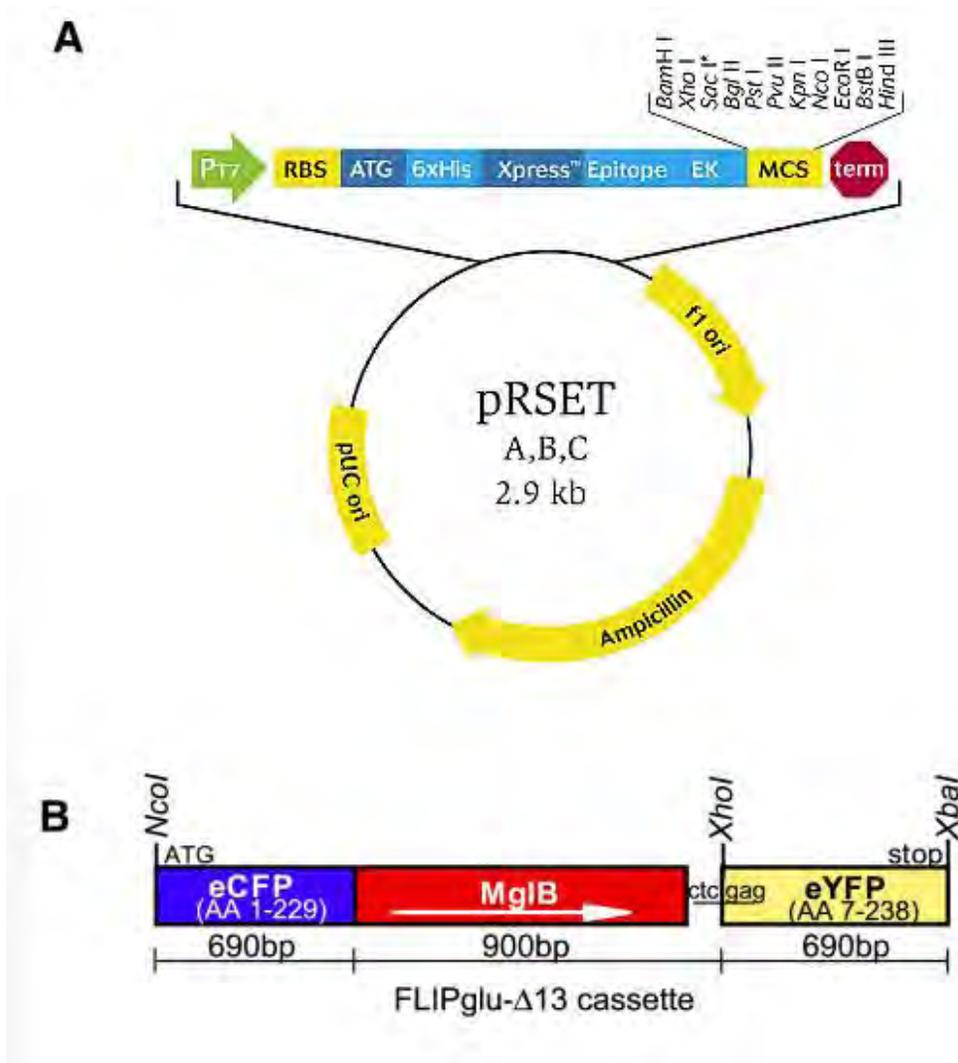


Figura 39. Vector binario pBA-DC-myc.



FiguraXX. Mapa de construcción del plásmido pRSETFLIPglu- Δ 13. **A)** vector pRSET, **B)** cassette FLIPglu- Δ 13 vista lineal que muestra la fusión de los genes eCFP-MgIB-eYFP. Se indica el tamaño de cada gene, los sitios de restricción y los sitios de inicio y paro de la transcripción. Modificado de Deuschle *et al.*, 2006.