



Universidad Austral de Chile

---

Facultad de Ciencias  
Escuela de Bioquímica

Profesor Patrocinante  
Dra. Ilona I. Concha G.  
Instituto de Bioquímica  
Facultad de Ciencias  
Universidad Austral de Chile

**Estudio de homología entre un fragmento del  
gen de GLUT5 humano y el putativo gen de GLUT5  
presente en *DESCHAMPSIA ANTARCTICA***

Tesis de Grado presentada como  
parte de los requisitos para optar al  
Grado de ***Licenciado en  
Bioquímica*** y al Título Profesional  
de ***Bioquímico***

**Iván Pedro Leñam Barril**

Valdivia Chile 2003

*A mis padres, gracias por ser quienes son, por ayudarme a crecer, apoyarme y alentarme a lo largo de toda mi vida. Gracias por estar ahí cuando la vida me golpeó, pues su infinito amor fue el que me hizo levantar.*

*A mis amigos, gracias por ser ustedes mismos y aceptarme tal cual soy.*

*A esa mujer que ya no está conmigo y que en esta última etapa fue mi motivación.*

*Gracias.*

## **Agradecimientos**

A mi profesor patrocinante, la Dra. Ilona Concha, por permitirme crecer a su alero y formar parte de la familia que compone su laboratorio, por su inagotable paciencia, comprensión y apoyo en los momentos difíciles, no sólo para finalizar este trabajo, sino para seguir adelante frente a los golpes que me dio la vida.

Al Dr. Rodolfo Amthauer y Dra. Miren Alberdi, por formar parte de la comisión evaluadora, en especial a la Dra. Alberdi por facilitar el material biológico de esta tesis.

A Mónica Brito, también por su inagotable paciencia, apoyo y ayuda para desarrollar esta tesis.

A mi gran amiga Cecilia Rauch, por su incesante estímulo, apoyo, paciencia y comprensión.

A mis compañeros de laboratorio, Enrique, Lorena, Angara, Angélica, Claudia, Pablo, Carola, Alfredo, Helga, Joanna, Marisol, Mónica, Yasna, Tibusay, gracias por su compañía y ayuda brindada, por la alegría y apoyo en esos días difíciles.

A mi amigo Fernando, por su apoyo incondicional, sus frases de apoyo y reprimenda que me alentaron muchas veces a seguir adelante con más ahínco.

A mis profesores a lo largo de mi carrera y a todas las personas del Instituto de Bioquímica que contribuyeron a lograr este objetivo.

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1990994.

## INDICE DE CONTENIDOS

	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	
<b>INDICE DE CONTENIDOS</b>	I
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	IV
<b>INDICE DE TABLAS</b>	V
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	VI
<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b>	19
<b>3.1 Material</b>	19
3.1.1 Material biológico	19
3.1.2 Reactivos	20
<b>3.2 Métodos</b>	22
3.2.1 Extracción de DNA de Plantas	22
3.2.2 Cuantificación de muestras de DNA	23
3.2.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	24
3.2.4 Análisis de PCR	24
3.2.5 Extracción de RNA en plantas	26

3.2.6	Cuantificación de las muestras de RNA	27
3.2.7	Electroforesis de RNA en geles de agarosa	28
3.2.8	Reacción de Transcripción Reversa	28
3.2.9	Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)	29
3.2.10	Extracción del fragmento amplificado por RT-PCR desde gel de agarosa	29
3.2.11	Ligación del fragmento aislado al vector de expresión	31
3.2.12	Transformación usando las reacciones de ligación	31
3.2.13	Cultivo de células competentes a menor escala	33
3.2.14	Digestión con enzima de restricción	34
3.2.15	Cultivo de células competentes a gran escala	35
3.2.16	Producción de un lisado clarificado	35
3.2.17	Purificación de DNA plasmidial	36
3.2.18	Secuenciación de fragmentos de cDNA	37
3.2.19	Extracción de proteínas totales	38
3.2.20	Cuantificación de proteínas	38
3.2.21	Electroforesis de proteínas totales	39
3.2.22	Detección Inmunológica (Western Blot)	39
3.2.23	Inmunoprecipitación	41
3.2.24	Estudios de homología	42

<b>4. RESULTADOS</b>		<b>43</b>
4.1	Estudio de DNA mediante PCR	44
4.2	Análisis de mRNA mediante técnica de RT-PCR	46
4.3	Transformación de células	48
4.4	Estudio de la proteína presente en <i>D. antarctica</i>	55
<b>5. DISCUSIÓN</b>		<b>62</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>73</b>

**INDICE DE FIGURAS**

	<b>Página</b>
Figura 1 Tipos de transporte a través de la membrana plasmática	4
Figura 2 Modelo de los transportadores facilitativos de hexosas	6
Figura 3 Esquema de absorción de fructosa	10
Figura 4 Función propuesta de la proteína pGlcT en la movilización de almidón	15
Figura 5 DNA y reacción de PCR realizada en <i>D. antarctica</i>	45
Figura 6 RT-PCR realizado con RNA total de <i>D. antarctica</i>	47
Figura 7 Fragmento amplificado por RT-PCR para transformación de las células	49
Figura 8 Fragmentos extraídos del gel de agarosa 1,2%	50
Figura 9 Digestión de plasmidio con EcoRI	51
Figura 10 Secuencia del fragmento obtenido por RT-PCR a partir de RNA total de <i>Deschampsia antarctica</i>	53
Figura 11 Estudio de homología entre el fragmento obtenido por RT-PCR y secuencias génicas conocidas	54
Figura 12 Perfil electroforético de proteínas totales de plantas aclimatadas de <i>Deschampsia antarctica</i>	56
Figura 13 Análisis de Western Blot en proteínas totales e inmunoprecipitada	

	de <i>Deschampsia antarctica</i>	58
Figura 14	Comparación de proteína deducida a partir de cDNA con diferentes proteínas conocidas	60
Figura 15	Esquema de las fases de la fotosíntesis	72

## INDICE DE TABLAS

		<b>Página</b>
Tabla 1	Isoformas de transportadores facilitativos de glucosa, GLUT	8

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	:	albúmina de suero bovino
cDNA	:	DNA complementario
DNA	:	ácido desoxirribonucleico
dNTP	:	desoxinucleótidos 5'-trifosfato
DTT	:	1,4-ditiotreitol
EDTA	:	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	:	ácido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetileter) N,N,N',N'-tetraacético
g	:	aceleración de gravedad
GLUT	:	transportador facilitativo de glucosa
kb	:	kilobases
kDa	:	kiloDalton
MOPS	:	ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfónico
pb	:	pares de bases
PBS	:	tampón fosfato salino
pGlcT	:	translocador de glucosa plastídico
PM	:	peso molecular
PMSF	:	fluoruro de sulfonil fenil metano
RNA	:	ácido ribonucleico

RT-PCR	:	transcripción reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena
SDS	:	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	:	electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes
TAE	:	tampón acetato-EDTA
TBE	:	tampón Tris-Borato-EDTA
TEMED	:	N,N,N',N' -tetrametiletilendiamina
TPT	:	translocador triosa fosfato/3-fosfoglicerato/fosfatasa
Tris	:	tris-hidroximetilamina
Tritón X-100:		octil fenoxi polietoxietanol
U.V.	:	ultravioleta

## 1. RESUMEN

Entre los estrés más comunes que afectan la sobrevivencia y distribución geográfica de las plantas, se encuentran las bajas temperaturas. Ellas afectan sus funciones metabólicas modificando muchas veces desfavorablemente su crecimiento y desarrollo. Esto conduce a un aumento de su resistencia a las bajas temperaturas, fenómeno conocido como aclimatación o endurecimiento. Esta involucra cambios a nivel morfológico, fisiológico o bioquímico, entre los cuales se pueden mencionar cambios cuali y cuantitativos de proteínas, ácidos ribonucleicos, y carbohidratos como sacarosa y fructanos.

Existen sólo dos plantas vasculares que han sido capaces de colonizar territorio antártico. Una de ellas es *Deschampsia antarctica* Desv, la cual es capaz de sobrevivir y desarrollarse a pesar de las condiciones extremas que existen en su hábitat.

Según estudios previos la gran acumulación de sacarosa y fructanos en esta especie sugieren la participación de un transportador facilitativo de fructosa, similar a GLUT5 encontrado en humano.

En este estudio se analizó esta proteína en *Deschampsia antarctica* Desv, y se encontró que la proteína propuesta como un transportador sería una proteína que está asociada a la maquinaria fotosintética, específicamente al fotosistema I en la membrana de cloroplastos.

## SUMMARY

Low temperature is the most important environmental factor that affects geographic distribution and survival of plants, affecting their metabolic function by decreasing growth and development. The exposition of plants to cold temperatures results in an increase of their capacity to resist or tolerate low temperature. This process is known as cold acclimation or cold hardening, which is associated with morphological, physiological and biochemical changes. Among the biological changes, are quantitative and qualitative changes in proteins, ribonucleic acids and increase of certain carbohydrates, sucrose and fructans as well.

There are only two kinds of vascular plants that have been able to colonize the Antarctic territory. One of them corresponds to *Deschampsia antarctica* Desv, which is naturally adapted to survive and develop in the extreme cold conditions that exist on this natural habitat.

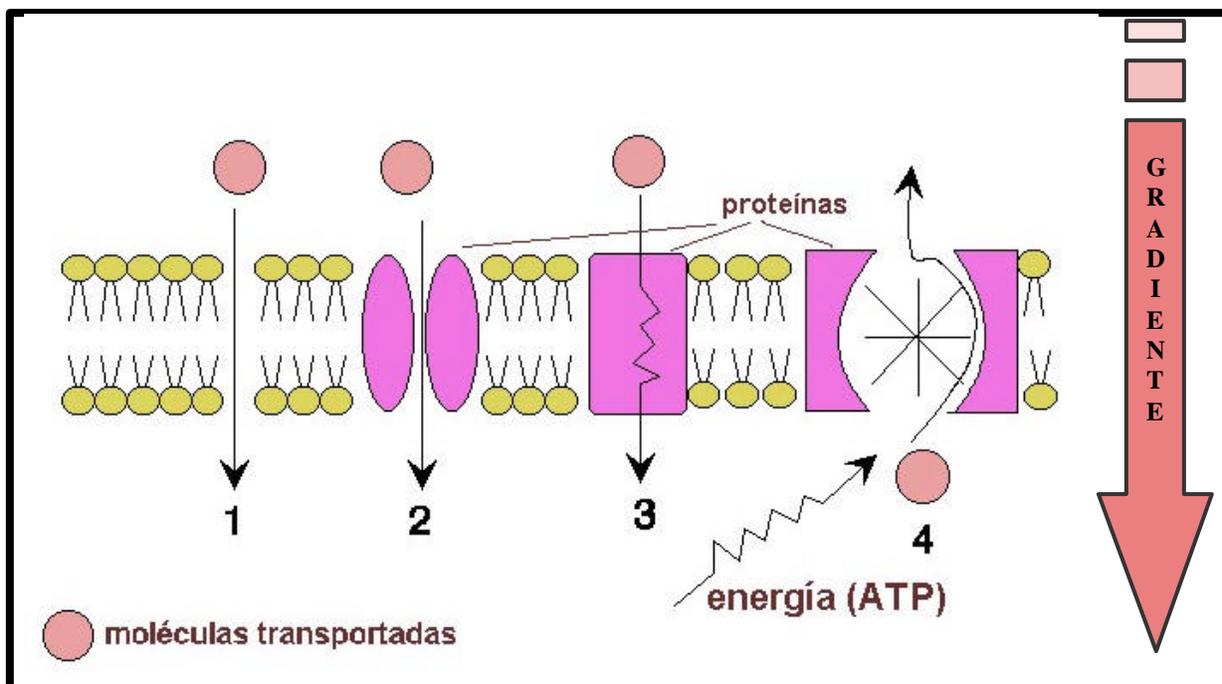
According to previous studies the great sucrose and fructans accumulation in this specie suggests the participation of a facilitative fructose transporter, similar to human GLUT5.

In this study, the protein present in *Deschampsia antarctica* was analyzed, and it was found that the protein proposed as a transporter would be a protein associated to the photosynthetic machinery, specifically to the photosystem I in the chloroplast membrane.

## 2. INTRODUCCION

En la naturaleza, existe gran diversidad de formas de vida, las que, como tal, interactúan con su entorno obteniendo de él los precursores y nutrientes que necesitan para llevar a cabo sus procesos biológicos, asimilando y distribuyéndolos dentro de los compartimentos del organismo. Dentro de estos nutrientes se encuentran las hexosas, las cuales se presentan de variadas formas dependiendo del tipo celular, por ejemplo, como glicógeno en hígado y músculo, como almidón en células vegetales, formando parte de proteínas (glicosilación), o actuando como osmoreguladoras dentro de la célula. Estas hexosas se encuentran altamente distribuidas en los diferentes organismos, sirviendo principalmente como fuente de energía. Es así que se hace tremendamente necesario disponer de este recurso en cualquier momento para satisfacer los requerimientos celulares del organismo.

El transporte de hexosas se realiza mediante dos sistemas, el transporte activo y el pasivo. Las hexosas ingresan hacia el interior de la célula a través de proteínas relacionadas a estos tipos de transporte, entre los cuales destaca el transporte facilitado de hexosas, el cual se realiza sin consumo de energía, a favor de un gradiente de concentración, e independiente de la concentración de sodio (Figura 1). Principalmente debido a estas características

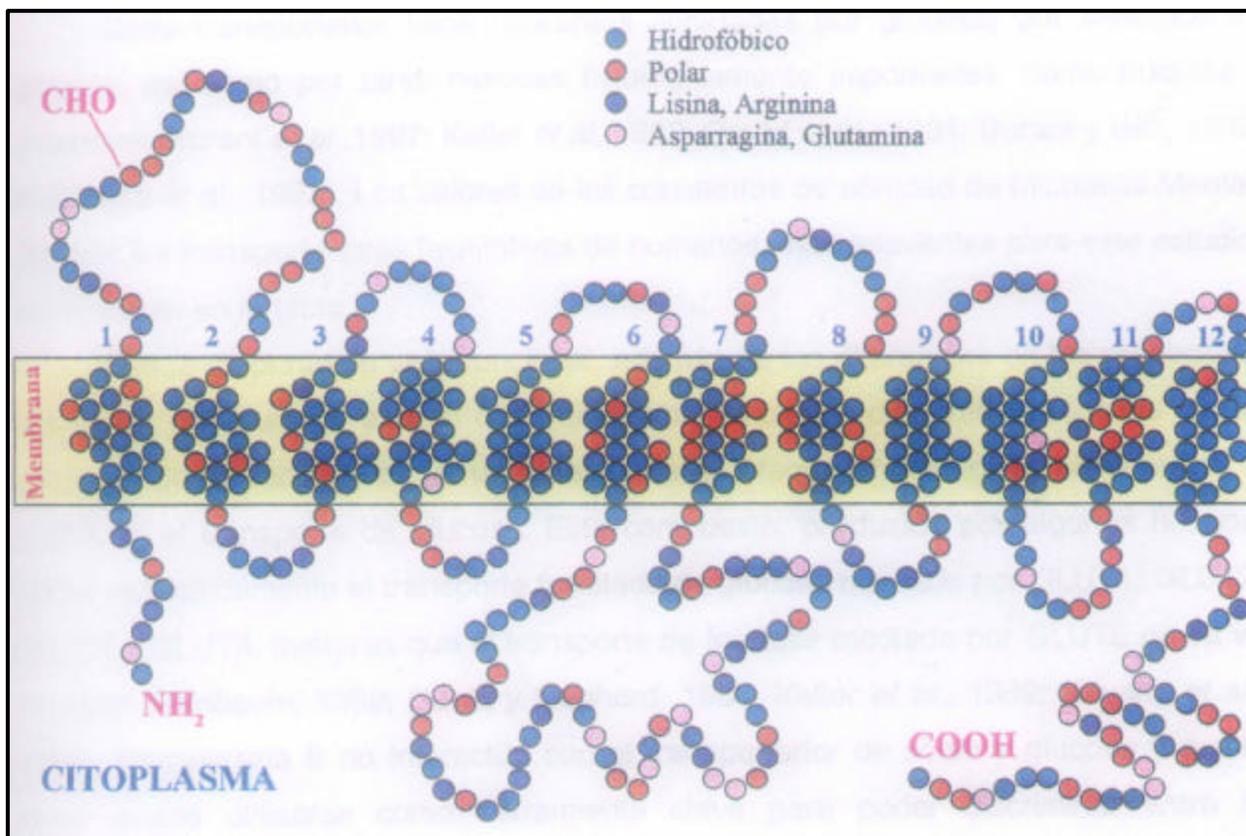


**Figura 1. Tipos de transporte a través de la membrana plasmática.** La figura muestra los tipos de transporte pasivo (1-3) y activo (4). **1**, Difusión simple a través de la bicapa lipídica, las moléculas transportadas atraviesan la membrana a favor de un gradiente de concentración. Este es el caso para hormonas esteroidales, anestésicos como el éter, fármacos liposolubles, sustancia apolares como O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>, algunas polares como el agua, CO<sub>2</sub>, etanol y glicerina. **2**, Difusión simple a través de canales, a través de proteínas de canal con un orificio o canal interno cuya apertura está regulada, por ejemplo por ligando. Así entran iones como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, además de neurotransmisores u hormonas, igualmente a favor de un gradiente de concentración. **3**, Difusión facilitada, permite el transporte a favor de un gradiente de concentración de pequeñas moléculas polares, como aminoácidos y monosacáridos, que requieren de proteínas transmembranas transportadoras o permeasas que al unirse a la molécula sufren un cambio estructural que arrastra la molécula hacia el interior de la célula. **4**, Transporte activo, actúan proteínas de membrana que requieren energía en forma de ATP para transportar las moléculas en contra de un gradiente de concentración. Ejemplo de este último son la bomba Sodio-Potasio y la bomba de Calcio. (Adaptada de Luengo, 2002)

de transporte es que en nuestro laboratorio se ha generado un gran interés por este tipo de transportadores, los cuales se ha determinado que intervienen en el transporte de varios metabolitos y no sólo en el transporte de hexosas.

Estos transportadores pertenecen a una familia conocida como GLUTs, o transportadores facilitativos de glucosa, encontrándose ampliamente distribuidos en seres vivos y expresados de manera característica según tejidos y células, existiendo la posibilidad de expresión de más de una isoforma a la vez. Se ha propuesto un modelo para estos transportadores (Figura 2), el que constaría de 12 dominios de transmembrana muy hidrofóbicos, donde cada dominio tendría aproximadamente 20 – 25 aminoácidos, que atravesarían la membrana plasmática, ubicándose los extremos amino y carboxilo terminal en el interior de la célula (Mueckler *et al.*, 1985).

Se conocen varias isoformas de esta familia presentando cada una de ellas propiedades cinéticas y regulatorias que varían según su función. El transporte es estereoespecífico, permitiendo el transporte de D-glucosa y no de L-glucosa, siendo bidireccional y saturable (Wright, 1993). GLUT1 en humanos se expresa virtualmente en todos los tejidos (principalmente tejido fetal, cerebro y placenta, riñón, músculo cardíaco, adipocitos, fibroblastos, timo, diafragma, vejiga y vena cava) y transporta glucosa con mediana afinidad (Mueckler *et al.*, 1985; Birnbaum *et al.*, 1986; Flier *et al.*, 1987). GLUT2 transporta glucosa con



**Figura 2. Modelo de los transportadores facilitativos de hexosas.** El modelo consta de 12 dominios de transmembrana altamente hidrofóbicos con un sitio de glicosilación entre los segmentos 1 y 2. Los dominios amino y carboxilo terminal se encuentran localizados intracelularmente (Bell et al., 1993, Mueckler et al., 1985, Mueckler, 1994, y Pessin y Bell, 1992).

una baja afinidad y fructosa con afinidad aún más baja, principalmente en hepatocitos, intestino delgado, riñones y en células  $\beta$  del páncreas. GLUT3 posee una alta afinidad por glucosa (mayor que GLUT1), estando presente en todos los tejidos pero expresándose principalmente en cerebro, riñón y placenta de humanos, así como también en cerebro de rata, ratón y conejo. GLUT4 corresponde a la isoforma que transporta glucosa en respuesta a los estímulos de insulina, localizándose en tejidos de alto consumo de glucosa como el tejido adiposo y los músculos cardíaco y esquelético (Ziel *et al.*, 1988; Marshall *et al.*, 1993; Ren *et al.*, 1993). La isoforma GLUT5 transporta sólo fructosa localizándose abundantemente en espermatozoides humanos (Shepherd *et al.*, 1992; Mantych *et al.*, 1993), sobreexpresándose en células tumorales (Dropelmann, 1997), en granos de polen germinados y sin germinar (Valenzuela, 1997) y en eritrocitos humanos (Concha *et al.*, 1997). GLUT8 presenta una secuencia significativamente similar a GLUT1 con un 29,4% de identidad. Descrito recientemente, transporta glucosa, aunque, no se descarta la posibilidad de que transporte otras hexosas, siendo necesarios mayores estudios para definir su sustrato específico. Se expresa abundantemente en diferentes tejidos que metabolizan la glucosa como cerebro, músculo, riñón, hígado y testículo (Doege *et al.*, 2000; Weber, 2001). En los últimos años se han descrito nuevas isoformas de este tipo de transportadores, de los cuales aún no se han determinado totalmente sus propiedades y características cinéticas (Tabla 1).

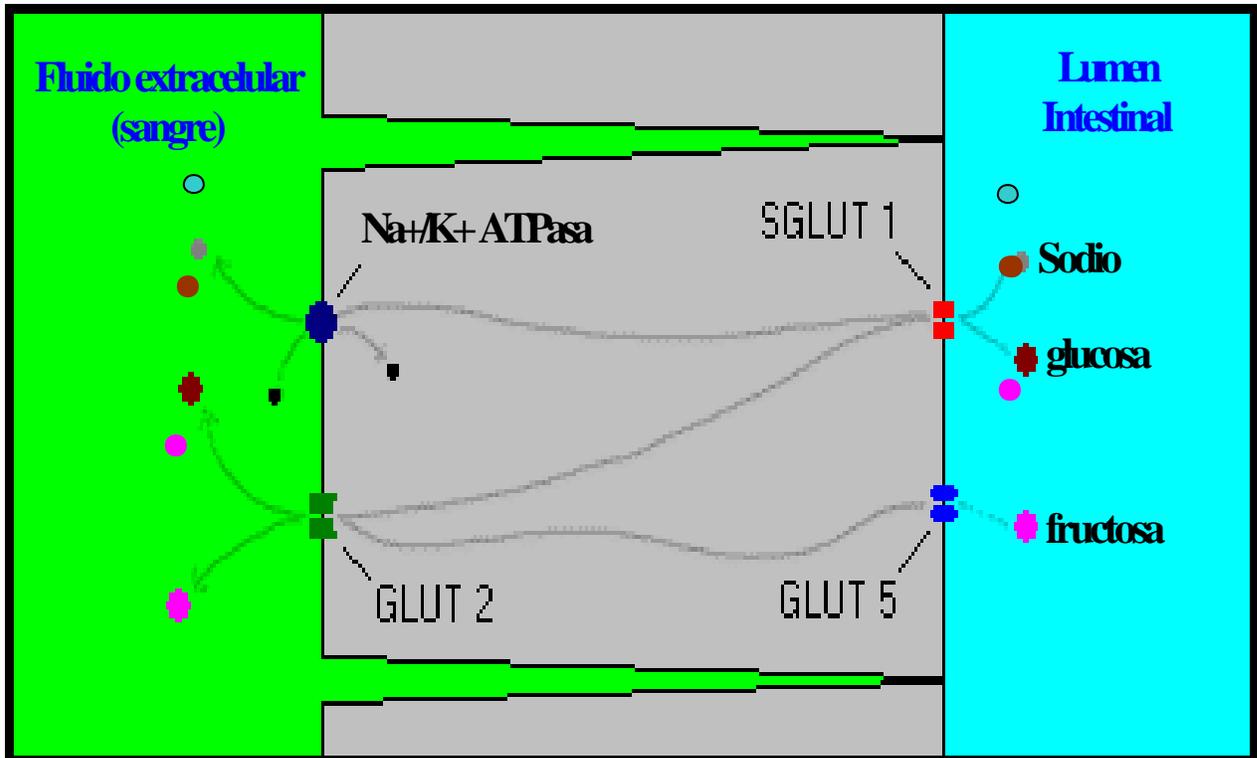
<b>Transportador</b>	<b>Principal sitio de expresión</b>	<b>Características</b>
<b>GLUT1</b>	Todos los tejidos (abundante en cerebro y eritrocitos)	Absorción basal. Transporta glucosa (alta afinidad) y galactosa, no fructosa. Expresado en muchas células. Km = 16,9 - 26,2 mM para 3-O-metilglucosa.
<b>GLUT2</b>	Hígado, células beta pancreáticas, intestino delgado, riñón, retina.	Transporta glucosa, galactosa y fructosa. Una baja afinidad, alta capacidad transporte de glucosa; sirve como un "sensor de glucosa" en células beta pancreáticas. Km = 40 mM para 3-O-metilglucosa y 67 mM para fructosa.
<b>GLUT3</b>	Cerebro, placenta y testículo	Transporta glucosa (alta afinidad) y galactosa, no fructosa. Es el transportador de glucosa primario para neuronas. Suplementa a GLUT1 en tejidos con alta demanda energética. Km = 10,6 mM para 3-O-metilglucosa.
<b>GLUT4</b>	Músculo esquelético y cardíaco, adipocitos	El transportador de glucosa sensible a insulina. Alta afinidad por glucosa. Km = 1,8 - 4,8 mM para 3-O-metilglucosa.
<b>GLUT5</b>	Intestino, espermio, testículo, riñón, eritrocitos	Transporta fructosa, pero no glucosa o galactosa. Presente también en cerebro, adipocitos y músculo. Km = 6 mM.
<b>GLUT6</b>	Bazo, leucocitos, cerebro	N/D
<b>GLUT7</b>	Hígado	N/D
<b>GLUT8</b>	Cerebro, músculo, riñón, hígado y testículo.	De secuencia similar a GLUT1 (29,4% de identidad). Transporta glucosa. Descrito recientemente, no se descarta transporte de otras hexosas.
<b>GLUT9</b>	Hígado, riñón	N/D
<b>GLUT10</b>	Hígado, páncreas	N/D
<b>GLUT11</b>	Corazón, músculo	N/D
<b>GLUT12</b>	Corazón, próstata	N/D

**Tabla 1. Isoformas de transportadores facilitativos de glucosa, GLUT.** Distintas isoformas de proteína GLUT, características de transporte y distribución por tejidos. (Modificada de Silverman, 1991, Thorens, 1993, y Medina & Owen 2002)

En el hombre, además de glucosa, otra principal fuente de azúcar en la dieta es la fructosa; sin embargo, diferente a glucosa, la absorción de fructosa desde el lumen intestinal toma lugar vía el transportador facilitativo de GLUT5 (Figura 3), y el nivel sanguíneo circulante de este azúcar es considerado más bajo (Darakhshan *et al.*, 1998).

Según Darakhshan *et al.* (1998), GLUT5 de rata y humano están localizados en la superficie de membranas de músculo esquelético y tejido adiposo, debido a que vesículas sarcolemas preparadas de músculo de rata exhiben ingreso de fructosa que no es inhibible con Citocalasina B. Estas observaciones niegan la posibilidad de que la expresión de GLUT5 en músculo esquelético humano y tejido adiposo pueda ser un fenómeno relacionado a la especie.

En las plantas los carbohidratos cumplen las mismas funciones que en organismos animales y muchas de las vías de metabolización son muy similares, siendo utilizados como fuente de carbono para la síntesis de variados compuestos. Las plantas poseen además un sistema eficiente de transporte a través del plasmalema para la distribución de estos azúcares, desde los tejidos *source* (hojas) hacia los tejidos *sink* (partes no verdes la planta). Además este transporte de azúcares ocurriría también en sistemas endomembranosos como cloroplastos y vacuolas.



**Figura 3. Esquema de absorción de fructosa.** Se muestra la forma en que fructosa sería absorbida en el lumen intestinal por medio del transportador facilitativo de hexosas GLUT5 comparada con la absorción de glucosa (Silverman, 1991, y Wright, 1993).

En plantas el carbono fijado durante el día es exportado desde los cloroplastos en la forma de triosa fosfato por el translocador triosa fosfato/3-fosfoglicerato/fosfatasa (TPT), y convertido en sacarosa en el citosol. Una cantidad considerable de este carbono fijado es mantenido en los cloroplastos y convertido en almidón transitorio. Este puede ser degradado posteriormente por la vía fosforolítica, pero existe evidencia de que la vía dominante es la amilolítica conduciendo a la formación de azúcares libres, como glucosa (Weber *et al.*, 2000).

Investigaciones recientes de Weber *et al.* (2000) acerca del transporte de glucosa en los cloroplastos han permitido identificar un translocador de glucosa plastídico (pGlcT) como un componente de la membrana interna del cloroplasto, el que sería responsable del transporte de hexosas provenientes de la degradación amilolítica del almidón transitorio. Esta proteína de membrana presenta una  $K_m$  para glucosa de 19,3 mM, una  $V_{max}$  de 519  $\mu\text{mol}$  de glucosa por mg de clorofila por hora, y posee una masa molecular aparente de 43 kDa. Además es inhibida por la acción conjunta de DTT y reactivos sulfhidrilos como NEM, y que según la nomenclatura sugerida por Saier (1998), pertenece a la familia portadora de azúcar que es parte de la superfamilia facilitadora.

La proteína pGlcT posee una secuencia peptídica ubicada al extremo carboxilo terminal que sirve para identificar clones en bibliotecas

genómicas de diferentes especies, pero ninguno de los clones encontrados en éstas codificó la proteína completa.

La comparación de la secuencia proteica de pGlcT reveló similitud con un transportador de azúcares putativo presente en durazno, con transportadores de hexosa de mamíferos y bacterias, y con transportadores de hexosa presentes en membrana plasmática de plantas (Weber *et al.*, 2000). El extremo amino terminal de esta proteína no mostró regiones de homología con otros transportadores de hexosa, pero posee una secuencia de señalización para plastidio (Emanuelsson *et al.*, 1999). El sitio de corte del péptido tránsito se predice estaría ubicado entre los residuos 85 y 86 de la proteína precursora de pGlcT.

Las similitudes entre los pGlcTs de plantas y miembros de la familia GLUT humana comienza alrededor de 20 residuos corriente arriba del sitio de procesamiento putativo (Weber *et al.*, 2000).

Henderson *et al.* (1991) reportaron que un motivo repetido [RK]XGR[RK] en el loop que conecta las hélices 2 y 3, así como en las hélices 8 y 9, es una característica compartida por los facilitadores de azúcar de eucariotes y bacterias. En pGlcTs de plantas, este motivo está conservado en el loop que conecta las hélices 8 y 9, mientras que el segundo motivo incluye un residuo de treonina insertado en frente del último residuo básico: [RK]XGRT[RK] (Weber *et al.*, 2000).

La unión de citocalasina B a GLUT1 requiere la presencia de dos residuos triptófano (Trp-388 y Trp-412) y un motivo Asn-Trp en la hélice 11. En la familia pGlcT de planta, el residuo correspondiente a Trp-388 está reemplazado por una alanina (Ala-467), y un residuo de histidina (His-490) reemplaza la asparagina del motivo GLUT1 Asn-Trp.

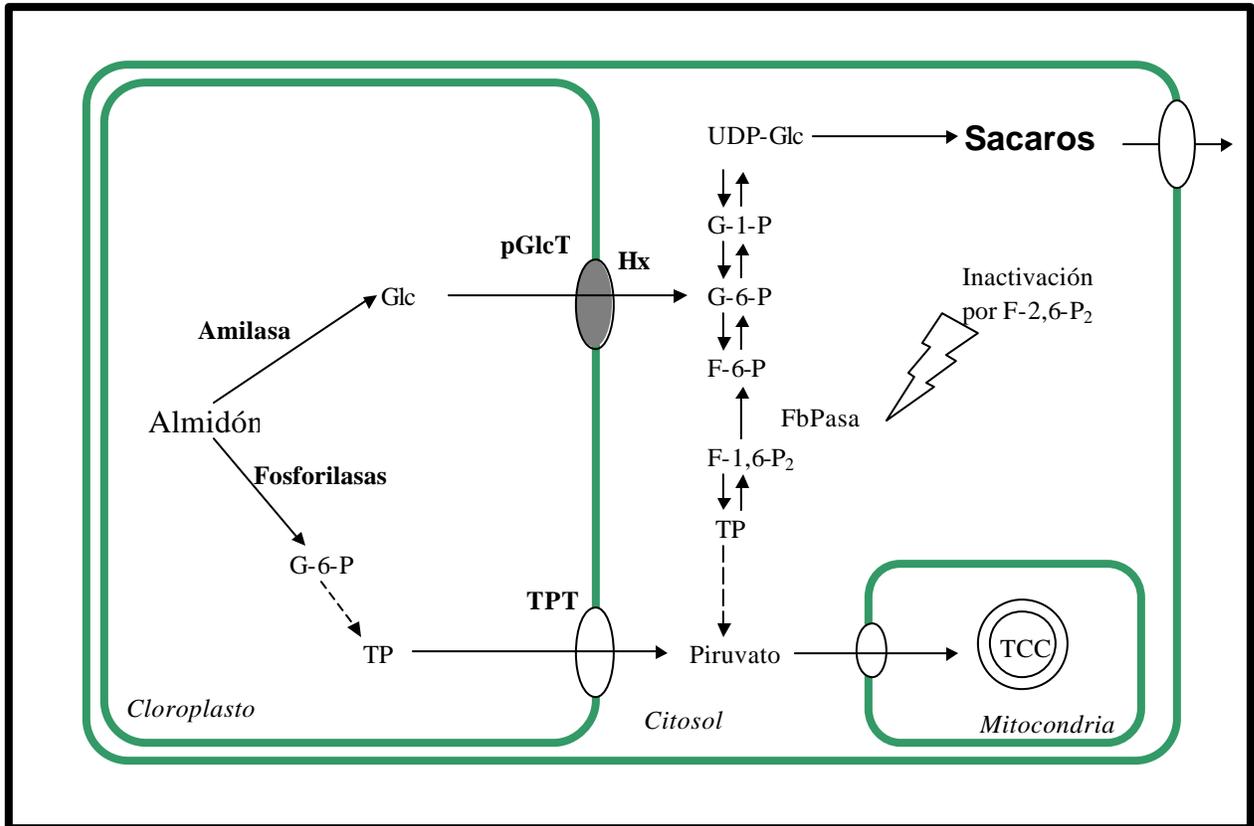
El filtro de selectividad de todos los miembros glucosa específicos de la familia GLUT humana (GLUT1, GLUT3 y GLUT4) reside en la hélice 7 y contiene un motivo QLSQQLS altamente conservado. En la familia pGlcT de plantas, este motivo es FLFQQ[LMF]A. Los transportadores de hexosa que pierden este motivo QLS también transportan fructosa (Walmsey *et al.*, 1998).

pGlcT es una proteína muy hidrofóbica y el análisis de distribución de hidrofobicidad revela la presencia de 12 regiones de transmembrana, agrupadas en dos pares de seis segmentos que atraviesan la membrana separadas por un loop de aproximadamente 60 residuos aminoacídicos. Los extremos amino y carboxilo terminal de pGlcT están expuestos hacia el lado citosólico de la membrana interna, esta topología de membrana se parece a la de los transportadores de hexosa de membrana (Weber *et al.*, 2000). Estudios realizados por estos últimos autores suponen que la membrana externa del cloroplasto es libremente permeable a solutos de masa molecular sobre varios kiloDalton; sin embargo, el reciente descubrimiento de proteínas tipo canal en esta membrana, que son específicas para ciertos metabolitos, abre la posibilidad

de que la membrana externa pueda tener algún control sobre los tipos de moléculas que se mueven tanto hacia dentro como fuera del cloroplasto (Pohlmeyer *et al.*, 1997).

La probable función fisiológica del pGlcT es catalizar el eflujo de glucosa derivada de la degradación amilolítica del almidón transitorio formado en los cloroplastos durante la fotosíntesis, pudiendo ser necesario un pronunciado gradiente de concentración entre estroma y citosol para obtener altas tasas de transporte de glucosa. Luego, para ser exportada del cloroplasto, glucosa es convertida a glucosa-6-fosfato por una hexoquinasa localizada en la membrana interna del cloroplasto (Wiese *et al.*, 1999) para mantener así un alto gradiente que favorezca la acción del pGlcT. Ambas proteínas, transportador y hexoquinasa, son claves en el proceso de degradación amilolítica de almidón (Figura 4; Weber *et al.*, 2000).

Por otra parte, la adaptación de las plantas a las condiciones del ambiente también involucra la participación de estos azúcares producidos durante la fotosíntesis. En plantas que habitan en regiones frías australes existiría un mecanismo de adaptación a las temperaturas bajas adversas. Plantas que resisten o toleran las temperaturas bajas son capaces de sobrevivir en estos ambientes fríos, debido a que presentan mecanismos de adaptación que les permiten tolerar heladas o congelación de los tejidos. La tolerancia a las bajas temperaturas puede aumentarse si las plantas son sometidas a temperatu-



**Figura 4. Función propuesta de la proteína pGlcT en la movilización de almidón en planta.** La glucosa de la degradación de almidón es exportada desde el cloroplasto por pGlcT y subsecuentemente convertida a Glc-6-fosfato (G-6-P) por una hexoquinasa (HxK) que está localizada en la membrana interna del cloroplasto. Glucosa-6-fosfato es trasladada al sitio de síntesis de sacarosa, mientras que triosa fosfato que resulta de la degradación fosforolítica del almidón es dirigido a la glicólisis. F-6-P, fructosa-6-fosfato; F-1,6-P<sub>2</sub>, fructosa-1,6-bisfosfato; F-2,6-P<sub>2</sub>, fructosa-2,6-bisfosfato; FbPasa, fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa; G-1-P, glucosa-1-fosfato; TCC, ciclo de los ácidos tricarbóxicos; TP, triosa fosfato; TPT, traslocador triosa fosfato/3-fosfoglicerato/fosfatasa (Weber et al., 2000).

ras no congelantes entre 0 y 10 °C, lo cual es conocido como aclimatación.

Esta aclimatación al frío involucra cambios estructurales, fisiológicos, bioquímicos y moleculares, como son el incremento de carbohidratos, proteínas, modificación de actividades enzimáticas y cambios de tipo y concentración de lípidos de membrana (Triviño, 1998).

Se sugiere también que la aclimatación al frío involucraría cambios en la expresión de ciertos genes en la célula, lo que provocaría una síntesis de nuevas proteínas que no estarían presentes antes de la aclimatación (Triviño, 1998).

La crioprotección otorgada por azúcares es cualitativamente menor que la otorgada por las proteínas, pero, en el primer caso el efecto cuantitativo logrado es mayor debido a la cantidad de azúcares presentes en relación a las proteínas.

Entre estos azúcares, se encuentran carbohidratos totales no estructurales como sacarosa (glucosa-fructosa), rafinosa y fructanos, los cuales serían almacenados en vacuolas de hojas y tallos, pudiendo actuar como osmoreguladores fijando agua presente en el interior de la célula.

Los fructanos son polímeros solubles de fructosa, consistentes en una serie de oligo y polisacáridos no reductores conteniendo cada fructano una molécula de glucosa móvil por cadena. Funcionan como el principal almacenaje de carbohidratos en el 15% de las plantas que florecen, incluyendo muchos

cultivos económicamente importantes. Los fructanos también juegan un rol en la osmorregulación durante sequías y pueden actuar como protectores contra deshidratación infringida por la sequía o congelamiento. A pesar de las importantes funciones y amplia distribución de oligofructanos en plantas que florecen, virtualmente no hay información disponible concerniente al transporte de oligofructanos en plantas superiores (Triviño, 1998).

La acumulación de estos fructanos ha sido asociada con respuestas de aclimatación en ciertas plantas a las bajas temperaturas.

Estudios realizados en nuestro laboratorio por Triviño (1998) y Weber (2001) indican que existiría un transportador de hexosas, del tipo facilitativo en *Deschampsia antarctica*, asociado a esta respuesta al frío, el cual podría ser GLUT5, ya que se ha caracterizado una proteína muy similar a este transportador tanto en masa molecular como en propiedades cinéticas.

**Con estos antecedentes se postula la hipótesis de que la proteína parcialmente caracterizada en *Deschampsia antarctica* se trata de GLUT5 humano, y para comprobar esto se hace necesario saber más acerca de la secuencia nucleotídica y de la composición aminoacídica deducida de parte del gen que codifica esta proteína presente en *Deschampsia antarctica* para así compararla con las correspondientes a GLUT5 humano y efectivamente saber si se trata de la misma proteína, o en**

**caso contrario, averiguar el grado de homología existente entre ambas, y con otras proteínas.**

Los objetivos específicos para probar esta hipótesis son:

Identificar mediante PCR un segmento del extremo 3' del gen que codifica la proteína en *Deschampsia antarctica*.

Identificar mediante RT-PCR un cDNA correspondiente al extremo 3' del gen GLUT5 en *Deschampsia antarctica*.

Secuenciar parte del extremo 3' del gen que codifica la proteína similar al transportador facilitativo de fructosa GLUT5 en *Deschampsia antarctica*.

Evaluar el grado de homología existente entre el gen de GLUT5 humano y el gen de la proteína encontrada en *Deschampsia antarctica*.

Inmunodetectar la proteína GLUT5 en *Deschampsia antarctica*.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Material biológico

Se trabajó con plantas adultas de la especie *Deschampsia antarctica*, clima polar, creciendo a 13°C (Triviño, 1998). La planta fue sometida a fotoperíodos de 16/8 horas día/noche y fue sembrada en mezcla de tierra de hoja y turba, regada periódicamente con agua destilada y una vez por semana con solución nutritiva de phostrogen al 0,12%.

*Deschampsia antarctica* es una gramínea que ha sido capaz de colonizar en forma natural la Región Polar Antártica. Crece en forma radial, en cuyo caso se obtienen nuevas plantas por partición de una planta adulta abundante en hojas en dos o más plantas “hijas”, las que deben crecer para alcanzar estado adulto antes de cosecharlas para su estudio, lo cual se logra en aproximadamente un mes de crecimiento luego de su traspaso a una nueva maceta. La cosecha de la planta se llevó a cabo dos horas después de comenzada la fase luminosa del fotoperíodo. Las hojas fueron cortadas, pulverizadas en presencia de nitrógeno líquido y sometidas a los diferentes métodos de extracción, dependiendo del tipo de material a aislar.

### 3.1.2 Reactivos

De **Sigma Chemical Co.** se obtuvieron los siguientes reactivos: agarosa, bromuro de etidio, azul de bromofenol, DTT, MOPS, persulfato de amonio, SDS, TEMED, xilencianol, acrilamida, bisacrilamida, Trisma base, BSA, 2-mercaptoetanol, glicina, azul de Coomassie, Triton X-100.

De **Merck, Darmstadt** se obtuvo: acetona, etanol absoluto, ácido acético glacial, ácido clorhídrico, formaldehído, glicerol, cloroformo, formamida, hidróxido de potasio, fosfato de potasio, carbonato de sodio, carbonato ácido de sodio, fosfato ácido de potasio, fosfato diácido de potasio, cloruro de calcio dihidratado, cloruro de sodio, Tween 20, hidróxido de sodio, EDTA, BSA, PMSF, cloruro de potasio, alcohol isoamílico, alcohol isopropílico, tiocianato de guanidinio, etanol.

Las membranas de nitrocelulosa Hybond C (poro 0,45  $\mu\text{m}$ ) fueron obtenidas de **Amersham International plc**, al igual que los marcadores de peso molecular "Rainbow <sup>TM</sup>" coloreados para proteínas.

De **Boehringer Mannheim GmbH** se utilizó Leupeptina y Aprotinina.

De **East Acres Biologicals, Southbridge, Ma** se obtuvo el anticuerpo policlonal anti-GLUT5 humano dirigido contra una secuencia peptídica ubicada en el extremo carboxilo terminal.

De **Gibco Laboratories Life Technologies, Inc.** se obtuvo anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa, estándar de masa molecular de proteínas (200-14,3 kDa), marcador de tamaño molecular de DNA de 100 pb, DNA polimerasa (Taq polimerasa), cloruro de magnesio, tampón 10X para enzima Taq polimerasa.

De **Sudelab** se obtuvo ácido acético, alcohol isopropílico, etanol, y metanol, todos de grado técnico.

De **Biosonda S.A.** se obtuvo partidorentido (5'CTGCTGGGC TTCTCCATCTG3') y el partidore antisentido (5'CTGTTCCGAAGTGACAGG TGAAGCTCTTTCAGTTCCTCC3') correspondiente a la región complementaria al extremo 3' del mRNA del transportador de hexosas GLUT5 humano.

De **Clontech Laboratories, Inc.** se obtuvo RNA de testículo humano.

Se utilizó el siguiente equipo: centrífuga Eppendorf refrigerada 5417-R, espectrofotómetro Shimadzu UV-260, pHmetro, fuente de poder EPS 250 de Scientific Company, agitador magnético IKAMAG<sup>®</sup> RCT, agitador orbital Lab-Line Orbit Environt Shaker de Lab Line Instrument Inc., balanza Precisa 180A, sistema de electroforesis y transferencia Mini Protean II y Mini Trans Blot de BioRad, Freezer a -70°C Forma Scientific Bio-freezer 8425, freezer a -20°C y refrigerador Fensa.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Extracción de DNA de Plantas

El DNA de planta se extrajo utilizando el método descrito por Dellaporta et al. (1983), con algunas modificaciones.

Tomar sobre 0,4 gr. de planta, molerla en presencia de nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino, agregar 750  $\mu$ l de tampón de extracción (Tris 100 mM, pH 8,0; EDTA 50 mM; NaCl 500 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM) y mezclar agitando vigorosamente. Agregar luego 50  $\mu$ l de SDS 20%, mezclar por inversión varias veces e incubar a 65°C por 30 minutos (originalmente 10 minutos, pero tiempos largos de incubación resultan en sobrenadantes más claros). Agregar luego 250  $\mu$ l de acetato de potasio 5 M, mezclar por inversión varias veces e incubar en hielo por 20 minutos. Centrifugar a 4°C por 20 minutos a 4.000 xg, y transferir el sobrenadante (~ 900  $\mu$ l) a un tubo limpio que contenga 0,6 volúmenes (~ 540  $\mu$ l) de isopropanol frío, mezclar por inversión varias veces y mantener incubando a -20°C toda la noche.

Una vez incubado, centrifugar a 5.000 xg por 10 minutos a 4°C para precipitar el DNA. El sobrenadante es eliminado y el sedimento secado al aire. Disolver el sedimento en 400  $\mu$ l de tampón TE (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH

8.0), centrifugar 10 minutos a 5.000 xg para eliminar contaminantes, transferir el sobrenadante limpio a un nuevo tubo limpio y agregar 0,1 volúmenes (~40  $\mu$ l) de acetato de sodio 3M (pH 5.0) y 2 volúmenes (~800  $\mu$ l) de etanol 95%, mezclar bien por inversión y centrifugar a 5.000 xg por 3 minutos.

El precipitado obtenido lavarlo con etanol 70% frío y centrifugar 30 segundos a 4°C para remover el sobrenadante. Secar el sedimento al aire y finalmente disolver el DNA en 100 $\mu$ l de agua destilada desionizada estéril y UV irradiada.

### **3.2.2 Cuantificación de muestras de DNA**

Para cuantificar el DNA se diluye la muestra extraída 100 veces y se cuantifica a 260 nm, calculándose la cantidad de DNA tomando como referencia que una unidad de absorbancia corresponde a una concentración de DNA de doble hebra de 50  $\mu$ g/ml. Además se determinó la razón de absorbancia a 260 nm y 280nm para evaluar el grado de pureza o contaminación con proteínas en la muestra. Se tomó como aceptable un valor de 1,8 para esta razón, siendo descartadas las muestras que diferían demasiado de este valor.

### 3.2.3 Electroforesis de DNA en geles de Agarosa

El DNA extraído se analizó en un gel de agarosa al 0,8% utilizando tampón TBE 0,5X (Tris 0,0445 M, ácido bórico 0,0445 M y EDTA 0,001 M, pH 8,3) o TAE 1X (Tris acetato 40 mM, pH 8,3, EDTA 1 mM). La muestra fue tratada con tampón de carga (TBE 0,5X o TAE 1X, formamida 25%, glicerol 5%, azul de bromofenol 0,01mg/ml y xilencianol 0,01 mg/ml) y la corrida electroforética se realizó a 70-75 mA por aproximadamente 1 hora y el DNA se visualizó agregando al gel bromuro de etidio en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 1,5 mg/ml.

### 3.2.4 Análisis de PCR

El DNA aislado se analizó mediante la técnica de la polimerasa en cadena. Para esto, en tubos Eppendorf de 0,6 ml se realizó la siguiente mezcla de reacción: 30  $\mu$ l de agua estéril, 10  $\mu$ l de tampón de amplificación 10X, 5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  50 mM, 16  $\mu$ l de mezcla de dNTPs (cada uno a 1,25 mM), 5  $\mu$ l de primer sentido (extremo 3', 20 MER, CTGCTGGGCTTCTCCATCTG) conteniendo 50 pmoles, 5  $\mu$ l de primer antisentido conteniendo 50 pmoles (extremo 3', 40 MER, GGAGGAACTGAAAGAGCTTCCACCTGTCACTTCGGA ACAG), 0,3 a 1,0  $\mu$ g de templado de DNA, se completó a 100  $\mu$ l con agua estéril y se agregó 0,5  $\mu$ l de

enzima Taq Polimerasa (5 unidades/ $\mu$ l), cubriendo la mezcla con 100  $\mu$ l de vaselina estéril.

Se calcula la  $T_m$  de los partidores en base a la fórmula:

$$T_m = 81,5^\circ C + 16,6 \times (\log [NaCl]) + 0,41 (\% [G + C]) - \frac{675}{N^\circ \text{ bases}}$$

Posterior a esto se comenzó con la reacción de polimerización en termociclador como sigue: incubación inicial a 94°C por 5 minutos para desnaturar el DNA, incubación a 53°C por 1,5 minutos y luego a 72°C por 1 minuto. Luego se realizan 33 ciclos de desnaturación, alineamiento y extensión, con tiempos de 1 minuto, 1,5 minutos y 1 minuto, respectivamente. Las temperaturas de desnaturación, alineamiento y extensión utilizadas fueron de 94°C, 53°C y 72°C. Finalmente se terminó con un ciclo final de 1 minuto a 94°C, 1,5 minutos a 53°C y 10 minutos a 72°C, para permitir la extensión de las cadenas incompletas.

Los productos amplificados fueron observados en geles de agarosa al 1,2% en tampón de TBE 0,5X (o TAE 1X), utilizando 15  $\mu$ l del volumen de reacción.

### 3.2.5 Extracción de RNA en plantas

El RNA total de planta fue extraído utilizando el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Todo el proceso se lleva a cabo incubando la muestra en hielo.

Se tomó aproximadamente 100 mg de hojas de planta fresca y se homogeneizaron con 500  $\mu$ l de solución de homogeneización (tiocianato de guanidinio 4 M; citrato de sodio 25 mM, pH 7,0; sarcosil 0,5%;  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 M), luego se adicionó 50  $\mu$ l de acetato de sodio 2 M (pH 4,0), 500  $\mu$ l de fenol saturado en agua y 100  $\mu$ l de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1), y se agitó vigorosamente. Luego se centrifugó a 10.000  $xg$  por 20 minutos a 8°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo estéril para agregarle 500  $\mu$ l de solución de homogeneización (tiocianato de guanidinio 4 M; citrato de sodio 25 mM, pH 7,0; sarcosil 0,5%;  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 M), luego se adicionó 50  $\mu$ l de acetato de sodio 2 M (pH 4,0), 500  $\mu$ l de fenol saturado en agua y 100  $\mu$ l de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) y se agitó vigorosamente para luego centrifugar a 10.000  $xg$  por 20 minutos a 8°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo estéril. En la fase acuosa resultante se precipitó el RNA agregando un volumen de isopropanol frío e incubando por 12 horas a -20°C. Luego de esto se centrifugó a 10.000  $xg$  por 30 minutos para descartar el sobrenadante y

resuspender el sedimento en 500  $\mu\text{l}$  de agua estéril. Una vez resuspendido el sedimento se adicionó 500  $\mu\text{l}$  de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) y se agitó vigorosamente por 1 minuto para luego incubar 5 minutos a  $0^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó a 15.600  $\times g$  durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para posteriormente trasvasijar la fase acuosa a otro tubo estéril y adicionar 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 2,5 volúmenes de etanol frío, dejándose precipitar durante 12 horas a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se centrifugó a 15.600  $\times g$  por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y el sedimento se lavó con etanol 75% frío para después secar al aire y resuspender en 50  $\mu\text{l}$  de agua desionizada estéril.

### **3.2.6 Cuantificación de las muestras de RNA**

Para cuantificar el RNA se diluyó una alícuota de la muestra obtenida y se procedió a leer su absorbancia a 260 nm. Una medición a 280 nm se realizó para observar la contaminación con proteínas y para el cálculo de la razón 260/280. Una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a una concentración de 40  $\mu\text{g/ml}$  de RNA.

### 3.2.7 Electroforesis de RNA en geles de agarosa

La visualización del RNA se realizó por medio de una electroforesis en agarosa al 1,2% en condiciones desnaturantes (formaldehído), preparando el gel en tampón MOPS 1X (MOPS 20 mM, pH 7,0; acetato de sodio 5 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0), formaldehído 2,2 M y solución de tinción de bromuro de etidio 1,5  $\mu\text{g/ml}$ . Las muestras con el tampón de carga (MOPS 1X, formamida 25%, glicerol 5%, formaldehído 2,2 M, azul de bromofenol 0,01 mg/ml y xilencianol 0,01 mg/ml) se incuban a 65°C por 5 minutos y se dejan enfriar antes de cargarlas en el gel.

La electroforesis fue llevada a cabo a 30 mA por 1,5 horas, y una vez que el frente migró 2/3 del gel se detuvo y observó en un transluminador UV.

### 3.2.8 Reacción de Transcripción Reversa

Incubar 5  $\mu\text{g}$  de RNA total junto con 100 pmoles de partidor antisentido a 72°C por 10 minutos, luego de esto se mantiene la mezcla en hielo 2 minutos y se centrifuga por 1 minuto, adicionar 4  $\mu\text{l}$  de tampón de la enzima RT 5X, 2  $\mu\text{l}$  de DTT 0,1 M, 2  $\mu\text{l}$  de mix de dNTPs 10 mM, 2  $\mu\text{l}$  de agua estéril y 1  $\mu\text{l}$  de la enzima transcriptasa reversa, incubar la mezcla por una hora a 42°C en el termociclador.

### **3.2.9 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)**

Tomar 5  $\mu$ l del producto obtenido en el punto 3.2.8 y agregar en forma secuencial 10  $\mu$ l de tampón 10X de la enzima Taq DNA Polimerasa, 3 $\mu$ l de  $MgCl_2$  50 mM, 2  $\mu$ l de Mix de dNTPs 10 mM, 100 pmoles del partidor sentido, 80  $\mu$ l de agua estéril y 0,5  $\mu$ l de la enzima Taq DNA Polimerasa. Sellar la mezcla con 100  $\mu$ l de vaselina estéril y desnaturarla en termociclador por 5 minutos a 100°C, luego iniciar la amplificación usando ciclos de 1 minuto a 94°C, 1,5 minutos a 55°C y 1 minuto a 72°C. Finalmente realizar una extensión final de 5 minutos a 72°C.

El producto obtenido es visualizado en un gel de agarosa al 1,2%.

### **3.2.10 Extracción de fragmento amplificado por RT-PCR desde gel de agarosa**

Se utilizó el Sistema de extracción de geles proporcionado por GibcoBRL (Concert Gel Extraction Systems).

Cortar el área del gel que contiene el fragmento de DNA amplificado de interés usando una hoja de afeitar limpia. Minimizar la cantidad de agarosa cortada junto al fragmento, tratando de pesar aproximadamente 400 mg de gel

en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Agregar 30  $\mu$ l de tampón de solubilización por cada 10 mg de gel, e incubar a 50 °C por 15 minutos, mezclando cada 3 minutos para asegurar la disolución del gel. Una vez disuelto el gel incubar el tubo por 5 minutos más y colocar en un spin cartridge del kit (tubo abierto en el fondo que posee un filtro en forma de lana de vidrio) dentro de un tubo de lavado de 2 ml. Pipetear la mezcla con el gel disuelto obtenido anteriormente dentro del spin cartridge, centrifugar a 12.000  $xg$  por un minuto, y descartar el filtrado.

Colocar el spin cartridge en otro un tubo de lavado de 2 ml limpio, adicionar 500  $\mu$ l de tampón de solubilización, incubar a temperatura ambiente por un minuto y luego centrifugar a 12.000  $xg$  por 1 minuto. Descartar el filtrado.

Colocar el spin cartridge de nuevo en un tubo de lavado de 2 ml limpio, adicionar 700  $\mu$ l de tampón de lavado, incubar por 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugar a 12.000  $xg$  por un minuto y descartar el filtrado. Centrifugar nuevamente por un minuto para eliminar el tampón de lavado residual.

Colocar el spin cartridge en un tubo de recuperación de 1,5 ml, adicionar 50  $\mu$ l de Tampón TE precalentado a 65 - 70 °C directamente al centro del spin cartridge, incubar por un minuto a temperatura ambiente y centrifugar a 12.000  $xg$  por 2 minutos. Recuperar el filtrado que contiene el DNA y almacenarlo a -20 °C.

### **3.2.11 Ligación del fragmento aislado a un vector de expresión**

Se utilizó el sistema de ligación proporcionado por Promega (pGEM®-T Easy Vector System).

Mezclas de reacción se prepararon conteniendo, para el tubo de control positivo, 5 µl de tampón de ligación rápido 2X para la enzima T4 DNA ligasa, 1 µl de pGEM®-T Easy Vector (50 ng), 1 µl de T4 DNA ligasa, 2 µl de inserto de DNA control; y para el tubo de muestra 5 µl de tampón de ligación rápido 2X para la enzima T4 DNA ligasa, 1 µl de pGEM®-T Easy Vector (50 ng), 1 µl de T4 DNA ligasa, 1 µl de fragmento aislado por RT-PCR (30 ng), Ambos tubos son llevados a 10 µl de volumen final con agua destilada, se mezcla por pipeteo. Incubar toda la noche a 4°C.

### **3.2.12 Transformación usando las reacciones de ligación**

Dos placas se prepararon para cada reacción de ligación que contenían medio LB/Ampicilina/IPTG/X-Gal, y dos placas adicionales para determinar la eficiencia de la transformación.

Los tubos que contienen las reacciones de ligación se centrifugaron para concentrar el contenido al fondo del tubo, se tomaron 2 µl de reacción de

ligación y se adicionaron a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml en hielo. Otro tubo se preparó en hielo con 0,1 ng de plasmidio sin cortar para la determinación de la eficiencia de la transformación de las células competentes.

Luego el tubo de células competentes (Células competentes de alta eficiencia JM 109) se retiró del almacenaje a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se le colocó en un baño de hielo hasta que se descongeló. Las células se mezclaron suavemente por inversión del tubo y cuidadosamente se transfirieron 50  $\mu\text{l}$  de células a los tubos que contienen la alícuota de la reacción de ligación (se usó 100  $\mu\text{l}$  de células para la determinación de la eficiencia de transformación). Los tubos se mezclaron suavemente y se colocaron en hielo por 20 minutos. Luego se dio un golpe de calor a las células por 45-50 segundos en un baño de agua a exactamente  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se colocaron los tubos inmediatamente en hielo por dos minutos, se adicionó 950  $\mu\text{l}$  de medio SOC a temperatura ambiente a los tubos que contienen las células transformadas con las reacciones de ligación y 900  $\mu\text{l}$  al tubo que contenía las células transformadas con el plasmidio sin cortar, y se incubó por 1,5 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación de  $\sim 150$  r.p.m. en un agitador orbital. El medio SOC se preparó disolviendo en 97 ml de agua destilada 2,0 gr. de triptona, 0,5 gr. de extracto de levadura, 1 ml de NaCl 1 M, 0,25 ml de KCl 1 M, luego de autoclavar y enfriar a temperatura ambiente, se adicionó 1 ml de  $\text{MgSO}_4$  2 M y 1 ml de glucosa 2 M, ambos filtrados y estériles. Finalmente, con agua

destilada estéril se llevó a 100 ml y se filtró a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ , y se ajustó el pH a 7,0.

Se plaquearon 100  $\mu\text{l}$  de cada cultivo de transformación en duplicado en placas LB/ampicilina/IPTG/X-Gal. Para la transformación control, una dilución 1:10 con medio SOC es recomendada para plaquear. Luego las placas fueron incubadas a 37 °C toda la noche (16-24 horas).

Con el fin de obtener un mayor número de copias, se hizo una resiembra en 3 ml de medio líquido y se incubó a 37 °C toda la noche, para luego realizar una extracción de DNA plasmidial.

### **3.2.13 Cultivo de células competentes a menor escala**

Con objeto de realizar un cultivo a mayor escala, 1 ml de cultivo bacteriano (células transformadas) se guardó a 4 °C para realizar una resiembra en medio líquido. El resto de cultivo bacteriano (2 ml) se centrifugó a 22.000 x  $g$  por 30 segundos a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante, agregar al precipitado 200  $\mu\text{l}$  de Solución Fría I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8,0), e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego adicionar 400  $\mu\text{l}$  de Solución Fresca II (NaOH 0,2 N; SDS 1%) y mezclar suavemente e incubar en hielo por 10 minutos. Luego se adiciona 200  $\mu\text{l}$  de Solución Fría III (ácido acético glacial 11,5%; acetato de sodio 3 M), se mezcla e incuba por 10

minutos en hielo. Finalmente centrifugar a 22.000  $\times g$  10 minutos a temperatura ambiente, y descartar el precipitado. El sobrenadante se extrae con 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1), recuperándose la fase acuosa, en la cual se precipita el DNA con 2 volúmenes de etanol 100% y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M. El DNA se recupera centrifugando a 10.000  $\times g$  por 10 minutos a 4 °C. El precipitado se lava con 200  $\mu l$  de etanol 80%, y se centrifuga a 10.000  $\times g$  por 5 minutos a 4 °C, descartando el sobrenadante. El precipitado se dejó secar por inversión de los tubos sobre una toalla de papel absorbente. Luego se resuspende el DNA plasmidial en 20  $\mu l$  de agua estéril, para ser almacenado a una temperatura de -20 °C.

### **3.2.14 Digestión con enzima de restricción**

Con el fin de verificar la transformación exitosa de las células competentes, es decir, que el fragmento en estudio fue insertado en el plasmidio, se lleva a cabo un corte con enzima de restricción EcoRI, ya que existen dos sitios de corte para esta enzima que flanquean al inserto.

En un tubo estéril se mezcló aproximadamente 20  $\mu g$  de DNA plasmidial (~1  $\mu l$ ), 2  $\mu l$  de tampón H 10X de la enzima EcoRI, 16,3  $\mu l$  de agua destilada estéril, 0,2  $\mu l$  de BSA y 0,5  $\mu l$  de enzima EcoRI (12 U/ $\mu l$ ), y se incubó

por dos horas a 37 °C. El producto de la digestión fue observado mediante electroforésis en un gel de agarosa al 1,2%.

### **3.2.15 Cultivo de células competentes a mayor escala**

A la porción de 1 ml de cultivo celular guardada anteriormente (3.2.13) se le adicionó 9 ml de medio de cultivo y se incubó a 37 °C toda la noche con agitación. El cultivo resultante fue resembrado en 90 ml de medio e incubado a 37 °C por 2 a 3 horas.

La extracción de DNA plasmidial se llevó a cabo utilizando un Kit de purificación de DNA (Promega - Wizard Plus Midipreps DNA Purification System).

### **3.2.16 Producción de un lisado clarificado**

Peletear 100 ml de células en cultivo por centrifugación a 10.000 xg a 4 °C por 10 minutos, descartar el sobrenadante y poner el tubo boca abajo sobre una toalla de papel para remover el exceso de líquido. Luego resuspender completamente el sedimento en 3 ml de solución de resuspensión celular, adicionar 3 ml de solución de lisis celular y mezclar por inversión del tubo cuatro veces. La suspensión debe aclararse inmediatamente. Adicionar 6 ml de solución

de neutralización, mezclar por inversión del tubo cuatro veces, e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego centrifugar a 14.000  $xg$  por 15 minutos a 4 °C, y en el caso de no formarse un precipitado compacto, centrifugar otros 15 minutos adicionales. Finalmente decantar cuidadosamente el sobrenadante a un nuevo tubo de centrífuga, evitando el precipitado blanco.

### **3.2.17 Purificación de DNA plasmidial**

Al lisado clarificado obtenido anteriormente se adicionaron 10 ml de resina de purificación de DNA, se insertó la punta de la midicolumna en el dispositivo de vacío, y se transfirió la mezcla resina/DNA a la midicolumna para aplicar un vacío de al menos 15 pulgadas de mercurio para empujar la mezcla dentro de la columna. El vacío fue cortado cuando toda la muestra hubo pasado a través de la columna, luego de lo cual se adicionaron 15 ml de solución isopropanol 40% - guanidina 4,2 M y nuevamente se aplicó vacío continuo hasta 30 segundos después que toda la solución hubo pasado por la columna. Luego se adicionaron 15 ml de solución de lavado de columna a la midicolumna y aplicó vacío para drenarla de la columna. El vacío fue cortado y se adicionaron otros 15 ml de solución de lavado de columna, siendo drenados nuevamente por aplicación de vacío. Se secó la resina manteniendo el vacío por 30 segundos después de drenada la columna, y se removi6 la midicolumna de la fuente de

vacío. Se separó el reservorio de la midicolumna cortándolo, se transfirió la midicolumna a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, y se centrifugó a 10.000  $xg$  en microcentrífuga por 2 minutos para remover cualquier solución de lavado residual. Luego se transfirió la midicolumna a un nuevo tubo de microcentrífuga, y se le adicionaron 300  $\mu$ l de agua libre de nucleasa precalentada a 65 - 70 °C, eluyendo el DNA por centrifugación a 10.000  $xg$  por 20 segundos. La midicolumna fue removida y descartada, y se centrifugó a 10.000  $xg$  por 5 minutos para peletear cualquier vestigio de resina y se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a un tubo limpio. El DNA plasmidial fue resuspendido en agua estéril y se almacenó a -20 °C.

### **3.2.18 Secuenciación de fragmentos de cDNA**

Los insertos de cDNA obtenidos a partir de RNA total de *Deschampsia antarctica*, fueron secuenciados utilizando partidores específicos dirigidos al extremo 3' del gen GLUT5 humano, tal como se describió en los puntos anteriores, gracias a la gentileza del Dr. Alejandro Araya, en la Universidad de Bordeaux II-CNRS, Francia, utilizando nucleótidos dideoxifluorescentes y un secuenciador automático.

### 3.2.19 Extracción de proteínas totales

Aproximadamente 1 gramo de hojas frescas fueron homogeneizadas en homogeneizador eléctrico en presencia de acetona fría. Luego se procedió a la remoción de la acetona por filtración y, una vez seco el residuo (polvo cetónico), se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A 7 mg de polvo cetónico se agregó 175  $\mu\text{l}$  de tampón de extracción (Tris-HCl 65 mM, pH 6,8; SDS 2%; glicerol 5%; DTT 100 mM; EDTA 2 mM y PMSF 1 mM), se mezcló en vortex, luego se hirvió por 3 minutos y se centrifugó a 1.500 xg por 2 minutos y el sobrenadante se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.20 Cuantificación de Proteínas

Con el fin de precipitar el SDS de las muestras, a una alícuota de 20  $\mu\text{l}$  se adicionó 30  $\mu\text{l}$  de agua estéril y 400  $\mu\text{l}$  de tampón Kpi ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  100 mM; pH 7,2), se mezcló en vortex y dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 1.600 xg por 5 minutos. A 250  $\mu\text{l}$  del sobrenadante claro se les adicionó 2,75 ml de reactivo Bradford diluido (5 veces), y se midió su absorbancia a 595 nm, para así calcular la concentración de la muestra contra un estándar o por interpolación en una curva de calibración de BSA. (Bradford, 1976)

### **3.2.21 Electroforesis de proteínas totales**

Para separar las proteínas totales obtenidas se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE), para lo cual se cargó por carril 30  $\mu\text{g}$  de la mezcla de proteínas y se corrió a 10 mA por aproximadamente 1,5 horas o hasta que el frente iónico haya migrado casi en su totalidad (dimensiones: 0,75 mm de grosor, 16 cm de ancho y 17,5 cm de largo), utilizando tampón de corrida 1X el cual contiene Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 190 mM, y SDS 0,1%.

Una vez realizada la separación de las proteínas en el gel, este fue fijado en una solución que contiene metanol 50% y ácido acético 10%, por una hora, luego de lo cual se tiñó con solución de azul de Coomassie (metanol 50%, ácido acético 10%) por tres horas o durante toda la noche. Luego el gel fue desteñido en agua hirviendo en microondas, hasta la visualización de las bandas, para finalmente ser secado en papel celofán. (Laemli, 1970)

### **3.2.22 Detección inmunológica (Western Blot)**

A fin de realizar la detección inmunológica se realizó una electroforesis de las proteínas sembrando 40  $\mu\text{g}$  de mezcla de proteínas por carril. Una vez separadas las proteínas en el gel, estas se transfieren a papel de

nitrocelulosa utilizando tampón de transferencia (Tris 0,1 M; Glicina 0,768 M; SDS 0,4%; metanol 20%) dejándose transferir por 12 horas a 10 mA.

Una vez transferidas las proteínas al papel de nitrocelulosa, se incubó esta membrana con 10 ml de solución de bloqueo PBS-Tween 20-BSA-Leche ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  15 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; Tween 20 0,3%; BSA 1% y leche descremada 5%) durante 1 hora a 37°C con agitación. Luego se incubó a 37°C durante 1 hora con el anticuerpo anti-GLUT5 de conejo en dilución 1:4000 en solución de bloqueo. Se lavó tres veces con PBS-Tween ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  15 mM, pH 7,4; Tween 20 0,3%) a 37°C por 10 minutos, y se procedió a incubar a 37°C con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa, en dilución 1:1000 en solución de bloqueo, se lavó nuevamente tres veces con PBS-Tween a 37°C por 10 minutos.

Para revelar, en cámara oscura, se puso la nitrocelulosa sobre papel de aluminio, depositando sobre ella la mezcla de reactivos de revelado de peroxidasa, se dejó reaccionar por 30 segundos y luego se sacó el exceso y se expuso en un film el resultado de la excitación del luminol. La reacción fue detenida retirando la película de la membrana y procediendo después al revelado de esta.

### 3.2.23 Inmunoprecipitación

La proteína en estudio fue inmunoprecipitada llevando a cabo el procedimiento descrito por Lilly (2001), modificado. Se tomó 25 mg de polvo cetónico de *Deschampsia antarctica*, y se les adicionó 1 ml de tampón de lisis 1X para inmunoprecipitación (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Tritón X-100; pirofosfato de sodio 2,5 mM; Leupeptin 1 µg/ml; Aprotinin 10 µg/ml; PMSF 0,18 mg/ml) e incubó a temperatura ambiente por 3 horas. Luego se centrifugó por 15 minutos a 15.000 xg a temperatura ambiente. El sobrenadante se trasladó a un tubo limpio cuidando de no arrastrar precipitado, y de este se tomó una alícuota de 200 µl a la que se agregó 5 µl de anticuerpo anti-GLUT5. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente 12 horas con agitación. Luego, se agregó 20 µl de proteína A-agarosa e incubó a temperatura ambiente por otras 12 horas, para después centrifugar a 15.000 xg por un minuto a temperatura ambiente y descartando el sobrenadante. El precipitado formado fue lavado tres veces con 200 µl de tampón de lisis 1X y centrifugado a 15.000 xg por un minuto entre lavados. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 40 µl de tampón de carga 1X para proteínas en geles de poliacrilamida.

La proteína inmunoprecipitada pudo ser visualizada en un gel de poliacrilamida al 10%, tomando la precaución de centrifugar la muestra antes de cargarla en el gel para precipitar la proteína A-agarosa.

### **3.2.24 Estudios de homología.**

Los estudios de homología realizados con la secuencia nucleotídica fueron realizados mediante la consulta a internet en la base de datos del programa BLASTN 2.2.1 del sitio NCBI ubicado en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>. RID: 994295645-18412-8613.

La secuencia deducida de la proteína se obtuvo mediante la traducción de la secuencia nucleotídica obtenida en el punto 3.2.18 usando el programa OMIGA 2.0. Una vez obtenida esta secuencia aminoacídica deducida, se introdujo en la base de datos del programa BLAST, indicado anteriormente, para realizar una búsqueda de proteínas que presentaran homología o similitud con este péptido.

#### 4. RESULTADOS

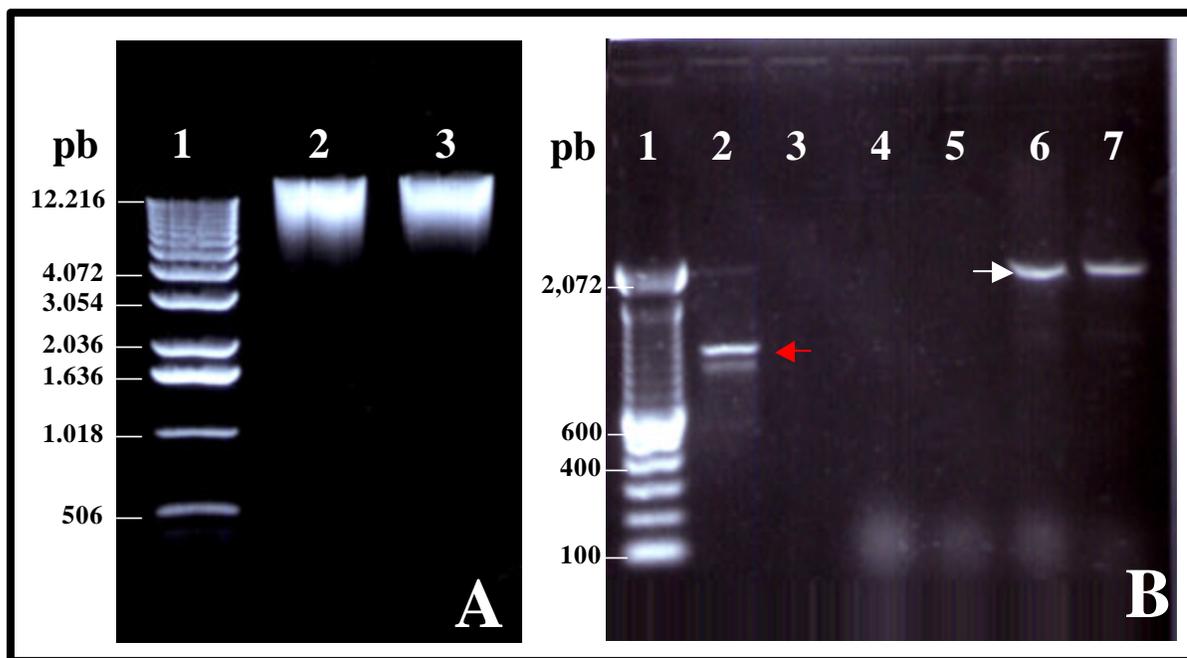
Estudios previos del laboratorio sugieren que plantas de regiones australes, como *Deschampsia antarctica*, responden a los cambios ambientales, en especial a las bajas temperaturas, mediante modificaciones tanto en la expresión de ciertas proteínas, como en la modificación de las cantidades de ciertos carbohidratos presentes en la planta. Estas modificaciones en gran medida permiten a la planta soportar temperaturas tan bajas como la temperatura de congelamiento.

En este caso particular, la respuesta generada ante un estrés frío redonda en un incremento intracelular en los niveles de hidratos de carbono como la sacarosa y de polímeros como fructano, más específicamente en las vacuolas de la planta. Debido a que estos polímeros de fructano aumentan a partir de aquellos ya preformados, en estas condiciones aumentaría la demanda del precursor fructosa, el cual normalmente es obtenido a partir de sacarosa, pero en las condiciones particulares de crecimiento de estas plantas el transporte activo de sacarosa se presenta como una opción desfavorable, presentándose la posibilidad de que dicho precursor, es decir, fructosa, sea obtenido a partir de sacarosa por medio de la enzima invertasa y transportado a través de las membranas de la planta mediante un sistema independiente de energía, como lo sería un transporte del tipo facilitativo.

Este transporte sería llevado a cabo por una proteína del tipo de la familia de los transportadores de hexosas conocida como GLUT5 y se hace necesario entonces estudiar tanto la composición y secuencia nucleotídica del gen de este transportador en plantas, como deducir su secuencia aminoacídica.

#### **4.1 Estudio de DNA mediante PCR**

Con el fin de estudiar la presencia y similitud entre el gen de la proteína encontrada en planta y el gen de GLUT5 humano, se realizó una amplificación por PCR usando DNA genómico extraído de *Deschampsia antarctica* usando partidores específicos para el extremo 3' del gen de GLUT5 humano. Se observa una cierta homología en el patrón de amplificación, pues tanto en plantas como en humano se observa un producto amplificado muy similar. En la Figura 5 se puede observar que, si bien en ambas muestras se obtienen dos fragmentos amplificados (flechas roja y blanca), el tamaño de estos varía notablemente, más para el caso de humano (carril 2) donde el fragmento más abundante tiene un tamaño aparente entre 900 pb y 1kb, en tanto que para el caso de *D. antarctica* (carriles 6 y 7) los fragmentos más abundantes amplificados se obtienen de un tamaño por sobre las 2 kb. Este resultado sugiere que el gen de GLUT5 humano podría ser homólogo a una secuencia existente en el DNA de la planta, y la diferencia en el tamaño entre ambos fragmentos amplifi-



**Figura 5. DNA y reacción de PCR realizada en *Deschampsia antarctica*. Cuadro A,** DNA genómico obtenido a partir de planta fresca de *Deschampsia antarctica*; **carril 1**, estándar de pares de base; **carriles 2 y 3**, muestras obtenidas a partir de planta fresca. **Cuadro B,** productos de amplificación obtenidos en muestras de plantas y humano por PCR utilizando partidores para el extremo 3' del gen de GLUT5 humano; **carril 1**, estándar de pares de base; **carril 2**, control positivo DNA placenta humana; **carril 3**, control negativo; **carril 4 y 5**, producto amplificado realizado en muestra de *Arabidopsis thaliana*; **carril 6 y 7**, producto amplificado realizado en muestra de *D. antarctica*. La flecha roja indica el producto de amplificación correspondiente a 1 kb en humanos, mientras que la flecha blanca indica el producto de amplificación observado en *Deschampsia antarctica* alrededor de las 2 kb.

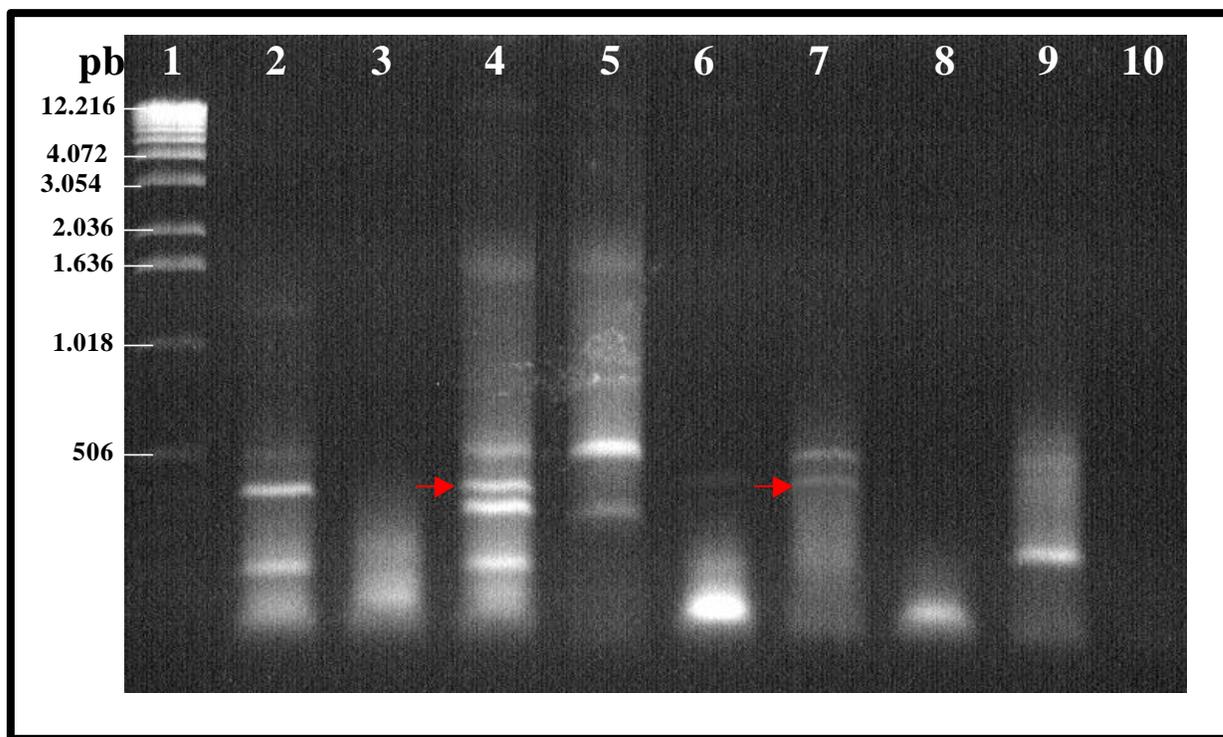
cados podría deberse a la existencia de un intrón o de un fragmento del gen “no leído” en plantas.

## 4.2 Análisis de mRNA mediante técnica de RT-PCR

A fin de estudiar las diferencias entre el mensajero de la proteína transportadora encontrada en *D. antarctica* y el mensajero de GLUT5 humano, se analizó, mediante la técnica de RT-PCR, muestras de RNA total extraídas a partir de hojas de plantas frescas y RNA comercial de testículo humano.

En la figura 6 se muestra el resultado de este análisis. Se observa un patrón de amplificación análogo, produciéndose fragmentos de similar tamaño tanto para la muestra vegetal (carril 4) como para la humana (carril7). En el carril 5 se muestra un control de la enzima Taq DNA Polimerasa, pudiéndose observar claramente los fragmentos inespecíficos obtenidos en la amplificación, esto es particularmente importante para la selección del fragmento amplificado a utilizar más adelante en la transformación de las células competentes. Se realizó además, una amplificación con un alineamiento a 50 °C (carriles 2, 3, 9 y 10), observándose el mismo patrón de amplificación con excepción de los fragmentos inespecíficos, los cuales no están presentes o se observan muy levemente.

Este resultado viene a apoyar más aún la hipótesis de que los genes para ambas proteínas podrían presentar una gran homología desde el punto de



**Figura 6.** RT-PCR realizado con RNA total de *Deschampsia antarctica*. Carril 1, estándar de pares de base; carril 2, producto amplificado a partir de *D. antarctica*; carril 3, producto amplificado sin enzima transcriptasa reversa (control negativo); carril 4, producto amplificado a partir de *D. antarctica*; carril 5, producto amplificado sin el partidor sense (control interno); carril 6, producto amplificado sin transcriptasa reversa; carril 7, producto amplificado con RNA total de testículo humano (control positivo); carril 8, producto amplificado con RNA total de testículo humano y sin transcriptasa reversa (control negativo); carril 9, producto amplificado con RNA total de testículo humano (control positivo); carril 10, producto amplificado con RNA total de testículo humano y sin transcriptasa reversa (control negativo). Las puntas de flecha indican el producto de amplificación obtenido por RT-PCR a partir de RNA total utilizando partidores para el extremo 3' del gen de GLUT5 humano en muestra de RNA total de testículo humano (carril 4) y en muestra de RNA total de *Deschampsia antarctica* (carril 7), siendo este ultimo el utilizado para transformar las células competentes. En los carriles 4 a 8 la temperatura de alineamiento de la reacción de la polimerasa en cadena se llevó a cabo a 55°C, y en los carriles 2, 3, 9 y 10 la temperatura usada fue de 50 °C.

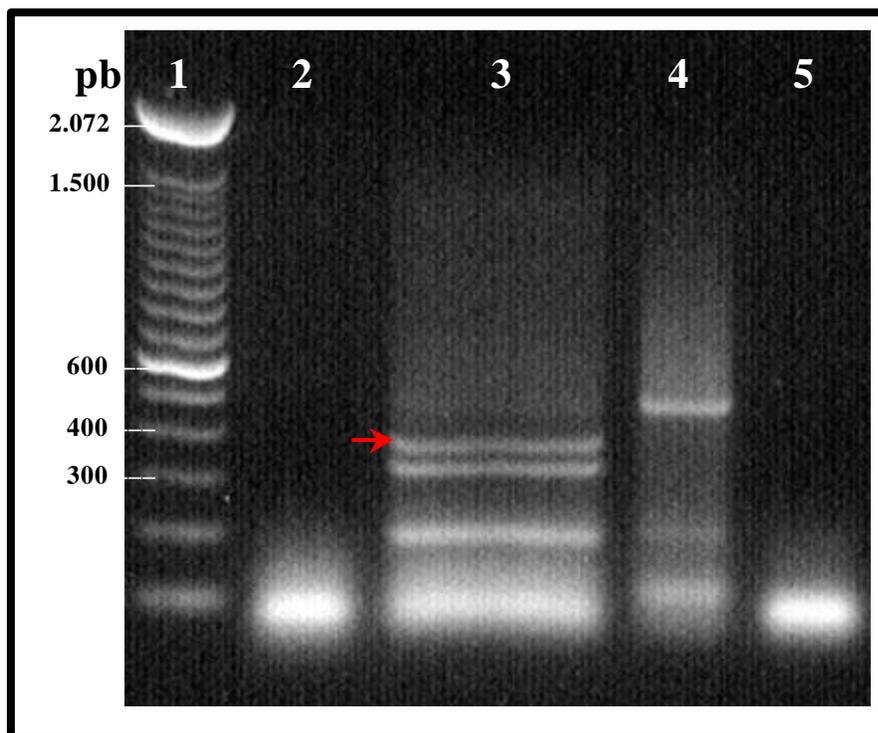
vista molecular, haciéndose necesario un estudio de la secuencia del fragmento obtenido para así determinar el grado de homología entre el gen de la proteína de plantas y humano.

### **4.3 Transformación de células**

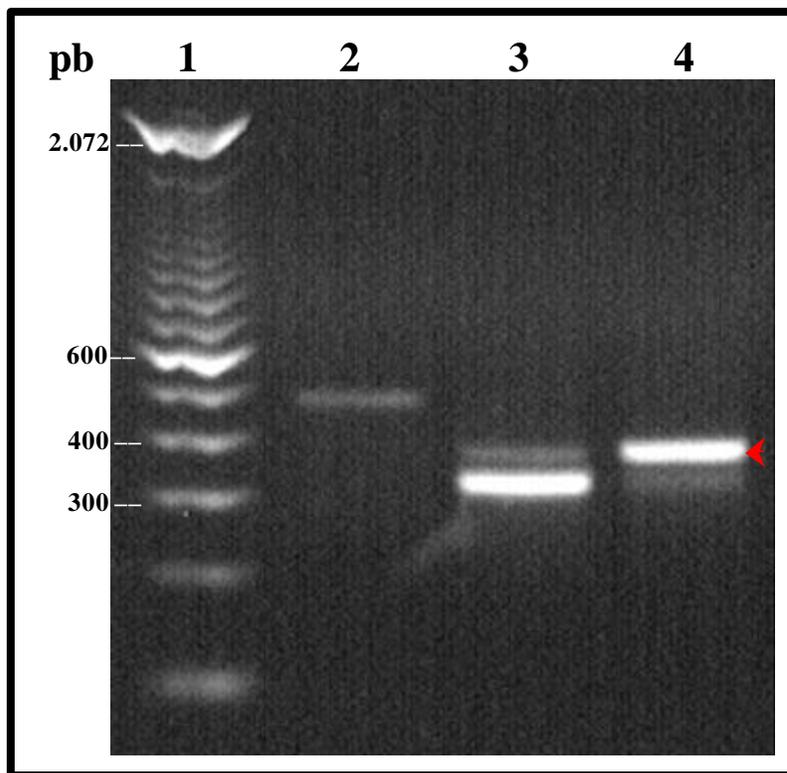
Para poder conocer la secuencia del fragmento obtenido por RT-PCR, se procedió a transformar células competentes para así obtener un mayor número de copias para poder secuenciar.

El fragmento obtenido por RT-PCR fue visualizado en un gel de agarosa para posteriormente ser extraído e insertado en un vector (Figura 7 y 8). Una vez insertado en el vector, éste fue usado para transformar células competentes (*E. Coli*) y obtener un mayor número de copias.

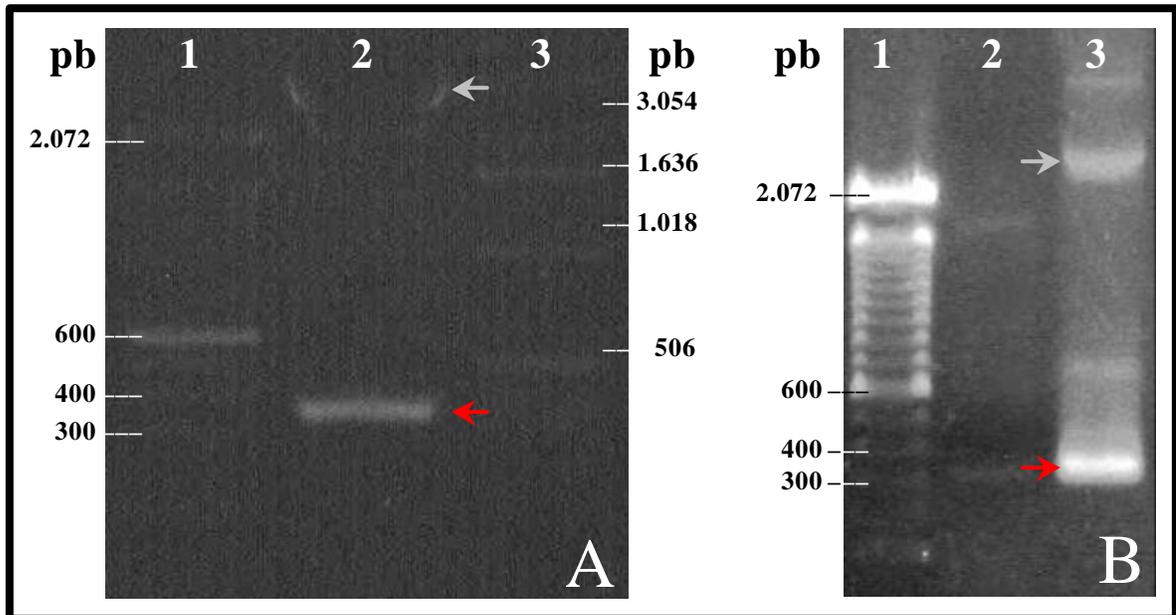
Una vez cultivadas se procedió a tomar una colonia y llevar a cabo una extracción de DNA plasmidial para luego someterlo a digestión con EcoRI, enzima de restricción que corta justo en ambos lados del fragmento insertado, para así comprobar si efectivamente se obtuvieron células que portasen el vector con el inserto. Como se esperaba, se obtienen células que portan tanto el vector como el fragmento insertado. En la Figura 9 se puede observar el resultado de la digestión con EcoRI visualizándose en un gel de agarosa donde se obtiene el fragmento anteriormente obtenido por RT-PCR a un tamaño aparente entre 300



**Figura 7. Fragmento amplificado por RT-PCR para transformación de las células.** El fragmento obtenido por RT-PCR a partir de RNA total de *Deschampsia antarctica* usando partidores para el extremo 3' del gen de GLUT5 humano fue visualizado en un gel de agarosa al 1,2% para posteriormente ser extraído, adicionado a un vector y transformar *E. Coli*. **Carril 1**, estándar de pares de base; **carril 2**, control negativo transcriptasa; **carril 3**, producto amplificado por RT-PCR, la flecha roja muestra el fragmento escogido para transformar las células, escogido según el criterio expuesto en la figura 6; **carril 4**, producto amplificado por RT-PCR sin partidore sense; **carril 5**, control negativo de polimerasa.



**Figura 8. Fragmentos extraídos de gel de agarosa 1,2%.** Se muestran los fragmentos obtenidos por RT-PCR a partir de RNA total de *Deschampsia antarctica* utilizando partidores para el extremo 3' del gen de GLUT5 humano purificados desde el gel de agarosa al 1,2%. **Carril 1**, estándar de pares de base; **carril 2**, control negativo RT-PCR; **carriles 3 y 4**, productos de RT-PCR obtenidos a partir de RNA total de *Deschampsia antarctica*. La punta de flecha roja muestra el fragmento seleccionado para transformar las células. La banda minoritaria obtenida en el carril 3 (de mayor tamaño) corresponde a contaminación con el fragmento mayoritario observado en el carril 4 al momento de realizar las reacciones de RT-PCR. Lo mismo ocurre con el fragmento minoritario de menor tamaño observado en el carril 4.



**Figura 9. Digestión de plasmidio con EcoRI.** De las células transformadas se extrajo DNA plasmidial y se cortó con EcoRI con el fin de comprobar la presencia del fragmento en dicho plasmidio. **Cuadro A**, digestión parcial del plasmidio con EcoRI, **carril 1**, estándar de pares de base; **carril 2**, digestión de DNA plasmidial con EcoRI; **carril 3**, estándar de pares de base. Las flechas gris y roja muestran el vector y el inserto, respectivamente. **Cuadro B**, visualización de productos de PCR llevado a cabo usando el plasmidio como templado y partidores de extremo 3' del gen de GLUT5 humano. **Carril 1**, estándar de pares de base; **carril 2**, control positivo (templado DNA genómico de placenta humana); **carril 3**, producto amplificado utilizando el plasmidio como templado y partidores del extremo 3' de GLUT5 humano. Las flechas gris indica el plasmidio+inserto y la roja muestra el producto amplificado.

pb y 400 pb (flecha roja, Figura 9, Cuadros A y B), y el vector utilizado a un tamaño aparente alrededor de los 3 kb (flecha blanca, Figura 9, Cuadros A y B).

Una vez establecido que las células transformadas de *E. coli* contienen el fragmento, se realiza un cultivo a mayor escala para así obtener una buena cantidad de DNA plasmidial, y poder llevar a cabo la secuenciación.

La Figura 10 muestra la secuencia obtenida, esta incluye tanto los sitios de corte de la enzima EcoRI (en negrita) como la secuencia de los partidores usados (en rojo y azul para los partidores sense y antisense, respectivamente). El fragmento obtenido corresponde a 263 pb con un contenido de 35% de adenina, 23,2% de timina, 22,8% de citosina y 19% de guanina. Presenta además sitios de corte con enzimas de restricción HinfI (secuencia de corte GATTC) en el residuo 168, y dos sitios de corte con enzima HaeIII (secuencia de corte GGCC) en los residuos 197 y 225.

La comparación de esta secuencia con secuencias conocidas indica que se trataría del gen de una proteína presente en plantas, P700 de fotosistema I, presente en cloroplasto (Figura 11). Para el caso del genoma completo de cloroplasto de *Oryza sativa*, Figura 11-(2), el fragmento coincide en un 77,71%; para ps1A1 y ps1A2 de fotosistema de cloroplasto de Maíz, Figura 11-(3), un 81,42%; para genoma completo de cloroplasto de *Arabidopsis thaliana*, Figura 11-(4), un 74,3%; para la proteína A1 de P700 de fotosistema I de *Araucaria araucana*, Figura 11-(5), un 47,68%; y para los exones 5, 6, 7, 8 y 10 del gen del

<b>GAATTCGATT</b> 	<b>CTG TTCCGAA</b> 	<b>GTGACAGGTG</b> 	<b>GAAGCTCT TT</b> 	<b>CAGTTC TCC</b> 
<b>CTTAAGCTAA</b> 	GACAAGGCTT 	CACTG TCCAC 	CT TCGAGAAA 	GTCAAGGAGG 
TAGCCACTAT 	CCTACT GCAA 	TAATTC TCGC 	TAAGAAGAAT 	GCCCAAGTTG 
ATCGGTGATA 	GGATGACGT T 	ATTAAGAGCG 	ATT CTT CTTA 	CGGGTTCAAC 
TGGCAATTCC 	ACCCAGAAGG 	TAATGGGTTA 	CTCC TACAGC 	GCCCAAGT TG 
ACCGTTAAGG 	TGGGTC TTC C 	ATTACCCAAT 	GAGGATGTCG 	CGGGT TCAAC 
ATAATGC TCA 	AGGCTC TAGG 	CTGAGTAGCA 	GGAGCAACTT 	TTAAT TTGT T 
TAT TACGAGT 	TC CGAGATCC 	GACTCATCGT 	CC TCGTTGAA 	AATTAAACAA 
ATGAGCCCAA 	ACGATAGATT 	CAATAAGTTC 	TTGCCAATAA 	CCACGGCCGC 
TACTCGGGTT 	TGCTATCTAA 	GT TAT TCAAC 	AACGGT TAT T 	GGTGCCGGCG 
TGAATAAAAA 	CATTAAACTG 	AAGGCCCAGA 	CAAAATGAGC 	ACCTAAGAAA 
ACTTATTTTT 	GTAATTTGAC 	TTCCGGGTCT 	GTTTTACTCG 	TGGATTCTTT 
AAAAGACCAT 	ATGCAGATGG 	AGAAGCCCAG 	CAGAATCACT 	AGTGAATTC 
TTTTCTGGTA 	TAC <b>GTC TACC</b> 	<b>TCTT CGGGTC</b> 	<b>GTC</b> TTAGTGA 	TCACTTAAG 

**Figura 10. Secuencia del fragmento obtenido por RT-PCR a partir de RNA de *Deschampsia antarctica*.** Las bases en rojo corresponden al partidor sentido, las azules al partidor antisentido. Las bases en negrita corresponden a la secuencia del vector (sitios EcoRI).

```

(1) 1 tctgtccga agtgacaggt ggaagctctt tcagttcctc ctagccacta tctactgca ataattctcg ctaagaagaa tgcccaagtt gtggcaattc caccagaag
(2)                                     38986 ..... .. 39225
(3)                                     2988 ..... .. 39225
(4)                                     39593 ..... t... .. C.....t... ..
(5)
(6) 2666 ..... .. 2626

(1) gtaatgggtt actcctacag cacgtccttg tataatgctc aaggctctag gctgagtagc aggagcaact ttaatttgt tatgagccca aacgatagat tcaataagtt
(2) ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. .....C.....
(3) ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. .....C.....
(4) ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. .....a..... ..a..g... ..
(5)      2149 ..... .. ..... .. gC..... .. .....g..... ..ga..... .. .....C ..C..... ..g..... ..a..... ..
(6)

(1) cttgccaata accacggccg ctgaataaaa acattaaact gaaggcccag acaaaatgag cacctaagaa aaaaagacca tatgcagatg gagaagccca gcaga 325
(2) ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. 39225
(3) ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. 2715
(4) ..... .. .....C... .. .....g... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. 39843
(5) ..... .. C.....a ..... .. ..... .. a..a.....a ..... .. ..... .. ..... .. ..... .. 1975
(6)                                     1131 ..... .. ..... .. ..... .. 1111

```

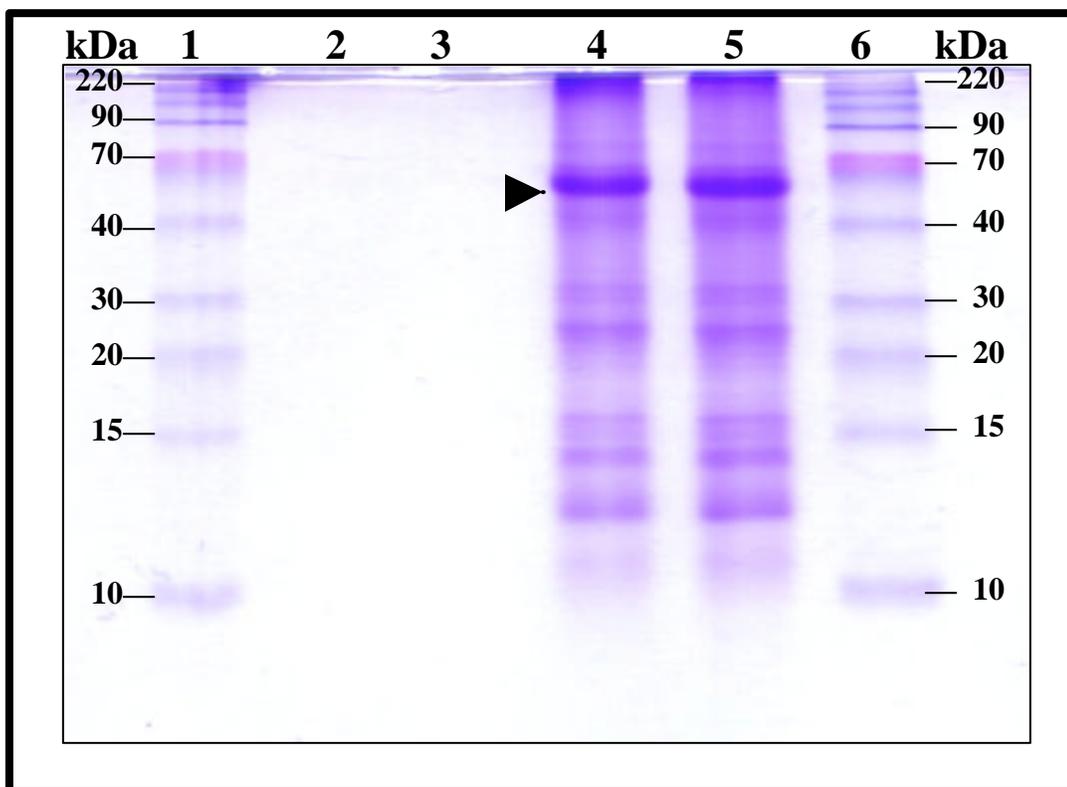
**Figura 11. Estudio de homología entre el fragmento obtenido por RT-PCR y secuencias génicas conocidas.** (1) Secuencia de fragmento amplificado por RT-PCR a partir de RNA total de *Deschampsia antarctica*; (2) genoma completo de cloroplasto de *Oryza sativa*, 251/253, 99% (77,71%); (3) genes de ps1A1 y ps1A2 de fotosistema I de cloroplasto de Maíz, 263/274, 95% (81,42%); (4) genoma completo de cloroplasto de *Arabidopsis thaliana*, 240/251, 95% (74,30%); (5) apoproteína A1 de P700 de fotosistema I de *Araucaria araucana*, 154/168, 91% (47,68%); (6) exones 5, 6, 7 8 y 10 del gen de transportador de fructosa humano (GLUT5), 41/41, 100% y 21/21, 100% (19,2%). En rojo y azul se muestran el partidor sense y antisense, respectivamente. Los números en los extremos de las secuencias indican la posición de las bases en la secuencia total a comparar.

transportador de fructosa humano (GLUT5), Figura 11-(6), un 19,2%.

Cabe notar que los segmentos homólogos a la proteína GLUT5 humana coinciden con las secuencias de los partidores utilizados (Figura 11-6), a diferencia de las otras secuencias encontradas. A simple vista, parecería un hecho fortuito que los partidores del extremo 3' para GLUT5 usados para la amplificación amplifiquen una región del DNA presente en la planta, más aún, que esta amplificación sea realizada en DNA de cloroplasto. Esto podría indicar que en realidad no se está detectando una proteína de transporte del tipo facilitativo, o, que esta proteína presente en planta que transporta fructosa en forma facilitativa contiene una secuencia que presenta una muy baja homología, o, que se trataría de otra proteína presente en plantas, y que en condiciones de estrés frío aumenta su expresión como fuera indicado por Triviño (1998).

#### **4.4 Estudio de la proteína presente en *D. antarctica***

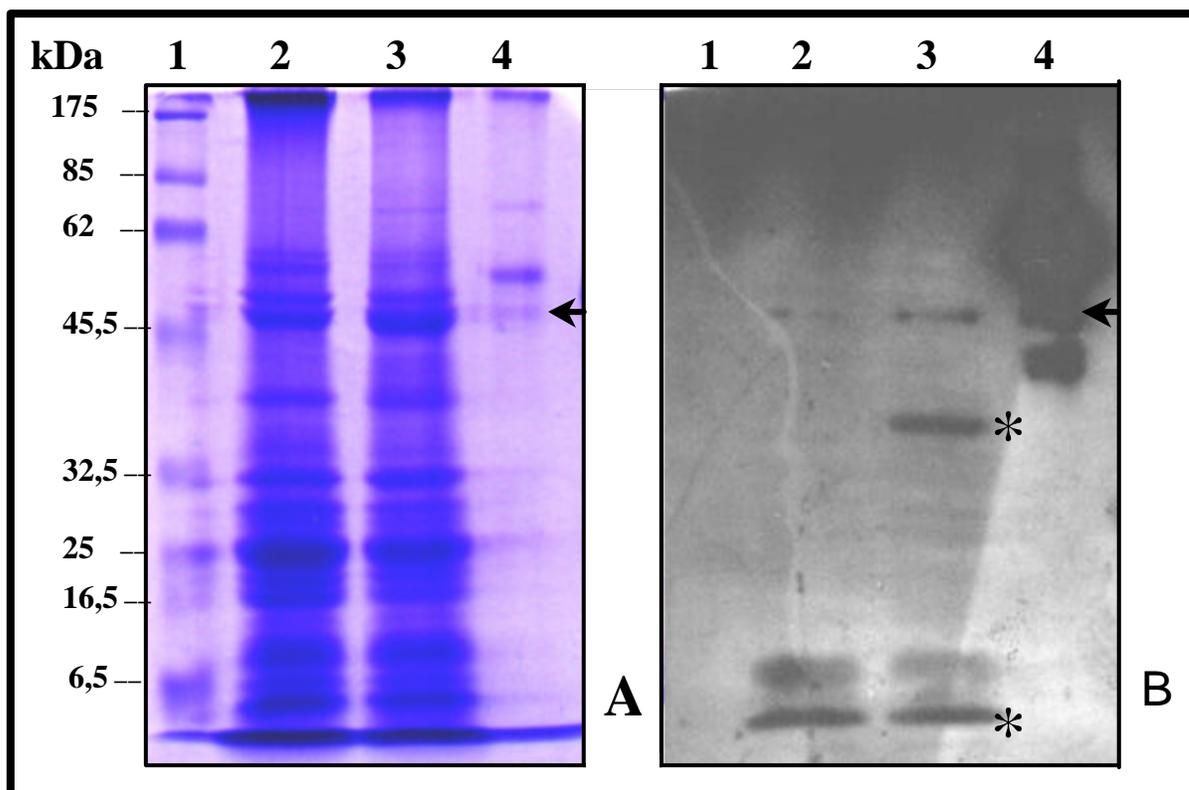
Con el fin de averiguar más respecto a la proteína detectada en plantas y que podría participar en la respuesta al frío como un transportador facilitativo de fructosa, se realiza una extracción de las proteínas totales de la planta para visualizarlas posteriormente en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE). La Figura 12 muestra el perfil electroforético obtenido de estas proteínas totales extraídas de plantas de *D. an-*



**Figura 12. Perfil electroforético de proteínas totales de plantas aclimatadas de *Deschampsia antarctica*. Carril 1, estándar; carril 2 y 3, 0.1 µg de proteína total de planta; carril 3 y 4, 10 µg de proteína total de planta; carril 6, estándar. En el carril 3 la punta de flecha indica la posición en la cual debería migrar la proteína GLUT5 humana.**

*tarctica*, se observa un gran número de bandas destacándose por sobre las demás una gran banda a un tamaño aparente de 50-60 kDa, lo cual concordaría con el tamaño descrito para GLUT5 en humanos (~55 kDa) y con el tamaño de ~63 kDa descrito por Triviño (1998) para *D. antarctica*, y Weber (2001) en cloroplasto de *D. antarctica*.

Para comprobar si efectivamente existe una proteína similar a GLUT5 humana en *D. antarctica*, se lleva a cabo un análisis de Western Blot (Figura 13), el cual indicó la presencia de una proteína que reacciona con el anticuerpo anti-GLUT5 humano que presentaba un tamaño aparente entre 45 y 55 kDa, lo cual coincidiría con los datos de bibliografía anteriormente expuestos. En el carril 2 de la Figura 13 se observan proteínas totales de *Deschampsia antarctica* obtenidas mediante el procedimiento estándar de extracción (fuerte), mientras que en el carril 3 se observan las proteínas totales obtenidas utilizando un método más suave de extracción para proteínas de membrana, y la banda indicada por un asterisco en el ensayo de Western Blot puede deberse a una posible degradación de la proteína. En ambos casos se observa el mismo patrón electroforético y la presencia de un “doblete” a un tamaño aparente de 50 kDa correspondiente con el tamaño descrito para GLUT5 humano. En el carril 4 de la Figura 13 se observa la proteína inmunoprecipitada utilizando anticuerpo anti-GLUT5 humano, la flecha indica el tamaño aparente informado por Triviño (1998) y Weber (2001) para GLUT5, que se corresponde con la proteína en estudio, y



**Figura 13. Análisis de Western Blot en proteínas totales e inmunoprecipitada de *Deschampsia antarctica*. Cuadro A.** Perfil electroforético de proteínas. **Carril 1**, estándar; **carril 2**, proteínas totales (extracción fuerte); **carril 3**, proteínas totales (extracción suave); **carril 4**, proteína inmunoprecipitada con anticuerpo anti-GLUT5. **Cuadro B.** Inmunodetección de proteínas electrotransferidas. **Carril 1**, estándar; **carril 2**, proteínas totales (extracción fuerte); **carril 3**, proteínas totales (extracción suave); **carril 4**, proteína inmunoprecipitada con anticuerpo anti-GLUT5. La flecha muestra el tamaño que al que migraría GLUT5 y que se corresponde con la proteína de interés, los asteriscos indican posibles degradaciones de la proteína.

las bandas de mayor tamaño observadas en el mismo carril pueden corresponder a artefactos de la técnica o a una posible agregación de la proteína.

Estos resultados parecen contradictorios con aquellos obtenidos mediante RT-PCR, ya que estos últimos indican, desde un punto de vista génico, que no se trataría de una proteína parecida a GLUT5 humano, sino más bien de una proteína implicada en el proceso fotosintético de la planta.

Es así que para aclarar este punto, se procedió a inmunoprecipitar la proteína utilizando para ello anticuerpo anti-GLUT5 humano. En el carril 4 del cuadro A de la Figura 13 se muestra el perfil electroforético de la inmunoprecipitación realizada, las puntas de flecha indican la presencia de una proteína de un tamaño aparente entre 50 y 60 kDa.

La obtención de una secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica del cDNA obtenido por RT-PCR, permite la posibilidad de estudiar la homología de esta proteína deducida con proteínas conocidas a partir de una base de datos. La figura 14 muestra este estudio, y en el se observa claramente que dicha proteína deducida posee sobre el 90% de homología con Apoproteína A1 de P700 de Fotosistema I, siendo de particular interés el hecho de que la secuencia deducida corresponde al extremo amino-terminal de cada proteína con que se comparó y que es el mismo grupo de tres

1	YGLFFLGAHFVWAFSLMFLFSGRGYWQELIESIVWAHNKLVKVPATQPRALSII	INL	GAVG	60
	YGLFFLGAHFVWAFSLMFLFSGRGYWQELIESIVWAHNKLVKVPATQPRALSII		AVG	
667	YGLFFLGAHFVWAFSLMFLFSGRGYWQELIESIVWAHNKLVKVPATQPRALSII	QGR	AVG	726
61	VTHYLLGGIATTWAFFLARIIAVG	84	Identidad = 81/84 (96%)	
	VTHYLLGGIATTWAFFLARIIAVG		Positivos = 81/84 (96%)	
727	VTHYLLGGIATTWAFFLARIIAVG	750	(1)	
1	YGLFFLGAHFVWAFSLMFLFSGRGYWQELIESIVWAHNKLVKVPATQPRALSII	INL	GAVG	60
	YGLFFLGAHFVWAFSLMFLFSGRGYWQELIESIVWAHNKLVKVPATQPRALSII		AVG	
675	YGLFFLGAHFVWAFSLMFLFSGRGYWQELIESIVWAHNKLVKVPATQPRALSII	VQGR	AVG	734
61	VTHYLLGGIATTWAFFLARIIAVG	84	Identidad = 80/84 (95%)	
	VTHYLLGGIATTWAFFLARIIAVG		Positivos = 81/84 (96%)	
735	VTHYLLGGIATTWAFFLARIIAVG	758	(2)	
1	YGLFFLGAHFVWAFSLMFLFSGRGYWQELIESIVWAHNKLVKVPATQPRALSII	INL	GAVG	60
	YGLFFLGAHFVWAFSLMFLFSGRGYWQELIESIVWAHNKLVKVPATQPRALSII		AVG	
667	YGLFFLGAHFVWAFSLMFLFSGRGYWQELIESIVWAHNKLVKVPATQPRALSII	QGR	AVG	726
61	VTHYLLGGIATTWAFFLARIIAVG	84	Identidad = 81/84 (96%)	
	VTHYLLGGIATTWAFFLARIIAVG		Positivos = 81/84 (96%)	
727	VTHYLLGGIATTWAFFLARIIAVG	750	(3)	
1	YGLFFLGAHFVWAFSLMFLFSGRGYWQELIESIVWAHNKLVKVPATQPRALSII	INL	GAVG	60
	YGLFFLGAHFVWAFSLMFLFSGRGYWQELIESIVWAHNKLVKVPATQPRALSII		AVG	
670	YGLFFLGAHFVWAFSLMFLFSGRGYWQELIESIVWAHNKLVKVPATQPRALSII	VQGR	AVG	729
61	VTHYLLGGIATTWAFFLARIIAVG	84	Identidad = 75/84 (89%)	
	VTHYLLGGIATTWAFFLARIIAVG		Positivos = 77/84 (91%)	
730	VTHYLLGGIATTWAFFLARIIAVG	753	(4)	

**Figura 14. Comparación de proteína deducida a partir de cDNA con diferentes proteínas conocidas.** Se muestra la comparación de la secuencia de la proteína deducida a partir de la traducción del fragmento obtenido por RT-PCR con la secuencia de diferentes proteínas conocidas. En cada set de comparaciones la línea superior corresponde a la proteína deducida, la inferior a la secuencia a comparar y la central a la comparación entre ambas. **(1)**, apoproteína A1 de P700 de fotosistema I proveniente de *Oryza sativa* (750 aa.); **(2)**, apoproteína A1 de clorofila a P700 de fotosistema I (758 aa); **(3)**, apoproteína A1 de P700 de PSI de *Arabidopsis thaliana* (750 aa); **(4)**, apoproteína A1 de P700 de PSI de *Pinus thunbergii* (753 aa). En rojo se muestran los aminoácidos no correspondientes en cada proteína y en azul se muestran aquellos que conservan la propiedad.

aminoácidos (QGR) el que está modificado en cada proteína y que estos se encuentran a la misma distancia del extremo amino-terminal.

Sólo en *Pinus thunbergii* se observa una mayor diferencia respecto de la proteína deducida, y la principal diferencia presentada entre ambas proteínas involucra siempre los mismos tres aminoácidos a una distancia igual del extremo amino-terminal de la proteína a que se compara.

## 5. DISCUSION

Este trabajo aporta más antecedentes acerca de la composición nucleotídica de un fragmento del gen que codifica una proteína presente en *Deschampsia antarctica*, que estaría involucrada en la respuesta al estrés frío que sufre esta planta en su hábitat natural. Se cree que esta proteína podría ser un transportador de membrana del tipo facilitativo (Triviño, 1998) y, por esta razón, se estudió la homología existente entre la proteína presente en *Deschampsia antarctica* y un transportador facilitativo del tipo GLUT y, en forma adicional, se buscó homología con otras proteínas.

La adaptación de las plantas a las condiciones del ambiente involucra la participación de azúcares. En plantas que habitan en regiones frías australes existiría un mecanismo de adaptación a las temperaturas bajas adversas. Plantas que resisten o toleran las temperaturas bajas son capaces de sobrevivir en estos ambientes fríos, debido a que presentan mecanismos de adaptación que les permiten tolerar heladas o congelación de los tejidos.

La crioprotección otorgada por los azúcares es cuantitativamente mayor a la otorgada por las proteínas, principalmente debido a la gran cantidad de azúcares presentes en la planta en comparación con las proteínas.

Entre estos azúcares, se encuentran carbohidratos totales no estructurales como sacarosa, rafinosa y fructanos, los cuales serían

almacenados en vacuolas de hojas y tallos, pudiendo actuar como osmoreguladores fijando agua presente en el interior de la célula.

Los fructanos son polímeros solubles de fructosa, consistentes en una serie de oligo y polisacáridos no reductores conteniendo cada fructano una molécula de glucosa móvil por cadena, y funcionan como el principal almacenaje de carbohidratos en el 15% de las plantas que florecen, incluyendo muchos cultivos económicamente importantes. Los fructanos también juegan un rol en la osmorregulación durante sequías y pueden actuar como protectores contra deshidratación producida por la sequía o congelamiento. La acumulación de estos fructanos ha sido asociada con respuestas de aclimatación en ciertas plantas a las bajas temperaturas.

Estudios realizados en nuestro laboratorio por Triviño (1998) y Weber (2001) indican que existiría un transportador de hexosas, del tipo facilitativo, asociado a esta respuesta al frío, el cual podría ser GLUT5, ya que se ha caracterizado una proteína muy similar a este transportador tanto en masa molecular como en propiedades cinéticas.

*Deschampsia antarctica* posee una alta tolerancia a la congelación en la cual están involucrados metabolitos crioprotectores tales como proteínas y, principalmente, fructanos (Triviño, 1998; Rosas *et al*, 1986; Alberdi y Corcuera, 1991). En condiciones extremas de frío esta planta se aclimata aumentando su cantidad de fructanos, requiriendo precursores de estos polímeros. Los

polímeros de fructano están constituidos por una molécula de glucosa libre y una serie de moléculas de fructosa unidas una tras otra. El aumento de estos polímeros en un estrés frío, más que síntesis de novo de polímeros, tiene lugar por extensión de los polímeros preexistentes, siendo entonces para esto de vital importancia el suministro del precursor fructosa (Triviño, 1998).

El transporte de hexosas a través de las membranas se realiza mediante dos tipos de transporte, el activo y el facilitado. Valenzuela (1997) determinó la existencia de una proteína en polen de pino, germinado y sin germinar, la cual transporta fructosa y presenta semejanzas con GLUT5 humano en cuanto a constante de afinidad y cinéticas de transporte e inhibición.

Otros estudios en nuestro laboratorio realizados por Triviño (1998) y Weber (2001), indican que existiría una proteína de membrana muy similar a GLUT5 humano en *Deschampsia antarctica*, y que podría estar involucrada en el mecanismo de respuesta al estrés frío.

En atención a los antecedentes anteriormente expuestos, surgió la inquietud de determinar la composición nucleotídica de esta proteína presente en *Deschampsia antarctica*, y estudiar el grado de homología existente con GLUT5 humano, para dilucidar si se trata de la misma proteína.

Es así que, como se muestra en la Figura 12, se estudió el perfil electroforético de las proteínas totales de *Deschampsia antarctica* y se observó una banda de un tamaño aparente de 50-60 kDa, que es coincidente con los

valores obtenidos por Triviño (1998) y Weber (2001). Además, se separó electroforéticamente la proteína inmunoprecipitada a partir del extracto de proteínas totales de hoja de *Deschampsia antarctica*, utilizando un anticuerpo dirigido al extremo amino-terminal de GLUT5 humano, obteniéndose similares resultados. Por otro lado, ensayos de Western Blot utilizando el mismo anticuerpo anti-GLUT5 humano usado para la inmunoprecipitación de la proteína en *Deschampsia antarctica*, mostraron de igual manera la presencia de una proteína de un tamaño aparente de 50-60 kDa en extractos de proteínas totales e inmunoprecipitada de *Deschampsia antarctica* (Figura 13), lo cual apoya los resultados obtenidos por Triviño y Weber, y valida aún más la hipótesis de que esta proteína presente en *Deschampsia antarctica* posee una gran similitud con GLUT5 humano.

Además, se realizaron estudios del patrón de amplificación en ambas especies (*D. antarctica* y humano) utilizando partidores construidos para amplificar un segmento del extremo 3' del gen de GLUT5 humano.

En la Figura 5 se muestra el resultado del análisis de PCR utilizando como templados DNA genómico de *Deschampsia antarctica* y DNA genómico de placenta humana, observándose que el tamaño de los productos amplificados difiere entre ambas especies, pues en *D. antarctica* se obtiene un producto de 2,0 kb y en humano se obtiene un producto de 0,9 - 1,0 kb. Esta diferencia en el tamaño de los productos amplificados en ambas especies puede atribuirse a la

existencia de uno o más intrones de mayor tamaño en el gen de la proteína presente en *D. antarctica*, o a la existencia de un intrón adicional, en el gen GLUT5 humano. A pesar de esta diferencia en el tamaño de los productos obtenidos en la amplificación de PCR, existe una similitud en el patrón de migración de los fragmentos amplificados, pues éstos migran formando “dobletes” característicos, obtenidos similarmente en otros estudios de nuestro laboratorio. Esto podría atribuirse a la posible alineación inespecífica del partidador antisentido, pues este posee un mayor tamaño (40 MER) y un menor porcentaje de contenido C+G que el partidador sentido, generando así un producto de diferente tamaño.

De igual manera se realizó un análisis de RT-PCR utilizando el RNA total de *D. antarctica* y de testículo humano, utilizando los mismos partidores, obteniéndose el mismo resultado que se obtuvo para la reacción de PCR, esto es, un patrón de amplificación en forma de “doblete” tanto para *D. antarctica* como para humano (Figura 6), salvo que esta vez, los productos amplificados obtenidos fueron del mismo tamaño. Este resultado estaría indicando, en primera instancia, que se trataría efectivamente de la misma proteína. Además, se pudo determinar cual de los fragmentos obtenidos es el que corresponde realmente a la amplificación específica utilizando los partidores de GLUT5 humano, ya que al realizar una amplificación sólo con el partidador antisentido para obtener fragmentos por alineación inespecífica del mismo, se obtiene una banda menos

que al utilizarse ambos partidores (Figura 6, Carril 5), indicando así que aquel fragmento que no se obtiene es el que es realmente específico y corresponde al cDNA del mensajero de la proteína en estudio.

En conjunto, los resultados obtenidos en los patrones de migración de los fragmentos amplificados en reacciones de PCR y RT-PCR, indican que ambos genes podrían codificar una misma proteína, aún cuando presentan diferencias que no se reflejan en el tamaño del mensajero, pues los fragmentos de cDNA amplificados obtenidos en la reacción de RT-PCR son de similar tamaño, a diferencia de los obtenidos en la reacción de PCR que difieren en tamaño.

El tamaño del fragmento específico amplificado y observado en el gel de agarosa sería de un tamaño aparente de 300 pb. El análisis de la secuencia de este fragmento indica que este consta efectivamente de 325 pb, incluidos ambos partidores usados en la amplificación (Figura 10). La comparación de la secuencia del fragmento obtenido en la base de datos BLAST con secuencias conocidas, incluido GLUT5 humano, contradictoriamente a lo obtenido en los resultados anteriormente expuestos, indica que no existiría homología alguna con GLUT5 humano, y que más bien se trataría de un gen presente en el genoma de cloroplasto, más específicamente, del que codifica para apoproteína A1 de P700 de fotosistema I, presentando en este caso

homologías por sobre el 75% con especies como *Oryza sativa* (arroz), maíz, *Arabidopsis thaliana*, y *Araucaria araucana* (Figura 11).

A partir del cDNA obtenido de la amplificación por RT-PCR de RNA total de *Deschampsia antarctica*, se dedujo una secuencia proteica obteniéndose un péptido de 84 aminoácidos (Figura 14), y se estudió la homología de este péptido comparando su secuencia con la de GLUT5 humano y con secuencias conocidas de otras proteínas en la base de datos de BLAST con el fin de observar alguna posible semejanza en el contenido de aminoácidos o en la estructura de la proteína. Sin embargo, el péptido deducido no presentó homología alguna con GLUT5 humano y, por el contrario, presentó una homología que supera el 90% con el extremo carboxilo terminal de apoproteína A1 de P700 de fotosistema I de especies diferentes tales como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Pinus thunbergii* (Figura 14).

Cabe señalar que la masa molecular deducida del tamaño de apoproteína A1 de P700 de fotosistema I de estas especies es de aproximadamente 75 kDa, lo cual difiere por mucho en la masa molecular de la proteína inmunodetectada con anticuerpo anti-GLUT5. Esta diferencia en la masa molecular puede atribuirse al hecho de que en las bases de datos se informa la secuencia completa de la proteína, y esta puede poseer secuencias de señalización (localización) que luego se pierden al procesarse el precursor en la proteína madura, tal como es el caso del translocador de glucosa plastídico

(pGlcT), el cual posee una secuencia señal en su extremo amino terminal para su localización en la membrana interna del cloroplasto, pudiendo ser este el caso de nuestra proteína en estudio.

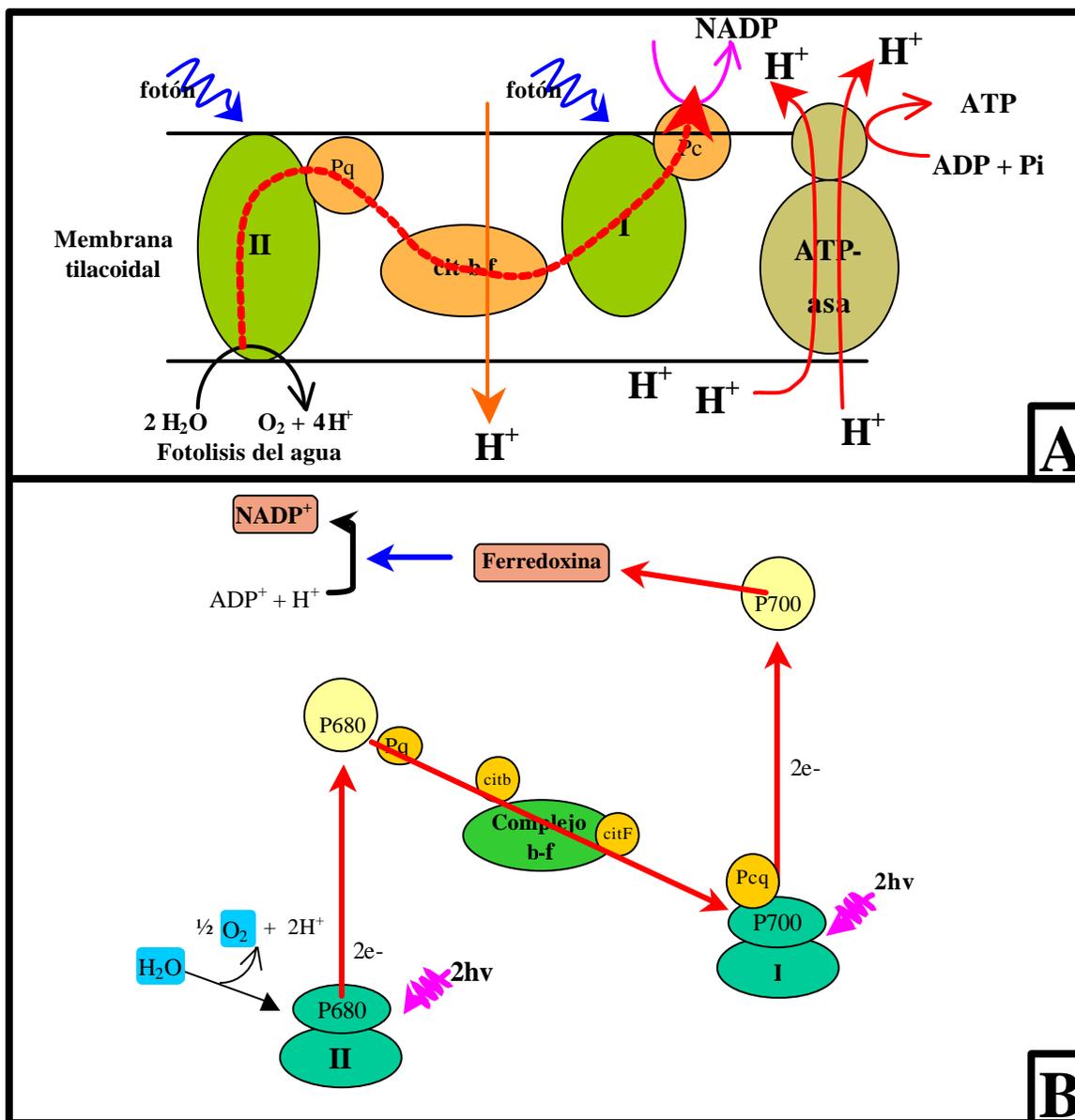
Dado que la secuencia aminoacídica deducida corresponde al cDNA de sólo una parte del gen total de *D. antarctica*, serían necesarios más estudios con el fin de averiguar si el resto de la proteína correspondiente a este gen presenta la misma homología encontrada en este trabajo para apoproteína A1 o si presenta algún tipo de homología con GLUT5 humano, y de ser así, en este último caso, vendría a explicarse el hecho de que el anticuerpo anti-GLUT5 humano reconozca a esta proteína en los estudios de Western Blot, pues el control de la inmunodetección con anticuerpo preabsorbido dio un resultado negativo, lo cual corroboraría la especificidad del anticuerpo utilizado.

Estudios anteriores indican que la proteína inmunodetectada con anticuerpo anti-GLUT5 humano, y que aumenta ante un estrés frío, podría ser homóloga a GLUT5 humano, lo cual era atribuido a un aumento del transportador en las membranas de los diferentes compartimentos de *Deschampsia antarctica* con el objeto de suplir la demanda del precursor fructosa para la síntesis de fructanos (Triviño, 1998; Weber, 2001). Estudios realizados en nuestro laboratorio por Weber (2001), indican que cloroplastos aislados de plantas de *Deschampsia antarctica* tratados con anticuerpo anti-GLUT5 humano, mediante la técnica de inmunocitoquímica, muestran la existencia de una marca

inmunoreactiva, lo cual evidenciaría la existencia de una proteína reconocida por anti-GLUT5 humano, homóloga a la expresada en humanos, y que se encontraría en la membrana de los cloroplastos, hecho que apoya la idea de que se trata de una proteína de membrana, tal como fuera sugerido por Triviño (1998). Además, las marcas inmunoreactivas obtenidas de estos estudios, tanto en plantas controles (13 °C) como en plantas aclimatadas (4 °C) indican la existencia de una sobreexpresión de esta proteína homóloga a GLUT5 en los cloroplastos de las plantas de *Deschampsia antarctica* sometidas a aclimatación.

De los resultados del presente trabajo se puede concluir que en realidad la proteína detectada es apoproteína A1 de P700 de fotosistema I, lo que en el fondo se traduce en un aumento de la fotosíntesis por parte de la planta, tal vez para suplir la demanda de fructosa, precursor del polímero de fructano, pues esta proteína se encuentra embebida en la membrana, lo cual es concordante con los estudios de Weber (2001) anteriormente expuestos, formando parte del complejo proteico asociado a la clorofila (fotosistema), la cual al ser estimulada por la luz desencadenaría una serie de reacciones electroquímicas en la fase luminosa de la fotosíntesis, destinadas finalmente a producir ATP (Figura 15, cuadro A) y poder reductor (Figura 15, cuadro B), los que posteriormente son utilizados en la fase oscura, en el Ciclo de Calvin, para fijar el CO<sub>2</sub> atmosférico generando finalmente glucosa, la cual puede ser utilizada en diferentes formas por la célula vegetal, como por ejemplo, la formación de

fructosa por isomerización para la ulterior elongación de polímeros de fructano preexistentes y así responder al estrés frío que afecta a esta planta.



**Figura 15. Esquemas de las fases de la fotosíntesis. Cuadro A, producción de ATP en fase luminosa,** se muestra la forma en que la planta genera energía en forma de ATP en la fase luminosa de la fotosíntesis. Los fotosistemas se encuentran ubicados en la membrana tilacoidal del cloroplasto. La flecha roja punteada indica el flujo de electrones. **Cuadro B, producción de poder reductor en fase luminosa de la fotosíntesis,** se muestra un esquema de cómo se produce poder reductor en forma de NADPH en la fase luminosa de la fotosíntesis de la planta. De particular importancia es el caso del Fotosistema I en el cual se encuentra involucrado el pigmento P700 el cual absorbe la energía luminosa del sol iniciando un flujo de electrones que finalmente deriva en la producción de NADPH. Las flechas rojas en el esquema indican el flujo de electrones no cíclico y la flecha azul el flujo de electrones cíclico. (Modificado de Luengo, 2002)

## 6. BIBLIOGRAFIA

Alberdi, M. and Corcuera, L.J. (1991). Cold acclimation in plants. *Phytochemistry*. 30: 3177-3184.

Bell, G.I.; Burant, C.F.; Takeda, J. and Gould, G.W. (1993). Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J. Biol. Chem.* 268 (26): 19161-19164.

Birnbaum, M.J.; Haspel, H.C. and Rosen, O.M. (1986). Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 5784-5788.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Casanova, M.A. (1997). Eficiencia fotoquímica del PSII en *Deschampsia antarctica* Desv.: una gramínea tolerante a la congelación. Tesis. Grado de Magister en Ciencias, con Mención Botánica. Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 163: 156-159.

- Concha, I.I., Velásquez; F.V.; Martínez, J.M.; Angulo, C.; Droppelmann, A.; Reyes, A.; Slebe, J.C.; Vera, J.C. and Golde, D.W. (1997). Human erythrocytes express GLUT5 and transport fructose. *Blood*, 89: 4190-4195.
- Darakhshan, F; Hajdusch, E.; Kristiansen, S.; Richter, E.A. and Hundal, H.S. (1998). Biochemical and functional characterization of the GLUT5 fructose transporter in rat skeletal muscle. *Biochem. J.* 336: 361-366 (Printed in Great Britain)
- Dellaporta, S.L.; Wood, J. and Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Doerge, H.; Schurmann, A.; Bahrenberg, G.; Brauers, A. and Joost, H. (2000). GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J. Biol. Chem. USA.* 275, 16275-16280.
- Droppelmann, A. (1997). Expresión de los transportadores facilitativos de hexosas en seminomas. Tesis. Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Emanuelsson, O.; Nielsen, H.; and von Heijne, G. (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* 8, 978-984.
- Flier, J.S.; Mueckler, M.; McCall, A.L. and Lodish, H.F. (1987). Distribution of glucose transporter messenger RNA transcripts in tissue of rat and man. *J. Clin. Invest.* 79: 657-661.

Gould, G.W. and Bell, G.I. (1990). Facilitative glucose transporters: an expanding family. *Trends Biochem. Sci.* 15: 18-23.

Henderson, P.J.F. (1991). Sugar transport proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1, 590-601.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature.* 227: 680-685.

Lilly, M.B.; Zemskova, M.; Frankel, A.E.; Salo, J. and Kraft, A.S. (2001). Distinct domains of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor  $\alpha$  subunit mediate activation of Jak/Stat signaling and differentiation. *Blood*, 97: 1662-1670.

Luengo, L. (2002). Curso "Índice de Biología" Capítulo 2: Nivel celular. Tema: Organización de la célula eucariota. Membrana. Fisiología. IES La Rábida. Huelva. <http://www.arrakis.es/~lluengo/transporte.html>

Mantych, G.J.; James, D.E. and Devaskar, S.U. (1993). Jejunal/kidney glucose transporter isoform (GLUT5) is expressed in the human blood-brain barrier. *Endocrinology*, 132: 35-40.

Marshall, B.A.; Ren, J.M.; Johnson, D.W.; Gibbs, E.M.; Lillquist, J.S.; Soeller, W.C.; Holloszy, J. and Mueckler, M. (1993). Germiline manipulation of glucose homeostasis via alteration of glucose transporter levels in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 268: 18442-18445.

Medina, R.A. and Owen, G. (2002). Glucose transporters: expression, regulation and cancer. Review. *Biol Res.* 35: 9-26.

Mueckler M.; Caruso C.; Baldwin S.A.; Panico M.; Blench I.; Morris H.R.; Allard W.J.; Liender G.E. and Lodish H.F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science.* 229: 941-945.

Mueckler, M. (1994). Facilitative glucose transporter. *Review Eur. J. Biochem.* 219: 713-725.

Mujica, A.L. (1999). Síntesis diferencial de proteínas y mRNAs durante la aclimatación al frío en *Deschampsia antarctica* Desv. Tesis. Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Pessin, J.E. and Bell, G.I. (1992). Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. Review. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 911-930.

Pohlmeier, K.; Soll, J.; Steinkamp, T.; Hinnah, S. and Wagner, R. (1997). Isolation and characterization of an amino acid-selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 9504-9509.

Ren, J.M.; Marshall, B.A.; Gulve, E.A.; Gao, J.; Johnson, D.; Holloszy, J.O. and Mueckler, M. (1993). Evidence form transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogeno deposition and glycolysis in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 268: 16113-16115.

Rosas, A.; Alberdi, M.; Delseny, M. and Meza-Basso, L. (1986). A cryoprotective polypeptide isolated from *Nothofagus dombeyi* seedlings. *Phytochemistry*. 25: 2497-2500.

Saier, M.H., Jr. (1998). Molecular phylogeny as a basis for the classification of transport proteins from bacteria, archaea and eukarya. *Adv. Microbiol. Physiol.* 40, 81-136.

Shepherd, P.R.; Gibbs, E.M.; Westan, C.; Gould, G.M. and Kahn, R.B. (1992). Human small intestine facilitative fructose/glucose transporter (GLUT5) is also present in insuline-response tissues and brain. Investigation of biochemical characteristic and translocation. *Diabetes*. 41: 1360-1365.

Silverman, M. (1991). Structure and function of hexose transporters. *Annual Review of Biochemistry*. 60: 757-794.

Biomedical Hypertexts. Hexose transporters (Bowen, R.).

[Http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hboks/molecules/hexose\\_xport.html](http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hboks/molecules/hexose_xport.html)

Thorens, B. (1993). Facilitated glucose transporters in epithelial cells. *Review. Annu. Rev. Physiol.* 55: 591-608.

Triviño, C. (1998). Papel de las proteínas en la crioprotección de *Deschampsia antarctica* Desv., e identificación de un transportador de fructosa. Tesis. Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Valenzuela, V. (1997). Germinación y transporte de hexosas en granos de polen. Tesis. Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Walmsley, A.R.; Barrett, M.P.; Bringaud, F. and Gould, G.W. (1998). Sugar transporters from bacteria, parasites and mammals: Structure-activity relationships. *Trends Biochem. Sci.* 23, 476-481.

Weber, A.; Servaites, J.C.; Geiger, D.R.; Kofler, H.; Hille, D.; Gröner, F.; Hebbeker, U. and Flügge, U.I. (2000). Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *The Plant Cell.* 12, 787-801.

Weber H.; Otth C.; Rauch M.C.; Triviño C.; Alberdi M. y Concha I.I. (1997). ¿Existen transportadores facilitativos de hexosas en cloroplastos aislados? Institutos de Bioquímica y Botánica. Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. V Exposición Científica Universidad Austral de Chile. 29 - 30 Nov. y 01 Dic.

Weber, H. (2001). Determinación de la existencia de un homólogo del transportador de fructosa GLUT5 en cloroplastos de *Deschampsia antarctica* Desv. y cambios en su expresión bajo aclimatación al frío. Tesis. Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile.

Wiese, A.; Gröner, F.; Sonnewald, U.; Deppner, H.; Lerchi, J.; Hebbeker, U.; Flügge, U.I. and Weber, A. (1999). Spinach hexokinase I is located in the outer envelope membrane of plastids. *FEBS Lett.* 461, 13-18.

Wright, E.M. (1993). *Annu. Rev. Physiol.* 55: 691-608.

Ziel, F.H.; Venkatesan, N. and Davison, M.B. (1988). Glucose transport is rate limiting for skeletal muscle glucose metabolism in normal and STZ-induced diabetic rats. *Diabetes*. 37: 885-890.

Zuñiga, G.E.; Alberdi, M. and Corcuera, L.J. (1996). Non structural carbohydrates in *Deschampsia antarctica* Desv. from South Shetland Islands, maritime Antarctic. *Environ Expert Bot*. 36: 393-399.