

Tesis de Posgrado

Caracterización bioquímica y molecular de la glicosiltransferasa autocatalítica UDP-glucosa : proteína transglucosilasa

Wald, Flavia A.

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Wald, Flavia A.. (2001). Caracterización bioquímica y molecular de la glicosiltransferasa autocatalítica UDP-glucosa : proteína transglucosilasa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3357_Wald.pdf

Cita tipo Chicago:

Wald, Flavia A.. "Caracterización bioquímica y molecular de la glicosiltransferasa autocatalítica UDP-glucosa : proteína transglucosilasa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3357_Wald.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“Caracterización bioquímica y molecular de la
glicosiltransferasa autocatalítica UDP-glucosa: proteína
transglucosilasa”**

Flavia A. Wald

Director: Dra. Silvia Moreno

Instituto de Investigaciones Bioquímicas

Dr. Luis J. B. ...

“Fundación ...mar”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
(Area: Química, Orientación: Bioquímica y Biología Molecular)

2001

Resumen

“Caracterización bioquímica y molecular de la glicosiltransferasa autocatalítica UDP-glucosa: proteína transglucosilasa”

La enzima UDP-glucosa: proteína transglucosilasa (UPTG) es una glicosiltransferasa autocatalítica descrita tanto en tubérculo de papa (*Solanum tuberosum* L.) como en endosperma de maíz (*Zea mays*), involucrada en la síntesis de polisacáridos.

Encontramos diferentes isoformas de UPTG de papa las cuales se expresaron en *E. coli* y se caracterizaron bioquímicamente. Las isoformas UPTG1 y UPTG2 no sólo presentan características cinéticas diferentes sino que además se expresan diferencialmente en los diversos tejidos de la planta. Se encontró una alta expresión de los transcritos de UPTG1 en estolones, tubérculos y raíces mientras que la expresión de los mensajeros de UPTG2 era elevada en todos los tejidos analizados, principalmente en hojas y tallos. El análisis del ADN genómico de papa sugiere la existencia de nuevas isoformas de UPTG, lo que sumado a la presencia de proteínas homólogas a la UPTG en otras especies vegetales, muestran que dichas glicosiltransferasas autocatalíticas constituirían una pequeña familia multigénica presente sólo en plantas superiores.

Los estudios bioquímicos de la reacción de glicosilación de la UPTG mostraron que un único residuo de glucosa, xilosa o galactosa se une a la enzima en configuración β , con un tipo de unión que se comportaría más bien como las del tipo N. Además, el análisis de la reversibilidad de la reacción de glicosilación mostró que la UPTG catalizaría la ruptura del enlace glicosídico.

El estudio de la naturaleza del inhibidor de la UPTG en maíz reveló que éste sería la isoforma SS1 de la sacarosa sintetasa presente principalmente en el endosperma. La isoforma SS1 ha sido relacionada recientemente con la biosíntesis de polisacáridos de pared celular y su asociación con la UPTG de maíz aporta una nueva evidencia a favor de dicha hipótesis.

Los resultados de esta Tesis muestran que la UPTG de papa podía ser fosforilada *in vitro*. El tratamiento con fosfatasa de la proteína UPTG recombinante mostró que la defosforilación de la UPTG incrementa su glicosilación y que a su vez, la glicosilación de la enzima favorece la aparición de formas de mayor tamaño molecular inmunológicamente relacionadas con la UPTG. Se piensa que la defosforilación de UPTG incrementaría su glicosilación promoviendo la asociación de la proteína a otras proteínas o a sí misma.

Se propone que la proteína UPTG se asociaría funcionalmente a elementos de anclaje, desconocidos hasta el momento, presentes en la membrana del Golgi facilitando el transporte de los UDP-azúcares sustratos de la biosíntesis de pectinas y hemicelulosas. Así, no podemos descartar que la defosforilación de la UPTG favorezca su asociación a membranas lo que podría involucrar un mecanismo de localización de la enzima. Los resultados con respecto al análisis de la expresión de ARNm de UPTG, sugieren que la enzima se expresaría principalmente en tejidos cuyas células estarían en estado de activo crecimiento y/o elongación. Basados en el hecho que en tejidos en elongación hay una activa síntesis principalmente de pectinas y hemicelulosas, los datos mostrados constituyen una fuerte evidencia que apoya la hipótesis que propone que la UPTG estaría involucrada en la síntesis de los polisacáridos no celulósicos que componen la pared celular vegetal.

Más aún, la existencia de isoenzimas redundantes de UPTG sugiere que la enzima formaría parte de un sistema complejo esencial para la viabilidad de la célula vegetal.

Palabras clave: glicosiltransferasas, Golgi, pared celular vegetal, polisacáridos, *Solanum tuberosum* L., UDP-glucosa: proteína transglucosilasa, *Zea mays*.

Abstract

“Biochemical and molecular characterization of the autocatalytic glycosyltransferase UDP-glucose: protein transglucosylase”

The enzyme UDP-glucose: protein transglucosylase (UPTG) is an autocatalytic glycosyltransferase involved in the biosynthesis of polysaccharides, which was described in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) and in maize endosperm (*Zea mays*).

We found at least two different UPTG isoforms from potato, we expressed the recombinant proteins in *E. coli* and their biochemical characteristics were determined. UPTG1 and UPTG2 isoforms not only showed different kinetic properties but also a differential mRNA expression in potato plants was observed. While UPTG1 expression was found predominantly in stolons, tubers and roots, UPTG2 expression was high in all the analyzed tissues but mainly in stems and leaves. The analysis of the potato genomic DNA suggested the existence of new isoforms of UPTG, what in addition to the presence of homologue UPTG proteins showed that these autocatalytic glycosyltransferases constitute a small multigenic family present only in higher plants.

The biochemical analysis of the UPTG glycosylation reaction showed that only one residue of glucose, xylose or galactose was bound to the enzyme in β configuration and that the carbohydrate behaved like N-glycosidically linked. Furthermore, when we analyzed the reversibility of the glycosylation reaction we found that in the presence of UDP, the glycosidic bond between UPTG and glucose was broken.

The nature of the UPTG inhibitor in maize was studied. We found that the SS1 isoform of sucrose synthase that is expressed predominantly in the endosperm, was responsible for UPTG inhibition. This isoform was recently related to cell wall polysaccharide biosynthesis and its association with UPTG provides a new evidence that supports this hypothesis.

The Thesis work showed that the potato UPTG can be phosphorylated *in vitro*. After phosphatase treatment, an increase in UPTG glycosylation was observed. Furthermore, the enzyme glycosylation promotes the appearance of high molecular weight polypeptides, which are immunologically related to UPTG. We think that UPTG dephosphorylation could stimulate its glycosylation favoring its association with other proteins or with itself.

We suggest that UPTG may functionally associates to anchoring elements, yet unknown, that are present in Golgi membranes facilitating the UDP-sugars transport from the cytosol for the synthesis of pectins and hemicelluloses. We cannot rule out that UPTG dephosphorylation could favor its association to membranes what may involve a localization mechanism of the enzyme. The results related to the expression of UPTG mRNA, suggested that the enzyme might be mainly expressed in actively growing or elongating tissues. The fact that in elongating tissues there is an active synthesis of pectins and hemicelluloses in addition to the results presented here, represent a strong evidence that supports the hypothesis that UPTG is involved in the synthesis of noncellulosic polysaccharides that constitute the plant cell wall. Moreover, the existence of redundant UPTG isozymes points out that the enzyme may form part of a complex system essential for the viability of the plant cell.

Key words: glycosyltransferases, Golgi, plant cell wall, polysaccharides, *Solanum tuberosum* L., UDP-glucose: protein transglucosylase, *Zea mays*.

Agradecimientos

A la Dra. Juana Tandecarz por haberme aceptado en su laboratorio y permitirme aprender y trabajar en el campo de la ciencia.

A la Dra. Silvia Moreno por haberme dirigido en este trabajo de Tesis, por haberme enseñado con paciencia y dedicación, por haberme brindado valiosas horas de su tiempo y por haber compartido conmigo no sólo su experiencia académica sino personal.

Al Consejo Directivo de la Fundación Campomar por haberme permitido desarrollar este trabajo de Tesis en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

Al FOMEC (Fondo para el Mejoramiento de la Calidad Universitaria) y a la Universidad de Buenos Aires por su apoyo económico.

Al Dr. Patrick du Jardin y a Ralph Kissen (Unidad de Biología Vegetal de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Bélgica) por la fructífera discusión de resultados.

A Mario Sakson, Marta Bravo, Amy Curto y Susana Raffo por la indispensable ayuda técnica a lo largo de estos años.

A todo el personal de apoyo y mantenimiento del IIB, que silenciosa y humildemente cumplen con su labor solucionando todo tipo de problemas.

A mis compañeros del laboratorio con quienes compartí incontables horas de trabajo y mates: Andrea Rothschild, María Julia García, Mara Roset y María Eugenia Cozzarín. Y especialmente a Silvia Bocca (Silvius), compañera de travesías, maestra indiscutible y referente en los momentos de desesperación.

A los amigos de fierro del IIB que siempre estuvieron allí, no sólo para brindarme su ayuda desinteresada con algún protocolo desconocido sino apoyándome y haciéndome el trabajo más grato y placentero: Diana Tolmasky, Caro Carrillo, Belén Cadenas, Mariana Berenstein, Ale Rabossi, Sofia Lavista Llanos, Caffé, Marta Bravo, Karin Hagelin, Martín Radrizzani, Martín Perez y muchos otros.

A toda mi familia, por su apoyo constante y principalmente por su inmenso afecto.

Índice

	Página
Introducción	
I. La célula vegetal	1
Generalidades	1
II. Estructura de los polisacáridos vegetales	4
II.1. Polisacáridos de reserva	4
II.2. Polisacáridos de pared	5
III. Biosíntesis de los polisacáridos vegetales	8
III.1. Síntesis de precursores activados	8
III.1.1. Sacarosa sintetasa	11
III.2. Glicosiltransferasas	12
Generalidades	12
III.2.1. Glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de polisacáridos estructurales	14
III.2.1.1. Glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de celulosa	15
La superfamilia de las celulosas sintetasas	15
Modelo topológico de la celulosa sintetasa	16
Mecanismo de síntesis de polisacáridos	18
III.2.1.2. Glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de hemicelulosas	22
Xilosiltransferasas	22
Galactosiltransferasas y fucosiltransferasas	23
Localización de la síntesis de los polisacáridos no celulósicos	23
Translocación de los precursores desde el citosol al sitio de síntesis	24
III.2.2. Glicosiltransferasas autocatalíticas	26
RGPs	26
IV. Sistema modelo de estudio	28
<i>Zea Mays</i>	28
<i>Solanum tuberosum</i>	29
V. Antecedentes del trabajo de tesis	32
VI. Objetivos de la Tesis	38
Materiales y Métodos	
1. Sustratos radioactivos	40
2. Preparaciones enzimáticas	40
2.1. Preparación de UPTG de papa y maíz	40
2.2. Preparación de UPTG de microtubérculos de papa	41

2.3. Preparación del inhibidor de UPTG (IP)	41
2.4. Preparación de UPTG recombinante	41
3. Protocolos de purificación	42
3.1. Purificación de UPTG de papa	42
3.2. Purificación del inhibidor IP de maíz	42
4. Determinación de actividades enzimáticas	43
4.1. Ensayo de actividad de UPTG	43
4.2. Ensayo de inhibición de UPTG	43
4.3. Ensayo de reversibilidad de la reacción de glicosilación	43
5. Enzimas auxiliares	44
5.1. Enzimas hidrolíticas	44
5.1.1. Ensayo de α -glucosidasa	44
5.1.2. Ensayo de β -glucosidasa	44
5.1.3. Ensayo de β -xilosidasa	44
5.1.4. Ensayo de α -galactosidasa	44
5.1.5. Ensayo de β -galactosidasa	45
5.2. Fosfatasa alcalina	45
6. Ensayo de β -eliminación	45
7. Técnicas cromatográficas	45
7.1. Cromatografía en capa delgada	45
7.2. Cromatografía en papel	46
8. Técnicas electroforéticas	46
8.1. Electroforesis en papel	46
8.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	46
8.3. Electroforesis en geles de agarosa	47
8.3.1. Geles para ADN	47
8.3.2. Geles para ARN	47
9. Técnicas inmunológicas	47
9.1. Western blot	47
9.2. Ensayo de neutralización	48
9.3. Inmunoprecipitación	48
10. Fosforilación <i>in vitro</i>	48
11. Determinación de proteínas	48
12. Northern blot	49
12.1. Aislamiento de ARN	49
12.2. Marcación de sondas radioactivas	49

12.3. Hibridización	49
13. Southern blot	50
13.1. Aislamiento de ADN genómico de plantas papa	50
13.2. Hibridización	50
14. Preparación de sondas específicas	50
14.1. Diseño de sondas específicas	50
14.2. Amplificación de sondas por PCR	51
15. Preparaciones de plásmidos	51
16. Subclonado de UPTG1 en pTrcHis y purificación parcial de la proteína recombinante	51
16.1. Subclonado de UPTG1 en pTrcHis	51
16.2. Expresión de la proteína recombinante	52
16.3. Purificación parcial de la proteína recombinante	52
17. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	53

Resultados

1. Caracterización bioquímica de la reacción de UPTG en <i>Solanum tuberosum</i>	54
1.1. Naturaleza del enlace glicosídico	54
1.1.1. Análisis de los productos	56
1.2. Reversibilidad de la reacción	58
1.3. Análisis de los productos de glicosilación luego de la incubación con dos azúcares en la mezcla de incubación	61
2. Caracterización bioquímica de la reacción de UPTG en <i>Zea mays</i>	64
2.1. Identificación de la naturaleza del inhibidor	64
2.1.1. Caracterización bioquímica	64
2.1.2. Caracterización inmunológica	68
2.2. Análisis de la actividad del inhibidor en distintos tejidos de plantas de maíz	69
2.3. Análisis de la expresión del inhibidor en mutantes <i>shrunk1</i> de maíz	73
3. Expresión de ARNm de UPTG en cultivos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de papa	76
3.1. Expresión de ARNm de UPTG en <i>Solanum tuberosum</i> usando como sonda el ADNc completo de UPTG1	76
3.1.1. Expresión de ARNm de UPTG en un sistema de tuberización <i>in vitro</i>	76
3.1.2. Expresión de ARNm de UPTG en distintos tejidos de plántulas de papa crecidas <i>in vitro</i>	79
3.1.3. Expresión de ARNm de UPTG en distintos tejidos de plantas de papa crecidas <i>in vivo</i>	82

3.2. Expresión de ARNm de UPTG en <i>Solanum tuberosum</i> usando sondas diferenciales para UPTG1 y UPTG2	83
3.2.1. Diseño y preparación de las sondas específicas	83
3.2.2. Expresión diferencial de ARNm de UPTG1 y UPTG2 en distintos tejidos de plantas de papa	86
4. Caracterización bioquímica y molecular de UPTG en sistemas recombinantes	88
4.1. Expresión y caracterización bioquímica de UPTG2 en <i>E. coli</i>	88
4.1.1. Determinación de constantes cinéticas	89
4.1.2. Determinación del pH óptimo de la reacción	91
4.1.3. Fosforilación de UPTG	93
4.1.3.1. Efecto de la fosforilación sobre la glicosilación de UPTG2	94
4.1.3.2. Efecto de la fosforilación sobre la oligomerización de UPTG2	97
4.1.3.3. Efecto de la glicosilación sobre el estado de oligomerización de la UPTG2	98
4.2. Expresión y caracterización parcial de UPTG3 en <i>E. coli</i>	99
4.2.1. Efecto de la glicosilación sobre la oligomerización de UPTG3	100
4.3. Clonado y expresión de UPTG1 en el plásmido pTrcHis	101
4.3.1. Purificación parcial de UPTG1	104
5. Análisis genómico de UPTG	106
5.1. Análisis por Southern blot	106
5.2. Análisis por PCR	107
Discusión	109
Conclusiones	118
Referencias	121

Abreviaturas

ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ADP-Glc	adenina difosfo glucosa
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
Asp (D)	ácido aspártico
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BSA	seroalbúmina bovina
cpm	cuentas por minuto
CTAB	cetiltrimetilamonio
dCTP	deoxi-citosina 5'-trifosfato
DEAE	dietilaminoetil
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilen-diamino-tetra-acético
EST	expressed sequence tag
FPLC	cromatografía líquida de rápida resolución
Fru	fructosa
Fuc	fucosa
Glc-1-P	glucosa-1-fosfato
His	histidina
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
IP	inhibitor protein of UPTG
IPTG	isopropil β -D-tiogalactósido
JA	ácido jasmónico
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
Km	constante de Michaelis-Menten
MES	ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
Pi	fosfato inorgánico
PMSF	parametilsulfonilfluoruro
PP _i	pirofosfato inorgánico
RGP	reversibly glycosylated polypeptides
S	sustrato
SDS	dodecil sulfato de sodio
SS	sacarosa sintetasa
TCA	ácido tricloroacético
TGN	<i>trans</i> Golgi network
Tris	tris (hidroximetil)-aminometano
UDP	uridina 5'-difosfato
UDP-Ara	uridina 5'-difosfo-arabinosa
UDP-Api	uridina 5'-difosfo-apiosa
UDP-Gal	uridina 5'-difosfo-galactosa

UDP-GalAU	uridina 5'-difosfo-ácido galacturónico
UDP-Glc	uridina 5'-difosfo-glucosa
UDP-GlcAU	uridina 5'-difosfo-ácido glucurónico
UDP-GlcNAc	uridina 5'-difosfo-N-acetilglucosamina
UDP-Man	uridina 5'-difosfo-manosa
UDP-Xil	uridina 5'-difosfo-xilosa
UMP	uridina 5'-monosfato
UPTG	UDP-glucosa: proteína transglucosilasa
UTP	uridina 5'-trifosfato
UV	ultravioleta
V	velocidad
Vmax	velocidad máxima

Introducción

I. La célula vegetal

Generalidades

Las plantas y los animales están separados por aproximadamente un billón de años de historia evolutiva. Ambos desarrollaron independientemente una organización multicelular, aunque usaron la misma batería inicial de genes heredada de un antecesor unicelular eucariota en común. Muchas de las diferencias en las estrategias evolutivas de las plantas se deben a dos características peculiares: la primera, es que éstas obtienen energía de la luz solar mediante el proceso de fotosíntesis y la segunda, es que sus células están rodeadas por paredes celulares semi-rígidas lo que les impide moverse como lo hacen los animales. Así las plantas desarrollaron mecanismos diferentes para formar el cuerpo y para enfrentar los cambios del medio ambiente.

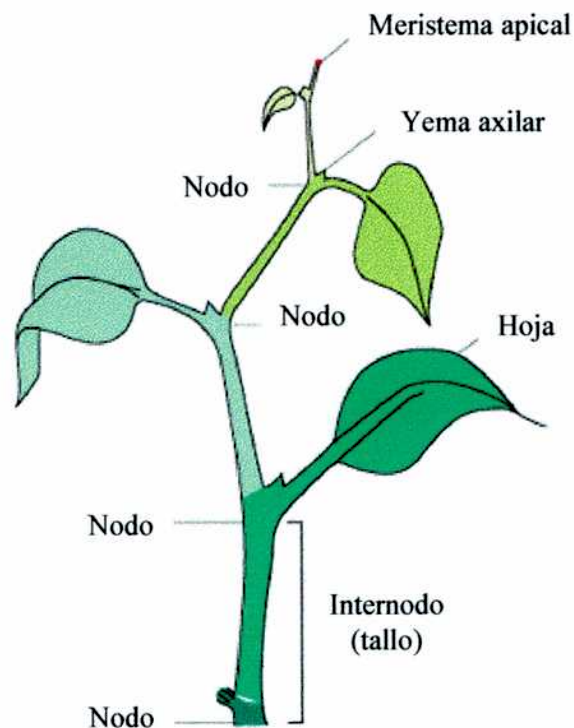


Figura 1. Estructura modular de las plantas superiores. Cada módulo (mostrado en distintos tonos de verde) consiste en un tallo, una hoja y una yema que contiene un centro potencial de crecimiento (el meristema). La yema se forma en el punto de ramificación o nodo, donde la hoja se diferencia del tallo. La actividad continua del meristema apical da origen a los módulos que surgen secuencialmente.

Además, a diferencia de lo que ocurre con los animales, las plantas crecen continuamente por el agregado secuencial de módulos o estructuras (Figura 1) que se originan en pequeños bolsillos de células en división llamados meristemas. Las células meristemáticas están empaquetadas densamente y se localizan en los puntos de crecimiento de tallos, raíces y otros órganos, persistiendo a lo largo de toda la vida de la planta y permitiendo una continua división celular. Dichas células sufren tres fases diferentes de desarrollo: división, elongación y diferenciación. En la etapa de elongación las células hijas pueden incrementar su volumen cincuenta veces o más.

Las células de las plantas superiores están rodeadas por una pared celular la cual no sólo define la forma y contribuye con la integridad estructural de la planta, sino que constituye la primer barrera de defensa de las plantas contra el ataque de patógenos. Las paredes celulares son fundamentales además, en procesos de morfogénesis, resistencia a enfermedades, reconocimiento celular, mecanismos de señalización celular y en el crecimiento de la planta. Dicha pared tiene que ser lo suficientemente fuerte como para soportar la presión osmótica y lo suficientemente flexible para permitir la expansión celular.

Las paredes celulares se clasifican en primarias y secundarias dependiendo del estadio de crecimiento de la célula en que estas paredes son formadas (Cosgrove, 1997). La pared primaria se deposita en la etapa de expansión y una vez que ha cesado dicha etapa, algunos tipos celulares también depositan una pared secundaria la cual les confiere fuerza mecánica.

La pared primaria consiste en una red tridimensional de microfibrillas de celulosa entrecruzadas con hemicelulosas (Figura 2) (Darvill y col., 1980; Zablackis y col., 1995). Dicha red está embebida en una matriz gelatinosa de polisacáridos ácidos ricos en ácido galacturónico (pectinas) unidos por puentes de calcio (Carpita y Gibeau, 1993). Las paredes primarias de las plantas superiores pueden clasificarse en paredes de tipo I (características tanto de monocotiledóneas como de dicotiledóneas) o de tipo II (características de las gramíneas). En las paredes de tipo I las microfibrillas de celulosa están interconectadas principalmente por xiloglucanos mientras que en las paredes de tipo II, las microfibrillas están unidas principalmente por glucuronoarabinosilanos.

Asimismo, la pared primaria está interconectada con proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos, y está parcialmente unida por sustancias aromáticas (Showalter, 1993). Algunas de dichas proteínas están involucradas en la modificación de la pared mientras que otras tienen funciones estructurales. Estas últimas se clasifican en proteínas ricas en glicina (GRPs) y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs). Las enzimas involucradas en la

biosíntesis o modificación de la pared, pueden estar iónica o covalentemente unidas a la red de celulosas o a la matriz péctica.

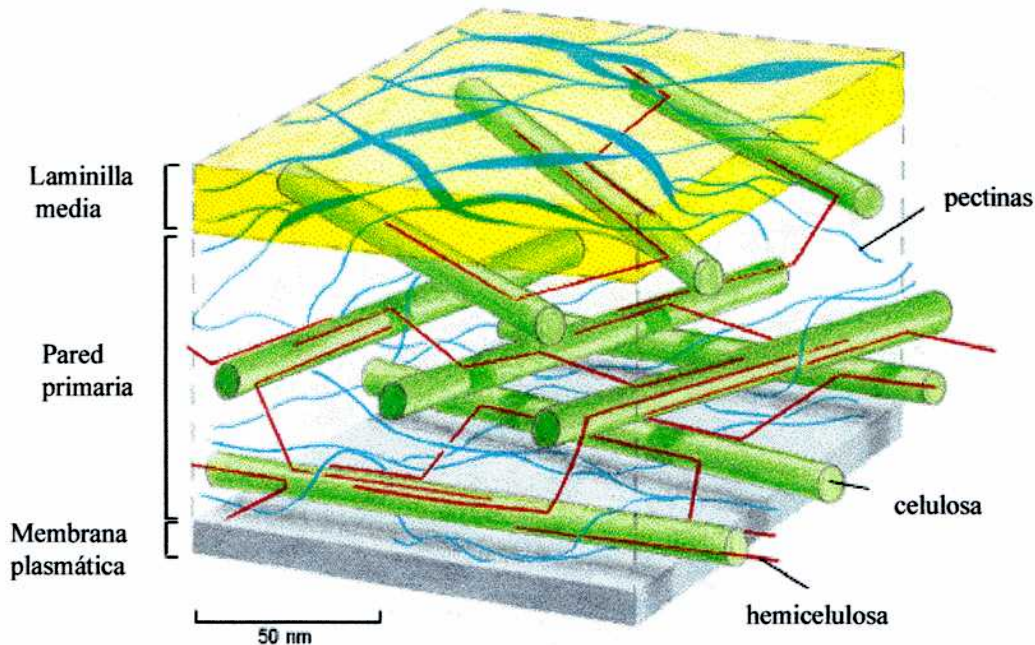


Figura 2. Modelo a escala de la pared primaria. Las fibrillas de celulosa (verde) se encuentran entrecruzadas con una red de hemicelulosas (rojo). Las mismas, se superponen con otra red formada por los polisacáridos pécticos (azul). Las celulosas y las hemicelulosas le proveen flexibilidad a la pared mientras que las pectinas le otorgan resistencia a la compresión. La laminilla media es rica en pectinas y participa en la adhesión entre células. (Alberts y col., 1994)

La pared celular es una estructura dinámica en donde las células adyacentes se comunican entre sí por medio de los plasmodesmos. Estos canales complejos proveen a las células de la fuerza estructural suficiente para fijar su posición (Crawford y Zambryski, 1999). La expansión celular depende de la coordinación entre el relajamiento de la estructura original de la pared y la deposición del nuevo material. Se piensa que la rigidez estructural y la fuerza de la pared celular dependen fundamentalmente de la integridad de la red de celulosa/hemicelulosa, por lo tanto las modificaciones enzimáticas de las hemicelulosas son esenciales para la expansión de la pared durante el crecimiento celular (Talbot y Ray, 1992). Dicha expansión, es mediada por las expansinas que son pequeñas

proteínas que debilitan las uniones no covalentes entre los polisacáridos de la pared (Cosgrove, 2000).

II. Estructura de los polisacáridos vegetales

Los polisacáridos vegetales constituyen un campo de gran significación biológica, son los compuestos biológicos más abundantes sobre la tierra y la principal fuente de energía de los seres vivos. Los polisacáridos son macromoléculas constituidas por monómeros de azúcares y son uno de los principales constituyentes de la planta. Los mecanismos de síntesis de polisacáridos involucran varias etapas independientes como la iniciación, la elongación y la terminación de la cadena. El conocimiento de ciertas características de la biosíntesis de polisacáridos vegetales ha progresado mucho aunque se sabe poco sobre la etapa de iniciación de la síntesis de los mismos y su regulación. Esta falta de conocimiento hace que actualmente sea muy difícil para el hombre modificar, tanto a un nivel cualitativo como cuantitativo, los polisacáridos de la planta por no contar con estrategias genéticas efectivas para manipular los mismos.

II.1 Polisacáridos de reserva

Una sustancia de reserva es aquella que puede ser rápidamente degradada para proveer energía o para construir nuevos componentes. Desde este punto de vista, no sólo el almidón y los fructanos sino algunos polisacáridos de la pared celular pueden ser considerados como sustancias de reserva ya que en algunos tejidos senescentes éstos son degradados originando monosacáridos que son luego incorporados a otros polisacáridos.

Almidón: es la principal reserva de carbono de las plantas. Consiste en diversos polímeros de glucosa organizados en gránulos que forman una estructura tridimensional y cristalina (Myers y col., 2000). El almidón se sintetiza durante el día a partir de la fijación de carbono producto de la fotosíntesis, dentro de los cloroplastos en las hojas y es movilizado durante la noche. También se sintetiza transcientemente en otros órganos como en los meristemas, pero se acumula mayoritariamente en órganos de reserva que pueden ser semillas, frutas, tubérculos y raíces. El almidón que se encuentra en los órganos de reserva, se sintetiza y acumula en los amiloplastos que son plástidos especializados en la síntesis de dicho polisacárido. El almidón puede ser fraccionado en dos polímeros diferentes: la amilosa y la

amilopectina. La amilosa consiste en cadenas lineales de α -1,4-glucosa de aproximadamente 1000 residuos de longitud levemente ramificada por α -1,6-glucosa y representa ~30% del almidón total. Esta cantidad puede variar de acuerdo a la especie vegetal, el tejido, el estadio de desarrollo de ese tejido y las condiciones de crecimiento de esa planta (Martin y Smith, 1995). La amilopectina que constituye ~70% del almidón total, consiste también en un homopolímero de α -1,4-glucosa pero está altamente ramificada por α -1,6-glucosa y forma estructuras más organizadas.

Fructanos: son polímeros de D-fructosa altamente solubles en agua que están presentes en más del 10% de las plantas vasculares y en algunos casos se pueden acumular a largo plazo en las vacuolas de órganos como tubérculos, tallos y semillas. Por ser osmóticamente activos, se propuso que los fructanos podrían disminuir el punto de congelamiento de las células.

Mananos: se encuentran formando parte de las paredes de las células del endosperma en algunas plantas. En los mananos, las unidades de manosa están unidas predominantemente por uniones β -D-(1 $\rightarrow$ 4).

Callosa: son polímeros de β -1,3-glucosa que se sintetiza en respuesta a heridas, stress fisiológico o infecciones (Delmer, 1987; Hayashi y col., 1987; Stone y Clarke, 1992; Kauss, 1996). La callosa también se deposita en paredes especializadas o en estadios particulares del desarrollo y la diferenciación de semillas, polen, plasmodesmos, etc. (Fincher y Stone, 1981; Stone y Clarke, 1992).

II.2 Polisacáridos de pared

Celulosa: es un polímero lineal formado por monómeros de glucosa unidos en posición β -1,4. Está compuesto por 50-80 cadenas lineales posicionadas en paralelo y estrechamente unidas por puentes de hidrógeno formando estructuras llamadas microfibrillas. Las celulosas de distintos tejidos se diferencian en su grado de polimerización y en el grado y tipo de cristalinidad de las cadenas de glucano dentro de las microfibrillas. Estudios de microscopía electrónica sugieren que la síntesis de celulosa se llevaría a cabo en un complejo proteico en forma de roseta, localizado en la membrana plasmática (Cuttler y Somerville, 1997).

Hemicelulosas: son polisacáridos heterogéneos que están constituidos por una cadena lineal de β -1,4-glucanos con pequeñas ramificaciones laterales. Son moléculas neutras que se extraen de la pared con álcali y se piensa que se asocian no covalentemente con la celulosa interconectando las microfibrillas (Hayashi, 1989; Hayashi y col., 1994) Entre las hemicelulosas podemos encontrar a los xiloglucanos, los xilanos y los glucomananos entre otros (Figura 3).

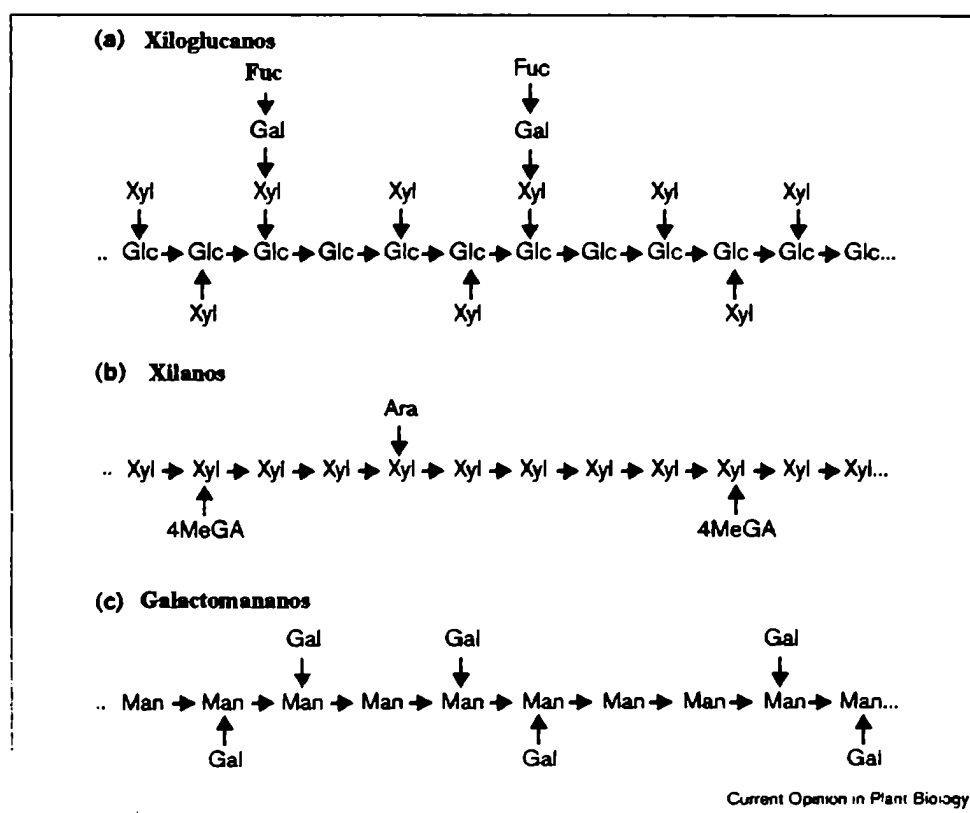


Figura 3. Estructuras parciales de algunas hemicelulosas. El esqueleto β -1,4 lineal presenta ramificaciones laterales. (A) Xiloglucanos: el esqueleto de β -1,4-D-Glc tiene ramificaciones α -1,6 Xil, la Xil está unida en β -1,2 a Gal y la Gal está unida en α -1,2 a la Fuc. (B) Xilanos: la cadena de β -1,4-D-Xil tiene pequeñas ramificaciones que incluyen 4-O-metil-D-glucurónico (4MeGA) unido en α -1,2 y arabinofuranosa (Ara) unida en α -1,2 o α -1,3. (C) Galactomananos: es una esqueleto de β -1,4-D-manano (Man) que tiene ramificaciones de α -1,6-D-galactosa (Gal). (Reid, 2000)

Los xiloglucanos son los más abundantes y forman una red de celulosa-xiloglucanos que caracteriza a las paredes primarias de tipo I. Los xiloglucanos son polisacáridos que están formados también por cadenas lineales de (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucosa, pero a diferencia de la

celulosa, tienen numerosas ramificaciones. Cerca del 75% de los residuos de glucosa están sustituidos en el carbono 6 con unidades de α -D-xilosa (Bauer y col., 1973; Hayashi, 1989). Entre 1/3 y 1/2 de los residuos de α -D-xilosa están sustituidos en el carbono 2 con residuos de β -D-galactosa y éstos a su vez están frecuentemente sustituidos con residuos de α -L-fucosa. El residuo de galactosa puede también estar sustituido con 1 o 2 grupos O-acetilo. En algunas especies como las Solanaceas, la galactosa y la fucosa son reemplazadas por residuos de α -L-arabinosa unidos a los residuos xilosa.

Los xilanos son abundantes en las paredes primarias de las monocotiledóneas pero se encuentran sólo en pequeñas cantidades en las paredes primarias de las dicotiledóneas. Están constituidos por cadenas lineales de (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-xilosa con ramificaciones en el O-2 y O-3 de los residuos xilosa consistentes en un único residuo de arabinosa (arabinoxilanos) y, menos frecuentemente, una única unidad de ácido glucurónico (glucuronoarabinoxilanos).

Los galactomananos son muy poco abundantes y sólo se encuentran en algunas paredes primarias. Se acumulan en gran cantidad en tejido en diferenciación y especialmente en las paredes del endosperma de las semillas y de los cotiledones, donde luego de la germinación los polisacáridos son movilizados y utilizados como reserva de alimentos. Su esqueleto está exclusivamente formado por residuos (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-manosa con unidades de α -D-galactosa unidas en la posición O-6.

Pectinas: son componentes abundantes de las paredes primarias, constituyen alrededor del 35% de las paredes de tipo I (compuestas principalmente por celulosa, xiloglucanos y pectinas) y una menor proporción de las paredes de tipo II (compuestas principalmente por celulosa, arabinoxilanos y glucanos) que son típicas de las gramíneas. Las pectinas son macromoléculas ácidas estructuralmente complejas que forman una red gelatinosa y se definen clásicamente como el material extraído de la pared celular con quelantes de Ca^{2+} o con ácidos diluidos. El homogalacturonano (HG) y el ramnogalacturonano I (RGI) son los más abundantes y el ramnogalacturonano II (RGII) está presente en menor proporción (O'Neill y col., 1990). El homogalacturonano está formado por una cadena lineal de α -1,4-D- ácido galacturónico que puede estar o no metil-esterificada (Morris, 1980). Los segmentos no esterificados pueden condensarse por entrecruzamiento con Ca^{2+} que actúa uniendo dos cadenas antiparalelas. El ramnogalacturonano I es un heteropolímero constituido por la unidad disacarídica repetitiva (1 $\rightarrow$ 2)- α -L-ramnosa-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-ácido galacturónico (Lau y col., 1985). El ramnogalacturonano II es un polisacárido ramificado relativamente pequeño (~6 kDa) compuesto de alrededor de 11 azúcares distintos (York y col., 1985; Stevenson y col., 1988). Las ramificaciones laterales son complejas y contienen

sitios de O-acetilación y metil esterificación. Aunque su estructura está altamente conservada en plantas tan diversas como monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, su función específica todavía no ha sido determinada.

III. Biosíntesis de los polisacáridos vegetales

La biosíntesis de los polisacáridos vegetales comprende al menos 3 etapas: la formación de monosacáridos activados a partir de la interconversión de azúcares, el transporte de estos precursores desde el citosol al sitio de síntesis y finalmente la síntesis de polisacáridos a partir de los monómeros activados, catalizada por las enzimas denominadas glicosiltransferasas. Dependiendo del tipo de polisacárido, la síntesis puede ocurrir en el citosol o en algún compartimento subcelular como por ejemplo los plástidos o el aparato de Golgi.

III.1 Síntesis de precursores activados

Todos los polisacáridos se sintetizan a partir de nucleótido difosfo-azúcares (NDP-azúcares) (Feingold y Avigad, 1980). A pesar de lo mucho que se conoce sobre la síntesis de NDP-azúcares en plantas superiores, los genes que codifican las enzimas que interconvierten nucleótido-azúcares han sido identificados en los últimos tiempos (Dörmann y Benning, 1996; Tenhaken y Thulke, 1996; Bonin y col., 1997; Seitz y col., 2000). La caracterización de dichos genes es de gran interés ya que al actuar en los primeros pasos de la biosíntesis de polisacáridos podrían ejercer funciones regulatorias.

El UDP-Glc en las plantas superiores es uno de los principales sustratos para: 1) la síntesis de sacarosa en el citosol vía la sacarosa fosfato sintetasa y la sacarosa fosfato fosfatasa, 2) la síntesis de celulosa, hemicelulosas, pectinas, como precursor directo o indirecto y 3) la síntesis de almidón como precursor directo o indirecto a través de su conversión en ADP-Glc (Figura 4).

En los tejidos fotosintéticos, el UDP-Glc deriva de la Glc-1-P por la acción de la enzima UDP-Glc pirofosforilasa que cataliza la siguiente reacción: $\text{Glc-1-P} + \text{UTP} \leftrightarrow \text{UDP-Glc} + \text{PPi}$ (Kleczkowski, 1994). La Glc-1-P es preferentemente transportada a los amiloplastos donde se utiliza para la síntesis de almidón vía el ADP-Glc (ap Rees, 1989).

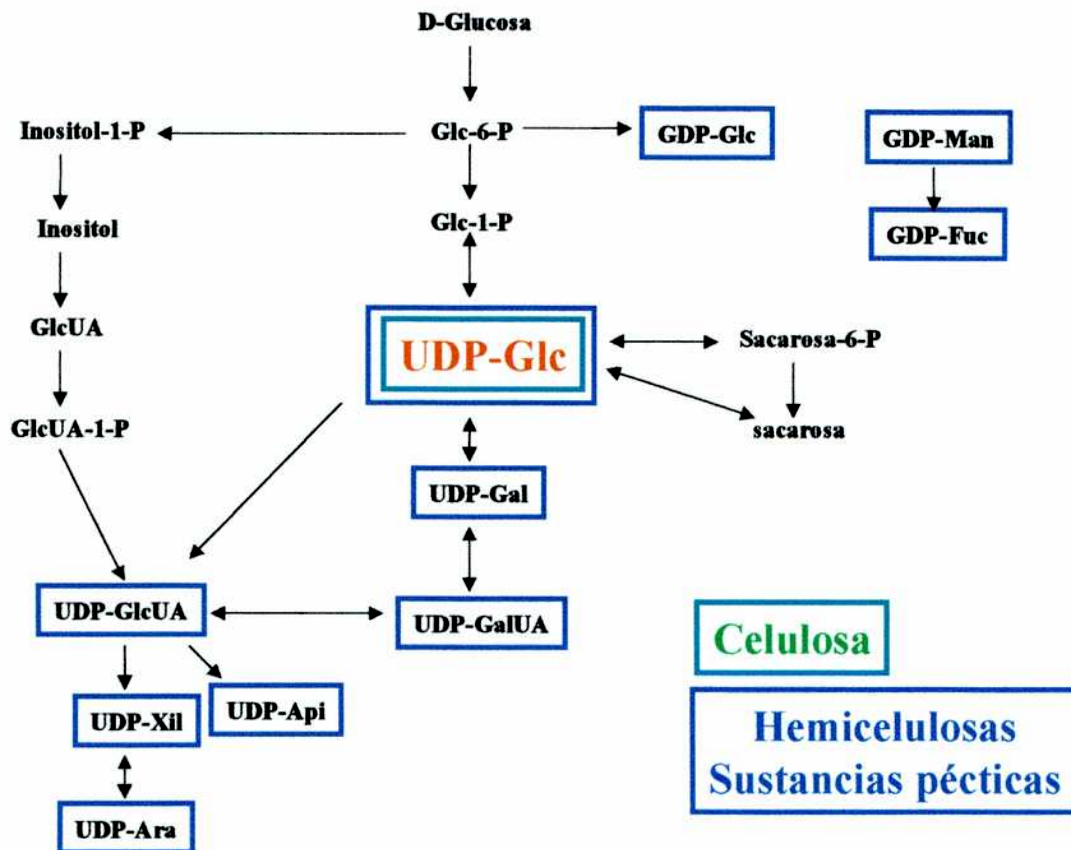


Figura 4. Síntesis de los principales precursores activados involucrados en la composición de la pared celular. El UDP-Glc es uno de los sustratos fundamentales para la síntesis de carbohidratos en las plantas superiores. La GDP-L-Fuc se sintetiza independientemente del UDP-Glc, a partir de la GDP-D-Man. Los sustratos para la síntesis de celulosa están recuadrados en verde y los sustratos para la síntesis de hemicelulosas y sustancias pécticas están recuadrados en azul.

Se considera que el UDP-Glc está compartimentalizado casi enteramente en el citosol aunque no se descarta la presencia de una pequeña reserva plastidial. Además, la UDP-Glc pirofosforilasa se ha descrito casi exclusivamente en el citosol, pero en algunas plantas se ha encontrado considerable actividad asociada con fracciones de membrana (Nishimura y Beevers, 1979). Estudios inmunocitoquímicos y bioquímicos usando anticuerpos contra UDP-Glc pirofosforilasa de arroz sugieren que la enzima se encuentra localizada en un 90% en el citosol de células de arroz y el restante 10% está distribuido en las membranas de los amiloplastos y del aparato de Golgi (Kimura y col., 1992).

Otra ruta de síntesis del UDP-Glc es a partir de la enzima sacarosa sintetasa que cataliza la siguiente reacción reversible: sacarosa + UDP $\leftrightarrow$ UDP-Glc + fructosa. Esta enzima se encuentra en grandes cantidades en los tejidos no fotosintéticos en donde, junto con las invertasas, degrada la sacarosa proveyendo sustratos, principalmente, para la síntesis de almidón.

Los polisacáridos de pared son más complejos que el almidón y además de glucosa contienen altos niveles de galactosa y fucosa. El UDP-Glc puede convertirse en UDP-Gal gracias a la acción de la UDP-Glc 4-epimerasa, una enzima citosólica (Dörmann, 1996). La forma activada de la L-Fuc es la GDP-L-Fuc que se sintetiza a partir de la GDP-D-Man por medio de un mecanismo que involucra una GDP-D-Man 4,6-dehidratasa y una 3,5-epimerasa-4-reductasa bifuncional (Bonin y Reiter, 2000).

Mientras que la celulosa se compone de Glc, las hemicelulosas se sintetizan a partir de UDP-Ara, UDP-Api, UDP-GalUA y UDP-Xil. Todos estos UDP-azúcares son derivados del UDP-GlcUA.

El ácido urónico (UA) puede epimerisarse y dar UDP-GalUA, que es el principal precursor para la síntesis de sustancias pécticas. A su vez, el UDP-GalUA puede sufrir una decarboxilación y transformarse en UDP-Xil. El UDP-Xil puede epimerisarse dando UDP-Ara (Gibeaut y Carpita, 1994). Por lo tanto el UDP-GlcUA es el precursor también de los nucleótido-azúcares necesarios para la síntesis de diversas hemicelulosas (arabinanos, arabinogalactanos, glucuronoarabinosilanos, ramnogalacturonanos, xilanos y xiloglucanos). Se sugirió que la producción de UDP-GlcUA sería un punto de regulación en la síntesis de polisacáridos de pared ya que la enzima UDP-GlcDH (dehidrogenasa) que oxida el UDP-Glc convirtiéndolo en UDP-GlcUA, compromete irreversiblemente la reserva de nucleótido-azúcares para la síntesis de pared (Robertson y col., 1995). Luego del clonado de la enzima UDP-GlcDH (Tenhaken y Thulke, 1996) se encontró que su regulación es a nivel transcripcional ya que la expresión de su ARNm se correlaciona con el crecimiento de los órganos de las plantas, en donde se necesita el UDP-GlcUA para la activa síntesis de los polisacáridos de la matriz (Seitz, 2000).

Existe una segunda vía biosintética para la producción del UDP-GlcUA. En esta ruta, la Glc-6-P se convierte en GlcUA a partir del inositol, luego el GlcUA se activa por el agregado del UDP (Loewus, 1982).

III.1.1 Sacarosa sintetasa

La sacarosa sintetasa (SuSy o SS, EC 2.4.1.13) es una enzima clave en el metabolismo de los polisacáridos vegetales y está presente principalmente en órganos de reserva como ser tubérculos, semillas, etc. Dicha enzima cataliza la reacción reversible: sacarosa + UDP $\rightleftharpoons$ UDP-Glc + Fru, y los productos UDP-Glc (o Glc-1-P) y Fru son utilizados en diversos caminos metabólicos que incluyen la glicólisis, la biosíntesis de almidón y la síntesis de celulosa y callosa.

En las monocotiledóneas se han encontrado dos genes que codifican para dos isoformas diferentes de SS (Shaw y col., 1994). Las isoformas SS1 y SS2 de diversas especies fueron comparadas y se encontró que las constantes cinéticas, la especificidad de sustratos y la estructura eran muy similares entre ambas isoenzimas. Sin embargo, la expresión de ambos genes es diferencial y puede ser modulada por diversas condiciones como por ejemplo los niveles de azúcar del tejido o el stress anaeróbico (Chourey y Taliencio, 1994; Shaw y col., 1994; Ruan y col., 1997; Chourey y col., 1998).

Si bien la SS fue primero descripta en trigo (Cardini y col., 1955), la más estudiada hasta hoy en día es la SS de maíz. En maíz se han reportado dos isoenzimas bioquímicamente similares, la SS1 (codificada por el locus *Shrunken 1*) y la SS2 (codificada por el locus *Sus1*) (Chourey, 1981; Echt y Chourey, 1985). La isoenzima SS1 está presente en altos niveles en el endosperma inmaduro (Chourey y Nelson, 1976) mientras que la SS2 está presente en una variedad de tejidos como por ejemplo endosperma, embrión, tallos y raíces (McCarty y col., 1986; Nguyen-Quoc y col., 1990).

El mutante de maíz *shrunk* (*sh1*) carece de la isoforma SS1 y presenta diversas alteraciones en el endosperma como ser una reducción en los niveles de almidón (Chourey y Nelson, 1976) y alteraciones en la pared celular producto de una degeneración celular temprana relacionadas con en la síntesis de los componentes de la pared celular (Chourey y col., 1991). Contrariamente, la inactivación del gen *Sus1* no provoca cambios fenotípicos visibles (Chourey y col., 1988).

Aunque históricamente siempre se asoció a la enzima SS sólo con la síntesis de almidón, hoy en día hay evidencia que sugiere que la enzima podría estar relacionada también con la síntesis de pared celular. Chourey y col. (1998) observaron que mientras la isoforma SS2 de maíz tenía un rol preponderante en la generación de precursores para la síntesis de almidón, la SS1 estaría relacionada con la síntesis de polisacáridos de pared celular. Esto concuerda con el modelo propuesto por Amor y col. (1995) que sugirieron que la forma SS asociada a la membrana plasmática interactuaría con la celulosa sintetasa para proveerle directamente el UDP-Glc al complejo de síntesis.

Además, hasta hace no mucho tiempo atrás se creía que la SS era exclusivamente una enzima citosólica sin embargo, actualmente se sabe que esto no es cierto pues se encontró una forma de sacarosa sintetasa asociada a la membrana en diversas plantas (Keller y col., 1988). Amor y col., 1995; Carlson y Chourey, 1996; Winter y col., 1997). Recientemente también se encontró una asociación entre la sacarosa sintetasa y la actina sugiriendo una relación con el citoesqueleto (Winter y col., 1998).

Se encontró que la SS de maíz y de soja eran capaces de fosforilarse en el residuo Ser (Huber y col., 1996; Zhang y Collet, 1997). Se propuso que dicha regulación post-traducciona modularía la actividad enzimática, pero posteriormente Winter y col. (1997) encontraron que la fosforilación de la forma de SS asociada a la membrana causaba la liberación de la misma mientras que la defosforilación de la enzima soluble favorecía su asociación con la membrana. También observaron que la defosforilación causaba cambios conformacionales en la proteína provocando una mayor exposición de los sitios hidrofóbicos sobre la molécula. Basados en estos datos se sugirió que la fosforilación de SS sería parte de un mecanismo que controla su localización (Winter y col., 1997, 1998; Zhang y col., 1999). Una mayor asociación a membranas sería necesaria para incrementar la deposición de polisacáridos en la pared celular, por ejemplo en la etapa de elongación.

III.2 Glicosiltransferasas

Generalidades

Las glicosiltransferasas constituyen un importante grupo de enzimas ya que están presentes en todos los organismos y están involucradas en diversas funciones celulares. Dichas enzimas catalizan la transferencia de un azúcar dador a una molécula aceptora. Dependiendo de la especificidad del sustrato dador y del aceptor y de la naturaleza del enlace formado, la reacción puede ser catalizada por una glicosiltransferasa en particular. Mientras que existe una variedad de moléculas aceptoras (azúcares, proteínas, ADN o lípidos) (Bill y col., 1998), las moléculas dadoras son principalmente nucleótido-azúcares de alta energía, aunque también pueden ser azúcares fosfato o disacáridos (Saxena y col., 1995).

Generalmente las glicosiltransferasas actúan secuencialmente, es decir que el oligosacárido producto de una enzima sirve como sustrato aceptor para la acción siguiente de otra glicosiltransferasa (Varki y col., 1999). El resultado es un polímero lineal y/o ramificado de monosacáridos encadenados unos con otros con gran precisión. Esta

precisión se debe a la gran especificidad por el sustrato aceptor que exhiben la mayoría de estas enzimas

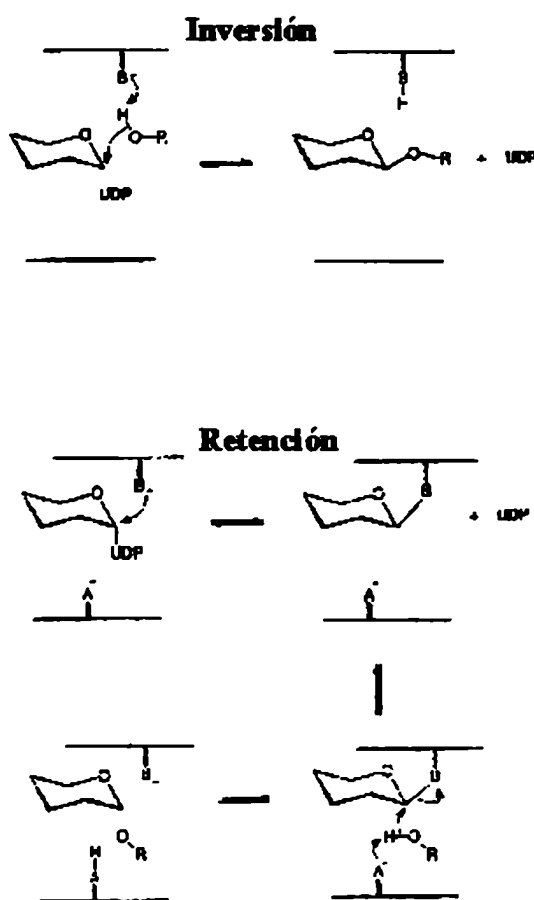


Figura 5. Mecanismos propuestos para la transferencia glicosídica a partir de un nucleótido difosfo-azúcar. En el mecanismo de inversión, una única sustitución nucleofílica en el C anomérico del azúcar lleva a la formación de una unión β a partir de un dador unido en α . El mecanismo de retención involucra la formación transiente de una enzima glicosilada y subsecuentemente se agrega al aceptor. Ambas sustituciones nucleofílicas en el C anomérico del azúcar resultan en la formación de una unión α a partir de otra unión α . ROH representa al aceptor, A representa la base catalítica y B representa el nucleófilo. (Saxena y col., 1995)

Como puede esperarse por la gran variedad de estructuras de glicanos presentes en la naturaleza, existe una gran familia de glicosiltransferasas. Las glicosiltransferasas pueden clasificarse en base a la homología de secuencias, a la existencia de motivos conservados, a su especificidad catalítica o a la estereoquímica de los sustratos y los productos de la

reacción (Sinnot, 1990; Campbell y col., 1998; Kapitonov y Yu., 1999). Según este último criterio, las glicosiltransferasas pueden clasificarse en enzimas de retención o de inversión, dependiendo de si modifican o no la conformación anomérica de la posición C1 del azúcar dador (Figura 5).

Otra manera de clasificar a las glicosiltransferasas es en procesivas y no procesivas dependiendo si transfieren múltiples residuos de azúcar o un único residuo azúcar al aceptor.

Si bien no hay gran homología de secuencias entre las distintas glicosiltransferasas Saxena y col. (1995) descubrieron, mediante el análisis de grupos hidrofóbicos, la existencia de motivos cortos altamente conservados que estarían involucrados en la unión al sustrato y al aceptor.

III.2.1 Glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de polisacáridos estructurales

Si bien se conoce profundamente la composición de los polisacáridos vegetales en general, poco se sabe sobre las enzimas involucradas en su biosíntesis (McNeil y col., 1984; Carpita y Gibeau, 1993; Carpita y col., 1997; Myers y col., 2000).

La identificación del primer componente del complejo de biosíntesis de celulosa, CelA (Pear y col., 1996), es tan sólo el comienzo del conocimiento de una multitud de genes involucrados en la biosíntesis de la pared celular (Varner y Lin, 1989). Los mutantes deficientes en la síntesis de celulosa y hemicelulosas constituyen una herramienta valiosa para el estudio de cómo y cuándo los polisacáridos de pared celular son sintetizados (Reiter y col., 1993; Reiter y col., 1997; Turner y Somerville, 1997; Arioli y col., 1998).

III.2.1.1 Glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de celulosa

La superfamilia de las celulosas sintetetasas

El gen de la subunidad catalítica de la celulosa sintetasa fue identificado por primera vez en *Acetobacter xylinum* (Saxena y col., 1990). El conocimiento de la secuencia aminoacídica de dicho gen (CesA) posibilitó la identificación de otras glicosiltransferasas, como así también de secuencias altamente conservadas en un gran número de enzimas que utilizan UDP-Glc o UDP-GlcNAc como sustratos (Saxena y col., 1994; Delmer y Amor, 1995). Como mencionamos anteriormente (punto III.3), las glicosiltransferasas pueden ser clasificadas en procesivas y no procesivas de acuerdo a si transfieren un único o varios residuos de azúcar a la molécula aceptora. Saxena y col. (1995), utilizando la técnica de análisis por grupos hidrofóbicos (HCA, hydrofobic cluster analysis), encontraron que las enzimas procesivas tenían dos dominios conservados (dominios A y B) mientras que las no procesivas conservaban el dominio A únicamente. En el dominio A se encontraron dos residuos Asp (D) conservados mientras que en el dominio B se encontró un Asp conservado seguido río abajo por una secuencia QXXRW. La secuencia DXD resultó involucrada en la unión del UDP del UDP-azúcar dador (Gastinel y col., 1999).

La búsqueda en bancos de datos de la secuencia ...D...D...D...QXXRW resultó en la identificación de diversas secuencias EST de *Arabidopsis thaliana*, *Brassica campestris* y *Oriza sativa* que probablemente codifican para glicosiltransferasas procesivas (Saxena y Brown, 1997). Así se encontró una superfamilia que incluye genes que codifican para las celulosas sintetetasas (CesA) y otros genes similares los cuales se denominaron Csl (cellulose-synthase like) (Richmond y Somerville, 2000).

La celulosa sintetasa forma parte de la familia GT-2, cuyas glicosiltransferasas invierten la conformación anomérica del azúcar sustrato (Campbell y col., 1997). Las proteínas codificadas por los genes Csl atraviesan la membrana un par de veces en el extremo amino-terminal y varias veces en el extremo carboxi-terminal y poseen una región citoplasmática extensa que incluye el sitio catalítico (Saxena y Brown, 2000). Las proteínas Csl probablemente estén involucradas en la síntesis del esqueleto de los polisacáridos no-celulósicos o de β -oligosacáridos. Se piensa que la celulosa sintetasa estaría localizada en la membrana plasmática mientras que las proteínas Csl probablemente localicen en el aparato de Golgi.

Modelo topológico de la celulosa sintetasa

El análisis de la topología de las proteínas CesaA mostró que seis subunidades se asociarían en forma de roseta en la membrana plasmática de la célula vegetal (Brown y Saxena, 2000). La celulosa sintetasa está codificada por una gran familia de genes y sería posible que éstos codificaran para distintas isoformas con diferentes funciones. Es probable que la roseta esté compuesta por diversas isoformas y que la combinación de estas isoformas regulara la composición de celulosa de la pared. El modelo topológico predice que las 8 hélices de las proteínas CesaA atravesarían las membrana y se asociarían entre sí para formar un canal central a través del cual el glucano sería secretado y depositado en la pared (Figura 6) (Delmer, 1999).

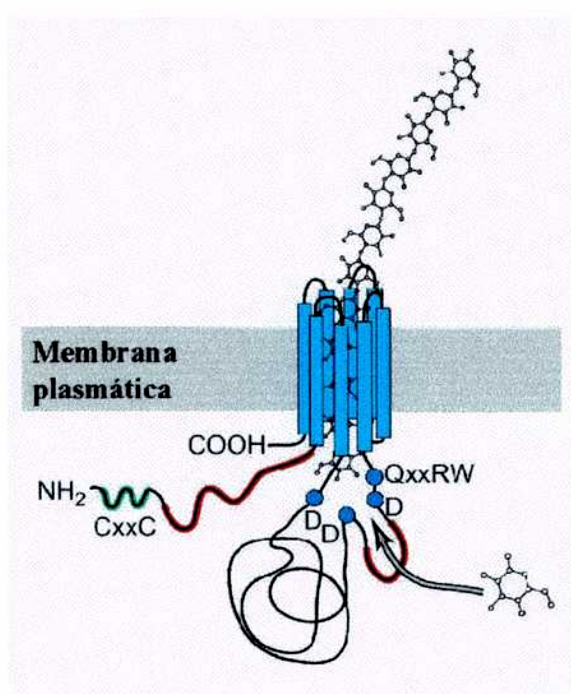


Figura 6. Estructura tridimensional hipotética de las proteínas CesaA. Las 8 hélices transmembrana formarían un poro en la membrana plasmática a través del cual la cadena de celulosa se secretaría a la pared celular (Delmer, 1999). Los dominios que contiene los tres Asp y el motivo QXXRW de cada subunidad se plegarían de tal manera de permanecer unidos entre sí, esta región estaría involucrada en la unión al sustrato e incluiría el sitio catalítico. Una subunidad CesaA como la que se muestra en este esquema, debe interactuar con otras subunidades para formar el complejo de síntesis. (Richmond, 2000)

La estructura de estas proteínas presenta una región cercana al N-terminal que contiene dos dedos de zinc y presenta homología con factores de transcripción de plantas (Richmond, 2000). Las proteínas CesA también contienen un dominio hipervariable, que no presenta una homología significativa con ninguna otra proteína pero que podría intervenir en la asociación entre las subunidades que forman la roseta, y algunos dominios específicos de plantas los cuales interactuarían con otras proteínas. Dos candidatos que parecen interactuar con las proteínas CesA son el citoesqueleto y la sacarosa sintetasa (E.C.2.4.1.13).

Ya se había descrito una forma de sacarosa sintetasa asociada a la membrana plasmática en diversas plantas (Amor y col., 1995; Carlson y Chourey, 1996; Winter y col., 1997). Amor y col. (1995) sugirieron que dicha forma de SS interactuaría directamente con el complejo de síntesis proveyéndole directamente UDP-Glc a la celulosa sintetasa (Figura 7). El hecho que la roseta esté asociada a la sacarosa sintetasa sugiere una posible relación del metabolismo citoplasmático con la arquitectura de la pared celular.

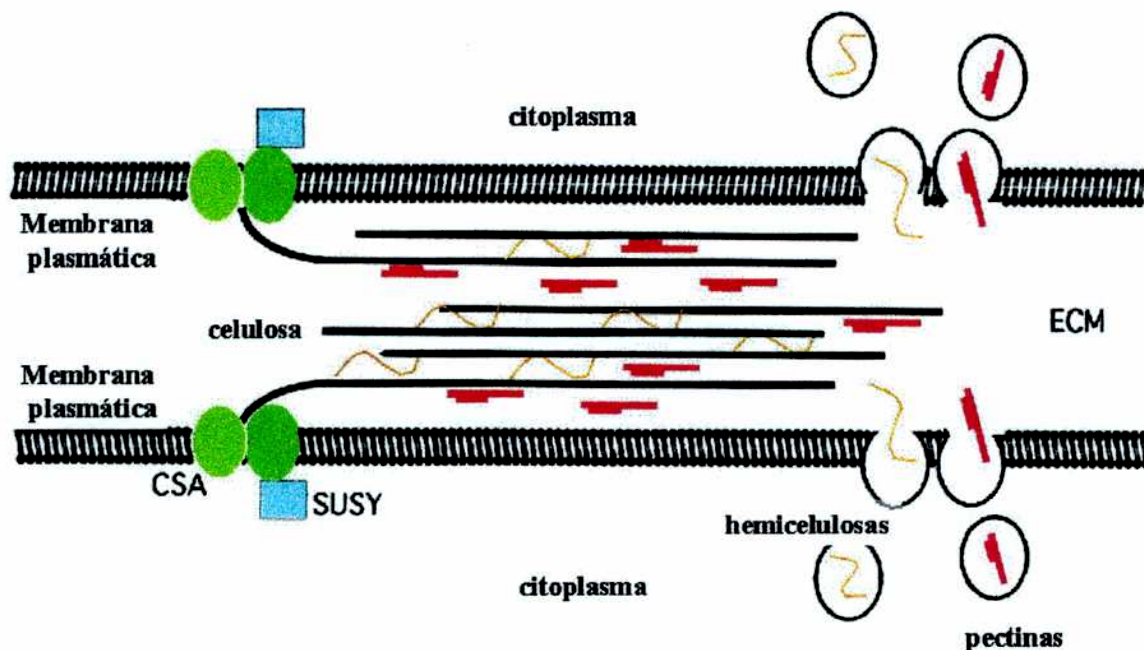


Figura 7. Representación esquemática del ensamblaje y estructura de la pared primaria entre dos células adyacentes. La celulosa (en negro) es sintetizada y secretada por los complejos de celulosa sintetasas (CSA) ubicados en la membrana plasmática. Estos complejos están asociados a la sacarosa sintetasa (SUSY) la cual les provee los azúcares para la síntesis del polímero. Las pectinas (en rojo) y las hemicelulosas (en naranja) son sintetizadas y secretadas por la vía ER-Golgi y se aComplejan con la celulosa en la matriz extracelular (ECM). (Kohorn, 2000)

Mecanismo de síntesis de polisacáridos

Si bien se conocen diversas secuencias de genes de la celulosa sintetasa, el mecanismo de biosíntesis de la celulosa sigue aún sin ser dilucidado. Los modelos más aceptados de síntesis de polisacáridos de pared celular parten de la suposición de que estos polisacáridos no se forman por la polimerización de monosacáridos, sino por la polimerización de intermediarios disacarídicos (Albersheim y col., 1997).

Sabemos que la celulosa es un polímero lineal de β -1,4-glucosas cuyos residuos están girados 180° uno con respecto al otro, la unidad repetitiva de dicho polisacárido es la celobiosa. Esta orientación alternada de los monómeros plantea un problema contorsional (Figura 8).

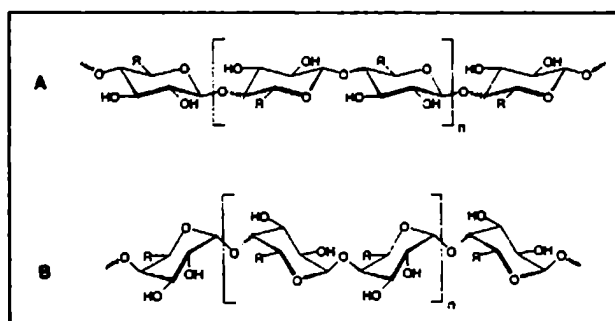


Figura 8. Unidad repetitiva disacarídica de los esqueletos de los polisacáridos de pared celular. A: celulosa, xiloglucano y xilano ($R = H$ para el xilano y $R = CH_2 OH$ para la celulosa y el xiloglucano), B: homogalacturonano y ramnogalacturonano II ($R = CO_2 H$). (Albersheim y col., 1997)

Si la celulosa sintetasa tuviera un único sitio activo, la enzima tendría que ir moviéndose de uno a otro lado de la cadena polisacarídica para ir agregando cada monosacárido en la orientación correcta. Alternativamente, la enzima podría tener dos sitios activos ubicados uno 180° girado con respecto al otro. Si bien no puede descartarse, la primera hipótesis parece poco probable ya que las celulosas sintetasas forman complejos multienzimáticos que dificultarían la libre movilización de la glicosiltransferasa hacia un lado y el otro del glucano. Además, si se agregara de a un monómero por vez, la glicosiltransferasa debería rotar luego de cada enlace glicosídico lo que implicaría una situación poco favorable a nivel energético.

Albersheim y col. (1997) propusieron un modelo alternativo más simple que permitiría explicar la síntesis de unidades disacarídicas repetidas sin necesidad de rotación de la enzima o del polisacárido (Figura 9). En este modelo, la transferasa tendría dos sitios activos en donde el azúcar que entrara en el segundo sitio estaría rotado 180° con respecto al azúcar del primer sitio. Una vez que en cada sitio entrara un difosfo-nucleótido-azúcar, los residuos glicosilos serían transferidos a los oxidrilos apropiados sobre la glicosiltransferasa. El modelo propone que los dos azúcares así activados serían conectados para formar un dímero y luego serían unidos al polisacárido creciente. El polisacárido tendría después que translocarse para que dos nuevos difosfo-nucleótido-azúcares pudieran entrar, activarse e iniciar otro ciclo de elongación.

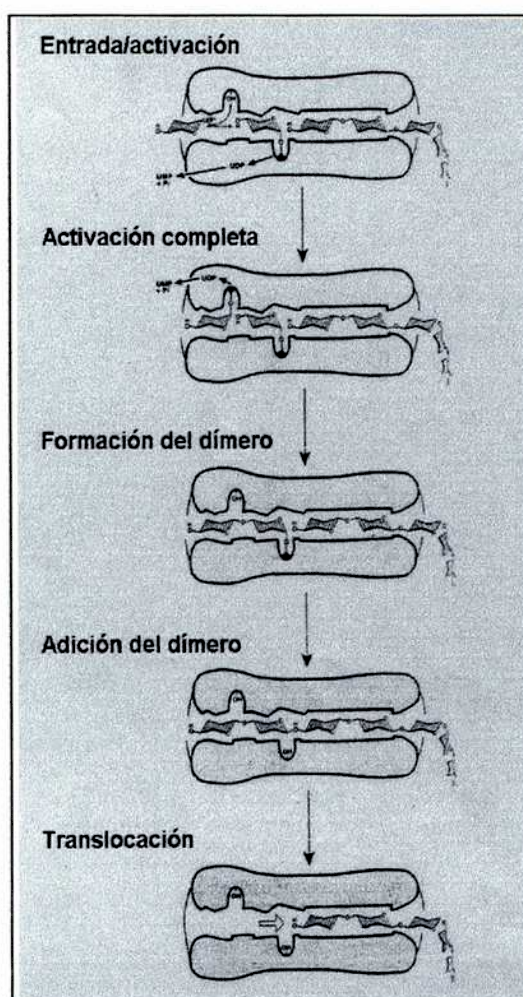


Figura 9. Modelo de Albersheim y col. (1997) para la síntesis de polisacáridos de pared cuyos esqueletos están constituidos por unidades repetidas disacarídicas.

Como mencionamos anteriormente, Saxena y col. (1995) encontraron que las β -glicosiltransferasas procesivas tenían dos dominios conservados (dominios A y B). Esta estructura apoya el modelo de los dos centros catalíticos en el cual los dominios A y B actuarían como centros de transferencia del disacárido a la cadena polisacáridica.

A partir de la resolución de la estructura tridimensional de la glicosiltransferasa SpsA de *Bacillus subtilis* (Charnock y Davies, 1999), se han empezado a resolver las estructuras de glicosiltransferasas de diversas familias (Ünlügil y Rini, 2000). La estructura tridimensional de SpsA reveló una proteína que presentaba un centro de hojas β rodeado de α hélices (Figura 10). La región N-terminal constituye un dominio de unión de nucleótidos (UDP) formado por 4 hojas β paralelas rodeado a cada lado por 2 α hélices. El dominio C-terminal es el sitio de unión al aceptor y el Asp-191 funcionaría como la base catalítica requerida por el mecanismo de inversión. Los residuos Asp-98 y Asp-99, que corresponden al motivo D(x)D, formarían el centro de coordinación de metales.

El modelo de los dos centros catalíticos se basa en la presunción de que los 4 residuos Asp son suficientes para constituir dos centros discretos. La elucidación de las estructuras de diversas glicosiltransferasas de diferentes familias reveló que estos 4 Asp forman un único centro catalítico. El dominio N-terminal que contiene el motivo D...D(x)...D une al UDP y los 3 residuos están comprometidos en dicha unión.

Basados en estos datos, Charnock y col. (2001) propusieron un modelo para la celulosa sintetasa y otras enzimas similares donde existirían dos dominios: el A que une el UDP-azúcar y el B que involucra el sitio de unión al aceptor y provee la base catalítica para la transferencia de un único monómero. Existen otras glicosiltransferasas como la hialurónico sintetasa tipo II, que posee dos repeticiones de los dominios de unión a UDP y al aceptor, constituyendo ella sí una enzima con dos centros catalíticos (Jing y DeAngelis, 2000).

Cómo un polipéptido con un único sitio activo puede sintetizar polisacáridos que alternen dos azúcares diferentes aún se desconoce. No se puede descartar aún, basándose en la estructura tridimensional de SpsA el modelo del doble centro catalítico.

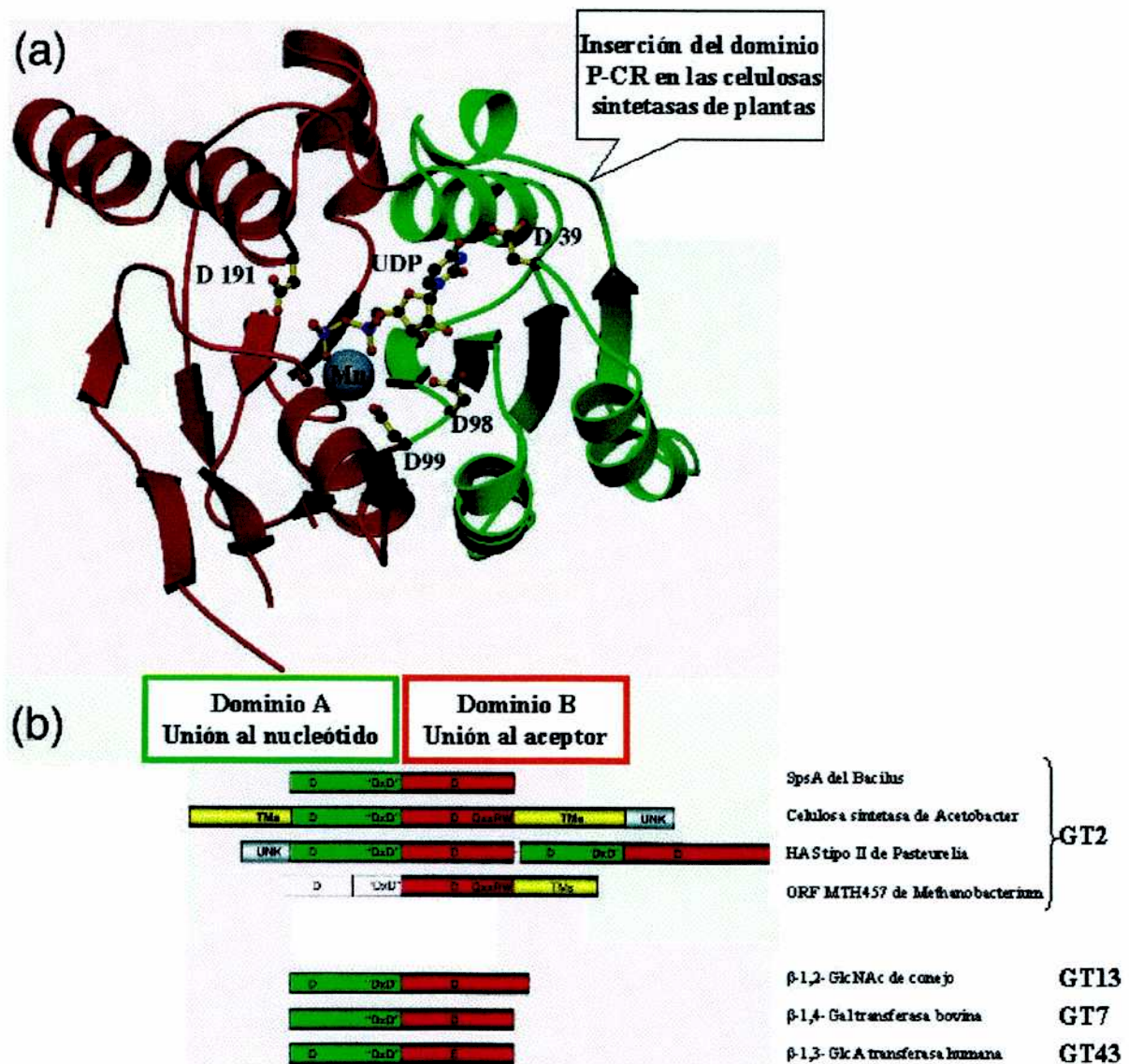


Figura 10. (A) Estructura tridimensional de la glicosiltransferasa SpsA de *Bacillus subtilis*, perteneciente a la familia GT-2 de glicosiltransferasas dependientes de UDP-azúcares. El dominio N-terminal que une UDP se muestra en verde y el dominio C-terminal que une al aceptor se muestra en rojo. (B) Representación esquemática de la familia GT-2 y de glicosiltransferasas relacionadas. Regiones transmembrana extensas se muestran en amarillo. (Charnock y col., 2001)

III.2.1.2 Glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de hemicelulosas

Mientras que la celulosa y otros polisacáridos lineales se sintetizan procesivamente en una única reacción que no requiere intermediarios, el ensamblaje de polisacáridos ramificados como el xiloglucano requiere diversas actividades enzimáticas. La biosíntesis de heteropolisacáridos puede dividirse en 4 pasos: la iniciación de la cadena central o esqueleto, la elongación, el agregado de cadenas laterales y finalmente la terminación y la deposición extracelular (Waldrom y Brett, 1985).

Hasta hace muy poco tiempo ninguna glicosiltransferasa involucrada en la síntesis de hemicelulosas había sido clonada. Hoy en día, se ha logrado la purificación de cantidades suficientes de algunas de las enzimas que agregan las cadenas laterales de las hemicelulosas lo que permitió su posterior secuenciación (Perrin y col., 1999; Edwards y col., 1999). La solubilización con detergente de enzimas procesivas involucradas en la iniciación y elongación de la cadena central de las hemicelulosas siempre ha resultado en la pérdida de su actividad. Probablemente sean necesarias otras técnicas, como por ejemplo el análisis de mutantes de pared celular, para la identificación y el clonado de dichas glicosiltransferasas (Reid, 2000).

Xilosiltransferasas

Se sabe que en el aparato de Golgi se pueden sintetizar tanto (1→4)-β-D-glucanos lineales como xiloglucanos (Ray, 1980). Si bien hasta el presente no se ha clonado ninguna xilosiltransferasa de plantas, se ha reportado la incorporación de xilosa a partir UDP-[¹⁴C]Xil a polisacáridos de tamaño comparable al del xiloglucano en membranas de soja (Hayashi y Matsuda, 1981), arveja (Camirand y MacLachlan, 1986; Hayashi y McLachlan, 1986) y poroto (Campbell y col, 1988). La degradación de los productos de reacción que se obtienen muestra la presencia de isoprimeverosa (xilosa-α-1,6-glucosa). La síntesis de xiloglucanos se ve aumentada en presencia de concentraciones milimolares de UDP-Glc y UDP-Xil y con Mn²⁺ o Mg²⁺ como cofactores.

Las actividades de glucosil y xilosiltransferasas aparecen fuertemente asociadas, mientras que el agregado de los azúcares adicionales a los residuos xilosa ocurre independientemente. Aunque se ha descrito la síntesis de xilanos *in vitro*, los productos radioactivos obtenidos en ningún caso fueron totalmente caracterizados y las actividades recuperadas son muy pequeñas.

Galactosiltransferasas y fucosiltransferasas

La α -L-fucosiltransferasa, clonada recientemente en *Arabidopsis thaliana* (Perrin y col., 1999) y en arveja (Faik y col., 2000), es una enzima que cataliza la transferencia de α -1,2-Fuc a las galactosas laterales del galactoxiloglucano. La adición de estas fucosas terminales sería necesaria para iniciar el cambio conformacional para que el xiloglucano se una a la celulosa (Levy y col., 1997).

La α -D-galactosiltransferasa, fue clonada en *Trigonella foenum-graecum* por Edwards y col. (1999). Esta enzima transfiere un único residuo α -1,6-Gal al polímero lineal β -1,4-Man del galactomanano. El polímero aceptor debe poseer al menos 5 residuos de Man para que la enzima lo galactosile. Las cadenas laterales del galactomanano le confieren sus propiedades hidrofílicas las cuales son fundamentales para sus funciones biológicas como absorbentes de agua y protectores de la sequía.

Tanto la α -L-fucosiltransferasa como la α -D-galactosiltransferasa son proteínas de membrana de tipo II, ancladas a la membrana por una única hélice hidrofóbica cercana al N-terminal (Paulson y Colley, 1989). El sitio catalítico de la α -L-fucosiltransferasa está en el lumen del Golgi (Wulff y col., 2000) y se presume que el de la α -D-galactosiltransferasa también.

Localización de la síntesis de los polisacáridos no celulósicos

Contrariamente a la biosíntesis de la celulosa (β -1,4 glucano) y de la callosa (β -1,3 glucano) que se lleva a cabo en la membrana plasmática, las hemicelulosas, las pectinas y las cadenas glicosídicas de los proteoglicanos se sintetizan en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi (Driouich y col., 1993).

Luego de ser sintetizados, los polisacáridos son empaquetados en vesículas secretorias y exportados a la superficie de la pared celular donde son integrados con las microfibrillas de celulosa.

El aparato de Golgi está compuesto por pequeños apilamientos de vesículas. El número de estos apilamientos y su distribución dependen del tipo celular. Generalmente éstos están dispersos por todo el citoplasma aunque pueden agruparse en regiones subcelulares específicas en donde hay crecimiento de la pared o una intensa secreción. En el aparato de Golgi de plantas se sintetizan una variedad de polisacáridos de pared y proteoglicanos, además es donde se lleva a cabo la O-glicosilación y el procesamiento de glicanos (Dupree y Sherrier, 1998).

Se piensa que se necesitan glicosiltransferasas específicas para transferir cada azúcar de su nucleótido-azúcar dador a su oligosacárido aceptor (Gibeau y Carpita, 1994) y que dichas transferasas trabajarían en complejos (Albersheim y col., 1997). Por lo tanto, para simplificar el reconocimiento de sus sustratos es probable que dichas enzimas estén subcompartimentalizadas dentro de las cisternas. Hasta el presente, no se ha clonado ninguna glicosiltransferasa asociada a las membranas del Golgi por lo que todas las evidencias sobre la subcompartimentalización de dichas enzimas se ha basado en la localización de los productos de las mismas (Moore y col., 1991; Lynch y Stahelin, 1992; Zhang y Stahelin, 1992; Fitchette-Laine y col., 1994; Sherrier y VandenBosch, 1994).

Con el fin de conocer la compartimentalización de la síntesis del xiloglucano dentro de las vesículas de Golgi, se han hecho estudios inmunohistoquímicos en células de *Acer pseudoplatanus* con anticuerpos específicos contra el esqueleto de xiloglucano y contra la fucosa terminal de la cadena lateral (Moore y col., 1991). Los resultados mostraron que la síntesis del esqueleto de xiloglucano ocurre exclusivamente en las cisternas del *trans* Golgi. Por otro lado, la marca con los anticuerpos contra la fucosa terminal es consistente con la hipótesis de que la fucosilación de las cadenas laterales se inicia en las cisternas del *trans* Golgi y en la TGN. También hay estudios de fraccionamiento en los cuales se concluye que la fucosilación de las cadenas laterales se iniciaría en las cisternas del *trans* Golgi y se completaría en las vesículas secretorias. Todavía no se sabe en que región del Golgi son agregados los residuos de galactosa de las cadenas laterales del xiloglucano.

A diferencia de lo que ocurre con el xiloglucano, la vía de síntesis de los polisacáridos pécticos homogalacturonano y ramnogalacturonano I parece involucrar todo tipo de cisternas de Golgi, al menos en los estudios hechos con células de *Acer pseudoplatanus* en cultivo. Basados en estudios de inmunomarcación con cuatro anticuerpos específicos contra los azúcares, se dedujo que los esqueletos del homogalacturonano y del ramnogalacturonano I son ensamblados en las vesículas del Golgi *cis* y medio, la metilesterificación de los grupos carboxilo de los residuos de ácido galacturónico en el homogalacturonano ocurre en las cisternas del Golgi medio y las cadenas laterales con arabinosa del ramnogalacturonano I son agregadas en las cisternas del *trans* Golgi (Driowich y col., 1993).

Translocación de los precursores desde el citosol al sitio de síntesis

Sabemos que los nucleótido-azúcares de bajo peso molecular se sintetizan en el citosol, entonces para que ocurra la síntesis de hemicelulosas, dichos dadores deben ser

transportados hacia el lumen del Golgi. Estudios realizados con vesículas de Golgi de arveja mostraron que el UDP-Glc puede ser transportado al lumen del mismo por intermedio de una proteína (Figura 11) (Muñoz y col., 1996). Luego de la transferencia del azúcar al oligosacárido, el UDP se degrada rápidamente a UMP y P_i mediante una nucleósido difosfatasa presente en el lumen del Golgi (Neckelman y Orellana, 1998). La hidrólisis de UDP elimina la inhibición potencial de las transferasas e inclina la reacción hacia la polimerización de azúcares. El UMP sale del Golgi estimulado por el UDP-Glc que entra, sugiriendo la existencia de un antiporter UDP-Glc/UMP. El P_i no se acumula dentro de las cisternas sugiriendo la existencia de un transportador que lo extrae fuera del Golgi.

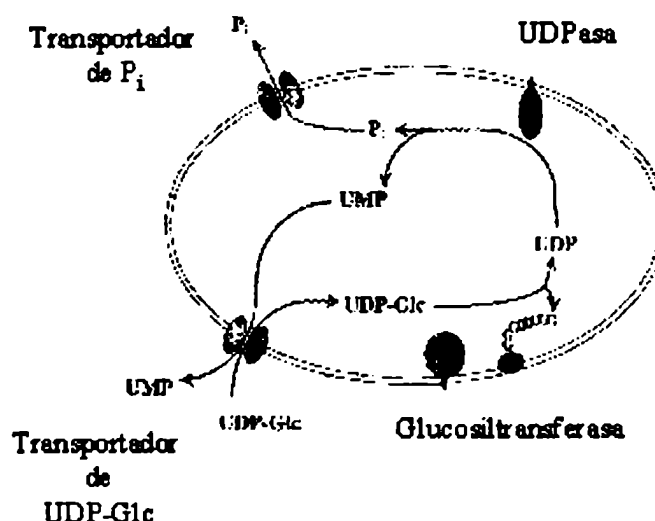


Figura 11. Proteínas necesarias para la biosíntesis de glucanos en las vesículas de Golgi. El UDP-Glc es transportado activamente dentro de las vesículas y es sustrato de glucosiltransferasas que agregan Glc al glucano que se está elongando. El UDP liberado es hidrolizado a UMP y P_i por la UDPasa y luego son secretados fuera de las vesículas. (Chrispeels y col., 1999)

Este modelo se describió para la utilización del UDP-Glc, sin embargo existen diversas glicosiltransferasas que utilizan nucleótido-azúcares derivados no sólo de uridina sino también de guanósina. La xiloglucano α -1,2-fucosiltransferasa, utiliza GDP-Fuc como sustrato para la adición de la Fuc terminal de los xiloglucanos. Dicha enzima muestra un único dominio transmembrana cerca del extremo amino-terminal y se asemeja a las glicosiltransferasas de mamíferos que participan en la glicosilación de proteínas en el Golgi

(Perrin y col., 1999). Wulff y col. (2000) encontraron que el GDP-Fuc entra a las vesículas de Golgi por intermedio de una proteína diferente al transportador del UDP-Glc, sugiriendo que en dicha organela habría transportadores específicos para cada nucleótido-azúcar requerido para la biosíntesis de polisacáridos. Por otro lado, se encontró que la hidrólisis de UDP y GDP-azúcares se llevaría a cabo por la misma enzima y se vio que ésta no tendría actividad ADPasa (Norambuena y Orellana, manuscrito en preparación). En la actualidad, se están utilizando las secuencias de los transportadores de nucleótido-azúcares ya clonados para identificar otras proteínas similares responsables del transporte de otros sustratos al aparato de Golgi. Así, Norambuena L, Marchant L y Orellana A han clonado recientemente en *Arabidopsis thaliana*, genes que codifican para transportadores de nucleótidos-azúcares entre los que se encuentra un transportador para UDP-Glc y UDP-Gal (comunicación personal).

III.2.2 Glicosiltransferasas autocatalíticas

Dentro de las glicosiltransferasas se encuentra un pequeño número de enzimas que presentan la característica peculiar de ser autocatalíticas, es decir que transfieren residuos azúcares sobre sí mismas. Dentro de esta clase, la más estudiada es la glucogenina que inicia la síntesis del glucógeno tanto en mamíferos (Pitcher y col., 1988) como en hongos (Takahara y Matsuda, 1977; Goldraij y col., 1993) y levaduras (Cheng y col., 1995). En plantas también se han descrito actividades de glicosiltransferasas autocatalíticas. En maíz se las ha relacionado con la síntesis de almidón (Singh y col., 1995; Curá y col., 1994). En *Daucus carota* L., Ingold y Seitz (1986) identificaron otra glicosiltransferasa asociada a membranas que estaría involucrada en la biosíntesis de polisacáridos celulares. Otras enzimas involucradas en el metabolismo de polisacáridos estructurales son los polipéptidos que se glicosilan reversiblemente denominados RGP (reversibly glycosylated polypeptides). Estas glicosiltransferasas ya han sido descritas en arveja (Dhugga y col., 1991; 1997) y en *Arabidopsis thaliana* (Delgado y col., 1998) y se piensa que estarían asociadas tanto a la membrana plasmática como al aparato de Golgi.

RGP

Cuando investigaban la síntesis de polisacáridos en membranas de Golgi de arveja, Dhugga y col. (1991) identificaron un doblete proteico de 41 kDa. Esta proteína podía

glicosilarse a partir de UDP-[^{14}C]Glc y esta radioactividad podía ser desplazada por el agregado de UDP-Glc, UDP-Xil o UDP-Gal, azúcares que componen los xiloglucanos. Dicha proteína se denominó PsRGP1 por *Pisum sativum* reversibly glycosylated polypeptide (Duggha y col., 1997). Además, encontraron que las condiciones que estimulaban o inhibían la actividad de β -glucano sintetasa de Golgi (GS-I) eran las mismas que estimulaban o inhibían la glicosilación de PsRGP1 (Duggha y col., 1991).

Para tratar de elucidar el rol de esta enzima en la biosíntesis de polisacáridos, Duggha y Ray (1994) purificaron la proteína y obtuvieron la secuencia de péptidos tripticos. Anticuerpos desarrollados contra PsRGP1 mostraron que la proteína se encontraba tanto en forma soluble como asociada a la membrana plasmática y al compartimento de Golgi (Duggha y col., 1997). La glicosilación de PsRGP1 con los diferentes azúcares mostró una relación de aproximadamente 10:7:3 (Glc: Xil: Gal), que sería similar a la composición del xiloglucano (1.0:0.75:0.25) (Duggha y col., 1997). Por ello, sugirieron que dicha proteína estaría involucrada en la síntesis de polisacáridos de pared celular.

La secuencia de las RGPs carece de señales de inserción a membranas. La búsqueda en bancos de datos mostró la existencia de dos Asp conservados correspondientes al dominio A de otras β -glicosiltransferasas, sin embargo no se encontró el dominio B característico de las enzimas procesivas. Se sugirió así que las RGPs actuarían como enzimas no procesivas (Saxena y Brown, 1999).

Faik y col. (2000) describieron en *Tropaeolum majus* L. una actividad enzimática similar a las RGPs, es decir que se glicosilaba reversiblemente con diversos UDP-azúcares y en SDS-PAGE se encontró un polipéptido radioglicosilado de 41 kDa. Además, mostró reacción cruzada con anticuerpos generados contra la RGP de *Arabidopsis thaliana*. La presencia de dichos anticuerpos inhibió la glicosilación del polipéptido a partir de UDP-[^{14}C]Gal, el ingreso de este nucleótido-azúcar a las vesículas de Golgi y la incorporación de [^{14}C]Gal a los nuevos xiloglucanos.

Si bien la función de las RGPs aún se desconoce, se ha especulado con que dichos polipéptidos se unirían a los nucleótido-azúcares del citosol y los transportarían hasta el aparato de Golgi donde el azúcar se usaría como sustrato de glicosiltransferasas involucradas en la biosíntesis de polisacáridos estructurales (Read y col., 1986; Dhugga y col., 1991, 1997; Delgado y col., 1998). El trabajo de Faik y col. (2000) presenta la primera evidencia de que dicha hipótesis sería la correcta.

IV. Sistema modelo de estudio

Zea Mays

El maíz es una planta monocotiledónea, es un cereal de cosecha anual de la familia de las gramíneas. Posee un sistema radicular fibroso y un tallo alto con una hoja por nodo, las hojas se encuentran enfrentadas. Los órganos femeninos y masculinos se encuentran en flores diferentes pero en el mismo individuo. El grano de maíz consiste en el pericarpio, el aleurón, el endosperma y el embrión (Figura 12). El pericarpio está formado por una fina película que protege a la semilla. El aleurón posee una monocapa de células que se ubica inmediatamente bajo el pericarpio. El endosperma es la principal fuente de energía para el embrión y la planta joven ya que almacena grandes cantidades de almidón.

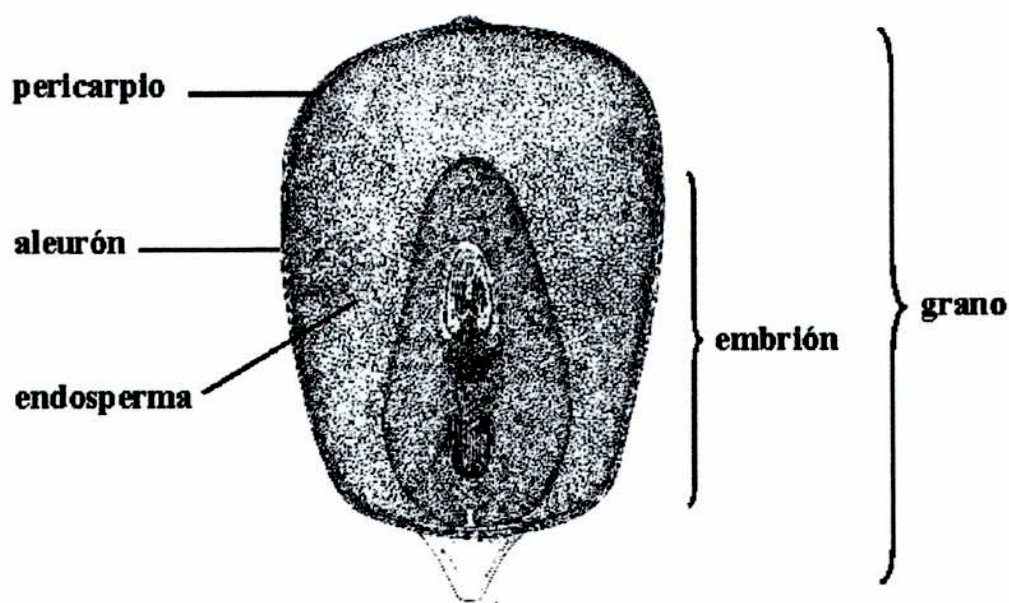


Figura 12. El grano de maíz maduro. Corte longitudinal. (Rédei, 1982)

Los cereales son muy apreciados en la agricultura ya que se componen principalmente de carbohidratos. Por esta razón el estudio del metabolismo y acumulación de estas moléculas es de gran interés. Varios aspectos del metabolismo de carbohidratos en maíz han sido ampliamente estudiados como ser la regulación de la biosíntesis y la modificación tanto genética como industrial de los mismos (Nelson y Rines, 1962; Shure y

col., 1983; Tsai y Nelson, 1966; Echeverría y col., 1987; Bae y col., 1990; Bhave y col., 1990; Preiss y col., 1990; Hannah y col., 1993). El endosperma de maíz no sólo es una rica fuente de carbohidratos para fines alimenticios e industriales, sino que provee un sistema modelo para estudios bioquímicos, moleculares y de desarrollo.

El endosperma de maíz en desarrollo es un tejido con poblaciones de células de distintas edades fisiológicas. Las células centrales del endosperma empiezan a acumular almidón inmediatamente mientras que las células periféricas lo hacen más tarde. En las células más jóvenes el contenido de azúcares es elevado mientras que el contenido de almidón es bajo. A medida que las células van desarrollándose, el contenido de azúcar disminuye hasta el 1% y el del almidón aumenta hasta llegar al 86% del peso seco del endosperma.

Con respecto a los polisacáridos estructurales, mientras que el endosperma posee paredes primarias gruesas, las del embrión son mucho más delgadas (Boyer y Shannon, 1987). Las células del pericarpio también desarrollan paredes secundarias una vez que la expansión celular ha cesado. Las principales hemicelulosas del endosperma de maíz son los glucomananos y galactoglucomananos, aunque también contienen arabinoxilanos, arabinogalactanos, arabinanos y xiloglucanos.

Solanum tuberosum

La papa representa el cuarto cultivo en importancia en el mundo luego del maíz, el arroz y el trigo. Por lo tanto, la investigación sobre la iniciación y el desarrollo de los tubérculos de papa es de gran relevancia ya que el conocimiento de dicho proceso nos permitirá manipularlo para nuestro beneficio.

La utilización de las plantas de papa presenta varios beneficios ya que es fácilmente transformable y por lo tanto ameno para la manipulación genética, y además puede ser propagado rápidamente. Otra ventaja es que la papa está cercanamente relacionada con el tomate para el cual ya se tiene un buen mapa genético.

El crecimiento y desarrollo de las plantas dependen de la energía obtenida a partir de la producción de carbohidratos durante la fotosíntesis en los tejidos fuente, es decir en las hojas maduras (Turgeon, 1989). Los fotosintatos producidos son posteriormente transportados a los tejidos destino en donde serán consumidos o almacenados (Ho, 1988). Los tejidos de consumo están constituidos por meristemas y hojas jóvenes los cuales son metabólicamente muy activos y crecen rápidamente, allí los fotosintatos son utilizados principalmente para la respiración y la biosíntesis de las estructuras celulares. Los tejidos

de almacenamiento están constituidos por tubérculos, semillas, raíces o frutos en los cuales los fotosintatos importados se transforman en carbohidratos (principalmente sacarosa y almidón) y se acumulan para ser utilizados cuando la planta lo requiera.

Los tubérculos de papa son un órgano destino por excelencia ya que importan grandes cantidades de sacarosa. Durante la tuberización hay una activa síntesis de polisacáridos tanto de reserva (almidón) como de polisacáridos estructurales (celulosa, hemicelulosas, pectinas) y por lo tanto este sistema representa un excelente modelo para el estudio de la biosíntesis de dichos polímeros.

El proceso de tuberización en la papa se ha estudiado intensivamente tanto a un nivel fisiológico como morfológico. Los tubérculos de la papa son órganos de reserva que se originan a partir de los estolones (tallos subterráneos). Por lo tanto, los mismos constituyen un tallo morfológicamente modificado que se ha expandido radialmente (Prat y col., 1990). Existe una variedad de factores ambientales y genéticos que controlan la tuberización como por ejemplo fotoperíodos cortos, bajas temperaturas o bajas concentraciones de nitrógeno que favorecen dicho proceso (Jackson, 1999). Aunque se han realizado muchos estudios a nivel fisiológico, hoy en día se desconocen los eventos bioquímico-moleculares que ocurren en la iniciación de la tuberización en la papa.

Se ha sugerido que las hormonas jugarían un rol preponderante en el control de la tuberización (Vreugdenhil y Struik, 1989). Las giberelinas (GA) inhiben la formación del tubérculo orientando los microtúbulos y las microfibrillas transversalmente con respecto al eje de la célula lo que provoca una expansión longitudinal de la célula y la elongación de los estolones (Shiboaka, 1993; Fujino y col., 1995). Se sabe que los niveles de nitrógeno, la temperatura y la intensidad de la luz afectan los niveles de giberelinas y aparentemente dicha hormona detectaría el fotoperíodo impidiendo la tuberización en días largos.

Por otro lado, se vio que el ácido absísico (ABA) promueve la tuberización de la papa (Marschner y col., 1984). Los niveles de ABA son afectados por el fotoperíodo (Machackova y col., 1998) y por el nivel de nitrógeno (Krauss, 1985). El efecto inductor del ABA sobre la tuberización se debe aparentemente, a su efecto antagónico sobre la orientación de los microtúbulos provocada por las GA (Xu y col., 1998). El ácido jasmónico (JA) también mostró propiedades inductoras de la tuberización *in vitro* (Koda y col., 1991). Se cree que el JA actuaría de manera similar al ABA, antagonizando el efecto de GA (Matsuki y col., 1992).

Koda y col. (1996) descubrieron otro compuesto con características inductoras de la tuberización llamado coronatina. Esta es una fitotoxina aislada del *Pseudomonas syringae* y además de inducir la tuberización, promueve la expansión celular en los tubérculos de papa.

Además de las hormonas, se observó que el nivel de sacarosa en el medio también afecta la tuberización *in vitro* (Xu y col., 1998). Se sabe que la sacarosa induce diversos genes que están también inducidos en el tubérculo de papa como por ejemplo la patatina, el inhibidor II de proteinasa y la ADP-Glc pirofosforilasa. Usando un gen antisentido de la ADP-Glc pirofosforilasa, Muller-Rober y col. (1992) mostraron que el aumento en los niveles de sacarosa de los estolones provocó la tuberización de una mayor cantidad de tubérculos aunque éstos eran de menor tamaño. Xu y col. (1998) sugirieron que la sacarosa podría modular los niveles endógenos de GA en el extremo del estolón, disminuyéndolos en condiciones que favorecen la tuberización.

La identificación de las señales que regulan el proceso de tuberización continúa sin ser completamente resuelta. Sin embargo, todos los factores hormonales y ambientales que afectan la tuberización parecen afectar los niveles de GA o tener efectos antagónicos sobre esta hormona.

V. Antecedentes del trabajo de tesis

Lavintman y col. (1974) describieron por primera vez glicosiltransferasas capaces de sintetizar α -1,4-glucanos unidos a proteínas en una fracción particulada de tubérculos de papa. Se sugirió que estas glicosiltransferasas estarían relacionadas con la síntesis *de novo* del almidón y se propuso un mecanismo en dos etapas (Tandecarz y Cardini, 1979). La enzima que catalizaba la primer etapa, es decir que unía Glc a la proteína, se denominó UDP-glucosa: proteína transglucosilasa (UPTG, EC 2.4.1.112). Luego, se encontró que la enzima UPTG se autoglucosilaba en presencia de Mn^{2+} y UDP-[C^{14}]Glc dando un producto radioactivo de 38kDa (Moreno y col, 1986, 1987; Ardila y col, 1992). Se sugirió que el producto de la reacción catalizada por la UPTG serviría de aceptor para las enzimas alargadoras (fosforilasa y almidón sintetasa) presentes en la preparación de tubérculos de papa en una segunda etapa (Moreno y col., 1987).

La UPTG de tubérculo de papa purificada se utilizó para generar anticuerpos policlonales específicos contra el monómero de 38 kDa (Tandecarz y col., 1996a; Bocca y col., 1997b). Dichos anticuerpos se han utilizado para la búsqueda de clones de UPTG a partir de dos bibliotecas de ADNc, una de hojas de papa y otra de estolones iniciando la tuberización de papa. Así, se aislaron y purificaron 19 clones positivos de ambos bancos cuyos insertos una vez caracterizados mediante análisis de restricción e hibridaciones cruzadas, fueron clasificados en dos grupos. Los clones más largos de cada uno de estos grupos fueron secuenciados y se los denominó E11 y E2 (Bocca y col., 1999). Se encontró que dichos ADNc codificaban para polipéptidos de 365 y 366 aminoácidos, respectivamente, los cuales presentaban un 89% de identidad. El clon E11, fue expresado en *E. coli* y las características de la enzima recombinante resultaron similares a las descriptas para la enzima purificada a partir de tubérculo de papa (Tandecarz y col., 1996b). Se sugirió entonces el nombre de UPTG1 para la proteína recombinante codificada por dicho clon.

La secuenciación de los clones nos permitió predecir algunos aspectos estructurales y bioquímicos de las proteínas recombinantes. Usando programas de computación específicos, se pudo determinar que las proteínas recombinantes tendrían un punto isoelectrico de 6.19 para E11 y de 5.71 para E2 y una masa molecular entre 41.6-41.8 kDa, que es levemente mayor a la de la subunidad de la proteína de papa. También se sugirió que la UPTG no tendría secuencias señales para una localización subcelular y que sería una proteína hidrofílica (Bocca y col., 1999).

Luego de la purificación a homogeneidad de la UPTG, se encontró que además del UDP-[C^{14}]Glc, el UDP-[C^{14}]Xil y el UDP-[C^{14}]Gal en concentraciones micromolares eran

sustratos de la enzima y que el azúcar radioactivo unido a la proteína se liberaba en presencia de concentraciones milimolares de UDP o de UDP-Glc, UDP-Xil o UDP-Gal (Bocca y col., 1999). Sin embargo, el UDP-Man, el UDP-GlcNAc, el UDP-GlcUA y el UDP-GalUA resultaron incapaces de liberar el azúcar radioactivo unido a la UPTG en las mismas concentraciones que los anteriores nucleótidos-azúcares ensayados.

Si bien la UPTG se reportó como una actividad asociada a membranas (Lavintman y col., 1974) y se la purificó a partir de una fracción particulada (Bocca y col., 1997a), dicha enzima se encuentra en grandes cantidades en la fracción soluble (Bocca y col., 1999). Esto coincide con la ausencia de motivos de inserción a membranas en la secuencia de la proteína. Además, la enzima nativa presentaría una estructura oligomérica ya que Ardila y col. (1992) reportaron múltiples picos con actividad UPTG que eluían a baja fuerza iónica de una cromatografía en columnas de intercambio aniónico. Bocca y col. (1997a) encontraron un pico asimétrico ancho con actividad enzimática luego de la purificación de la UPTG mediante cromatografía en columnas de tamiz molecular.

La búsqueda en bancos de datos mostró homologías entre UPTG y otras secuencias de origen vegetal que se pudieron clasificar en dos categorías (Bocca y col., 1999). La primera categoría, que presentó entre 86-93% de identidad, involucraba ADNc de las RGP (reversibly glycosylated polypeptides) de *Pisum sativum* y de *Arabidopsis thaliana* (Dhugga y col., 1991 y 1997; Delgado y col., 1998), el ADNc de la proteína se-wap41 de plasmodesmos de *Zea mays* (Epel y col., 1996), y algunas secuencias homólogas de *Vigna unguiculata*, *Oryza sativa* y *Triticum aestivum*. La UPTG mostró también similitudes a nivel de aminoácidos con péptidos tripticos de la amilogenina de *Zea mays* (Singh y col., 1995). La segunda categoría de secuencias compartía entre 44-47% de identidad con la UPTG y estaba constituida por algunos ADNc de *O. sativa*, de *T. aestivum* y algunas ESTs de *A. thaliana*.

Hoy en día varias de las secuencias que presentaban mayor homología con UPTG han sido identificadas como RGPs (Figura 13). Se ha sugerido que la UPTG, las RGPs (Delgado y col., 1998; Dhugga y col., 1997), la amilogenina de maíz (Singh y col., 1995) y la glicosiltransferasa I de zanahoria (Quentmeier y col., 1987) entre otras, formarían un grupo de proteínas homólogas. Estas enzimas no son similares únicamente en sus secuencias sino en sus características bioquímicas: glicosilación reversible con UDP-Glc y en algunos casos también con UDP-Xil y UDP-Gal, Km (μM), peso molecular entre 38-41 kDa, activación por Mn^{2+} , cinética veloz, presencia de un doblete con moviidades electroforéticas muy parecidas, localización tanto soluble como asociada a membranas.

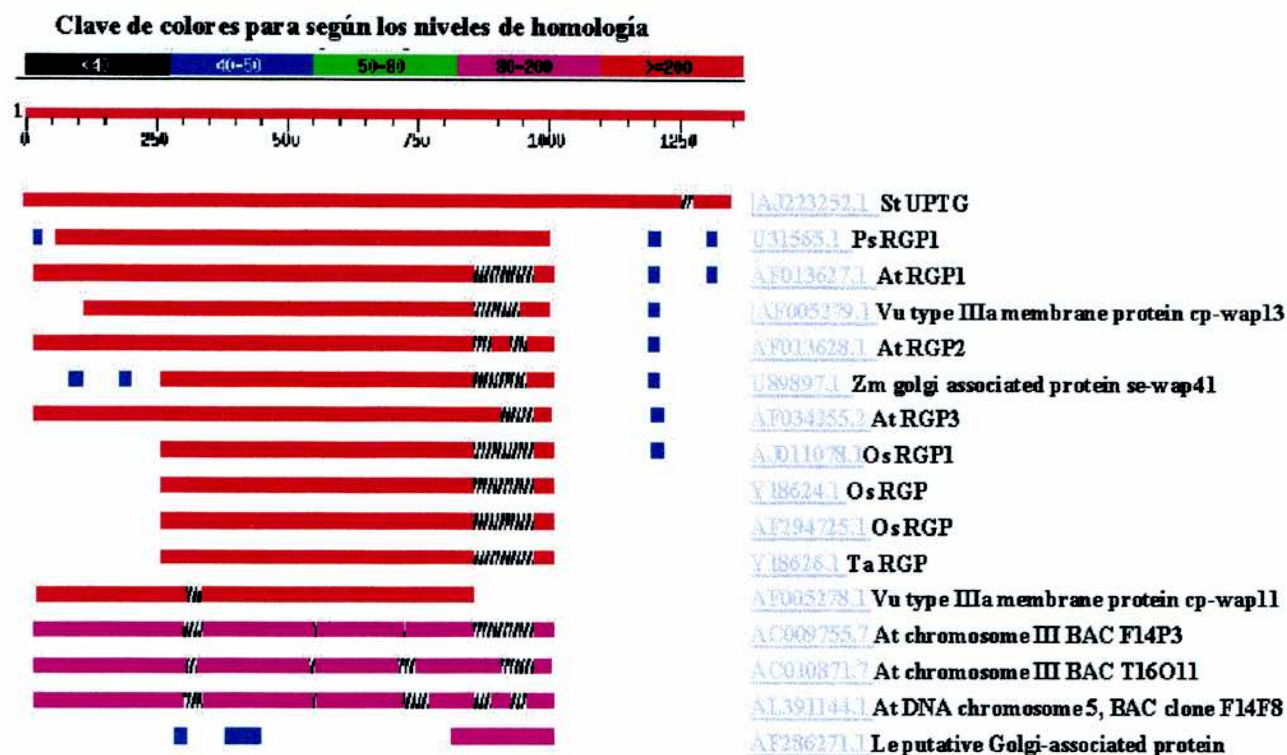


Figura 13. Secuencias homólogas a la UPTG de *Solanum tuberosum*. Se utilizó el programa de computación BLAST (Altschul y col., 1997) para buscar secuencias homólogas al ADNc codificado por el clon E11. El programa alinea las secuencias de manera esquemática y las grafica utilizando una escala de color según el grado de identidad de las mismas.

El ADNc del clon E11 fue utilizado como sonda en ensayos de RFLP en una población de papa (Bocca y col., 1999). Un locus pudo ser mapeado y se determinó que el marcador molecular más cercano ligado era CP31, un marcador de RFLP que se encuentra en el cromosoma V. Se propuso el nombre de *uptg1* para este gen mapeado.

Aunque sólo un locus pudo ser mapeado sugiriendo la existencia de un gen de copia única o de bajo número de copia, la existencia de un segundo gen para la misma enzima no se puede descartar completamente. En plantas, hay en general un alto número de isoenzimas en las especies poliploides como consecuencia de la existencia de varios genomas con loci homeólogos (Gottlieb, 1982). Por ser *Solanum tuberosum* una especie tetraploide, los diversos clones positivos que se encontraron en las bibliotecas de expresión podrían corresponder a los 4 posibles alelos de un único gen para la UPTG en la papa.

La UPTG había sido también reportada en plántulas de maíz (Tandecarz y col., 1982) y en otro órgano de reserva como es el endosperma de semillas inmaduras de maíz (Rothschild y Tandecarz, 1994). El producto radioactivo de la reacción catalizada por la UPTG de maíz, sometido a SDS/PAGE y posterior fluorografía, presentó una banda radioactiva de peso molecular aparente de 38 kDa, al igual que la enzima de tubérculo de papa (Rothschild y Tandecarz, 1994). Contrariamente a lo que ocurre en condiciones similares en preparaciones de tubérculo de papa, en el endosperma de semillas inmaduras de maíz se observó una baja actividad UPTG (Rothschild y col., 1996). Más aún, la preparación solubilizada de endosperma de maíz era capaz de inhibir la actividad UPTG de tubérculo de papa. Se observó, que si se congelaba la preparación solubilizada de maíz a -20°C por varios días o se la preincubaba a 65°C durante 5 minutos, se incrementaba unas 10 veces la actividad UPTG (Rothschild y Tandecarz, 1994). Se describió la presencia de un inhibidor (IP) termolábil no competitivo en la preparación (Rothschild y col., 1996).

Con el objetivo de identificar la naturaleza del inhibidor, se purificó la proteína IP a homogeneidad (Rothschild y col., 1996) y posteriormente se la secuenció. La búsqueda en bancos de datos reveló alta homología de IP con secuencias conocidas de sacarosa sintetasa (SS) de diversas especies vegetales (Tabla 1). Se observó que el péptido más corto de IP presentaba una identidad del 60% con la SS de maíz, cebada y arroz. Más aún, el péptido más largo de IP mostró una identidad del 91% con SS de maíz y una identidad del 81-82% con SS de arroz, cebada, papa y tomate.

A		Proteína	Secuencia				
		IP (15 bases)	E M Q D N P D A V G G N Y N D				
		SUS1 maíz	398	E <u>M</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>D</u> 412			
		SUS1 arroz	398	E <u>M</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>D</u> 412			
		SUS1 cebada	397	E <u>M</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>D</u> 411			
		SUS2 arroz	406	E <u>L</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>D</u> 420			
		SUS2 cebada	406	E <u>L</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>D</u> 420			
		MZESUS1-1 maíz	406	E <u>L</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>D</u> 420			
		MZESUS1C-1 maíz	406	E <u>L</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>D</u> 420			
		IP (23 bases)	R L T A F H P E I E L I Y - D V E N - E H K				
		SUS1 maíz	537	<u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>H</u> 553			
		SUS1 arroz	537	<u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>K</u> 559			
		SUS1 cebada	536	<u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>H</u> 558			
		OSRSS1A-1 arroz	537	<u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>K</u> 559			
		POTSSYN-1 papa	540	<u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>H</u> 561			
		TOMSSF-1 tomate	540	<u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>H</u> 561			
B		SUS1 maíz	SUS1 arroz	SUS1 cebada	OSRSS1A-1 arroz	POTSSYN-1 papa	TOMSSF-1 tomate
Identidad con IP		91%	82%	82%	82%	81%	81%

Tabla 1. Secuencias aminoacídicas de dos péptidos internos de IP de endosperma de maíz. (A) Comparación de las secuencias aminoacídicas de dos péptidos internos de IP de endosperma de maíz con SS conocidas de plantas. Los aminoácidos idénticos aparecen subrayados. (B) Se calculó el porcentaje de identidad aminoacídica entre el péptido más largo de IP y secuencias conocidas de SS de plantas. (Wald y col., 1998)

Todavía no se ha demostrado la función para UPTG ni para ninguna de las proteínas homólogas. Sabemos que la UPTG está estrechamente ligada con el UDP-Glc ya que se autoglucosila y el Km por dicho sustrato es muy pequeño ($<1\mu\text{M}$). Como comentamos anteriormente, el UDP-Glc está involucrado en diversos caminos metabólicos de la célula.

La ausencia de péptidos de tránsito a plástidos en la secuencia de la UPTG hace difícil pensar que la proteína estuviera involucrada en la síntesis de almidón dentro del amiloplasto (Bocca y col., 1999). El hecho de que la PsRGP haya sido inmunolocalizada en las vesículas del *trans* Golgi y la especificidad de la UPTG y las RGP por los nucleótidos azúcares UDP-Glc, UDP-Xil y UDP-Gal, sugieren una posible participación en la síntesis de polisacáridos estructurales que constituyen la pared primaria de las células vegetales (Figura 14) (Dhugga y col., 1997; Bocca y col., 1999). Más aún, Faik y col. (2000) reportaron la primera evidencia directa que indica que los polipéptidos autoglicosilantes facilitarían la provisión de UDP-azúcares activados desde el citoplasma al lumen de las vesículas de Golgi donde éstos serían utilizados como sustratos de las glicosiltransferasas que sintetizan productos como los xiloglucanos. Otro resultado que apoya esta hipótesis es la relación entre la UPTG y la SS de maíz involucrada en la provisión de sustratos para la síntesis de pared celular (Wald y col., 1998; Chourey y col., 1998).

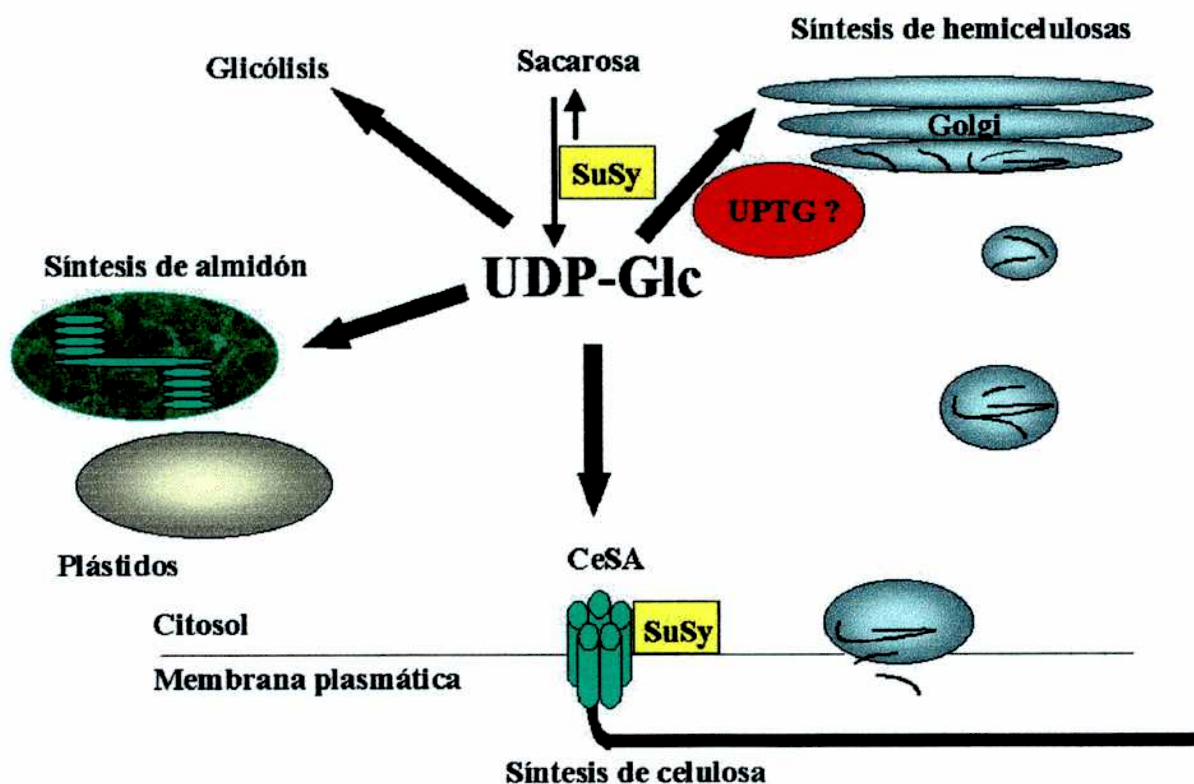


Figura 14. Principales funciones del UDP-Glc en la célula vegetal. El UDP-Glc es sintetizado principalmente a partir de la sacarosa por la enzima sacarosa sintetasa y tiene un rol central en el metabolismo de la célula. Es utilizado como fuente de energía y además es un precursor directo o indirecto para la síntesis de celulosas, hemicelulosas, pectinas y almidón. La enzima UPTG está íntimamente ligada con el UDP-Glc y si bien su función aún se desconoce, sugerimos estaría involucrada en la facilitación de dicho sustrato para la síntesis de hemicelulosas en el aparato de Golgi.

VI. Objetivos de la Tesis

No son muchas las glicosiltransferasas descritas en la literatura que presentan la característica de ser autocatalíticas y aunque se las ha relacionado con la biosíntesis de polisacáridos en general, su función específica aún no se conoce. Por trabajos previos sabemos que la UPTG cataliza una reacción de autoglicosilación a partir de UDP-Glc, UDP-Xil y UDP-Gal en la cual el azúcar se uniría a la proteína de modo reversible. La proteína se encuentra distribuida tanto en fracciones de membranas como en fracciones solubles. El clonado de la enzima posibilitó la búsqueda de proteínas homólogas a la UPTG las cuales se encontraron únicamente en el reino vegetal y se observó que estarían asociadas a la cara externa del aparato de Golgi. Todos estos datos sugieren que la proteína UPTG podría tener una función relacionada con la síntesis de polisacáridos estructurales constituyentes de las paredes celulares de las plantas.

En esta tesis se desarrollaron diversas estrategias bioquímicas y moleculares, tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro*, con el fin de aportar datos para dilucidar en que etapa de la síntesis de los polisacáridos vegetales está involucrada la enzima UPTG. Dentro de las estrategias bioquímicas, se investigarán más profundamente el mecanismo de la reacción que cataliza la enzima y los posibles mecanismos de regulación de la actividad de la misma. Dentro de las estrategias moleculares, se desarrollarán diferentes sistemas de expresión en *E coli* para obtener la enzima en altas cantidades y se buscarán otros genes o isoformas de UPTG a partir de los clones ya aislados de bibliotecas de expresión de estolones y de hojas. Finalmente se analizará la expresión de diferentes isoformas de la enzima en distintos tejidos de plantas de papa para investigar si la UPTG está regulada a nivel transcripcional.

Así, se plantearon los objetivos específicos siguientes:

1. Analizar el mecanismo de la reacción de la UPTG en papa. La enzima presenta características únicas, no descritas en ninguna otra glicosiltransferasa ya que cataliza una reacción reversible de autoglucosilación a partir de tres posibles nucleótidos azúcares. Por ello:

- se estudiará la naturaleza del enlace glicosídico
- se estudiará la reversibilidad de la reacción
- se analizará si existe alguna relación entre los tres nucleótidos-azúcares en la reacción de glicosilación.

2. Estudiar posibles mecanismos de regulación de la actividad de UPTG en papa y en maíz. Se encontró que la UPTG de maíz estaba inhibida aunque se desconocía la naturaleza de dicho inhibidor. Por otro lado, se encontró que la secuencia de la proteína de papa presentaba 13 sitios potenciales de fosforilación. Así, se proyectó:

- identificar al inhibidor de la actividad de UPTG de maíz
- analizar la capacidad de la enzima de ser fosforilada y analizar si el grado de fosforilación afectaba la actividad enzimática en papa.

3. Identificar distintas isoformas de la UPTG de papa. Como se mencionó anteriormente, luego del análisis de dos bibliotecas de ADNc (una de hojas y la otra de estolones de papa iniciando el proceso de tuberización) con un anticuerpo policlonal específico contra el monómero de UPTG, se obtuvieron 7 clones positivos en estolones y 12 positivos en hojas. Sabemos que alguno de esos ADNc hibridizan débilmente entre sí lo que podría deberse a la presencia de distintas formas alélicas de la enzima o a la existencia de más de un gen codificante para la UPTG. Se caracterizarán a nivel bioquímico y molecular algunos de los clones aislados. Así, se proyectó:

- la expresión en *E. coli* de los clones E2 (de estolón) y H6 (de hoja).
- la caracterización bioquímica de las enzimas recombinantes.
- el análisis del ADN genómico de papa por Southern blot

4. Analizar la expresión de la UPTG en papa a nivel del mensajero para investigar la posibilidad de una regulación transcripcional de la enzima. Para ello:

- se investigará la expresión del clon E11 en sistemas de cultivo *in vitro* de papa
- una vez obtenidos los diferentes clones, se investigará la expresión de los mismos en diversos tejidos de plantas de papa mediante el uso de sondas específicas para cada uno de ellos.

Materiales y Métodos

1. Sustratos radioactivos

El material radioactivo, UDP-[¹⁴C]Glc, UDP-[¹⁴C]Xil y UDP-[¹⁴C]Gal (300 µCi/µmol), se obtuvo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas según el método de Wright y Robbins (1965). El ATP[γ-³²P] y dCTP[α-³²P] se obtuvieron comercialmente (3000 Ci/mmol, New England BioLabs, USA).

2. Preparaciones enzimáticas

2.1. Preparación de UPTG de papa y maíz

Las preparaciones de papa se realizaron homogeneizando los tubérculos, filtrándolos por muselina y centrifugando el filtrado a 25000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante resultante (S14500) se ultracentrifugó durante 2 horas a 140000 x g y el nuevo sobrenadante se precipitó al 50 % con sulfato de amonio. Las proteínas precipitadas fueron dializadas contra buffer 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM 2β-mercaptoetanol a 4°C durante 12 horas y utilizadas como fuente de UPTG soluble (S140). Las preparaciones particuladas (precipitado de 140000 x g) de tubérculos de papa se obtuvieron usando la técnica descrita por Lavintman y col. (1974). Brevemente, las preparaciones se solubilizaron con 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM 2β-mercaptoetanol durante 48 horas a 0°C y luego se ultracentrifugaron durante 2 horas a 140000 x g. El sobrenadante obtenido (Psol) se utilizó como fuente enzimática.

Las preparaciones de endosperma de maíz se realizaron por homogeneización en presencia de 1,5 volúmenes de buffer 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 20 mM 2β-mercaptoetanol. Luego la preparación fue centrifugada a 25000 x g durante 20 minutos y el sobrenadante resultante (S14500) se ultracentrifugó durante 2 horas a 140000 x g. El nuevo sobrenadante se precipitó al 50 % con sulfato de amonio y las proteínas precipitadas fueron dializadas contra buffer 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 20 mM 2β-mercaptoetanol a 4°C durante 12 horas y utilizadas como fuente de UPTG soluble (S140). Las preparaciones particuladas (precipitado de 140000 x g) de endosperma de semillas inmaduras de maíz se obtuvieron como fue descrito anteriormente por Rothschild y Tandecarz (1994) y se utilizaron como fuente de UPTG luego de calentarlas a 65°C durante 5 minutos (preparación activada por calentamiento). Las preparaciones particuladas de plántulas y de raíces de plántulas de maíz se obtuvieron de manera similar a lo descrito para endosperma.

2.2. Preparación de UPTG de microtubérculos de papa

Plántulas de *Solanum tuberosum* cv. Spunta se micropropagaron por subcultivo de cortes de tallos en el medio basal de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962). Se mantuvieron bajo fotoperíodo de 16:8 hs (luz : oscuridad) con una intensidad de aproximadamente 60 μEm^{-2} . Se induce la tuberización *in vitro* incubando cortes polinodales de tallos de plántulas micropropagadas (explantos) en el medio MS con agregado de hormonas vegetales (Moreno y Tandecarz, 1996). Las preparaciones enzimáticas de los microtubérculos de papa obtenidos, se realizaron por homogeneización del material en mortero agregando tres veces su peso en volumen de 50mM Tris-HCl (pH 7,4), 20mM 2- β -mercaptoetanol, según el método de Tandecarz y col. (1978). Se filtró la preparación por muselina y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 x g a 4°C. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 4°C por 20 minutos a 25000 x g. El sobrenadante fue precipitado al 50% con sulfato de amonio, centrifugado a 3000 x g y dializado contra de 50mM Tris-HCl (pH 7,4), 20mM 2- β -mercaptoetanol a 4°C durante 12 hs. Esta preparación fue utilizada como fuente enzimática.

2.3. Preparación del inhibidor de UPTG (IP)

Se obtuvieron membranas (preparaciones particuladas) de endosperma de semillas inmaduras de maíz (*Zea mays* L.) flint y semident con el método ya descrito por Rothschild y Tandecarz (1994). Para solubilizar las preparaciones particuladas (35-50 mg proteína/ml) se las trató con Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 y 5 mM β -mercaptoetanol durante 48 horas a 0 °C. Luego de ultracentrifugar a 140000 x g durante 90 minutos, se obtuvo un sobrenadante claro el cual fue usado como fuente de inhibidor (Psol).

2.4. Preparación de UPTG recombinante

Las células de *E. coli* expresando los distintos clones de UPTG, se cultivaron en 50 ml de medio LB (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl) en presencia de 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilina y se incubaron a 37°C con agitación hasta DO_{600} : 0,4. Posteriormente, se realizó la inducción con IPTG 0.1mM y se continuó la incubación a 28°C durante toda la noche. Luego los cultivos se centrifugaron y las células se resuspendieron en 1ml de buffer 25 mM Tris (pH 7,6), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA (pH 8), 12,5 mM MgCl_2 , 10% glicerol, 0,1% NP-40, 1mM DTT, 0,1 mM metabisulfito de sodio y 0,1 mM PMSF. Se agregó 0,5 mg/ml de lisozima de clara de huevo, se incubó en hielo durante 30 minutos y se sonicó 3 veces durante 30 segundos (sonicador VirSonic, VIRTIS).

El lisado se centrifugó 20 minutos a 25000 x g y el sobrenadante se utilizó en los ensayos de actividad enzimática.

3. Protocolos de purificación

3.1. Purificación de UPTG de papa

Las preparaciones solubilizadas (~ 160 mg de proteína) se cromatografiaron en una columna de DEAE-Sepharosa fast-flow (1 x 30 cm) equilibrada en 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 20 mM mercaptoetanol (buffer A). La columna, acoplada a un equipo de cromatografía FPLC, se lavó con 4 volúmenes del mismo buffer y se eluyó con 80 ml de un gradiente lineal de KCl (0-0,5 M) en buffer A. Se realizó la cromatografía con una velocidad de flujo de 2 ml/min y se colectaron fracciones de 2 ml. Las fracciones que presentaron actividad UPTG se dializaron contra buffer A y luego se cromatografiaron en una columna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) acoplada a un equipo de cromatografía FPLC. La columna, equilibrada con buffer A, se corrió a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Luego de lavar con 15 ml del mismo buffer, se eluyó con 15 ml de un gradiente lineal de KCl (0-0,5 M) en buffer A. Se colectaron fracciones de 1 ml y se determinó la actividad de UPTG en alícuotas de las mismas.

3.2. Purificación del inhibidor IP de maíz

La preparación solubilizada a partir del endosperma de semillas inmaduras de maíz (6-15 mg de proteína) fue cromatografiada en una columna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) equilibrada con 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20 mM β -mercaptoetanol (buffer B). La columna, acoplada a un equipo de cromatografía FPLC, fue lavada con 6 ml de dicho buffer y se la eluyó con un gradiente lineal de 15 ml KCl (0-0,5 M) en buffer B con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Se recolectaron fracciones de 0,5 ml cada una, y se determinó la actividad de IP en las fracciones eluidas (I-M). Alícuotas de I-M (500 μ l, mg de proteína) fueron cromatografiadas en una columna Superosa 12 HR 10/30 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) acoplada a un equipo de FPLC. La columna fue previamente equilibrada con 100 mM KCl en buffer B (buffer C). Luego de cargar la muestra, se lavó la columna con 6,5 ml de buffer C a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min, se recolectaron fracciones de 0,5 ml y se guardaron las que presentaron actividad de IP (I-S).

4. Determinación de actividades enzimáticas

4.1. Ensayo de actividad de UPTG

La transferencia de [^{14}C]glucosa, [^{14}C]xilosa o [^{14}C]galactosa a partir de UDP-[^{14}C]Glc, UDP-[^{14}C]Xil o UDP-[^{14}C]Gal respectivamente, a una proteína aceptora endógena, se midió como la incorporación de radioactividad a un precipitado de 10% TCA (v/v) (Moreno et al., 1986). Salvo que esté indicado de otro modo, la mezcla standard de incubación contenía 10 mM MnCl_2 , UDP-[^{14}C]Glc, UDP-[^{14}C]Xil o UDP-[^{14}C]Gal (0.2 nmol, 80.000 cpm), 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) y enzima (10-300 μg de proteína) en un volumen final de 120 a 150 μl . La incubación se llevó a cabo a 30 °C durante 30 minutos y se detuvo por el agregado de 1 ml de 10% TCA frío. Se filtró a través de membranas de nitrocelulosa (Millipore BA 85), los filtros se lavaron por pasaje de 10 ml de 10% TCA frío y se secaron bajo lámpara infrarroja. Se colocaron los filtros en viales de plástico junto con 3 ml de solución centelleadora (4 gramos de Omnifluor por litro de tolueno) y se midió la radioactividad con un contador de centelleo líquido (Wallac, modelo 1214, RACKBETA).

4.2. Ensayo de inhibición de UPTG

El inhibidor de UPTG se detectó por la disminución en la radioactividad incorporada al precipitado de 10% TCA luego de glicosilar la enzima con UDP-[^{14}C]Glc. En un ensayo standard se incubaron a 30 °C durante 30 minutos las preparaciones con actividad UPTG (10-300 μg de proteína), 10 mM MnCl_2 , UDP-[^{14}C]Glc (0.2 nmol; 80000 cpm), 100 mM Tris-HCl pH 8,0 y las preparaciones conteniendo el inhibidor; en un volumen final de 150 μl . El porcentaje de inhibición de la actividad de UPTG se calculó asumiendo un 0% en ausencia del inhibidor.

4.3. Ensayo de reversibilidad de la reacción de glicosilación

La UPTG de tubérculo de papa proveniente de la columna Mono Q, fue glucosilada como ya se describió en el punto 4.1 y la mezcla de reacción fue pasada por una columna Sephadex G-25 para sacar los restos de UDP-[^{14}C]Glc. La fracción que contenía la UPTG-[^{14}C]Glc fue incubada 30 minutos a 30°C en presencia o ausencia de 1mM UDP. Los productos de la reacción fueron cromatografiados en columna Ultrasphere ODS de 4,6 x 25 cm con precolumna (Beckman, USA) acoplada a un equipo de HPLC. La muestra fue eluída con trietilaminafosfato pH 6,5 a una velocidad de flujo de 1 ml/min y se recolectaron fracciones de 0,5 ml donde se midió la presencia de [^{14}C]Glc y UDP-[^{14}C]Glc.

5. Enzimas auxiliares

5.1. Enzimas hidrolíticas

5.1.1. Ensayo de α -glucosidasa

El producto de la reacción de glicosilación fue precipitado con 10% TCA y luego fue lavado varias veces con 10% TCA, resuspendido en agua y se eliminó el resto de ácido con éter etílico. Al producto obtenido se le agregó 5 unidades de α -glucosidasa (Sigma, USA) en buffer 0.1 M citrato (pH 6) y se incubó a 37°C durante 48 horas bajo vapores de tolueno. Se detuvo la reacción agregando 1 ml de metanol. Se lavó el precipitado y se determinó la radioactividad insoluble remanente.

5.1.2. Ensayo de β -glucosidasa

El producto de la reacción de glicosilación fue precipitado con 10% TCA y luego fue lavado varias veces con 10% TCA, resuspendido en agua y se eliminó el resto de ácido con éter etílico. Al producto obtenido se le agregó 5 unidades de β -glucosidasa (Sigma, USA) en buffer 0,1 M acetato de Na (pH 5) y se incubó a 37°C durante 48 horas bajo vapores de tolueno. Se detuvo la reacción agregando 1 ml de metanol y se continuó como en 5.1.1.

5.1.3. Ensayo de β -xilosidasa

El producto de la reacción de glicosilación fue precipitado con 10% TCA y luego fue lavado varias veces con 10% TCA, resuspendido en agua y se eliminó el resto de ácido con éter etílico. Al producto obtenido se le agregó 1 unidad de β -xilosidasa (Sigma, USA) en buffer 0,05 M acetato de Na (pH 5) y se incubó a 25°C durante 48 horas bajo vapores de tolueno. Se detuvo la reacción agregando 1 ml de metanol y se continuó como en 5.1.1.

5.1.4. Ensayo de α -galactosidasa

El producto de la reacción de glicosilación fue precipitado con 10% TCA y luego fue lavado varias veces con 10% TCA, resuspendido en agua y se eliminó el resto de ácido con éter etílico. Al producto obtenido se le agregó 1 unidad de α -galactosilasa (Sigma, USA) en buffer 0,05 M acetato de Na (pH 4) y se incubó a 25°C durante 48 horas bajo vapores de tolueno. Se detuvo la reacción agregando 1 ml de metanol y se continuó como en 5.1.1.

5.1.5. Ensayo de β -galactosidasa

El producto de la reacción de glicosilación fue precipitado con 10% TCA y luego fue lavado varias veces con 10% TCA, resuspendido en agua y se eliminó el resto de ácido con éter etílico. Al producto obtenido se le agregó 1 unidad de β -galactosidasa (Sigma, USA) en buffer 0,05 M acetato de Na (pH 4) y se incubó a 25°C durante 48 horas bajo vapores de tolueno. Se detuvo la reacción agregando 1 ml de metanol y se continuó como en 5.1.1.

5.2. Fosfatasa alcalina

Fracciones solubles de *E. coli* que expresaban la UPTG de tubérculo de papa (100 μ g) fueron preincubadas a 30°C durante 30 minutos en buffer 50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM $MnCl_2$, 10 mM $MgCl_2$ en presencia o ausencia de 20 unidades de fosfatasa alcalina de intestino de ternero (Promega). Posteriormente, la mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos más a 30°C con UDP- $[^{14}C]$ Glc (0.2 nmol; 80000 cpm), y luego se midió la incorporación de $[^{14}C]$ Glc al precipitado de 10% TCA como ya se describió en 4.1.

6. Ensayo de β -eliminación

El producto de la reacción de glicosilación fue tratado con 0,5 N NaOH y 1 M BH_4Na durante 5 hs a 50°C. Luego se neutralizó la reacción con ácido acético glacial y se agregó 1 ml de metanol. Se lavó el precipitado y se determinó la radioactividad insoluble remanente. El sobrenadante metanólico se deionizó por filtración en columnas Dowex 50w-x8, se evaporó el borato bajo lámpara infra-roja lavándolo repetidas veces con metanol. Los productos de hidrólisis fueron analizados mediante electroforesis en papel.

7. Técnicas cromatográficas

7.1. Cromatografía en capa delgada

Se utilizaron placas con base de vidrio de 5 x 20 cm y 0,25 cm de espesor (Merck). El solvente utilizado fue acetonitrilo: ácido acético: etanol: agua (6:5:10:20) (v/v). Las muestras se sembraron a 2 cm del borde inferior de la placa y el desarrollo fue de 50 minutos. Las cromatografías fueron autoradiografiadas en placas Kodak X-Omat AR-5 a -70°C durante 14 días. Los standards externos fueron revelados por el método del nitrato de plata alcalino (Trevelyan y col., 1950), usando una solución acetónica de nitrato de plata al

1% (p/v) en medio alcalino (0,5 N NaOH en etanol). Las sales de plata remanentes fueron eliminadas con 5% tiosulfato de Na.

7.2. Cromatografía en papel

Las cromatografías fueron realizadas utilizando papel Whatman N° 1. El solvente empleado fue butanol-pirimidina-agua (6:4:3 v/v). Los picos radioactivos se detectaron mediante un radiocromatógrafo (Packard, Modelo 7200). Los azúcares no radioactivos fueron revelados por el método del nitrato de plata alcalino (Trevelyan y col., 1950). Las sales de plata remanentes fueron eliminadas con 5% tiosulfato de Na.

8. Técnicas electroforéticas

8.1. Electroforesis en papel

Se realizó sobre papel Whatman N°1 con enfriamiento por inmersión en tetracloruro de carbono. Se utilizaron voltajes de 500 volts (20 volts/cm) en desarrollos que duraron aproximadamente 2 horas. El buffer utilizado fue 0.1 M molibdato de Na (pH 5). Para la ubicación de los azúcares reductores se utilizó el método del nitrato de plata alcalino (Trevelyan y col., 1950). Las sales de plata remanentes fueron eliminadas por inmersión en 5% tiosulfato de Na.

8.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El análisis por SDS-PAGE fue realizado en una unidad Mini-Protean II (BioRad) usando geles de 0,75 mm de espesor, conteniendo el gel concentrador 5% (w/v) y el separador 10% (w/v) de acrilamida. La corrida electroforética se realizó durante 45 minutos a 200 mV según Laemmli (1970). Conjuntamente se sometieron a electroforesis standards de peso molecular (MW-SDS-200 y MW-SDS-70 L, Sigma). Las bandas proteicas se visualizaron mediante la coloración con Coomassie brilliant blue R-250. Los geles secos que contenían material radioactivo fueron expuestos a placas Kodak X-Omat AR-5 o Kodak BIOMAX MR a -70°C, durante 2 días para [³²P] ó 15 días para [¹⁴C] a menos que se indique lo contrario.

8.3. Electroforesis en geles de agarosa

8.3.1. Geles para ADN

La electroforesis de ADN se realizó en geles de 0,8-1,2% agarosa en buffer 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA (pH 8). Se le agregó a la mezcla 0,5 µg/ml bromuro de etidio para la visualización del ADN. La corrida electroforética se desarrolló a 5 volts/cm durante 1 hora, en el mismo buffer. El ADN fue examinado bajo lámpara ultravioleta.

8.3.2. Geles para ARN

El RNA (30µg) fue calentado a 65°C durante 15 minutos en presencia de 2µl de buffer de corrida 5X (MOPS 0,1 M pH 7, acetato de sodio 40 mM, EDTA 5 mM pH 8), 3,5 µl formaldehído y 10 µl formamida. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa 0,8%, buffer de corrida 1X y formaldehído 2,2 M.

9. Técnicas inmunológicas

9.1. Western blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa según Towbin y col., 1979. Se bloquearon las membranas durante 1 hora con leche descremada en polvo 10 % (P/V) en buffer fosfato salino (PBS) con 0,2% NP40 y luego se incubaron con el suero anti-UPTG (dilución 1:1000), anti-IP (dilución 1:1000) o anti-SS (dilución 1:10000) durante 1 hora. Luego de incubar las membranas durante 1 hora con anticuerpos contra conejo conjugados a peroxidasa, éstas se revelaron por quimioluminiscencia usando los reactivos comerciales ECL (DuPont). El suero anti-SS fue generosamente provisto por la Dra. Karen Koch (Universidad de Florida, Gainesville, FL, USA). En los casos en que las proteínas enfrentadas al suero anti-UPTG eran de origen bacteriano, el suero se adsorbió con un extracto de proteínas de *E. coli*. Aproximadamente 10 mg de proteína fueron acoplados covalentemente a 2 mg de Sepharosa 4B activada con CNBr (Pharmacia). La matriz acoplada fue incubada durante 15 horas a temperatura ambiente con 5 ml de 50 mM Tris-HCl pH:7.5, 150 mM NaCl y 0.1 % NP40 conteniendo 0,5 ml de suero anti-UPTG. La fracción de suero no unida a la matriz fue utilizada para los ensayos de Western blot.

9.2. Ensayo de neutralización

Se incubaron cantidades crecientes (0-600 μ l) del suero anti-IP de endosperma de maíz con 3,9 mg de la preparación particulada de endosperma de maíz, durante 30 minutos a 30 °C y posteriormente durante 2 horas a 0°C. Se centrifugó la mezcla de incubación durante 5 minutos a 14000 rpm a 4°C y se midió actividad UPTG tanto en el precipitado como en el sobrenadante.

9.3. Inmunoprecipitación

Se purificaron los anticuerpos anti-UPTG por precipitación con 50% sulfato de amonio, se dializó el precipitado contra buffer 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) (Buffer D) y luego se cromatografió en una columna DEAE-Sepharose fast flow. La columna se equilibró y lavó con 20 volúmenes de buffer D y se eluyó con un gradiente de NaCl (50-300 mM) en el mismo buffer. Las fracciones con los anticuerpos se detectaron por Abs₂₈₀.

Los anticuerpos se acoplaron a Sepharose 4B activada con CNBr (2 mg anticuerpos/ml resina) por incubación durante 12 horas a 4°C en buffer 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,3), 0,5 M NaCl. Se bloquearon los grupos reactivos restantes con 1 M etanolamina durante 12 horas a 4°C. Se lavó el exceso de proteínas adsorbidas con buffer 0,1 M acetato de Na.

Se incubaron los anticuerpos acoplados a la resina con un homogenato de tubérculos de papa (S14500) durante 12 horas a temperatura ambiente con agitación. Se precipitaron los anticuerpos por centrifugación y se probó la eficiencia de la inmunoprecipitación por medio de electroforesis en SDS-PAGE y posterior Western blot con el suero anti-UPTG.

10. Fosforilación *in vitro*

La reacción se realizó incubando 100 μ g de un homogenato de tubérculos de papa (S14500) con 1 μ Ci ATP[γ -³²P], 1 mM ATP, 0,25 mM CaCl₂, 150 nM ácido okadaico a 30°C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se inmunoprecipitó como se describe en el ítem 9.3 y las proteínas precipitadas se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE y posterior autoradiografía durante 5 días a -70°C en placas Kodak BIOMAX MR.

11. Determinación de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada según el método de Lowry y col. (1951). Asimismo se estimó la concentración de proteínas eluídas de las columnas DEAE

fast flow, Mono Q y Superosa 12 mediante la absorbancia de las mismas a 280 nm y de la columna Ultrasphere ODS mediante la absorbancia a 260 nm.

12. Northern blot

12.1. Aislamiento de ARN

Los tejidos vegetales fueron congelados en nitrógeno líquido y molidos en mortero hasta obtener un fino polvo. Como buffer de extracción se usaron 2 volúmenes de 8 M clorohidrato de guanidina, 20 mM MES, 20 mM EDTA, 50 mM 2 β -mercaptoetanol. Se centrifugó durante 10 minutos a 3000 x g. El sobrenadante obtenido se filtró por muselina y se emulsionó con 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó durante 45 minutos a 3000 x g. La fase acuosa se precipitó con 0,2 volúmenes de 1 M ácido acético glacial y 0,7 volúmenes de 100% etanol, durante 1 h a -70°C. Se centrifugó durante 10 minutos a 3000 x g. El precipitado fue lavado 2 veces con 3 M acetato de sodio (pH 5,2) y las sales fueron removidas con 70% etanol. El ARN obtenido fue resuspendido en agua estéril y se determinó Abs₂₆₀/Abs₂₈₀.

12.2. Marcación de sondas radioactivas

Las distintas sondas radioactivas se marcaron con dCTP-[α^{32} P] mediante la técnica de cebado al azar (random priming) usando un sistema comercial (Prime-a-gene Labeling System, Promega, USA).

12.3. Hibridización

El ARN se separó por electroforesis en gel de agarosa como se describe en el ítem 8.3.2 y luego se transfirió a una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham) por capilaridad según Sambrook y col. (1989). La pre-hibridización se realizó durante 2hs a 65°C en 1% BSA, 0,5 M Na₂PO₄, 1 mM EDTA, 7% SDS. Luego se agregó la sonda radioactiva desnaturalizada y se incubó 12 horas más. Las membranas fueron lavadas con 40 mM Na₂PO₄, 1 mM EDTA, 1% SDS dos veces durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego durante 15 minutos a 65°C. Las membranas fueron expuestas a placas Kodak X-Omat AR-5 o Kodak BIOMAX MR a -70°C durante 2-4 días. Los niveles de ARN fueron cuantificados por densitometría mediante el programa Scion Image, normalizados con respecto a la señal respectiva del ARNr y expresados como unidades arbitrarias.

13. Southern blot

13.1. Aislamiento de ADN genómico de plantas papa

El ADN se extrajo por homogeneización en mortero de 1 g de hojas de plantas de papa congeladas. Se pasó el fino polvo a tubos de propileno y se agregaron 6 ml de buffer de extracción (100mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 1,4 M NaCl, 2% CTAB, 2% 2 β -mercaptoetanol) precalentado a 65°C. Se incubó durante 1 hora a 65°C agitando cada 10-15 min. Luego de enfriar 5 minutos, se agregaron 4 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a temperatura ambiente durante 15 minutos a 3000 x g. Se tomó la fase acuosa y se repitió la extracción 3 veces. A la fase acuosa de la última extracción se le agregó 0,7 volúmenes de 2-propanol. Se incubó 1 hora a -20°C y se centrifugó 15 minutos a 25000 x g. El precipitado obtenido fue lavado con 70 % etanol, resuspendido en 125 μ l de agua estéril y tratado con RNasa durante 1 hora a 37 °C. El ADN fue conservado a -20°C.

13.2. Hibridización

6 μ g de ADN genómico de plantas de papa se digirieron exhaustivamente con EcoRI o con XbaI. Luego, se analizaron los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa 1% como ya se describió en el punto 8.3.1 y se transfirieron a membranas de nylon Hybond-N+ (Amersham) por capilaridad. Las membranas se hibridizaron y autoradiografiaron de igual manera que en el punto 12.3.

14. Preparación de sondas específicas

14.1. Diseño de sondas específicas

Mediante el programa de computación ALIGN disponible a través de Internet (<http://genome.eerie.fr/fasta/align-query.html>), se compararon las secuencias nucleotídicas de los clones E11 y E2 que codifican para UPTG1 y UPTG2, respectivamente. Se seleccionó un fragmento en el carboxilo terminal que mostró menor homología entre ambas secuencias. El programa PRIMER (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer2.2/primer_front), también disponible a través de Internet, fue utilizado para seleccionar oligonucleótidos específicos para amplificar cada sonda mediante la técnica de PCR.

14.2. Amplificación de sondas por PCR

Los templados utilizados para las sondas de los experimentos de Southern y Northern blot fueron sintetizados por PCR, usando distintos pares de oligonucleótidos para amplificar la región conservada (sonda general) o las regiones menos conservadas entre UPTG1 y UPTG2 (sondas específicas). Cuando se amplificó el ADNc completo del clon UPTG1 se utilizaron como oligonucleótidos el M13/pUC Forward y Reverse amplification primers (Gibco). Cuando se sintetizaron sondas específicas para el clon UPTG1 o UPTG2 se diseñaron oligonucleótidos que amplificaban diferencialmente fragmentos de un clon o del otro. El programa de PCR utilizado fue: 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de (94°C durante 1 minuto, 48°C durante 40 segundos, 72°C durante 45 segundos) y una última etapa de 72°C durante 5 minutos.

15. Preparaciones de plásmidos

En líneas generales, los plásmidos fueron purificados a partir de cultivos de *Escherichia coli* XL1Blue mediante el método de la lisis alcalina (Sambrook y col., 1989). Se cultivaron las células en 3 ml de medio LB en presencia de 100µg/ml ampicilina a 37°C con agitación durante 14-20 horas. Se centrifugaron los cultivos a 8000 x g por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 200µl de 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 0,1 mg/ml RNasa. Se agregaron 200 µl de 0,2 N NaOH, 1% SDS, se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µl de 3M acetato de sodio pH 4,8, se mezcló por inversión y se incubó durante 10 minutos en hielo. Se centrifugó durante 20 minutos a 17000 x g y el sobrenadante obtenido se precipitó con 500 µl de isopropanol en hielo durante 20 minutos. Luego de centrifugar 25 minutos a 17000 x g, el precipitado se lavó con 70 % etanol, se dejó evaporar el alcohol y el ADN obtenido se resuspendió en 20 µl de agua MilliQ.

16. Subclonado de UPTG1 en pTrcHis y purificación de la proteína recombinante

16.1. Subclonado de UPTG1 en pTrcHis

Preparaciones de pBluescript-UPTG1 y de pTrcHis (Invitrogene) se cortaron con EcoRI (Gibco) durante 2hs a 37°C. Luego se incubó la preparación de pTrcHis 30 minutos a 37°C en presencia de 100 µM EDTA y 0,1U fosfatasa alcalina de intestino de ternero (Boehringer). Los productos de restricción de ambos plásmidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 0,8% y luego se purificaron las bandas correspondientes al

inserto UPTG1 y al vector pTrcHis mediante un sistema comercial (Geneclean, BIO101, USA). La ligación se realizó incubando durante 16hs a 4°C la siguiente mezcla de reacción: 100ng de ADN (1:3 inserto/vector), buffer de ligación (60mM Tris-HCl, pH 7,5, 5mM MnCl₂, 1mM DTT, 1mM ATP) y T4 ADN ligasa. Las células competentes de *E. coli* fueron incubadas con 50ng ADN de pTrcHis-UPTG1 durante 30 minutos en hielo. Luego se incubó la mezcla 90 segundos a 42°C y se la volvió a pasar a hielo durante 2 minutos más. Se agregó medio SOC (20g/l triptona, 5g/l extracto de levadura, 0,5g/l NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 20mM glucosa) y se las mantuvo en agitación suave durante 90 minutos a 37°C. La selección de los clones positivos se hizo en LB agar-ampicilina a 37°C durante 14-20 horas. Las colonias crecidas fueron amplificadas y su ADN fue extraído y purificado como se describe en el punto 15. El ADN de cada clon fue cortado con EcoRI (Gibco) para confirmar la presencia del inserto de 1.4kb y posteriormente fue confirmada la dirección de inserción del mismo mediante el corte de restricción con NcoI (Promega).

16.2. Expresión de la proteína recombinante

A partir del cultivo de toda la noche se inocularon 50 ml de medio LB con ampicilina que se incubaron con agitación a 37°C hasta DO₆₀₀: 0,4. En ese momento se realizó la inducción con IPTG (5μM a 0,1 mM) y se continuó la incubación a 28°C durante 5 a 16 horas. Luego el cultivo se centrifugó y las células se resuspendieron en 1 ml de 50 mM Na₂PO₄ pH 8, 0,5 M NaCl, 12,5 mM MgCl₂, 0,1% NP-40, 1mM DTT y 0,1 mM PMSF. Se agregó lisozima en una concentración final de 0,5 mg/ml, se incubó en hielo durante 30 min y se sonicó 2 veces durante 30 segundos (Sonicador VirSonic, VIRTIS). El lisado obtenido fue centrifugado 20 min a 25000 x g guardándose el sobrenadante que se utilizó como fuente enzimática.

16.3. Purificación parcial de la proteína recombinante

Una vez obtenido el sobrenadante de 25000 x g se lo sometió a cromatografía en columna de afinidad en ácido iminodiacético acoplado a una matriz de Sepharose fast flow (IMAC: *Iminodiacetic Metal Affinity Chromatography*, Chelating Sepharose FF, Pharmacia). La columna, previamente cargada con 50mM NiCl₂ se equilibró con 50 mM NaPO₄, pH: 8, 0.5 M NaCl. Luego de sembrada la muestra, se lavó la columna con 10 vol. del mismo buffer y luego se eluyeron las proteínas unidas a la resina con un gradiente de 0-0,4M imidazole en el buffer ya mencionado.

17. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Cepas

E. coli XL1Blue (Stratagene)

genotipo

*endA1 hsdR17(rk⁻,mk⁺) supE44 thi-1 λ⁻ recA
gyrA96 relA1 lac⁻ /F' proAB lacI^qΔM15
Tn10(Tet^r)*

Plásmidos

pBluescript SK⁻ (Short y col.,1988)

Amp^r*lacZ*⁺

pUC19 (Yanisch-Perron y col., 1985)

Amp^r*lacZ*⁺

pTrcHis (Invitrogen)

Amp^r*lacZ*⁺

Resultados

1. Caracterización bioquímica de la reacción de UPTG en *Solanum tuberosum*

Como ya mencionamos en la introducción, la UDP-glucosa: proteína transglucosilasa (UPTG, EC 2.4.1.112), aislada y caracterizada en nuestro laboratorio, es una de las pocas glicosiltransferasas autocatalíticas conocidas hasta el momento. Se había encontrado previamente que la enzima UPTG era capaz de incorporar glucosa, xilosa y galactosa a partir de los nucleótidos azúcares correspondientes, aunque aún no se conoce el tipo de enlace covalente entre la porción glicosídica y la proteína. (Bocca y col., 1999). Las uniones glicosídicas más frecuentes son las O-glicosídicas (lábilas al tratamiento en condiciones alcalinas suaves) y las N-glicosídicas (resistentes al tratamiento en condiciones alcalinas suaves). Aquí, profundizamos aspectos relacionados con el tipo de unión glicosídica que establecen los diferentes sustratos azúcares con la UPTG.

1.1. Naturaleza del enlace glicosídico

Se estudió la sensibilidad al tratamiento con diversas enzimas hidrolíticas de los productos formados a partir de UDP-[C¹⁴]Glc, UDP-[C¹⁴]Xil y UDP-[C¹⁴]Gal (Tabla 2). Se vio que cuando se trataban los productos con β -glucosidasa, β -xilosidasa o β -galactosidasa, disminuía la radioactividad en el precipitado de 10% TCA con respecto al control. Por otro lado, los productos formados a partir de UDP-[C¹⁴]Glc mostraron ser resistentes al tratamiento con α -glucosidasa.

Así, estos resultados sugieren que el azúcar se estaría uniendo a la proteína en configuración β . La disminución de la radioactividad en el precipitado de 10% TCA luego del tratamiento con α -galactosidasa podría deberse a una contaminación de la enzima con β -galactosidasa.

Tratamiento	Radioactividad en el precipitado de TCA (% del control)		
	UDP-[C ¹⁴]Glc	UDP-[C ¹⁴]Xil	UDP-[C ¹⁴]Gal
β -glucosidasa	9%	-	-
α -glucosidasa	92%		
β -xilosidasa		7%	
α -galactosidasa			33%
β -galactosidasa	-	-	35%

Tabla 2. Tratamiento con diferentes enzimas hidrolíticas del producto de la reacción de UPTG. Los valores se expresan como porcentajes con respecto a los controles: 15300 cpm, 10900 cpm y 7500 cpm incorporadas al precipitado de 10% TCA luego de incubar con UDP-[C¹⁴]Glc, UDP-[C¹⁴]Xil o UDP-[C¹⁴]Gal, respectivamente. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos.

Para estudiar el tipo de unión glicosídica entre el azúcar y la proteína UPTG, se sometió al producto radioglicosilado a un tratamiento de β -eliminación y posterior reducción con BH₄Na. Así, el azúcar unido a la proteína se convierte en su correspondiente azúcar-alcohol. El producto radioactivo de la reacción luego de la incubación con UDP-[C¹⁴]Glc, UDP-[C¹⁴]Xil o UDP-[C¹⁴]Gal se sometió a tratamiento alcalino en condiciones reductoras en presencia de diferentes concentraciones de NaOH y distintas temperaturas de incubación. Se encontró que los productos, luego de la incubación con UDP-[C¹⁴]Glc, UDP-[C¹⁴]Xil o UDP-[C¹⁴]Gal, eran sensibles a dicho tratamiento en presencia de 0.5 N NaOH y 1 M BH₄Na durante 5 horas a 50°C (Tabla 3). Se encontró una liberación de un 93-97% de la radioactividad al sobrenadante de TCA (Tabla 3).

Estos resultados muestran que la unión entre la UPTG y la glucosa, xilosa o galactosa se comporta más bien como las del tipo N pues se rompe en condiciones relativamente fuertes y no en condiciones suaves (temperatura ambiente y menor concentración de BH₄Na, dato no mostrado).

Tratamiento	Radioactividad en el precipitado de TCA (cpm)		
	UDP-[C ¹⁴]Glc	UDP-[C ¹⁴]Xil	UDP-[C ¹⁴]Gal
Control	20000	10700	12700
β -eliminación	600	750	380

Tabla 3. Efecto del tratamiento de β -eliminación sobre el producto de la reacción de glicosilación. Los controles se realizaron midiendo la incorporación de productos radioactivos al precipitado de 10% TCA antes del tratamiento de β -eliminación. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos.

1.1.1. Análisis de los productos

Los productos liberados al sobrenadante de TCA por tratamiento con enzimas hidrolíticas fueron sometidos a cromatografía en papel y en capa delgada. En la cromatografía en papel se observó la presencia de un pico correspondiente a Glc proveniente de los productos formados a partir de UDP-[C¹⁴]Glc y un pico correspondiente a Xil proveniente de los productos formados a partir de UDP-[C¹⁴]Xil (datos no mostrado). Por cromatografía en capa delgada se encontró que el producto formado a partir de UDP-[C¹⁴]Xil y tratado con β -xilosidasa presentaba una movilidad similar a xilosa y el producto formado a partir de UDP-[C¹⁴]Gal y tratado con β -galactosidasa presentaba una movilidad similar a galactosa (Figura 15). Estos datos descartan la posibilidad de que el UDP-Xil o el UDP-Gal se transformara en UDP-Glc antes de glicosilar a la UPTG.

Así, los análisis de los productos luego de la glicosilación de UPTG a partir de los tres sustratos azúcares, confirman que la enzima UPTG además de autoglucosilarse realmente es capaz de autoxilosilarse y autogalactosilarse.

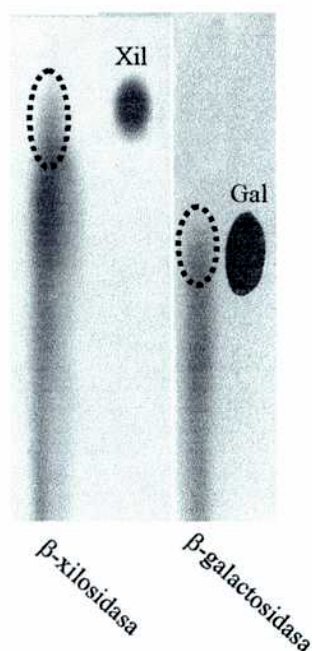


Figura 15. Cromatografía en capa delgada de los productos liberados al sobrenadante de TCA luego del tratamiento con β -xilosidasa o β -galactosidasa. La xilosa y galactosa comerciales fueron visualizadas por el método del nitrato de plata alcalino como se describe en Materiales y Métodos. Las placas fueron autoradiografiadas durante 14 días a -70°C .

Luego, se analizaron los productos de xilosilación (Figura 16A) y galactosilación (Figura 16B) de UPTG luego de la β -eliminación, mediante electroforesis en papel para analizar la cantidad de residuos unidos a la proteína. Se vio que el producto obtenido a partir de la incubación con UDP-Xil migraba como xilitol, lo que indicó que un único residuo de xilosa se unía a la proteína. De manera similar, el producto obtenido a partir de la incubación con UDP-Gal migraba como galactitol. Se había descripto anteriormente en fracciones solubilizadas de tubérculos de papa que un único residuo de glucosa se unía a la UPTG (Tandecarz y Cardini, 1978).

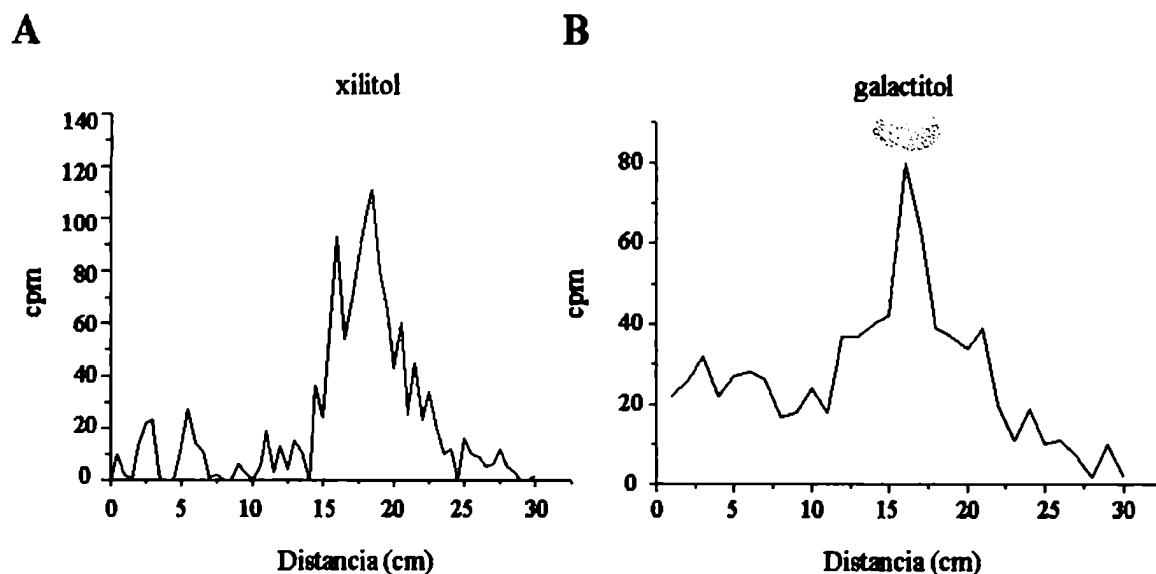


Figura 16. Electroforesis en papel del producto de la reacción de UPTG luego de la incubación con UDP-[C¹⁴]Xil (A) o UDP-[C¹⁴]Gal (B) y posterior tratamiento alcalino. El xilitol y el galactitol comercial fueron visualizados mediante el método del nitrato de plata alcalino como se describe en Materiales y Métodos.

1.2. Reversibilidad de la reacción

Como se mencionó en la Introducción, se había descrito que la glucosilación de la UPTG era reversible. Se encontró que la glucosa radioactiva unida a la subunidad de 38kDa de la proteína podía ser desplazada por la presencia de UDP-azúcares en concentraciones del orden de milimolar y también en presencia de 1 mM UDP (Bocca y col., 1999). Por lo tanto, un dato muy importante a conocer sobre la reacción de catálisis de la enzima, es saber si la reacción es reversible o si se trata de una deglicosilación.

Para empezar a estudiar la dinámica de la reacción de autoglicosilación, se incubó una fracción de microtubérculos de papa que presentaba actividad de UPTG en presencia de UDP-[C¹⁴]Glc y después de 30 minutos se incubó la mezcla de reacción en presencia de UDP-Glc o UDP-Xil no radioactivos en concentraciones desde 6 μ M hasta 2 mM (Tabla 4). Los resultados muestran que en presencia de concentraciones milimolares de UDP-Glc la radioactividad asociada con la proteína es desplazada de manera similar a lo descrito previamente para la enzima purificada de papa (Bocca y col., 1999). Por otro lado, se

encontró también que cantidades micromolares de UDP-Glc son suficientes para lograr desplazar la radioactividad incorporada a la enzima. Similares resultados se encontraron cuando se incubó la enzima en presencia de concentraciones milimolares de UDP-xilosa. Sin embargo, cuando se utilizaron concentraciones micromolares de UDP-Xil encontramos la misma incorporación de radioactividad que en el control, lo que indica que en las condiciones del ensayo el UDP-xilosa no es capaz de desplazar la radioactividad incorporada a la UPTG.

UDP-azúcar no radioactivo agregado		Radioactividad incorporada al precipitado de TCA (cpm)
Control	-	1923
UDP-Glc	6 μ M	238
	0,1 mM	290
	2 mM	114
UDP-Xil	6 μ M	1886
	50 μ M	1989
	0,1mM	1932
	0,3 mM	1905
	0,5 mM	533
	1 mM	212
	2 mM	653

Tabla 4. Efecto del agregado de distintas concentraciones de UDP-Glc o de UDP-Xil sobre la glucosilación de UPTG. El ensayo se realizó en dos etapas, en la primera etapa se radioglucosiló la enzima (sobrenadante de 25000g de microtubérculos) como se describe en Materiales y Métodos y en la segunda etapa se incubó la enzima glucosilada durante 15 minutos más a 30°C en presencia de diversas cantidades de UDP-Glc o UDP-Xil no radioactivos. El control se realizó sin ningún agregado en la segunda etapa de la incubación.

No se puede descartar que la disminución de la radioactividad incorporada en las condiciones anteriormente estudiadas se deba a una deglicosilación de la enzima. Para analizar dicho aspecto, se prepararon productos radioactivos de UPTG a partir de UDP-[C¹⁴]Glc y luego de la incubación, se separó la UPTG radioglucosilada del exceso de sustrato que queda en la mezcla de incubación por una columna Sephadex G-25.

Posteriormente se realizó el ensayo de desplazamiento. Para ello, se incubó la fracción correspondiente a la UPTG- $[C^{14}]$ Glc durante 30 minutos a $30^{\circ}C$ en presencia o ausencia de 1mM UDP. Los productos de la reacción fueron cromatografiados en HPLC en una columna Ultrasphere ODS y se midió la presencia de $[C^{14}]$ Glc y UDP- $[C^{14}]$ Glc en las fracciones obtenidas (Figura 17). Se observó que en presencia de UDP, el pico radioactivo correspondiente con la movilidad de Glc aumenta significativamente.

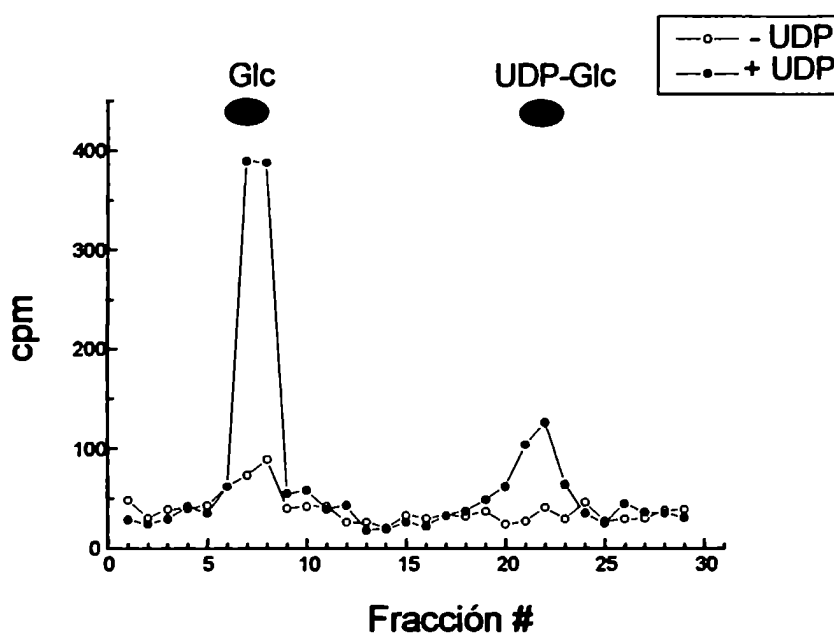


Figura 17. Cromatografía en HPLC. La UPTG parcialmente purificada de tubérculo de papa se radioglucosiló y luego se pasó por una columna Sephadex G-25 para sacar los restos de UDP- $[C^{14}]$ Glc. Posteriormente, la enzima se incubó 30 minutos a $30^{\circ}C$ en presencia o ausencia de 1mM UDP y se sometió a cromatografía en columna Ultrasphere ODS. Se tomaron alícuotas de 0,7 ml y se midió la radioactividad en alícuotas de 0,1 ml de cada fracción. La elución de $[C^{14}]$ Glc y UDP- $[C^{14}]$ Glc se muestra en la figura.

Este resultado sugiere que la UPTG podría deglicosilarse en presencia de UDP perdiendo la Glc unida por la reacción de autoglucosilación. Por otro lado, se observó también una pequeña cantidad de UDP- $[C^{14}]$ Glc, aunque en este caso el aumento con respecto al control fue mucho menor (Figura 17).

1.3. Análisis de los productos de glicosilación luego de la incubación con dos azúcares en la mezcla de incubación

Sabemos que cuando se incuba una fracción de tubérculos de papa con concentraciones micromolares de los nucleótido-azúcares por separado, la única proteína radioglicosilada es la UPTG y ésta presenta un solo residuo de azúcar unido a sí misma. Aquí, investigamos si en presencia de dos nucleótidos azúcares juntos en la mezcla de incubación se forma o no un producto diferente sobre la UPTG comparado con el que se forma en presencia de cada sustrato por separado.

Cuando se incubó la fracción enzimática en presencia de UDP-[C¹⁴]Glc y UDP-[C¹⁴]Xil juntos en la mezcla de reacción, se vio un aumento en la radioactividad incorporada al precipitado de TCA mayor a la suma de las radioactividades incorporadas cuando se incubaba dicha preparación en presencia de UDP-[C¹⁴]Glc o UDP-[C¹⁴]Xil por separado (Tabla 5).

UDP- [C ¹⁴]Glc	UDP-[C ¹⁴]Xil	Radioactividad incorporada al precipitado de TCA (cpm)
170 pmol	-	1900
-	170 pmol	1200
170 pmol	170 pmol	7503

Tabla 5. Glicosilación de UPTG en presencia de UDP-[C¹⁴]Glc y UDP-[C¹⁴]Xil. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos.

Podría ocurrir que dicho aumento en la incorporación de radioactividad en presencia de ambos nucleótido-azúcares fuera debido a la formación de un disacárido de glucosa-xilosa que quedara unido a la enzima UPTG y que estuviera involucrado en las primeras etapas intermediarias de la síntesis de los xiloglucanos. Sin embargo, cuando se analizaron los productos de la reacción en presencia de los dos azúcares por geles de poliacrilamida y posterior fluorografía, no se encontró una mayor radioactividad asociada con la banda de UPTG ni tampoco se observó otra proteína marcada radioactivamente (datos no mostrados).

Además, cuando se analizaron los productos radioactivos sintetizados en presencia de 170 pmol de UDP-[C¹⁴]Glc y de 170 de UDP-Xil y posterior tratamiento con β -

glucosidasa, se vio por cromatografía en papel que se formaba un único pico con una movilidad correspondiente a glucosa (Figura 18). Esto también indica que el producto incorporado a la enzima no sería un disacárido pues, en los xiloglucanos la unión glc-xil es de tipo α y por lo tanto debería ser resistente al tratamiento con β -glucosidasa. También, la movilidad correspondiente a un disacárido se debería observar como un pico radioactivo a la izquierda de la glc. Aunque se observó un pequeño hombro a la izquierda de la glc, este no presentó una cantidad significativa de radioactividad.

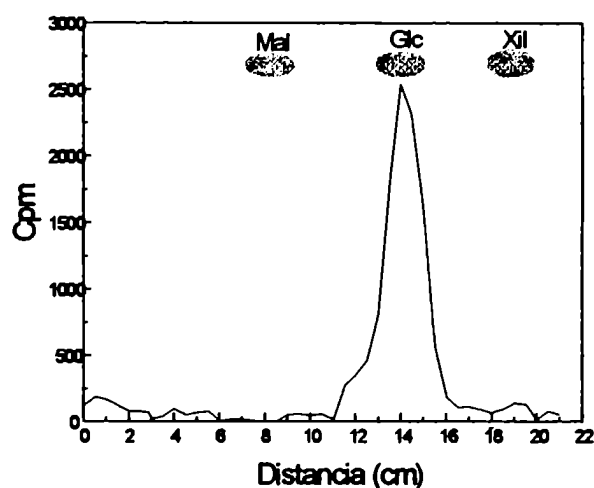


Figura 18. Distribución de la radioactividad luego de cromatografía en papel de los azúcares liberados por hidrólisis con β -glucosidasa a partir de los productos formados con 170 pmol UDP- $[C^{14}]$ Glc y 170 pmol UDP-Xil como dadores. La cromatografía y radiocromatografía se realizaron como se describe en Materiales y Métodos.

El incremento en la radioactividad observado en la Tabla 5 podría deberse a la presencia de otro aceptor de xilosas en la preparación enzimática diferente a la UPTG y quizás de naturaleza no proteica. De acuerdo con esta hipótesis, cuando se analizaron por cromatografía en papel los productos de hidrólisis con β -glucosidasa luego de incubar la UPTG con 170 pmol de UDP- $[C^{14}]$ Xil y 170 pmol UDP-Glc fría, se vieron picos radioactivos con menor movilidad que la xilosa. En este caso también se observó un pico con una movilidad correspondiente a xilosa que correspondería al residuo unido a la UPTG (Dato no mostrado). Por otro lado, si existiera otro aceptor de xilosas que estuviera compitiendo con la UPTG por el UDP-Xil se podría explicar el hecho que a concentraciones micromolares el UDP-xilosa no es capaz de desplazar la radioactividad

incorporada a la UPTG (Tabla 4). La naturaleza del aceptor de xilosas distinto de UPTG en dicha preparación no fue investigada.

2. Caracterización bioquímica de la reacción de UPTG en *Zea mays*

Como mencionamos en la Introducción, Rothschild y Tandecarz (1994) habían descrito la presencia de un inhibidor termolábil (IP) en preparaciones de endosperma de semillas inmaduras de maíz. Dicho inhibidor fue posteriormente purificado a homogeneidad (Rothschild y col., 1996) y se secuenciaron dos péptidos internos de la proteína (Wald y col., 1998). La búsqueda en bancos de datos reveló una alta homología de los péptidos de IP con secuencias conocidas de sacarosa sintetasa (SS) de otras especies vegetales. Estos datos sugirieron que el inhibidor podría estar relacionado con la SS y por lo tanto decidimos investigar esta hipótesis.

2.1. Identificación de la naturaleza del inhibidor

2.1.1. Caracterización bioquímica

Como primer paso para investigar si la actividad inhibitoria de IP estaba o no relacionada con la actividad de SS, se analizó si en la preparación que contenía actividad de IP se encontraba también la actividad de SS. En la Figura 19A se muestra que tanto la actividad de IP como la de SS están presentes en la preparación de maíz. Mientras que se observó una cinética rápida para IP (en 2 minutos alcanza el plateau), la dinámica de la reacción para la actividad de SS resultó más lenta. Esto podría sugerir la existencia de diferentes sitios catalíticos para cada una de las actividades (de IP o de SS) sobre la misma proteína.

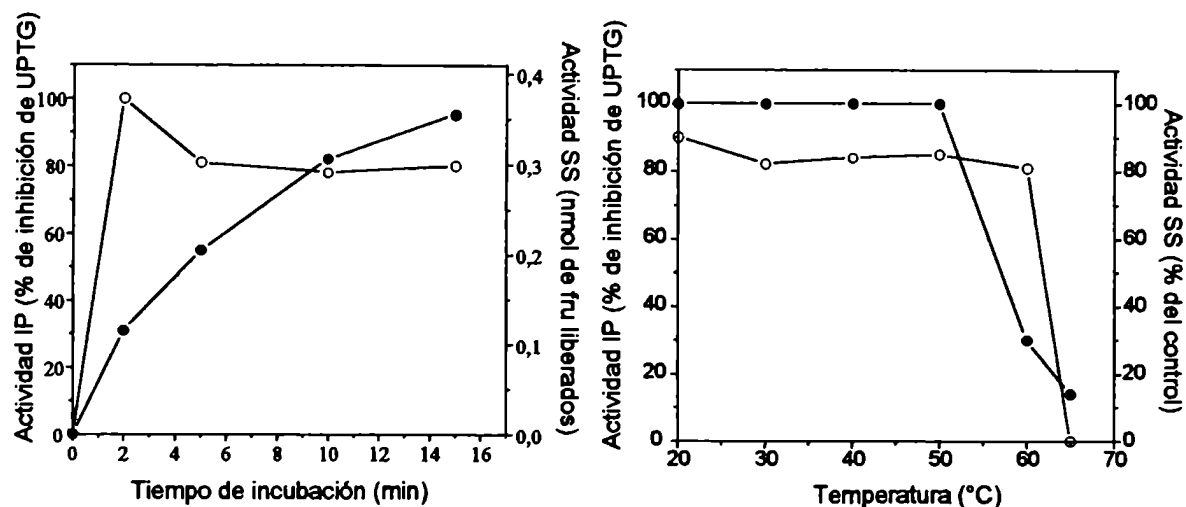


Figura 19. (A) Curva de tiempo de las actividades IP y SS. Se incubaron alícuotas (15 µg) de la preparación solubilizada de maíz a 30°C y se determinaron las actividades de IP (O-O) y de SS (●-●) como se describe en Materiales y Métodos. **(B) Estabilidad térmica de IP y SS.** Alícuotas (30 µg) de la preparación solubilizada de maíz fueron pre-incubadas por 5 min a distintas temperaturas y se determinaron las actividades de IP (O-O) y de SS (●-●).

Rothschild y col. (1996) habían reportado que IP perdía su capacidad de inhibir a la UPTG luego de ser calentado a 65°C. Entonces, para analizar si la actividad SS también presentaba termosensibilidad se midieron ambas actividades (IP y SS) luego de pre-incubar la preparación a distintas temperaturas (Figura 19B). Los resultados obtenidos muestran una buena correlación hasta los 50°C, sin embargo, cuando la muestra es pre-incubada entre los 50-60°C, SS pierde aproximadamente el 70% de su actividad mientras que la actividad de IP recién se pierde entre 60-65°C. Esta leve diferencia de 5°C entre las estabildades térmicas de ambas actividades, podría deberse a que la proteína SS requiera una desnaturalización más exhaustiva para perder su actividad IP. Con respecto a la termoestabilidad de la proteína SS, nuestros datos coinciden con los de Su y Preiss (1978) quienes también habían observado una rápida pérdida de la actividad SS de maíz cuando incubaban la enzima a 60°C.

Posteriormente, se estudiaron las propiedades cromatográficas de las actividades de IP y de SS. Una alícuota de la preparación solubilizada de endosperma de maíz fue cromatografiada en una columna de intercambio aniónico (Mono Q) y se determinaron las actividades de IP y de SS (Figura 20A). Se encontró que las actividades de IP y de SS copurificaban en un mismo pico que eluía a 0.23 M KCl.

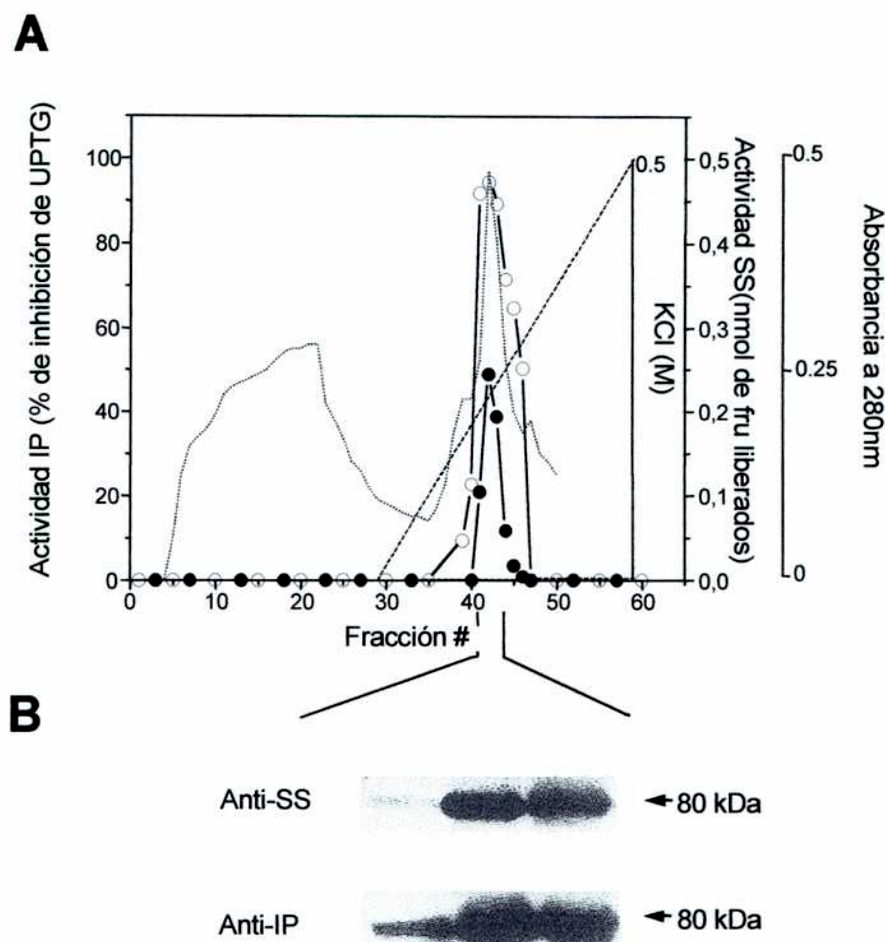


Figura 20. (A) Cromatografía en Mono Q. Se cromatografió una preparación solubilizada de endosperma de maíz (15 mg de proteína) en una columna Mono Q y se determinaron las actividades IP (○-○) y SS (●-●). (----) gradiente de KCl; (....) A_{280} . **(B) Western blot.** Se analizaron alícuotas de 50 μ l de las fracciones eluidas de la Mono Q con anticuerpos anti-IP y anti-SS.

Luego, el pico de la Mono Q que contenía ambas actividades fue cromatografiado en una columna de tamiz molecular con el fin de analizar el tamaño molecular (Figura 21A). Nuevamente se observó que las actividades de IP y de SS coelúan en un mismo pico que correspondía a un tamaño molecular de ~ 360 kDa. Este valor coincide con los datos reportados para la SS de maíz, que muestran que la enzima posee una estructura tetramérica de alrededor de 360 kDa con una alta actividad específica (Su y Preiss, 1978).

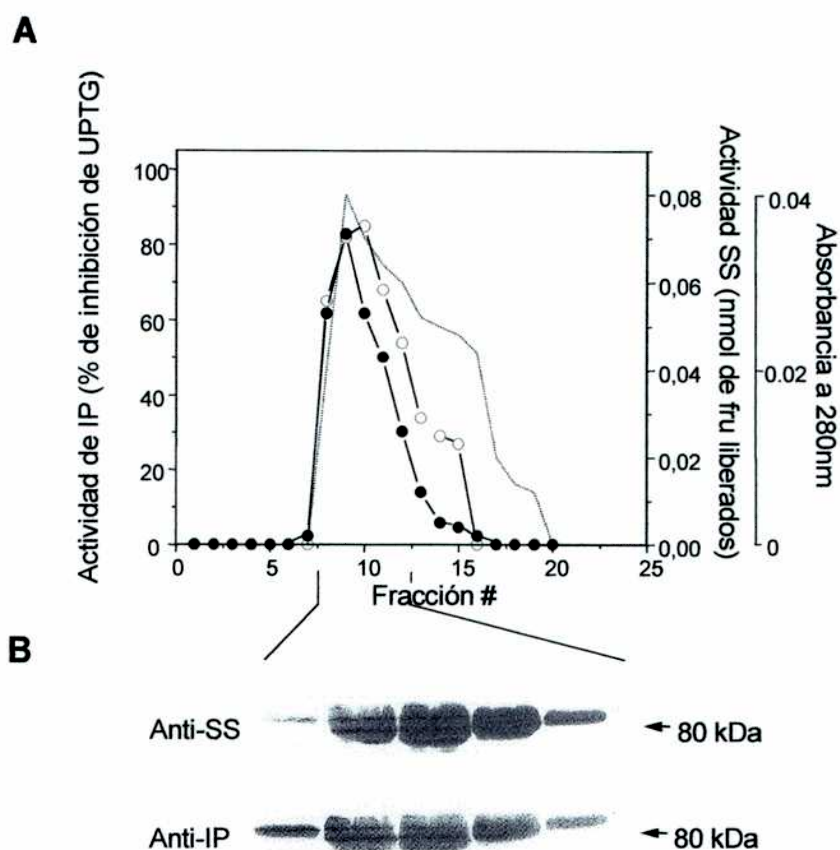


Figura 21. (A) Cromatografía en Superosa 12. Se inyectó una alícuota (0.3-0.5 mg de proteína) de IP parcialmente purificado proveniente de la columna Mono Q en una columna Superosa 12 y se determinaron las actividades IP (○-○) y SS (●-●). (....) A_{280} . **(B) Western blot.** Se analizaron las fracciones (alícuotas de 500 μ l) de la Superosa 12 con anticuerpos anti-IP y anti-SS.

Para analizar si IP está inmunológicamente relacionado con SS, se llevaron a cabo experimentos de Western blot con un anticuerpo anti-SS. También se compararon los resultados obtenidos con un anticuerpo anti-IP generado en el laboratorio. Para ello, se analizaron las fracciones de la Mono Q que presentaban actividad de IP y de SS (# 41-43) mediante la técnica de Western blot (Figura 20B). Se encontró que las fracciones que presentaban actividad de SS estaban enriquecidas en un polipéptido de 80 kDa que era reconocido por el anticuerpo anti-SS. Ya se había determinado un peso molecular de alrededor de 86kDa para la subunidad de SS de maíz (Su y Preiss, 1978). Más aún, las fracciones que presentaron la banda más intensa tenían también el máximo porcentaje de inhibición de UPTG (94.3%) y una actividad máxima de SS (0.24 nmol fru), (Figura 20A y

B). Similares resultados se obtuvieron cuando se analizaron las fracciones # 7-12 de la Superosa 12 con ambos anticuerpos (Figura 21B). Las fracciones (# 9-10) que habían presentado mayor porcentaje de actividad de IP y de SS mostraron las bandas reactivas más intensas.

2.1.2. Caracterización inmunológica

Se realizaron ensayos de neutralización para estudiar si los anticuerpos anti-SS y anti-IP podían inhibir indistintamente las actividades de IP y de SS (Figura 22). Se observó que el anticuerpo anti-SS podía neutralizar ambas actividades (60% de la actividad SS y 40% de la actividad IP). Este resultado refuerza la hipótesis que IP y SS podrían ser una misma entidad proteica. Cuando se utilizaron anticuerpos anti-IP se vio que éstos podían neutralizar el 90% de la actividad IP pero no neutralizaban la actividad SS, ni aún con alta titulación del anticuerpo. Estos resultados sugieren que el sitio de asociación de la UPTG sobre la molécula de SS sería diferente al sitio activo de la enzima.

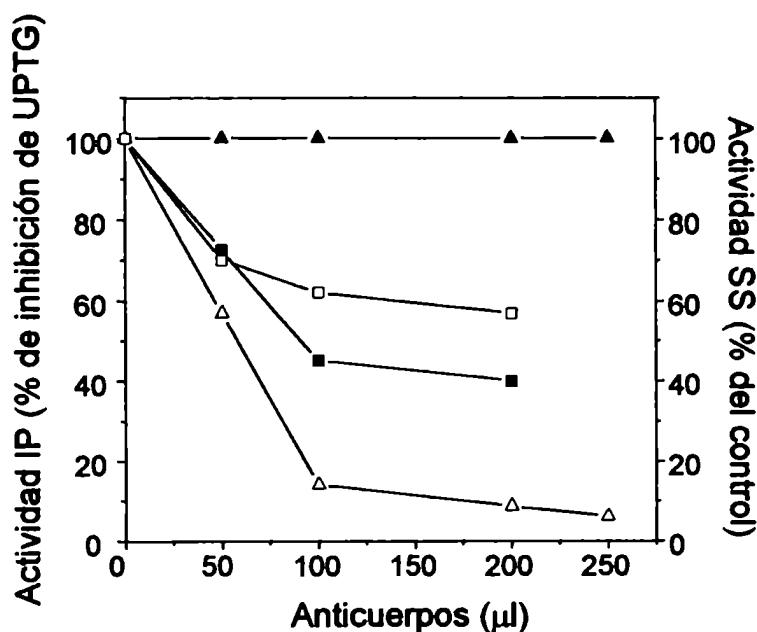


Figura 22. Neutralización de las actividades IP y SS mediante anticuerpos anti-IP y anti-SS. IP parcialmente purificado proveniente de la columna Mono Q fue preincubado con cantidades crecientes de anticuerpos anti-IP (Δ) o anti-SS (□) como se describe en Materiales y Métodos. Luego de centrifugar la mezcla de incubación, se determinaron las actividades IP (en blanco) y SS (en negro). El anticuerpo anti-IP usado era un suero mientras que el anticuerpo anti-SS era una fracción IgG purificada (dilución 1:25).

2.2. Análisis de la actividad del inhibidor en distintos tejidos de plantas de maíz

Como ya vimos anteriormente, existe en las preparaciones particuladas y solubilizadas de endosperma de semillas inmaduras de maíz un factor termolábil capaz de inhibir la actividad de UPTG, el cual parece estar relacionado con la sacarosa sintetasa. Como la SS es una enzima que se ha descrito fundamentalmente como una proteína soluble aunque en menor cantidad se la ha reportado como asociada a membrana, queríamos saber si en fracciones solubles encontrábamos el mismo efecto sobre la actividad de UPTG. También queríamos saber si dicho inhibidor estaba presente en preparaciones particuladas y solubles de otros tejidos de la planta. Para ello, se midió la actividad UPTG en raíces y plántulas de maíz antes y después de calentar los extractos a 65°C (Tabla 6).

Fuente de UPTG	Incorporación de Glc [^{14}C] (cpm)	
	control	calentado 5 min a 65°C
Preparación soluble de endosperma de maíz	214	1019
Preparación particulada de plántulas de maíz	1009	444
Preparación soluble de plántulas de maíz	233	43
Preparación particulada de raíces de plántulas de maíz	1355	1388
Preparación soluble de raíces de plántulas de maíz	1062	486

Tabla 6. Efectos de la temperatura (65°C) sobre la actividad UPTG de distintas fuentes. Se midió actividad UPTG en alícuotas (300-500 µg de proteína) de distintas fuentes enzimáticas luego de calentarlas a 65°C durante 5 minutos. Control: sin calentar.

Como se observa en la Tabla 6, luego del calentamiento de las preparaciones solubles de endosperma de maíz hay un aumento notable en la actividad UPTG. Por el contrario, se observó que en las preparaciones solubles de plántulas y raíces de plántulas de

maíz, la actividad de UPTG disminuía notablemente luego del calentamiento. Con respecto a las preparaciones particuladas, mientras que en endosperma hay un aumento de la actividad de UPTG después de calentar estas preparaciones a 65°C durante 5 minutos, en plántulas se ve una disminución y en raíces de plántulas no se modifica la actividad de esta enzima.

Estos resultados podrían indicar que en plántulas y raíces de plántulas de maíz hubiera una UPTG diferente a la de endosperma que no fuera capaz de ser inhibida o que en dichos tejidos el inhibidor termolábil no estaría presente.

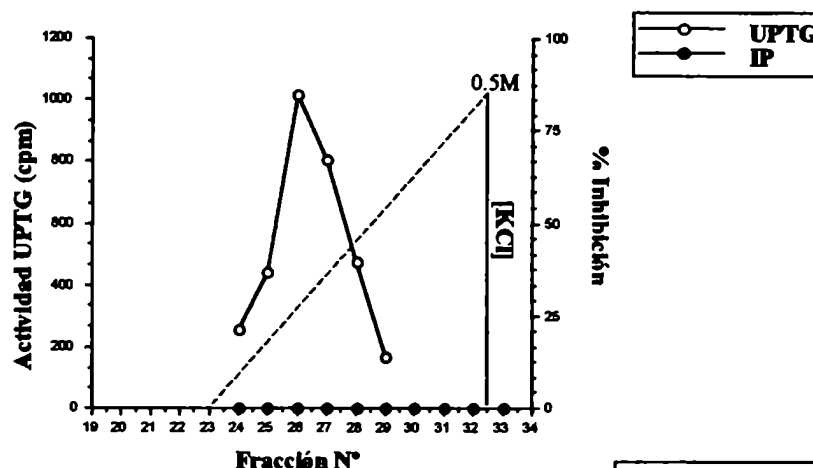
Para probar la hipótesis que en plántulas hubiera una UPTG diferente a la del endosperma que no fuera capaz de ser inhibida, se analizó si la actividad UPTG de plántulas o raíces de plántulas podía ser inhibida por el IP proveniente de una preparación particulada de endosperma de maíz o luego de purificarlo parcialmente por Mono Q (Tabla 7). Rothschild y col. (1996) habían observado que las preparaciones de endosperma de maíz activadas por calentamiento podían ser inhibidas si se les agregaba preparaciones particuladas de maíz como fuente de inhibidor. Se vio que tanto la preparación particulada como el IP proveniente de la Mono Q podían inhibir la actividad UPTG tanto de preparaciones particuladas de raíces y plántulas de maíz, como también de las preparaciones solubles de los mismos tejidos. Estos resultados indican que la actividad de UPTG de raíces y plántulas de maíz es capaz de ser inhibida.

Fuente de UPTG	Control	Fuente de IP	
		Preparación particulada de endosperma	IP-Mono Q
Preparaciones particuladas de plántulas de maíz	1251	224	246
Preparaciones solubles de plántulas de maíz	1272	n.d.	386
Preparaciones particuladas de raíces de plántulas de maíz	469	164	137
Preparaciones solubles de raíces de plántulas de maíz	1498	164	n.d.
Preparaciones particuladas de endosperma maíz activadas por calentamiento	2205	92	175
Preparaciones solubles de endosperma de maíz activadas por calentamiento	2101	98	194

Tabla 7. Efecto del inhibidor de endosperma de maíz sobre la actividad UPTG de distintas fuentes. Se midió actividad UPTG en alícuotas de distintas fuentes enzimáticas (300-500 µg de proteína) en presencia o ausencia de preparaciones particuladas de endosperma de maíz o del inhibidor de endosperma de maíz parcialmente purificado por Mono Q.

Otra aproximación para analizar si la UPTG de plántulas y raíces de plántulas era diferente a la de endosperma de maíz consistió en estudiar las propiedades cromatográficas de la enzima. Para ello, se midió la actividad UPTG luego de cromatografiar en columnas de FPLC-Mono Q las preparaciones particuladas de dichos tejidos (Figura 23). Se observó que la actividad UPTG eluía en un pico a 0.23-0.25 M KCl. Estos resultados muestran que tanto la UPTG de endosperma como la de plántulas y raíces de plántulas de maíz eluyen con la misma fuerza iónica. Además, en las fracciones de las columnas no se encontró actividad de IP, lo que confirma la ausencia de dicha actividad en plántulas y raíces de plántulas de maíz.

A



B

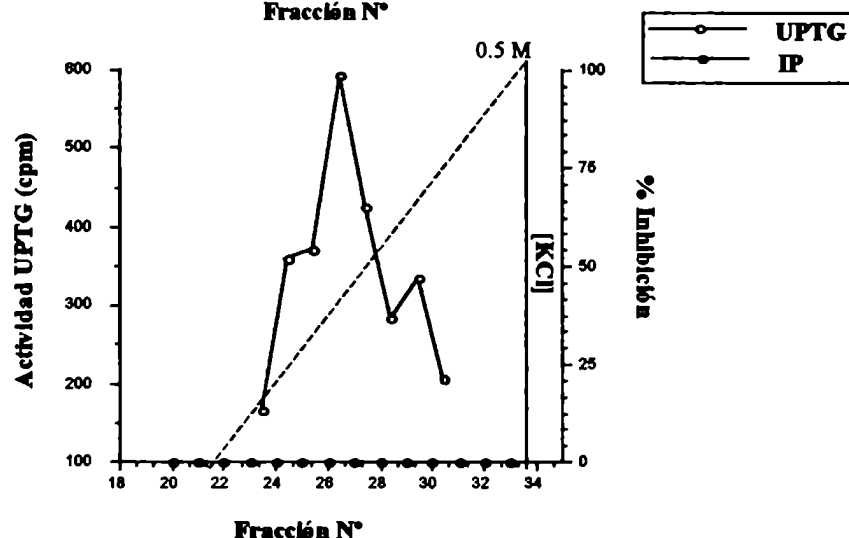


Figura 23. Cromatografías en Mono Q. Se cromatografiaron en columnas de Mono Q preparaciones solubilizadas de plántulas de maíz de 5 días de edad (A) o de raíces de plántulas de maíz (B). Las actividades de UPTG y de IP se determinaron en alícuotas de 50 μ l de cada fracción como se describe en Materiales y Métodos.

Por último, para investigar si la proteína IP estaba presente en plántulas y raíces de plántulas de maíz, se analizaron dichos tejidos por Western blot usando anticuerpos anti-SS (Figura 24A) y anti-IP (Figura 24B). Se incluyó como control positivo del experimento una alícuota de una preparación de endosperma de semillas inmaduras de maíz y como control negativo una alícuota de tubérculos de papa. Se observó que ambos anticuerpos daban reacción cruzada con una banda de 80 kDa que aparecía tanto en raíces de plántulas como en plántulas de maíz. Esto indica que en dichos tejidos la proteína de 80 kDa está presente aunque en forma inactiva ya que no hay actividad de IP.

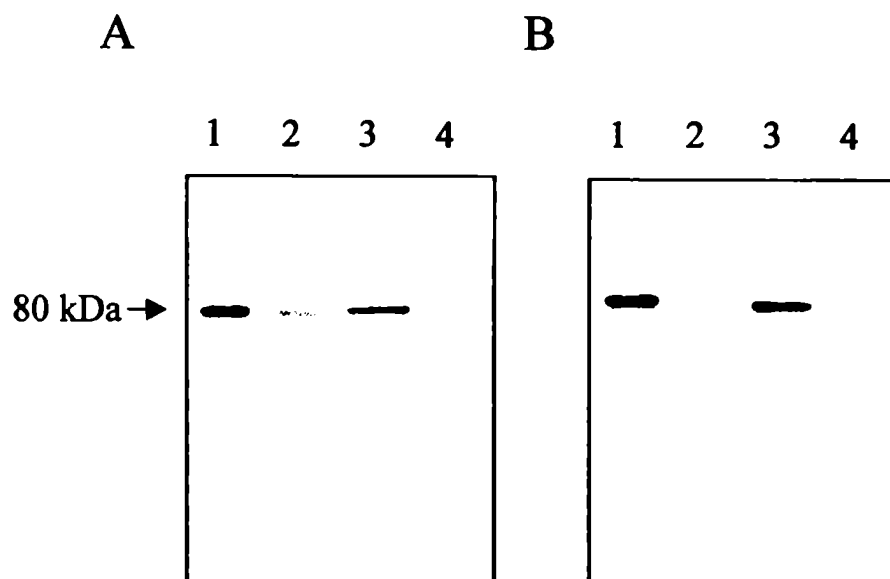


Figura 24. Western blot. Luego de la electroforesis en SDS-PAGE 10% se analizaron extractos solubles de distintos tejidos de plantas con anticuerpos anti-SS (A) o anti-IP (B). Canal 1: preparación de endosperma de maíz (30 μ g), canal 2: raíces de plántulas de maíz (50 μ g), canal 3: plántulas de maíz (50 μ g), canal 4: tubérculos de papa (50 μ g).

2.3. Análisis de la expresión del inhibidor en mutantes *shrunkent1* de maíz

Como ya se mencionó anteriormente, cuando se midió actividad de IP y de SS en distintos tejidos vegetales como ser endosperma, raíces y plántulas de maíz, a pesar que se encontró actividad SS en todos ellos, la actividad UPTG estaba inhibida solamente en el endosperma. Pensamos que la isoforma SS1 (preponderante en endosperma) sería la que tiene actividad de IP, no así la isoforma SS2.

Para probar si efectivamente la isoforma de endosperma (SS1) es la que posee actividad IP se decidió analizar los mutantes de maíz *shrunkent1* (*sh1*) que carecen de dicha isoforma de sacarosa sintetasa. Se analizó entonces, si este mutante era capaz o no de inhibir la actividad de UPTG. Para ello, se midió la incorporación de [14 C]Glc a una preparación de endosperma de maíz *shrunkent1* pre-incubada o sin pre-incubar a 65°C (Figura 25A). En esta preparación se encontró actividad UPTG aún sin pre-incubar la misma a 65°C (974 cpm). Más aún, el pre-calentamiento de dicha preparación no sólo no produjo ningún aumento en la incorporación de radioactivo al precipitado de 10% TCA sino que se observó una disminución significativa de la actividad de UPTG (de 974 a 377

cpm). Nótese que el mismo tratamiento aumentó notablemente la actividad de esta enzima en la preparación del maíz silvestre (de 156 a 824 cpm).

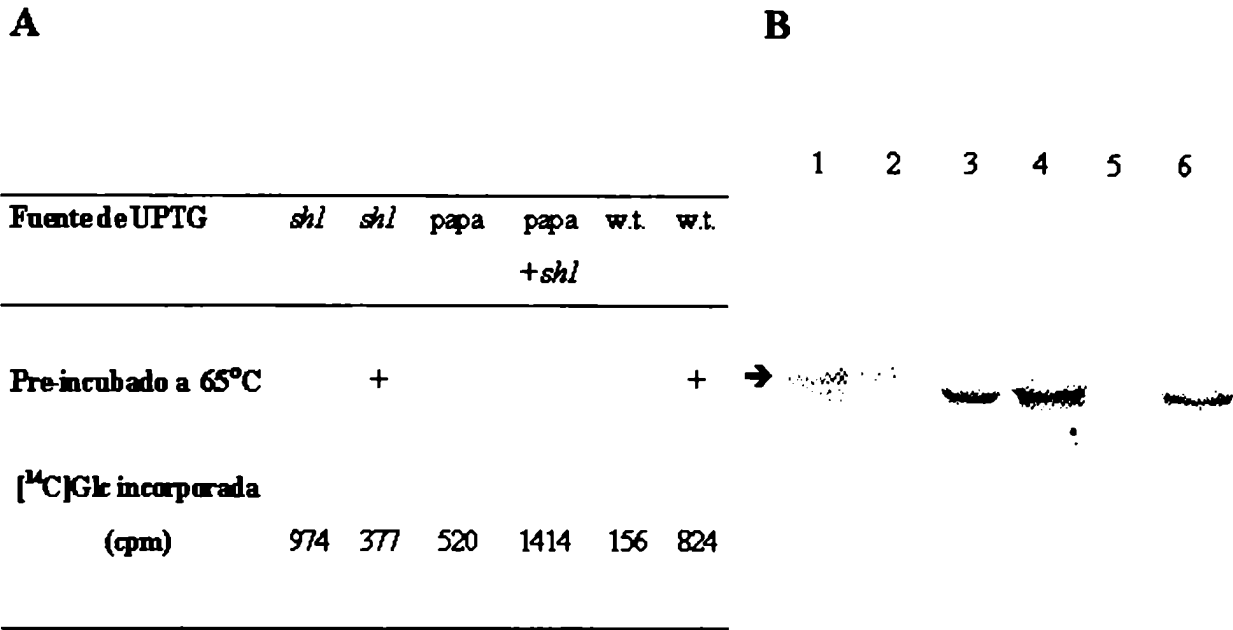


Figura 25. Análisis de la expresión del inhibidor en mutantes *shrunkent1* de maíz (A) Actividad de IP en el endosperma del mutante *shrunkent1*. En la preparación de endosperma del mutante de maíz *shl* se midió actividad UPTG y se probó su capacidad para inhibir UPTG de tubérculo de papa. Se utilizó como control una preparación de endosperma de maíz silvestre. (B) SDS-PAGE y posterior fluorografía de los duplicados del ensayo A. Calles 1 y 2, Psol *shl* (150 µg) no tratado y pre-incubado a 65°C respectivamente; calle 3, Psol de tubérculo de papa (50 µg); calle 4, Psol de tubérculo de papa (50 µg) + Psol *shl* (150 µg); calles 5 y 6 (control), Psol silvestre (150 µg) no tratado y pre-incubado a 65°C respectivamente. La flecha señala el producto radioactivo de 38kDa.

Habíamos encontrado en el laboratorio que la preparación de endosperma de maíz salvaje era capaz de inhibir la actividad de UPTG de tubérculos de papa (Rothschild y col., 1996). Entonces, se estudió si el mutante poseía esa misma propiedad. Se observó que la preparación del mutante *shl* era incapaz de inhibir la actividad UPTG de tubérculos de papa. Más aún, se produjo un aumento en la incorporación de radioactividad al precipitado de 10% TCA que pensamos se debe a que la actividad UPTG del mutante se sumó a la actividad UPTG de los tubérculos de papa (Figura 25A).

Los duplicados de este ensayo fueron sometidos a SDS-PAGE y posterior fluorografía (Figura 25B). Se observó que cuando la preparación del endosperma *sh1* fue pre-incubada a 65°C, la banda radioglucosilada de 38kDa presentó una menor intensidad con respecto a la muestra sin precalentar (calles 1 y 2). Lo contrario se observó con la preparación de endosperma silvestre (calles 5, 6). Además, la mezcla de la preparación de tubérculos de papa con la preparación de endosperma mutante resultó en un aumento de la intensidad de la banda de 38kDa lo que confirma que la actividad UPTG del mutante se sumó a la actividad UPTG de los tubérculos de papa (calle 4). Así, los datos de incorporación que se muestran en la Figura 25A concuerdan con la variación en la intensidad de la banda radioglucosilada de 38kDa que se muestra en la Figura 25B. Todos estos resultados indican que SS1 sería la isoforma de maíz que posee actividad de IP.

3. Expresión de ARNm de UPTG en cultivos *in vivo* e *in vitro* de papa

Con el objetivo de conocer nuevos aspectos de la UPTG que pudieran señalar algunas pautas sobre el rol fisiológico de la enzima, decidimos analizar su expresión a nivel de ARNm en diversos tejidos de plantas de papa.

Como se mencionó en la Introducción, uno de los clones aislados a partir de la biblioteca de estolones mediante anticuerpos anti-UPTG había sido expresado en *E. coli* y las características de la enzima recombinante resultaron similares a las descritas para la enzima purificada a partir de tubérculo de papa (Bocca y col., 1999). Se propuso el término de *uptg1* para el gen correspondiente al ADNc contenido por dicho clon (AJ223252.1) (Bocca y col., 1999) y el término UPTG1 para la proteína de 365 aminoácidos codificada por el mismo. También disponíamos de la secuencia de un segundo clon (AJ310910) el cual presentó un 89% de homología de secuencia con el primero, se propuso el término UPTG2 para la proteína codificada por éste último.

Así, se estudió la expresión de la UPTG a nivel del ARNm utilizando una sonda que incluía el ADNc completo de UPTG1 e hibridizaba con ambos clones o sondas diferenciales que reconocían específicamente a cada clon de UPTG.

3.1. Expresión de ARNm de UPTG en *Solanum tuberosum* usando como sonda el ADNc completo de UPTG1

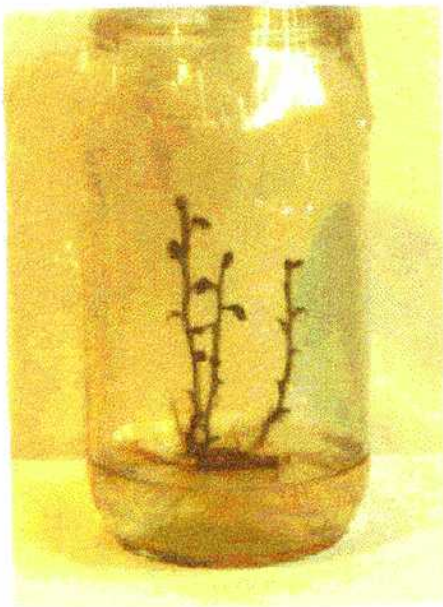
3.1.1. Expresión de ARNm de UPTG en un sistema de tuberización *in vitro*

Se había reportado una alta expresión de ARNm de UPTG en estolones y tubérculos de papa (Bocca y col., 1999). Por ello, analizamos la expresión del ARNm de UPTG en un sistema de tuberización *in vitro* para ver si la UPTG estaba relacionada con el proceso de tuberización (aparición o desarrollo de tubérculos) o con el estadio de reserva del tejido.

Se sabe que el proceso de tuberización involucra diferentes efectores hormonales y nutricionales de la planta como por ejemplo el ácido jasmonico, que tiene propiedades inductoras *in vitro* (Koda y col., 1996). Por otro lado, se cree que la sacarosa sería otra señal involucrada en la inducción de la tuberización, afectando la expresión de diversos genes involucrados en este proceso (Xu y col., 1998).

En un sistema biológico modelo de tuberización *in vitro* (Figura 26) encontramos que distintos factores que afectan la tuberización también afectaban la actividad de la enzima UPTG (García, 1997). Se vio que la enzima UPTG aumentaba su actividad específica cuando los microtubérculos eran inducidos en medios con ácido jasmónico y disminuía su actividad cuando los microtubérculos eran inducidos en medios con altas concentraciones de sacarosa.

A



B



Figura 26. Sistema de tuberización *in vitro*. (A) Plántula de papa micropropagada. Las plántulas de *Solanum tuberosum* fueron micropropagadas por subcultivo de cortes uninodales en medio MS. Una vez crecidas las plántulas, se seccionaron segmentos de tallos (explantos) para inducir la tuberización. (B) Inducción de microtubérculos. Los explantos cultivados en el medio de inducción de la tuberización dan origen a tallos etiolados (estolones) sobre los cuales se desarrollan pequeños tubérculos (microtubérculos).

Para ver si el ácido jasmónico regulaba la UPTG a nivel transcripcional, se analizó la expresión del ARNm de UPTG en estolones (tuberizados o no tuberizados) cultivados *in vitro* en presencia de la hormona (Figura 27).

Se observó que la expresión del mensajero de UPTG disminuía entre 35-40% en presencia de ácido jasmónico tanto en 3% como en 6% de sacarosa. Estos resultados no están de acuerdo con el efecto estimulador del jasmónico sobre la actividad específica de

la enzima. Entonces, la regulación de la UPTG por esta hormona podría ser de tipo post-transcripcional. El ácido jasmónico, por ejemplo, podría estar activando a la enzima por intermedio de otro factor o impidiendo su degradación por proteasas.

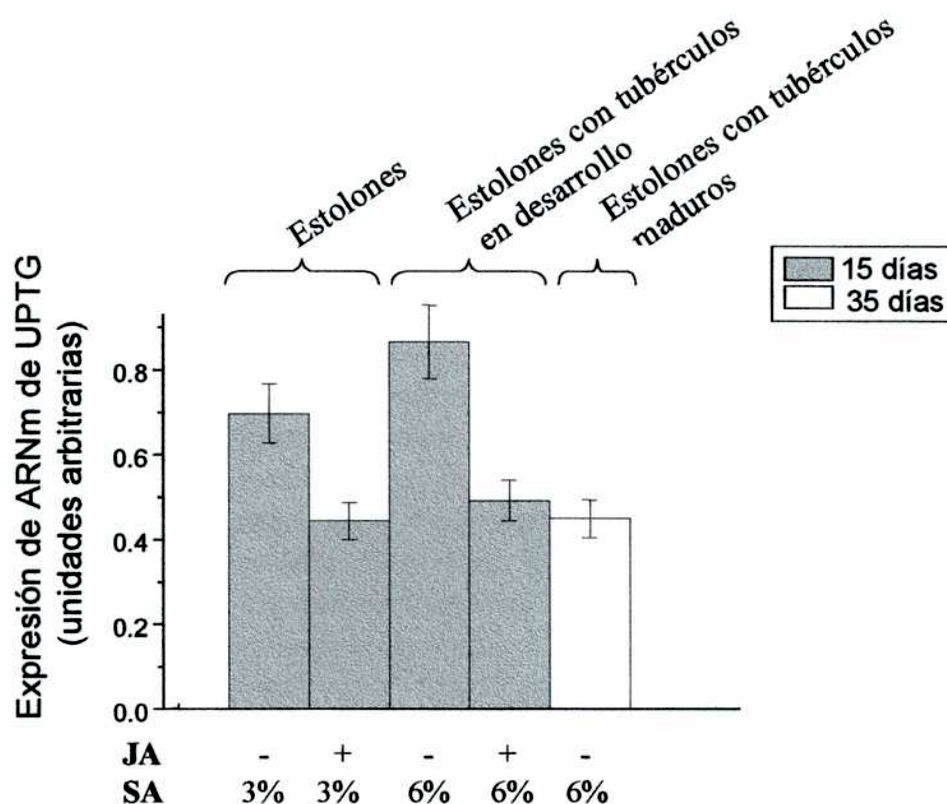


Figura 27. Expresión de ARNm de UPTG en estolones inducidos en medios conteniendo 3% o 6% sacarosa y/o ácido jasmónico. Ensayo de Northern blot utilizando una sonda correspondiente al ADNc completo de UPTG1 como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de ARNm en la autoradiografía fueron cuantificados mediante densitometría usando el programa de computación Scion Image, normalizados con respecto a la señal respectiva del ARNr y expresados como unidades arbitrarias.

Con respecto a la sacarosa utilizada en el medio de inducción, en general encontramos que no se observan variaciones en los niveles del ARNm de UPTG cuando se aumenta la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. En la Figura 27, aunque a 6% de sacarosa se observa un aumento en la expresión del mensajero de UPTG, éste es sólo de un 25% con respecto al encontrado en presencia de 3% de sacarosa. Por otro lado, los

genes que muestran ser regulables por azúcares muestran niveles de variación de mensajeros como mínimo del orden del 200% (Koch y col., 1992).

Luego, analizamos los niveles de los mensajeros de UPTG en estolones sin tuberizar y en estolones tuberizados. En el sistema de tuberización que utilizamos, a los 15 días de cultivo en presencia de 3% de sacarosa los estolones aún no han tuberizado, tanto en ausencia como en presencia del ácido jasmónico. Sin embargo, con 6% de sacarosa en ausencia de jasmónico aparecen pequeños microtubérculos sobre los estolones, mientras que en presencia de la hormona los tubérculos están más desarrollados (Figura 27). Se observó que la aparición de microtubérculos no provocó un aumento significativo en los niveles de ARNm de UPTG.

Un resultado inesperado fue que se encontró una disminución en la expresión del mensajero de UPTG en función del tiempo de desarrollo del microtubérculo, es decir que en estolones con tubérculos maduros los niveles de mensajeros de UPTG son menores que en los estolones con tubérculos en desarrollo. Más aún, los estolones que se encuentran en un menor estadio de diferenciación, esto es en ausencia de JA, presentan un mayor nivel de ARNm de UPTG que los estolones cultivados en presencia de JA. Se sabe que el JA estimula la tuberización en sistemas de tuberización *in vitro* y en su presencia los tejidos se encuentran en un estadio de mayor diferenciación.

Entonces, la expresión de UPTG no estaría relacionada con el estadio de reserva del tubérculo y tampoco con la concentración de sacarosa de los medios de cultivo. Podría ocurrir una mayor expresión de ARNm de UPTG en aquellos tejidos con un mayor ritmo de crecimiento y menor diferenciación, en los cuales predomina la elongación de las células y en donde hay una activa síntesis de componentes de la pared celular vegetal.

3.1.2. Expresión de ARNm de UPTG en distintos tejidos de plántulas de papa crecidas *in vitro*

En la Introducción vimos que algunas proteínas homólogas a UPTG en otras especies podrían estar relacionadas con la síntesis de polisacáridos estructurales que forman la pared celular, como por ejemplo los xiloglucanos. Se cree que en las plantas dicotiledóneas la naturaleza dinámica de la asociación de los xiloglucanos con la celulosa es uno de los principales factores que controlan la expansión de la pared celular, regulando de este modo el crecimiento de los vegetales. Se sabe también que en la parte inferior de los tallos (tallos basales) el tejido crece principalmente por elongación de sus células mientras

que en la parte superior de los mismos (tallos apicales) se encuentra el meristema apical y el crecimiento es fundamentalmente por división celular.

Entonces, estudiamos si existía una variación en la expresión del ARNm de UPTG en distintos segmentos de tallos de plántulas de papa micropropagadas *in vitro* cultivadas durante 1 mes. Utilizamos para ello, la técnica de Northern blot y usamos una sonda correspondiente al ADNc completo de UPTG1 (Figura 28). Se vio que la expresión del ARNm de UPTG era similar tanto en las raíces como en los tallos basales, intermedios y apicales. Es importante destacar que en plantas jóvenes el ritmo de crecimiento es elevado en la mayoría de los tejidos.

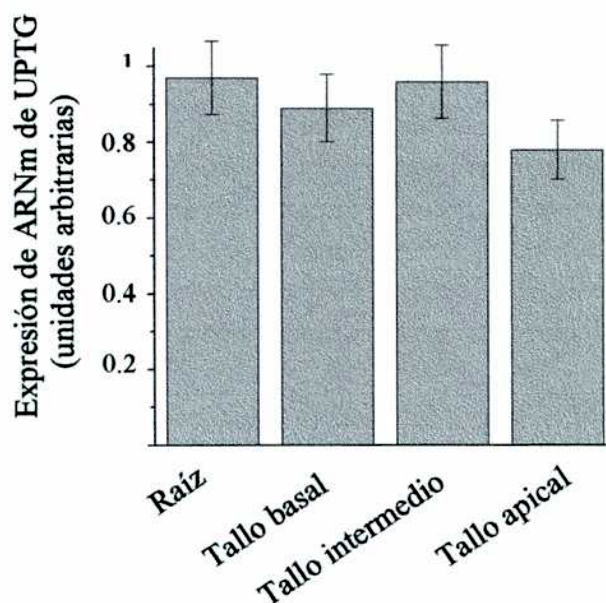


Figura 28. Expresión de UPTG en distintos segmentos de tallos de plántulas de *Solanum tuberosum* cultivadas *in vitro* durante un mes. Ensayo de Northern blot utilizando una sonda correspondiente al ADNc completo de UPTG1 como se describe en Materiales y Métodos. Los tallos de las plántulas se dividieron en tallos basales, intermedios y apicales tomando aproximadamente unos 5 cm de cada sección. Los niveles de ARNm en la autoradiografía fueron cuantificados mediante densitometría usando el programa de computación Scion Image, normalizados con respecto a la señal respectiva del ARNr y expresados como unidades arbitrarias.

Luego, analizamos, la expresión del ARNm de UPTG en tallos de plántulas micropropagadas *in vitro* después de diferentes períodos de subcultivo, es decir en distintos estadios del desarrollo (Figura 29). De manera similar a lo observado en la figura 28, también vimos que al mes de subcultivo no había diferencias en los niveles de ARNm de UPTG entre las porciones basales y apicales de los tallos. Sin embargo, se ve una disminución notable en el nivel de ARNm de UPTG en función del tiempo de cultivo en los tallos apicales mientras que en los tallos basales no hay una variación significativa. En consecuencia, luego de 3 meses de subcultivo los niveles de ARNm de UPTG en los tallos basales era aproximadamente cinco veces mayor que en la parte apical de los mismos (Figura 29, recuadro).

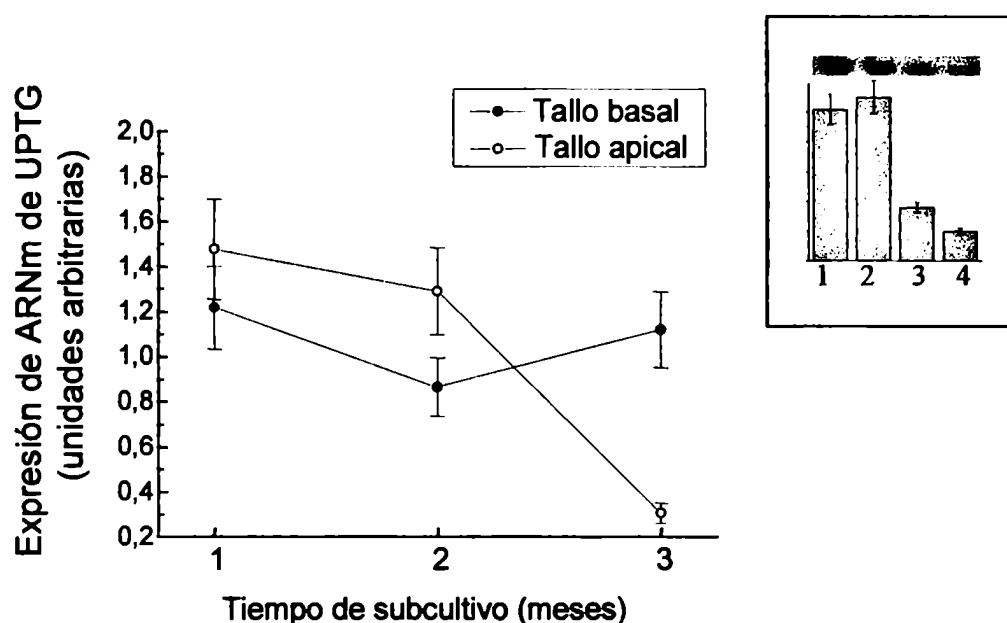


FIGURA 29. Expresión del ARNm de UPTG en plantas micropropagadas *in vitro* en función del tiempo de subcultivo. Se analizaron, mediante la técnica de Northern blot, los tallos de plántulas micropropagadas *in vitro* durante diferentes períodos de subcultivo (1, 2 ó 3 meses). Se tomaron las porciones basales y apicales de los tallos (5cm desde la base y 4cm desde el ápice, respectivamente). La sonda utilizada corresponde al ADNc completo del clon UPTG1. Recuadro: Expresión del ARNm de UPTG en tallos de plántulas de *Solanum tuberosum* cultivadas *in vitro* durante 3 meses. Se analizaron por duplicado los tallos basales (calles 1 y 2) y los tallos apicales (calles 3 y 4).

Podría ocurrir que hubiera una mayor expresión de mensajeros de UPTG en los tallos basales con respecto a los tallos apicales como consecuencia de que los primeros

presentan un ritmo de crecimiento mayor. Habíamos observado también que el nivel de ARNm de UPTG en tubérculos de papa disminuía a lo largo del tiempo de post-cosecha, lo que nos indicó que en tejidos quiescentes hay una disminución de dichos mensajeros (datos no mostrados).

3.1.3. Expresión de ARNm de UPTG en distintos tejidos de plantas de papa crecidas *in vivo*

Estudiamos la expresión de mensajeros de UPTG en distintos tejidos de plantas de papa crecidas en tierra durante 1 mes (Figura 30). Se encontró que la expresión de ARNm de UPTG era similar en raíces, tallos basales e intermedios observándose una mayor expresión de mensajeros en tallos apicales, hojas viejas y hojas jóvenes.

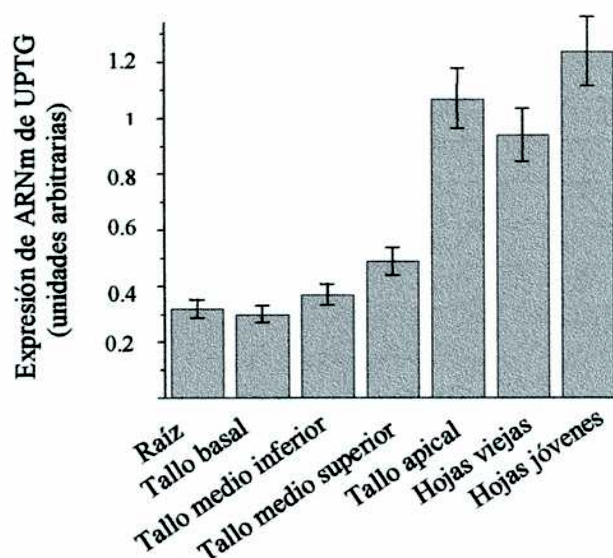


Figura 30. Expresión del ARNm de UPTG en distintos tejidos de plantas de *Solanum tuberosum* originadas a partir de brotes de tubérculos maduros y crecidas en tierra durante un mes. Se analizaron los tallos tomando segmentos de 10 cm, desde la parte inferior a la superior denominándose respectivamente: tallo basal, tallo medio inferior, tallo medio superior y tallo apical. También se analizaron las raíces, las hojas viejas (inferiores) y las hojas jóvenes (las cuatro hojas superiores). La sonda utilizada corresponde al ADNc completo del clon UPTG1.

Encontramos una mayor expresión de mensajeros en tallo apical con respecto al tallo basal, comparado con los resultados hallados en las plántulas cultivadas *in vitro* durante 1 mes (Figura 29). Esta discrepancia podría deberse al hecho de que en el caso de las plántulas *in vitro* la extracción del ARN se realizó a partir del tallo incluyendo también sus pequeñas hojas, en cambio en las plantas crecidas en tierra se tomaron sólo los tallos. También hay que tener en cuenta es que el ritmo de crecimiento en las plantas crecidas en tierra es diferente al de las plántulas crecidas *in vitro*.

3.2. Expresión de ARNm de UPTG en *Solanum tuberosum* usando sondas diferenciales para UPTG1 y UPTG2

3.2.1. Diseño y preparación de las sondas específicas

Como se mencionó anteriormente, el segundo clon aislado de estolón había mostrado una señal débil al realizar hibridizaciones cruzadas con el inserto marcado de UPTG1, lo que sugería que podría corresponder a una forma diferente de UPTG. El mismo presentaba un 89% de identidad con UPTG1 y se lo denominó entonces, UPTG2.

Con el objetivo de estudiar cómo era la expresión del ARNm de cada uno de los dos clones aislados, se diseñaron sondas diferenciales que reconocían específicamente secuencias de UPTG1 o de UPTG2 (Figura 31). Se utilizaron dos pares diferentes de oligonucleótidos para cada uno de los clones, se sintetizó una sonda de 330 pb para UPTG1 y otra de 240 pb para UPTG2 (Figura 32A y B). Las sondas diferenciales se diseñaron sobre la secuencia carboxilo terminal, debido a que esta zona era la que presentaba menor homología entre UPTG1 y UPTG2.

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90	
UPTG1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CGGCCGCCAGCAA	CACCACTGTTGAAAG	ATGAGCTTGATATTG				43
UPTG2	CCGTTTTTTTCTTC	TTTCAGATCCATTGT		TGCTATGGCAGGATC		TTCAGT-GACACCAA	CGCCATTGCTGAAAG	ATGAGCTTGATATTG					89
	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180	
UPTG1	TGATTCACCAATAA	GAAATCTTGATTTT		TGGAGATGTGGAGAC		CCTTTTTTCAGCCAT	ACCATCTGATTATTG	TTCAAGATGGTGATC					133
UPTG2	TGATACCAACATCA	GAAATCTTGATTTCT		TGGAGATGTGGAGAC		CCTTTTTTCAGCCAT	ATCATCTCATCATTG	TTCAAGATGGTGATC					179
	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270	
UPTG1	CTTCAAAGATCMTA	AGGTCCCTGAAGGAT		TTGATTATGAGCTTT		ATATCGAAATGACA	TTAACAGGATTTTGG	GTCCCTAAAGCTTCT					223
UPTG2	CTTCAAAGATCMTA	ATGTTCTGAAGGAT		TTGATTATGAGCTTT		ATATCGTAATGATA	TTAACAGGATTTTGG	GACCAAGGATCTT					269
	271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360	
UPTG1	GTATCTCTTTCAAGG	ATTCTGCTTGTAGGT		GTTTTGGATATATGG		TGCTTAAGAAGAGT	ATATCTACACCATG	ATGATGATTGCTTTG					313
UPTG2	GTATCTCTTTTAAAG	ACTCTGCTTGTAGGT		GTTTTGGATATATGG		TGCTTAAGAAGAGT	ATATCTACACTATTG	ATGATGATTGCTTTG					359
	361	375	376	390	391	405	406	420	421	435	436	450	
UPTG1	TGGCTAAGGACCCGT	CTGGTAAGGATATCA		ATGCACCTTGAGCAGC		ACATCAAGAACCTCC	TGTGCCCATCCACAC	CGCACTTCTTTAACA					403
UPTG2	TGGCTAAGGATCCTT	CTGGCAAGGACATCA		ATGCTCTTGAGCAGC		ACATAAAGAACCTGT	TATGTCTTCCACTC	CACATTTCTTCAACA					449
	451	465	466	480	481	495	496	510	511	525	526	540	
UPTG1	CTCTGTATGATCCAT	ACAGAGATGGTGACG		ATTTCTGCTGCTGCT		ACCTTTTCAGCATGC	GTGAGGGTGCTCCAA	CAGCTGTTTCTCATG					493
UPTG2	CTCTGTATGATCCAT	ACAGAGAAGGAGCAG		ATTTTGTTCGTGGAT		ACCTTTTCAGTATGC	GTGAGGGTGCGGCCA	CAGCTGTTTCTCATG					539
	541	555	556	570	571	585	586	600	601	615	616	630	
UPTG1	GACTGTGGCTCAACA	TCCCTGACTACGATG		CTCCACACAGCCTTG		TCAAGCCTCATGAGA	GGAACTACTAGATACG	TGATGCTGTCTATGA					583
UPTG2	GACTTTGGCTCAACA	TCCCTGACTATGATG		CACCTACTCAACTTG		TTAAGCCACGTGAGA	GGAACTAGAGATATG	TGGATGCTGTCTATGA					629
	631	645	646	660	661	675	676	690	691	705	706	720	
UPTG1	CAATTCACAAAGGCA	CTTTGTTCCCTATGT		GTGGAAATGAACCTTG		CATTGACCGTGATC	TCATTGGACCTGCAA	TGTACTTTGGCTCTCA					673
UPTG2	CAATTCCTAAGGCA	CTTTGTTCCCTATGT		GTGGAAATGAACCTTG		CATTGACCGTGAGC	TGATTGGACCTGCAA	TGTACTTTGGCTCTCA					719
	721	735	736	750	751	765	766	780	781	795	796	810	
UPTG1	TGGGTGACGGTCAAG	CAATTTGGTCTTACG		ACGATATGTGGGCTG		GCTGGGTATCCAAAG	TCATATGTGACCATG	TGGGACTAGCAATCA					763
UPTG2	TGGGTGATGGTCAAG	CAATTTGGTCTTACG		ACGATATGTGGGCTG		GTTGGGTATCCAAAG	TCATATGCCACCATG	TGGGACTCGGTGTCA					809
	811	825	826	840	841	855	856	870	871	885	886	900	
UPTG1	AGACTGGTCTGCGCT	ACATTTGGCAGACGA		AAGCTAGCAACCCAT		TGTTAACCCTCAAAA	AGGAGTACAAATGGA	TCTTCTGGCAGGAGG					853
UPTG2	AGACTGGTTACCTC	ACATATGGCAGACGA		AAGCAAGCAACCCCT		TGTTAACCCTTAAAA	AGGAGTACAAAGGCA	TCTACTGGCAGGAGG					899
	901	915	916	930	931	945	946	960	961	975	976	990	
UPTG1	AGATCATCCCTTCT	TCCAGGCTGCAACTC		TTCTTAAAGAGTGCA		CAACCCTCCAGCAT	GCTACCTCGAGCTCT	CAGGACAGGTCAAGG					943
UPTG2	AGATCATTCATTTT	CCCAGTCTGCAACTC		TTCCAAAAGATTGCA		CAAGTGTTCACAGT	GCTATCTCGAGCTGT	CAGAACAGGTCAAGG					989
	991	1005	1006	1020	1021	1035	1036	1050	1051	1065	1066	1080	
UPTG1	AAAAAATTTCCAGTA	TCCATCCCTATTTC		CCAGCTAGGAGAGAG		CCATGGTCACATGGA	TCGAAAGCTTGGGATG	AGCTCAA-CCTACTG					1032
UPTG2	AGAAATTTTCCACTA	TAGACCCGTATTTC		CCAGCTAGGCTGATG		CCATGGTCACATGGA	TTGAAAGCTTGGGATG	AGCTCAATCCTACTG					1079
	1081	1095	1096	1110	1111	1125	1126	1140	1141	1155	1156	1170	
UPTG1	GGGACAACTTGGCTA	AGCTGTCTATCGCCG		ATGGTCCAGCAAGAG		CTAAAAAGTAGATGC	TATGTATAGCTTTTG	CTCATTTTCTTCG-A					1121
UPTG2	GGGAGAGTTTGGCTA	AGCT-TCCATCTCGA		ACGGCCCCGGAAAG-		-----TAGACTC	CATTAA--GCTTATG	GTTCTTCCCTTTTA					1157
	1171	1185	1186	1200	1201	1215	1216	1230	1231	1245	1246	1260	
UPTG1	CGGCTAAGAGACTTA	--TGAGTTAACTAGA		ACTGGATTTT----A		C-TTGTTTATCAGTT	TACTTGTTTAAATT	TGGTTGAGGATTTAG					1204
UPTG2	CAGTTT-GAGTTTCA	GTTGAGTTGAGTTGA		GTTGAACCTTTGGAT		CATTATTTGTCTATT	TACTTATTT-AATTT	TGCT-AGGATTTAC					1244
	1261	1275	1276	1290	1291	1305	1306	1320	1321	1335	1336	1350	
UPTG1	GTTTCATAGTGCTGC	TGCTGCTGTTATGTA		GAGCAGCTTTTGATT		GCCTTCTCTGAGACA	TCATAGGAGTATTTT	ATTTTTATTATTTAT					1294
UPTG2	-TTTTATTGTAGA-C	TACTATTTAATTTTC		GA-----TTTTAAT		CCAACTTTT-GAGT	TCAAATG-----	-----					1303
	1351	1365	1366	1380	1381	1395	1396	1410	1411	1425	1426	1440	
UPTG1	ATAAGGCTTAGTTCC	AAACTTTGAGATCTC		CTAATATCAATAAAA		TATGGCTTAGTGCTT	TATGCTGCGGCGCGG						1369
UPTG2	-----	-----		-----		-----	-----						1303

Figura 31. Diseño de sondas de ADN correspondientes a los genes UPTG1 y UPTG2. Las sondas específicas para UPTG1 (rojo) y para UPTG2 (azul) comprenden la región entre los nucleótidos 1035-1365 y 1054-1296, respectivamente. También se diseñó una sonda que corresponde a una región de alta homología entre UPTG1 y UPTG2, la cual se llamó sonda general (verde). Esta sonda se usará en el Capítulo 5.

APrimers UPTG1

5'→3': GACAACTTGGCTAAGCTGTCTATCG (1035)

3'→5': GCCGCAGCATAAAGCACTAAG (1365)

Primers UPTG2

5'→3': AGCCTGGGATGAGCTCAATC (1054)

3'→5': ACTCAAAAGTTTGGAATTTAAATCGA (1296)

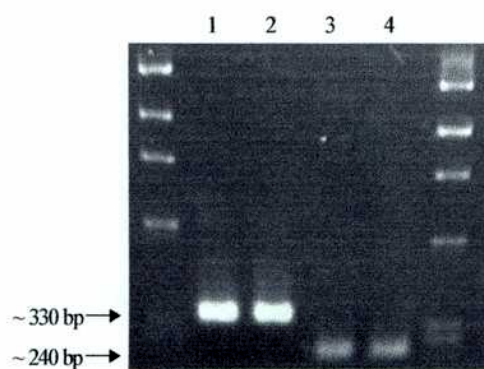
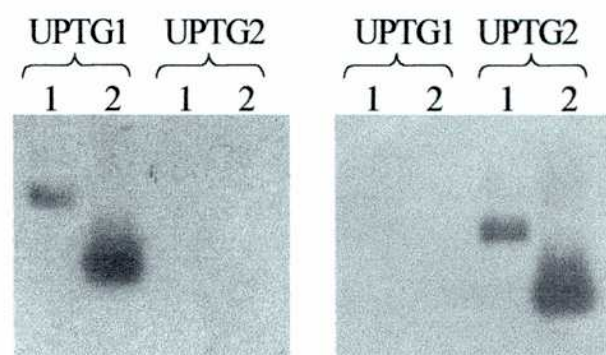
B**C**

Figura 32. Construcción de las sondas específicas para UPTG1 y UPTG2. (A) Primers utilizados para sintetizar las sondas específicas para UPTG1 y UPTG2. (B) Las sondas para UPTG1 (330 pb) y para UPTG2 (240 pb) que se sintetizaron por PCR fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa 0.8% y visualizadas con luz UV. Sonda para UPTG1 (calles 1 y 2) y sonda para UPTG2 (calles 3 y 4). (C) Análisis de hibridaciones cruzadas por la técnica de Southern blot utilizando sondas específicas para el clon UPTG1 (izquierda) o para el clon UPTG2 (derecha) con diferentes productos de PCR correspondientes al ADNc de los clones UPTG1 Y UPTG2:

1. producto de PCR equivalente al tamaño del ADNc completo (~1,4 kb)
2. producto de PCR equivalente al tamaño de la sonda diferencial (~330 bases para UPTG1 y 240 bases para UPTG2)

Se realizaron hibridaciones cruzadas sobre diferentes productos de PCR amplificados a partir de los ADNc de cada clon mediante la técnica de Southern blot como control de la especificidad de las sondas diseñadas (Figura 32C). Se observó que la sonda para UPTG1 hibridizaba únicamente con los productos de PCR correspondientes a UPTG1 (ADNc completo y fragmento equivalente a la sonda específica) y no hibridizaba con los productos de PCR correspondientes a UPTG2. Resultados análogos se obtuvieron cuando

se utilizó la sonda específica para UPTG2, asegurando que no había reacción cruzada entre ambas sondas.

3.2.2. Expresión diferencial de ARNm de UPTG1 y UPTG2 en distintos tejidos de plantas de papa

En el punto 3.1.3 mostramos que, cuando utilizamos una sonda correspondiente al ADNc completo de UPTG1, había una mayor expresión de los mensajeros de UPTG en tallos apicales y en hojas con respecto a otros tejidos de plantas de papa crecidas *in vivo*. Para estudiar si alguna isoforma de UPTG en particular era responsable de dicho efecto, se analizaron por Northern blot diversos tejidos de las plantas de papa utilizando sondas específicas para cada isoforma (Figura 33). Se observó, usando una sonda específica para UPTG1, una mayor expresión de mensajeros en estolones, tubérculos y raíces. Sin embargo, cuando usamos una sonda específica para UPTG2 se observó una alta expresión de ARNm en tallos y hojas. También, se encontró expresión de ARNm de UPTG2 en estolones, tubérculos y raíces en niveles similares a los encontrados utilizando la sonda específica para UPTG1.

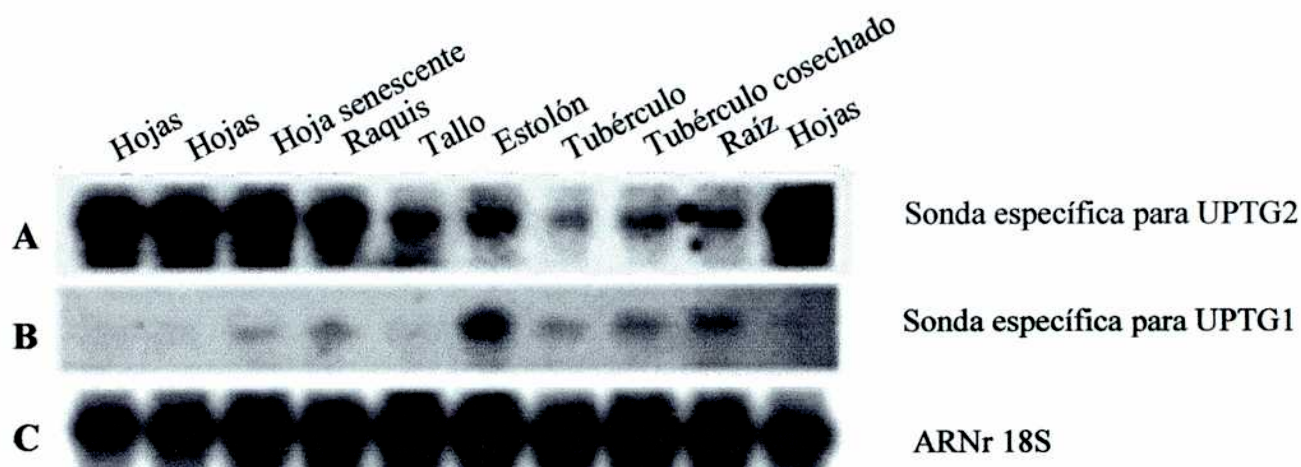


FIGURA 33. Expresión diferencial del ARNm de UPTG (UPTG1 y UPTG2) en distintos tejidos de plantas de papa. Análisis por Northern blot de la expresión del ARNm de la UPTG en distintos tejidos de plantas de papa crecidas en tierra. Se utilizó una sonda específica para UPTG2 (A) una sonda específica para UPTG1 (B) y una sonda correspondiente al ARNr 18S como control (C).

Como UPTG2 parecería ser la isoforma preponderante en tallos y hojas, la mayor expresión de ARNm de UPTG encontrado en hojas cuando se utilizó la sonda correspondiente al ADNc completo de UPTG1 que reconoce las dos isoformas conocidas de la enzima (Figura 30) podría deberse a la expresión de la isoforma UPTG2 en dichos tejidos.

Estos resultados nos sugieren la existencia de por lo menos dos isoformas activas de la enzima UPTG cuya expresión muestra cierta especificidad de tejidos en la planta de papa (Wald y col., 1999).

4. Caracterización bioquímica y molecular de UPTG en sistemas recombinantes

La expresión diferencial de los ARNm de UPTG1 y de UPTG2 en los distintos tejidos de plantas de papa nos sugirió que ambos ADNc codificarían distintas isoformas de la enzima. Entonces, decidimos expresar el clon UPTG2 en *E. coli* para estudiar algunas características bioquímicas de la proteína recombinante y compararlas con la UPTG1.

4.1. Expresión y caracterización bioquímica de UPTG2 en *E. coli*

La expresión de UPTG2 en *E. coli* se realizó en las mismas condiciones reportadas para UPTG1 (Bocca y col., 1999). Las bacterias se cultivaron en medio LB en presencia de 100 µg/ml ampicilina y se incubaron a 37°C con agitación hasta DO₆₀₀: 0,4. Posteriormente, se realizó la inducción con IPTG 0.1mM y se continuó la incubación a 28°C durante toda la noche. Luego los cultivos se centrifugaron y las células se trataron como se describe en Materiales y Métodos.

Se midió la actividad de UPTG en los extractos solubles de *E. coli* que expresaban el clon UPTG2. Se encontró radioactividad incorporada al precipitado de 10% TCA a partir de los 3 nucleótido-azúcares y las proteínas fueron analizadas por electroforesis en SDS-PAGE 10% y posterior fluorografía (Figura 34). Se observó que la proteína recombinante daba productos radioglicosilados de ~37-38 kDa luego de la incubación con los tres sustratos radioactivos y no se observó ninguna banda en la preparación de *E. coli* transformada con el plásmido sin el inserto. Los productos de ~37-38 kDa, que se presentaban en forma de doblete, coincidían con el tamaño de la subunidad de la UPTG descrito para la enzima purificada a partir de tubérculo de papa.

Además, se observó una banda de ~80 kDa que también se radioglicosilaba en presencia de los tres sustratos ensayados. Más adelante investigaremos si este polipéptido está o no relacionado con la UPTG.

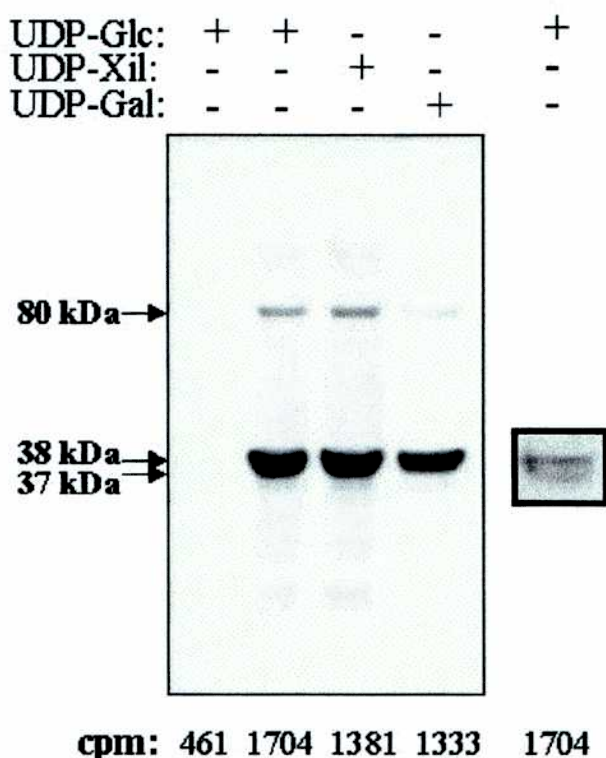


FIGURA 34. Actividad de UPTG2 recombinante. Los extractos de *E. coli* (120µg) que expresaban el clon UPTG2 fueron incubados con UDP-[C¹⁴]Glc, UDP-[C¹⁴]Xil o UDP-[C¹⁴]Gal. La reacción se detuvo con 10% TCA y la radioactividad incorporada al precipitado fue cuantificada. Duplicados de los productos radioglicosilados fueron sometidos a electroforesis en SDS-PAGE 10% y posterior autoradiografía (15 días). Como control se incubaron con UDP-[C¹⁴]Glc extractos de células de *E. coli* transformadas con el plásmido que no contiene inserto. **Recuadro:** detalle del doblete radioglicosilado en presencia de UDP-[C¹⁴]Glc luego de electroforesis en SDS-PAGE 10% y posterior autoradiografía (5 días).

4.1.1. Determinación de constantes cinéticas

Una vez lograda la expresión de la proteína UPTG2 recombinante en *E. coli*, se analizaron algunos parámetros bioquímicos de la misma y se compararon con los de UPTG1 para confirmar la existencia de dos isoformas distintas de UPTG en *Solanum tuberosum*.

Se ensayó la cinética de glicosilación de la UPTG2 usando una concentración de 4 µM de los distintos azúcares sustrato (Figura 35). La cinética de transferencia de los tres azúcares resultó muy rápida alcanzando el plateau en ~2 minutos, de manera similar a lo observado para la UPTG1 (Bocca y col., 1998). Por otro lado, se observó que la velocidad

de incorporación de [^{14}C]Xil y [^{14}C]Gal era mayor que la velocidad de incorporación de [^{14}C]Glc. Este efecto es diferente a lo que ocurre con las cinéticas de UPTG1, donde la incorporación de [^{14}C]Glc y [^{14}C]Gal son las más rápidas (Tesis S. Bocca, 1998).

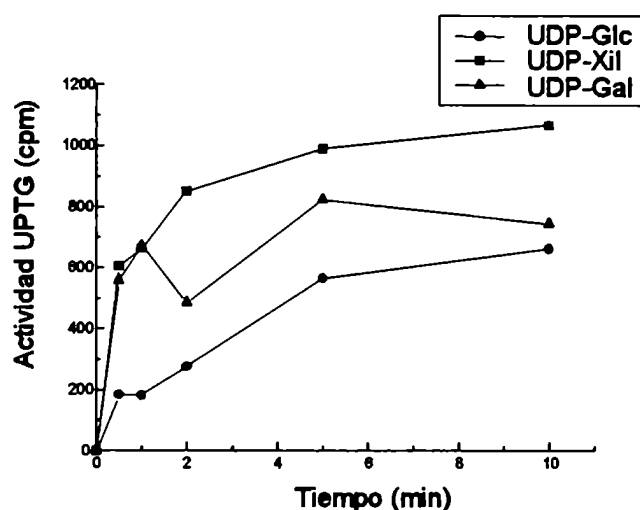


Figura 35. Cinética de la reacción de transferencia de [^{14}C]Glc, [^{14}C]Xil y [^{14}C]Gal. Los sobrenadantes de lisados de *E. coli* que expresaban UPTG2 (100 μg de proteínas) fueron incubados a 30°C en presencia de 4 μM UDP-[^{14}C]Glc, UDP-[^{14}C]Xil o UDP-[^{14}C]Gal. La reacción se detuvo en los tiempos indicados por agregado de 10% TCA y se cuantificó la radioactividad incorporada en los precipitados como se describe en Materiales y Métodos.

Posteriormente, se estudió el efecto de la concentración de UDP-Glc, UDP-Xil y UDP-Gal sobre la actividad UPTG2 y se calculó el valor de las Kms a partir del gráfico de Lineweaver-Burk ($1/V$ vs $1/S$) (Tabla 8). Las Kms obtenidas fueron de 0.45, 2.71 y 1.20 μM para UDP-Glc, UDP-Xil y UDP-Gal, respectivamente. El valor hallado para UDP-Glc es similar a la Km encontrada para UPTG1 (0.71 μM) (Bocca y col., 1999). Se encontraron valores de 1.25 y 1.67 μM para las Kms de UDP-Xil y UDP-Gal, respectivamente (Cozzarín, 2001). Cuando se calcularon las Vmax se vio que el valor para UDP-Glc era similar entre UPTG1 y UPTG2 (8.24 vs. 6.45 pmol de azúcar incorporados/min). Sin embargo, la enzima UPTG2 presentó valores de Vmax para UDP-xilosa y UDP-galactosa (35 y 27 pmol de azúcar incorporado/min) 3-4 veces mayores a los observados para UPTG1 (8.90 y 9.94 pmol de azúcar incorporado/min).

Sustrato	K _m (M)	V _{max} *
UPTG1		
UDP-Glc	0.71 x 10 ⁻⁶	8.24
UDP-Xil	1.25 x 10 ⁻⁶	8.90
UDP-Gal	1.67 x 10 ⁻⁶	9.94
UPTG2		
UDP-Glc	0.45 x 10 ⁻⁶	6.45
UDP-Xil	2.71 x 10 ⁻⁶	35.00
UDP-Gal	1.20 x 10 ⁻⁶	27.00

* V_{max} se expresa en pmoles de hexosa incorporada a la proteína por minuto.

Tabla 8. Constantes cinéticas de UPTG1 y UPTG2. Extractos de *E. coli* (100 µg de proteínas) que expresaban UPTG1 o UPTG2 se incubaron en presencia de concentraciones variables de UDP-[¹⁴C]Glc, UDP-[¹⁴C]Xil o UDP-[¹⁴C]Gal. Los valores para K_m y V_{max} se calcularon a partir del gráfico de Lineweaver-Burk (1/V vs 1/S).

4.1.2. Determinación del pH óptimo de la reacción

La secuenciación de los clones UPTG1 y UPTG2 nos permitió analizar mediante la ayuda de programas de computación específicos, aspectos estructurales de las proteínas como ser el punto isoelectrico teórico. El hecho de que los puntos isoelectricos teóricos de UPTG1 (6.19) y de UPTG2 (5.71) fueran distintos nos llevó a estudiar el pH óptimo en el que se produce la reacción de glicosilación de las enzimas recombinantes.

Se incubaron 100 µg de extractos solubles de *E. coli* que expresaban UPTG2 con UDP-[¹⁴C]Glc, UDP-[¹⁴C]Xil o UDP-[¹⁴C]Gal y se varió el pH de la mezcla de incubación entre 7.4–9 mediante el uso de buffer Tris-HCl o Bicina (Figura 36). Se observó que el pH óptimo de la reacción era muy amplio (7.8–8.8) para los tres sustratos. También se vio en

los tres casos mayor actividad UPTG cuando se usó buffer Tris-HCl en la mezcla de incubación en lugar de Bicina. En el caso de UPTG1, se observó un pH óptimo más acotado (8–8.5) y tanto el buffer Tris-HCl como la Bicina dieron resultados similares en cuanto a la actividad de la enzima (Cozzarín, 2001). Cuando se ensayaron rangos de pH entre 5-6, se observó una disminución significativa (~50%) en la actividad UPTG de ambos clones.

Las diferencias en las V_{max} para UDP-Xil y UDP-Gal y en los pHs óptimos entre ambas enzimas recombinantes ratifican los datos anteriores que sugieren que UPTG1 y UPTG2 son isoformas diferentes.

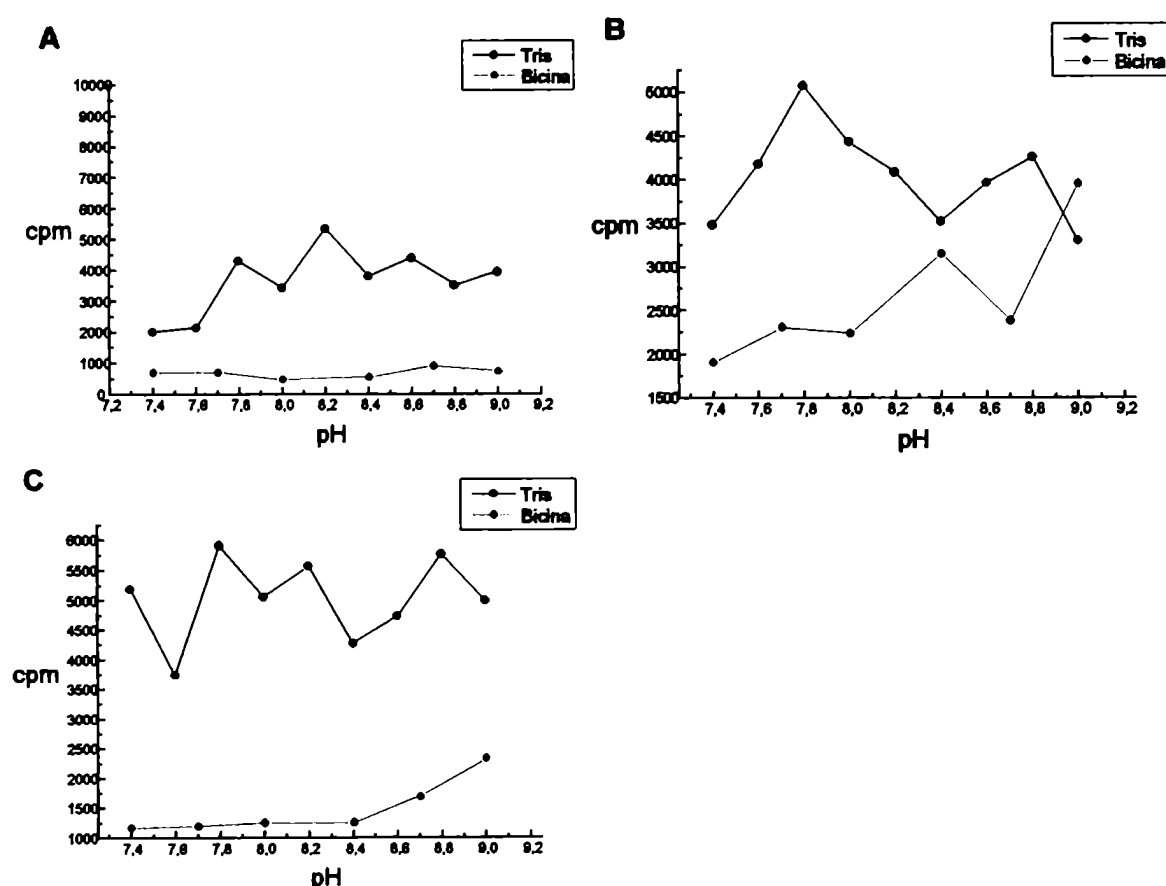


FIGURA 36. Efecto del pH de la mezcla de incubación en la glicosilación de la UPTG. Se incubaron 100µg de un extracto de *E. coli* que expresaba UPTG2 con (A) UDP-[C¹⁴]Glc, (B) UDP-[C¹⁴]Xil o (C) UDP-[C¹⁴]Gal a distintos pHs utilizando 60mM buffer Tris-HCl ó 60mM buffer Bicina. Se determinó la incorporación de azúcares radioactivos al precipitado de 10% TCA como se describe en Materiales y Métodos.

4.1.3. Fosforilación de UPTG

Ya se había reportado en tubérculos de papa que la glucosilación de UPTG daba una doble banda radioactiva de ~38 kDa (Tandecarz y col., 1995). Este efecto es similar a lo que ocurre con la RGP de arveja donde también aparecen dos especies radioglucosiladas con movilidades electroforéticas muy similares (Dhugga y col., 1991). Se sugirió que la aparición de dicho doblete se podía deber a la existencia de dos formas alélicas de UPTG (Bocca y col., 1999) o a algún procesamiento post-traducciona l de una única forma enzimática. El hecho de expresar un sólo ADNc en un sistema bacteriano inclusive en presencia de inhibidores de proteasas y aún ver el doblete radioactivo (ver Figura 34), nos encaminó hacia la investigación de posibles modificaciones post-traduccionales que pudiera sufrir la proteína. Una modificación post-traducciona l de gran relevancia, presente tanto en eucariotes y procariotes, es la fosforilación/defosforilación de proteínas. En las plantas, las actividades de diversas enzimas son reguladas por mecanismos de fosforilación/defosforilación (Stone y Walker, 1995). Según los datos obtenidos a partir del programa PROSITE, la secuencia de UPTG1 presentaba 13 posibles sitios de fosforilación (Bocca, 1998). Decidimos, entonces, estudiar si la UPTG de tubérculos de papa era capaz de fosforilarse. Para ello, se puso a punto una inmunoprecipitación con anticuerpos anti-UPTG de tubérculo de papa acoplados a Sepharose activada con CBr.

Cuando una fracción de tubérculos de papa (sobrenadante de 25000 g) fue incubada en presencia de ATP[γ -P³²], inmunoprecipitada con los anticuerpos anti-UPTG, sometida a electroforesis en SDS-PAGE 10% y posterior autoradiografía, se vio una banda radioactiva con la movilidad correspondiente a la de un polipéptido de 38 kDa (Figura 37). Más aún, en la fracción no inmunoprecipitada se puede observar también la banda radioactiva pero mucho menos intensa. Este resultado nos sugirió que la UPTG de tubérculos de papa era capaz de fosforilarse.

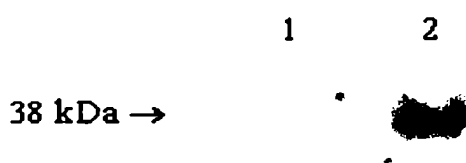


Figura 37. Fosforilación del polipéptido de 38 kDa. Se realizó una fosforilación *in vitro* con ATP[γ -P³²] en un sobrenadante de 25000g de tubérculos de papa. Al terminar la reacción, uno de los duplicados se inmunoprecipitó con anticuerpos anti-UPTG acoplados a Sepharose activada con CBr. La mezcla de reacción (calle 1) o el inmunoprecipitado (calle 2) fueron sometidos a electroforesis en SDS-PAGE 10% y posterior autoradiografía.

4.1.3.1. Efecto de la fosforilación sobre la glicosilación de UPTG2

Una estrategia alternativa para investigar el efecto de la fosforilación sobre distintas actividades enzimáticas consiste en realizar una defosforilación *in vitro* con fosfatasa alcalina para disminuir el estado de fosforilación de las proteínas (Winter y col., 1997; Zhang y col., 1999). Entonces decidimos tratar a la UPTG2 con fosfatasa alcalina para analizar si el estado de fosforilación de la enzima afectaba la autoglicosilación de la misma (Tabla 9). Se observó que luego de preincubar la enzima con fosfatasa alcalina, la radioactividad incorporada al precipitado de 10% TCA aumentaba unas 15 veces con respecto al control. Este efecto se revertía parcialmente si en la mezcla de preincubación se agregaban inhibidores de fosfatasas, un 18% en presencia de 20 mM NaF y un 76% en presencia de 10 μ M ácido okadaico. El agregado de ácido okadaico en ausencia de fosfatasa no afectó la incorporación de [14 C]Glc con respecto al control (1900 cpm vs. 2100 cpm).

Preincubación			Incubación	cpm
Fosfatasa	Inhibidor		UDP-[¹⁴ C]Glc	
	NaF	Ac.Okadaico		
-	-	-	+	2100
+	-	-	+	32900
+	+	-	+	27000
+	-	+	+	7900
		+	+	1900

Tabla 9. Efecto del tratamiento con fosfatasa sobre la actividad de la enzima UPTG2. Extractos de *E. coli* (100 μ g de proteína) que expresaban UPTG2 se preincubaron en presencia de 10 mM Cl_2Mg y 10 mM Cl_2Mn con 20U de fosfatasa alcalina en ausencia o en presencia de 20 mM fluoruro de sodio o de 10 μ M ácido okadaico, durante 30 minutos a 30 °C. Luego se incubaron con 4 μ M UDP-[14 C]Glc durante 30 minutos y se determinó la radioactividad incorporada al precipitado de 10% TCA.

Decidimos entonces, investigar si el aumento en la radioactividad incorporada al precipitado de 10% TCA reflejaba realmente un aumento en la glucosilación de UPTG2. Para ello, se sometieron los productos de glucosilación, pretratados o no con fosfatasa alcalina, a electroforesis en SDS-PAGE 10% y posterior autoradiografía (Figura 38A). Se observó que el pretratamiento con fosfatasa resultaba en un aumento de ~6 veces en la glucosilación de los polipéptidos de 37 y 38 kDa. También se observó un aumento en la intensidad de un polipéptido de ~80 kDa y la aparición de un polipéptido radioglucosilado de ~150 kDa (Figura 38B). En todos los casos, la intensidad de la marca disminuía cuando la enzima era preincubada en presencia de fosfatasa y ácido okadaico. Estos resultados muestran que el pre-tratamiento con fosfatasa realmente incrementa la glucosilación de UPTG2.

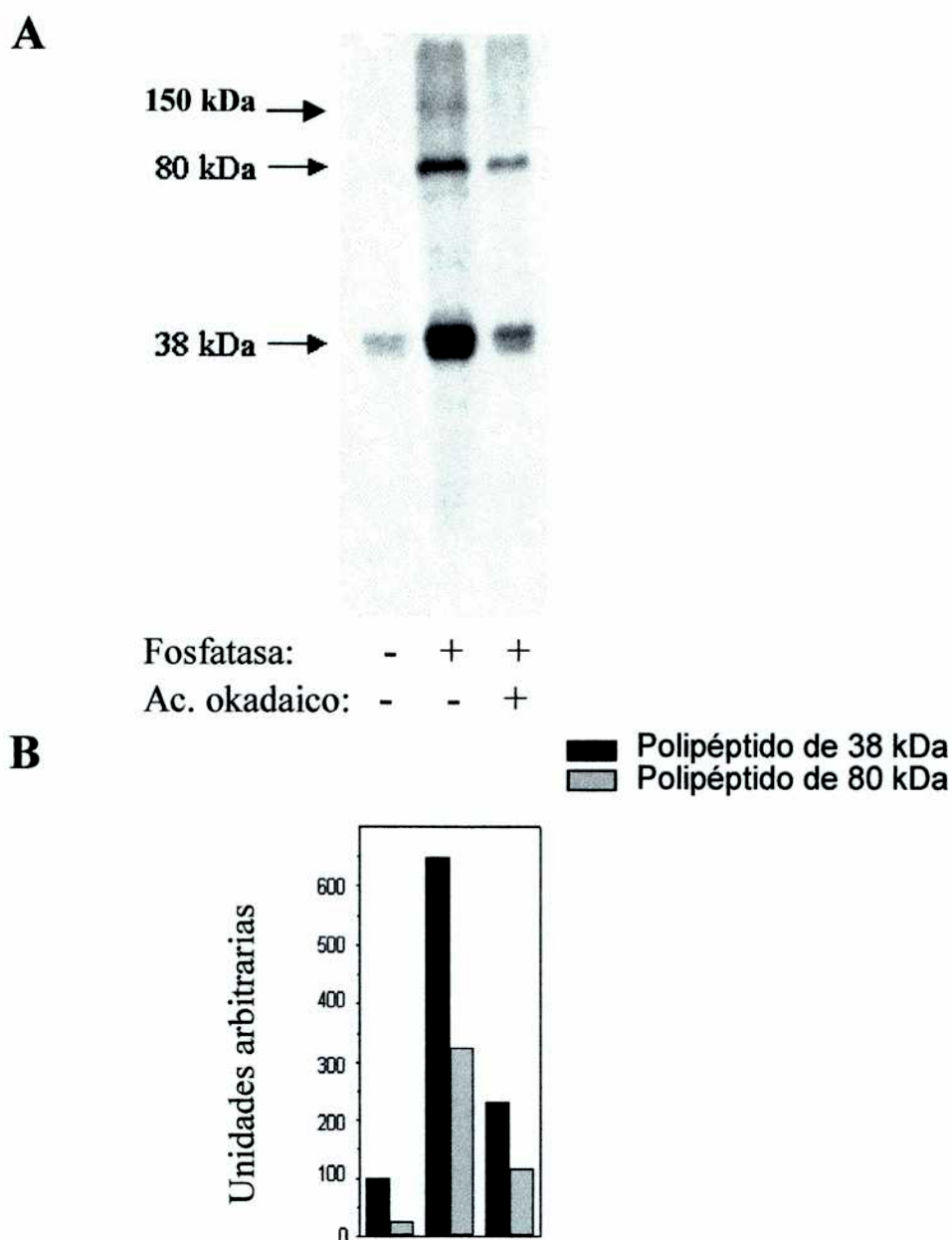


Figura 38. Efecto de la defosforilación sobre la glucosilación de UPTG2. Extractos de *E. coli* (100µg) que expresaban el gen UPTG2 de tubérculo de papa se preincubaron con fosfatasa alcalina (20U) en presencia o ausencia de ácido okadaico (10 µM), luego se incubaron con UDP-[¹⁴C]Glc y se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE 10%. (A) Autoradiografía de los productos glucosilados. (B) Densitometría de la autoradiografía de los productos glucosilados mediante el programa Scion Image. Las intensidades relativas se expresan como unidades arbitrarias.

4.1.3.2. Efecto de la fosforilación sobre la oligomerización de UPTG2

Habíamos visto que después del tratamiento con fosfatasa la glucosilación del polipéptido de 38 kDa de UPTG2 aumentaba y también aumentaba la glucosilación de polipéptidos de mayor tamaño molecular (Figura 38). Entonces para investigar si había algún efecto a nivel de la proteína luego de la defosforilación, realizamos un ensayo de Western blot. Para ello, extractos de *E. coli* que expresaban UPTG2, pre-tratados o no con fosfatasa alcalina y luego glucosilados, fueron sometidos a SDS-PAGE 10% y posterior Western blot con anticuerpos anti-UPTG de tubérculos de papa (Figura 39). Con respecto a las bandas de mayor tamaño, observamos que tanto el polipéptido de 80 kDa como el de 150 kDa eran reconocidos por el anticuerpo y ambos aumentaban luego del tratamiento con fosfatasa.

Cuando se cuantificó el polipéptido de 38 kDa luego del tratamiento con fosfatasa alcalina, se observó que éste disminuía entre un 10-15% con respecto al control (datos no mostrados).

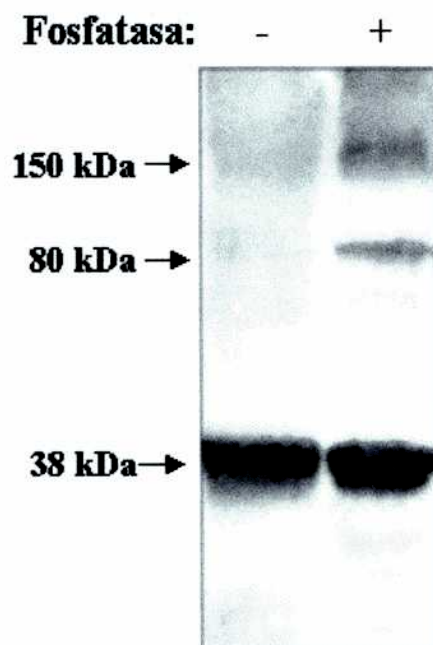


Figura 39. Western blot sobre UPTG2 luego del tratamiento con fosfatasa y posterior glucosilación. Extractos de *E. coli* (100µg) que expresaban el gen UPTG2 de tubérculo de papa fueron pretratados o no con 20U de fosfatasa alcalina y posteriormente incubados con 4 µM UDP- $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$. Las proteínas fueron sometidas a electroforesis en SDS-PAGE 10% y luego se realizó un ensayo de Western blot con el anticuerpo anti-UPTG de tubérculo de papa.

4.1.3.3. Efecto de la glicosilación sobre el estado de oligomerización de la UPTG2

Los datos presentados hasta el momento sugieren que la defosforilación de la UPTG estimula su glicosilación y que ésta a su vez, podría estar alterando el estado de agregación/asociación de la enzima consigo misma o con otras proteínas.

Quisimos investigar si la glicosilación *per se* podía alterar el estado de oligomerización de la UPTG. Para ello, analizamos mediante un ensayo de Western blot el estado de agregación/asociación de la enzima antes o después de glicosilar la preparación (Figura 40A). Se observó que después de la reacción de glicosilación el polipéptido de 38 kDa disminuía, mientras que el polipéptido de 80 kDa aumentaba luego de dicha reacción. Más aún, el aumento en la señal del polipéptido de 80 kDa era dependiente de la concentración de UDP-Glc que se agregaba en la mezcla de reacción (Figura 40B).

El hecho de que la intensidad de la banda de 38 kDa disminuya y que la intensidad de la banda de 80 kDa aumente luego de la glicosilación, sugiere que habría un cambio en el estado de oligomerización de la enzima luego de dicho tratamiento.

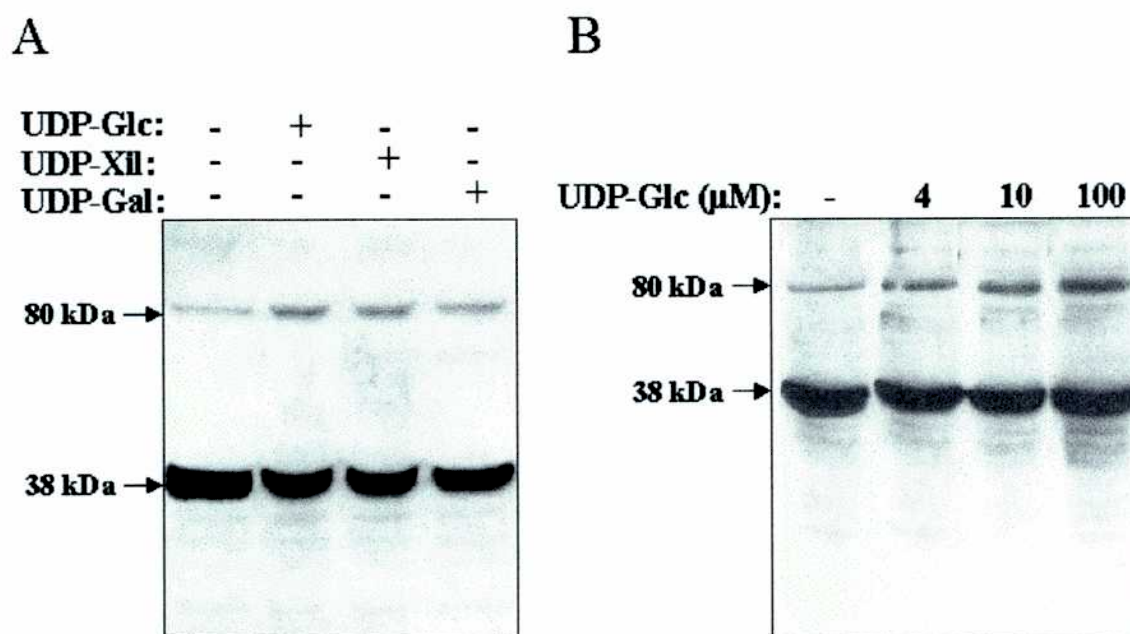


Figura 40. Western blot sobre UPTG2 luego de la glicosilación de la proteína. Extractos de *E. coli* (100 μg) que expresan el gen UPTG2 de tubérculo de papa fueron incubados con 4 μM UDP- $[^{14}\text{C}]$ Glc, UDP- $[^{14}\text{C}]$ Xil o UDP- $[^{14}\text{C}]$ Gal (A) o con distintas concentraciones de UDP- $[^{14}\text{C}]$ Glc (B). Las proteínas fueron sometidas a electroforesis en SDS-PAGE 10% y luego se realizó un ensayo de Western blot con el anticuerpo anti-UPTG de tubérculo de papa.

En resumen, los datos muestran que tanto el polipéptido de 80 como el de 150 kDa estarían inmunológicamente relacionados con la UPTG. El hecho que los tamaños de los polipéptidos de 80 y 150 kDa se aproximen al peso molecular que tendrían un dímero y un tetramero de UPTG respectivamente, sugieren que la UPTG2 podría estar formando oligómeros. Por otro lado, no podemos descartar que la UPTG se estuviera asociando a otra proteína aunque la asociación de UPTG2 con otras proteínas presentes en *E. coli* parece poco probable.

4.2. Expresión y caracterización bioquímica parcial de UPTG3 en *E. coli*

Además de los clones aislados a partir de estolones, disponíamos de clones aislados a partir de hojas. Se sabe bien que los mecanismos de control del flujo de carbono son diferentes entre tejidos fotosintéticos y de reserva y que ocurre en direcciones opuestas ya que los primeros son autótrofos (tejidos fuente) para el carbono, mientras que los últimos son heterótrofos y se denominan tejidos destino (Robards y Lucas, 1990). Buscamos entonces, actividades de UPTG que se expresen en tejidos fotosintéticos para empezar a analizar diferencias entre las enzimas codificadas por los clones aislados a partir de estolón y las enzimas codificadas por los clones aislados a partir de hojas.

En primera instancia, probamos expresar un clon de hoja denominado UPTG3 que ya se tenía subclonado, utilizando las mismas condiciones optimizadas para UPTG2. Se midió la actividad de UPTG en los extractos solubles de *E. coli* que expresaban el clon UPTG3. Luego de la incubación con UDP-[C¹⁴]Glc, UDP-[C¹⁴]Xil o UDP-[C¹⁴]Gal, las proteínas fueron sometidas a electroforesis en SDS-PAGE 10% y posterior fluorografía (Figura 41). Los resultados obtenidos muestran que la forma molecular de hoja también presenta actividad a partir de los 3 sustratos característicos de la UPTG, dando el doblete radioglicosilado de ~37 y 38 kDa.

Se observaron otros productos de mayor peso molecular aunque a diferencia de lo que sucede con UPTG2 (Figura 34), además del polipéptido de 80 kDa aparecen bandas radioactivas de ~ 120 y 150 kDa (Figura 41). Al igual que lo que sucede con UPTG2, las bandas de 80, 120 y 150 kDa que coinciden con los pesos moleculares correspondientes para dímeros, trímeros y tetrameros de la enzima, también se radioglicosilan con los 3 sustratos.

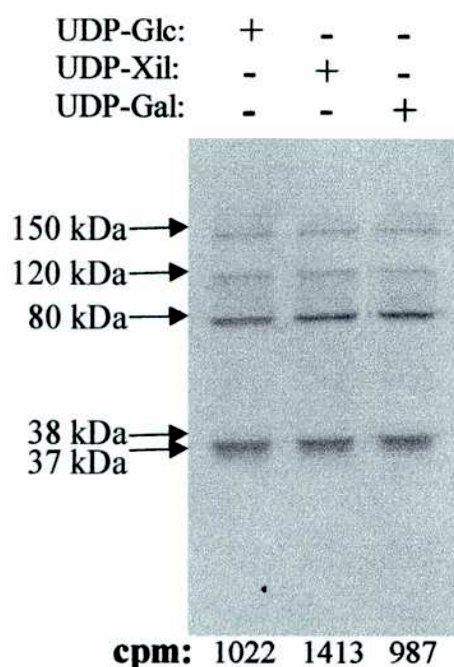


Figura 41. Glicosilación de la enzima recombinante UPTG3. Los extractos de pUC19-UPTG3 (50µg) fueron incubados con UDP-[C¹⁴]Glc, UDP-[C¹⁴]Xil o UDP-[C¹⁴]Gal, analizados por electroforesis en SDS-PAGE 10% y autoradiografiados. Sobre la izquierda se muestran los pesos moleculares de las bandas radioglicosiladas.

4.2.1. Efecto de la glicosilación sobre la oligomerización de UPTG3

Como habíamos visto en el punto 4.1.3.3, la glicosilación per se afectaba el estado de oligomerización de UPTG2. Así, analizamos si la glicosilación de UPTG3 tenía algún efecto sobre el estado de oligomerización/asociación de esta proteína. Para ello, extractos de *E. coli* que expresan UPTG3 fueron incubados con UDP-[¹⁴C]Glc, UDP-[¹⁴C]Xil o UDP-[¹⁴C]Gal, sometidos a electroforesis en SDS-PAGE 10% y luego se realizó un ensayo de Western blot con anticuerpos anti-UPTG de tubérculos de papa (Figura 42). Se observó que luego de la glicosilación, el polipéptido de 38 kDa disminuía mientras que los polipéptidos de 80, 120 y 150 kDa aumentaban su nivel significativamente.

Al igual de lo que ocurre con UPTG2, la glicosilación podría favorecer la exposición de sitios hidrofóbicos sobre la proteína y así, ésta se asociaría a sí misma o a otras proteínas dando formas de mayor peso molecular inmunológicamente relacionadas con UPTG.

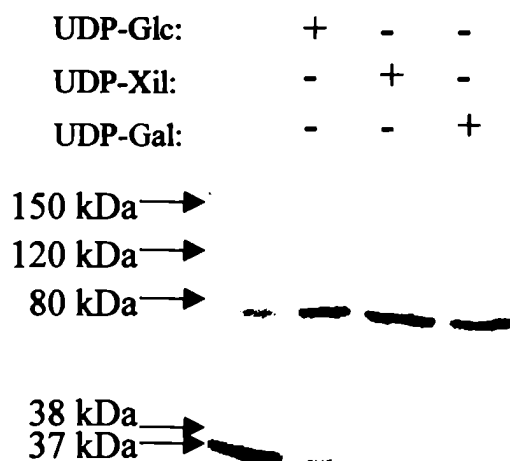


Figura 42. Western blot sobre UPTG3 luego de la glicosilación de la proteína. Extractos de *E. coli* (100µg) que expresaban el ADNc de UPTG3 se incubaron con UDP-[¹⁴C]Glc, UDP-[¹⁴C]Xil o UDP-[¹⁴C]Gal, se analizaron mediante electroforesis en SDS-PAGE 10% y posterior Western blot usando anticuerpos anti-UPTG de tubérculo de papa.

4.3. Clonado y expresión de UPTG1 en el plásmido pTrcHis

Con el fin de obtener la UPTG en grandes cantidades y de tal forma que su purificación sea sencilla, se decidió subclonar el ADNc de UPTG1 en el plásmido pTrcHis (Invitrogene) (Figura 43A). Este plásmido tiene un alto número de copias y produce la proteína deseada fusionada a una cola de 6 residuos de His, la cual posee alta afinidad por metales cargados como el Ni^{++} o el Zn^{++} . Esta propiedad hace que la proteína de fusión sea fácilmente purificada mediante una columna de afinidad cargada con dichos metales. Usando técnicas clásicas de clonado se construyó el pTrcHis-UPTG1. Se chequeó la presencia del inserto UPTG1 dentro del plásmido usando la enzima de restricción EcoRI y se corroboró la dirección 5'→3' del mismo al obtener un fragmento de 1.1 kb mediante el corte con la enzima NcoI (Figura 43B).

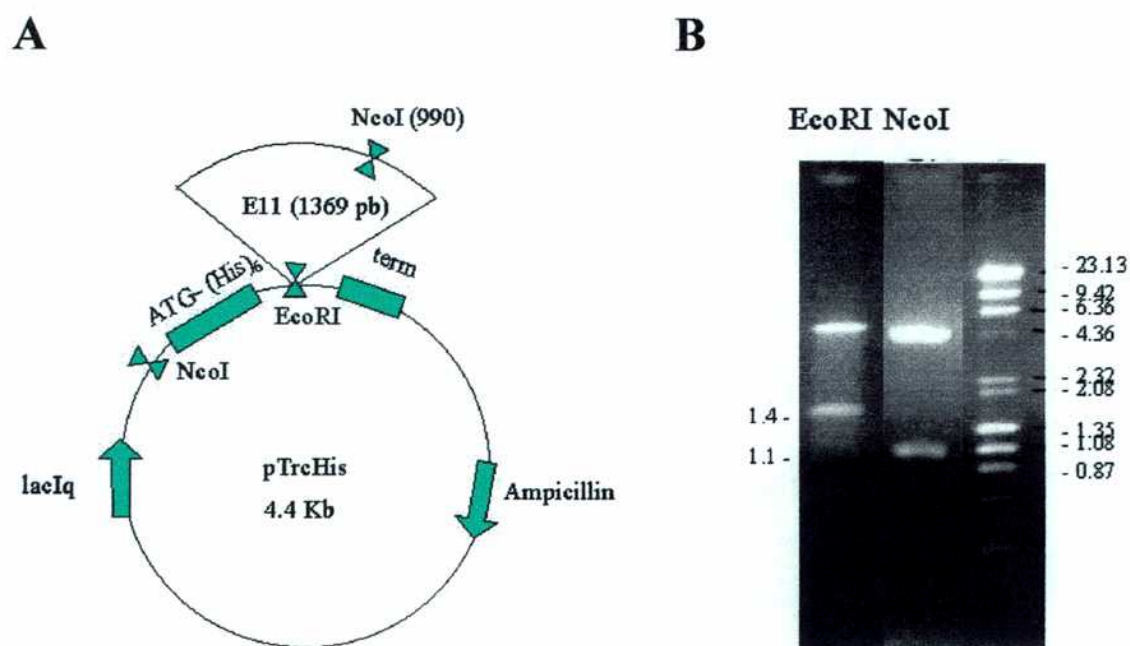


Figura 43. Clonado de UPTG1 en pTrcHis. (A) Mapa circular del plásmido pTrcHis conteniendo el inserto UPTG1 (clon E11) en el sitio EcoRI. El pTrcHis posee 5' al sitio de clonado, un codón de iniciación de la traducción seguido por una secuencia que codifica para 6 residuos de His. El plásmido es inducible por IPTG y confiere resistencia a ampicilina. (B) Cortes con enzimas de restricción del pTrcHis-UPTG1. Preparaciones del plásmido purificado fueron incubadas con EcoRI o con NcoI durante 2 horas a 37°C, y luego analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8%. Los marcadores de peso molecular se indican sobre la derecha, los tamaños de los fragmentos escindidos se indican sobre la izquierda.

Una vez obtenido el pTrcHis-UPTG1, se transformaron células de *E. coli* y se analizó la expresión de la proteína recombinante (Figura 44). El análisis de los extractos de *E. coli* mediante electroforesis en SDS-PAGE mostró una proteína de 42kDa que aparecía al expresar el plásmido que contenía la secuencia de UPTG1 y no aparecía cuando se transformaban las bacterias con el plásmido sin el inserto (dicho valor corresponde al valor de 38 kDa de la proteína sumado a aproximadamente 3kDa que aportan las 6 His) (Figura 44A). Luego de incubar los extractos en presencia de UDP-[^{14}C]Glc y Mn^{2+} , se observó la aparición de un producto radioglucosilado que correspondía a la banda de 42kDa (Figura 44B). El análisis por Western blot mostró una única banda de 42kDa que era reconocida por el anticuerpo anti-UPTG de tubérculo de papa (Figura 44C).

Una vez expresada la proteína, se probaron distintas condiciones para la expresión de la enzima de forma tal de obtenerla soluble. Se probó inducir los cultivos a distintas concentraciones de IPTG, durante distintos tiempos y diversas temperaturas. Finalmente, se logró una expresión de UPTG1 de más del 50% en la fracción soluble por inducción de los cultivos con 5 μ M IPTG durante 5 horas a 28°C (Figura 44D). La inducción de los cultivos durante 15 horas provocaba la aparición de la proteína recombinante únicamente en la fracción particulada de los lisados. Lo mismo ocurría si los cultivos eran inducidos a concentraciones >5 μ M de IPTG (no se muestra).

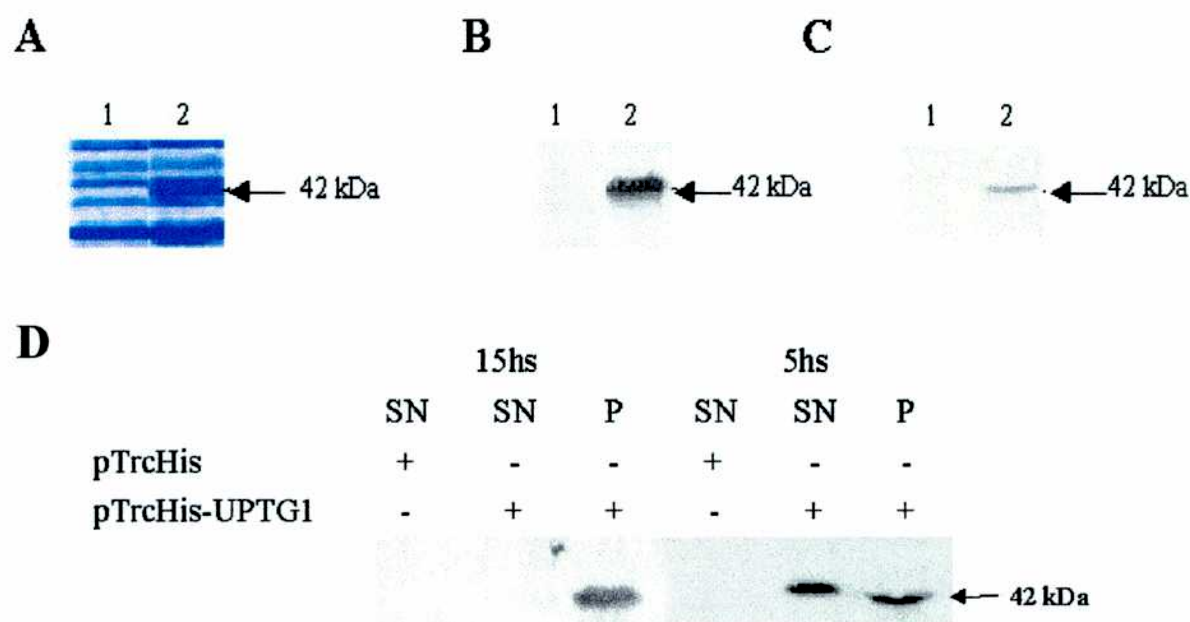


Figura 44. Expresión de 6His-UPTG1 recombinante. (A) Cultivos de *E. coli* transformados con el plásmido pTrcHis (calle 1) o con pTrcHis-UPTG1 (calle 2) fueron inducidos con 0.1 mM IPTG durante 15 horas a 28°C. Las proteínas totales de los extractos de *E. coli* (50 μ g) se separaron por SDS-PAGE 10% y se tiñeron con Coomassie brilliant blue. (B) Autoradiografía luego de la incubación de las proteínas totales de los extractos de *E. coli* (50 μ g) con UDP-[14 C]Glc y Mn^{2+} . (C) Western blot con el anticuerpo anti-UPTG de tubérculos de papa. Luego de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron mediante el método comercial de ECL (Dupont). (D) La inducción de los cultivos de *E. coli* transformados con pTrcHis-UPTG1 se realizó con 5 μ M IPTG durante 5 ó 15 horas a 28°C. Luego los cultivos fueron lisados y las fracciones solubles y particuladas de los mismos fueron analizadas por SDS-PAGE 10% y posterior Western blot con anticuerpos anti-UPTG de tubérculos de papa. Se utilizó como control cultivos de *E. coli* transformados con pTrcHis sin inserto.

4.3.1. Purificación parcial de UPTG1

Una vez obtenida la proteína UPTG1 con los residuos de His fusionados, se intentó su purificación mediante el uso de una columna de afinidad armada con agarosa acoplada a ácido nitrilotriacético (Pharmacia) cargada con Ni^{2+} . La columna fue equilibrada con buffer 20 mM Tris-HCl (pH: 7.9), 0.5M NaCl, 5mM imidazole y luego de sembrada la muestra, la columna fue lavada con 10 volúmenes del mismo buffer, luego se aumentó la concentración del imidazole a 60 mM y finalmente a 1 M para la elución de la proteína recombinante (Figura 45A). El eluido final fue dializado y concentrado y alícuotas de cada lavado fueron analizadas por SDS-PAGE 10% (Figura 45B). Se observó que la fracción eluida con 1 M imidazole presentaba unas 6-7 bandas proteicas, entre ellas la de 42 kDa. Si bien la UPTG1 resultó bastante pura, no presentó actividad enzimática tal vez por la alta concentración de imidazole utilizada.

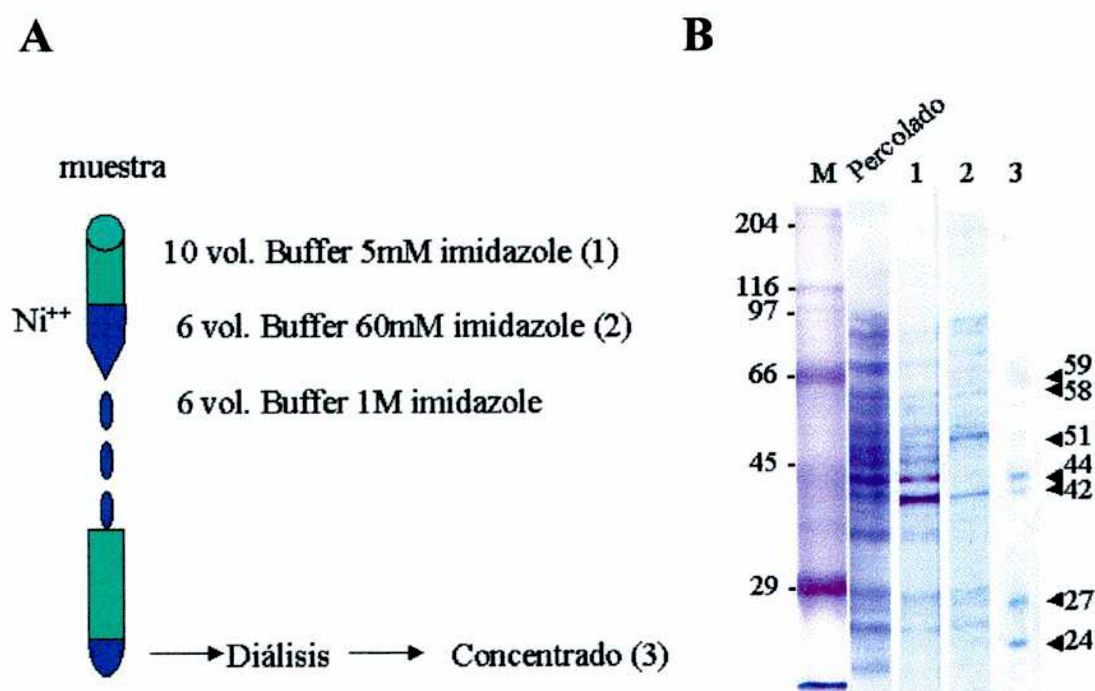


Figura 45. Purificación parcial de 6His-UPTG1. (A) Esquema de purificación de la proteína de fusión en una columna de agarosa acoplada a ácido nitrilotriacético (Pharmacia) (B) Análisis por SDS-PAGE de alícuotas de las fracciones eluidas de la columna. Alícuotas del percolado, de los lavados con 5 mM (calle 1) y 60 mM imidazole (calle 2) y del eluido dializado y concentrado (calle 3) fueron analizadas por SDS-PAGE 10% y teñidas con Coomassie brilliant blue. Los tamaños de los marcadores de peso molecular (calle M) se indican a la izquierda y los tamaños aparentes de las proteínas eluidas a la derecha.

Se decidió entonces, probar con la misma resina acoplada a un aparato de FPLC para poder eluir la proteína con la menor cantidad posible de imidazole utilizando un gradiente entre 0.05-0.35 M. Se analizaron las fracciones eluidas mediante electroforesis en SDS-PAGE 10% y luego se realizó un ensayo de Western blot para localizar la UPTG a lo largo de la columna (Figura 46). Se observó que la enzima eluía entre 0.15 y 0.25 M imidazole, coeluyendo nuevamente con varias proteínas más. A pesar de la menor concentración de imidazole utilizada, la enzima seguía inactiva aún después de la diálisis. Así, aunque se purificó mucho la UPTG recombinante, ésta no es útil para estudios en donde se requiere la actividad de la misma.

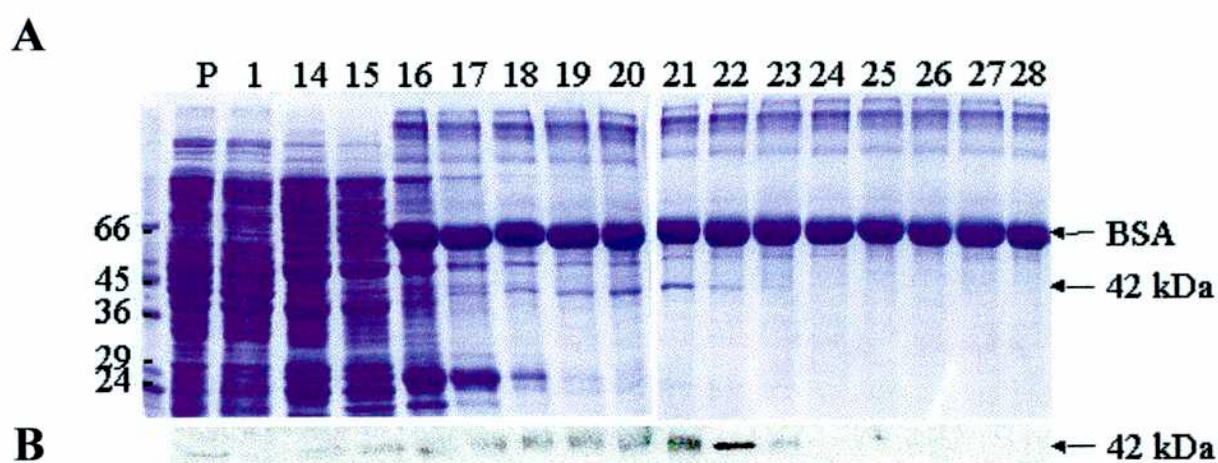


FIGURA 46. Purificación parcial de 6His-UPTG en columnas acopladas a FPLC . El extracto soluble de *E. coli* que expresaba pTrcHis-UPTG1 fue cromatografiado en una columna IMAC (Pharmacia) acoplada a un aparato de FPLC. (A) Análisis por SDS-PAGE 10% del percolado (p) y de las fracciones eluidas con imidazole entre 0,05-0,35 M. (B) Western blot con anticuerpos anti-UPTG de tubérculos de papa. Luego de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron mediante el método comercial de ECL (Dupont).

5. Análisis genómico de UPTG

La papa es un organismo tetraploide ($2n=4x$, $x=12$), por lo tanto es posible encontrar hasta cuatro alelos diferentes para un único gen. Si bien la localización cromosómica del gen que codifica la UPTG de papa reveló la existencia de un gen de copia única o de bajo número de copia (Bocca y col., 1999) la existencia de otros genes para la misma enzima no se puede descartar completamente.

5.1. Análisis por Southern blot

Así, se analizó el ADN genómico de papa mediante la técnica de Southern blot en busca de nuevos alelos diferentes a UPTG1 y UPTG2 (Figura 47). Para ello, se digirió exhaustivamente el ADN genómico de papa con EcoRI o con XbaI, enzimas de restricción que no cortan dentro de las secuencias de UPTG1 ni de UPTG2. Los fragmentos obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1% y luego se transfirieron a membranas de nylon. Se buscaron fragmentos de ADN que hibridizaran con una sonda general (ver Figura 31) que reconoce una región altamente conservada entre diversas proteínas homólogas a la UPTG y que no hibridizaran con las sondas específicas para UPTG1 o para UPTG2.

Al cortar con EcoRI, se encontraron dos fragmentos que hibridizaron con la sonda general y no hibridizaron con las sondas específicas para UPTG1 ni para UPTG2. La señal de estas dos bandas mostró ser menos intensa que las bandas encontradas con las sondas específicas y esto podría deberse a que la región que hibridiza con la sonda general no estuviera tan conservada en esas secuencias. Las bandas de ~ 4.3 Kb hibridizadas con la sonda general son más intensas que las bandas hibridizadas con cada una de las sondas por separado ya que la primera estaría reconociendo ambas isoformas de UPTG.

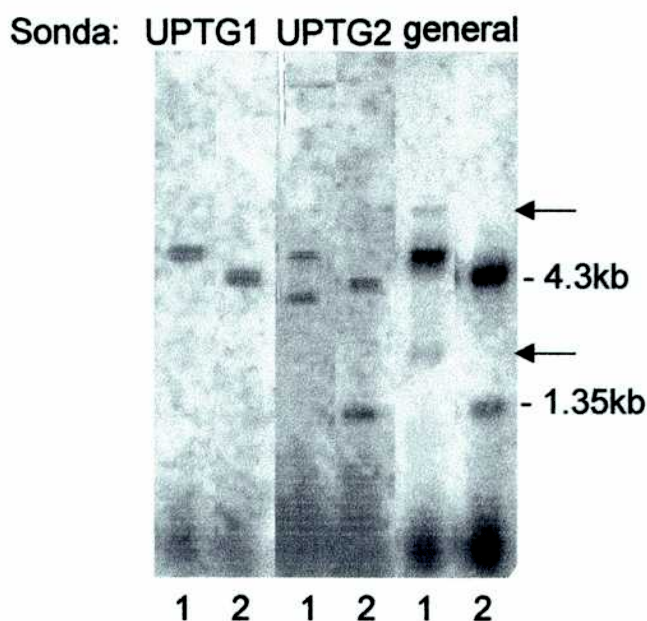


Figura 47. Análisis por Southern blot del ADN genómico de *Solanum tuberosum*. El ADN genómico de papa (6µg) fue digerido exhaustivamente con EcoRI (calle 1) o con XbaI (calle 2). Los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1% y se transfirieron a membranas de nylon. Las membranas fueron hibridizadas con una sonda general o con sondas específicas para UPTG1 o UPTG2 marcadas con dCTP[³²P].

5.2. Análisis por PCR

Otra manera de buscar nuevos alelos de UPTG fue mediante la técnica de PCR. Usando el ADN genómico de papa como templado, se probaron diversos pares de oligonucleótidos que apareaban con una región altamente conservada entre UPTG1 y UPTG2 o con regiones específicas sobre cada una de las isoformas (Figura 48).

Se observó que usando los oligonucleótidos que aparean específicamente con UPTG1 se amplifica una banda de 330 pb (correspondiente al tamaño esperado en caso de no haber intrones en ese fragmento) y otra banda de ~800 pb que se amplificaba incluso en caso de utilizar uno solo de los oligonucleótidos (dato no mostrado), motivo por el cual la misma no se tomó en cuenta. Usando los oligonucleótidos que aparean específicamente con UPTG2 se amplificaron una banda de 240 pb (correspondiente al tamaño esperado en caso de no haber intrones en ese fragmento) y otra banda de ~900 pb que también se amplificaba usando uno solo de los oligonucleótidos (dato no mostrado). Cuando usamos los oligonucleótidos que apareaban en la zona conservada se obtuvieron una banda de 400 pb

(correspondiente al tamaño esperado en caso de no haber intrones en ese fragmento) y otra banda de ~600 pb que no apareció en los controles con un solo oligonucleótido. Esta banda podría corresponder a otra forma de UPTG diferente que contuviera un intrón. Podría ocurrir también que dicha banda corresponda a alguna otra glicosiltransferasa que presente alta homología con UPTG en la región donde aparean los oligonucleótidos.

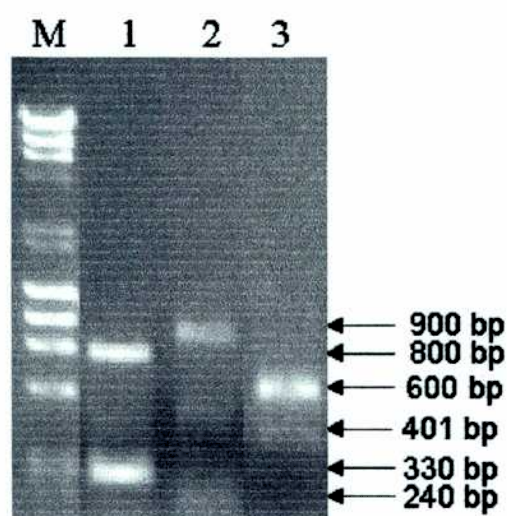


Figura 48. Productos de PCR sintetizados a partir del ADN genómico de papa. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando oligonucleótidos específicos para UPTG1 (calle 1) y UPTG2 (calle 2) u oligonucleótidos generales que apareaban con ambas secuencias (calle 3). La temperatura de apareamiento utilizada fue de 48°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1% y se visualizaron con luz ultravioleta. Los tamaños moleculares de los productos amplificados se indican a la derecha. Calle M: marcadores de tamaño molecular.

Así pues, los resultados obtenidos mediante las técnicas de Southern blot y PCR sugieren la existencia de nuevos alelos de UPTG, distintos de UPTG1 y de UPTG2 en papa. La confirmación absoluta de que los fragmentos de ADN encontrados corresponden a UPTG se obtendrá luego de la secuenciación de los mismos.

Discusión

Familia de glicosiltransferasas vegetales autocatalíticas

Dentro del grupo de las glicosiltransferasas vegetales se encuentra un pequeño número que tiene la propiedad de ser autocatalítica. Aunque a algunas de ellas se las ha relacionado con la síntesis de polisacáridos, su función exacta aún no se conoce.

La UPTG de papa fue previamente purificada a homogeneidad y luego de su clonado se encontraron dos categorías de secuencias relacionadas con la enzima. La primera categoría presentaba un 86-93% de identidad e incluía a las RGP y la segunda categoría presentaba un 44-47% de identidad en su secuencia aminoacídica (Bocca y col., 1999). En arveja se ha descripto un gen de RGP de copia única mientras que en *A.thaliana* ya se han descripto tres isoformas para dicha enzima (Dhugga y col., 1997; Delgado y col., 1998). Los resultados de esta Tesis muestran que en papa, que es una especie tetraploide, habría al menos dos isoformas de la UPTG (UPTG1 y UPTG2) las cuales no sólo se expresan diferencialmente en los diversos tejidos de la planta sino que presentan características cinéticas diferentes. La UPTG2 mostró una mayor velocidad de glicosilación con xilosa y galactosa con respecto a la UPTG1, aunque las afinidades por los sustratos resultaron similares.

Por otro lado, el análisis del ADN genómico de papa por Southern blot y PCR, sugiere la existencia de nuevos genes de UPTG diferentes a los dos anteriormente descriptos. Todos estos datos confirman la existencia de una pequeña familia multigénica de glicosiltransferasas autocatalíticas presentes en plantas superiores.

Bioquímica de la reacción de glicosilación

Aunque los trabajos previos sugerían que la UPTG era capaz de autoglicosilarse tanto en presencia de UDP-Glc como de UDP-Xil o UDP-Gal (Bocca y col., 1999), no se había investigado en profundidad aspectos tales como la naturaleza del enlace entre la porción glicosídica y la proteína o la reversibilidad de la reacción. Además, no se había estudiado la relación entre los diferentes sustratos utilizados por la enzima. El tratamiento con enzimas α y β -hidrolíticas luego de la glicosilación de la UPTG de papa, mostró que la glucosa, la xilosa y la galactosa se unen a la proteína en configuración β .

Se sabía que el tratamiento con 0,5N NaOH durante 5hs a 50°C liberaba al sobrenadante de 10% TCA aproximadamente el 90% de las glucosas unidas a la UPTG (Tandecarz y Cardini, 1978). Luego de dicho tratamiento, se encontró que la xilosa y la galactosa unidas a la UPTG también mostraban el mismo comportamiento que la glucosa. Además, se encontró que un único residuo de xilosa y de galactosa se uniría a la proteína,

lo que coincide con lo reportado por Tandecarz y Cardini (1978) quienes mostraron que la UPTG uniría un único residuo de glucosa. Así, estos resultados sugieren que un único residuo de azúcar se uniría en configuración β a la proteína y dicha unión se comportaría más bien como las del tipo N. Para la amilogenina de maíz, que es una proteína que presenta alta homología con UPTG, se encontraron resultados similares (Singh y col., 1995).

Aunque se sabía que en presencia de concentraciones mM de UDP, UDP-Glc, UDP-Xil o UDP-Gal la radioactividad incorporada a la UPTG podía ser desplazada (Bocca y col., 1999), se encontró que concentraciones micromolares de UDP-Glc también eran suficientes para desplazar la radioactividad asociada a la enzima.

No se sabía si dicho desplazamiento involucraba una reacción reversible o si se trataba de una deglicosilación. Los datos encontrados sugieren que la UPTG catalizaría la ruptura del enlace glicosídico y no la transferencia del azúcar nuevamente al UDP. Podría ocurrir que la deglicosilación de la UPTG fuera consecuencia de la presencia de glucosidasas en la preparación, sin embargo Bocca y col. (1999) encontraron que la UPTG de tubérculo de papa también perdía el azúcar unido a la proteína en presencia de concentraciones mM de UDP-Glc, UDP-Xil o UDP-Gal aún cuando la enzima estaba purificada a homogeneidad.

Se esperaba que concentraciones micromolares de UDP-Xil fueran suficientes para desplazar la radioactividad asociada a la UPTG. Sin embargo, los resultados mostraron que eran necesarias concentraciones milimolares de UDP-Xil para lograr el desplazamiento de la radioactividad. Esto podría revelar la existencia de otro aceptor de xilosas distinto a la UPTG en la preparación enzimática. Cuando estudiamos si se formaba un disacárido de Glc-Xil sobre la UPTG mediante la incubación simultánea con UDP-[C¹⁴]Glc y UDP-[C¹⁴]Xil, encontramos otra evidencia que apoya la existencia del aceptor de xilosas en la preparación enzimática de papa diferente a la UPTG. Se vio que la incorporación de radioactividad al precipitado de 10% TCA era mayor a la sumatoria de las incorporaciones obtenidas con cada sustrato por separado aunque no se formara un disacárido sobre la enzima. Ray (1980) también propuso la existencia de un aceptor de xilosas en una preparación de membranas de Golgi de arveja ya que observó que la incorporación de UDP-Xil a oligosacáridos era estimulada en presencia de UDP-Glc. Aunque el aceptor de xilosas distinto de UPTG queda aún por ser identificado, la importancia del mismo radica en que podría estar relacionado con los eventos iniciales en la síntesis de hemicelulosas, aún totalmente desconocidos.

Regulación de la actividad de UPTG en maíz

Cuando Rothschild y col. (1994) caracterizaron la UPTG en maíz, encontraron que la actividad enzimática estaba inhibida. Luego se reportó que dicha inhibición se debía a la presencia de un inhibidor proteico (IP) el cual presentó alta homología con secuencias ya conocidas de sacarosa sintetasa (SS) de plantas (Rothschild y col., 1996; Wald y col., 1998).

Para confirmar que la sacarosa sintetasa era la que efectivamente presentaba la actividad inhibitoria sobre la UPTG de maíz, se compararon las características bioquímicas de IP y de SS y se encontró que éstas eran muy similares. Los ensayos de neutralización y de termosensibilidad mostraron además, que la molécula de sacarosa sintetasa presentaba un sitio de unión a UPTG diferente al sitio de unión a la sacarosa.

Más aún, nuestros resultados sugieren que la isoforma de sacarosa sintetasa que tendría actividad IP sería la SS1. Esta hipótesis se basa primero, en el hecho que la SS1 es la isoforma preponderante en el endosperma inmaduro del grano de maíz en donde la UPTG está inhibida. En segundo lugar, en el endosperma del mutante *shrunk1* que carece de la isoforma SS1, se encontró que la actividad de UPTG no estaba inhibida. También, a diferencia del endosperma silvestre, la preparación del endosperma de maíz *shrunk1* era incapaz de inhibir la UPTG de tubérculo de papa sugiriendo que dicho mutante que carece de SS1, carece también de actividad IP. En tercer lugar, en tallos y raíces de plántulas de maíz se encontró actividad de SS, sin embargo la actividad UPTG no estaba inhibida. En dichos tejidos la isoforma mayoritaria es la SS2, la cual evidentemente no presenta actividad inhibitoria sobre la UPTG. Esto explica por qué en los ensayos de Western blot la proteína SS estaba presente, ya que los anticuerpos utilizados son policlonales y reconocerían también la isoforma SS2.

Aunque históricamente siempre se asoció a la SS únicamente con la síntesis de almidón, actualmente hay diversas evidencias que indican que la enzima estaría involucrada también en la biosíntesis de polisacáridos estructurales. Delmer y Amor (1995) han reportado que la SS de plantas de algodón estaría asociada a los complejos de celulosa sintetasa para abastecer el UDP-Glc necesario para la síntesis de celulosa. Chourey y col. (1998) reportaron que en maíz, la isoforma SS1 estaría participando en el abastecimiento de sustratos para la biosíntesis de celulosa mientras que la isoforma SS2 sería necesaria para generar precursores para la biosíntesis de almidón. Anteriormente la UPTG había sido asociada con la síntesis *de novo* del almidón aunque luego de la purificación a homogeneidad de la enzima y su posterior clonado, se la involucró en la biosíntesis de polisacáridos de pared celular (Bocca y col., 1999). La asociación entre la UPTG de maíz y

la SS1 aporta una nueva evidencia a favor de que la UPTG estaría involucrada en la biosíntesis de polisacáridos de pared celular vegetal. Podríamos especular que la SS regule la disponibilidad del UDP-Glc necesario para la glucosilación de la UPTG. No es extraño entonces encontrar que en el endosperma de semillas de maíz, en cuyas paredes primarias se acumulan principalmente galactomananos y no xiloglucanos, la UPTG esté inhibida.

Aunque no sabemos aún si existe una asociación directa entre la UPTG y la SS, el uso de geles bidimensionales y de técnicas de coimmunoprecipitación podrían ser de utilidad para investigar este aspecto.

Modificación post-traducciona de la UPTG de papa

Previamente se había mostrado que luego de la glucosilación, la UPTG de papa aparecía en SDS-PAGE como un doblete de ~37,38 kDa. Se sugirió que dicho doblete podría deberse a la presencia de diversas formas alélicas de la enzima o bien que podría tratarse de una modificación post-traducciona de la proteína. Nuestros resultados muestran que aún luego de expresar en *E. coli* un solo ADNc se sigue viendo el doblete, lo que sugiere que una modificación post-traducciona sería la que daría origen al mismo. Las RGP de arveja y en *A.thaliana* también mostraron la presencia de dobletes proteicos con moviidades electroforéticas muy similares, aunque su naturaleza aún se desconoce (Dhugga y col., 1991; Delgado y col., 1998).

Investigando la naturaleza de la posible modificación post-traducciona, encontramos que la UPTG de papa puede ser fosforilada *in vitro*. Es importante destacar que la secuencia de la proteína predice la existencia de 14 posibles sitios de fosforilación. También vimos que el tratamiento con fosfatasa de la proteína UPTG2 recombinante aumentaba la glucosilación del péptido de 38 kDa. El mismo efecto se vio cuando se trató de igual manera a la proteína recombinante UPTG1 (Cozzarín, 2001). Aunque las pequeñas diferencias en las moviidades electroforéticas de las proteínas que conforman el doblete impidieron determinar cuál de las bandas incrementaba su glucosilación, los resultados obtenidos muestran claramente que la fosforilación altera el estado de glucosilación de la UPTG.

El tratamiento con fosfatasa también favoreció la glucosilación de polipéptidos de 80 y 150 kDa inmunológicamente relacionadas con la UPTG, los cuales aumentaban su nivel a expensas del polipéptido de 38 kDa. Esta evidencia sugiere que el estado de glucosilación de la proteína podría regular otras funciones como ser la asociación de la UPTG con otras proteínas o consigo misma. El tamaño de las bandas de alto peso molecular que aparecen

luego del tratamiento con fosfatasa y posterior glicosilación coinciden con el tamaño molecular esperado para dímeros y tetrámeros de UPTG, lo que sugiere que la enzima se estaría oligomerizando. Ya se había reportado una estructura oligomérica para la UPTG nativa de tubérculos de papa (Moreno y col., 1986; Ardila y col., 1992). Además, el comportamiento de la UPTG al ser sometida a cromatografías en columnas de tamiz molecular mostró la presencia de pentámeros o hexámeros de la subunidad de 38 kDa (Bocca y col., 1997).

Encontramos que no sólo la fosforilación sino que la glicosilación *per se* afectaría el estado de oligomerización de la UPTG. Además, se observó que el aumento de los polipéptidos de alto peso molecular sería dependiente de la concentración de UDP-Glc presente en la mezcla de reacción, lo que apoya fuertemente dicha hipótesis.

Todos estos resultados apoyan la idea que la glicosilación favorecería la oligomerización de la UPTG consigo misma. Sin embargo, la secuenciación de los polipéptidos de alto peso molecular confirmará dicha hipótesis.

Por otro lado, no podemos descartar que la defosforilación también favorezca la asociación de la UPTG a membranas lo que podría involucrar un mecanismo de localización de la enzima. La UPTG había sido reportada anteriormente como una actividad asociada a las membranas (Moreno y col., 1981) y había sido purificada a partir de una fracción particulada de tubérculos de papa (Bocca y col., 1997). Posteriormente, se demostró que la enzima de tubérculos de papa se encontraba presente en abundantes cantidades también en las fracciones solubles (Bocca y col., 1999), lo que coincide con los datos de la estructura primaria de la UPTG que predice una proteína sin regiones transmembrana (Bocca y col., 1999). Además, se sabía que la defosforilación de otras enzimas solubles involucradas en el metabolismo de azúcares (la sacarosa sintetasa y la sacarosa fosfato sintetasa) promovía cambios conformacionales que involucraban un aumento en la exposición de residuos hidrofóbicos al solvente (Winter y col., 1997; Huber y col., 1992). También, se había observado que la fosforilación de la sacarosa sintetasa de tubérculos de papa liberaba a la enzima de las membranas como consecuencia de una disminución de la hidrofobicidad en la superficie de la molécula. Especulamos entonces, que la defosforilación y posterior glicosilación de UPTG favorezca, mediante la exposición de sitios hidrofóbicos, la asociación de la proteína a membranas.

Aún se desconoce a qué tipo de membranas se asociaría la UPTG sin embargo se ha reportado que la RGP de arveja estaría localizada en la membrana plasmática (Dhugga y col., 1991) y en el aparato de Golgi (Dhugga y col., 1997). La RGP de *A.thaliana* se encontró asociada periféricamente a las vesículas del Golgi (Delgado y col., 1998). Epel y col. (1996) aislaron, a partir de una preparación de pared celular, una proteína de maíz

homóloga a la UPTG y reportaron que la misma estaría asociada al aparato de Golgi y en especial a los plasmodesmos. Faik y col. (2000) reportaron en *Tropaeolum majus* L., que polipéptidos autoglicosilantes se asociarían a las vesículas de Golgi. Esta aparente discrepancia con respecto a la localización de las enzimas homólogas a la UPTG, podría deberse a la existencia de una localización subcelular diferente para cada isoforma o a que una misma proteína pueda localizar en distintos compartimentos. Se podría especular también, que diferentes isoenzimas de UPTG y de RGP pudieran estar involucradas en la biosíntesis de distintos polisacáridos vegetales que se sabe ocurre en compartimentos subcelulares diferentes.

Expresión de ARNm de UPTG en plantas de papa

Otra estrategia que puede aportar información sobre la función *in vivo* de una proteína es el análisis de su expresión a nivel de ARNm. Como ya vimos, la UPTG presenta diversas isoformas y el análisis de la expresión diferencial de las mismas puede responder preguntas tales como si la regulación está mediada por los factores metabólicos del tejido o por el control del crecimiento de la célula.

La expresión del ARNm de UPTG había sido analizada, utilizando una sonda correspondiente al ADNc completo del clon E11 (UPTG1), en diversos tejidos de plantas de papa y se encontró un transcripto de aproximadamente 1.4 kb principalmente en estolones y tubérculos (tejidos destino) (Bocca y col., 1999). Esto sugirió que tal vez la UPTG estuviera relacionada con el proceso de tuberización o con el estadio metabólico del tejido. Por ello, se analizó la expresión de los mensajeros de UPTG en un sistema de tuberización *in vitro*, utilizando una sonda que reconocía tanto los transcriptos de UPTG1 como los de UPTG2. Se encontró que los niveles de ARNm de UPTG no variaban en respuesta a la aparición de microtubérculos ni a la concentración de sacarosa del medio de cultivo lo que sugiere que ni el proceso de tuberización ni el estadio metabólico del tejido modularían la expresión de los mensajeros de la UPTG. Esto coincide con los datos de actividad de UPTG encontrados por García (1997) que observó que en los tubérculos crecidos en 6% de sacarosa la actividad de la enzima bajaba un 60% con respecto a los tubérculos crecidos en 3% de sacarosa (de 42 a 25 pmol Glc/min. mg de proteína), es decir que cuanto más desarrollados era el tejido la actividad de la enzima era menor. Por otro lado, un resultado inesperado fue que se encontró una mayor expresión de mensajeros de UPTG en estolones con tubérculos inmaduros comparando con estolones con tubérculos

maduros lo que hacía sospechar que la UPTG podría estar relacionada más bien con el estadio de diferenciación del tejido.

Otra evidencia que indicaba una posible relación entre el estadio de diferenciación del tejido y la expresión de ARNm de UPTG, fue que en función del tiempo de subcultivo se encontró una disminución en los niveles de mensajeros en las porciones apicales de tallos de plántulas micropropagadas *in vitro*, mientras que en las porciones basales de los mismos, en donde el ritmo de crecimiento es mayor, los niveles de mensajeros de UPTG no disminuyeron.

Todos estos datos sugieren que la UPTG se expresaría principalmente en tejidos cuyas células presentan un estado de activo crecimiento y/o elongación. Así, en las plantas de papa la expresión de la UPTG podría estar regulada por factores que controlan el crecimiento de la célula. La baja expresión de ARNm en las porciones apicales de los tallos podría relacionarse con la baja tasa de crecimiento en esos tejidos. En tejidos quiescentes como son los tubérculos de papa cosechados, también encontramos que los niveles de mensajeros de UPTG disminuían en función del tiempo de post-cosecha. Los datos encontrados coinciden con lo reportado por Delgado y col. (1998) quienes observaron una mayor expresión del ARNm de RGP en la fase logarítmica de cultivos en suspensión de células de *Arabidopsis thaliana*.

Cuando se analizó la expresión específica de los transcritos de UPTG1 y de UPTG2 en diversos tejidos de plantas de papa, se encontró una alta expresión de los transcritos de UPTG1 en estolones, tubérculos y raíces mientras que la expresión de los mensajeros de UPTG2 era elevada en todos los tejidos analizados pero especialmente en hojas y tallos. El hecho que la UPTG2 presenta mayores velocidades de incorporación para xilosa y galactosa con respecto a UPTG1, podría sugerir que la primera sería la isoforma más activa en tejidos con metabolismos de síntesis de polisacáridos más dinámicos como ser los tejidos fotosintéticos, donde los ciclos de síntesis/degradación de polisacáridos son muy rápidos. La expresión del ARNm de UPTG1 se asemeja a los datos encontrados por Delgado y col. (1998) que observaron altos niveles de ARNm de RGP1 en raíces y una baja expresión en hojas y tallos de *Arabidopsis thaliana*.

Función *in vivo* de la UPTG

Además de la celulosa, los principales componentes de la pared celular vegetal son las hemicelulosas y las pectinas. Aunque hay muy poca información sobre los eventos moleculares involucrados en la síntesis e iniciación de dichos polisacáridos, se sabe que

éstos son sintetizados en el lumen del aparato de Golgi (Brett y Waldron, 1996). Se sabe que los nucleótidos-azúcares sustratos de la síntesis de hemicelulosas y pectinas son sintetizados en el citosol y que las glicosiltransferasas que participan en la polimerización de los azúcares de dichos polisacáridos se localizan en el lumen del Golgi, lo que plantea un conflicto topológico (Muñoz y col., 1996; Wulff y col., 2000). Por lo tanto, se requiere que los sustratos de las glicosiltransferasas sean transportados desde el citosol hasta el lugar de síntesis de los polisacáridos. Estudios realizados en arveja mostraron que el UDP-Glc puede ser transportado al lumen del Golgi por intermedio de una proteína (Muñoz y col., 1996). Norambuena y col. (comunicación personal) han clonado recientemente en *A.thaliana*, genes que codifican para transportadores de nucleótidos-azúcares entre los que se encuentra un transportador para UDP-Glc y UDP-Gal.

Por otro lado, la especificidad de sustrato de la UPTG por los nucleótidos-azúcares que componen los xiloglucanos sumada a la localización en el aparato de Golgi reportada para enzimas homólogas a la UPTG, han llevado a proponer que la enzima podría estar involucrada en la síntesis de polisacáridos de pared celular. En *Tropaeolum majus L.*, Faik y col. (2000) han encontrado una proteína homóloga a la UPTG que facilitaría la canalización de UDP-azúcares desde el citoplasma hacia el lumen del Golgi donde serían usados en la síntesis de xiloglucanos. Como la proteína UPTG es soluble y no presenta dominios transmembrana, podría ocurrir que esta enzima se asociara a elementos de anclaje, desconocidos hasta el momento, presentes en la membrana del Golgi. Así, la UPTG podría establecer asociaciones funcionales con dichos elementos que podrían ser del tipo de los transportadores de nucleótidos-azúcares, canalizando los UDP-azúcares al aparato de Golgi para la biosíntesis de polisacáridos.

Es sabido que en tejidos en elongación hay una activa síntesis de los componentes de la pared celular, principalmente pectinas y hemicelulosas (Driouch y col., 1993). Los resultados encontrados en esta Tesis mediante el análisis de la expresión de ARNm de UPTG, sugieren que la enzima se expresaría principalmente en tejidos cuyas células estarían en estado de activo crecimiento y/o elongación, lo que constituye una fuerte evidencia que apoya la hipótesis que propone que la UPTG estaría involucrada en la síntesis de los polisacáridos no celulósicos que componen la pared celular vegetal.

Otra estrategia para evaluar la función *in vivo* de la UPTG es la manipulación genética de su expresión en plantas transgénicas. Los trabajos realizados en colaboración con el laboratorio del Dr. Patrick Du Jardin (Faculte des Sciencies Agronomiques de Gembloux, Bélgica) muestran que cuando se transforman plantas de papa con construcciones antisentido de UPTG1, la expresión de la actividad de la enzima no disminuye. Esto podría estar indicando que la supresión de la expresión de una isoforma de

UPTG induce la expresión de otra isoforma, la cual estaría compensando la falta de la primera. La existencia de isoenzimas redundantes de UPTG sugiere que la enzima formaría parte de un sistema complejo esencial para la viabilidad de la célula vegetal.

Conclusiones

Conclusiones

- Se describieron dos isoformas de UPTG de papa (UPTG1 y UPTG2) las cuales presentaron características cinéticas diferentes y que muestran una expresión diferencial a nivel de ARNm en diversos tejidos de la planta de papa.
- Se analizaron aspectos bioquímicos de la reacción de glicosilación de la UPTG de *Solanum tuberosum*. Se mostró que un único residuo de glucosa, xilosa o galactosa se une a la proteína en configuración β y que dicha unión se comporta más bien como las del tipo N. Cuando se analizó la reversibilidad de la reacción catalizada por la UPTG, se encontró evidencia que mostraba que en presencia de UDP la enzima catalizaría la ruptura del enlace glicosídico.
- Se encontró que la actividad de UPTG de maíz está inhibida por una isoforma de la sacarosa sintetasa, la isoforma SS1, que se piensa estaría involucrada en la biosíntesis de polisacáridos de la pared celular vegetal.
- Se encontró que la UPTG de papa puede ser fosforilada *in vitro* y que el estado de fosforilación de la proteína puede alterar su glicosilación. Más aún, se propuso que la defosforilación y posterior glicosilación de la proteína podrían regular la asociación de la UPTG con otras proteínas o consigo misma.
- El análisis de la expresión del ARNm de UPTG mostró que en las plantas de papa la UPTG se expresa principalmente en tejidos cuyas células se encuentran en estado de activo crecimiento/elongación. Así, la expresión de la enzima podría estar regulada por factores que controlan el crecimiento de la célula. Basados en el hecho que en tejidos en elongación hay una activa síntesis principalmente de pectinas y hemicelulosas, los datos mostrados constituyen una fuerte evidencia que apoya la hipótesis que propone que la UPTG estaría involucrada en la síntesis de los polisacáridos no celulósicos que componen la pared celular vegetal. Más aún, la existencia de isoenzimas redundantes de UPTG sugiere que la enzima formaría parte de un sistema complejo esencial para la viabilidad de la célula vegetal.

Perspectivas

- Para confirmar si efectivamente la UPTG estaría involucrada en la canalización de UDP-azúcares desde el citoplasma hacia el lumen del Golgi, será interesante investigar la relación física y funcional de la enzima con las vesículas del Golgi y con otras proteínas asociadas a dicha organela. La identificación de los posibles sitios de anclaje de la UPTG a las vesículas del aparato de Golgi de plantas podría llevarse a cabo por técnicas de entrecruzamiento. Asimismo, sería importante investigar la asociación de la UPTG con otras proteínas, tales como los transportadores de nucleótidos-azúcares, que pudieran unirse a la enzima para formar complejos de importación de sustratos al Golgi.

Por otro lado, para confirmar si la UPTG forma parte de un sistema que acopla la transferencia de azúcares a la síntesis de polisacáridos se podría analizar si la enzima, una vez glicosilada con azúcares radioactivos, es capaz de transferirlos a los polisacáridos que se sintetizan en el Golgi, como ser los xiloglucanos.

- El hecho de haber aislado el clon UPTG3 a partir de hojas, hace pensar que la enzima recombinante podría presentar características bioquímicas diferentes a las de las enzimas codificadas por los clones aislados a partir de estolón (enzimas UPTG1 y UPTG2). La comparación de dichas características y el análisis de la expresión de UPTG3 a nivel de ARNm podría aportar nuevos datos acerca de su función *in vivo* y de su especificidad de tejido. La secuenciación del clon UPTG3 confirmará la existencia de un tercer gen para la UPTG de papa. Asimismo, será interesante continuar analizando los clones que se aislaron en el laboratorio para intentar encontrar la existencia de un cuarto gen para la UPTG de papa, cuyo genoma admitiría hasta cuatro genes por ser esta especie tetraploide.
- La identificación de los factores que modulan la actividad de la UPTG podría aportar datos relevantes para el control de la síntesis de los polisacáridos vegetales. Así, es importante investigar diversos aspectos sobre la fosforilación como modificación post-traducciona de la UPTG. Entre ellos:
 - identificar los factores involucrados en la fosforilación/defosforilación de la UPTG tales como protein kinasas y fosfatasas endógenas.
 - investigar el mecanismo por el cual la glicosilación de la UPTG modula el estado de oligomerización de la enzima.

- investigar si el estado de fosforilación de la UPTG involucra efectivamente un mecanismo de localización de la enzima. Ya que tanto la UPTG como las proteínas homólogas presentan la característica de aparecer tanto de manera soluble como asociadas a membranas, sería relevante el análisis de la localización de la UPTG bajo diversos estados de fosforilación.

Referencias

Referencias

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J** (1994) *Molecular Biology of the Cell*, 3ª edición, Garland Publishing Inc.
- Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Staehelin LA, Varner JE** (1997) *Plant Physiol.* 113: 1-3.
- Altschul, SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott M, Delmer DP** (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 9353-9357.
- Ap Rees T, Entwistle G** (1989) In: *Physiology, Biochemistry and Genetics of Nongreen Plastids*. Boyer CD, Hardison RC, Shannon JC, eds. Am. Soc. Plant Physiol., Rockville.
- Ardila FJ, Tandecarz JS** (1992) *Plant Physiol.* 99: 1342-1347.
- Arioli T, Peng L, Betzner A, Burn J, Wittke W, Herth W, Camilleri C, Höfte H, Plazinski J, Birch R, Cork A, Glover J, Redmond J, Williamson R** (1998) *Science* 279: 717-720.
- Bae JM, Giroux M, Hannah LCO** (1990) *Maydica* 35: 317-322.
- Bauer WD, Talmadge KW, Keegstra K, Albersheim P** (1973) *Plant Physiol.* 51: 174-187.
- Bhave MR, Lawrence S, Barton C, Hannah LC** (1990) *Plant Cell* 2(6): 581-8.
- Bill RM, Revers L, Wilson IBH** (1998) *Protein Glycosylation*. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Bocca SN, Rothschild A, Tandecarz JS** (1997a) *Plant Physiol. Biochem.* 35: 203-210.
- Bocca SN, Rojas-Beltran J, Moreno S, du Jardin P, Tandecarz JS** (1997b) *FASEB Journal* 11(9): 701.
- Bocca SN** (1998) Tesis de Doctorado: ““Caracterización bioquímica y molecular de la enzima UDP-glucosa: proteína transglucosilasa de *Solanum tuberosum* L.””
- Bocca SN, Kissen R, Rojas-Beltrán JA, Noël F, Gebhardt C, Moreno S, du Jardin P, Tandecarz JS** (1999) *Plant Physiol. Biochem.* 37(11): 809-819.
- Bonin CP, Potter I, Vanzin GF, Reiter WD** (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2085-2090.
- Bonin CP, Reiter WD** (2000) *Plant J.* 21(5): 445-54.

-
- Boyer CD, Shannon JC (1987)** Corn: chemistry and technology, by the American Association of Cereal Chemists Inc., Watson SA, Ramstad PE, eds., Minnesota, USA.
- Brett CT, Waldron KW (1996)** Cell wall formation. In Brett C, Waldron K eds. Physiology and Biochemistry of plant cell walls, Ed 2. Chapman & Hall, London.
- Brown RM Jr., Saxena IM (2000)** Plant Physiol. Biochem. 38: 57-67.
- Camirand A, McLachland GA (1986)** Plant Physiol. 82: 379.
- Campbell JA, Davies GJ, Bulone V, Henrissat B (1997)** Biochem. J. 326: 929-939.
- Campbell JA, Davies GJ, Bulone V, Henrissat B (1998)** Biochem. J. 329: 719.
- Campbell RE, Brett CT, Hillman JR (1988)** Biochem. J. 253: 795-800.
- Cardini CE, Leloir LF, Chiriboga J (1955)** J. Biol. Chem. 214: 149-155.
- Carlson SJ, Chourey PS (1996)** Mol. Gen. Genet., 252: 303-310.
- Carpita NC, Gibeaut DM (1993)** Plant J. 3: 1-30.
- Carpita NC (1997)** Structure and biosynthesis of plant cell walls. *In*: Dennis DT, Turpin DH, Lefebvre DD and Layzell DB (Eds.), Plant metabolism 2nd ed., Addison Wesley Longman, England, pp. 124-147.
- Charnock SJ, Davies GJ (1999)** Biochemistry 38: 6380-6385.
- Charnock SJ, Henrissat B, Davies GJ (2001)** Plant Physiol. 125: 527-531.
- Cheng C, Mu J, Farkas I, Huang D, Goebel MG, Roach PJ (1995)** Mol. Cell. Biol. 15: 6632-6640.
- Chourey PS, Nelson OE (1976)** Biochem. Gen. 14: 1041-1055.
- Chourey PS (1981)** Mol. Gen. Genet. 184: 372-376.
- Chourey PS, DeRobertis GA, Still PE (1988)** Mol. Gen. Genet. 214: 300-306.
- Chourey PS, Chen YC, Miller ME (1991)** Maydica 36: 141-146.
- Chourey PS, Taliencio EW (1994)** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 7917-7921.
- Chourey PS, Taliencio EW, Carlson SJ, Ruan YL (1998)** Mol. Gen. Genet. 259 (1): 88-96.
- Chrispeels MJ, Holuigue L, Latorre R, Luan S, Orellana A, Peña-Cortés H, Raikhel NV, Ronald PC, Trewavas A (1999)** Biol. Res. 32: 35-60.

- Cosgrove DJ** (1997) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13: 171-201.
- Cosgrove DJ** (2000) *Nature* 407(6802):321-6.
- Cozzarín ME** (2001) Tesina de licenciatura: “Caracterización bioquímica y molecular de la UDP-glucosa proteína transglucosilasa involucrada en la síntesis de polisacáridos en plantas de interés agroeconómico”.
- Crawford KM, Zambryski PC** (1999) *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 382-387.
- Curá JA, Tolmasky DS, Lepek VC, Lerner LR, Salerno JC, Krisman CR** (1994) *Cell. Mol. Biol.* 40: 1007-1020.
- Cutler S, Somerville C** (1997) *Curr. Biol.* 7: R108-R111.
- Darvill JE, McNeil M, Darvill AG, Albersheim P** (1980) *Plant Physiol.* 66: 1135-1139.
- Delgado IJ, Zhaohong W, de Rocher A, Keegstra K, Raikhel NV** (1998) *Plant Physiol.* 116: 1339-1349.
- Delmer DP** (1987) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38:259-290.
- Delmer DP, Amor Y** (1995) *Plant Cell* 7: 987-1000.
- Delmer DP** (1999) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 245-276.
- Dhugga KS, Ulvskov P, Gallagher SR, Ray PM** (1991) *J. Biol. Chem.* 226: 21964-21977.
- Dhugga KS, Ray PM** (1994) *Plant Physiol.* 105: S-126.
- Dhugga KS, Tiwari SC, Ray PM** (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7679-7684.
- Dörmann P, Benning C** (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* 327: 27-34.
- Driouich A, Faye L, Stahelin A** (1993) *Trends Biochem. Sci.* 18: 210-2214.
- Dupree P, Sherrier DJ** (1998) *Biochem. Biophys. Acta* 1404: 259-270.
- Echeverria E, Boyer CD, Thomas PA, Liu K, Shannon JC** (1988) *Plant Physiol.* 86: 786-792.
- Echt CS, Chourey PS** (1985) *Plant Physiol.* 79: 530-536.
- Edwards ME, Dickinson CA, Chengappa S, Sidebottom C, Gidley MJ, Reid JS** (1999) *Plant J.* 19(6): 691-7.
- Epel B, Van Lent J, Cohen L, Kotlizky G, Katz A, Yahalom A** (1996) *Protoplasma* 191: 70-78.

- Faik A, Desveaux D, MacLachlan G** (2000) *Biochem. J.* 347: 857-864.
- Feingold DS, Avigad G** (1980) Sugar nucleotide transformation in plants. In: *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*, vol 3. Stumpf PK, Conn EE, eds. New York, Academic Press.
- Fincher GB, Stone BA** (1981) Metabolism of noncellulosic polysaccharides. In: *Tanner W, Loewus FA, eds. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series 13B.* Springer-Verlag, Berlin.
- Fitchette-Laine AC, Gomord V, Chekkafi A, Faye L** (1994) *Plant J.* 5: 673-682.
- Fujino K, Koda Y, Kikuta Y** (1995) *Plant Cell. Physiol.* 36: 891-895.
- García MJ** (1997) Tesina de Licenciatura: "Análisis de factores nutricionales y hormonales que afectan la tuberización *in vitro* de papa y su relación con la síntesis de almidón".
- Gastinel LN, Cambillau C, Bourne Y** (1999) *EMBO J.* 18: 3546-3557.
- Gibeaut DM, Carpita NC** (1994) *FASEB J.* 8: 904-915.
- Gibeaut DM** (2000) *Plant Physiol. Biochem.* 38: 69-80.
- Goldraij A, Miozzo MC, Curtino JA** (1993) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 30: 453-460.
- Gottlieb LD** (1982) *Science* 216: 373-380.
- Hannah LC, Giroux MJ, Boyer CD** (1993) *Sci. Horticult.* 55: 177-197.
- Hayashi T, Matsuda K** (1981) *J. Biol. Chem.* 256(21): 11117-22.
- Hayashi T, McLachlan G** (1986) In: *Cellulose: Structure, Modification and Hydrolysis.* Young RA, Rowell RM, eds. Wiley, New York.
- Hayashi T, Read SM, Bussell J, Thelen M, Lin FC y col.** (1987) *Plant Physiol.* 83: 1054-1062.
- Hayashi T** (1989) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 139-168.
- Hayashi T, Takeda T, Ogawa K, Mitsuishi Y** (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(6): 893-899.
- Ho LC** (1988) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 355-378.
- Huber JL, Huber SC** (1992) *Biochem. J.* 283(3): 877-82.
- Huber SC, Huber JL, Liao PC, Gage DA, McMichael P Jr., Chourey PS, Hannah LC, Koch K** (1996) *Plant Physiol.* 112: 793-802.

- Ingold E, Seitz H** (1986) *Z. Naturforsch* 41c: 407-409.
- Jackson SD** (1999) *Plant Physiol.* 119: 1-8.
- Jing W, DeAngelis PL** (2000) *Glycobiology* 10: 883-889.
- Kapitonov D, Yu RK** (1999) *Glycobiology* 9: 961-978.
- Kauss H** (1996) Callose synthesis. In: Smallwood M, Knox JP, Bowles DJ (eds.) *Membranes: specialized functions in plants*. BIOS Scientific, Oxford.
- Keestra K** (1999) *Science* 284: 1976-1979.
- Keller F, Frehner M, Wiemken A** (1988) *Plant Physiol.* 88: 239-241.
- Kimura S, Mitsui T, Matsouka T, Igaue I** (1992) *Plant Physiol. Biochem.* 30: 683-693.
- Kleczkowski L A** (1994) *Phytochemistry* 37: 1507-1515.
- Koch KE, Nolte KD, Duke ER, McCarty DR, Avigne WT** (1992) *Plant Cell* 4: 59-69.
- Koda Y , Kikuta Y, Tazaki H, Tsujino Y, Sakamura S, Yoshihara T** (1991) *Phytochemistry* 30: 1435-1438.
- Koda Y , Takahashi K, Kikuta Y, Greulich F, Toshima H, Ichihara A** (1996) *Phytochemistry* 41: 93-96.
- Kohorn BD** (2000) *Plant Physiol.* 124: 31-38.
- Krauss A** (1985) Interaction of nitrogen nutrition, phytohormones and tuberization. In PH Li, ed, *Potato Physiology*. Academic Press, London, pp 209-231.
- Kumar D, Wareing PF** (1972) *New Phytol.* 71: 639-648.
- Laemmli JK** (1970) *Nature* 227: 680-685.
- Lau JM, McNeil M, Darvill AG, Albersheim P** (1985) *Carbohydr. Res.* 137: 111-125.
- Lavintman N, Tandecarz JS, Carceller M, Mendiara S, Cardini CE** (1974) *Eur. J. Biochem.* 50: 145-155.
- Lawrence CH, Barker WG** (1963) *Am. Pot. J.* 40: 349-356.
- Levy S, MacLachlan G, Stahelin LA** (1997) *Plant J.* 11: 373-386.
- Loewus FA** (1982) *Recent Adv. Phytochem.* 17: 173-192.
- Lowry OH, Rosebruogh JJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265-271.

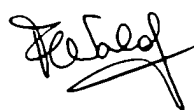
- Lynch MA, Stahelin LA (1992)** *J. Cell Biol.* 118: 467-479.
- Machackova I, Konstantinova TN, Seergeva LI, Lozhnikova VN, Golyanovskaya SA, Dudko ND, Eder J, Aksenova NP (1998)** *Physiol. Plant.* 102: 272-278.
- Marschner H, Sattelmacher B, Bangerth F (1984)** *Physiol. Plant.* 60: 16-20.
- Martin C, Smith AM (1995)** *Plant Cell* 7: 971-985.
- Martin RC, Mok MC, Mok DW (1999)** *Plant Physiol.* 120(2): 553-558.
- Matsuki T, Tazaki H, Fujimori T, Hogetsu T (1992)** *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 1329-1333.
- McCarty D, Shaw JR, Hannah LC (1986)** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9099-9103.
- McNeil M, Darvill AG, Fry SC, Albersheim P (1984)** *Ann. Rev. Biochem.* 53: 625-663.
- Moore PJ, Swords KM, Lynch MA, Stahelin LA (1991)** *J. Cell Biol.* 112: 589-602.
- Moreno S, Tandecarz JS (1982)** *FEBS Letters* 139: 313-316.
- Moreno S, Cardini CE, Tandecarz JS (1986)** *Eur. J. Biochem.* 157: 539-545.
- Moreno S, Cardini CE, Tandecarz JS (1987)** *Eur. J. Biochem.* 162: 609-614.
- Moreno S, Tandecarz JS (1996)** *Cell. Mol. Biol.* 42: 637-643.
- Morris ER, Gidley MJ, Murray EJ, Powell DA, Rees DA (1980)** *Int. J. Biol. Macromol.* 2: 327-330.
- Muller-Rober B, Sonnewald U, Willmitzer L (1992)** *EMBO J.* 11: 1229-1238.
- Muñoz P, Norambuena L, Orellana A (1996)** *Plant Physiol.* 112: 1585-1594.
- Murashige T y Skoog F (1962)** *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- Myers AM, Morell MK, James MG, Ball SG (2000)** *Plant Physiol.* 122: 989-997.
- Neckelmann G., Orellana A (1998)** *Plant Physiol.* 117: 1007-1014.
- Nelson OE, Rines HW (1962)** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9: 297-300.
- Nguyen-Quoc B, Krivitzky M, Huber SC, Lecharny A (1990)** *Plant Physiol.* 94: 516-523.
- Nishimura M, Beevers H (1979)** *Plant Physiol.* 64: 31-37.

- O'Neill M, Albersheim P, Darvill A (1990)** The pectic polysaccharides of primary cell walls. In: Dey PM, Harborne JB, eds. *Methods in Plant Biochemistry*, vol 2. Academic Press, London.
- Orellana A, Neckelmann G, Norambuena L (1997)** *Plant Physiol.* 114: 99-107.
- Paulson JC, Colley KJ (1989)** *J. Biol. Chem.* 264: 17615-17618.
- Pear J, Kawagoe Y, Schreckengost W, Delmer D, Stalker D (1996)** *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 93: 12637-12642.
- Perrin R, DeRocher A, Bar-Peled M, Xeng W, Norambuena L, Orellana A, Raikhel N y Saxena I, Brown M, Fevre M Geremia R, Henrissat B (1995)** *J. Bacteriol.* 177: 1419-1424.
- Perrin RM, DeRocher AE, Bar-Peled M, Zeng W, Norambuena L, Orellana A, Raikhel NV, Keegstra K (1999)** *Science* 284(5422): 1976-9.
- Pitcher J, Smythe C, Cohen P (1988)** *Eur. J. Biochem.* 176: 391-395.
- Prat S, Frommer WB, Höfgen R, Keil M, Kobmann J, Köster-Töpfer M, Liu XJ, Müller B, Peña-Cortés H, Rocha-Sosa M, Sánchez-Serrano JJ, Sonnewald U, Willmitzer L (1990)** *FEBS Letters* 268(2): 334-338.
- Preiss J, Danner S, Summers PS, Morell M, Barton CR, Yang L, Nieder M (1990)** *Plant Physiol.* 92: 881-885.
- Quentmeier H, Ingold E, Seitz HU (1987)** *Planta* 171: 483-488.
- Ray PM (1980)** *Biochem. Biophys. Acta* 629: 431-444.
- Read SM, Thelen M, Delmer DP (1986)** In: *Proceedings of the 4th Cell Wall Meeting*. Vian B, Reis D, Goldberg R, eds. University Pierre et Marie Curie Press, Paris.
- Rédei GP (1982)** *Genetics*, Macmillan Publishing Co., New York, USA.
- Reid JSG (2000)** *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 512-516.
- Reiter WD, Chapple CCS, Somerville CR (1993)** *Science* 261: 1032-1035.
- Reiter WD, Chapple C, Somerville CR (1997)** *Plant J.* 12(2): 335-45.
- Richmond T (2000)** *Genome Biology* 1(4): 3001.1-3001.
- Richmond TA, Somerville CR (2000)** *Plant Physiol.* 124(2): 495-8.
- Robards AW, Lucas WJ (1990)** *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 369-419.
- Robertson D, McCormack BA, Bolwell GP (1995)** *Biochem J.* 306 (3): 745-50.

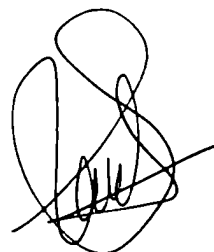
- Rothschild A, Tandecarz JS (1994) Plant Sci. 97: 141-148.**
- Rothschild A, Wald FA, Bocca SN, Tandecarz JS (1996) Cell. Mol. Biol. 42: 645-651.**
- Ruan YL, Chourey PS, Delmer DP, Perez-Grau L (1997) Plant Physiol. 115: 375-385.**
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *In*: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.**
- Saxena IM, Lin FC, Brown RM Jr (1990) Plant Mol. Biol. 15: 673-683.**
- Saxena IM, Kudlicka K, Okuda K, Brown RM Jr (1994) J. Bacteriol. 176(18): 5735-52**
- Saxena IM, Brown RM Jr, Fevre M, Geremia RA, Henrissat B (1995) J. Bacteriol. 177: 1419-1424.**
- Saxena IM, Brown RM Jr (1997) Cellulose 4: 33-49.**
- Saxena IM, Brown RM Jr (1999) Trends Plant Sci. 4(1): 6-7.**
- Saxena IM, Brown RM Jr (2000) Curr. Opin. Plant Biol. 3(6): 523-31.**
- Seitz B, Klos C, Wurm M, Tenhaken R (2000) Plant J. 21(6): 537-46.**
- Shaw JR, Ferl RJ, Baier J, St Clair D, Carlson C, McCarty DR, Hannah LC (1994) Plant Physiol. 106: 1659-1665.**
- Sherrier DJ, VandenBosch KA (1994) Plant J. 5: 185-195.**
- Shibaoka H (1993) Aust. J. Plant Physiol. 20: 461-470.**
- Short M, Fernandez J, Sorge J, Huse W (1988) Nucl. Acids Res. 16: 7583-7600.**
- Showalter AM (1993) Plant Cell 5: 9-23.**
- Shure M, Wessler S, Fedoroff N (1983) Cell 35(1): 225-233.**
- Singh DG, Lomako J, Lomako WM, Whelan WJ, Meyer HE, Serwe M, Metzger JW (1995) FEBS Letters 376: 61-64.**
- Sinnot ML (1990) Chem. Rev. 90: 1171-1202.**
- Stevenson TT, Darvill AG, Albersheim P (1988) Carbohydr. Res. 182: 207-226.**
- Stone BA, Clarke AE (1992) The Biology of (1-3)- β -Glucans. La Trobe, Australia: La Trobe University Press.**
- Stone JM, Walker JC. (1995) Plant Physiol. 108(2): 451-457.**
- Su JC, Preiss J (1978) Plant Physiol. 61: 389-393.**

- Takahara H, Matsuda K (1977)** *J. Biochem.* 81: 1587-1594.
- Talbott LD, Ray PM (1992)** *Plant Physiol.* 92: 357-368.
- Tandecarz JS, Cardini CE (1978)** *Biochem. Biophys. Acta* 543: 423-429.
- Tandecarz JS, Cardini CE (1979)** *Plant Sci. Lett.* 1: 151-158.
- Tandecarz JS, Szalai EN, Cardini CE (1982)** *An. Asoc. Quím. Argentina* 70: 395-404.
- Tandecarz JS, Ardila FJ, Bocca SN, Moreno S, Rothschild A (1995)** In: *Current Topics in Plant Physiology*. Pontis HG, Salerno GL, Echeverría E, eds. Amer. Soc. Plant Physiol., Rockville.
- Tandecarz JS, Bocca SN, Moreno S, Rothschild A, Wald FA (1996a)** Recent advances in the understanding of the initiation of starch biosynthesis. *The Biogenesis of Storage Polysaccharides. A Symposium of the Division of Carbohydrate Chemistry, American Chemical Society: Orlando, FL, Agosto.*
- Tandecarz JS, Bocca SN, Moreno S, Rothschild A, Wald FA, (1996b)** Purification and characterization of the potato tuber UDP-Glucose: Protein Transglucosylase involved in early steps of starch biosynthesis initiation. *Cellular and Molecular Biology 2nd World Congress. Ottawa, Canada, September.*
- Tenhaken R, Thulke O (1996)** *Plant Physiol.* 112: 1127-1134.
- Towbin J, Staehelin T, Gordon J (1979)** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Trevelyan WE, Procter DP, Harrison JS (1950)** *Nature* 166: 444-445.
- Tsai CY, Nelson OE (1966)** *Science* 151(708): 341-3.
- Turgeon R (1989)** *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 119-138.
- Turner SR, Somerville CR (1997)** *Plant Cell* 9(5): 689-701.
- Ünlügil UM, Rini JM (2000)** *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 510-517.
- Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J (1999)** *Essentials of Glycobiology*, published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, The Consortium of Glycobiology eds., La Jolla, CA, USA.
- Varner JE, Lin LS (1989)** *Cell* 56(2): 231-9.
- Vreugdenhil D, Struik PC (1989)** *Physiol. Plant.* 75: 525-531.
- Wald FA, Rothschild A, Moreno S, Tandecarz JS (1998)** *Cell. Mol. Biol.* 44: 397-406.

- Wald FA, Kissen R, Bocca SN, Harfi I, Du Jardin P, Moreno S** (1999) "Expression of UDP: glucose protein transglucosylase mRNA in potato tissues." International Symposium on Plant Genetic Engineering, La Habana, Cuba.
- Waldron KW, Brett CT** (1985) In: Biochemistry of Plant Cell Walls. Brett CT, Hillman JR, eds. Cambridge University Press, Cambridge.
- Winter H, Huber JL, Huber SC** (1997) FEBS Letters 420: 151-155.
- Winter H, Huber JL, Huber SC** (1998) FEBS Letters 430(3): 205-8.
- Wright A y Robbins PW** (1965) Biochem. Biophys. Acta 104: 594-596.
- Wulff C, Norambuena L, Orellana A** (2000) Plant Physiol. 122: 867-877.
- Xu X, van Lammeren AA, Vermeer E, Vreugdenhil D** (1998) Plant Physiol. 117: 575-584.
- Yanisch-Perron C, Vieira J and Messing J** (1985) Gene 33: 103.
- York WS, Darvill AG, McNeil M, Albersheim P** (1985) Carbohydr. Res. 138: 109-126.
- Zablackis E, Huang J, Muller B, Darvill AG, Albersheim P** (1995) Plant Physiol. 107(4): 1129-38.
- Zhang GF, Stahelin LA** (1992) Plant Physiol. 99: 1070-1083.
- Zhang XQ, Chollet R** (1997) FEBS Letters 410: 126-130.
- Zhang XQ, Lund AA, Sarath G, Cerny RL, Roberts DM, Chollet R** (1999) Arch. Biochem. Biophys. 371(1): 70-82.



Lic. Flavia A. Wald



Dra. SILVIA MORENO