

## Tesis Doctoral

# Estudio de la función de los polipéptidos reversiblemente glicosilados (Reversibly Glycosylated Polypeptide) en plantas de interés agro-económico

De Pino, Verónica

2010

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

De Pino, Verónica. (2010). Estudio de la función de los polipéptidos reversiblemente glicosilados (Reversibly Glycosylated Polypeptide) en plantas de interés agro-económico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

De Pino, Verónica. "Estudio de la función de los polipéptidos reversiblemente glicosilados (Reversibly Glycosylated Polypeptide) en plantas de interés agro-económico". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**Universidad de Buenos Aires**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**“Estudio de la función de los polipéptidos reversiblemente glicosilados (Reversibly Glycosylated Polypeptide) en plantas de interés agro-económico”.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Lic. Verónica De Pino**

**Directora: Dra. Silvia Moreno**  
**Consejero de estudios: Dr. Omar A. Coso**

**Fundación Instituto Leloir**

**Buenos Aires – 2010**

## **“Estudio de la función de los polipéptidos reversiblemente glicosilados en plantas de interés agro-económico”.**

### ***Resumen***

Las plantas explotan una variedad de mecanismos para regular la producción y el acceso a los azúcares en respuesta al desarrollo, al ambiente, y al estado metabólico. La síntesis de polisacáridos a partir de fotosintatos, como la sacarosa, es un proceso muy regulado en el que están involucradas invertasas y glicosiltransferasas. La estructura y destino de los polisacáridos es bien conocida, pero el mecanismo de biosíntesis particularmente la síntesis *de novo* y las enzimas que transfieren los azúcares siguen siendo un enigma a resolver. En este trabajo de tesis nos focalizaremos en unas proteínas muy particulares que fueron descubiertas intentando identificar componentes de la pared celular. Estas proteínas se denominan RGP, por “reversibly glycosylated polypeptide”, y tienen capacidad de autoglicosilarse, a partir de UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-Xyl y UDP-Ara dando como producto la proteína glicosilada y regenerando el nucleótido azúcar. Las RGPs están presentes en plantas superiores tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, pero están ausentes en otras especies, lo que indicaría que su función está muy conservada en las plantas, aunque se sabe poco de su rol fisiológico (Moreno & Tandecarz 1982; Moreno et al. 1986; Delgado et al. 1998; Bocca et al. 1999). Un análisis filogenético (Wald et al. 2003) muestra que hay dos clases, clase 1, la mayoría de las RGPs pertenece a esta clase, que es muy activa, y la clase 2, a la cual no se le asoció actividad, pero sí capacidad de interactuar con la clase 1. Se encontró una multiplicidad de isoformas en todas las especies donde está presente, aspecto asociado con su capacidad de formar homo y heterodímeros. Anteriormente se demostró que la expresión de la RGP se produce en los tejidos donde hay activa síntesis de pared celular, durante este trabajo mostramos que la expresión esta modulada por el desarrollo, la inducción hormonal y el estrés, clarificando el rol fisiológico de la RGP en la remodelación/reconstrucción *de novo* de la pared celular vegetal, en donde uno de los caminos metabólicos claves en dicho proceso de la célula vegetal es la síntesis de polisacáridos.

**Palabras clave:** glicosiltransferasa, Golgi, hormonas vegetales, *Oryza sativa*, polisacáridos, reversibly glycosylated polypeptide, *Solanum tuberosum*, UDP-azúcares.

## **“Functional study of Reversibly Glycosylated Polypeptides in plants of agro-economic interest”**

### ***Abstract***

Plants exploit diversity of mechanisms to regulate the production and the access to sugars in response to developmental cues, the environment and to the metabolic state. Polysaccharide synthesis upon photosynthates as sucrose is a highly regulated process, in which invertases and glycosyltransferases are implicated. Although the structure and destination of polysaccharides is well established, mechanisms of *de novo* synthesis as well as the identification of glycosyltransferases are yet an enigma to be resolved. This work is focused on a group of proteins called reversibly glycosylated polypeptide, RGP which have the unique capability to perform self-glycosylation upon incubation with UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-Xyl and UDP-Ara given as product the glycosylated protein and the regeneration of the nucleotide diphosphate. RGPs are present in higher plants; in monocotyledons as well as in dicotyledons, indicating that their functions is highly conserved, although little is known about their physiological role (Moreno & Tandecarz 1982; Moreno et al. 1986; Delgado et al. 1998; Bocca et al. 1999). A phylogenetic analysis of RGP (Wald et al. 2003) showed that there are two classes, class 1, the majority of RGP belongs to this class, which is highly active, and class 2, which is inactive but it has the capability to interact with the class 1 forming heteromultimers. It was found a multiplicity of forms of RGP in all species; this fact is associated with its ability to form homo and heterodimers. Previously, it was found that the expression of the RGP is particularly relevant in tissues where an active synthesis of cell wall take place. Here we demonstrate that the expression of the RGP is modulated by development, elongating involved hormones, germination as well by stress, clarifying the physiological role of the RGP in the remodeling/*de novo* synthesis of the plant cell wall, where the synthesis of polysaccharide is a key metabolic pathway.

**Key words:** glycosyltransferase, Golgi, *Oryza sativa*, plant hormones, polysaccharide reversibly glycosylated polypeptide, *Solanum tuberosum*, UDP-sugars.

*“Merced a su capacidad heurística, pese a las predeterminaciones genéticas y otros condicionamientos, es probable que el ser humano (valga la aparente paradoja de la frase) esté condenado a ser libre de las limitaciones que el medio le impone”*  
*JP. Sartre*

Para Julián, Bruno y Coqui, los soles de mi vida,  
y especialmente para Rina, inspiradora constante.

## ***Agradecimientos***

*A la Dra. Silvia Moreno por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en su laboratorio, por la paciencia, la dedicación y el afecto de estos años.*

*A la Fundación Instituto Leloir y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por permitirme formarme en instituciones de excelencia académica.*

*Al CONICET por estos años de financiamiento económico.*

*A mis compañeros de laboratorio por todas las horas de trabajo compartidas y todos los mates: Verónica Barni, Mauro Gaya, Diego Grinman, Adriana Ojeda, y Vicky Repetto.*

*A todos mis amigos de la FIL, especialmente a Naty Ainciart, Naty Bruera, Giselle Gherzi, Mariángeles “Meriyein” Gonzalez, Rodri Pagano, Maxi López Medus y Lucas Landolfo.*

*A Carolina Carrillo, por su paciencia, cariño y enseñanza.*

*A Martin Arán, Leonardo Alonso, Ángeles Heer, Sabrina Iñigo, Julio Caramelo y Vanesa Zylberman por la ayuda y la buena onda*

*Al Dr. Pablo Cerdán y al Dr. Ricardo Wolosiuk, por la ayuda prestada y los años de seguimiento.*

*A Marta Bravo, Susana Raffo, Edith Trejo y Soledad Malori, por la indispensable ayuda técnica de todos estos años.*

*A Mónica Perez, Fátima Orellana, Marcos Sciannamea, Juan Pocarobba por la constante ayuda bibliográfica.*

*A Carina Castillo y a Diego Alvarez del droguero por su amabilidad y buen humor*

*Al personal de Soporte por la paciencia y la buena onda.*

*A todo el personal de apoyo, mantenimiento y administrativo de la FIL, especialmente a Lili, Dora, Claudia, Silvia, Silvana, Pancho y Hugo.*

*A Leandro por todo su amor y compañía.*

*A toda mi familia, por su apoyo incondicional e inmenso amor.*

## ***Abreviaturas***

ADP	adenosina 5'-difosfato
ATP	adenosina 5'-trifosfato
cADN	ácido desoxirribonucleico complementario
cpm	cuentas por minuto
CTAB	cetiltrimetilamonio
DEAE	dietilaminoetil
EDTA	ácido etilen-diamino-tetra-acético
FPLC	cromatografía líquida de rápida resolución
HEPES	ácido N-2-hdroximetilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
mARN	ácido ribonucleico mensajero
MES	ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
Pi	fosfato inorgánico
PMSF	parametilsulfonilfluoruro
AtRGP	<i>Arabidopsis thaliana</i> reversibly glycosylated polypeptide
OsRGP	<i>Oryza sativa</i> reversibly glycosylated polypeptide
PsRGP	<i>Pisum sativum</i> reversibly glycosylated polypeptide
StRGP	<i>Solanum tuberosum</i> reversibly glycosylated polypeptide
SDS	dodecil sulfato de sodio
TBS	buffer Tris salino
TCA	ácido tricloroacético
TFMS	ácido trifluorometanosulfónico
Tris	tris (hidroximetil)-aminometano
UDP	uridina 5'-difosfato
UDP-Gal	uridina 5'-difosfo-galactosa
UDP-Glc	uridina 5'-difosfo-glucosa
UDP-Xil	uridina 5'-difosfo-xilosa
UPTG	UDP-glucosa: proteína transglucosilasa

**Introducción**

1.-Las Plantas	1
2.- Pared Celular	6
2.1.- Generalidades de la pared celular	6
2.2.- Formación y Crecimiento de la pared celular	7
2.3.- Composición de la Pared Celular	8
3.-Funciones de los principales polisacáridos estructurales	14
4.- Lugar de síntesis de los polisacáridos de pared celular	15
5.- Actividades enzimáticas involucradas en la biosíntesis de polisacáridos estructurales	19
6.- Síntesis localización y transporte de los precursores de la biosíntesis de polisacáridos estructurales	20
7.- Identificación de las enzimas involucradas en la biosíntesis de polisacáridos estructurales	22
8.- Modelos Propuestos para la síntesis de pared celular	23
9.- Glicosiltransferasas	25
10.- Sistemas modelo de estudio: Plantas de interés agroeconómico	27
11.- Las Glicosiltransferasas RGP	29
12.- Antecedentes del tema de trabajo	30

**Objetivos 36**

**Materiales y Métodos 38**

1.-Sustratos radioactivos	38
2.-Material vegetal	38
3.-Fuente de RGP	39
4.-Protocolos de purificación	40
5.-Determinación de actividades enzimáticas	41
6.-Enzimas auxiliares	42
7.-Técnicas electroforéticas	43
8.-Técnicas inmunológicas	44
9.-Determinación de proteínas	45
10.-Northern blot	45

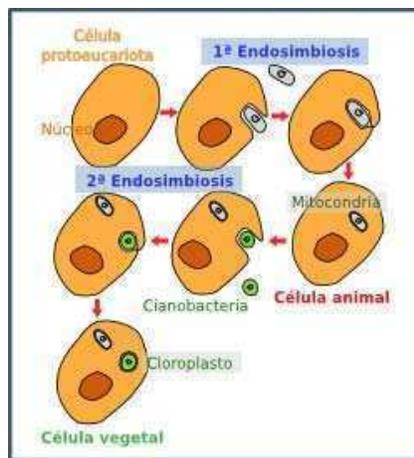
11.-Aislamiento de ADN genómico de plantas de arroz	46
12.-Preparación de sondas específicas	46
13.-Preparaciones de plásmidos	47
14. Expresión de la proteína recombinante	47
15. Técnicas Espectroscopicas	48
<b>Resultados</b>	<b>49</b>
<b>Capítulo 1-Estudios del mecanismo de reacción de la proteína RGP</b>	<b>49</b>
1- Análisis de la relación entre estructura y función de la proteína RGP	49
1.1-La fuerza iónica modula la glicosilación y la reversibilidad de la glicosilación de la RGP	49
1.2- La concentración de proteínas afecta la glicosilación	52
1.3- La proteína RGP es parte de complejos que cambian con el estado de glucosilación	54
1.4- La fosforilación de la proteína RGP modula tanto en tamaño como la actividad de autoglicosilación	57
1.5.-La estructura de la StRGP	63
1.5.1- los complejos de la StRGP también estarían estabilizados por puentes disulfuro	63
1.5.2- La proteína StRGP tiene una estructura secundaria en la que predominan las hélices alfa	65
<b>Capítulo 2-Expresión de la RGP- Regulación de la proteína RGP durante el desarrollo de la planta</b>	<b>74</b>
2.1- El desarrollo modula el estado de oligomerización de la OsRGP (Oriza sativa RGP).....	74
2.2.- El estado fisiológico de la planta modula la oligomerización de la OsRGP	78
2.3. La actividad de la OsRGP también esta regulada por el desarrollo	80
2.4. El agregado de fosfatasa alcalina modula diferencialmente la actividad de OsRGP dependiendo del desarrollo	82
2.5-Estudio de la expresión de la OsRGP a nivel transcripcional también depende del desarrollo	85
2.6.-La expresión de la OsRGP no solo esta regulada por el desarrollo sino también por hormonas	87
2.6.1.-Las hormonas involucradas en elongación inducen la OsRGP	87
2.6.2- Las hormonas involucradas en la germinación inducen la OsRGP	89
2.7- Las situaciones que movilizan azúcares dentro de la planta también inducen la OsRGP	90
<b>Capitulo 3-Estudio de la localización subcelular de la proteína RGP</b>	<b>92</b>

3.1. La proteína RGP esta asociada a las vesículas de Golgi como parte de complejos proteicos de gran peso molecular	92
3.2. Los complejos asociados al aparato de Golgi contienen RGP monoméricas.	93
<b>Discusión</b>	<b>96</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>107</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>109</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>110</b>

# *Introducción*

## 1.-Las Plantas

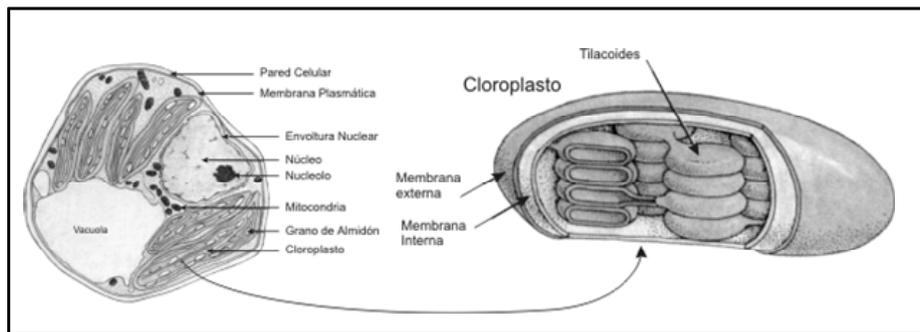
Las plantas son organismos eucariotas sésiles, capaces de generar su propio alimento a partir de elementos inorgánicos tales como el agua y la luz, mediante un proceso llamado fotosíntesis, en el cual el carbono del aire es transformado en alimento utilizando la energía solar y el agua. Se estima que la fotosíntesis oxigénica surgió hace unos 2 billones de años, a partir de un organismo procariota unicelular capaz de utilizar agua como dador de electrones, mediante la elevación de su potencial de reducción utilizando fotones provenientes del sol. Esta capacidad sería luego transmitida por endosimbiosis a una célula eucariota primitiva capaz de utilizar el oxígeno (Figura 1). Esta transferencia originó la primera célula “proto-vegetal” ancestral, y esta a su vez dio lugar al primer metazoario capaz de realizar fotosíntesis oxigénica. Aparecían así las primeras plantas sobre la Tierra.



**Figura 1- Hipótesis propuesta para explicar la aparición de las mitocondrias y los cloroplastos de las células eucariotas.** Ocurrió mediante dos procesos independientes de endosimbiosis de las células procariotas en las células protoeucariotas. Las células procariotas que se convirtieron en cloroplastos se cree que fueron similares a las cianobacterias actuales. De [webs.uvigo.es/~5-células/1-endosimbiosis.php](https://webs.uvigo.es/~5-células/1-endosimbiosis.php)

Las células vegetales se caracterizan por la presencia de una abundante cantidad de organelas verdes llamadas cloroplastos (Figura 2). Los cloroplastos, son orgánulos rodeados por dos membranas, capaces de coleccionar la energía electromagnética derivada de la luz solar y de convertirla en energía química mediante el proceso de la fotosíntesis, utilizando después dicha energía para sintetizar azúcares a partir del CO<sub>2</sub> atmosférico.

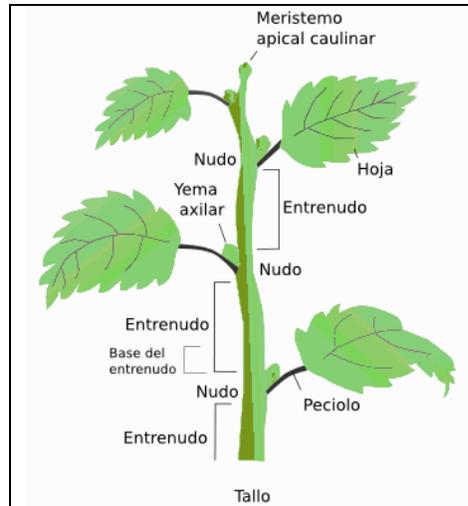
Otra característica típica de las células vegetales es la presencia de una gran vacuola central denominada “tonoplasto”, que constituye un depósito de agua y de diversas sustancias químicas, tanto de desecho como de almacenamiento. La presión ejercida por el agua de la vacuola se denomina presión de turgencia contribuye a mantener la rigidez de la célula, debido a esta presión el citoplasma y el núcleo de la célula vegetal adulta se observan adosados a las paredes celulares. La pérdida del agua resulta en el fenómeno denominado plasmólisis, por el cual la membrana plasmática se separa de la pared y condensa en citoplasma en el centro físico de la célula. Otra característica saliente es la pared celular, que confiere forma a la célula, cubriéndola a modo de exoesqueleto, y proporcionándole textura a cada tejido, siendo el componente que le otorga protección y sostén a la planta.



**Figura 2- Esquema de una célula vegetal.** Mostrando los cloroplastos y la gran vacuola central. Fuente: <http://www.genomasur.com/lecturas/Guia01.htm>

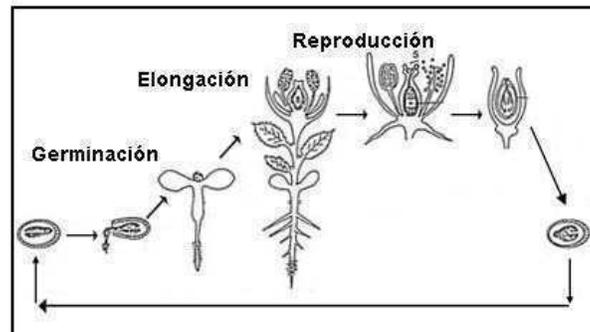
Las plantas al igual que los animales, están compuestas por células, pero las plantas a diferencia de los animales, se caracterizan por su crecimiento ilimitado, que se produce por el agregado secuencial de módulos, estos módulos se originan en pequeños bolsillos de células en división llamados meristemas (Figura 3). Las células meristemáticas están densamente empaquetadas 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. Los meristemas están compuestos por células no diferenciadas que se dividen activamente, también llamadas células totipotentes por su habilidad de dar lugar a todos los tejidos vegetales. Las células meristemáticas son pequeñas, poliédricas, más o menos equidimensionales. En ellas, el citoplasma ocupa la mayor parte de volumen celular ya que las vacuolas son muy pequeñas. Las células meristemáticas no contienen cloroplastos ni ningún otro plástido

diferenciado, la pared celular de las células meristemáticas es delgada y carece de pared secundaria.



**Figura 3-. Estructura modular de las plantas superiores.** Cada módulo consiste en un tallo, una hoja y una yema que contiene un centro potencial de crecimiento (el meristema). La yema se forma en cada punto de ramificación, donde salen las hojas. La actividad continua del meristema apical da lugar al crecimiento ilimitado originando cada módulo secuencialmente.

El crecimiento de las plantas depende fundamentalmente de la división, diferenciación y elongación de las células meristemáticas. Y estos procesos dependen del entorno donde está la planta, y de su habilidad de producir, transportar o consumir los azúcares producidos por fotosíntesis. Estos azúcares son importantes tanto como fuente de energía como también para información, sostén y estructura. Dado que las plantas son sésiles, la generación del alimento y el crecimiento, dependen de su habilidad para adaptarse e interactuar con el medio ambiente. Esto implicó que las plantas generaran una gran variedad de mecanismos para regular la producción y el acceso a los azúcares en respuesta a diversos factores: cambios en el ambiente, señales de desarrollo, estado metabólico. Este sensado de condiciones internas y externas les permite tomar decisiones. Entonces, la supervivencia de una planta implica que pueda adaptarse a las condiciones cambiantes del entorno para que sus células puedan seguir dividiéndose y generando alimento, que se almacena hasta que la planta se reproduce, y forma frutos y semillas, completando así el ciclo de vida (Figura 4).



**Figura 4- Esquema del ciclo de vida de una planta.-** La planta germina, crece, se desarrolla, se reproduce y vuelve a dar frutos.

Aunque la clasificación de las plantas varió mucho con el surgimiento de la biología molecular y la capacidad de estudiar polimorfismos en el ADN, los taxones más importantes se conservaron. La antigua división entre Angiospermas y Gimnospermas sigue vigente aunque algunos ensayos muestran que las angiospermas tendrían un ancestro gimnospermático (Raven, Evert, Eichhorn, 1992). Las gimnospermas son plantas leñosas, casi siempre arbóreas, y se caracterizan por tener la semilla desnuda, mientras que las angiospermas, tienen la semilla encerrada en el ovario, pueden ser leñosas o herbáceas y se caracterizan por tener flores. Si bien la presencia de flores es un rasgo saliente de las angiospermas, esta característica probablemente evolucionó a partir de una gimnosperma ahora extinguida, con piñas polinizadas por insectos, que combinaban partes reproductivas masculinas y femeninas. Casi todas las gimnospermas vivientes tienen polinización por el viento, aunque algunos grupos fósiles y supervivientes aportan indicios de polinización por insectos. Las angiospermas constituyen la forma de vida vegetal dominante, debido a que la aparición de la flor perfeccionó el proceso de reproducción. El desarrollo del carpelo que encierra el óvulo es una adaptación para proteger a éste y a la semilla en desarrollo de la predación (aunque los insectos favorecen la polinización, también devoran los óvulos), de las influencias nocivas del medio, como la desecación, y también ha permitido reducir el tamaño del óvulo.

Las angiospermas son la fuente de la mayor parte de los alimentos del ser humano y de los animales, así como de muchas materias primas y productos naturales. Pertenecen a este grupo casi todas las plantas arbustivas y herbáceas, la mayor parte de los árboles, salvo pinos y otras coníferas, también suculentas, epifitas y acuáticas. Las

plantas de flor han ocupado casi todos los nichos ecológicos y dominan la mayor parte de los paisajes naturales. Aproximadamente las dos terceras partes de todas las especies son propias de los trópicos, pero las actividades humanas las están exterminando a gran velocidad. Sólo un millar de especies tienen importancia económica digna de consideración, y el grueso de la alimentación mundial procede de sólo quince especies. Se presentan dos grandes grupos principales de plantas con flores: Monocotiledóneas y Dicotiledóneas.

La diferencia fundamental entre mono y dicotiledóneas, que le da el nombre a cada grupo, es la cantidad de cotiledones presentes en la semilla. Los cotiledones son las hojas primordiales constitutivas de la semilla y las reservas nutritivas del embrión. Las semillas de las plantas monocotiledóneas implican un único cotiledón (trigo, maíz); las de las dicotiledóneas implican dos (poroto, castaño). Presentan además otras diferencias estructurales, las dicotiledóneas pueden poseer un tallo herbáceo, arbustivo, trepador o leñoso, con haces conductores dispuestos en un círculo en sección transversal del tallo. Los haces conductores son abiertos permitiendo un crecimiento secundario en grosor. Las monocotiledóneas tienen tallos herbáceos, sin crecimiento secundario típico, dispuestos, en varios círculos en sección transversal del tallo. Los haces vasculares del tallo son cerrados generalmente dispersos en 2 o más anillos. Tienen otras diferencias anatómicas, la raíz de las dicotiledóneas son pivotantes, las hojas son pecioladas, con innervación reticulada y a menudo compuestas, las piezas florales dispuestas en múltiplos de 4 ó 5 y formadas por cáliz y corola. Mientras que las monocotiledóneas tienen hojas típicamente lanceoladas, simples, con lámina acintada de innervación paralela y piezas florales en múltiplos de 3 con cáliz y corola indistinguibles.

Las monocotiledóneas y dicotiledóneas presentan también otras diferencias sobre todo en la composición de azúcares de la pared celular y la deposición de pared celular secundaria. Por ejemplo, las hemicelulosas de las dicotiledóneas y las monocotiledóneas gramíneas (cereales) son distintas. Las dicotiledóneas tienen grandes cantidades de pectinas y xiloglucanos, los cereales contienen poca cantidad de estos polisacáridos, pero grandes cantidades de glucuronoarabinosilanos, así como también un polímero particular  $\beta$ -(1-3)(1-4)-D-glucanos (también conocido como glucano de unión mixta) (Carpita & Gibeau 1993; Carpita 1996).

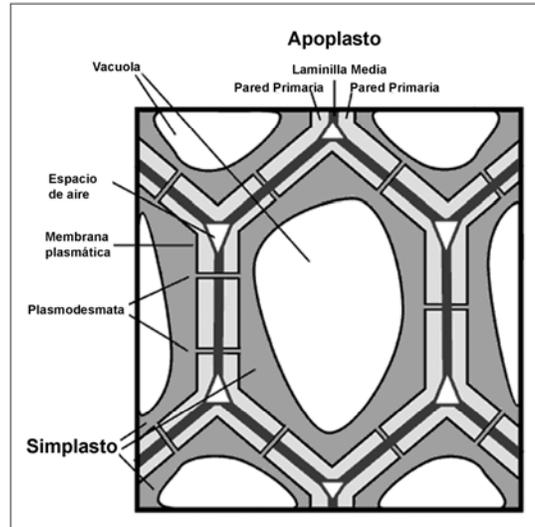
## **2.-Pared celular**

### **2.1-Generalidades de la pared celular**

Las plantas se rodean de una cubierta polisacáridica, llamada pared celular. La pared celular vegetal es un órgano complejo que no solo da soporte y estructura a los tejidos vegetales, sino que también tiene la capacidad de condicionar el desarrollo de las células interviniendo en procesos tales como crecimiento y diferenciación celular, comunicación intercelular, movimiento de agua y defensa (Cosgrove 2005). La pared celular se encuentra entre la laminilla media, y la membrana plasmática como se puede ver en la Figura 5. Cada una de estas capas que envuelven a la célula vegetal tiene una composición característica y se forma en un momento dado del desarrollo.

La pared celular puede ser primaria o secundaria. La pared primaria es una matriz extracelular flexible que es depositada mientras la célula está creciendo, está compuesta mayoritariamente por celulosa, hemicelulosas, pectinas y algunas proteínas estructurales. La pared primaria puede ser tipo I, compuesta mayoritariamente por celulosa, xiloglucanos y pectinas, o tipo II, compuesta por celulosa, arabinosilanos y glucanos, y es típica de las gramíneas. La pared celular secundaria es depositada cuando la célula deja de crecer, sólo cuando se necesita gran resistencia mecánica y refuerzo estructural. La pared secundaria está generalmente compuesta de celulosa y lignina, (polímero del fenilpropano), y de otras moléculas que varían según la célula (cutina, suberina, sales minerales, etc.). La pared secundaria se organiza en capas, en las cuales las microfibrillas se disponen de forma ordenada en varios planos. En cada capa las microfibrillas son paralelas, cambiando la orientación de las mismas de una capa a la siguiente.

La laminilla media es una capa delgada que conecta dos células adyacentes y está compuesta fundamentalmente por pectinas. La laminilla media y la pared celular forman el apoplasto en el tejido en crecimiento. El simplasto es una fase continua de citoplasma dada por los plasmodesmos, que son prolongaciones que conectan célula con célula, y se forman cuando se forma la pared celular primaria, durante la citocinesis (Figura 5).



**Figura 5- Esquema de la pared celular y la laminilla media.** La pared se deposita sobre la laminilla media, que separa la membrana plasmática de la pared celular.

## **2.2.-Formación y Crecimiento de la Pared Celular**

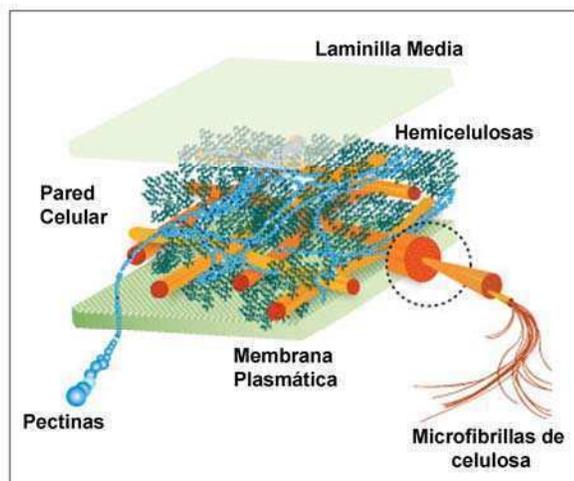
La pared primaria se crea en las células cuando está terminando su división.

Durante la interfase se genera la banda preprófásica, que es un anillo de microtúbulos corticales, y va a indicarle a la célula por dónde tiene que dividirse. Esta estructura desaparece cuando la célula avanza en el proceso de división. Durante la telofase, se genera el fragmoplasto, que es un sistema de fibrillas en forma de barril que están formados por los microtubulos polares del huso mitótico, y sirve de guía para las vesículas de secreción provenientes del aparato de Golgi, que traen pectinas y hemicelulosas, y van formando la placa celular, la cual crece desde el interior de la célula en división, hasta ponerse en contacto con las paredes laterales (Raven, Evert, Eichhorn 1992). Estas vesículas secretorias también contribuyen a construir las membranas y las laminillas medias de las células en división a cada lado de la placa. Los plasmodesmos se forman en ese momento como segmentos del retículo endoplásmico tubular capturados durante la fusión de las vesículas.

Siguiendo a la formación de la placa celular cada protoplasto deposita una pared primaria y una laminilla media. Además cada célula hija deposita una nueva capa de pared alrededor de todo el protoplasto ya que la pared proveniente de la célula madre se estira durante el crecimiento de las células hijas, debilitándose. La pared primaria está adaptada al crecimiento celular, las microfibrillas se deslizan entre ellas produciéndose

una separación longitudinal mientras el protoplasto hace presión sobre ellas. Una vez formada, la pared celular crece por deposición de capas sucesivas de celulosa. En cada capa, la orientación de las microfibrillas de celulosa está guiada por el citoesqueleto, más exactamente por los microtúbulos corticales, los cuales alinean al complejo responsable de la síntesis de celulosa, que es la celulosa sintetasa. La elongación celular ocurre en el eje perpendicular al de las microfibrillas de la capa de pared que se está depositando, de ahí que la síntesis de la pared y la orientación de las microfibrillas de celulosa este en directa relación con el tamaño celular (Doblin et al. 2002; Cosgrove 2005).

La pared se mantiene en constante comunicación con el interior celular, esta interacción entre la pared y el protoplasto es dinámica y transmite señales hacia el interior de la célula, dando cuenta de las condiciones del ambiente extra-citoplasmático. En el otro sentido, de adentro hacia afuera, el protoplasto regula el estado de la pared en cada momento, dependiendo del desarrollo del tejido y las condiciones ambientales.

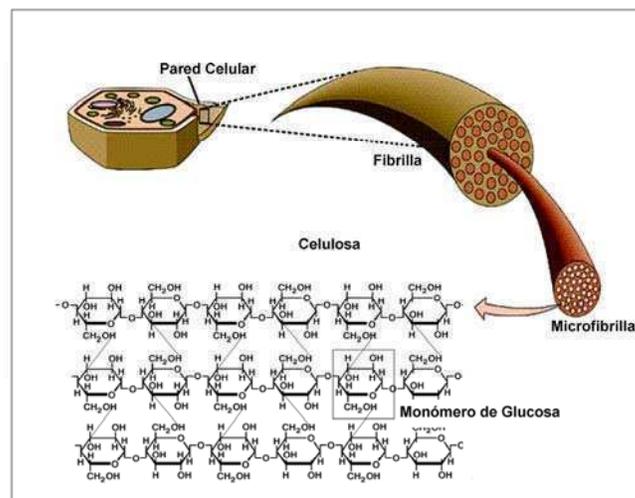


**Figura 6- Estructura y composición de la pared celular-** Usualmente mide entre 100 y 200 nm de espesor y es producto de la acumulación de 3 ó 4 capas sucesivas de microfibrillas de celulosa. Las microfibrillas de celulosa se encuentran atadas por hemicelulosas. Las pectinas determinan la porosidad y la carga de la pared. (<http://www.ceres.net/AboutUs/Images/PlantCellWall/Tab-Complete.jpg>)

### **2.3.-Composición de la Pared Celular**

Como se mencionó en la sección anterior, la pared celular posee una estructura compleja, y esta involucrada en procesos celulares tales como desarrollo, defensa, y resistencia mecánica. Diferentes tipos celulares dentro de una misma planta pueden ser

distinguidos por la química y organización de su pared. Las paredes difieren entre sí dependiendo del estado de desarrollo así como también por estadio de desarrollo y la exposición a diferentes condiciones ambientales (Cosgrove 1989; Carpita et al. 2001). La pared está compuesta mayormente por polisacáridos, que pueden ser clasificados en celulosa, hemicelulosa y pectinas, aunque el aporte de cada uno de estos polisacáridos puede variar con los diferentes tipos celulares, y con los grupos taxonómicos. La síntesis de estos polímeros tiene lugar en diferentes compartimientos subcelulares. La celulosa y la callosa son sintetizadas en la membrana plasmática, mientras que las pectinas y hemicelulosas son sintetizadas en aparato de Golgi (Carpita & Gibeaut 1993).

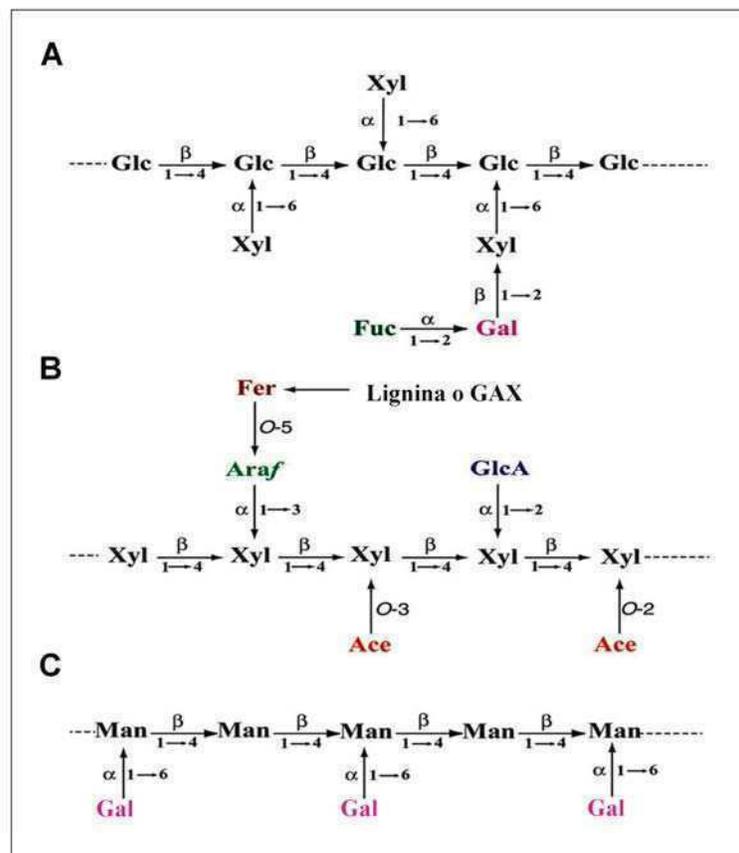


**Figura 7- Arreglos en fibrilla, microfibrilla y celulosa en la pared celular.** La celulosa es un polímero no ramificado de  $\beta$ -(1-4)-Glucosa que consiste en arreglos paralelos de 36 cadenas de  $\beta$ -(1-4)-glucanos, unido inter-catenariamente por puentes de hidrogeno. Muchas cadenas paralelas se agrupan para formar una microfibrilla cristalina muy resistente a la tracción mecánica y a la degradación enzimática. Las microfibrillas son depositadas en una orientación controlada, generalmente perpendicular al eje de elongación celular.

### La celulosa.

La celulosa esta omnipresente en el reino vegetal, ya que constituye el polisacárido mayoritario en las paredes celulares, además de ser considerado el biopolímero más abundante de la Tierra (Lerouxel et al. 2006, Saxena & Brown Jr. 1999). La celulosa está en el núcleo de la pared celular, donde sirve de estructura para los otros componentes, se sintetiza a partir del UDP-Glc generado en la fotosíntesis. Es un polímero no ramificado de  $\beta$ -(1-4)-Glucosa. Consiste en arreglos paralelos de 36

cadena de  $\beta$ -(1-4)-glucanos, unidos inter-catenariamente por puentes de hidrógeno como se ve en la Figura 7. Muchas cadenas paralelas se agrupan para formar una microfibrilla cristalina muy resistente a la tracción mecánica y a la degradación enzimática (Somerville 2006). Las microfibrillas son depositadas en una orientación controlada, perpendicular al eje de elongación celular en la pared primaria y en varias capas sucesivas y perpendiculares entre sí cuando la célula deja de crecer. La celulosa sirve como estructura para que se unan otros compuestos polisacáridicos a la pared, tales como las hemicelulosas y las pectinas. La celulosa es sintetizada en el citoplasma por un gran complejo enzimático, la celulosa sintetasa (CESA), la biomáquina más prolífica de la naturaleza.



**Figura 8- Estructura de los Xiloglucanos (A), Glucuronoarabinosilanos (B), y Galactomananos (C).** Ace, acetato; Araf, arabinofuranosa; Fer, ferulato; Fuc, fucosa; Gal, galactosa; Glc, glucosa; Xyl, xilosa; GlcA, glucuronato; Man, manosa. Sandhu et al. 2009)

---

## Hemicelulosas

Las hemicelulosas son moléculas complejas que se unen a la celulosa formando una matriz fuertemente entrecruzada por uniones covalentes. Las hemicelulosas están altamente ramificadas y modificadas esto hace que no puedan formar microfibrillas entre sí. Pueden ser divididas en cuatro clases muy distintas: aunque tienen en común ser  $\beta$ -glucanos con uniones ecuatoriales: xiloglucanos, glucomananos, glucoarabinosilanos (Figura 8) y  $\beta$ -glucanos o glucanos de unión mixta (Figura 9).

### Xiloglucanos y xilanos

Xiloglucanos: consisten en esqueletos de  $\beta$ -(1-4)-Glc sustituidos con xilosa. Los residuos de Xilosa pueden estar sustituidos con cadenas laterales cortas conteniendo Ara, Gal, y Xil. (Figura 8A)

Xilanos: son polímeros de  $\beta$ -(1-4)-Xil, pueden estar acetilados en el C2 o el C3, o unidos en  $\alpha$ -(1-2) a 4-O-metil-GlcUA y/o GlcUA. En paredes primarias de hierbas y plantas relacionadas, los xilanos son el polisacárido no celulósico mayoritario, y están sustituidos con cadenas laterales de  $\alpha$ -L-arabinofuranósidos unidos en (1-3) ó (1-2) (Porchia et al. 2002; Aspinall 1998; McNeil et al. 1984). Este tipo de xilano es conocido como arabinosilano (Figura 8B) y se cree que está involucrado en el entrecruzamiento por uniones covalentes de las microfibrillas de celulosa, así como también en la expansión celular y fortalecimiento de la pared (Gibeaut & Carpita 1991; Carpita 1996).

### Arabinanos, Galactanos y Arabinogalactanos

Son polímeros compuestos principalmente de azúcares neutros. Estos polisacáridos pueden ser arabinanos puros, constituidos por cadenas de  $\alpha$ -(1-5)-L-arabinosa en las cuales algunos de los residuos tienen además cadenas laterales de  $\alpha$ -L-arabinosa unidos al O-2, al O-3 y a veces a ambos O-2 y O-3. Las paredes primarias tienen también galactanos puros, que son básicamente polímeros de  $\beta$ -(1-4)-galactosa. Algunos galactanos tienen también uniones  $\beta$ -(1-6)-galactosa además de las (1-4). Con respecto a los arabinogalactanos de las paredes primarias hay dos tipos. El tipo I está compuesto por cadenas de  $\beta$ -(1-4)-galactosa con unidades de arabinosa en el O-3 de la mayor parte de los residuos de galactosa. El tipo II está constituido por cadenas cortas de  $\beta$ -(1-3) y (1-6)- galactosa conectadas entre sí por puntos de ramificación con uniones (1-3, 1-6).

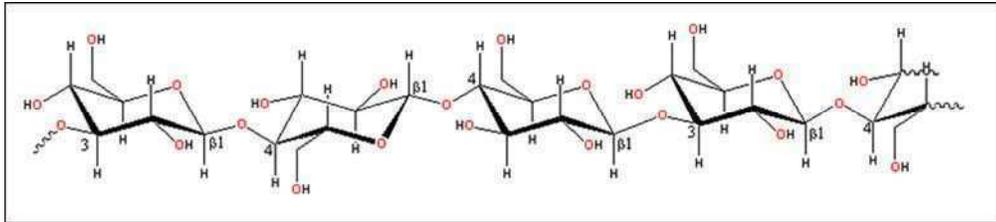
La mayoría de las posiciones O-3 y O-6 de los residuos galactosa que no intervienen en las ramificaciones están sustituidas por residuos arabinosa.

### Galactomananos, Glucomananos y Galactoglucomananos

Estos polisacáridos no celulósicos también actúan interconectando las microfibrillas de celulosa pero son muy poco abundantes y a diferencia de los mencionados anteriormente, sólo se encuentran en algunas paredes primarias (Figura 8C). Se acumulan en gran cantidad en tejido en diferenciación y especialmente en las paredes del endosperma de las semillas y de los cotiledones. Los galactoglucomananos son mezclas de residuos  $\beta$ -(1-4)-D-manosa y  $\beta$ -(1-4)-D-glucosa en proporciones 1:1 con cantidades variables de residuos terminales  $\alpha$ -D-galactosa unidos en la posición O-6 de los residuos manosa. En los galactomananos, el esqueleto está exclusivamente formado por residuos  $\beta$ -(1-4)-D-manosa con unidades de  $\alpha$ -D-galactosa unidas en posición O-6.

### $\beta$ -Glucanos o glucanos de unión mixta

Son esqueletos glucosídicos sin sustituir, que presentan uniones mixtas  $\beta$ -(1-4) y  $\beta$ -(1-3), presentes únicamente en gramíneas y cereales (Figura 9). Su estructura fuera de lo común, justamente por las uniones mixtas, fue establecida usando una endoglucanasa de *Bacillus subtilis* que corta uniones  $\beta$ -(1-4)-d-glucósidos solo si están precedidos por uniones  $\beta$ -(1-3), esto deja un trisacárido, celobiosil-(1-3)-d-Glc, y un tetrasacárido, celotriosil-(1-3)-d-Glc (Anderson & Stone 1975). Entonces, son polímeros sin ramificar de glucosa que consisten en unidades de celotriosil y celotetraosil en una proporción de 2:3 conectados por una sola unión  $\beta$ -(1-3) (Wood et al. 1991, 1994). El resto del polímero está formado por varias series de celodextrinas conectadas por una sola unión  $\beta$ -(1-3) (Staudte et al. 1985; Wood et al. 1994). La proporción de los oligómeros de celodextrina es 2 veces mayor que otro oligómero mayoritario presente en la serie (Wood et al. 1991, 1994). Aunque no se encuentra en ninguna otra angiosperma, glucanos similares se encontraron en un líquen *Cetraria islandica* (Wood et al. 1994), pero en este líquen la celotriosa era el polisacárido mayoritario (Buckeridge et al. 1999). Entonces la síntesis ocurre en el Golgi, a partir de UDP-Glc y depende de la presencia de iones divalentes tales como  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  (Gibeaut & Carpita 1993).



**Figura 9- Glucanos de unión mixta-** polisacáridos sin ramificar unidos en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)- y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranosas en unidades no repetitivas y tampoco dispuestas al azar

### Pectinas

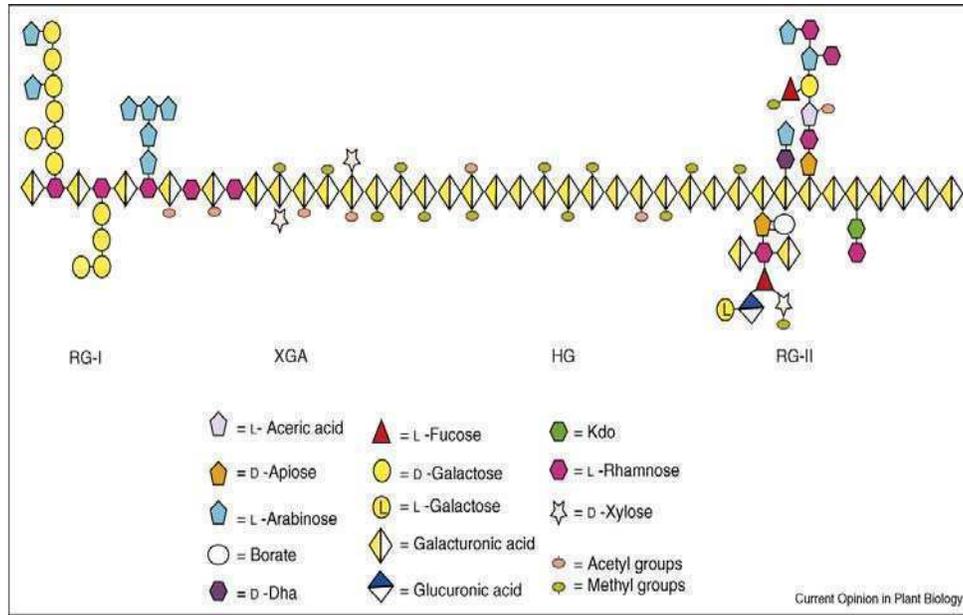
Las pectinas son componentes de las paredes celulares primarias, conformando una de las familias de polisacáridos más complejos de la naturaleza (Figura 10). La pectina es abundante en paredes celulares que rodean las células en crecimiento y/o división, células en partes blandas de la planta y en la laminilla media y también está presente en la zona de unión de las células con pared secundaria y en las células fibrosas de la madera (Mohnen 2008).

Los componentes mayoritarios de la pectina son: los homogalacturonanos (HG), ramnogalacturonanos clase I (RG I) y clase II y los xilogalactouronatos.

Homogalacturonanos (HG): cadenas lineales de ácido galacturónico que pueden estar parcialmente metil-esterificadas en el carboxilo del C-6, o O-acetiladas en el O-2 ó el O-3. Cuando el galactouronano está modificado por la adición de ramificaciones de xilosa, se llama xilogalactouronano (XGA). XGA esta mayoritariamente presente en tejidos reproductivos, pero también se encontró en tallos y hojas de *Arabidopsis* y en situaciones de ataque de patógenos (Zandleven et al. 2007; Jensen et al. 2008). Apiogalacturonano, es un HG sustituido en el O-2 o O-3 con apiofuranosa, presente en monocotiledóneas acuáticas.

Los grupos carboxilos de los homogalacturonanos y los xilogalacturonanos están frecuentemente esterificados, esa modificación bloquea el grupo ácido y reduce su capacidad de gelificación.

Ramnogalacturonos I: consiste en residuos alternados de ácido galacturónico y ramnosa. Pueden poseer cadenas laterales extensas y muy variadas.



**Figura 10- Estructura esquemática de la pectina-** Se muestran los 4 polisacáridos pectícos: homogalacturonanos (HG), xilogalacturonanos (XGA), ramnogalacturonanos I y II (RG-I y RG-II respectivamente) unidos unos con otros. El esquema estructural no es estricto en cuanto a proporciones de cada uno. Para más detalle ver Mohnen 2008. Los símbolos usados están acorde a: Symbol and Text Nomenclature for Representation of Glycan Structure from the Consortium for Functional Glycomics (<http://www.functionalglycomics.org/glycomics/molecule/jsp/carbohydrate/carbMoleculeHome.jsp>).

**Ramnogalacturonanos II:** contiene 11 residuos azúcares diferentes y forma dímeros a través de ésteres de borato. Arabinanos y arabinogalactanos, que son neutros, también están ligados a las pectinas, que son ácidas, esto conferiría flexibilidad extra a la pared, ya que les permitiría unirse a la celulosa.

### **3.-Funciones de los principales polisacáridos estructurales**

Los polisacáridos estructurales tienen una función regulatoria además de su función estructural. En este sentido se cree que 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 en las dicotiledóneas regulando de este modo el crecimiento celular.

Por otro lado, las pectinas interactúan en la pared celular de diversas maneras. Principalmente, las cadenas helicoidales de los homogalacturonanos pueden condensarse por entrecruzamiento con  $\text{Ca}^{2+}$  originando zonas de unión, juntando varias

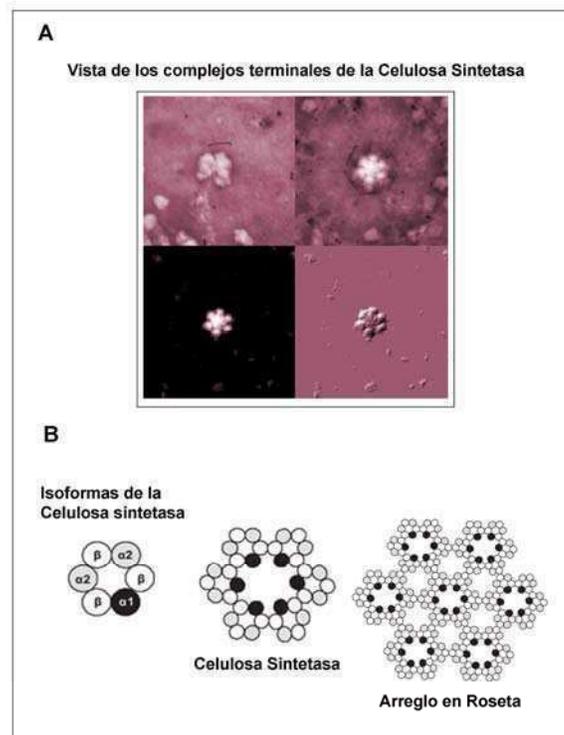
cadena y formando un gel. Además, las pectinas pueden estar unidas covalentemente a otros polímeros a través de uniones éster. El tamaño de las zonas de unión y la frecuencia de las sustituciones pueden constituir un control fino de la porosidad, la carga de la matriz, la modulación del pH y el balance iónico de la pared.

Otra función importante de los xiloglucanos y de algunos polisacáridos pécticos como el homogalacturonano es la formación de oligosacarinas. Las oligosacarinas son carbohidratos complejos que pueden funcionar en las plantas como señales moleculares que regulan el crecimiento, el desarrollo y la adaptación al medio ambiente (Côté & Hahn 1994). Una fracción de los xiloglucanos de pared celular es degradada durante el crecimiento promovido por auxinas originando oligosacáridos, algunos de los cuales funcionan como oligosacarinas participando en la regulación del crecimiento inducido por auxinas. Asimismo, la depolimerización parcial del homogalacturonano genera oligogalacturónidos que también pueden considerarse oligosacarinas ya que exhiben diversos efectos regulatorios en las plantas. Algunos de estos efectos son la generación de respuestas de defensa, la regulación del crecimiento y el desarrollo y la inducción de respuestas rápidas en la superficie celular.

#### **4.-Lugar de síntesis de los polisacáridos de pared celular: aparato de Golgi y membrana plasmática**

La celulosa es sintetizada en la superficie de la membrana plasmática de las células vegetales.

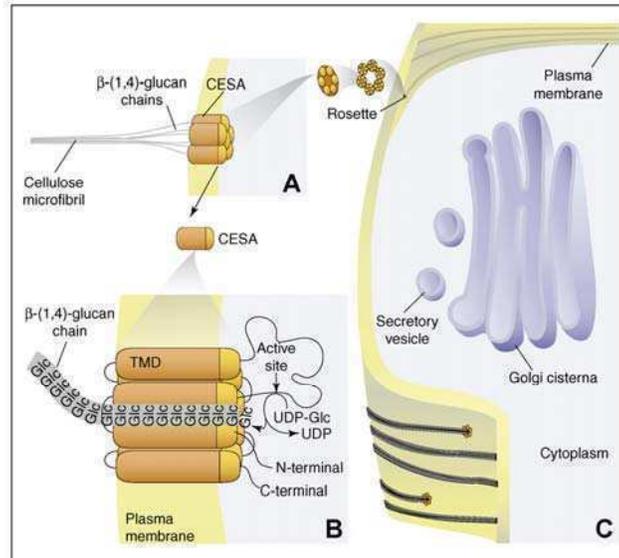
La síntesis de celulosa es catalizada por un complejo multienzimático que forma una estructura con forma de rosetas sobre la membrana plasmática. Este complejo multienzimático está compuesto mayoritariamente por la celulosa sintetasa, una elegante nano-maquina (Figura 11 y 12). La celulosa sintetasa está compuesta por seis subunidades, formando un hexámero, este hexámero se asocia con cinco hexámeros más y forma la roseta. Las rosetas se asocian entre sí mostrando la estructura característica de la celulosa sintetasa. Se cree que cada roseta, contiene seis hexámeros formados a su vez por seis monómeros de CESA, dando un total de 36 proteínas por roseta, como se muestra en la figura 11 (Lerouxel et al. 2006, Saxena & Brown Jr. 2005), cada roseta de aproximadamente 25-30 nanómetros (Brown 1996, Kimura et al. 1999).



**Figura 11-Celulosa Sintetasa.** (A) Vista de la síntesis de celulosa *in vitro* y de los complejos terminales en forma de roseta. Arriba a la izquierda, imagen original, las demás son rotaciones que demostraron la simetría hexamérica del complejo multimérico. De Kudlicka & Brown (1997). (B) Modelo esquemático de la estructura del complejo celulosa sintetasa (roseta) en plantas superiores. De Ding and Himmel (2006).

La celulosa sintetasa está en la membrana plasmática, con una cara hacia el citoplasma, donde recluta el UDP-Glc, y otra cara hacia la pared celular (Figura 12). El dominio citoplasmático contiene la secuencia conservada DXD, y el sitio activo donde están los residuos D,D,D...QXXRW que son característicos de las  $\beta$ -glicosiltransferasas procesivas. Otra característica común de las proteínas CESA son un par de motivos de “dedos de zinc” en el amino terminal (Kurek et al. 2002; Doblin et al. 2002), mediante los cuales se cree que forman estructuras muy ordenadas tanto *in vitro* como *in planta* (Kurek et al. 2002; Taylor et al. 2004). Es más, se cree que las secuencias “dedos de zinc” actúan como dominios de multimerización involucrados en el ensamble de los monómeros en los hexámeros, este ensamble estaría regulado por el estado redox de la célula (Kurek et al. 2004).

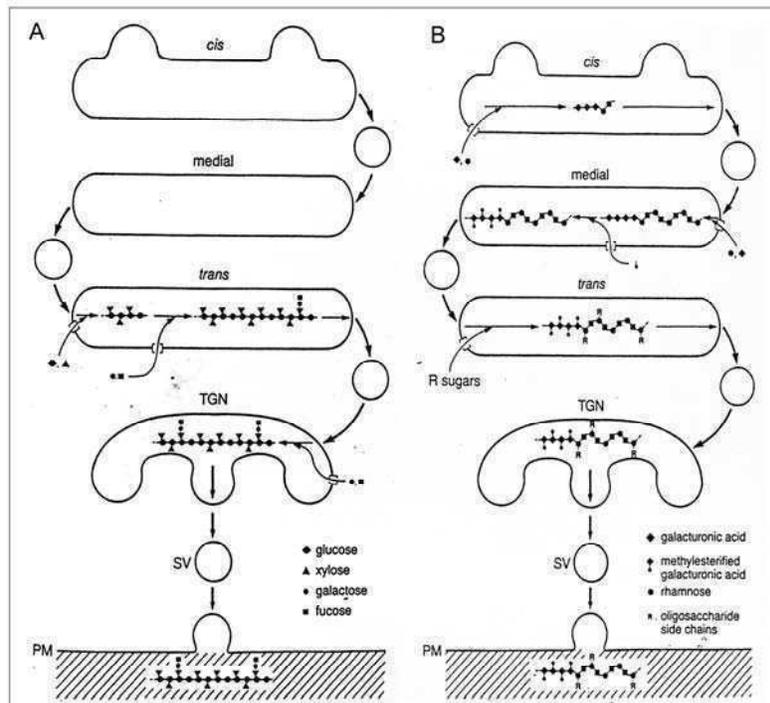
Los microtúbulos corticales son los encargados de la inserción de los complejos de celulosa sintetasa en dominios específicos de la membrana plasmática (Crowell et al. 2009; Gutiérrez et al. 2009) y guiar su trayectoria en la membrana a medida que la celulosa es sintetizada (Paredez et al. 2006, 2009).



**Figura 12- Síntesis de celulosa y ensamblado del complejo en la membrana.** (A) composición de las rosetas, cada arreglo en roseta estaría formada por 6 rosetas, que a su vez estaría formada por 6 proteínas CESA. (B) Cada una de estas proteínas se asocia a la membrana plasmática mediante 8 pasos transmembrana, con una cara hacia el citosol y otra hacia la pared. Se ve el glucano nascente salir hacia la pared por medio de un canal, donde se une a los demás para formar una microfibrilla. (C) Los polisacáridos de la matriz son sintetizados en el Golgi antes de ser trasladados por medio de vesículas a la superficie (Lerouxel et al. 2006).

A diferencia de la celulosa, los polisacáridos no celulósicos son sintetizados en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi, empaquetados en vesículas secretorias y exportados a la superficie de la pared celular, lugar donde son integrados con las microfibrillas de celulosa (Driouich et al. 1993) (Figura 6).

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. Los resultados mostraron que la síntesis del esqueleto de xiloglucano ocurre exclusivamente en las cisternas del trans Golgi.



**Figura 13. Modelos propuestos para la vía biosintética del xiloglucano y del homogalacturonano/poligalacturonano I en el aparato de Golgi para cultivos de células en suspensión de *Acer pseudoplatanus* (Driouich et al. 1993). A xiloglucano. B homogalacturonano/poligalacturonano I. PM: membrana plasmática, SV: vesícula secretoria, TGN: trans Golgi network.**

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 (Figura 13A). 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 metil-esterificación 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 (Figura 13B).

### **5.-Actividades enzimáticas involucradas en la biosíntesis de polisacáridos estructurales**

La celulosa sintetasa localizada en membrana plasmática utiliza como sustrato sólo UDP-Glc, en cambio para las múltiples reacciones catalizadas por las sintetetas del aparato de Golgi diferentes nucleótido-azúcares son tomados como sustrato (Carpita 1996).

El aparato de Golgi aislado puede sintetizar tanto (1-4)- $\beta$ -D-glucanos lineales como xiloglucanos (Ray 1980). La síntesis de xiloglucanos está aumentada en presencia de concentraciones milimolares de UDP-Glc y UDP-Xil (UDP-Xil) y con  $Mn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$  como cofactores. La degradación de los productos de reacción que se obtienen muestran la presencia de unidades heptasacarídicas  $Glc_4 Xil_3$  típicas del xiloglucano (Figura 13A). Las actividades de glucosil y xilosiltransferasas aparecen fuertemente asociadas, mientras que el agregado de los azúcares adicionales a los residuos xilosa ocurre independientemente. También se han descrito síntesis de xilanos *in vitro* aunque los productos radioactivos obtenidos en ningún caso fueron totalmente caracterizados y las actividades recuperadas son muy pequeñas.

Los glucomananos se pueden sintetizar *in vitro* a partir de GDP-glucosa (GDP-Glc) y GDP-manosa (GDP-Man) ya sea con preparaciones de membranas insolubles o solubilizadas. Las preparaciones de membranas de semillas en desarrollo catalizan la síntesis de galactomananos. En este caso el sustrato para la formación del esqueleto de (1-4)- $\beta$ -D-manosa es el GDP-Man, mientras que la incorporación de los residuos laterales de galactosa a partir del UDP-Gal (UDP-Gal) depende de la transferencia simultánea de las unidades de manosa. También se describió la incorporación de ácido galacturónico a partir de UDP-Gal en productos que se cree corresponden a homogalacturonanos, gran parte de los cuales están esterificados con grupos metilo. Esta metilación ocurre en el aparato de Golgi antes de que el polisacárido sea transportado a la pared celular.

Las actividades biosintéticas mencionadas en los párrafos anteriores son algunos ejemplos de las numerosas actividades enzimáticas descritas en relación con la síntesis de polisacáridos estructurales. Sin embargo, muy pocos de estos complejos o polipéptidos con actividad sintetasa se ha conseguido purificar hasta el momento (Dhugga et al. 2004, Cocuron et al. 2006, Jensen et al. 2008)

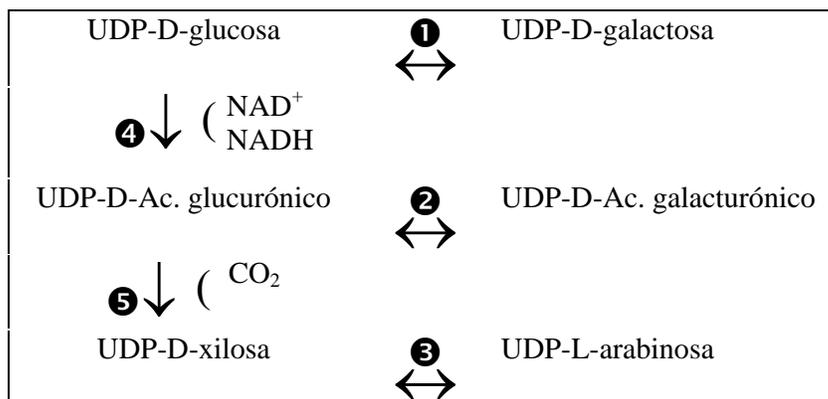
## **6.-Síntesis, localización y transporte de los precursores de la biosíntesis de polisacáridos estructurales**

Las glicosiltransferasas que catalizan la biosíntesis de los polisacáridos estructurales utilizan nucleósido difosfo azúcares como sustratos. Las sustancias pécticas, la celulosa y las hemicelulosas se sintetizan a partir de UDP-azúcares mientras que el GDP-Man y el GDP-Glc son los precursores de la síntesis de los galactoglucomananos.

Hay tres vías principales por las cuales se pueden formar los UDP-azúcares en las células vegetales:

1. La D-glucosa, por acción de la hexoquinasa (EC 2.7.1.1) es convertida a D-glucosa 6-fosfato y este azúcar puede ser usado para la biosíntesis de UDP-Glc por acción de las enzimas fosfoglucomutasa (EC 2.7.5.1) y UDP-D-glucosa pirofosforilasa (EC 2.7.7.9) o para la biosíntesis de UDP-D-ácido glucurónico (UDP-GlcA) a través de la vía de oxidación del mioinositol.
2. La sacarosa puede formar UDP-Glc por acción de la enzima sacarosa sintetasa (EC 2.4.1.13)
3. Por interconversión a partir de compuestos existentes (Figura 14)

Se ha propuesto que parte del control de la síntesis de los polisacáridos de pared celular podría ocurrir a nivel de la formación de los nucleótido-azúcares precursores. Esta idea está apoyada por el estudio de las actividades de las principales enzimas involucradas en la interconversión de nucleósido difosfo azúcares (UDP-Gal 4-epimerasa, UDP-1-arabinosa 4-epimerasa, UDP-Glc deshidrogenasa y UDP-GlcA decarboxilasa) en distintos estadios del desarrollo de la pared celular. Durante este proceso, en el cual hay un cambio en la proporción de síntesis de pectinas, hemicelulosas y celulosa, se observó que las actividades específicas de las enzimas involucradas en la interconversión de nucleósido difosfo azúcares variaban de acuerdo al tipo de polisacárido sintetizado (Dalessandro & Northcote 1977).



**Figura 14. Principales reacciones de interconversión de UDP-azúcares en plantas.** ① UDP-D-galactosa 4 epimerasa (EC 5.1.3.2), ② UDP-D-glucuronato 4-epimerasa (EC 5.1.3.6), ③ UDP-D-xilosa 4-epimerasa (EC 5.1.3.5), ④ UDP-D-glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.22), ⑤ UDP-D-glucuronato decarboxilasa (EC 4.1.1.35) (Bocca 1998).

Por otro lado, distintas evidencias sugieren que la síntesis de los nucleósido difosfo azúcares ocurre en el lumen de las cisternas de Golgi y que su transporte hacia el interior del aparato de Golgi es necesario para que estén accesibles a las glicosiltransferasas. Una vez en el lumen de Golgi, el azúcar es transferido a aceptores endógenos que son principalmente polisacáridos en sus distintos estadios de síntesis. De este modo, las glicosiltransferasas y las enzimas que sintetizan los precursores no son los únicos elementos involucrados en la biosíntesis de los polisacáridos, sino que los transportadores de nucleótido azúcares en sí mismos tendrían una función esencial en esta síntesis.

El estudio de los transportadores de nucleótido azúcares conocidos hasta el momento establece que el transporte hacia el lumen del Golgi ocurre a través de un sistema “antiporte” con el correspondiente nucleósido monofosfato. El hecho de que la molécula “antiporte” sea el nucleósido monofosfato y no el nucleósido difosfato se explica por la presencia en el lumen de Golgi de nucleósido difosfatasa (Abeijon et al. 1997). Con respecto al estudio de transportadores de nucleótido azúcares en plantas, se detectó una actividad de transporte de UDP-Glc en vesículas derivadas del aparato de Golgi de *Pisum sativum* que, como los transportadores descritos en mamíferos y levaduras, funciona como un “antiportador” (Muñoz et al. 1996). En estas mismas vesículas se ha descrito una nucleósido difosfatasa cuyo sitio activo está del lado

luminal de las cisternas de Golgi (Orellana et al. 1997). Estos resultados fueron utilizados para proponer un modelo que explica el metabolismo del UDP-Glc en las vesículas de Golgi de *Pisum sativum* (Neckelman & Orellana 1998). Este modelo propone que el UDP-Glc es transportado al lumen de las cisternas de Golgi en donde inmediatamente la glucosa es transferida a polímeros en distintos estados de crecimiento con liberación de UDP. A continuación, el UDP es inmediatamente hidrolizado por la uridina difosfatasa (UDPasa) de Golgi produciendo UMP y Pi. Un pequeño pool de estos metabolitos se observa en las cisternas de Golgi, sin embargo estos no se acumulan en el aparato de Golgi sino que salen del mismo. La salida del UMP es estimulada por la entrada del UDP-Glc, sugiriendo un mecanismo de intercambio entre ambos, mientras que el Pi sale por un mecanismo independiente.

## **7.-Identificación de genes de las enzimas involucradas en la biosíntesis de polisacáridos estructurales**

El primer gen que se logró identificar que codificaba para una enzima involucrada en la síntesis de polisacáridos estructurales de plantas fue el de la celulosa sintetasa. En 1996, Pear et al. encontraron en genotecas de cADN de algodón dos secuencias potencialmente homólogas a la subunidad catalítica de la celulosa sintetasa bacteriana. Estos genes, llamados *CelA*, tienen varias inserciones que no se encuentran en los bacterianos. Su expresión es muy alta en los estadios de desarrollo de la fibra de algodón en los cuales la síntesis *in vivo* de celulosa está aumentada más de 100 veces. Además, no hay otro tipo de  $\beta$ -glucano que se sintetice en las fibras de algodón con el mismo patrón de expresión en ese estadio del desarrollo. Cuando la región central, correspondiente al dominio citoplasmático se subclonó, expresó y purificó de *E. coli*, fue capaz de unir UDP-Glc de modo dependiente de  $Mg^{2+}$ . Si bien estos resultados sugerían que los genes *CelA* podrían corresponder a la subunidad catalítica de la celulosa sintetasa, aún faltaba una prueba de su función *in vivo*. Por otro lado, el análisis de secuencias de estos genes en *Arabidopsis* y arroz mostró que podría haber hasta 17 miembros de esta familia génica en *Arabidopsis* por lo cual era poco probable que la pérdida de uno de ellos llevara a un fenotipo visible. Sin embargo, Arioli et al. (1998) encontraron que una mutación en uno de los miembros de la familia génica produce una reducción muy marcada en la capacidad de síntesis de la celulosa cristalina. También mostraron que la complementación del mutante con un gen salvaje restaura el fenotipo

normal, aportando así la primera evidencia genética firme de que los genes *CelA* de plantas funcionan en la síntesis de celulosa.

## **8.-Modelos propuestos para la síntesis de polisacáridos de pared celular**

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 (Saxena et al. 1995, Albersheim et al. 1997).

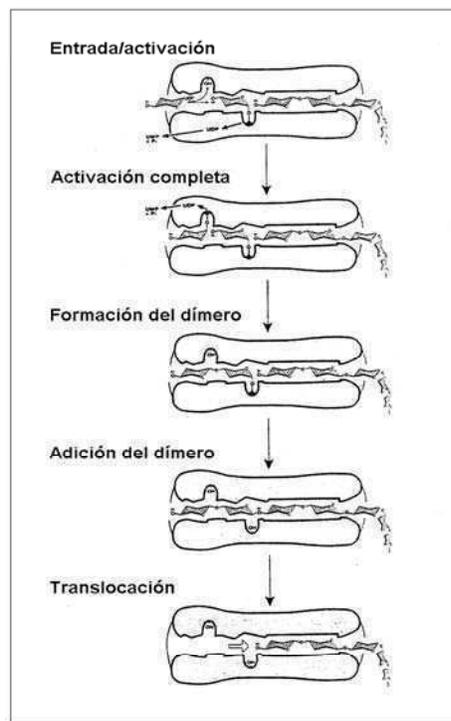
Las estructuras tridimensionales de los seis polisacáridos que están presentes en todas las paredes primarias de las plantas superiores (Figuras 7, 8, 9, y 10) muestran que están constituidos por unidades repetidas de disacáridos. Esta característica se observa también en los glicosaminoglicanos constituyentes de la matriz extracelular de las células animales, pero no es una observación válida para todos los polisacáridos ya que otros, como el almidón, los lipopolisacáridos y los polisacáridos capsulares, no están constituidos por unidades disacarídicas.

Los esqueletos de la celulosa y del xiloglucano consisten en cadenas lineales de residuos de  $\beta$ -D-glucosa y el esqueleto del arabinoxilano consiste en una cadena lineal de residuos de  $\beta$ -D-xilosa. En estos polisacáridos, cuando se produce la unión glicosídica  $\beta$ -(1-4) entre dos residuos, tanto el O-1 como el O-4 están en configuración ecuatorial, de modo que los residuos unidos quedan rotados  $180^\circ$  uno respecto del otro. En el caso del ramnogalacturonano II y del homogalacturonano, los esqueletos consisten en cadenas lineales de residuos de  $\alpha$ -D-ácido galacturónico. Cuando se produce la unión glicosídica  $\alpha$ -(1-4), el O-1 y el O-4 están ambos en configuración axial, quedando cada residuo rotado respecto a su vecino  $180^\circ$  como en los casos anteriores. Estos tipos de uniones resultan, por lo tanto, en polisacáridos constituidos por esqueletos de naturaleza disacarídica.

Si bien no se puede descartar la acción simultánea de dos glicosiltransferasas con idénticos sitios activos y localizadas a  $180^\circ$  una de la otra o, dos glicosiltransferasas con igual localización pero distintos sitios activos, Albersheim et al. (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

15). 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 glicosilo 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 traslocarse para que dos nuevos difosfo-nucleótido-azúcares pudieran entrar, activarse e iniciar otro ciclo de elongación.

En favor de este modelo pueden tomarse las evidencias presentadas por Saxena et al. (1995) de la existencia de dos sitios activos en las glicosiltransferasas que sintetizan los polisacáridos de pared celular y también el trabajo de Pear et al. (1996) en el cual se muestra que los genes *CelA* de algodón y arroz, que codifican para la subunidad catalítica de la celulosa sintetasa, tendrían más de un dominio para la unión de difosfo-nucleótido-azúcares.



**Figura 15. Modelo de Albersheim et al. (1997) para la síntesis de polisacáridos de pared** cuyos esqueletos están constituidos por unidades repetidas disacarídicas.

Un último modelo posible debería considerar la síntesis a partir de dadores disacarídicos activados por un nucleósido-difosfato o un dolicol-fosfato. Sin embargo,

no hay descripciones en la literatura de experimentos que hayan intentado la síntesis de algún tipo de polisacárido de pared celular con esta clase de dadores.

Los modelos discutidos tratan de interpretar principalmente la síntesis de los esqueletos que constituyen los polisacáridos. Sin embargo, para aquellos polisacáridos que durante su polimerización reciben sustituyentes que van siendo unidos covalentemente al esqueleto formando cadenas laterales, hay que considerar además la participación en la síntesis de más de un polipéptido catalítico. Así, es muy posible que las dificultades que se encuentran al intentar reconstituir los sistemas biosintéticos a partir de proteínas aisladas se deban a la necesidad de la acción secuencial de diferentes polipéptidos.

La similitud estructural entre los  $\beta$ -(1-4)-glucanos de la celulosa y los esqueletos de los  $\beta$  polisacáridos de las hemicelulosas llevo a predecir que podrían ser sintetizados por enzimas o complejos enzimáticos similares a la celulosa sintetasa (Cellulose synthase like, CSL). Estos genes codificarían para sintetisas localizadas en el Golgi que serían las encargadas de la biosíntesis de hemicelulosas (Hazen et al. 2002; Richmond et al. 2001). Aunque, como se dijo anteriormente, las dicotiledóneas y monocotiledóneas gramináceas tienen hemicelulosas distintas, y esto implicaría una plétora distinta de sintetisas en dicotiledóneas vs. monocotiledóneas, se cree que en ambos casos serían CSL enzimas.

Entonces, la síntesis de heteropolisacáridos puede ser dividida en 4 pasos: Inicio del esqueleto carbonado (cadena principal), elongación, adición de la cadena/s laterales y, terminación y deposición extracelular (Porchia et al. 2002). La biosíntesis de esos distintos pasos depende de la acción de las glicosiltransferasas, enzimas claves para la vida.

## **9.-Glicosiltransferasas**

Las glicosiltransferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un residuo azúcar de un dador activado, a una molécula aceptora. La molécula dadora usualmente es un nucleótido difosfo-azúcar, pero también puede ser un azúcar fosfato o un disacárido. La molécula aceptora, en la mayoría de los casos, es una cadena polisacarídica naciente, pero también puede ser una variedad de compuestos como carriers lipídicos, esteroides, bilirrubina, flavononas, carotenoides, proteínas, etc., que están covalentemente modificadas por glicosilación.

Hay dos grandes grupos de glicosiltransferasas: enzimas procesivas, que transfieren múltiples residuos azúcar al aceptor, como la celulosa sintetasa o la quitina sintetasa; y las no-procesivas, como las que están involucradas en la síntesis de la unidad repetitiva del succinoglicano, ese tipo de enzimas transfiere un solo residuo azúcar al aceptor. La especificidad de las enzimas por los sustratos dadores y aceptores es lo que condiciona la unión glicosídica.

Si bien las glicosiltransferasas de las plantas son las más abundantes en la naturaleza, ya que toda su forma de vida depende del metabolismo de azúcares, se sabe poco sobre la síntesis de polisacáridos y las enzimas que los producen. Se observa un rápido progreso en este campo en la mitad de los años 90 luego del descubrimiento de la celulosa sintetasa y del clonado de los primeros genes de otras glicosiltransferasas involucradas en la iniciación de la biosíntesis de polisacáridos (Arioli et al. 1998; Delmer 1999; Perrin et al. 1999; Doblin et al. 2002). El desarrollo de los biocombustibles le ha dado energía y recursos renovados a la investigación de síntesis de polisacáridos y nuevos resultados se han obtenido en este campo en los últimos años con el descubrimiento y descripción de la CESA. Su mecanismo de acción ha abierto las puertas a la identificación de proteínas relacionadas con la síntesis de celulosa, aunque aun queda mucho camino por recorrer, ya que el conocimiento en el campo de la biosíntesis de polisacáridos es abundante en referencia a las enzimas involucradas en la elongación y ramificación de las cadenas para poder modificarlos luego de su extracción de la planta. Sin embargo, se conoce muy poco sobre el mecanismo y regulación de la síntesis *de novo* de los mismos. De ésta manera la manipulación de la cantidad y calidad de los polisacáridos al nivel de las plantas ha sido obstaculizada por la carencia de información sobre las glicosiltransferasas que catalizan su iniciación

Las glicosiltransferasas de plantas son particularmente importantes porque ellas convierten el producto de la fotosíntesis en disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. En general, las uridina difosfato (UDP) glicosiltransferasas median la transferencia del residuo de azúcar a partir de un nucleótido azúcar activado a una molécula aceptora y una superfamilia de más de 100 putativos genes se ha identificado en *Arabidopsis thaliana* (Ross et al. 2001). Por otro lado, se conoce actualmente la función de pocas de ellas porque en general presentan una extrema especificidad de sustrato, diferentes isoformas y están asociadas a estructuras de membrana. El sustrato UDP-Glc se usa en varios caminos metabólicos tales como en la síntesis de celulosa, xiloglucano, hemicelulosa en plantas superiores, callosa y el almidón (Odegard et al. 1996).

Las proteínas CSL serían las subunidades catalíticas de complejos enzimáticas que sintetizarían los esqueletos de las hemicelulosas (Richmond & Somerville 2000, 2001). Estas proteínas contienen una secuencia característica de las glicosiltransferasas procesivas el motivo “D,D,D,QXXRW” (Saxena & Brown 1995) y serían proteínas integrales de membrana, aunque datos recientes sugieren que un mecanismo de regulación de la biosíntesis podría darse mediante un pool de ensamblado y desensamblado cíclico entre la membrana plasmática y compartimentos subcelulares, con un mecanismo similar al de la quitina sintetasa, el cual respondería a los requerimientos de la célula (Paredez et al. 2006; Robert et al. 2005; Dunkley et al. 2006).

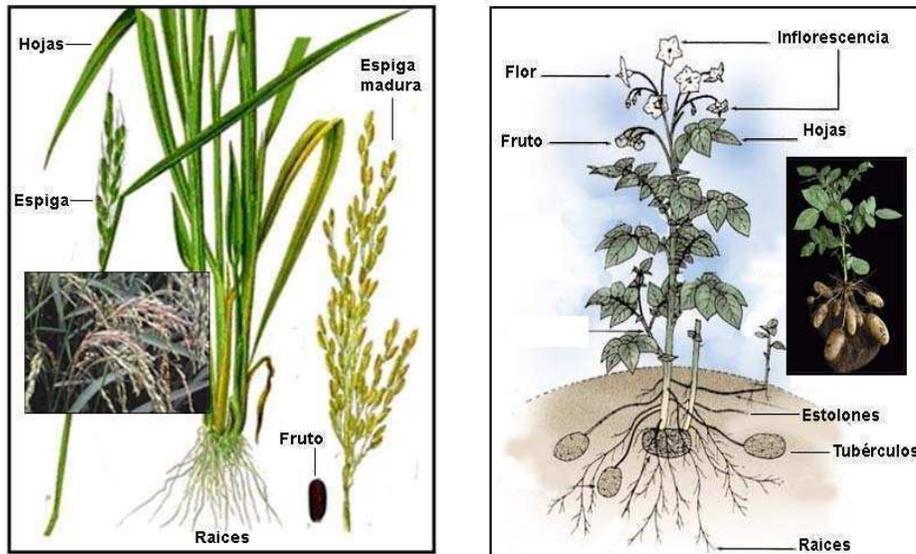
En conclusión, a pesar de la diferencia en la composición de la pared celular entre dicotiledóneas y cereales, que reflejaría distintos patrones de enzimas y genes, los genes de la superfamilia CLS son actualmente, los candidatos más promisorios para codificar las glicosiltransferasas que hacen los esqueletos de las hemicelulosas de pared (Hazen et al. 2002; Richmond & Somerville 2001), aunque esta diferencia se ve reflejada en los grados de conservación y de divergencia entre los CLS de *Arabidopsis* vs. CLS de Arroz (Hazen et al. 2002).

## **10.-Sistemas modelo de estudio-Plantas de interés agroeconómico.**

La estructura de crecimiento de las plantas, módulos, difieren si se trata de una planta monocotiledóneas, como el arroz (*Oryza sativa*), o dicotiledónea, como la papa (*Solanum tuberosum*), que son nuestros sistemas de estudio.

El arroz, es una planta que proporciona un grano comestible rico en hidratos de carbono. También contiene proteínas, y, en estado natural, vitaminas y minerales. Aporta 360 kcal. cada 100 gramos de grano de arroz, 79% de hidratos de carbono, 7% de proteínas y 1% de grasas.

El cultivo del arroz comenzó simultáneamente en varios países hace más de 6 milenios. Dos especies de arroz se domesticaron, el arroz asiático (*Oryza sativa*), del cual proceden la mayoría de las variedades de arroz en el mundo; y el africano (*Oryza glaberrima*). Es una planta que puede llegar a medir 1,8 metros de altura.



**Figura 16-** Esquema de los módulos que desarrollan el arroz y la papa, monocotiledónea y dicotiledónea respectivamente, durante el ciclo de vida. El panel izquierdo muestra la planta de arroz, las espigas, frutos y raíces. El panel derecho muestra la planta de papa, con estolones tubérculos, flores y frutos.

Tiene un tallo en forma de caña hueca por dentro, exceptuando la parte de los nudos. Las hojas son lanceoladas terminadas en punta y con nervación paralela. Las espigas están formadas por una panícula caediza donde se encuentran las semillas o granos de arroz.

En cambio, la papa es una planta herbácea, tuberosa, perenne a través de sus tubérculos, caducifolia de tallo erecto. Las hojas son compuestas, de forma lanceolada y se disponen en forma espiralada en los tallos, que pueden tornarse relativamente leñosos en su parte basal. Los tubérculos de papa son tallos subterráneos engrosados como una adaptación para funcionar como órgano de almacenamiento de nutrientes. El sistema radical es fibroso, ramificado y extendido más bien superficialmente. Las plantas originadas a partir de tubérculos por provenir de yemas y no de semillas, carecen de radícula; sus raíces, que son de carácter adventicio, se originan a partir de yemas subterráneas. Estas raíces se ubican en la porción de los tallos comprendida entre el tubérculo semilla y la superficie del suelo. La inflorescencia nace en el extremo terminal del tallo y el número de flores en cada es variable. Las semillas se producen en los frutos obtenidos por polinización libre son una mezcla de auto-polinizaciones con polinizaciones cruzadas, siendo las primeras las más numerosas. El fruto de la planta de papa es una baya pequeña, de forma redonda y su color puede variar de verde a

amarillento, o de castaño rojizo a violeta. Cada baya puede contener entre 200 y 400 semillas. Las semillas son muy pequeñas, aplanadas, de forma arriñonada, y pueden ser blancas, amarillas o castaño amarillentas.

### **11.-Las glicosiltransferasas RGP (reversibly glycosylated polypeptide)**

Las glicosiltransferasas RGP, fueron descubiertas tratando de aislar los componentes del camino biosintético de la pared celular. Estas proteínas son específicas de plantas, y son capaces de unir a sí mismas reversiblemente un residuo azúcar proveniente del UDP-azúcar. La ausencia de mutantes supone una función vital y conservada, aunque todavía se sabe poco del rol fisiológico (De Pino et al. 2007; Drakakaki et al. 2006; Bocca et al. 1999; Delgado et al. 1998; Moreno et al. 1986; Moreno & Tandecarz 1982).

El análisis filogenético de las proteínas RGP reveló una familia multigénica (Wald et al. 2003) que puede dividirse en dos clases llamadas Clase 1 y Clase 2 RGPs (C1RGPs y C2RGPs, respectivamente, Langeveld et al. 2002). Las dos clases fueron históricamente implicadas en síntesis de pared celular/almidón, sugiriendo que la C1RGP podría funcionar en la biosíntesis de xiloglucanos, mientras que la C2RGP podría cumplir un rol en el inicio de la síntesis de almidón (Moreno et al. 1987; Singh et al. 1995; Langeveld et al. 2002). Las C1RGPs se encontraron asociadas a pared celular, específicamente a plasmodesmos (Pd; Epel et al. 1996; Sagi et al. 2005), y con el trans-Golgi (Epel et al. 1996; Dhugga et al. 1997; Sagi et al. 2005; Drakakaki et al. 2006; De Pino et al. 2007). El mecanismo por el cual las RGP son llevadas al Pd involucra la asociación a las membranas del trans-Golgi, mediante un mecanismo de oligomerización (De Pino et al. 2007), que involucraría la exposición de parches hidrofóbicos y asociación al Golgi como un complejo. Mediante vesículas de secreción sería llevada al Pd donde quedaría del lado citoplasmático (Sagi et al. 2005, Selth et al. 2006). El rol de la asociación de la C1RGP con el plasmodesmo, es aún desconocido, pero parece ser una característica común a estas proteínas, ya que un homólogo cercano de la RGP que fue identificado del alga verde *Chara corallina* en células nodales, que contienen plasmodesmos, y no en células intermodales (que carecen de ellos) durante un análisis proteómico (Faulkner et al. 2005)

Estas proteínas también tienen una actividad mutasa de arabinosa asociada (Konishi et al. 2007). Forman complejos hetero- y homomultiméricos (Langeveld et al. 2002; De Pino et al. 2007; Konishi et al. 2010) y son glicosiladas reversiblemente por

---

UDP-Glc, UDP-Xil, UDP-Gal, y UDP-arabinosa (Dhugga et al. 1991, 1997; Delgado et al. 1998; Langeveld et al. 2002; Testasecca et al. 2004; Konishi et al. 2007).

Las RGP comparten con otras enzimas iniciadoras la capacidad autocatalítica, por ejemplo en levaduras y mamíferos la glicosiltransferasa autocatalítica, llamada glicogenina, es requerida para iniciar la formación de  $\alpha$ -(1,4) glucanos (Alonso 1995), en bacterias se ha reportado que la glucógeno sintetasa participaría en la iniciación de la biosíntesis del glucógeno (Ugalde et al. 2003). Los estudios bioquímicos inicialmente realizados en el laboratorio sobre la RGP de papa sugieren que la proteína podría funcionar como intermediario proteico en la iniciación de la síntesis de glucanos (Moreno et al. 1982; Moreno et al. 1987). Langeveld et al (2002) amplían esta hipótesis y mencionando que las C1RGP1 es la que funcionaría en la síntesis de hemicelulosas y que otra isoforma relacionada “RGP-1 like” funcionaría en la síntesis del almidón. Otros genes ortólogos han sido aislados en arvejas (Dhugga et al. 1997); en *Arabidopsis* (Delgado et al. 1998) y nosotros los hemos aislado en papa (S. Bocca 1998 tesis doctoral; y Bocca et al. 1999).

La RGP de maíz aislada de endosperma de semillas en desarrollo se encontró asociada a un inhibidor de naturaleza proteica que fue identificado como la isoforma SS1 de la sacarosa sintetasa (Rothschild et al 1996). Tradicionalmente se asumía que la sacarosa sintetasa estaba relacionada exclusivamente con la síntesis de almidón. Sin embargo, se ha descrito que la isoforma SS1 es requerida en maíz para mantener la integridad de la pared celular en el endosperma, mientras que la isoenzima SS2 es la necesaria para generar los precursores del almidón (Chourey et al. 1998).

El análisis filogenético con 16 secuencias de proteínas relacionadas a 2 genes de papa reveló que la proteína llamada UDP-Glc: proteína transglucosilasa (RGP) es otra proteína de la subfamilia de las RGP de dicotiledóneas (Wald et al. 2003), y pertenece a la familia de glicosiltransferasas 75 en la base de datos CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes Database), tiene 59 miembros, 12 en Archaea, 3 en Bacteria y los 44 restantes en Eukarya. De estos miembros solo 5 están caracterizados. También están agrupadas en la EC 2.4.1.112, con las glicosiltransferasas que forman uniones  $\alpha$ , aunque un trabajo de Singh et al. (1995) muestra que la glucosa está unida en  $\beta$  a un residuo de arginina.

## **12.-Antecedentes del tema de trabajo**

Lavintman et al. (1974) describieron por primera vez glicosiltransferasas capaces de sintetizar  $\beta$ -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 & Cardini 1979). La enzima que catalizaba la primer etapa, es decir que unía Glc a la proteína, se denominó inicialmente UDP-Glc: proteína transglucosilasa (UPTG, EC 2.4.1.112). Luego, se encontró que la enzima UPTG se autoglicosilaba en presencia de  $Mn^{2+}$  y UDP-[C14]Glc dando un producto radioactivo de 38 kDa (Moreno et al. 1986, 1987; Ardila et al. 1992), y se la denominó RGP, por Reversibly Glycosylated Polypeptide (Dhugga et al. 1991). Se sugirió que el producto de la reacción catalizada por la RGP serviría de aceptor para las enzimas alargadoras (fosforilasa y almidón sintetasa) presentes en la preparación de tubérculos de papa en una segunda etapa (Moreno et al. 1987).

La RGP de tubérculo de papa purificada se utilizó para generar anticuerpos policlonales específicos contra el monómero de 40 kDa (Tandecarz et al. 1995; Bocca et al. 1997). Dichos anticuerpos se han utilizado para la búsqueda de clones de RGP a partir de dos bibliotecas de ADNc, una de hojas de papa y otra de estolones iniciando la tuberización de papa. Los clones más largos de cada uno de estos grupos fueron secuenciados y se los denominó E11 y E2 (Bocca et al. 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 et al. 1995). Se sugirió entonces el nombre de RGP1 para la proteína recombinante codificada por dicho clon.

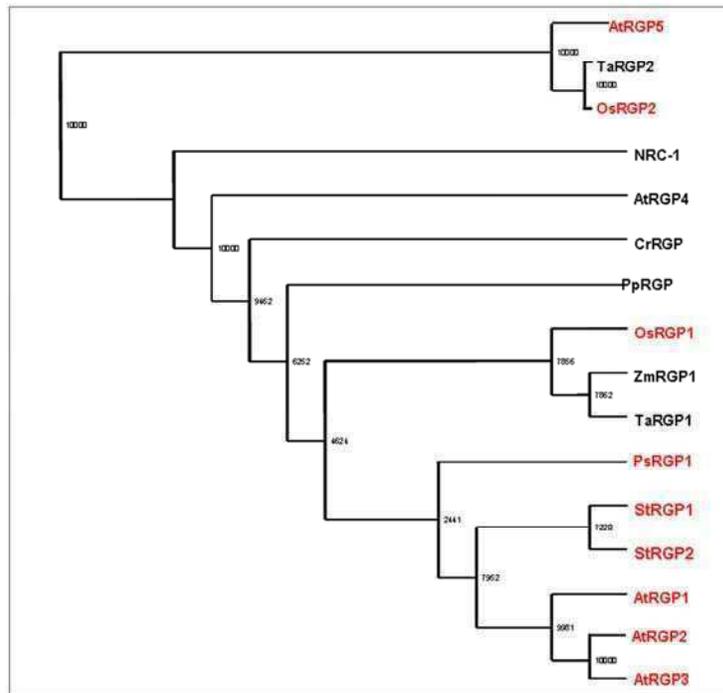
La secuenciación de los clones permitió predecir *in silico* algunos aspectos estructurales y bioquímicos de las proteínas recombinantes. Se pudo determinar que las proteínas recombinantes tendrían un punto isoeléctrico de 6.19 para E11 y de 5.71 para E2 y una masa molecular entre 41,6-41,8 kDa, que es levemente mayor a la de la subunidad de la proteína de papa. También se sugirió que la RGP no tendría secuencias señales para una localización subcelular y que sería una proteína hidrofílica (Bocca et al. 1999).

---

Luego de la purificación a homogeneidad de la RGP, se encontró que además del UDP-[C14]Glc, el UDP-[C14]Xil y el UDP-[C14]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 et al. 1999). Sin embargo, el UDP-Man, el UDP-GlcNAc, el UDP-GlcUA y el UDP-GalUA resultaron incapaces de liberar el azúcar radioactivo unido.

Si bien la RGP se reportó como una actividad asociada a membranas (Lavintman et al. 1974) y se la purificó a partir de una fracción particulada (Bocca et al. 1997), dicha enzima se encuentra en grandes cantidades en la fracción soluble (Bocca et al. 1999). Esto coincide con la ausencia de motivos de inserción a membranas en la secuencia de la proteína c1RGPs, que son las mayoritariamente expresadas. Además, la enzima nativa presentaría una estructura oligomérica ya que Ardila et al. (1992) reportaron múltiples picos con actividad RGP que eluían a baja fuerza iónica de una cromatografía en columnas de intercambio aniónico. Bocca et al. (1997) encontraron un pico asimétrico ancho con actividad enzimática luego de la purificación de la RGP mediante cromatografía en columnas de tamiz molecular.

La búsqueda en bases de datos mostró similitud entre la RGP y otras secuencias de origen vegetal que se pudieron clasificar en dos categorías (Bocca et al. 1999). La primera categoría, que presentó entre 86-93% de identidad, involucraba ADNc de las RGPs de *Pisum sativum* y de *Arabidopsis thaliana* (Dhugga et al. 1991, 1997; Delgado et al. 1998), el ADNc de la proteína se-wap41 de plasmodesmos de *Zea mays* (Epel et al. 1996), y algunas secuencias homólogas de *Vigna unguiculata*, *Oryza sativa* y *Triticum aestivum*. La RGP mostró también similitudes a nivel de aminoácidos con péptidos trípticos de la amilogenina de *Zea mays* (Singh et al. 1995). La segunda categoría de secuencias compartía entre 44-47% de identidad con la RGP y estaba constituida por algunos ADNc de *O. sativa*, de *T. aestivum* y algunas ESTs de *A. thaliana*, ver figura 17.



**Figura 17-Diagrama mostrando la divergencia de las RGPs de plantas superiores.**

Hoy en día luego del gran avance en la secuenciación y en la bioinformática, hay muchas más secuencias con gran porcentaje de identidad, pero las que fueron caracterizadas de alguna u otra manera, se muestran en el cladograma de la figura 17. Hoy se sabe que la UPTG de *Solanum tuberosum*, las RGPs (Delgado et al. 1998; Dhugga et al. 1997), la amilogenina de maíz (Singh et al. 1995) y la glicosiltransferasa I de zanahoria (Quentmeier et al. 1987) entre otras, forman un grupo de proteínas homólogas, con un motivo estructural conservado, pfam 03214 (<http://pfam.sanger.ac.uk/family?PF03214#tabview=tab6>). 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, 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.

El ADNc del clon E11 fue utilizado como sonda en ensayos de RFLP en una población de papa (Bocca et al. 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 RGP1 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, se sabe que hay un segundo gen para la misma enzima, las C2RGP, que tienen bajo porcentaje de identidad en la secuencia y no mostraron actividad de autoglicosilación.

La RGP había sido también reportada en plántulas de maíz (Moreno & Tandecarz, 1982) y en otro órgano de reserva como es el endosperma de semillas inmaduras de maíz (Rothschild & Tandecarz, 1994) y durante este trabajo de tesis también se ha encontrado en semillas de arroz. El producto radioactivo de la reacción catalizada por la RGP de arroz sometido a SDS/PAGE y posterior fluorografía, presentó una banda radioactiva de peso molecular aparente de 40 kDa, al igual que la enzima de tubérculo de papa (Rothschild & Tandecarz, 1994). Contrariamente a lo que ocurre en condiciones similares en preparaciones de maíz (Rothschild et al. 1996), en las semillas sin germinar de arroz se observó actividad RGP. Más aún, la preparación solubilizada de endosperma de maíz era capaz de inhibir la actividad RGP 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 RGP (Rothschild y Tandecarz, 1994). Se describió la presencia de un inhibidor (IP) termolábil no competitivo en la preparación (Rothschild et al. 1996). Ese inhibidor se purificó y secuenció. La secuencia reveló alta homología con la sacarosa sintetasa (SS) de diversas especies vegetales. 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.

Todavía no se ha demostrado inequívocamente la función para la RGP ni para ninguna de las proteínas homólogas, pero se sabe, como se mencionó en la sección anterior que la RGP está estrechamente ligada a la síntesis de pared celular. La ausencia de péptidos de tránsito a plástidos en la secuencia de la RGP hace difícil pensar que la proteína estuviera involucrada en la síntesis de almidón dentro del amiloplasto (Bocca et al. 1999). El hecho de que la PsRGP haya sido inmunolocalizada en las vesículas del trans Golgi y la especificidad de las RGPs por los nucleótidos azúcares UDP-Glc, UDP-Xil y UDP-Gal, sugieren una posible participación en la síntesis de polisacáridos estructurales no celulósicos que constituyen la pared primaria de las células vegetales (Dhugga et al. 1997; Bocca et al. 1999; De Pino et al. 2007). Más aún, Faik et al. (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; unos años después Porchia et al. (2002) mostraron que el azúcar radiactivo es transferido de la proteína de 40 kDa al xiloglucano si la preparación enzimática es incubada secuencialmente con xilosa y arabinosa. Otro resultado que apoya esta hipótesis es la relación entre la RGP y la SS de maíz involucrada en la provisión de sustratos para la síntesis de pared celular (Wald et al. 1998; Chourey et al. 1998).

# *Objetivos*

## **1.-Objetivos del trabajo de Tesis**

Generar conocimiento en el campo de la biosíntesis de polisacáridos a nivel de la planta a partir del estudio de una glicosiltransferasa autocatalítica denominada “reversibly glycosylated polypeptide”, RGP.

### 1.1-Objetivos generales

Escasas glicosiltransferasas descritas en la literatura hay 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 RGP 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 RGP 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 RGP podría tener una función relacionada con la síntesis de polisacáridos estructurales constituyentes de las paredes celulares de las plantas.

En esta tesis se desarrollaran diversas estrategias bioquímicas y moleculares, tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro*, con el fin de aportar datos para dilucidar en qué etapa de la síntesis de polisacáridos vegetales está involucrada la enzima RGP. 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 analizará la expresión de diferentes isoformas de la enzima en distintos tejidos de plantas de arroz para investigar si la RGP está regulada a nivel transcripcional.

### 1.2.-Objetivos específicos

- Analizar el mecanismo de la reacción de la RGP mediante análisis de estructura-función de la RGP.

Por técnicas bioquímicas-moleculares se profundizarán conocimientos sobre el mecanismo de autoglicosilación de la proteína, especialmente de las isoformas en papa dado el conocimiento previo disponible de la misma.

La enzima presenta características únicas, no descritas en ninguna otra glicosiltransferasa ya que cataliza una reacción reversible de autoglicosilación a partir de tres posibles nucleótidos azúcares. Por ello se estudiará la reversibilidad de la reacción. Se analizará si existe alguna relación entre los tres nucleótidos-azúcares en la reacción de glicosilación y el tamaño.

- Identificar reguladores de la actividad enzimática

Se busca conocer tanto factores intrínsecos a la proteína como extrínsecos a la misma que regulen su actividad enzimática.

- Investigar la expresión de la RGP

Se diseñarán estrategias para analizar la expresión de la proteína en plantas de diploides de arroz que contienen sólo 2 clases de RGP con 3 genes descritos, RGP1 y RGP3, que pertenecen a la clase 1, y RGP2 que pertenece a la clase 2. Se analizará la expresión en diferentes estadios de desarrollo de la planta, a nivel de proteína y de ARNm. El arroz es un modelo emergente para estudios moleculares porque: (a) El genoma completo ya fue secuenciado. (b) Están disponibles diversas herramientas para estudios de genómica funcional (Transposones, poblaciones de T-DNA-tags y está disponible la tecnología de microarray para estudiar la expresión de mRNA.

# ***Materiales y Métodos***

## 1.-Sustratos radioactivos

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

## 2.-Material vegetal

### 2.1.- *Oryza sativa*

Semillas de arroz variedad El Paso 144, fueron esterilizadas superficialmente, se cultivaron en medio MS (Murashige and Skoog, 1962), en cámara de cultivo con 12 horas de fotoperíodo a 22 °C. Se hizo extracción de proteínas a 0 días, que es la semilla germinada, 2 días que es la semilla germinada de 2 días de cultivo; 3 días plántula naciente de 3 días de cultivo; 4 días plántula de 4 días de cultivo, 8 y 10 días, plántulas de 8 y 10 días de cultivo respectivamente.

2.2.- Plantas de arroz en distintos estadios de crecimiento se cultivaron en el jardín Botánico Arturo E. Ragonese-Instituto de Recursos Biológicos, CIRN, INTA Castelar y cedidas gentilmente por el Ing. Miguel Angel Elechosa.

### 2.3.- *Arabidopsis thaliana*

Semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron esterilizadas por liberación de Cl<sub>2</sub> durante 4 horas, luego ventiladas, sembradas en esterilidad en cajas de petri, vernalizadas durante 2 días a 4 °C en oscuridad y luego crecidas hasta el estadio de 2 hojas primordiales en cámara de cultivo. En ese estado se transplantaron en macetas con una mezcla de tierra-vermiculita-perlita, en fotoperíodo. Fueron cosechadas antes de florecer.

### 2.4.-*Pisum sativum*

Plantas de arveja fueron crecidas en oscuridad en bandejas con una mezcla apropiada.

### 2.5.-*Solanum tuberosum*

Tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) de la variedad blanca fueron adquiridos comercialmente.

## 3.- Fuente de RGP

### 3.1.- Preparación de proteínas de RGP de papa, arroz y arveja.

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 (buffer A) a 4°C durante 12 horas y utilizadas como fuente de RGP 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 proteínas de arroz y arveja se realizaron mortereando con N2 (l) tejido proveniente de semillas sin germinar y plantas en distinto estadio de desarrollo, hasta fino polvo. El polvo se resuspendió en buffer 1,5 volúmenes de buffer A en presencia de 0.1 mM de PMSF. 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 guardó como S140 y la fracción de membranas se resuspendió en el mismo buffer. Las dos fracciones fueron utilizadas como fuente de RGP.

### 3.2.-Preparación de RGP recombinante

Las células de *E. coli* expresando los distintos clones de RGP, 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 µg/ml ampicilina y se incubaron a 37°C con agitación hasta DO<sub>600</sub>: 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<sub>2</sub>, 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.

3.3.-Preparacion de vesiculas de Golgi de arvejas y separacion de proteinas por coeficiente de sedimentacion.

Se extrajo la fracción de membranas enriquecidas en Golgi como se describe en Muñoz et al. (1996). Para solubilizar las membranas, las mismas se incubaron durante 15 minutos a 4 ° C en un buffer 10 mM Hepes pH 7; 5 mM EDTA, 600 mM de NaCl, 1,5% TX-100 y 1 mM PMSF. Para separar la fracción de membranas se utilizaron 5 ml de un gradiente lineal de sacarosa (5-25%) como describe Wang et al. (1998). Las proteínas obtenidas después de la solubilización se cargaron en este gradiente y se centrifugaron durante 14 horas a 100.000xg utilizando un rotor Sorvall AH650. Después de la centrifugación se recogieron diez fracciones. El pellet obtenido en el fondo del tubo se resuspendió en 500 µL de sacarosa 25% y corresponde a la fracción once. Para detectar RGP, 30 µLl de cada fracción fueron desnaturalizadas en el buffer de Laemmli, y sometidas a SDS-PAGE 10% y transferidas a una membrana de PVDF. Se revelo por western blot utilizando un anticuerpo policlonal contra RGP en una dilución 1:10.000 en PBS amablemente donado por K. Dhugga y el kit ECL (GE healthcare). El mismo procedimiento se utilizó con los marcadores de peso molecular (ovoalbúmina, LDH, β-galactosidasa y catalasa) que fueron separados por sedimentación. Ovoalbúmina y catalasa fueron detectados utilizando geles de SDS-PAGE y tinción de plata. La distribución de la LDH y β-galactosidasa se determinó enzimáticamente como se describe en Zewe y Fromm (1962) y Horwitz et.al (1964) respectivamente.

#### **4.- Protocolos de purificación**

##### 4.1.- Purificación de RGP de papa

Las preparaciones solubles y solubilizadas (~ 40 mg de proteína) se cromatografiaron en una columna en una columna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) acoplada a un equipo de cromatografía FPLC (AKTA, GE healthcare). 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 RGP en alícuotas de las mismas.

#### 4.2.-Purificación por afinidad

Las muestras provenientes de la columna de Mono Q se cromatografiaron en una columna de afinidad de UDP-hexanolamina unida a una matriz de agarosa cuya capacidad de unión es de 4  $\mu$ moles de UDP por ml de gel empaquetado. La columna de (0.5 x 5) se equilibró con 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 20 mM 2 $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM Cl<sub>2</sub>Mn (Buffer B), y luego de sembrada la muestra se lavó con 15 ml de buffer B. La elución de las proteínas unidas se realizó primero con 12 ml de 0,1 M KCl en buffer B y luego con 2 mM de UDP en buffer A. Se colectaron fracciones de 2 ml. Se midió actividad RGP luego de dializar ON contra buffer B, aquellas fracciones con actividad se guardaron a 4 °C.

#### 4.3.- Purificación por cromatografía de exclusión molecular en Superosa 12

Alícuotas del pico de Mono Q (200  $\mu$ l) fueron dializadas a: baja fuerza iónica (LIS: low ionic strenght) 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 20 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; a alta fuerza iónica (HIS: hight ionic strenght) 100 mM Tris-HCl pH 7.4, 20 mM  $\beta$ -mercaptoetanol 200mM KCl) en una membrana de diálisis de 1-14 MWCO y cromatografiadas en una columna de tamiz molecular Superosa 12 HR 10/30 (GE Healthcare, Bucks, UK). La columna fue equilibrada en condiciones LIS o HIS y eluída con un flujo de 0.5 ml min<sup>-1</sup>. Fueron colectadas fracciones de 500  $\mu$ l y ensayadas para actividad RGP sobre 250  $\mu$ l de cada una de las fracciones durante 1 hora en las condiciones descriptas. La columna fue calibrada con proteínas estándares de peso molecular: trypsinogen (29 kDa), carbonic anhydrase (48 kDa), y lactate dehydrogenase (176 kDa).

### **5.- Determinación de actividades enzimáticas**

#### 5.1.- Ensayo de actividad de RGP

La transferencia de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa, [ $^{14}\text{C}$ ]xilosa o [ $^{14}\text{C}$ ]galactosa a partir de UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc, UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Xil o UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]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  $\text{MnCl}_2$ , UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc, UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Xil o UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Gal (0.2 nmol, 80.000 CPM), 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) y enzima (10-300  $\mu\text{g}$  de proteínas) en un volumen final de 120 a 150  $\mu\text{l}$ . 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 y 50  $\mu\text{g}$  de BSA como carrier. Se centrifugó a 5000 rpm en una centrifuga de mesa, se descartó el sobrenadante y se lavó 2 veces con 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , se pasó a viales de plástico junto con 3 ml de solución centelleadora (UltimaGold, Sigma) y se midió radioactividad en el precipitado de TCA con un contador de centelleo líquido (Wallac, modelo 1214, RACKBETA).

## 5.2.- Ensayo de reversibilidad de la reacción de glicosilación

La RGP de tubérculo de papa proveniente de la columna Mono Q, fue glicosilada como se describió en el punto 4.1. La mezcla de reacción fue pasada por una columna Sephadex G-25 para sacar los restos de UDP-[ $\text{C}^{14}$ ]Glc. La fracción que contenía la RGP-[ $\text{C}^{14}$ ]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 [ $\text{C}^{14}$ ]Glc y UDP-[ $\text{C}^{14}$ ]Glc.

## 6.-Enzimas auxiliares

### 6.1.- Fosfatasa alcalina

Fracciones solubles de *E. coli* que expresaban la RGP de tubérculo de papa (100  $\mu\text{g}$ ) fueron preincubadas a 30°C durante 30 minutos en buffer 50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM  $\text{MnCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$  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-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc (0.2 nmol; 80000 CPM), y luego se

midió la incorporación de [<sup>14</sup>C]Glc al precipitado de 10% TCA como ya se describió en 4.1.

## 7.- Técnicas electroforéticas

### 7.1. 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 estándares 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 [<sup>32</sup>P] ó 15 días para [<sup>14</sup>C] a menos que se indique lo contrario.

### 7.2.-Electroforesis 2D en geles nativos (BNGE).

182 µg de proteínas extraídas de una fracción enriquecida en vesículas de Golgi de *Arabidopsis thaliana* a las cuales se les agrego buffer conteniendo 750 mM de ácido amino caproico, 50 mM bis-Tris and 40% (w/v) glycerol (pH 7.0) fueron solubilizadas para desarmar los complejos proteicos en 1.5% Triton X-100 e incubadas 30 min en hielo. Las proteínas solubilizadas fueron centrifugadas a 100,000xg durante 30 min a 4°C, and 5% (v/v) Serva blue (100 mM bis-Tris, 500 mM aminoacido caproico, 5% (w/v) Serva Blue G250) fue adicionado al sobrenadante. 36 µg de proteínas fueron separadas en un gel de gradiente de 5.5-12% acrilamida para la primera dimensión, y para la segunda, la calle de interés fue cortada y cargada en un gel SDS-PAGE 10% como describe Schagger y von Jagow (1991) y Schagger et al. (1994) excepto por el buffer desnaturizante del SDS-PAGE que fue 10% Glicerol; 2% SDS; 50 mM Tris pH 6.8; 0.002% bromofenol blue y 50 mM dithiotreitol. Después de la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Millipore) y la RGP fue detectada por western blot como se describe en el punto 8.1.

### 7.3.- Electroforesis en geles de agarosa

### 7.3.1.- 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.

### 7.3.2. 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.

## 8.- Técnicas inmunológicas

### 8.1.- Western blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa o PVDF según Towbin et al. (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 anticuerpo anti-RGP (dilución 1:1000) durante 1 hora. Luego de incubar las membranas durante 1 hora el anticuerpo primario, éstas se revelaron por quimioluminiscencia usando los reactivos comerciales ECL (GE healthcare). En los casos en que las proteínas enfrentadas al suero anti-RGP 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-RGP. La fracción de suero no unida a la matriz fue utilizada para los ensayos de Western blot.

## 9.- 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. También se utilizó el Nano-drop.

## **10.-Northern blot**

### 10.1.- Aislamiento de ARN

Los tejidos vegetales fueron congelados en nitrógeno líquido y molidos en mortero hasta obtener un fino polvo. Se extrajo RNA con Trizol LS reagent según instrucciones del fabricante. El ARN obtenido fue resuspendido en agua estéril y se determinó  $Abs_{260}/Abs_{280}$ .

### 10.2.- Marcación de sondas radioactivas

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

### 10.3.- 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  $Na_2PO_4$ , 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  $Na_2PO_4$ , 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.

## **11.- Aislamiento de ADN genómico de plantas de arroz**

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%

$\beta$ -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  $\mu$ l de agua estéril y tratado con RNasa durante 1 hora a 37 °C. El ADN fue conservado a -20°C.

## **12.- Preparación de sondas específicas**

### 12.1.- Diseño de sondas específicas

A partir de las secuencias encontradas en bases de datos (genebank) se diseñaron primers específicos para RGP 2 (número de acceso GeneBank OSA011079) se escogió la sonda levantada por los primers 16 y 17 de 294 pb (mtra 3). **Primer 16:** 5'-TGC AGA CTA TGA CCC ATT GAC TCA TGG TTG T-3', **Primer 17:** 5'-CTC TCT ACA ACC GCA ACG ACA TCA ACC G-3'. Para RGP 1 (número de acceso GeneBank OSA011078) se utilizó el fragmento que levantan los primers 1 y 2 (mtra 6); **Primer 1:** 5'-GAC ACC TTG GCT AAG CTG TCT ATC G-3', **Primer 2:** 5'-CCG CAG AAA GCA CTA AGC-3'; es un fragmento de 330 pb.

Sonda universal: 450 pb que revela las dos clases de osRGP, diseñada a partir de una zona de alta homología (primers 5 y 6, mtra 4). **Primer 5:** 5'-GGT GCA GAT TTC GTC CG-3'; **Primer 6:** 5'- TCC TTT TTG AGG TTA ACCG AAT-3'.

### 12.2.- 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 RGP1 y RGP2 (sondas específicas). Cuando se amplificó el ADNc completo del clon RGP1 se utilizaron como oligonucleótidos el M13/pUC Forward y Reverse amplification primers (Gibco). Cuando se sintetizaron sondas específicas para el clon RGP1 o RGP2 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.

### 13.- Preparaciones de plásmidos

Los plásmidos fueron purificados a partir de cultivos de *Escherichia coli* XL1Blue mediante el método de la lisis alcalina (Sambrook et al. 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.

### 14.- 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 DO<sub>600</sub>: 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 Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 0,5 M NaCl, 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 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.

#### 14.1.- 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 NiCl<sub>2</sub> se equilibró con 50 mM NaPO<sub>4</sub>, 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.

#### 15.- Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

<u>Cepas</u>	<u>genotipo</u>
<i>E. coli</i> XL1Blue (Stratagene)	<i>endA1 hsdR17(rk<sup>-</sup>,mk<sup>+</sup>) supE44 thi-1 λ<sup>-</sup> recA</i>
	<i>gyrA96 relA1 lac<sup>-</sup> /F' proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15</i>
	Tn10(Tet <sup>r</sup> )
<u>Plásmidos</u>	
pBluescript SK <sup>-</sup> (Short y col.,1988)	Amp <sup>r</sup> <i>lacZ</i> <sup>+</sup>
pUC19 (Yanisch-Perron y col., 1985)	Amp <sup>r</sup> <i>lacZ</i> <sup>+</sup>
pTrcHis (Invitrogen)	Amp <sup>r</sup> <i>lacZ</i> <sup>+</sup>

#### 15.-Técnicas espectroscópicas

15.1.- Espectro de absorción fue colectado en un espectrofotómetro marca Jasco 7850 usando una cubeta de 1 cm de paso óptico. El espectro fue medido de 200 hasta 350 nm, con un ancho de banda de 5 nm a una velocidad de 40 nm/min. Los datos fueron colectados cada 0.2 nm.

El buffer utilizado fue 25 mM Tris-HCl pH 7 o 25 mM buffer Fosfato pH 7.

#### 15.2.- Dicroísmo circular:

Se midió dicroísmo circular utilizando un equipo marca Jasco, modelo J815. Se midió desde 280 hasta 200 nm. Los intervalos de datos fueron colectados cada 0,2 nm a una temperatura de 20 °C con un paso óptico de 10 mm, a una sensibilidad estándar y una velocidad de 200 nm/min y 4 acumulaciones. Se graficó elipticidad cruda, mdeg en función de la longitud de onda.

El buffer utilizado fue 25 mM Tris-HCl pH 7 o 25 mM buffer Fosfato pH 7, con o sin 200 mM de KCl.

Para el dicroísmo circular del UDP, se utilizaron los mismos buffers con 0,5 mM UDP o 1 mM UDP.

### 15.3.- Fluorescencia

El espectro de fluorescencia fue medido en un equipo Aminco Bowman Series 2 spectrofluorometer equipado con célula termostática conectada a un baño de agua circulante. Se usó una cubeta de 1 cm de paso óptico. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm y el espectro de emisión fue colectado desde 310–400 nm. Para este caso los anchos de banda espectrales fueron seteados en 5 nm .

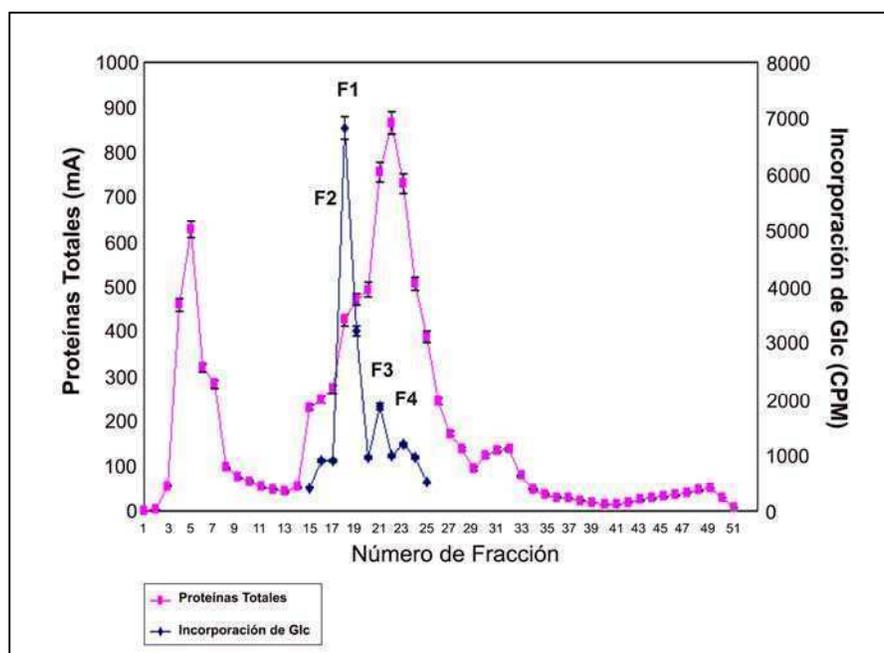
# *Resultados*

## **Capítulo 1-Estudio del mecanismo de reacción de la proteína RGP**

### **1-Análisis de la relación entre estructura y función de la proteína RGP**

#### **1.1- La fuerza iónica modula la glicosilación y la reversibilidad de la glicosilación de la proteína RGP**

Para investigar sobre la naturaleza de la formación de los oligómeros se utilizaron extractos proteicos provenientes de tubérculos de papa. Los extractos se purificaron parcialmente por cromatografía en una columna de intercambio iónico, Mono Q como se detalla en materiales y métodos. Si bien la RGP sale en una fracción definida por máxima actividad a 0,2 M de KCL (F1), el pico de elución es ancho, lo que sugiere heterogeneidad de carga propia de la enzima, que haría que interactúe diferencialmente con la resina de intercambio, (Figura 17).



**Figura 17 – Elución vs. Actividad RGP-** Se midió actividad RGP de las fracciones de Mono Q como se describe en Materiales y métodos. Se graficó proteínas totales en unidades de mili Absorbancia a 260 nm vs. Incorporación de Glc. F1, pico máximo de actividad de autoglicosilación, fracción a la izquierda del pico de máxima actividad, denominada F2, fracciones que salen a mayor molaridad de KCl, a la derecha de la F1, denominadas F3 y F4.

La fracción F1, que contiene al pico máximo, fue dividida en dos y dializada a alta fuerza iónica, HIS (por “high ionic strength”) o baja fuerza iónica, LIS (por “low ionic strength”). La glucosa radiactiva incorporada a la proteína fue determinada en el precipitado de TCA (Tabla 1) y el nivel de glicosilación fue determinado por phosphoimaging después de SDS-PAGE (Figura 18A). Los resultados muestran que una gran cantidad de glucosa radiactiva (8,25 pmol) se unió a la proteína, cuando la RGP previamente dializada a HIS fue incubada con UDP-[<sup>14</sup>C]Glc (Fig. 18A y Tabla 1). En contraste, el nivel de glucosa incorporada (3,09 pmol) a la proteína fue bajo cuando la reacción se hizo con la proteína dializada a LIS (Fig. 18A y Tabla 1).

Para determinar si la modificación de la glicosilación generada por el cambio de tamaño, tiene una contraparte en la reversibilidad de la reacción, se analizó la reversibilidad de la glucosilación por el agregado de UDP 1 mM por 30 min como se describe en materiales y métodos. Se encontró que la RGP dializada a LIS tiene baja reversibilidad y bajo nivel de glicosilación, mientras que la RGP dializada a HIS mostraba un alto nivel de glicosilación y de reversibilidad (Tabla 1 y Fig. 18A).

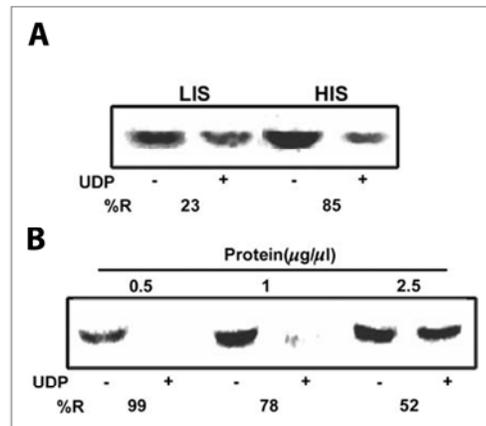
Condición	Proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Incorporación Glc (pmol)		%R <sup>a</sup>
		-UDP	+UDP	
LIS	1,0	3,09 $\pm$ 0,15	2,38 $\pm$ 0,12	23
HIS	1,0	8,25 $\pm$ 0,41	1,26 $\pm$ 0,06	85
Control	0,5	1,37 $\pm$ 0,07	0,01 $\pm$ 0,00	99
Control	1,0	2,37 $\pm$ 0,12	0,60 $\pm$ 0,03	78
Control	2,5	3,83 $\pm$ 0,19	1,85 $\pm$ 0,09	52

<sup>a</sup> Percentage of glycosylation reversibility  $\pm$  SD

**Tabla 1- Efecto de la fuerza iónica y la concentración de proteína sobre la incorporación de glucosa radiactiva al la RGP.** Alícuotas del pico máximo de Mono Q sin dializar (control) o después de diálisis a LIS o HIS, fueron incubadas con UDP [<sup>14</sup>C] Glc en presencia o ausencia de UDP. Los datos fueron representativos de tres experimentos independientes.

El porcentaje de reversibilidad de la glicosilación (%R) lo definimos como, la proporción entre la marca radiactiva que fue liberada de la RGP después de la incubación con UDP y la radiactividad asociada a la proteína en ausencia de UDP. Entonces, cuando la RGP fue dializada a baja fuerza iónica, la proteína mostró un bajo nivel de glicosilación y un bajo %R (23%), mientras que un alto nivel de glicosilación y

%R de la RGP (85%) fueron obtenidos cuando la RGP fue previamente dializada a alta fuerza iónica (Figura 18A). La radiactividad asociada a la RGP fue analizada por SDS-PAGE y cuantificada por phosphoimager. El %R obtenido usando este procedimiento muestra una alta correlación con lo obtenido cuantificando la radiactividad en los precipitados de TCA (Tabla 1). Resultados similares se obtuvieron cuando UDP-Gal y UDP-Xil se ensayaron como sustratos.

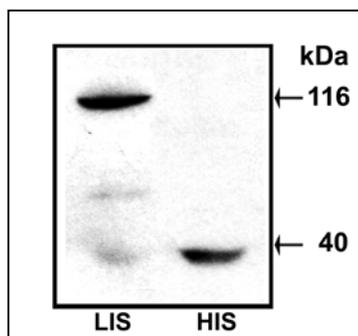


**Figura 18- A y B Efecto de la fuerza iónica y la concentración de proteínas sobre la autoglicosilación y la reversibilidad de la RGP.** **A-**Autorradiografía después de SDS-PAGE de una alícuota 1,0 µg/µl de la fracción F1 dializada a LIS o HIS. La proteína se incubó con UDP-[<sup>14</sup>C]Glc en condiciones de fuerza iónica similares a la de diálisis en presencia o ausencia de UDP. **B-**Autorradiografía después SDS-PAGE de la fracción F1 mantenida en las condiciones de elución de Mono Q. La proteína fue incubada a distintas concentraciones de RGP (0,5, 1 y 2,5 µg/µL) con UDP-[<sup>14</sup>C]Glc en ausencia o la presencia de UDP.

Estudios anteriores muestran que la separación por SDS-PAGE de extractos proteicos que contenían RGP daba como resultado una proteína de 40 kDa, que es el peso molecular reportado para la RGP (Dhugga et al. 1991). Sin embargo bajo ciertas circunstancias la proteína tiene menor movilidad electroforética y puede ser vista como una banda de 80 o 116 kDa, lo que sugiere que la RGP es parte de complejos de gran tamaño molecular (Wald et al. 1998, 2003).

Para analizar si la incubación a distintas condiciones de fuerza iónica, LIS o HIS tiene algún efecto sobre la movilidad electroforética, los extractos proteicos fueron dializados, separados por SDS-PAGE y revelados por Western blot usando un anticuerpo anti-RGP de papa (Figura 19). Los resultados muestran que después de la incubación a HIS la proteína migra como un monómero de 40 kDa, mientras que

después de LIS, se observa un descenso en la movilidad electroforética y la RGP se presenta como una proteína de 116 kDa, desapareciendo la banda correspondiente al monómero de 40 kDa. Este resultado sugiere que la RGP puede ser parte de complejos proteicos sensibles a la fuerza iónica.

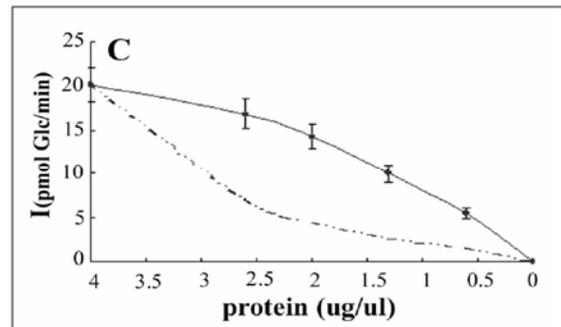


**Figura 19-Análisis de la formación de complejos de la RGP.** Análisis del pico máximo de RGP por Western-blot dializado a LIS o HIS. Fracciones de 350  $\mu$ l de la fracción F1 fueron dializadas a LIS (calle izquierda) o HIS (calle derecha). Estas alícuotas fueron precipitadas por TCA 10 % (w/v) y analizadas por SDS-PAGE y Western blot usando un anticuerpo anti-RGP de papa. Las flechas corresponden al tamaño molecular del monómero y de los complejos.

### **1.2- La concentración de proteínas afecta la glicosilación de la RGP**

En general, la interacción proteína-proteína puede verse favorecida por condiciones que estabilizan las interacciones hidrofóbicas propias de los oligómeros o por concentraciones altas de proteínas. Para estudiar si la concentración de proteína tenía algún efecto sobre la glicosilación de la RGP, diferentes concentraciones de la enzima fueron ensayadas para medir glicosilación (Figura 18B). Un aumento de la glicosilación de la RGP es visible entre 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l y 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de proteína en el ensayo, sin embargo un aumento de 5 veces en la concentración de proteínas solo produjo un incremento de 2 veces en la marca radiactiva asociada a la proteína (1,37 pmol vs. 3,83 pmol Glc incorporada). La cinética de la reacción de glicosilación fue analizada a lo largo del tiempo usando diferentes concentraciones de proteínas y se encontró que la incorporación del UDP-azúcar depende de la concentración de proteínas en un rango que va de 0,5 a 1  $\mu$ g/ $\mu$ l con una pendiente lineal, mientras que a mayor concentración de proteínas la habilidad de la RGP de autoglicosilarse alcanza una meseta, probablemente porque que la proteína se oligomeriza (tabla 1 y figura 18 y 19). En la figura 20, se

muestra el experimento inverso, en donde se va disminuyendo la concentración de proteínas, manteniendo la concentración de sustrato constante. Se confirma una relación lineal de glicosilación hasta 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteínas. Se puede ver que la velocidad inicial de incorporación de glucosa tiene una pendiente más lenta, desde 2,5 a 4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en donde la proteína es capaz de oligomerizarse. Este resultado podría deberse a que la dilución afectaría primero al desensamblado de oligómeros, haciendo que haya más RGP monoméricas libre para radioglicosilarse, antes de afectar el encuentro efectivo entre el sustrato y la enzima. Este resultado sugeriría que la capacidad de formación de complejos modularía directamente la actividad de la enzima, como se muestra en De Pino et al. (2007).



**Figura 20-Velocidad inicial (I) de auto-glicosilación del pico máximo en función de la dilución de proteína** (círculos llenos), comparando con la forma exponencial esperada para las enzimas que no alteran su velocidad por oligomerización (línea punteada).

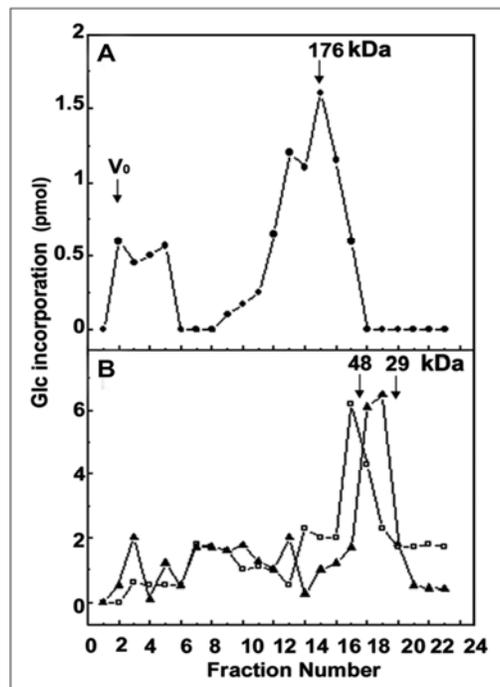
El patrón de glicosilación de la RGP no se modifica cuando se aumenta la concentración de proteínas totales inespecíficamente. La incubación de la RGP con distintas concentraciones de sero-albúmina bovina, durante 30 segundos ó 30 minutos no varió el patrón de glicosilación de la RGP, pero si lo hizo el aumento específico de RGP durante el ensayo (figura 18). Con respecto a la reversibilidad de la glicosilación, los resultados muestran un decaimiento en el %R cuando la concentración de proteínas aumenta (Tabla 1 y figura 18). A 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  fue observado un 100%R mientras que usando 1 y 2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteínas un %R menor fue observado (78% y 52%, respectivamente) (Figura 18B). Resultados similares fueron obtenidos cuando los experimentos de reversibilidad fueron hechos con 10 mM UDP en vez de 1 mM UDP, descartando toda posibilidad de pérdida de la reversibilidad por hidrólisis del UDP.

Los datos presentados sugieren que las condiciones que favorecen la interacción proteína-proteína producen un decaimiento tanto en la glucosilación como en la reversibilidad de la proteína RGP, en contraste las condiciones que desfavorecen la interacción proteína-proteína favorecen tanto la glucosilación como la reversibilidad.

### **1.3- La proteína RGP es parte de complejos que cambian de tamaño con el estado de glucosilación**

Investigamos el tamaño nativo de la proteína RGP usando cromatografía de exclusión molecular Superosa 12 en FPLC después de dializar a LIS o HIS (Figura 21). La cromatografía en Superosa 12 después de diálisis a LIS mostró un perfil heterogéneo de elución y tres picos conteniendo RGP activa (Figura 21A). El primer pico corresponde a una forma de gran tamaño molecular que eluye al límite del tamaño de exclusión ( $MW \geq 3 \times 10^5$ ). El segundo y el tercer pico corresponden a formas activas que migran entre 230 kDa y 176 kDa (Figura 21A). En contraste, luego de diálisis a HIS se observó un pico definido correspondiente a un tamaño molecular entre 76 kDa y 40 kDa (Figura 21B, triángulos negros). Esos resultados indican que la fuerza iónica produce cambios en el tamaño molecular, sugiriendo que la RGP formaría parte de estructuras de gran tamaño. La Figura 21B también muestra que la proteína a HIS tiene mayor actividad que la proteína a LIS (un máximo de 6 pmol vs. 1,5 pmol de Glc incorporada a la proteína, respectivamente).

Para analizar si las formas de alto peso molecular obtenidas después de diálisis a LIS, podían ser interconvertidas en formas de bajo peso molecular, otra alícuota de RGP fue dializada a LIS, re-dializada a HIS y cromatografiada en Superosa 12, como se describe en la Figura 21B. Esos resultados muestran la aparición de un pico en un tamaño de exclusión que corresponde 76-40 kDa de RGP activa luego de re-diálisis de LIS a HIS (Figura 21B, cuadrados blancos). Más aun, no hay pérdida de actividad debida al cambio de tamaño. Estos resultados permiten concluir que el monómero es mas activo y exhibe mayor glicosilación y reversibilidad que la RGP que presenta formas de alto peso molecular.



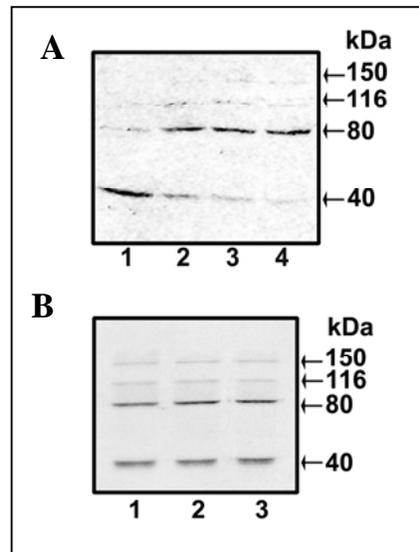
**Figura 21- Efecto de la fuerza iónica sobre la formación de complejos de RGP.** Cromatografía en Superosa 12 de **A** fracciones dializadas a LIS (círculos llenos), **B** fracciones dializadas a HIS (triángulos llenos) o primero dializadas a LIS seguidas de diálisis a HIS (cuadrados abiertos). Las alícuotas fueron incubadas con UDP- $^{14}\text{C}$ Glc durante 2 horas y la glucosa radiactiva incorporada a la proteína RGP fue determinada en el precipitado de TCA.  $V_0$  corresponde al volumen muerto de la columna; las flechas corresponden al volumen de elución de markers proteicos y los números a sus tamaños moleculares

Para estudiar el efecto de la glicosilación sobre la formación de complejos proteicos, ensayamos la incubación de la RGP con UDP-Glc, UDP-Gal y UDP-Xil, en condiciones que promueven la formación de multímeros de RGP. Los resultados sugieren que los cambios en la movilidad electroforética de la RGP en SDS-PAGE podrían deberse a la capacidad de formación de complejos propia de la RGP. Entonces, después de la incubación de StRGP recombinante con cualquiera de los 3 nucleótidos-azúcares radiactivos con los que es capaz de autoradioglicosilarse, la proteína fue sometida a SDS-PAGE y revelada por Western blot usando un anticuerpo anti-StRGP (Figura 22A) o por autorradiografía (Figura 22B), como se describió en materiales y métodos. Antes de la reacción de glicosilación la proteína mostraba una banda de 40kDa como la más prominente (Figura 22A, calle 1), sin embargo como se muestra en la Figura 22, calle 2-4, la cantidad de monómero disminuye significativamente luego de la

glucosilación con cualquiera de los UDP-azúcares, con UDP-Glc, UDP-Xil and UDP-Gal (43%, 27% and 21%, respectivamente). Por el contrario, las bandas de mayor tamaño molecular aumentan luego de glicosilación.

La autorradiografía muestra que la banda de 80-kDa es muy intensa pero también lo es la señal para la forma monomérica. Por el contrario, a nivel de proteína el monómero desaparece, esta aparente discrepancia puede deberse a la mayor sensibilidad de la detección de la proteína por autorradiografía con respecto al Western blot.

Estos resultados sugieren fuertemente que la glicosilación de la RGP promueve la formación de complejos proteicos radioglicosilados, ya que el perfil de proteínas muestra una escalera con incrementos en múltiplos de 40 kDa, lo que indica que RGP glicosilada formaría parte de multímeros probablemente formados por moléculas de RGP.



**Figura 22- La formación de complejos regula la glicosilación de la RGP.** A Análisis por Western-blot de la StRGP recombinante incubada en ausencia de UDP-azúcar (calle 1) o incubada con UDP-Glc (calle 2), UDP-Xil (calle 3) y UDP-Gal. (calle 4) en condiciones LIS. La RGP fue revelada usando un anticuerpo anti-StRGP o B Autorradiografía. Las flechas corresponden al peso molecular del monómero o de los oligómeros.

### **1.4-La fosforilación de la proteína RGP modula tanto el tamaño como la actividad de autoglicosilación**

La purificación de la proteína RGP por cromatografía de intercambio aniónico en Mono Q (intercambia aniones mediante aminas terciarias y cuaternarias) muestra que la misma eluye en varias fracciones a distintas concentraciones de KCl (Figura 17). Este comportamiento sugiere que la proteína RGP tendría, en solución, distinto balance de cargas interactuando de forma más débil, fracciones que eluyen a una molaridad menor de KCl, (fracciones a la izquierda del pico de máxima actividad, denominada F2) o más fuerte con la resina de intercambio, como las fracciones que salen a mayor molaridad de KCl, a la derecha de la F1, denominadas F3 y F4. Algunos de los factores que podrían modular esta heterogeneidad de cargas observada, serían: presencia/ausencia de fosfatos, glucosilación endógena, oligomerización.

Cuando se testea la glicosilación y la reversibilidad de la proteína RGP de las diferentes fracciones, se observa un comportamiento que varía con el perfil de elución (Tabla 2). Si bien la F1, siempre mostró alto grado de reversibilidad en su glicosilación, no se observa lo mismo para las otras fracciones.

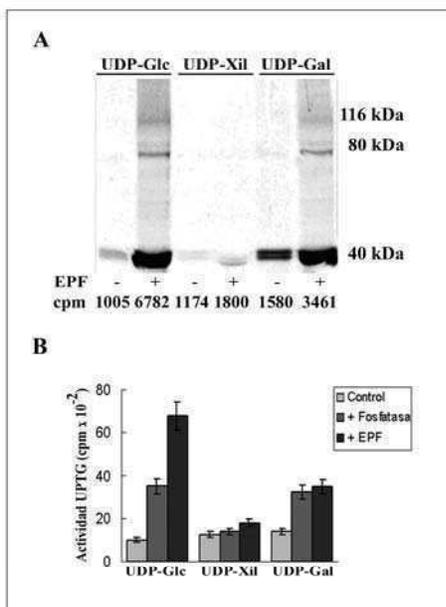
<b>Fracción</b>	<b>UDP</b>	<b>CPM</b>	<b>%R</b>
<b>F1</b>	-	527±46	78
	+	116±34	
<b>F2</b>	-	2164±89	86
	+	263±67	
<b>F3</b>	-	1490±27	42
	+	784±35	
<b>F4</b>	-	725±52	40
	+	365±55	

**Tabla 2 – Actividad y Reversibilidad vs. carga en solución-** Efecto de la carga sobre la incorporación de glucosa radiactiva al la RGP. Alícuotas de las fracciones de Mono Q fueron incubadas con UDP [<sup>14</sup>C] Glc en presencia o ausencia de UDP. Los datos fueron representativos de tres experimentos independientes.

Entonces el pico ancho en que eluye la RGP sugeriría una heterogeneidad de cargas que podría deberse entre otras razones, a modificaciones en el tamaño (los complejos tendrían otra distribución de cargas), o diferencias de carga netas (por

fosfatos o azúcares endógenos). Como se mencionó en la Introducción, se sabe que la proteína RGP tiene 19 sitios probables de fosforilación, y en el laboratorio se demostró que la StRGP se fosforila *in vitro* usando proteínas kinasas exógenas, y se desfosforila usando fosfatasa alcalina y el factor endógeno de papa (endogen potato factor, EPF, Testasecca et al. 2004 y Figura 23).

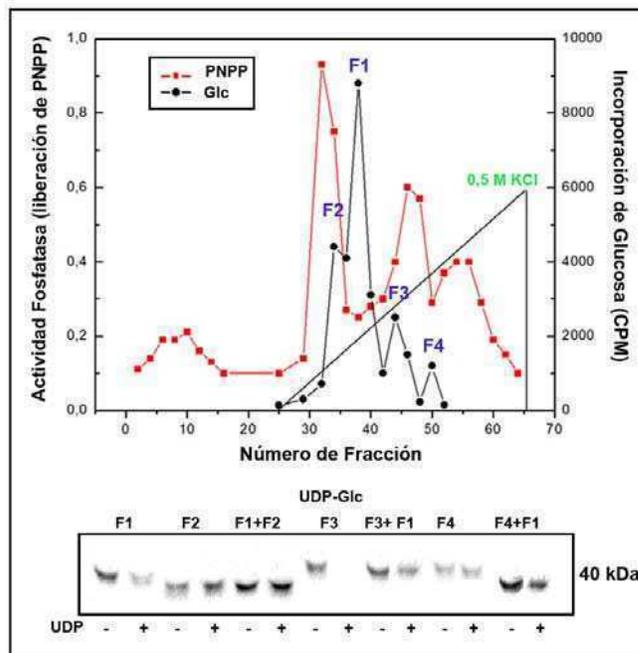
Con el objetivo de estudiar si el grado de fosforilación de la StRGP está modificando la actividad de la proteína, se midió actividad fosfatasa en todas las fracciones de Mono Q. En la figura 24A se ve el perfil de actividad RGP y el perfil de actividad fosfatasa medida como liberación de pNPP (p-nitrophenylphosphate). Se pueden observar 4 máximos de actividad fosfatasa, dos de los cuales co-eluyen con las fracciones F2 y F3. La fracción F2 es la primera fracción con actividad RGP, co-eluye con el segundo máximo de actividad fosfatasa. Esta fracción eluye con una menor molaridad de KCl, lo que indica que tiene una menor carga negativa, sugiriendo que podría estar más desfosforilada. Las demás fracciones no se solapan completamente con los máximos de actividad fosfatasa, y muestran una interacción más fuerte con la resina



**Figura 23- Efecto de la fosfatasa alcalina y el factor endogeno de papa (EPF) sobre la actividad de la enzima recombinante.** Extractos de *E.coli* (150µg) que expresaban StRGP se preincubaron con fosfatasa alcalina (5U) o EPF que eluye a 0,3 M KCl. Se agregaron los 3 nucleótidos azúcar, y se incubó durante 30 min más. Se terminó la reacción por precipitación con TCA 10% y se dividieron las muestras en 2 alicuotas **A** Separadas por SDS-PAGE y autorradiografía **B** Se determinó radactividad incorporada al

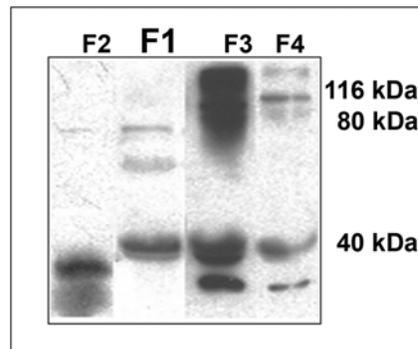
precipitado de TCA y se graficó actividad vs. fosfatasa alcalina exógena o EPF (P. Testasecca Tesis de Licenciatura, 2003)

Para analizar los cambios sobre la proteína monomérica, las diferentes fracciones eluidas de la columna de intercambio iónico se ensayaron para actividad RGP, incubándose solas o mezcladas entre sí (como se indica en la Figura 24B) y se sometieron a SDS-PAGE 15% para poder observar diferencias más pequeñas en el monómero. Se reveló por autorradiografía (Figura 24B). La mezcla de F1 con F2, dio como resultado una disminución de la movilidad electroforética y un aumento de actividad RGP. Si bien la RGP se hizo no reversible, este hallazgo podría explicarse ya que otros resultados del laboratorio mostraron que cuando la RGP es desforilada y luego glicosilada (ver figura 23, Testasecca 2003) se hace más activa, y lo que se ve



**Figura 24- La presencia de actividad fosfatasa modula la actividad, la reversibilidad y la movilidad electroforética de la proteína RGP- S140** de proteínas fueron cromatografiados por Mono Q y eluidos con un gradiente lineal de KCl. **A** Se ensayó actividad RGP (círculos negros) y actividad fosfatasa (factor endógeno de papa, cuadrados rojos) para todas las fracciones como se describe en materiales y métodos. Se detalla la posición de los máximos de actividad RGP, y la máxima molaridad de KCl usada para el gradiente. **B** Las fracciones desde F1 a F4 fueron incubadas solas o mezcladas entre sí para ensayar actividad RGP en presencia o en ausencia de UDP. Las fracciones fueron precipitadas con TCA 10%, sometidas a SDS-PAGE 15% y reveladas por autorradiografía. 40 kDa es el tamaño molecular del monómero de la fracción F1.

como una disminución de la reversibilidad, podría ser una disminución de la glucosilación endógena con la que fue purificada la RGP, generada por el UDP presente en cantidades milimolares, o un aumento en el nivel de de-oligomerización, generada también por la presencia del UDP. La fracción F3 que co-eluye parcialmente con un máximo de fosfatasa, tiene un nivel de actividad similar al de la F1, pero es completamente reversible. Sin embargo la mezcla de la F1 con la F3 se comporta como la fracción F1, (Figura 24) que podría explicarse por un compromiso entre la presencia de fosfatos y la formación de estructuras de alto peso molecular (Figura 25). La fracción F4 que es la menos activa, y es la que eluye a mayor fuerza iónica (Figura 24A), cuando es mezclada con la F1 se hace mucho más activa, y aumenta sensiblemente su movilidad electroforética (Figura 24B). Cuando estas mismas fracciones se analizan mediante un gel SDS-PAGE 10%, para observar las bandas de alto peso molecular, se observa que tanto la fracción F3 como la F4 forman estructuras de gran tamaño (Figura 25). Los resultados muestran un patrón de bandas diferente para las fracciones a izquierda y derecha de la F1 (Figura 24 y 25), que podría explicarse por un estado de fosforilación diferente según co-eluyan o no con la actividad fosfatasa concomitantemente con un estado de oligomerización preexistente (Figura 25, 26 y 27), y resistente al SDS-PAGE (De Pino et al. 2007).

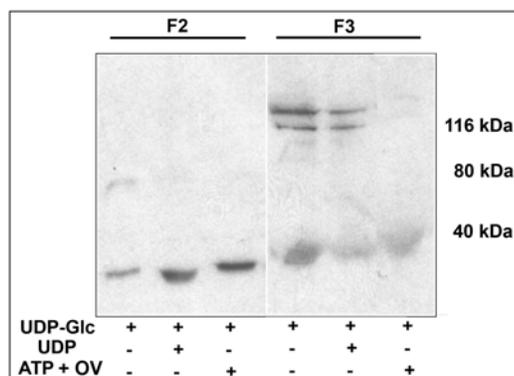


**Figura 25- Análisis del tamaño de las fracciones de Mono Q-** Fracciones de Mono Q fueron cuantificadas para sembrar 100 µg de proteínas totales, las proteínas fueron precipitadas con TCA 10%, separadas por SDS-PAGE y reveladas por Western blot.

Más aún, las diferencias observadas tanto en el perfil de elución como por actividad y SDS-PAGE, sugieren que hay más de un factor regulando la RGP *in vivo* y que co-purifican con ella durante la separación cromatografía, estos factores podrían ser fosfatasas y/o kinasas, que afectarían diferencialmente las diferentes formas de la RGP,

así como también la presencia de glucosilación endógena de la RGP. Por ejemplo la ausencia de fosfatos y la presencia de glicosilación endógena podría verse reflejada en la fracción F2, que tiene gran movilidad electroforética, pero no es particularmente activa. En el caso de la fracción F1, es notoria la ausencia de glicosilación endógena, pero probablemente la enzima esté fosforilada. Y en el caso de las fracciones F3 y F4 que co-eluyen parcialmente con el tercer máximo de actividad fosfatasa, lo que sugeriría que la RGP presente en esas fracciones está desfosforilada, y también glicosilada endógenamente, estos dos hechos conjuntos estarían modulando la oligomerización. (De Pino et al. 2007).

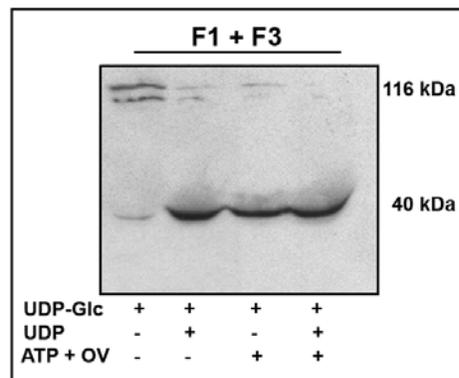
Para analizar cómo actúa la presencia o ausencia de fosfatos sobre el cambio de tamaño, se midió actividad RGP en condiciones que inhiben las fosfatasas alcalinas, como la presencia de ortovanadato (OV) y ATP (Figura 26), se puede ver que, la RGP de la F3 se hace monomérica (Figura 26, calle 6) y que la de la F2, cambia la movilidad electroforética, similares resultados fueron obtenidos con la StRGP recombinante cuando es tratada con la fracción que eluye a 0,36 M KCl, que es el tercer máximo de actividad fosfatasa (Figura 23, calle 2, 4 y 6). Otros ensayos del laboratorio muestran que el tratamiento con EPF o con fosfatasa alcalina, hace que disminuya el tamaño de la enzima, y que se vuelva mucho más activa. Entonces cambio de movilidad electroforética es susceptible al tratamiento con inhibidores de fosfatasas, lo que claramente sugiere presencia de fosfatos en la RGP (Figura 26 y 27).



**Figura 26- Efecto de las condiciones que inhiben las fosfatasas sobre la glucosilación y el tamaño de la RGP que co-eluye con fracciones con actividad fosfatasa.** Alícuotas provenientes de la F2 (calles 1-3) o de la derecha del pico máximo (F3, calles 5-7) fueron ensayadas para actividad RGP en condiciones que inhiben la fosfatasa alcalina, presencia de ATP y OV (calles 3 y 7), así como también en condiciones

que inhiben la glucosilación, presencia de UDP (calles 2 y 3). ATP: adenosintrifosfato, OV: ortovanadato de sodio.

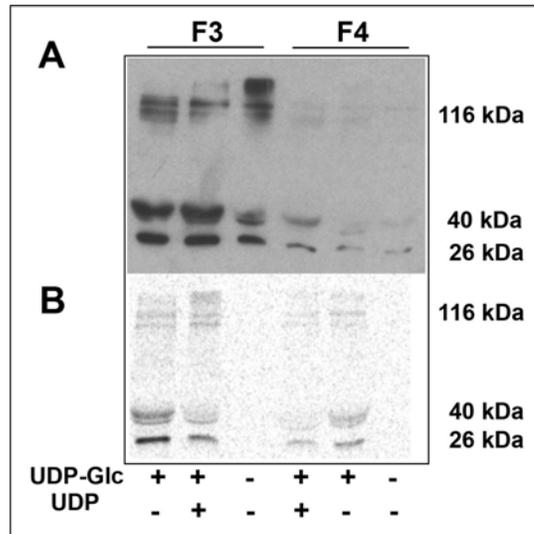
También se analizaron estas mismas condiciones sobre la mezcla de la fracción F1 con la F3 (fracción que co-eluye con máximo de fosfatasa, Figura 27), se puede ver que las condiciones que inhiben fosfatasas aumentan la autoglicosilación del monómero y modulan el tamaño.



**Figura 27- Efecto de las condiciones que inhiben las fosfatasas sobre la glucosilación y el tamaño de la RGP de la fracción con máxima actividad.** Una alícuota de la F1 se mezcló con la F4 y fue ensayada para actividad RGP en condiciones que inhiben la fosfatasa alcalina, presencia de ATP y OV (calles 3 y 4) así como también en condiciones que inhiben la glucosilación, presencia de UDP (calles 2 y 4),

Estos resultados sugieren que la RGP de la F1 estaría en forma de monómeros fosforilados, imposibilitada de oligomerizarse, pero no de glicosilarse, y las demás fracciones serían variaciones de estos estados posibles. En presencia de una fosfatasa la actividad aumentaría así como también la oligomerización (Figura 25, 26, 27 y 28).

Con respecto a las 2 fracciones que eluyen a la derecha de la fracción F1, que son las que muestran las estructuras de gran tamaño molecular, se observa que la F3 está más activa que la F4, lo que podría deberse a un estado diferencial de fosforilación, ya que el patrón de bandas es similar.



**Figura 28-** Análisis del tamaño de las fracciones de Mono Q a la derecha del pico máximo- Fracciones de Mono Q a la derecha del pico máximo fueron ensayadas para actividad RGP en presencia o ausencia de UDP, la reacción se detuvo con 10% de TCA, y las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y reveladas por Western blot A, o por autorradiografía B en

### **1.5-La estructura de la stRGP**

#### **1.5.1-Los complejos de la StRGP también estarían estabilizados por puentes disulfuro**

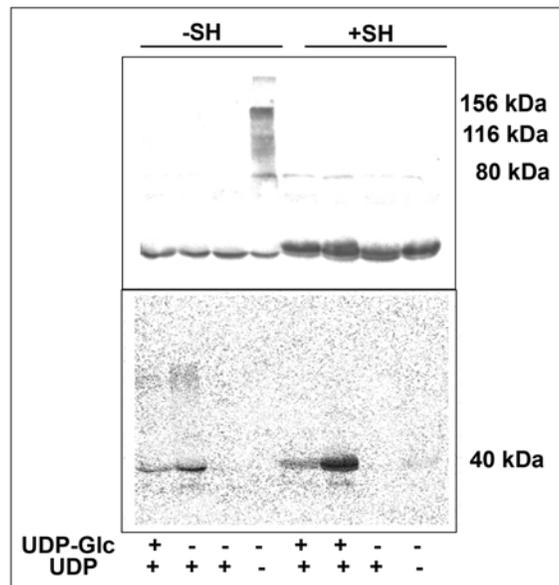
El estado de oxidación generalmente modifica el estado de oligomerización de las proteínas. Analizando la secuencia de aminoácidos de la StRGP, se vio que la proteína tiene 12 residuos de cisteína, este hecho hace que sea un excelente candidato a formar puentes disulfuro intracatenarios, modificando la estructura secundaria, o intercatenarios, lo que estabilizaría la formación de oligómeros. Para analizar cual era el caso de la proteína RGP, preincubamos la proteína proveniente de la fracción F1 en presencia, condiciones reductoras, o en ausencia de 2-mercaptoetanol, condiciones no-reductoras, luego se ensayó actividad RGP y las proteínas se separaron por SDS-PAGE, revelándose por Western blot o autorradiografía (Figura 29). Se puede ver que la proteína en condiciones HIS y en presencia del agente reductor migra como una banda de 40 kDa. Por el contrario, la remoción del agente reductor favorece la formación de estructuras de alto peso molecular y disminuye la cantidad de monómero (Figura 29, calle 8 y 4).

Cuando se mide la actividad de la RGP en ambas condiciones, el monómero se glicosila en mayor medida en presencia del agente reductor (Figura 29, calle 2 y 6), de este resultado se puede inferir que los puentes disulfuro no serían intracatenarios, ya que al agregar el agente reductor, la proteína hubiera perdido su estructura, y por lo tanto la actividad.

Estos resultado indican que el agregado del agente reductor afecta mayoritariamente a los complejos de la RGP, lo que sugeriría que éstos estarían estabilizados por puentes disulfuro intercatenarios.

También se observa que la reversibilidad es mayor en presencia del agente reductor, lo que también apoya la inferencia de que el mayor %R esta ligado a la ausencia de oligómeros. En presencia del sustrato UDP-Glc, del UDP o de ambos (Figura 29, calles 1-3) se observan débilmente las bandas de alto peso molecular, aunque solo por autorradiografía sugiriendo que hay un cambio de tamaño asociado a la unión del sustrato cuando la RGP es capaz de oligomerizarse, es decir en ausencia del agente reductor. Si bien las bandas de 40 kDa son menos intensas en ausencia de agente reductor que en presencia del mismo, esto podría deberse al tamaño final que es capaz de alcanzar la RGP en condiciones oxidantes, por ejemplo bandas de alto peso molecular que son visibles por autorradiografía.

Una observación cuidadosa de la autorradiografía muestra una banda de alto peso molecular débilmente radioglicosilada en ausencia de agente reductor (Figura 29, calle 2). Y en presencia del agente reductor, es posible ver otra banda débilmente glicosilada más pequeña que el monómero (Figura 29, calle 6). Experimentos similares con fracciones de Mono Q que eluyen a la derecha del pico máximo (co-eluyen con la actividad fosfatasa) también muestran las bandas de alto peso molecular radioglicosiladas, como se mostró en la figura 27.



**Figura 29-** El tamaño de la RGP varía con el estado de oxidación y con la unión al sustrato. La fracción F1 de Mono Q fue dividida en dos alícuotas de 500 ul, preincubada en presencia de agente reductor (calles 5-8) o en ausencia (calles 1-4). Las alícuotas fueron ensayadas para actividad RGP, en presencia (calle 1 y 5) o en ausencia de UPD (calles 2 y 6) o fueron incubadas solo con UDP (calles 3 y 7), o fueron incubadas con buffer en condiciones HIS (calles 4 y 8).

Se corroboró la presencia de puentes disulfuro intracatenarios usando el software DISULFIND en el servidor PredictProtein ([www.predictprotein.org/](http://www.predictprotein.org/)) (Figura 30). El resultado obtenido dio un DB\_state de 0, para todas las cisteínas presentes en la secuencia, con una confianza alta en cada caso (valores de confianza que van de 1-10, siendo 1 el mínimo y 10 el máximo)

AA	MAAATPLLKDELDIVIFTIRNLDLFEMWRPFQPYHLIVQDGDPSKIIKVPGEFQYELYNRNDINRILGPKASCISFK										
DB_state	0										
DB_conf	8										
AA	DSACRCFGY	MVSKK	KYIY	DD	CFVAKDP	SGKDINALEQ	HIK	NLLCP	STPHFFNTLY	DPYRDGAD	FVIRGYPFSMREGA
DB_state	0	0		0			0				
DB_conf	8	9		8			9				
AA	PTAVSHGLWLNIPDYDAPTQLVKPHERNTRYVDVAVMTIPKGTLPFCGMNLAFFDRDLIGPAMYFGLMGDGGQPIGRYDDM										
DB_state	0										
DB_conf	9										
AA	WAGWCTKVICDHLGLGIKTLGPIYWHKASNPVNLKKEYNGIFWQEEIIPFQAAATLPKECTTVQQCYLELSKQVKKK										
DB_state	0	0							0	0	
DB_conf	8	8							8	7	
AA	LSSIDPYFTKLGEMVTVIEWDELNLLGTTWLSCLSPMVQQLKSRCY										
DB_state	0										
DB_conf	6										

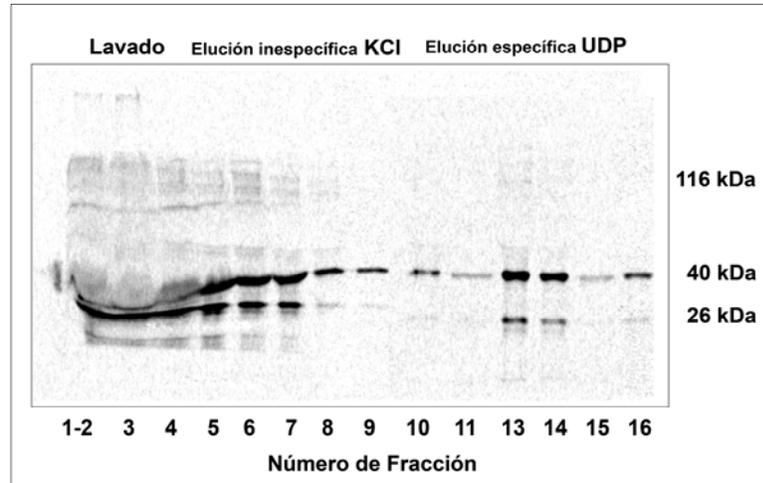
Figura 30- Análisis de la secuencia de aminoácidos del la StRGP buscando puentes disulfuro intracatenarios. La secuencia de la proteína se cargó en el servidor [www.predictprotein.org](http://www.predictprotein.org) y la predicción fue hecha usando el software DISULFIND. Se muestra el output tal cual, DB\_State es la probabilidad de que esa cisteína forme puentes disulfuro, y DB\_conf es el intervalo de confianza de la predicción. (Ceroni et al. 2006)

### **1.5.2-La proteína StRGP tiene una estructura secundaria en la que predominan las hélices alfa**

La StRGP se purificó a homogeneidad para hacer ensayos estructurales con la proteína pura. Las fracciones que eluyen de la columna de intercambio iónico Mono Q con mayor actividad fueron agrupadas y se purificaron por una columna de afinidad que contenía UDP unido a una hexanolamina en una matriz de agarosa, como se describe en materiales y métodos.

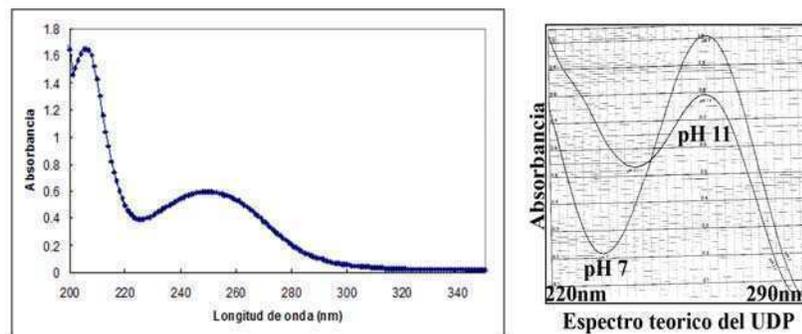
Se puede ver que la RGP eluye mayoritariamente con 2 mM de UDP, aunque es posible ver que también sale en el lavado (Figura 31) y tiene una elución inespecífica con KCl.

Estas fracciones eluidas por afinidad se agruparon dividieron en dos alícuotas, una de ellas para secuenciar y caracterizar las bandas de alto peso molecular y la otra alícuota fue utilizada para experimentos de dicroísmo circular (Figura 33), y fluorescencia a distinta fuerza iónica (Figura 34).



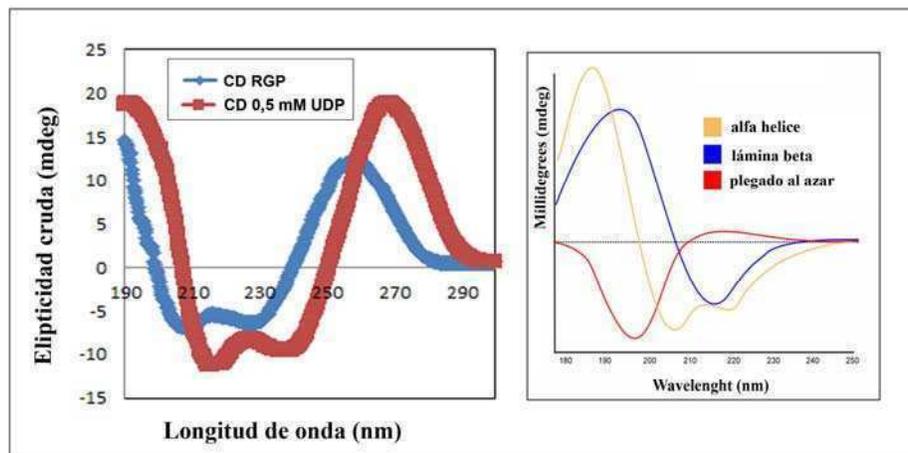
**Figura 31- Perfil de actividad y tamaño de la StRGP eluída de una columna de afinidad-** Las fracciones con mayor actividad eluídas de la comuna de Mono Q fueron agrupadas, dializadas durante 12 horas a baja fuerza iónica en presencia de 5mM  $MnCl_2$  y separadas por una columna de afinidad UDP-hexanolamina agarosa. La columna fue equilibrada en buffer LIS más 5 mM de  $MnCl_2$ . El primer lavado, se hizo en buffer LIS- $MnCl_2$  más 0.1 M KCl, para luego eluir con 2 mM UDP en 100 mM Tris-HCl 2-mercaptoetanol.

En la figura 32, donde se muestra el espectro de absorción UV de la proteína, se puede observar dos máximos un poco corridos, con respecto al correspondiente a proteínas o al UDP en solución. Esto se debe a la unión de alta afinidad del UDP a la RGP.



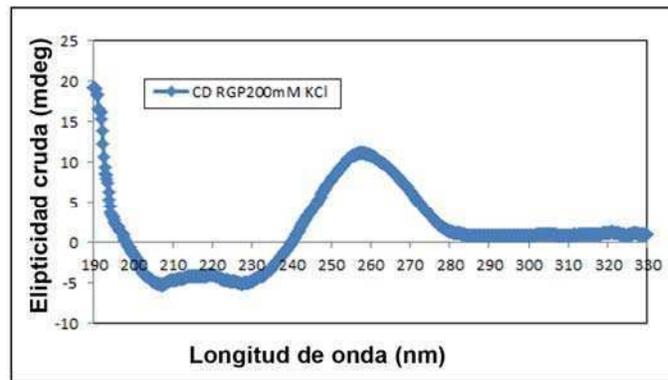
**Figura 32- Espectro de absorción de la proteína RGP.** Las fracciones purificadas por afinidad que eluyeron a 2 mM UDP fueron agrupadas, dializadas exhaustivamente a 25mM de Tris y se hizo un espectro de absorción, panel izquierdo. El panel derecho muestra el espectro de absorción del  $Na_2UDP \cdot 3H_2O$  (51,7 mg/l) a pH 7 y a pH 11

Con los datos anteriores, se llevaron a cabo experimentos de dicroísmo circular (Figura 33). Se puede ver que el espectro de dicroísmo circular de la proteína RGP corresponde en el UV lejano mayoritariamente a un alfa hélice, también se puede ver un máximo entre 260 y 280, que comparando con el espectro del UDP en solución (Figura 33, línea roja) es debido al dicroísmo del nucleótido, es el UDP unido a la proteína, que no fue removido por la diálisis, ya que se une a la enzima con mucha afinidad.



**Figura 33-Dicroísmo circular de StRGP purificada por afinidad-** Las fracciones que eluyeron a 2 mM UDP se agruparon, se dializaron exhaustivamente contra 25mM Tris pH 7.4 para remover todo el UDP libre y se hizo dicroísmo circular (circular dichroism, CD). El panel izquierdo muestra el espectro de CD de la RGP junto con el del UDP, y el derecho es un espectro teórico de proteínas con distintas estructuras secundarias.

Se llevó a cabo el mismo experimento de dicroísmo circular en condiciones de alta fuerza iónica, se incubó 20 minutos con 200 mM KCl, pero no se observaron diferencias sobre la estructura observada en el espectro de CD (Figura 34).

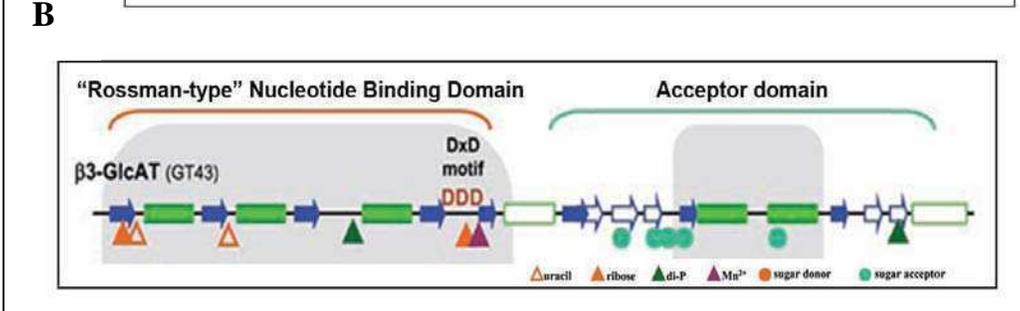
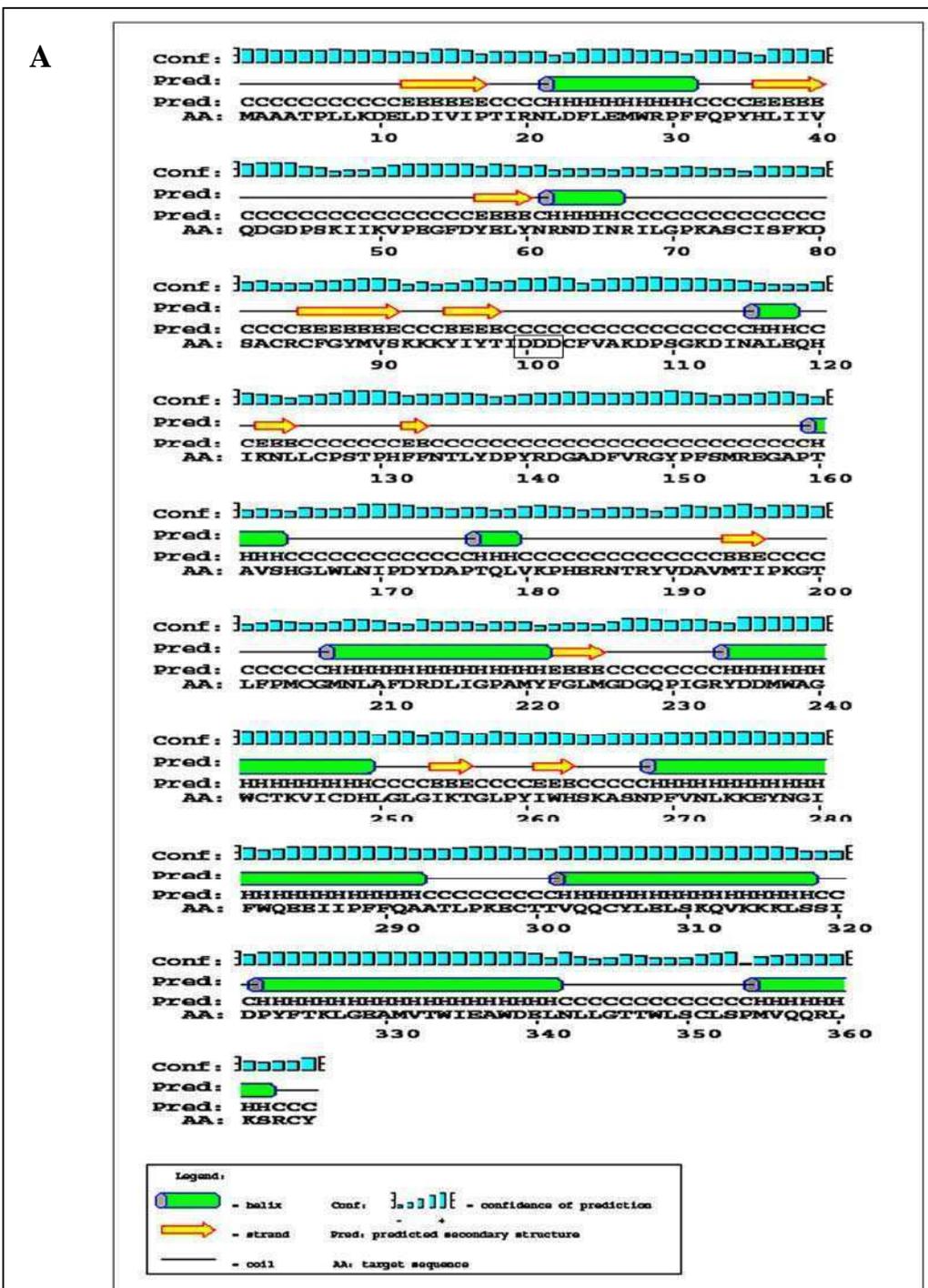


**Figura 34-Dicroísmo circular de StRGP purificada por afinidad en condiciones HIS-** Las fracciones que eluyeron a 2 mM UDP de la columna de afinidad, se agruparon, se dializaron exhaustivamente contra 25mM Tris pH 7.4 para remover todo el UDP posible, y se hizo dicroísmo circular (circular dichroism, CD) en condiciones de alta fuerza iónica.

Un espectro de dicroísmo similar muestran Geren et al. (1975) para una UDP-galactosiltransferasa de mamíferos incubada en presencia de  $Mn^{2+}$  y UDP-Gal.

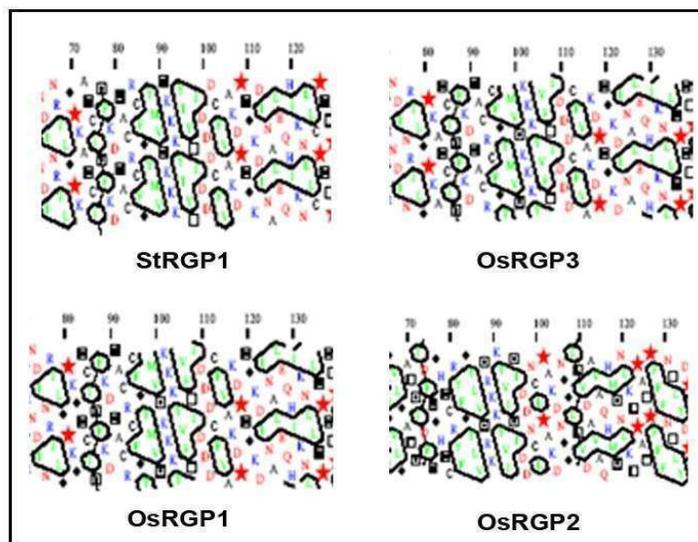
Usando un software que predice estructura secundaria a partir de la secuencia de aminoácidos (Figura 36A), se verificaron los resultados obtenidos por CD, usando el software PROFsec del servidor Predictprotein ([www.predictprotein.org](http://www.predictprotein.org)). Se puede observar que los dominios plegados en alfa hélice son mayoritarios, y que la confianza de la predicción es aceptable.

Hace relativamente poco que se clasificaron las RGPs en una familia de glicosiltransferasas propia, GT 75, son glicosiltransferasas A que tienen un dominio estructural descrito como “Rossmann-fold like” (Figura 35B) que consiste en el motivo DxD insertado en un motivo estructural conservado, que está compuesto por 3 o más laminas beta paralelas unidas por dos alfa hélices, en el siguiente orden topológico: beta-alfa-beta-alfa-beta. Cada plegamiento tipo Rossmann puede unir sólo un nucleótido a la vez, para unir más de un nucleótido se necesita dos pares de ese motivo estructural, que pueden estar en la misma proteína o en un dímero. Esto concuerda con las varias formas que puede adoptar la RGP y con otro resultado del laboratorio donde se observó que cada monómero de RGP unía solo un residuo azúcar (Bocca et al. 1999).



**Figura 35- Predicción de estructura secundaria.** A- Predicción de estructura secundaria utilizando un software de PredicProtein, que predice estructura secundaria a partir de la secuencia de aminoácidos. Helix=37.0%, Strand=11.5%, Loop=51.5% B- Representación esquemática del dominio catalítico de la superfamilia de Glicosiltransferasas –A que invierten la configuración. La localización de los 2 dominios mejor conservados estructuralmente está sombreada con gris. Láminas- $\beta$  y  $\alpha$ -hélices están representadas por flechas azules y cilindros verdes respectivamente. Los cilindros vacíos corresponden a las estructuras secundarias más conservadas de la superfamilia GT-A.

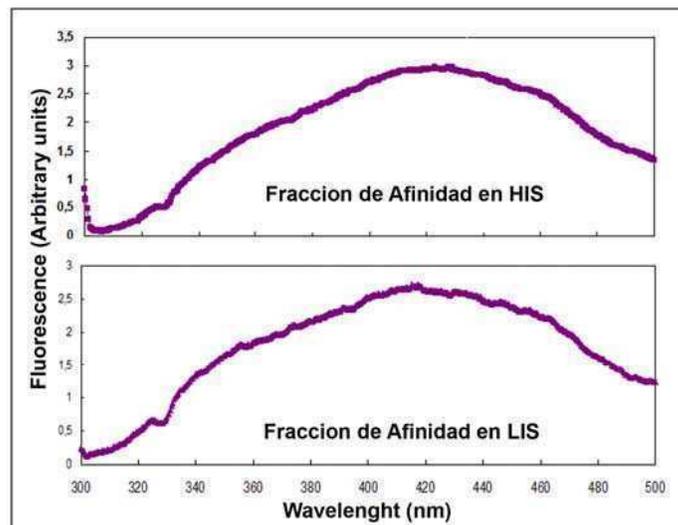
Entonces, las GT-A, familia a la cual pertenece la RGP, tendrían dos dominios (Figura 35B), como se explicó en el párrafo anterior, la primera región contiene 100 aminoácidos aproximadamente en el amino terminal, que corresponde mayoritariamente al dominio de unión a nucleótidos DxD; y la segunda región comprende un motivo estructural formado por  $\beta 6$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$ , que corresponde al dominio aceptor (Breton et al. 2006) En la figura 36, se puede observar que el motivo DxD siempre ocurre después de un cluster hidrofóbico vertical que indicaría una lámina- $\beta$  (Figura 35 A y B, y Figura 36) y también precede otro cluster hidrofóbico. Esta estructura está muy conservada dentro de las RGPs, y de las GT-A en general (Breton and Imberty 1999). Las proteínas RGP, como se dijo anteriormente unen  $Mn^{2+}$  que junto con las 3 lisinas cercanas al motivo DxD ayudan a dispersar la carga negativa del nucleótido.



**Figura 36-Eschema de la presencia del motivo DxD en las RGP de papa y arroz usando HCA plots.** HCA plots fueron obtenidos del servidor drawhca (<http://www.lmcp.jussieu.fr/~soyer/wwwhca/hca->

form.html). Las secuencias de proteínas están representadas como una red de  $\alpha$ -hélices duplicadas que agrupa clusters de residuos hidrofóbicos contiguos. El código de una letra fue usado para los aminoácidos.

Aunque el espectro de CD no mostró diferencias estructurales entre la RGP a LIS y la RGP a HIS, los espectros de fluorescencia mostraron ligeras diferencias en la máxima fluorescencia alcanzada en cada caso, que sugeriría un cambio estructural que expuso otros triptófanos que no estaban expuestos (Figura 37). Si bien el aumento observado no es muy grande, puede deberse a que la proteína tiene 9 triptófanos 12 cisteínas, 18 tirosinas y 19 fenilalaninas, que también fluorescen, lo que hace que el cambio en el espectro de fluorescencia no sea muy notorio. Si bien el espectro de fluorescencia de la RGP no presenta el típico máximo de emisión de los triptófanos a 330 nm como las proteínas de bibliografía, se encontró que es muy similar al de la Piridinolina, que es un crosslink no reducible del colágeno (Fujimoto y Moriguchi, 1978).



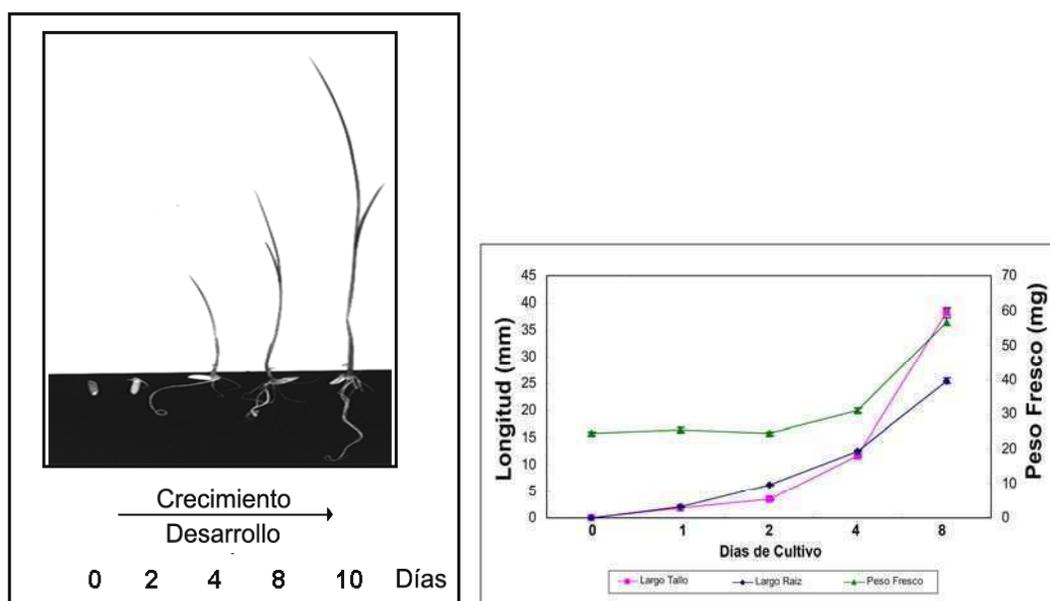
**Figura 37-Espectro de fluorescencia de la RGP en condiciones HIS y LIS**-Las fracciones que eluyeron a 2 mM UDP se agruparon, se dializaron exhaustivamente contra 25 mM Tris pH 7.4 para remover todo el UDP posible, y se hizo su espectro de fluorescencia primero en condiciones LIS, y luego a HIS por el agregado de 200 mM de KCl. La muestra fue excitada a 295 nm, con la slit de 3. El panel superior muestra el espectro de fluorescencia de la StRGP a HIS, y el inferior a LIS.

Las anomalías obtenidas en el espectro quizás se deban al tipo de oligómero resistente que es capaz de formar la RGP, ya que si bien los espectros de fluorescencia se realizaron en distintas condiciones de fuerza iónica, se hicieron en condiciones oxidativas, lo que favorece el alto peso molecular. Si bien los nucleótidos no fluorescen, la sumatoria de efectos, el oligómero con el  $Mn^{2+}$  unido y coordinado con el UDP, podrían hacer que la proteína florezca de forma anómala.

## Capítulo 2-Expresión de la RGP-Regulación de la proteína RGP durante el desarrollo de la planta

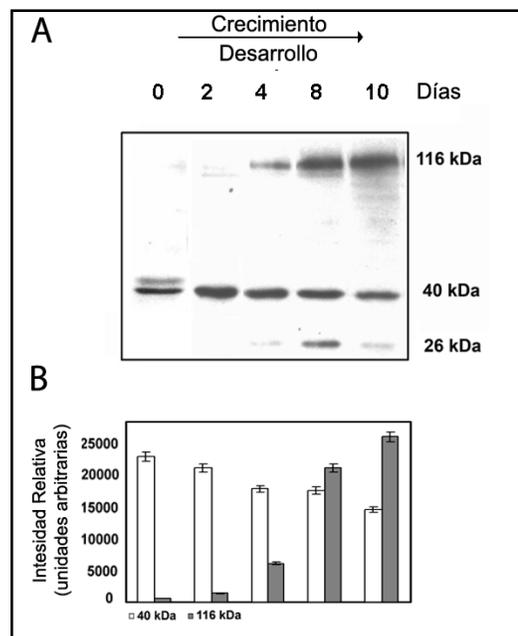
### 2.1.-El desarrollo modula el estado de oligomerización de la OsRGP (*Oriza sativa* RGP)

Para estudiar la regulación de la RGP en función del desarrollo, establecimos un modelo de cultivo de plantas de arroz *in vitro*. Se utilizaron semillas de arroz variedad El Paso 144, se cultivaron en cámara de cultivo con fotoperíodo (Figura 38 der.). En este sistema la germinación ocurre después de 1-2 días en cultivo, los coleoptiles y las raíces nodales emergen de la semilla al día 2, y tanto los tallos como algunas hojas son visibles después del día 4, se puede observar que a partir del día 4 hay un incremento del peso y longitud de las plantas (Figura 38 izq.). Se obtuvieron extractos proteicos solubles de la semilla sin germinar (día 0), semilla germinada (día 2) y de plantas a distintos tiempos de crecimiento. Estos tiempos de cultivo fueron escogidos, ya que durante los primeros estadios de desarrollo ocurre una activa síntesis de polisacáridos de pared celular, escenario ideal para estudiar la expresión de la RGP.



**Figura 38. Sistema de cultivo de plantas de arroz *in vitro*.** Semillas de *oriza sativa* var EL Paso 144, fueron esterilizadas y cultivadas en medio MS (Murashige and Skoog, 1987) en cámara de cultivo con 12 horas de fotoperíodo a 22 °C. 0, semilla sin germinar; 2 semilla germinada de 2 días de cultivo; 4, plántula de 4 días de cultivo; 8 plántula de 8 días de cultivo; 10, plantas de 10 días de cultivo. Medición de parámetros de crecimiento.

Los extractos de proteínas tomados a los tiempos mencionados en arriba fueron analizados por SDS-PAGE y Western blot (Figura 39 A). Encontramos que la RGP está presente en semilla sin germinar en forma de monómero de 40 kDa. Claramente, el perfil proteico incrementa su complejidad luego del 2do día de cultivo. Una banda de mayor tamaño, 116 kDa es reconocida por el anticuerpo anti RGP y se hace muy abundante cerca del día 4. Análisis densitométricos revelan un macado incremento en la cantidad de esta banda durante el desarrollo comparada con el monómero de RGP, el cual va decreciendo (Figura 39 B). También se hace visible una banda más pequeña que el monómero, de 26 kDa, que aparece concomitantemente con las bandas de alto tamaño molecular.



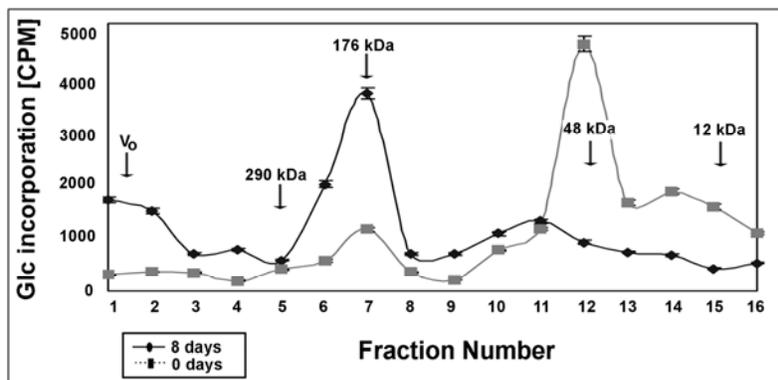
**Figura 39-Expresión de la RGP durante el desarrollo** A SDS-PAGE y Western blot de extractos proteicos de plantas de arroz de 0 a 10 días de cultivo B Cuantificación de las bandas proteicas mediante el programa

---

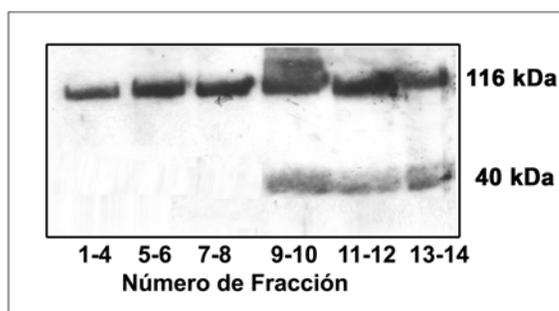
Scion image. Se graficó intensidad relativa vs. tiempo de cultivo. Los valores en kDa corresponden a la masa molecular del monómero y de las proteínas que contienen RGP.

El perfil de proteínas obtenido por Western blot, así como las diferencias observadas en la cuantificación, llevo a investigar el tamaño nativo de la OsRGP en la semilla sin germinar y luego de 8 días de cultivo. Extractos de proteínas de una fracción soluble obtenida por ultracentrifugación (S140) fueron separados por Superosa 12. Cada fracción se dividió en dos: con una alícuota se determinó actividad RGP y con la otra se se corrió un gel SDS-PAGE seguido de Western blot (Figura 40- 42). La RGP de 8 días eluyó como un pico ancho con un máximo de actividad en las fracciones 6 y 7, que corresponde a un tamaño nativo de 176 kDa, constituyéndose en tetrámeros de RGP. Sin embargo encontramos que en la semilla sin germinar (0 días) la máxima actividad coincide con el peso molecular del monómero de la proteína (40 kDa). En la figura 40 también se observa que en la semilla hay un pequeño pico de actividad que se corresponde con el tamaño del tetrámero. Este oligómero se detecta por Western blot solo en estas condiciones, quizás debido a un equilibrio entre las formas monoméricas y oligomérica, o también podría deberse a la disociación de un factor regulatorio durante el tamizaje molecular. Entonces, se encontró que la RGP no solo está presente en la semilla sin germinar, sino que también esta activa.

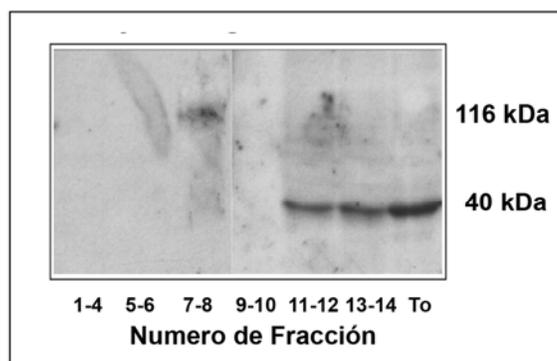
Las fracciones de plantas de 8 días eluidas de Superosa que fueron sometidas a SDS-PAGE y reveladas por Western blot (figura 40), mostraron la presencia del monómero en fracciones de menor tamaño molecular, como se esperaba. Sin embargo los oligómeros son visibles en todas las fracciones, lo que sugiere que probablemente ocurra un equilibrio entre las formas monoméricas y oligoméricas



**Figura 40- Análisis de tamaño nativo de la RGP de plantas 8 días y semillas sin germinar.** Extractos de proteínas correspondientes a los tiempos de cultivo mencionados fueron cromatografiados en Superosa 12. Las alícuotas obtenidas fueron incubadas con UDP-[<sup>14</sup>C]Glc durante 2 horas, se cuantificó la glucosa radiactiva en el precipitado de TCA. V<sub>0</sub> corresponde al volumen muerto; las flechas corresponden al volumen de elución de markers proteicos y los números, a su peso molecular en la fracción correspondiente.

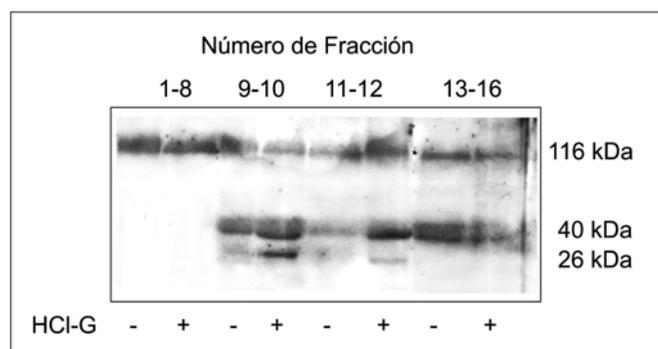


**Figura 41- Análisis de la formación de complejos de RGP de plantas de 8 días.** El tamaño nativo de la RGP de arroz se analizó por Superosa, SDS-PAGE y Western blot. Las fracciones de Superosa fueron ensayadas para actividad RGP y agrupadas, con un tamaño de exclusión similar, estos grupos fueron sometidos a SDS-PAGE y Western blot.



**Figura 42- Análisis de la formación de complejos de RGP de plantas de 0 días.** El tamaño nativo de la RGP de arroz es analizado por Superosa, SDS-PAGE y Western blot. Las fracciones de Superosa fueron ensayadas para actividad RGP y agrupadas por tamaño de exclusión similar, estos grupos fueron sometidos a SDS-PAGE y Western blot. To la muestra antes de Superosa.

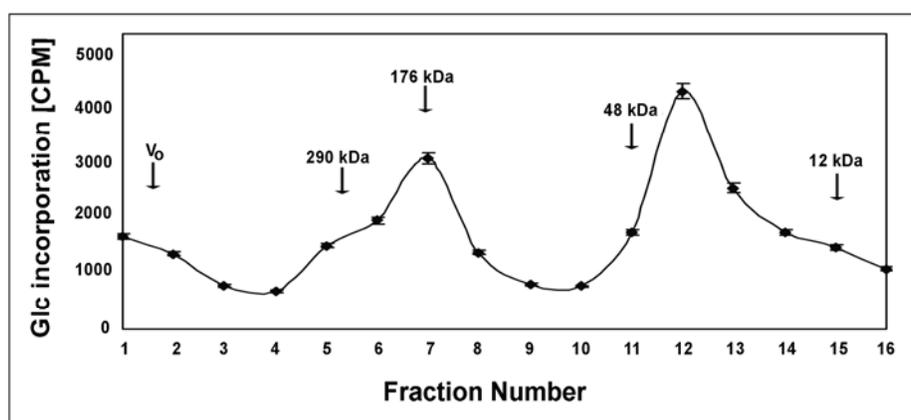
Dicho equilibrio entre el oligómero y el monómero no estaría regulado solo por interacciones hidrofóbicas, ya que la incubación con un agente caotrópico como el HCl-guanidinio, y posterior SDS-PAGE y Western blot (Figura 43), muestra que los oligómeros no se desarman.



**Figura 43-Análisis de oligomerización de las fracciones de Superosa** por incubación con un agente caotrópico. Las fracciones de Superosa que mostraban el mismo perfil de proteínas por SDS-PAGE fueron combinadas e incubadas con HCl-guanidinio (ver materiales y métodos), luego fueron centrifugadas y sometidas a SDS-PAGE y Western blot.

## **2.2.- El estado fisiológico de la planta modula la oligomerización de la OsRGP**

Con el objetivo de ahondar en el mecanismo de regulación fisiológica de la OsRGP, se cultivaron plantas etioladas. Estas plantas tienen la ventaja de tener una alta tasa de elongación, y no tener un sistema activo de captación de la luz. De estas plantas crecidas 8 días en oscuridad, extrajimos proteínas y analizamos el perfil de actividad en función del tamaño por Superosa 12 (Figura 44). La RGP extraída de plantas de 8 días etioladas, eluyó con un máximo de actividad en las fracciones 6 y 7, que correspondería a un tamaño nativo de 176 kDa, (tetrámero), y con otro máximo de actividad en fracciones que corresponderían a 176-44 kDa (trímero-monómero). Este resultado sugeriría que la RGP estaría muy activa en las plantas etioladas las cuales presentan activa síntesis de pared celular, debido a la alta tasa de elongación (Crosgrave 1997).

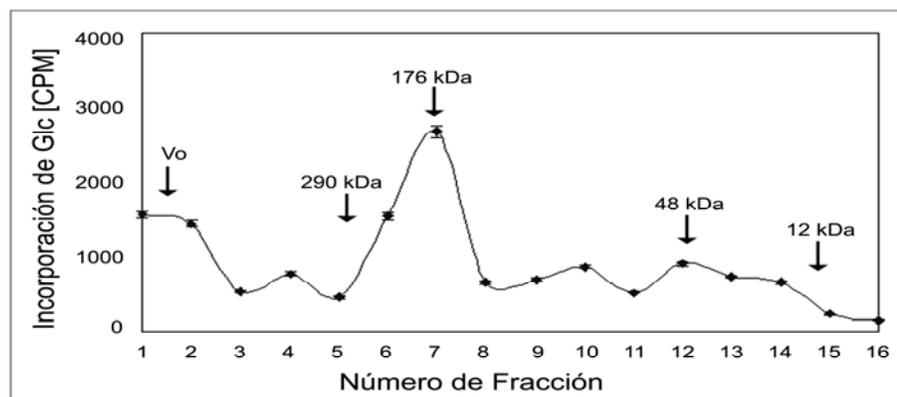


**Figura 44- Análisis de la formación de complejos de la RGP de plantas 8 días etioladas.** Un extracto de plantas de arroz crecidas en la oscuridad fue sometido a cromatografía en Superosa 12. Las alícuotas eluidas de la columna fueron incubadas con UDP-[<sup>14</sup>C]Glc durante 2 horas, se cuantificó la glucosa radiactiva en el precipitado de TCA. V<sub>0</sub> corresponde al volumen muerto; las flechas corresponden al volumen de elución de markers proteicos y los números, a su peso molecular en la fracción correspondiente.

Para investigar si el cambio en el tamaño etiolado era fisiológico, se tomaron plantas crecidas en la oscuridad durante 8 días y se expusieron a la luz, hasta obtener un color verde parejo, se extrajeron proteínas y se hizo Superosa 12 (Figura 45). El perfil de actividad muestra que el máximo correspondiente al monómero disminuye notablemente, y

el máximo de actividad coincide con el correspondiente al tamaño nativo de 176 kDa, por lo tanto se asemeja al de las plantas de 8 días crecidas en fotoperíodo (Figura 41).

Entonces, los mecanismos post-traduccionales que estarían involucrados en la regulación de la RGP dependerían del estado metabólico de la planta, lo que se hace evidente durante el desarrollo.

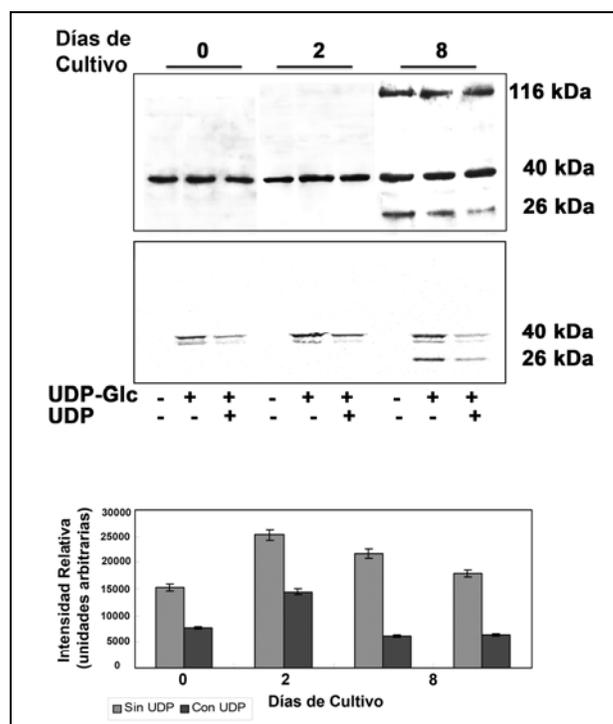


**Figura 45- Análisis de la formación de complejos de RGP en plantas crecidas durante 8 días etioladas y luego puestas a la luz.** Un extracto de plantas de arroz crecidas en la oscuridad y expuestas la luz hasta obtener color verde parejo, fue sometido a cromatografía en Superosa 12. Las alícuotas eluidas de la columna fueron incubadas con UDP-[<sup>14</sup>C]Glc durante 2 horas, se cuantificó la glucosa radiactiva en el precipitado de TCA. V<sub>0</sub> corresponde al volumen muerto; las flechas corresponden al volumen de elución de markers proteicos y los números, a su peso molecular en la fracción correspondiente.

### **2.3- La actividad de la OsRGP también esta regulada por el desarrollo**

Los resultados obtenidos sugieren que la diferencia en el tamaño molecular es debida a regulaciones post-traduccionales gatilladas por el estado metabólico, que cambia mucho en los primeros estadios de desarrollo de la planta. Entonces, para estudiar si el patrón de glicosilación también se modificaba durante el desarrollo, se tomaron semillas sin germinar, semillas germinadas y plantas de 8 días, se extrajeron proteínas y se separaron por SDS-PAGE, el gel fue transferido y revelado por Western blot y autorradiografía (Figura 46). Se encontró que la RGP presente en semillas sin germinar es activa, como ya habíamos visto por Superosa 12, que se radioglicosila con UDP-[<sup>14</sup>C]Glc, y que la glicosilación es reversible en todos los tiempos ensayados. Si observamos la cuantificación

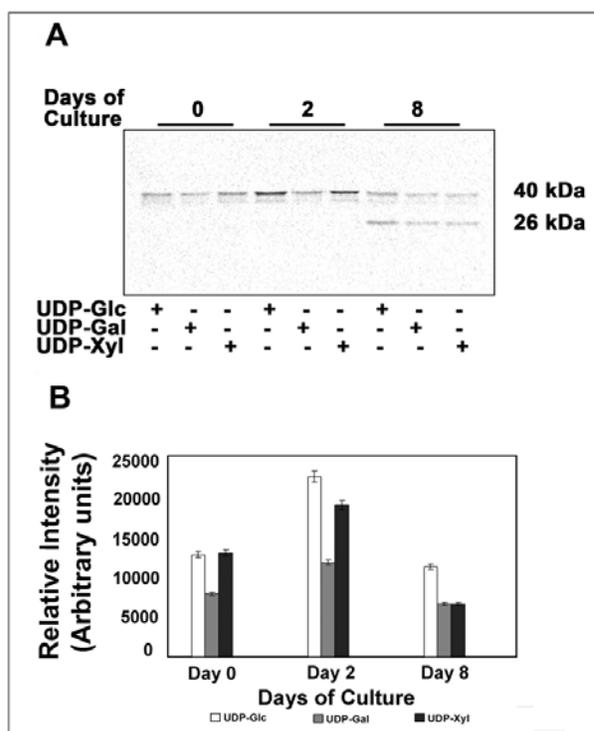
de la autorradiografía (Figura 46, panel inferior), se ve un máximo de actividad a los 2 días, así como también se observa que aparece una banda radioglicosilada de menor tamaño que el monómero, a los 8 días de cultivo, que quizás explica la menor radiactividad asociada a la RGP de 8 días, comparada con la de 2 días.



**Figura 46- Incorporación de Glucosa y reversibilidad de la glicosilación en el desarrollo-** Se extrajeron proteínas de semillas sin germinar (0 días), semillas germinadas (2 días), plantas (8 días), se midió actividad RGP así como también reversibilidad de la glicosilación, se detuvo la reacción por el agregado de 10% TCA, y las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se revelaron por Western blot, (panel superior, gel superior) o autorradiografía, (panel superior, gel inferior). La marca radiactiva se cuantificó con el programa Scion Image, y se grafico intensidad relativa vs tiempo de cultivo. Los valores en kDa corresponden a la masa molecular del monómero y los complejos que contienen RGP

En la misma medida se ve que la RGP a esos tiempos de cultivo se radioglicosila también con UDP-[<sup>14</sup>C]Gal y UDP-[<sup>14</sup>C]Xil (Figura 48). La RGP en la semilla sin germinar es capaz de glicosilarse con los 3 azúcares, así como la de la semilla germinada y la de la planta, aunque la RGP correspondiente a la semilla germinada parece más activa, esto podría deberse a que a los 8 días aparece una banda más pequeña que el monómero que

también se radioglicosila y revierte su glicosilación en la misma medida que la banda de 40 kDa (Figura 46 y 47). En ambos casos es notoria la falta de glicosilación del oligómero. Aunque las fracciones correspondientes a tamaños moleculares mayores al monómero eran activas, y los complejos de alto peso molecular son visibles por SDS-PAGE, no se observan por autorradiografía lo que sugiere que no estarían glucosilados o que no se glicosilan bajo estas condiciones porque ya estarían glicosilados endógenamente.



**Figura 47 – Glicosilación vs. Desarrollo.** Proteínas solubles de semillas y plantas de arroz en distintos estadios de desarrollo fueron incubados con UDP-Gal, UDP-Xil o UDP-Glc radiactivo durante 30 min.: **A** corridos SDS-PAGE y revelados por autorradiografía. **B** Las bandas obtenidas fueron cuantificadas con el programa Scion Image, se grafico intensidad relativa vs tiempo de cultivo. Los valores en kDa corresponden a la masa molecular del monómero y a los complejos que contienen RGP

#### **2.4- El agregado de fosfatasa alcalina modula diferencialmente la actividad de OsRGP dependiendo del desarrollo.**

En trabajos anteriores realizados con la proteína de papa se reportó que la glicosilación y el tamaño de la StRGP eran modificados por el agregado de fosfatasa alcalina, también se vio

que este efecto es revertido por inhibidores de fosfatasa (Testasecca et al. 2004). Para analizar si las diferencias observadas durante el desarrollo podían deberse a la fosforilación de la proteína, se ensayaron diferentes tiempos de cultivo con fosfatasa alcalina (Tabla 3) y se observó que en la semilla sin germinar y en la semilla recién germinada, que son predominantemente monoméricas, disminuye la glicosilación mientras que en la plántula de 8 días que puede oligomerizarse, aumenta la glicosilación.

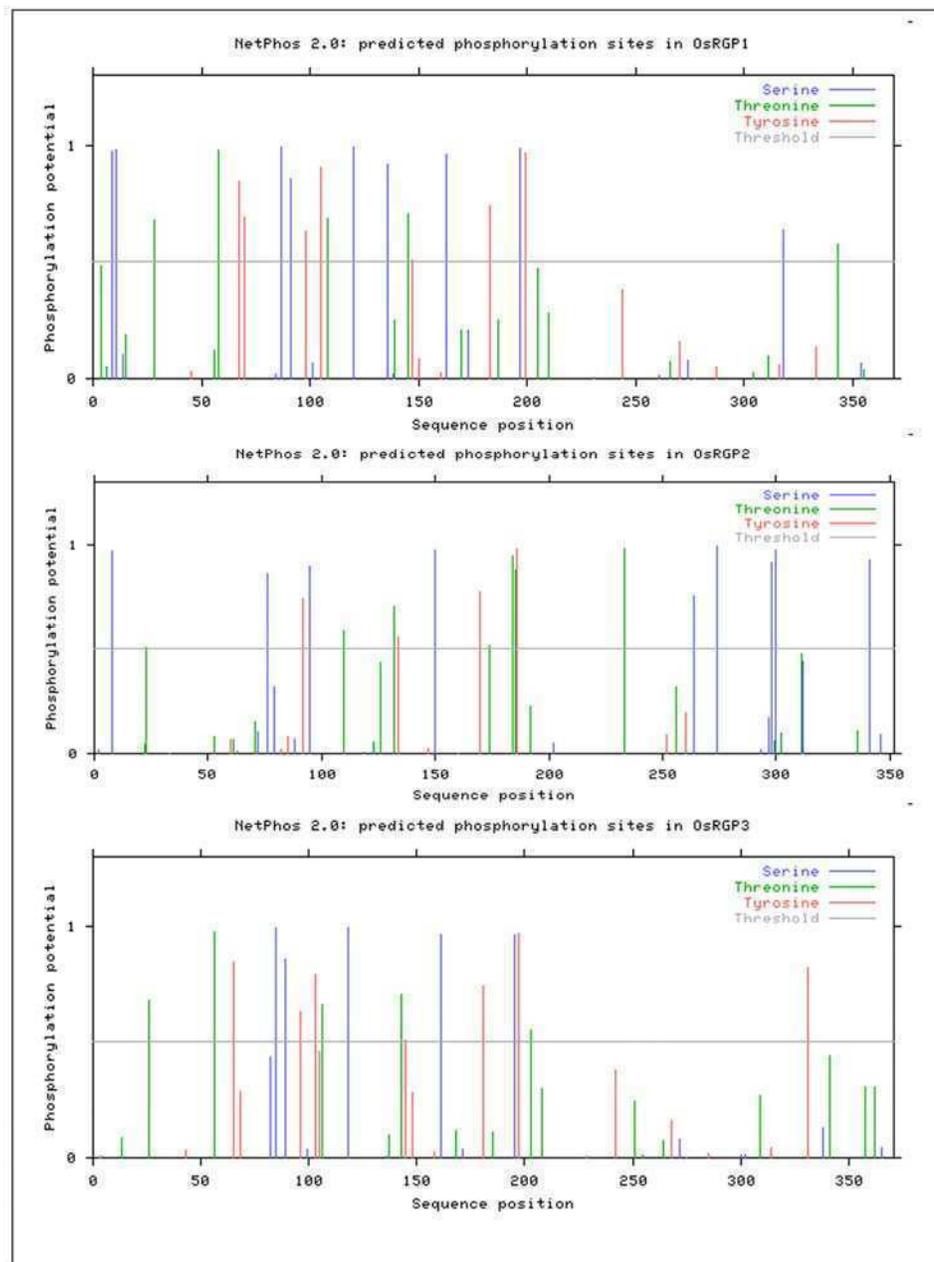
Fracción	Fosfatasa alcalina	Incorporación de Glc (CPM)
Semilla sin germinar	+	1259,75 ± 167,67
	-	2377,49 ± 182,34
Semilla germinada	+	1822,30 ± 145,27
	-	2093,97 ± 178,55
Plántula	+	2479,32 ± 115,12
	-	1678,83 ± 105,22
StRGP recombinante	+	4758,90 ± 190,29
	-	3327,07 ± 125,72

**Tabla 3- Efecto de la fosfatasa alcalina sobre la actividad de OsRGP vs. desarrollo.** Fracciones de proteínas de los distintos tiempos de cultivo fueron extraídas y se ensayó actividad en presencia o en ausencia de fosfatasa alcalina (5 U, promega). Se cuantificó radiactividad en el precipitado de TCA.

A este respecto, mediante el programa NetPhos ([www.expasy.org/tools/](http://www.expasy.org/tools/)), se obtuvo la predicción de sitios de fosforilación para las 3 RGPs de arroz. La predicción tiene un intervalo de confianza significativo (Figura 49 y tabla 4).

	Serinas	Treoninas	Tirosinas
OsRGP1	9	5	7
OsRGP2	9	7	4
OsRGP3	5	5	7

**Tabla 4-Predicción de fosforilación en serinas, treoninas y tirosinas para las 3 RGPs presentes en plantas de arroz.** La predicción se hizo con el programa NetPhos 2.0, en la interface de [www.expasy.org/tools](http://www.expasy.org/tools). Los puntajes para las predicciones van de 0.5-0.99; siendo 1 el puntaje más alto.



**Figura 48-Predicción de fosforilación en serinas, treoninas y tirosinas para las 3 RGPs presentes en plantas de arroz.** La predicción se hizo con el programa NetPhos 2.0, en la interface de [www.expasy.org/tools](http://www.expasy.org/tools). El tamaño de la barra indica la fortaleza de la predicción.

Las diferencias en los patrones de fosforilación putativos se deberían a las diferencias en la secuencia de aminoácidos de las 3 RGPs.

## 2.5-Estudio de la expresión de la OsRGP a nivel transcripcional también depende del desarrollo

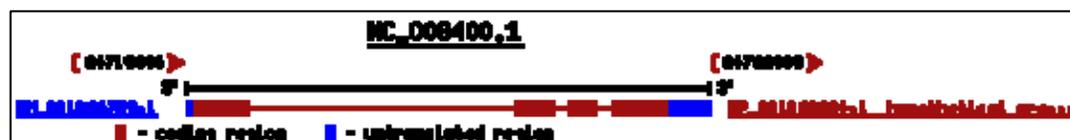
En arroz se conocen 3 secuencias (Figura 49) distribuidas en los cromosomas 3, 7 y 4 que codifican para 2 C1RGP con 80% de similitud entre sí, y una C2RGP con 78% de similitud con las clase 1. La clase 1, tiene actividad de autoglicosilación así como también de mutasa de arabinosa, mientras que la clase 2, no presenta ninguna de las actividades descritas, pero los heterocomplejos de las clase 1 y 2, son más activos que los homocomplejos compuestos por RGPs de la clase 1 solamente (Konishi et al. 2010).

C1RGP

RGP1 (Os03g0599800)



RGP3 (Os07g0604800)



C2RGP (Os04g0660400)



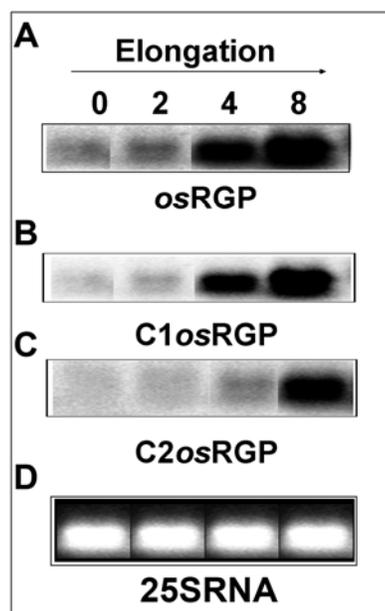
Figura 49- Esquema de la organización genética de las RGPs de arroz. Se hizo una búsqueda de secuencias de las RGPs de arroz en genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) y se encontraron estos 3 diseños genéticos.

Para estudiar si los cambios observados a nivel de proteína tenían correlación a nivel transcripcional, se diseñaron sondas diferenciales para estudiar la expresión de las dos clases de OsRGP por Northern blot (ver materiales y métodos), durante la germinación y elongación de plantas de arroz cultivadas *in vitro* e *in vivo*. Los fragmentos obtenidos por PCR fueron purificados del gel y secuenciados, por medio del programa BLAST se

---

alinearon las secuencias de interés, encontrándose que los fragmentos no tienen hibridación cruzada entre sí, salvo en el caso de la sonda universal, que esta generada sobre una porción conservada que hibridiza con las dos clases de RGPs.

El patrón de expresión de las OsRGP es diferencial, como se puede ver en la figura 50, donde se puede ver un incremento en el mRNA total (Figura 50 A) entre los días 2 y 4. La misma tendencia se observa para las C1RGP (Figura 50 B) sin embargo en el caso de la C2RGP (Figura 50 C), se observa una señal tenue a los 4 días, donde sí comenzaría a expresarse. Entonces, los resultados muestran un incremento en el mRNA de las Clase 1 OsRGP, que es concomitante con la rápida elongación de la planta de arroz, especialmente el tallo (Figura 39, panel derecho, cuadrados fucsia) que ocurre entre los días 2 y 4, sugiriendo que la RGP esta asociada con el desarrollo vegetativo cuando hay activa síntesis de polisacáridos como ocurre en los primeros estadios del desarrollo, y como se corrobora con datos de microarrays (<http://mpss.udel.edu/rice/>), esquematizados en la tabla 5 si bien la tendencia general es que mayoritariamente se expresa la RGP1 (Figura 50), y aunque las condiciones experimentales no son estrictamente las mismas, puede observarse que la contribución de la RGP3 al total de las C1RGP no es significativo, y que la RGP2 se expresa aunque ninguno de los grupos que trabajamos en el tema haya podido medir su actividad *per se*, apoyando la teoría de que pueda tratarse de una subunidad regulatoria, o que su actividad pueda ser inducible.



**Figura 50. Expresión de RGP durante el desarrollo.** Se extrajo RNA total de semilla sin germinar (0 días), semilla germinada (2 días), y plántulas en distintos estadios de desarrollo (4 y 8 días), se sembraron 30 ug de RNA total que fueron corridos bajo condiciones desnaturizantes, transferidos a una membrana de nylon, y revelados por la técnica de Northern blot con una sonda específica. (A) Sonda universal para RGP (B) C1RGP (C) C2RGP. (D) Control de carga gel teñido con Bromuro de Etidio.

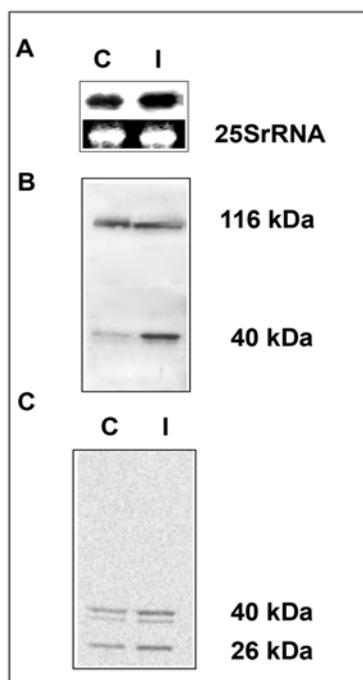
Tejido	Expresión Relativa (transcriptos por millón)		
	RGP1	RGP2	RGP3
Tallos (60d)	3639	788	15
Hojas (14d)	760	70	6
Raíces	2164	334	16
Semilla germinada (3d)	3331	832	56

**Tabla 5-Expresión relativa de los 3 genes de OsRGP.** Los detalles de preparación de tejidos y los métodos usados para generar los patrones de expresión pueden ser obtenidos de la base de datos Rice MPSS en <http://mpss.udel.edu/rice/>

## **2.6.-La expresión de la OsRGP no solo esta regulada por el desarrollo sino también por hormonas**

### **2.6.1.-Las hormonas involucradas en elongación inducen la OsRGP**

Al observar las diferencias en las formas de la OsRGP expresadas a nivel de proteínas junto con el patrón de expresión diferencial generado por el desarrollo, y dado que en arroz es bien sabido que los procesos de elongación están regulados por auxinas y citoquininas se estudió la inducción de hormonas que regulan el desarrollo sobre la expresión de la RGP. Para esto se utilizó, AIA (Acido idolacético, una auxina) y BAP (6-bencilaminopurina, una citoquinina). Se tomaron tallos de plantas de 4 días y se incubaron 12 horas con AIA y BAP, se extrajo RNA total y proteínas. El RNA se separó mediante gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes y se reveló mediante Northern blot; las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se revelaron por Western-blot (Figura 51). Se puede ver que la RGP se induce a todos los niveles luego del tratamiento hormonal, ya que se observó un claro aumento en el nivel del monómero de 40 kDa (Figura 51 B), así como también un aumento en la glicosilación (Figura 51 C).

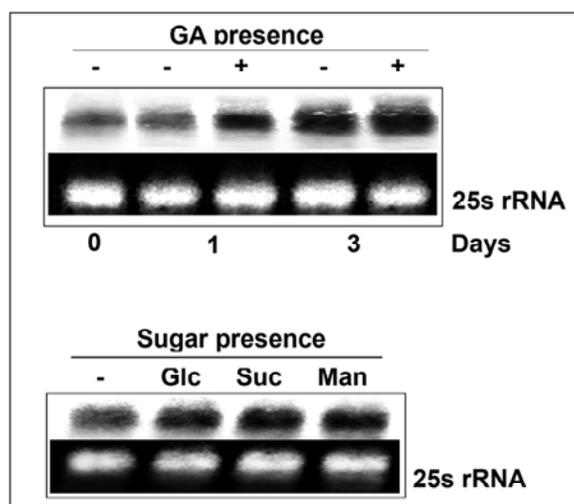


---

**Figura 51- La OsRGP es inducida por hormonas que regulan el desarrollo-** Tallos de plantas de 4 días fueron inducidas, se incubaron con  $10^{-5}$  M IAA +  $10^{-7}$  M BAP en buffer fosfato, luego se cambió a MS-liquido y se dejaron 40 min. Se tomaron alícuotas para extraer RNA y proteínas. **A** -El RNA se separó en gel de agarosa desnaturalizante y se reveló por Northern blot utilizando una sonda universal para ambas clases de RGPs. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se revelaron por Western blot **B**; o se ensayó actividad RGP y se revelaron por autorradiografía **C**.

### **2.6.2- Las hormonas involucradas en la germinación inducen la OsRGP**

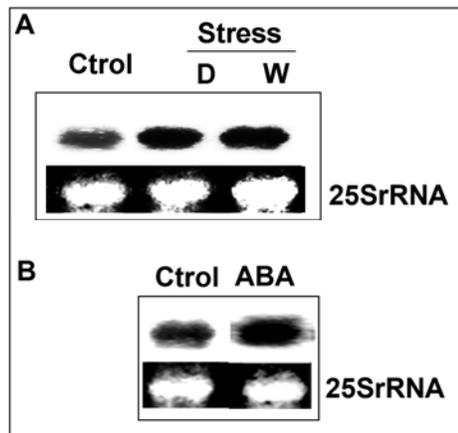
La observación de la OsRGP en la semilla sin germinar, tanto a nivel de mensajero como de proteínas (Figura 50 y 38 respectivamente), y no solo su presencia, sino también su actividad (Figuras 46 y 47), llevo a preguntarse si también era inducida por GA (giberelina) ya que es sabido que la GA induce la germinación y la acción de AIA, con la consecuente elongación del tallo. Para esto se cultivaron semillas de arroz en medio MS en presencia o en ausencia de GA (Figura 52 A), y se fueron tomando alícuotas de 1 a 3 días, estos tiempos fueron elegidos ya que al día 4, hay una inducción intrínseca por el desarrollo (Figura 50). Los resultados muestran una inducción del mRNA de OsRGP del día 1 al día 3. Para discernir que el efecto de la GA fuera directo sobre la RGP y no mediante la inducción de la  $\alpha$ -amilasa y la liberación de azúcares de reserva, se cultivaron semillas en presencia de distintos azúcares en el medio de cultivo (Figura 53 B). Se observa que no hay inducción significativa por algún azúcar libre en particular, lo que sugiere que el efecto de GA sobre la RGP sería directo.



**Figura 52- La OsRGP es inducida por hormonas que regulan la germinación y no por azúcares- A** Semillas de arroz fueron cultivadas en medio MS en ausencia o en presencia de  $5 \times 10^{-6}$  M GA las muestras se tomaron a los tiempos mencionados. **B** ídem pero se cultivaron en presencia de: 3 % de Glucosa, o 3% de Sacarosa, o de 3% de Manitol. El control esta cultivado en ausencia de azúcares y las muestras fueron cosechadas a los 3 días. Se tomaron alícuotas a los tiempos mencionados para extraer RNA total que se separó en gel de agarosa desnaturizante y se reveló por Northern blot utilizando una sonda universal que revela una zona conservada de las RGPs.

## **2.7- Las situaciones que movilizan azúcares dentro de la planta también inducen la OsRGP**

Los movimientos de azúcares en las plantas ocurren todo el tiempo, por motivos fisiológicos, como floración, o estacionales, otoño-primavera; en esta sección hacemos referencia a situaciones que provocan cambios bruscos en los gradientes de movilización, como es el estrés. Particularmente situaciones donde la integridad de la pared se ve amenazada de algún modo como es el estrés hídrico o las heridas. Se tomaron plantas de 4 días, (si bien la OsRGP está naturalmente inducida, se necesitaba una masa mínima para el ensayo) se destaparon y se deshidrataron hasta 25% de pérdida de peso fresco para el estrés hídrico, luego se extrajo RNA total (Figura 53). Para las heridas, se tomaron plantas de 4 días y se destaparon en campana de flujo laminar, para mantener las condiciones de esterilidad y se le realizaron cortes en las hojas, se taparon y se dejaron toda la noche y se extrajo RNA total.



**Figura 53- Las situaciones que movilizan azúcares dentro de la planta también inducen la OsRGP. A-** Plantas de arroz de 4 días de cultivo fueron desecadas hasta perder 25% de su peso fresco (D, por desecación) o heridas en las hojas (W, por wounding), el control se realizó con plantas a las que no se les hizo tratamiento alguno. **B-** Plantas de arroz de 4 días fueron incubadas con  $10^{-5}$  M ABA (por Abscisic Acid, Ácido abscísico) como se describe en Materiales y métodos, el control se hizo con plantas incubadas en Phosphate buffer. Se extrajo en ambos casos RNA total, se separó mediante gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes y se reveló por Northern blot. El blot se reveló con la sonda universal, que fue generada sobre una zona conservada de las RGP.

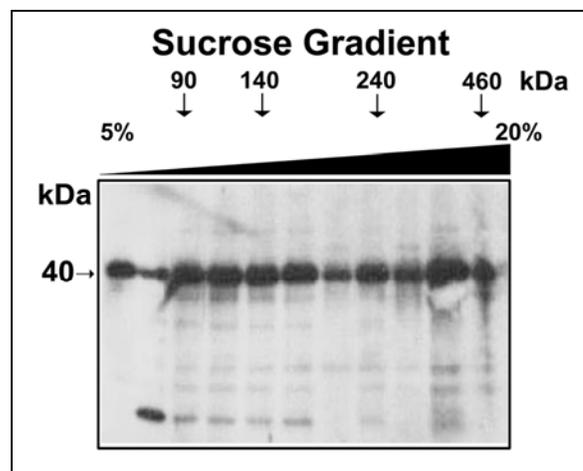
Se puede ver que la OsRGP se induce en condiciones de estrés, tanto mecánico, como en el caso de heridas o desecación (Figura 53A), así como también mediado por ABA (Figura 53B).

De los últimos ensayos, se podría concluir que la RGP esta presente en una variedad de caminos metabólicos, sugiriendo que hay un denominador común para estos caminos metabólicos, un nodo donde convergerían, este nodo sería la necesidad de remodelar/reconstruir/ o construir *de novo* la pared celular, ya que la situaciones ensayadas tienen por común denominador alguna modificación a la pared vegetal.

### **Capítulo 3-Estudio de la localización subcelular de la proteína RGP**

#### **3.1- La proteína RGP esta asociada a las vesículas de Golgi como parte de complejos proteicos de gran peso molecular**

La RGP se encontró tanto en forma soluble, como asociada a la fracción de membranas. Técnicas de inmuno-histoquímica combinadas con microscopia de transmisión de electrones indican que la RGP esta localizada en el aparato de Golgi (Dhugga et al. 1997). Para analizar si su presencia en esta organela es en forma monomérica o asociada a complejos proteicos, se aislaron vesículas de Golgi de *Arabidopsis thaliana* o de epicótiles de arveja (*Pisum sativum*) y se analizó el peso molecular nativo de la RGP usando gradientes de sedimentación y electroforesis en geles nativos (Blue Native Gel Electrophoresis: BNGE). La RGP fue extraída de membranas usando Triton X-100, un detergente no-iónico, y separada por sedimentación en un gradiente de sacarosa de 5-20 % (w/v). La distribución de la RGP en el gradiente fue analizada por Western blot usando un anticuerpo anti-PsRGP (*Pisum sativum* RGP). Los resultados muestran que la RGP esta distribuída todo a lo largo del gradiente (Figura 54) aunque un ligero incremento fue observado en la zona correspondiente a 400 kDa sugiriendo que la RGP localizada en el aparato de Golgi debe estar presente en estructuras complejas de alto peso molecular.



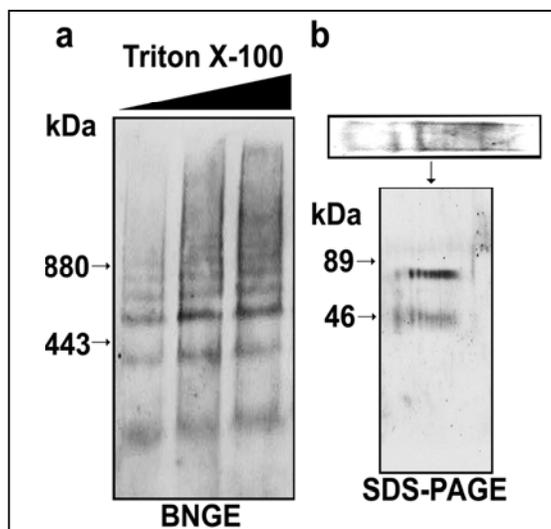
**Figura 54-** La PsRGP asociada a las membranas del aparato de Golgi exhibe un coeficiente de sedimentación heterogéneo. Membranas del aparato de Golgi fueron solubilizadas en 1% (v/v) Triton X-100 y sedimentadas mediante un gradiente de sacarosa de 5-20 % (w/v), fracciones de 30  $\mu$ l fueron colectadas y separadas por SDS-PAGE. La proteína RGP fue identificada por Western-blot usando un

---

anticuerpo específico anti-PsRGP. Los marcadores de tamaño (flechas superiores) son: ovoalbumina (90 kDa), LDH (140 kDa), catalasa (240 kDa) y  $\beta$ -galactosidasa (460 kDa) fueron separados por sedimentación. Ovoalbumina y catalasa fueron detectadas usando tinción con plata mientras que la distribución de LDH y la  $\beta$ -galactosidasa fueron ensayadas enzimáticamente en cada gradiente de sedimentación.

### **3.2- Los complejos asociados al aparato de Golgi contienen RGP monoméricas.**

Los resultados anteriores muestran que la RGP puede ser parte de complejos proteicos de alto peso molecular. Para analizar si estos complejos son capaces de revertir su tamaño dando el monómero se usó la técnica de electroforesis en geles nativos (BNGE), un procedimiento muy usado para estudiar la formación de complejos proteicos asociados a membranas de organelas (Schagger and von Jagow 1991). La extracción de proteínas de las membranas fue realizada con Triton X-100 (0,1; 0,5 y 1,5 % v/v), seguida de BNGE y Western-blot (Figura 55). El análisis por Western blot reveló una serie de bandas reconocidas por el anticuerpo anti-PsRGP, que mejoran su definición con el aumento de concentración del detergente (Figura 55A), estas bandas están entre 880 y 400 kDa. Es interesante notar que el patrón de complejos que contienen RGP se comporta como una escalera que parece tener escalones que aumentan de tamaño en múltiplos de 40kDa. Para confirmar que estas bandas contuvieran RGP monomérica, se cortó una calle del BNGE y se cargó en SDS-PAGE para correr en una segunda dimensión. Los resultados muestran que cada una de esas bandas observadas en la primera dimensión contienen una proteína que separada en segunda dimensión produce dos bandas (40 y 80 kDa) que son detectadas por el anticuerpo (Figura 55B). Inesperadamente, la abundancia relativa de las dos bandas indicaría que la más grande (80 kDa) es más abundante que la más pequeña (40 kDa). La RGP unida al aparato de Golgi es parte de complejos proteicos de alto peso molecular que están formados por monómeros de RGP.

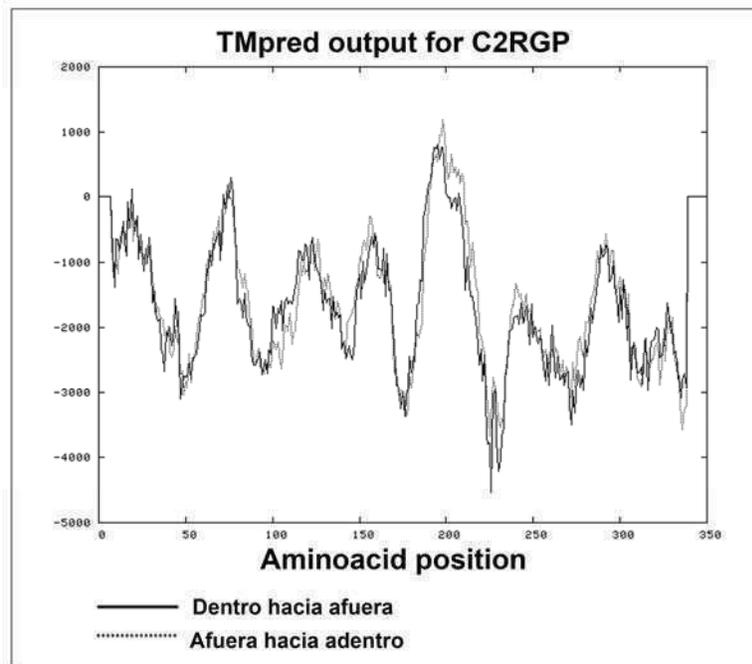


**Figura 55-La proteína RGP es parte de múltiples complejos proteicos.** **A** Se extrajeron proteínas de membranas de Golgi de *Arabidopsis thaliana* a diferentes concentraciones de Triton X-100 (0.1, 0.5 y 1.5 % (v/v)), estos extractos fueron separados por BNGE y revelados por Western-Blot. **B** la calle obtenida en el BNGE correspondiente a 1.5 % (v/v) Triton X-100 fue cargada en para una corrida en una segunda dimensión en SDS-PAGE y la RGP fue revelada usando un anticuerpo anti-PsRGP. Las flechas corresponden a proteínas marcadoras de peso molecular en kDa.

De estos resultados se puede ver que la RGP formaría parte de complejos que se unen a las membranas del aparato de Golgi, si bien sigue siendo desconocido el mecanismo que la ancla a dichas membranas. Predicciones transmembrana de la C2RGP de arroz mediante el programa Tmpred (Hoffmann & Stoffel, 1993) usando la secuencia de C2RGP presente en genbank con un GI:115461086, (NP\_001054143.1 Os04g0660400), arrojó un resultado positivo (Tabla 6 y Figura 56).

Orientación	Posición	Centro	Puntaje	Preferencia
Afuera hacia adentro	186-204	196	798	+
Adentro hacia afuera	189-209	199	1174	++

**Tabla 6-Predicción de pasos transmembrana de C2RGP de arroz-Mediante el programa Tmpred** ([http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED\\_form\\_parser](http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED_form_parser), solo es tenido en cuenta un puntaje mayor a 500.



```

1 MSLEIQDSEV DIVIAALQPN LTTFFEAWRP FFSRFHIIIV KDPDMAEELQ IPTGFDLKVY
61 TKSDMGVLGA TSIDFSGHSC RYFGYLVSRK KYVISI DDNC LPAKDNGGLT VDAVAQHMSN
121 LKTPATPFFF NTLYDPFRKG ADFVRGYPPS LREGVECMLS CGLWLHNADY DPMTHVVKRN
181 QRNTTYVDAV MTVPLGAMMP VSGINVAFNR EVLGPVMFPA LRLRKEGKHR WDTLEDVWNG
241 LCAKVVCDRL RYGVKTGLPY VMRSDAEAGK ALESLKEWEG VKVMDVVLFP FESLKLSTST
301 VTVEDCVKEL TSIVKEKLGK QNAIFAKAAD AMEEWTKLWK SHGAQSA

```

**Figura 56- Predicción de pasos transmembrana y secuencia de la C2RGP de arroz-** Aunque las dos hélices transmembrana predichas por el programa tienen un puntaje alto, hay una orientación que se ve favorecida, línea punteada. En el panel inferior se muestra la secuencia de aminoácidos de la C2RGP, resaltando el amarillo, la hélice transmembrana predicha, y en fucsia, el sitio DDN.

La C2RGP tendría un paso transmembrana (Tabla 6 y Figuras 56) que dejaría el N-terminal del lado de afuera del Golgi, libre para interactuar con las otras subunidades.

## *Discusión*

---

## **1-Estudio del mecanismo de reacción y de la localización de la proteína RGP**

Las plantas explotan una variedad de mecanismos para regular la producción y el acceso a los azúcares en respuesta a señales de desarrollo, los factores ambientales y el estado metabólico. En este trabajo de tesis se describen características funcionales de la proteína RGP tanto a nivel de mecanismo, y localización, profundizando nuestra comprensión de la regulación de la proteína, como a nivel transcripcional y post-transcripcional, puntualizando sobre su capacidad de formación de complejos.

En los dos primeros capítulos se muestra que la RGP se incorpora a complejos de proteínas que probablemente corresponden a homo-multímeros (Figura 21 y 40). Los resultados indican que la glicosilación de la forma monomérica juega un papel central en la incorporación de la RGP en complejos de proteínas (Figura 21) Se encontró correlación entre la actividad de glicosilación de la RGP y su presencia en los complejos de proteínas, resultando en una mayor actividad cuando está presente en forma de monómero y en una menor actividad cuando se presenta en forma de multímero (Figura 21).

Por otra parte, la reversibilidad de la glicosilación también depende del nivel de asociación de la RGP, mientras que la forma monomérica es altamente reversible, la forma multimérica es menos susceptible a liberar el residuo glicosídico en presencia de UDP. Por último, como se muestra en el capítulo III, la RGP se asocia a las membranas del Golgi formando parte de complejos proteicos de diferente peso molecular (Figura 56). En general, el comportamiento exhibido por la RGP es bastante singular.

Es poco probable que las propiedades descriptas por la RGP sean resultado de modificaciones tales como proteólisis o desnaturalización de la proteína. En primer lugar, los cambios tanto en la actividad enzimática como en la reversibilidad cuando se incuban a distinta fuerza iónica son totalmente reversibles, y no hay cambios en la actividad total, argumentando en contra de un efecto proteolítico que pueda alterar la funcionalidad de la RGP. En segundo lugar, los resultados presentados en este trabajo fueron obtenidos tanto con la proteína purificada de papa, de arroz, de arveja y *arabidopsis* así como también con la proteína recombinante. En tercer lugar, la separación en SDS-PAGE no muestra evidencia de degradación proteolítica, más aún cuando se observaron complejos de proteínas en estas condiciones, el patrón de migración corresponde a la incorporación de subunidades de aproximadamente 40 kDa, es decir, el peso molecular de la forma monomérica de RGP. En cuarto lugar, la evidencia de que la RGP es parte de complejos

proteicos proviene de experimentos llevados a cabo usando diferentes fuentes de enzima (*Solanum tuberosum*, *Pisum sativum*, *Arabidopsis thaliana*, *Oriza sativa*), así como en diferentes enfoques experimentales (cromatografía de exclusión de tamaño, SDS-PAGE, sedimentación y electroforesis en gel nativo). Por tanto, la evidencia antedicha, sumada a datos previos (Ardila y Tandecarz 1992; Bocca et al. 1997) sugiere que la RGP de papa también podría ser parte de complejos proteicos. Por otra parte, se demostró que RGP1 y RGP2 de trigo forman parte de complejos proteicos, y que esto modula la reversibilidad y la capacidad de glicosilación de RGP (Langeveld et al. 2002). Este comportamiento también puede explicar los diferentes grados de reversibilidad en la glicosilación de RGP que fueron descritos previamente (Moreno et al. 1986, 1987; Bocca et al. 1999). Además, estudios de doble híbrido en levaduras demuestran que la proteína RGP2 de trigo interactúa solo con las RGP1 y RGP2, mientras que en la purificación del complejo por columnas de afinidad no se encontró otro componente proteico (Langeveld et al. 2002). Por lo tanto, los complejos conteniendo RGP podrían ser creados por la libre asociación de monómeros disponibles. En concordancia con esta idea, la separación en Superosa 12 de los complejos de papa (Figura 21) muestra formas de peso molecular superior al del monómero. Estas estructuras desaparecen tras una incubación a alta fuerza iónica (Figura 21), recuperándose la actividad de RGP como monómero. Mientras que la incubación de RGP en condiciones que favorecen la formación de complejos, seguida de SDS-PAGE (Figura 19), mostró la aparición gradual de formas de peso molecular creciente con una separación alrededor de 40 kDa entre las diferentes formas, diferencia coincidente con el tamaño del monómero.

Estos datos muestran una inesperada complejidad biológica que implica una reversión de los complejos de RGP hacia la fase monomérica, cuando se los dializa a alta fuerza iónica (Figura 21), mientras que la estructura multimérica se mantiene en condiciones de SDS-PAGE (Figura 19). Aunque en general los complejos proteicos son disgregados y sus proteínas migran como monómeros luego de los experimentos de electroforesis, los oligómeros de RGP resistentes al SDS no fueron solubilizados bajo condiciones extremas (Figura 43). Otros investigadores también describen proteínas oligoméricas, que son resistentes a la disociación por el calor y SDS (Schagger et al. 1994; Membré et al. 2000; Norambuena et al. 2002; Castelli y Vitale, 2005). Además, Castelli y Vitale (2005) reportaron una proteína de poroto, que adquiere una estructura compleja y forma proteínas SDS-resistentes después de su asociación a las membranas.

Todos estos datos indican que RGP de diferentes especies serían capaces de autoasociarse para formar oligómeros.

Los resultados muestran que la glicosilación de RGP con UDP-glucosa, UDP-galactosa y UDP-xilosa lleva a un cambio de conformación de la RGP desde la fase de monómero a las estructuras con mayor peso molecular, lo que sugiere que la glicosilación sería capaz de cambiar la capacidad de la RGP de formar parte de un complejo (Figura 22). El hecho de que los oligómeros puedan transformarse en monómeros después de diálisis a HIS (Figura 21), pero no por las condiciones desnaturizantes del SDS-PAGE (Figura 22, 39, 41, 43) podría deberse a una sensibilidad intrínseca de la proteína oligomérica a un cambio específico en el microambiente, que modificaría su estructura terciaria o cuaternaria. Probablemente, los cambios dinámicos en las concentraciones de UDP-azúcares y/o un microambiente específico de membrana podrían estar siendo imitados por los cambios en la fuerza iónica en nuestro modelo experimental. Según esta hipótesis, encontramos que luego de glicosilarse, hay un cambio de tamaño hacia formas de alto peso molecular (Figura 22), sugiriendo que la glicosilación produciría un cambio de conformación que alteraría el patrón de hidrofobicidad/hidrofilicidad de la proteína, produciendo una exposición de dominios que favorecerían mayor interacción proteína-proteína, lo que llevaría a la formación de oligómeros SDS-resistentes.

Se muestra que la RGP monomérica (Tabla 1) tiene propiedades bioquímicas que son diferentes de la RGP oligomérica, (al menos del tetrámero putativo de 176 kDa, figura 21). Sin embargo, los complejos también se encuentran no sólo como tetrámeros, sino también como trímeros putativos (116 kDa; Figura 19, 22) y como un dímero putativo (80 kDa, Figura 22). Además, la proteína RGP se encuentra distribuida casi por igual todo a lo largo del fraccionamiento en gradiente de sacarosa, entre 90 a 460 kDa, con un pico prominente en 240kDa en las membranas de Golgi de *Arabidopsis thaliana*.

Los resultados sugieren que la oligomerización de la RGP no sólo dependería del contexto metabólico específico, sino también del escenario central del desarrollo, como puede verse en el capítulo II. En este sentido, los experimentos realizados en plántulas de arroz de 4 días de cultivo mostraron un trímero resistente a SDS, como la forma más prominente, mientras que en las semillas no germinadas el monómero es el predominante (Capítulo II, Figura 40)

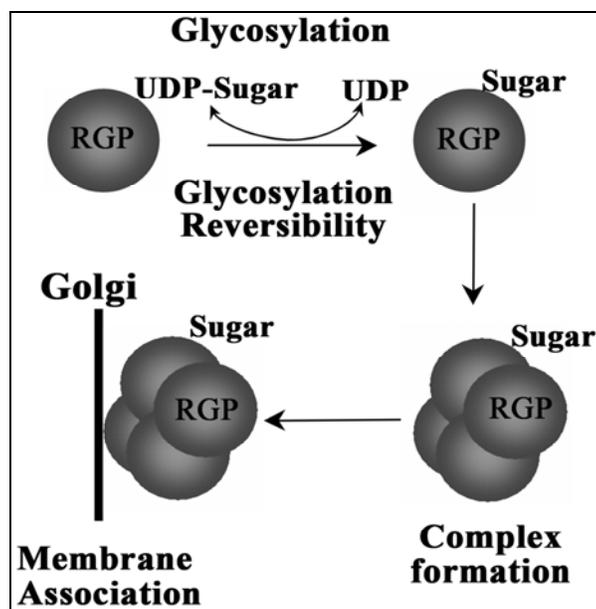
La proteína RGP se ha detectado tanto soluble como unida a la membrana de Golgi. En virtud de un incremento en la fuerza iónica, o de la presencia de detergente (Figura 55) la RGP de papa, así como la de maíz, fueron liberadas de las membranas del

---

aparato del Golgi o plasmodesmos (Moreno y Tandecarz 1982; Epel et al. 1996; Bocca et al. 1997). Esto podría deberse a que el oligómero de la RGP se hace más hidrofóbico aumentando su afinidad por las membranas, o que encuentre un socio que la una a la membrana del Golgi, como podría ser la C2RGP, para la cual no se ha descrito actividad, pero si se ha visto que posee al menos 1 paso transmembrana, lo que podría asociarla al Golgi, dejando el extremo amino del lado citoplasmático libre para interactuar con las otras subunidades.

La RGP en las membranas de Golgi aisladas tanto de epicotiles de *Pisum sativum* como de plantas de *Arabidopsis thaliana*, mostraron diferentes grados de oligomerización, por lo que podríamos hipotetizar que la glicosilación de la RGP conduce a la formación de oligómeros solubles que pueden orientar a la RGP en la membrana de Golgi. Este proceso evitaría el traslado de la unidad de azúcar de nuevo a UDP. Para una mejor comprensión tanto de la formación de complejos como de la asociación a organelas, se probaron otros posibles nucleótidos-azúcares que las aquí presentadas como ADP-glucosa, manosa-UDP, UDP-ácido galacturónico, ácido UDP-glucurónico, que sin embargo, no se unieron a la RGP (Bocca, 1998). Finalmente no se puede descartar que otros azúcares nucleótidos muestren interacción con la RGP, como muestra Konishi et al. (2007).

Hace unos años Sagi et al. (2005) encontraron que la proteína RGP se asociaba al Golgi, así como a plasmodesmos lo que sugiere un nuevo papel para la proteína, en la exportación nucleótidos-azúcares. La aparición de complejos RGP, la correlación con una disminución de la reversibilidad de la glicosilación de los complejos, así como la confirmación de que la RGP se asocia con las membranas del aparato de Golgi, se esquematiza en la Figura 58. La glicosilación parece promover la asociación de RGP monoméricas mediante un cambio de conformación, dado que la RGP asociada a la membrana de Golgi está presente en forma de oligómeros. Los datos experimentales la asocian con la bioíntesis de xiloglucano (Perrin et al. 1999; Faik et al. 2000; Madson et al. 2003, Zeng et al. 2010), aquí, proponemos que la glucosilación de la RGP monomérica llevaría a la formación de estructuras de alto peso molecular que contienen RGP, aumentando su afinidad por las membranas de Golgi.



**Figura 57.- Representación esquemática del mecanismo de acción de la RGP-** La glucosilación del monómero de RGP conduce a la formación de estructuras de alto peso molecular que contienen RGP, aumentando su afinidad por las membranas de Golgi (De Pino et al. 2007).

## 2.-Expresión de la RGP

En esta sección se discute la evidencia presentada sobre la regulación post-traduccional que regula la expresión de la RGP durante el desarrollo en plantas de arroz.

Se observó que la expresión de la RGP aumenta durante el desarrollo de plantas de arroz, alterando el balance entre las formas monoméricas y oligoméricas, así como también su abundancia relativa. La regulación post-traduccional modula la formación de complejos, luego que ocurre la germinación de la semilla. Concomitantemente con un aumento en el nivel de la glucosilación de la proteína RGP hay un cambio radical del patrón de expresión (Figura 39). Nuestros resultados indican que los complejos de alto peso molecular son las formas más prominentes en los tallos de arroz. Dando como resultado una inducción marcada de la RGP en esta etapa donde hay activa síntesis de polisacáridos, destinados al crecimiento (Figura 38). Teniendo en cuenta la cantidad de monómero junto con los oligómeros, hay un incremento significativo en la cantidad total de RGP (Figura 39B).

La oligomerización de OsRGP sería generada por el monómero glucosilado. En el monómero glucosilado se generaría un cambio conformacional que le permitiría asociarse con otras moléculas de RGP para formar los oligómeros (Figura 40 y 41). La cinética de

formación de los oligómeros sería propia de cada especie, ya que involucraría particularidades intrínsecas de la secuencia de aminoácidos de cada RGP presente en la especie en cuestión. Si tomamos como ejemplo la OsRGP, vemos por SDS-PAGE una banda que correspondería a un trímero, y el monómero, mientras que el dímero es una estructura visible en la StRGP (Figura 22, 23 y 25) o en el caso de la AtRGP (Figura 55).

Entonces, podría ocurrir un equilibrio entre el monómero glicosilado y el oligómero en las fracciones eluidas de Superosa 12 (Figura 40). Si bien los oligómeros son observados radioglicosilados sólo en condiciones de Superosa 12 (Figura 40), no las encontramos radioglicosiladas por autorradiografía (Figura 46 y 47). Este resultado puede explicarse por dos alternativas. La primera es la saturación de la proteína por glicosilación endógena en estados no reversibles. La otra alternativa es que la RGP de alto peso molecular esté impedida de ser glicosilada, tal vez debido a un acceso diferente del residuo de azúcar al complejo. La glicosilación podría estar ocurriendo por una reacción de inter-glicosilación entre diferentes moléculas RGP, entonces, si una transferencia de azúcar se produce entre dos moléculas de RGP, en la forma oligomérica la autoglicosilación podría verse afectada por impedimento estérico. Un mecanismo similar ha sido postulado para glucogenina, un iniciador propuesto para la biosíntesis del glucógeno en mamíferos (Cao et al. 1995; Gibbons et al. 2002).

También se observa que la expresión de la proteína se desplaza entre estados más o menos oligoméricos dependiendo del estado metabólico de la planta. Plantas etioladas de 8 días muestran un perfil de elución con 2 máximos, en estructuras tanto monoméricas como oligoméricas (Figura 44), si esas plantas son iluminadas, las estructuras monoméricas disminuyen, siendo predominantes las estructuras oligoméricas (Figura 45), lo que sugeriría que hay una predominancia de una u otra forma y que estaría regulada por una necesidad específica de la planta. Se conocen genes que codifican para proteínas involucradas en la síntesis de pared celular que están inducidos por auxinas durante los primeros días de crecimiento de plantas etioladas (Catalá et al. 2000), podría ser lo que está ocurriendo durante el crecimiento en oscuridad, ya que la RGP se ve inducida por la presencia de auxinas y citoquininas mostrando tanto la forma monoméricas como la oligomérica (Figura 51).

Cuando la semilla germina hay una movilización de azúcar procedente de los materiales almacenados para cubrir las necesidades metabólicas de la germinación, ya que durante el proceso de elongación hay activa síntesis de componentes de la pared celular (Leonardi et al. 1995), observándose un cambio significativo en el patrón de

expresión de la RGP (Figura 39). En ese estadio, además de la forma oligomérica discutida arriba, se revela la presencia de un péptido de 26 kDa. Su aparición coincide con la aparición de bandas de alto peso molecular y parece estar generado a partir de la proteína RGP después de la glicosilación (Figura 47), ya que está radioglicosilado con los tres UDP-azúcares descriptos para la RGP. Ya sea que este péptido pueda ser un producto de la proteína RGP generado por proteólisis específica, o liberado del oligómero (esto explicaría por qué no se encuentran los oligómeros radioglicosilados) está bajo investigación. Por otra parte, es tentador especular que el péptido podría generarse durante la transición-monómero hexámero, formando parte del mecanismo de reacción. En la misma línea de evidencia, se reportó una disminución de la masa molecular de la enzima nativa de papa después de glicosilación (Moreno et al. 1986).

Un aumento total de la RGP ocurre en los primeros estadios de crecimiento, un aumento de la RGP a nivel de proteína (Figura 39), que se correlaciona con un aumento de la RGP a nivel de ARNm (Figura 50). Se observa además que las C1RGP, específicamente la OsRGP1, es quien más colabora en el total de la expresión de las 3 RGPs de arroz, en los primeros 4 días de cultivo (Figura 50 y Tabla 5), sugiriendo que la expresión de las formas monomérica u oligomérica estaría modulada por un factor regulatorio intrínseco al desarrollo y no a la expresión diferencial de una u otra isoforma. Este factor regulatorio intrínseco debería ser algo más que una kinasa o una fosfatasa, que se expresa a distintos tiempos de desarrollo, ya que si la formación de complejos solo dependiera de la presencia de fosfatos, el tratamiento con fosfatasa alcalina, hubiera dado resultados similares a distintos tiempos de cultivo, y se vio que la fosfatasa alcalina regula diferencialmente la OsRGP (Tabla 3) dependiendo del estado de desarrollo. También se observó que las 3 RGPs de arroz tienen varios sitios putativos de fosforilación, al igual que la proteína de papa, por lo que quizás la fosforilación sea un mecanismo común de regulación de las RGPs.

El análisis de la expresión de RGP en etapas específicas del crecimiento demostró una fuerte correlación entre los niveles de transcritos y el crecimiento de la planta (Figura 50 y Figura 39), demostrando que no sólo la proteína sino además el mensajero de la RGP están inducidos por el desarrollo, y que además el mRNA de la RGP viene concentrado en la semilla. Este último hallazgo junto con la observación de que la OsRGP en semilla es activa, nos llevo a preguntarnos si era inducida por giberelinas, ya que es sabido que inducen la germinación, además de promover la acción del AIA y la

elongación de forma indirecta. También se sabe que las giberelinas tienen acción directa sobre la  $\alpha$ -amilasa que induce la liberación de azúcares del material de reserva (Perata et al. 1997). Se observó que la OsRGP es inducible por giberelinas (Figura 52A, calles 2 y 4), pero no hay un efecto significativo de azúcares libres sobre la inducción de la RGP (Figura 52B), aunque hay vías de señalización en las cuales la respuesta hormonal está modulada por azúcares (Smeekens 2000), por ejemplo, las giberelinas estimulan la expresión de la  $\alpha$ -amilasa tanto en el aleurona y el escutelo, pero los azúcares reprimen la expresión inducida por la giberelina sólo en el escutelo. Entonces la OsRGP es inducible por giberelina, pero no por azúcares libres en el medio de cultivo. Si hubiera un efecto de inducción en la expresión de la RGP debido a los azúcares, ya que se reportó que el promotor de la RGP de algodón era inducible por sacarosa (Wu et al. 2006), esta inducción podría deberse a un gradiente de concentración o a la acción concertada de azúcar y hormona.

Datos genómicos y proteómicos indican que las RGPs estarían involucradas en una variedad de caminos metabólicos que tienen lugar durante la vida de la planta:

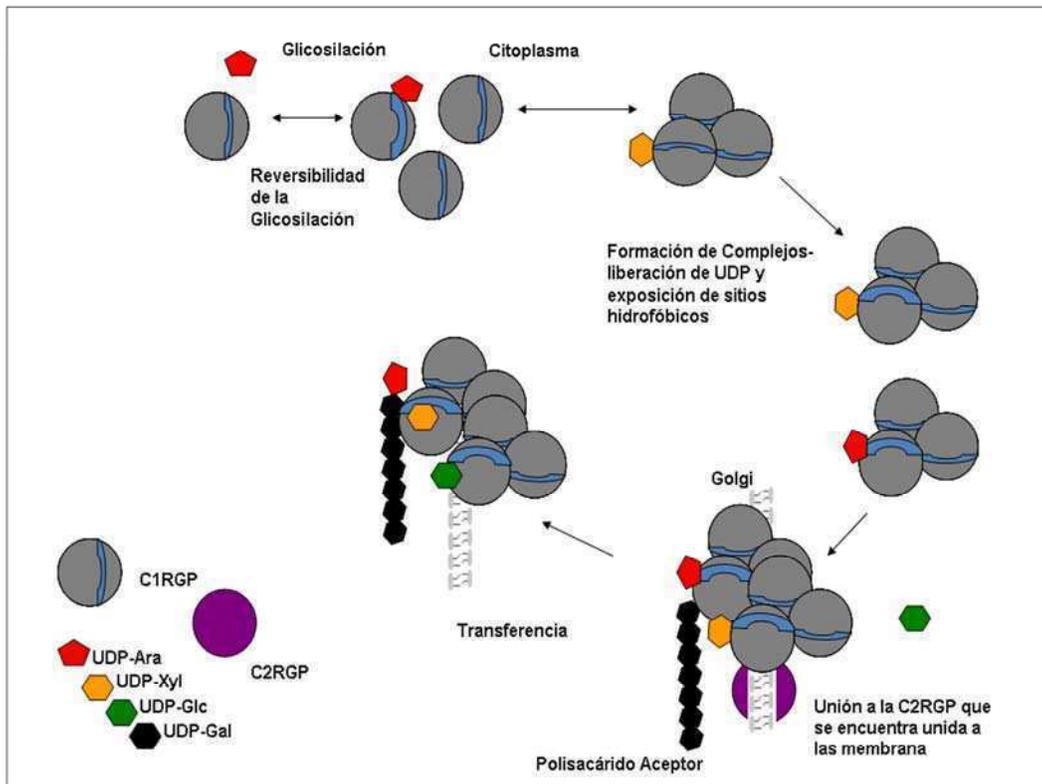
- Durante la diferenciación morfológica: incluyendo crecimiento y desarrollo del tubo polínico (Chen et al. 2006; Dai et al. 2006; Drakakaki et al. 2006; Matsuko et al. 2006; Zavaliev et al. 2010), desarrollo de la semilla (Gallardo et al. 2003).
- Estrés biótico: asociación a proteínas virales (Selth et al. 2006) y bloqueo del transporte viral (Zavaliev et al. 2010).
- Estrés abiótico: como los causados por benzotiadiazol (Hukkanen et al. 2008), cadmio (Ge et al. 2009), cloruro de sodio (Jiang et al. 2007), deficiencia de fosfato (Tran & Plaxton 2008), procesos que involucran especies reactivas del oxígeno (ROS; Kim et al. 2008; Benitez-Alfonso et al. 2010), y en condiciones de rotación en clinostato o campos gravitatorios aleatorios (Barjaktarovic et al. 2009).

Todos los procesos mencionados tienen en común la movilización de azúcares. Los movimientos de azúcares en la planta ocurren todo el tiempo, por motivos fisiológicos, como floración, o estacionales, otoño-primavera; en particular se hace mención a situaciones que provocan cambios bruscos en los gradientes de movilización, con el fin de responder al estímulo, debido a la necesidad de sintetizar activamente componentes de la pared celular como celulosa y hemicelulosa. Durante este trabajo se testaron estrés por heridas, y desecación (Figura 53), observándose que también la

OsRGP era inducida bajo estos estímulos. Esta inducción podría estar desencadenada por los daños mecánicos directos sobre la pared, con la concomitante liberación de azúcares, en el caso de las heridas; o por la acumulación de solutos en respuesta al estrés (Yamaguchi-Shinozaki et al. 2006), pero como se mostró en la Figura 52B, los azúcares libres en el medio de cultivo, no inducen significativamente la OsRGP, y la presencia de manitol, que comúnmente producido durante situaciones de estrés hídrico tampoco lo hace. Por todo este conjunto de resultados, sumado a la observación de elementos de respuesta a estrés, (W y G boxes), así como también elementos ABRE (ABA response elements) durante el análisis de elementos que actúan en *cis* sobre el promotor de la RGP de arroz podría decirse que la inducción de la RGP en estas condiciones sería indirecta quizás mediada por ABA. En este sentido, cuando se incubaron tallos de plantas de arroz en presencia de ABA (Figura 53B), se observó un aumento del nivel de ARNm de la RGP con respecto al control sin inducir, con lo que podríamos decir que la presencia de ABA podría estar mediando la respuesta de la RGP a este tipo de estrés. Este resultado es avalado por otro tipo de respuestas mediadas por ABA en las plantas de arroz, como es el cultivo en zonas anegadas, donde el proceso de adaptación de las plantas es en gran parte mediada por esta hormona (Xiong et al. 2002), así como también el llenado del grano donde la OsRGP aparece empacada.

En resumen, la RGP está presente en una variedad de caminos metabólicos que tendrían como nodo la síntesis/modificación/reparación de la pared celular, y que tiene un mecanismo de acción complejo que involucra cambios de tamaño y asociación a membranas. A este respecto es posible que la C1RGP glicosilada fuera capaz de reclutar a otras RGPs en un estadio en donde la reacción de autoglicosilación es reversible (Figura 59). La unión al azúcar y la liberación del UDP, cambiarían la conformación y capacidad de regenerar el nucleótido azúcar, esto le permitiría reclutar otras RGP. Una vez formado el oligómero, la exposición de sitios hidrofóbicos haría que la RGP tuviera afinidad por las membranas del Golgi, en las que estaría anclada la C2RGP, que es la única RGP con probables pasos de membrana. Este oligómero, llevaría al menos, dos azúcares distintos, que podrían ser transferidos secuencialmente, esta suposición esta avalada por el trabajo de Porchia et al (2002) en donde describen que la marca radiactiva es transferida de una proteína de 40 kDa (putativa RGP) a un polisacárido (arabinosilano) cuando incuban microsomas de trigo con UDP[<sup>14</sup>C]-Ara seguida de UDP-Xil o con ácido[<sup>14</sup>C] ferúlico. La transferencia del azúcar dependería del UDP-azúcar que se hubiera unido primero

(dentro de los posibles azúcares que se unen a la RGP), y de la unión de un segundo UDP-azúcar y del aceptor que fuera capaz de unirse, con esos azúcares ya unidos a la RGP.



**Figura 58-Modelo esquemático de la reacción transferencia del azúcar-** la C1RGP glicosilada sería capaz de reclutar a otras RGPs. En este estado, la reacción sería reversible. La unión al azúcar y la liberación del UDP, cambiarían la conformación y la reversibilidad, esto le permitiría reclutar otras RGP. Una vez formado el oligómeros, la exposición de sitios hidrofóbicos haría que la RGP tuviera afinidad por las membranas del Golgi, en las que esta anclada la C2RGP. Este oligómero, llevaría al menos, dos azúcares distintos, que podrían ser transferidos secuencialmente, La transferencia del azúcar dependería del UDP-azúcar que se hubiera unido primero y del aceptor que fuera capaz de unirse al azúcar y a la RGP.

De esta manera la reacción de transferencia concreta, estaría dependiendo no solo del aceptor, sino de una secuencia de azúcares. También explicaría porque no se ha reportado actividad para la C2RGP, y la ausencia de otra proteína que interactúe con la RGP, con la excepción de ella misma.

## *Conclusiones*

## **Conclusiones**

- Existe una correlación entre la actividad de glicosilación de la RGP y la presencia de complejos de la proteína, resultando en una mayor actividad cuando está presente en forma de monómero y en una menor actividad cuando se presenta en forma de multímeros.
- La glicosilación de RGP a partir de UDP-glucosa, UDP-galactosa y UDP-xilosa llevaría a cambios conformacionales de la RGP capaces de cambiar la capacidad de la RGP de formar parte de un complejo.
- La reversibilidad de la glicosilación dependería también del nivel de la asociación de RGP, mientras que la forma monomérica es altamente reversible, la forma multimérica es menos susceptible a liberar el residuo glicosídico en presencia de UDP.
- Se muestra que RGP monomérica tiene propiedades bioquímicas que son diferentes de la RGP oligomérica. Las formas oligoméricas de la RGP serían más hidrofóbicas aumentando su afinidad por las membranas del aparato de Golgi
- Se observó que la expresión de la RGP aumenta durante el desarrollo de plantas de arroz alterando el balance y la abundancia relativa de las formas monoméricas y oligoméricas, así como la cantidad total de la RGP, hay un aumento de la RGP a nivel de proteína que se correlaciona con un aumento a nivel de la RGP a nivel de ARNm. La expresión de la proteína se desplaza entre estados más o menos oligoméricos dependiendo del estado metabólico de la planta. Los complejos de alto peso molecular son las formas más prominentes en los tallos en activa elongación.
- Se observa que las C1RGP, específicamente la OsRGP1, es quien más colabora en los primeros 4 días de cultivo en el total de la expresión de las 3 RGPs de arroz, sugiriendo que la expresión de las formas monomérica u oligomérica estaría modulada por un factor regulatorio intrínseco al desarrollo y no a la expresión diferencial de una u otra isoforma.

- La C2RGP tendría al menos un paso transmembrana, y aunque no se ha descrito actividad asociada, podría pensarse que ésta se ancla a la membrana del Golgi, dejando el extremo amino del lado citoplasmático libre para interactuar con las otras subunidades.

- Se observó que las 3 RGP de arroz tienen varios sitios putativos de fosforilación, al igual que la proteína de papa, por lo que probablemente la fosforilación sea un mecanismo común de regulación de las RGPs, observándose que la fosfatasa alcalina regula diferencialmente la glucosilación de la OsRGP dependiendo del estado de desarrollo.

- La expresión del ARNm de la RGP se ve inducida por la presencia de auxinas y citoquininas, y por ABA.

- Se observó que tanto la proteína como el ARNm de la RGP vienen concentrados en la semilla, y que la OsRGP en semilla sin germinar es activa y era inducida por GA que regula la germinación pero no por azúcares libres en el medio de cultivo.

- La OsRGP es inducida por estrés por heridas, y desecación. Probablemente la inducción sea mediada por ABA ya que cuando se incubaron tallos de plantas de arroz en presencia de ABA se observó un aumento del nivel de ARNm de la RGP.

# *Perspectivas*

## **1.-Estructura y función**

Estudios de oligomerización mediante el uso de proteínas recombinantes mutantes para la arginina que se glicosila, y para el sitio de unión al UDP azúcar, DXD. Así como también la proteína RGP endógena de papa mediante una columna de afinidad de UDP-hexanolamina.

- a- Secuenciación de complejos de alto peso molecular.
- b- Determinación de estructura y cinética de oligomerización mediante difracción circular y light scattering.
- c- Los resultados de la tesis demostrando que la glicosilación regula la oligomerización y su asociación a membrana permitirán llevar a cabo experimentos de transferencia de UDP-azúcares: extracción de microsomas tratados con proteasa (para depletar de RGP endógena asociada a las membranas) incubación con UDP-Ara seguida de incubación con UDP-Xyl, UDP-Glc, o UDP-Gal, seguida de precipitación con TCA (para ver la marca sobre las proteínas) o con metanol para medir incorporación a polisacáridos, precipitación con acetato de sodio y degradación con endo o exoglucanasas para analizar el polisacárido. También se cuenta con los 3 genes de arroz clonados en vectores de expresión, tanto mutantes como wild type para completar estos experimentos de transferencia.

## **2.-Expresión**

- a- Expresión vs. Desarrollo: Extracción de RNA de plantas de arroz a lo largo de todo el ciclo de vida, seguida de RT y PCR semi cuantitativa para analizar expresión diferencial de RGP1, 2 y 3 de arroz.
- b- Clonado del gen de RGP2. Estudios de localización mediante el armado de una proteína de fusión (GFP-RGP2).

## *Referencias Bibliográficas*

- Abeijon C, Mandon EC, Hirschberg CB (1997)** Transporters of nucleotide sugars, nucleotide sulfate and ATP in the Golgi apparatus. *Trends Biochem Sci* 22: 203-207
- Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Staehelin LA, Varner JE (1997)** Do structure of cell wall polysaccharides define their mode of synthesis? *Plant Physiol* 113:1-3
- Alonso MD, Lomako J, Lomako WM, Whelan WJ (1995)** A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J* 9:1126-1137
- Anderson MA, Stone BA (1975)** A new substrate for investigating the specificity of b-glucan hydrolases. *FEBS Lett* 52:202-207
- Ardila FJ, Tandecarz JS (1992)** Potato tuber UDP-glucose: protein transglucosylase catalyses its own glucosylation. *Plant Physiol* 99:1342-1347
- Arioli T, Peng L, Betzner AS, Burn J, Wittke W, Herth W, Camilleri C, Hofte H, Plazinski J, Birch R, Cork A, Glover J, Redmond J, Williamson RE (1998)** Molecular analysis of cellulose biosynthesis in Arabidopsis. *Science* 279:717-720
- Aspinall GO Arioli T, Peng L, Betzner AS, Burn J, Wittke W, Herth W, Camilleri C, Höfte H, Plazinski J, Birch R, Cork A, Glover J, Redmond J, Williamson RE (1998)** Molecular Analysis of Cellulose Biosynthesis in Arabidopsis. *Science* 279:717-720
- Benitez-Alfonso Y, Jackson D, Maule A (2010)** Redox regulation of intercellular transport *Protoplasma* DOI 10.1007/s00709-010-0243-4
- Bocca SN, Rothschild A, Tandecarz JS (1997)** Initiation of starch biosynthesis: purification and characterization of UDP-glucose: protein transglucosylase from potato tubers. *Plant Physiol Biochem* 35:203-210
- Bocca SN (1998)** Caracterización bioquímica y molecular de la enzima UDP-glucosa: proteína transglucosilasa de *Solanum tuberosum*. Ph. D. thesis. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires.
- Bocca SN, Kissen R, Rojas-Beltrán JA, Noël F, Gebhardt C, Moreno S, du Jardin P, Tandecarz JS (1999)** Molecular cloning and characterization of the enzyme UDP-glucose: protein transglucosylase from potato. *Plant Physiol Biochem* 37:809-819
- Buckeridge S, Vergara CE & Carpita NC (1999)** The Mechanism of Synthesis of a Mixed-Linkage (1-3),(1-4) $\beta$ -D-Glucan in Maize. Evidence for Multiple Sites of Glucosyl Transfer in the Synthase Complex. *Plant Physiology* 120:1105-1116
- Breton C, Šnajdrová L, Jeanneau C, Koca J, Imberty A (2006)** Structure and Mechanism of Glycosyltransferases. *Glycobiology* 16: 29-37
- Breton C and Imberty A (1999)** Structure/function studies of glycosyltransferases. *Current Opinion in Structural Biology* 9:563-571
- Brown DM, Zeef LAH, Ellis J, Goodacre R, Turner SR (2005)** Identification of novel genes in Arabidopsis involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *Plant Cell* 2005 17:2281-2295

- Brown Jr RM. (1996)** The biosynthesis of cellulose. *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry* 33: 1345–1373
- Catala C, Rose JKC, Bennett AB (2000)** Auxin-Regulated Genes Encoding Cell Wall-Modifying Proteins Are Expressed during Early Tomato Fruit Growth. *Plant Physiol.* 122:527-534
- Cao Y, Steinrauf LK, Roach PJ (1995)** Mechanism of glycogenin self-glucosylation. *Arch Biochem Biophys* 319:293-298
- 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
- Carpita NC (1996)** Structure and biogenesis of the cell wall of grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 445–476
- Carpita NC, Gibeaut DM (1993)** Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3: 1-30
- Carpita NC, Defernez M, Findlay K., Wells B, Shoue DA, Catchpole G, Wilson RH, McCann MC. (2001)** Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiol.* 127:551-565.
- Castelli S, Vitale A (2005)** The phaseolin vacuolar sorting signal promotes transient strong membrane association and aggregation of the bean storage protein in transgenic tobacco. *J Exp Bot* 56:1379-1387
- Ceroni A, Passerini A, Vullo A, Frasconi P (2006)** DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction Server. *Nucleic Acids Research* Doi:10.1093/nar/gkl266
- Chen Y, Chen T, Shen S, Zheng M, Guo1 Y, Lin J, Baluska F, Samaj J (2006)** Differential display proteomic analysis of *Picea meyeri* pollen germination and pollen-tube growth after inhibition of actin polymerization by latrunculin B. *Plant Journal* 47, 174–195
- Chen T, Wu X, Chen Y, Li X, Huang M, Zheng M, Baluska F, Samaj J, Lin J (2009)** Combined Proteomic and Cytological Analysis of Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin Regulation in *Picea meyeri* Pollen Tube Growth . *Plant Physiol.* 149: 1111–1126
- Chourey PS, Taliercio EW, Carlson SJ, Ruan YL (1998)** Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Mol Gen Genet* 259: 88-96
- Cocuron JC, Lerouxel O, Drakakaki G, Alonso AP, Liepman AH, Keegstra K, Raikhel N, Wilkerson CG (2006)** A gene from the cellulose synthase-like C family encodes  $\alpha$ -1,4 glucan synthase. *PNAS* 104:8550-8555
- Coutinho PM, Stam M, Blanc E, Henrissat B (2003)** Why are there so many carbohydrate-active enzyme-related genes in plants? *Trends Plant Sci* 8:563-565

- Cosgrove DJ (1989)** Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. *Planta*. 177:121-130.
- Cosgrove DJ (1997)** Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* 9: 1031-1041.
- Cosgrove DJ (2000)** Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407:6802
- Cosgrove DJ (2005)** Growth of the plant cell wall *Nature* 6: 850-861
- Cote F & Hahn M (1994)** Oligosaccharins. Structure and signal transduction. *Plant Mol. Biol.* 26: 137-144
- Crowell EF, Bischoff V, Desprez T, Rolland A, Stierhof YD, Schumacher K, Gonneau M, Hofte H, and Vernhettes S (2009)** Pausing of Golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:1141–1154
- Cutler S & Somerville C (1997)** Cellulose synthesis: cloning *in silico*. *Curr Biol* 7:108-111
- Dai S, Chen T, Chong K, Xue Y, Liu S, Wang T (2007)** Proteomics Identification of Differentially Expressed Proteins Associated with Pollen Germination and Tube Growth Reveals Characteristics of Germinated *Oryza sativa* Pollen. *Mol. Cell. Proteomics* 6: 207-230
- Dalessandro G, Northcote DH (1977)** Changes in enzymic activities of nucleoside diphosphate sugar interconversions during differentiation of cambium to xylem in pine and fir. *Biochem J* 162: 281-288
- Delgado IJ, Wang Z, de Rocher A, Keegstra K, Raikhel NV (1998)** Cloning and characterization of AtRGP1: A reversibly autoglycosylated *Arabidopsis* protein implicated in cell wall biosynthesis. *Plant Physiol* 116:1339-1349
- Delmer DP (1999)** Cellulose Biosynthesis: Exciting Times for A Difficult Field of Study Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology Ann. Rev Plant Physiol Mol Biol 50: 245-276
- De Pino V, Borán M, Norambuena L, González M, Reyes F, Orellana A, Moreno S (2007)** Complex formation regulates the glycosylation of the reversibly glycosylated polypeptide. *Planta* 226:335-345
- Desprez T, Juraniec M, Crowell EF, Jouy H, Pochylova Z, Parcy F, Höfte H, Gonneau M, Vernhettes S (2007)** Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15572-15577
- Doblin MS, Kurek I, Jacob-Wilk D, Delmer DP (2002)** Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol* 43:1407-1420
- Drakakaki G, Zabortina O, Delgado IJ, Robert S, Keegstra K, Raikhel NV (2006)** *Arabidopsis* Reversibly Glycosylated Polypeptides 1 and 2 Are Essential for Pollen Development. *Plant Physiol* 142:1480-1492

- Driouich A, Faye L, Staehelin A (1993)** The plant Golgi apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins. *Trends Biochem Sci* 18: 210-214
- Dröge-Laser W, Kaiser A, Lindsay WP, Halkier BA, Loake GJ, Doerner P, Dixon RA and Lamb C (1997)** Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase which phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBP-1, in the induction of early transcription-dependent defenses. *EMBO J* 16: 726-738
- Dhugga KS, Ulvskov P, Gallagher SR, Ray PM (1991)** Plant polypeptides reversibly glucosylated by UDP-glucose: Possible components of Golgi  $\beta$ -glucan synthase in pea cells. *J Biol Chem* 226: 21977-21984
- Dhugga KS, Tiwari SC, Ray PM (1997)** A reversibly glycosylated polypeptide (RGP1) possibly involved in plant cell wall synthesis: Purification, gene cloning and trans-Golgi localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7679-7684
- Dhugga KS, Barreiro R, Whitten B, Stecca K, Hazebroek J, Randhawa GS, Dolan M, Kinney AJ, Tomes D, Nichols S, Anderson P (2004)** Guar Seed  $\beta$ -Mannan Synthase Is a Member of the Cellulose Synthase Super Gene. *Science* 303: 363-366
- Dunkley TP, Hester S, Shadforth IP, Runions J, Weimar T, Hanton SL, Griffin JL, Bessant C, Brandizzi F, Hawes C, Watson RB, Dupree P, Lilley KS (2006)** Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6518-6523.
- Edwards ME, Dickson CA, Chengappa S, Sidebottom C, Michael J, Gidley MJ and Reid JSG (2002)** Molecular characterization of a membrane-bound galactosyltransferase of plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis. *Plant J.* 19: 691-697
- El-Battari A, Prorok M, Angata K, Mathieu S, Zerfaoui M, Ong E, Susuki M, Lombarda D, Fukuda M (2003)** Different glycosyltransferases are differentially processed for secretion, dimerization, and autoglycosylation. *Glycobiology* 13:941-953
- Epel BL, vanLent JWM, Cohen L, Kotlizky G, Katz A, Yahalom A (1996)** A 41 kDa protein isolated from maize mesocotyl cell walls immunolocalizes to plasmodesmata. *Protoplasma* 191:70-78
- Faik A, Desveaux D, Maclachlan G (2000)** Sugar-nucleotide binding and autoglycosylating polypeptide(s) from nasturtium fruit: biochemical and potential functions. *Biochem J* 347:857-864
- Faulkner CR, Blackman LM, Cordwell SJ, Finkelstein RL (2005)** Proteomic identification of putative plasmodesmatal proteins from *Chara corallina*. *Proteomics* 5:2866-2875
- Finkelstein RR & Gibson SI (2001)** ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Curr Opin Plant Biol.* 5: 26-32.
- Fujimoto D & Moriguchi T (1978)** Pyridinoline, a Non-Reducible Crosslink of Collagen. *J. Biochem.* 83:863-867

- Gallardo K, Le Signor C, Vandekerckhove J, Thompson RD, Burstin J (2003)** Proteomics of *Medicago truncatula* Seed Development Establishes the Time Frame of Diverse Metabolic Processes Related to Reserve Accumulation. *Plant Physiol*, 133: 664–682
- Ge C, Ding Y, Wang Z, Wan D, Wang Y, Shang-Qi, Luo S (2009)** Responses of wheat seedlings to cadmium, mercury and trichlorobenzene stresses. *Journal of Environmental Sciences* 21: 806–813
- Geigenberger P, Merlo L, Reimholz R, Stitt M (1994)** When growing potato tubers are detached from their mother plants there is a rapid inhibition of starch synthesis, involving inhibition of ADP glucose pyrophosphorylase. *Planta* 193:486-493
- Geren CR, Magee SC, Ebner KE (1975)** Circular dichroism in Galactosyltransferase upon substrate binding. *Biochemistry* 14:1461-1463.
- Gibbons BJ, Roach PJ, Hurley TD (2002)** Crystal structure of the autocatalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin. *J Mol Biol* 319:463-77
- Gibeaut DM, Carpita NC (1993)** Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *FASEB J* 8: 904-915
- Gibeaut DM, Carpita NC (1991)** Tracing cell wall biogenesis in intact cells and plants: selective turnover and alteration of soluble and cell wall polysaccharides in grasses. *Plant Physiol* 97: 551–561
- Gillmor CS, Lukowitz W, Brininstool G, Sedbrook JC, Hamann T, Poindexter P, Somerville C (2005)** Glycosylphosphatidylinositolanchored proteins are required for cell wall synthesis and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:1128-1140.
- Guicherd P, Peltier JP, Gout E, Bligny R, Marigo G (1997)** Osmotic adjustment in *Fraxinus excelsior* L.: malate and mannitol accumulation in leaves under drought conditions. *Trees - Structure and Function* 11 155-161
- Gutierrez R, Lindeboom JJ, Paredes AR, Emons AM, and Ehrhardt DW (2009)** *Arabidopsis* cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nat. Cell Biol.* 11:797–806
- Hukkanen A, Kokko H, Buchala A, Häyrinen J, Kärenlamp S (2008)** Benzothiadiazole affects the leaf proteome in arctic bramble (*Rubus arcticus*) *Mol Plant Path* 9: 799- 808.
- Hazen SP, Scott-Craig JS, Walton JD (2002)** Cellulose synthase-like genes of rice. *Plant Physiol* 128:336-340
- Hofmann K & Stoffel W (1993)** TMbase-A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 47,166
- Itho K, Yamaguchi J, Huang N, Rodriguez LR, Akazawa T, Shimamoto K (1995)** Developmental and hormonal regulation of rice  $\alpha$ -amylase(RAmy1A)-gusA fusion genes in transgenic rice seeds. *Plant Physiol.* 107:25-31

- Jensen JK, Sørensen SO, Harholt J, Geshi N, Sakuragi Y, Møller I, Zandleven J, Bernal AJ, Jensen NB, Sørensen C, Pauly M, Beldman G, Willats WG, Scheller HV (2008)** Identification of a xylogalacturonan xylosyltransferase involved in pectin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:1289-1302
- Jiang Y, Yang B, Harris NS, Deyholos MK (2007)** Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *J Exp Bot.* 58: 3591-3607
- Kende H (1987)** Studies on internodal growth using deepwater rice: In physiology of the cell expansion during plant growth. Cosgrove DJ, Knievel DP, eds (Rockville, MD: American Society of plant Physiologist 227-236
- Kim SG, Kim ST, Kang SY, Wang Y, Kim W, Kang KY (2008)** Proteomic analysis of reactive oxygen species (ROS)-related proteins in rice roots. *Plant Cell Rep* 27:363–375
- Kimura S, Laosinchai W, Itoh T, Cui X, Linder R, Brown Jr RM (1999)** Immunogold Labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *The Plant Cell* 11: 2075–2085
- Konishi T, Takeda T, Miyazaki Y, Ohnishi-Kameyama M, Hayashi T, O'Neill MA, Ishii T (2007)** A plant mutase that interconverts UDP-arabinofuranose and UDP-arabinopyranose. *Glycobiology* 17:345-354
- Konishi T, Ohnishi-Kameyama M, Funane K, Miyazaki Y, Konishi T (2010)** An argynil residue in rice UDP-arabinopyranose mutase is required for catalytic activity and autoglycosylation. *Carbohydr. Res.* Doi: 10.1016/j.carres.2010.01.008
- Konishi T, Miyazaki Y, Yamakawa S, Iwai H, Satoh S, Ishii T (2010)** Purification and biochemical characterization of recombinant rice UDP-Arabinopyranose mutase generated in insect cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74 (1) 191-194
- Kudlicka K, Brown Jr RM. (1997)** Cellulose and callose biosynthesis in higher plants (I. Solubilization and separation of (1-3) and (1-4)- $\beta$ glucan synthase activities from mung bean). *Plant Physiology* 115: 643–656.
- Kurek I, Kawagoe Y, Jacob-Wilk D, Doblin M, Delmer D (2002)** Dimerization of cotton fiber cellulose synthase catalytic subunits occurs via oxidation of the zinc-binding domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11109-11114.
- Laemmli JK (1970)** Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lane DR, Wiedemeier A, Peng L, Hofte H, Vernhettes S, Desprez T, Hocart CH, Birch RJ, Baskin TI, Burn JE et al. (2001)** Temperature sensitive alleles of RSW2 link the KORRIGAN endo-1,4-bglucanase to cellulose synthesis and cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126:278-288.

- Langeveld SMJ, Vennik M, Kottenhagen M, van Wijk EL, Buijk A, Kijne JW, de Pater S (2002)** Glucosylation activity and complex formation of two classes of reversibly glycosylated polypeptides. *Plant Physiol* 129:278-289
- Lavintman N, Tandecarz JS, Carceller M, Mendiara S, Cardini CE (1974)** Role of uridine diphosphate glucose in the biosynthesis of starch. *Eur J Biochem* 50:145-155
- Leonardi A, Heimovaara-Dijkstra S, Wang M (1995)** Differential involvement of abscisic acid in dehydration and osmotic stress in rice cell suspension. *Physiol Plantarum* 93:31-37
- Leloir LF, and Cardini CE (1962)** UDPG-glycogen transglucosylase. In: Boyer PD, Lardy H, Myrbäck K (eds) *The Enzymes*, 2nd edn. Academic Press, New York, pp. 317-326.
- Lerouxel O, Cavalier DM, Liepman AH, and Keegstra K (2006)** Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides-a complex process. *Curr Opin Plant Biol* 9:621-630
- Lukowitz W, Nickle TC, Meinke DW, Last RL, Conklin PL, Somerville CR (2001)** *Arabidopsis* *cyt1* mutants are deficient in a mannose-1-phosphate guanylyltransferase and point to a requirement of N-linked glycosylation for cellulose biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2262-2267.
- Lorbiecke R, Sauter M (1998)** Induction of cell growth and cell division in the intercalary meristem of submerged deepwater rice (*Oryza sativa L.*) *Planta* 204:140-145
- Madson M, Dunand Ch, Li X, Verma R, Vanzin GF, Caplan J, Shoue DA, Carpita NC, Reiter WD (2003)** The MUR3 gene of *Arabidopsis* encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins. *Plant Cell* 15:1662-1670
- Matsuko H, Endo M, Saito H, Hakozaki H, Park JI, Kawagishi-Kobayashi M, Takada Y, Okabe T, Kamada M, Takahashi H, Higashitani H, Watanabe M (2006)** Anther specific genes expressed through microsporogenesis, are temporally and spatially regulated in legume model *Lotus japonicus*. *Genes Genet. Syst* 81: 57-62
- Membré N, Bernier F, Staiger D, Berna A (2000)** *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins:
- McNeil M, Darvill AG, Fry SC, Albersheim P (1984)** Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu Rev Biochem* 53: 625-663
- Mohnen D (2008)** Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 11: 266-277
- Moreno S (1984)** Síntesis de  $\beta$ -(1-4) glucanos unidos a proteína: aislamiento de glucosiltransferasas de una fracción particulada de papa. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires
- Moreno S, Cardini CE, Tandecarz JS (1986)**  $\beta$ -Glucan synthesis on a protein primer, uridine diphosphoglucose: protein transglucosylase I. Separation from starch synthetase and phosphorylase and a study of its properties. *Eur J Biochem* 157: 539-545
- Moreno S, Tandecarz JS (1982)** Potato tuber glucosyl transferases: partial characterization of the solubilized enzymes. *FEBS Lett* 139: 313-316

- Moreno S, Cardini CE, Tandecarz JS (1987)**  $\beta$ -Glucan synthesis on a protein primer: A reconstituted system for the formation of protein-bound  $\beta$ -glucan. *Eur J Biochem* 162:609-614
- Moreno S, Tandecarz JS (1996)** Analysis of primer independent phosphorylase activity in potato plants: high levels of activity in sink organs and sucrose-dependent activity in cultured stem explants. *Cell Mol Biol* 42: 637-643
- Mühlenhoff M, Eckhardt M, Bethe A, Frosh M, Gerardy-Schahan R (1996)** Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1. *EMBO J* 15:6943- 6950
- Muñoz P, Norambuena L, Orellana A (1996)** Evidence for an UDP glucose transporter in Golgi apparatus-derived vesicles from pea and its possible role in polysaccharide biosynthesis. *Plant Physiol* 112:1585–1594
- Murashige T, Skoog FA (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissues cultures. *Physiol Plant* 15:473-479
- Neckelmann G, Orellana A (1998)** Metabolism of uridine 5'-difosfate-glucose in Golgi vesicles from pea stems. *Plant Physiol* 117: 1007-1014
- Norambuena L, Marchant L, Berninsone P, Hirschberg CB, Silva H, Orellana A (2002)** Transport of UDP-galactose in plants. Identification and functional characterization of AtUTr1, an *Arabidopsis thaliana* UDP-galactose/UDP-glucose transporter. *J Biol Chem* 277:32923-32929
- Odegard W, Liu JJ, de Lumen BO (1996)** Cloning and expression of rice (*Oryza sativa*) sucrose synthase 1 (RSs1) in developing seed endosperma *Plant Sci.* 113:67-78.
- Orellana A, Neckelmann G, Norambuena L (1997)** Topography and function of Golgi Uridine-5'-diphosphatase from pea stems. *Plant Physiol* 114: 99-107
- Pagant S, Bichet A, Sugimoto K, Lerouxel O, Desprez T, McCann M, Lerouge P, Vernhettes S, Hofte H (2002)** KOBITO1 encodes a novel plasma membrane protein necessary for normal synthesis of cellulose during cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:2001-2013
- Paredes AR, Somerville CR, Ehrhardt DW (2006)** Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* 312:1491-1495.
- Paredes AR, Persson S, Ehrhardt DW, Somerville CR (2009)** Genetic evidence that cellulose synthase activity influences microtubule cortical array organization. *Plant Physiol.* 147:1723–1734
- Pear J, Kawagoe Y, Schreckengost W, Delmer DP, Stalker D (1996)** Higher plants contain homologs of the bacterial CelsA genes encoding the catalytic subunit of the cellulose synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:12637–42
- Peck SC & Kende H (1995)** Sequential induction of the ethylene biosynthetic enzymes by indole-3-acetic acid in etiolated peas. *Plant Mol Biol* 28:293-301

- Perata P, Matsukura C, Vernieri P, Yamaguchi J (1997)** Sugar repression of gibberellin-dependent signaling pathway in barley embryos. *Plant Cell* 9:2197-2208.
- Perrin RM, DeRocher AE, Bar-Peled M, Zeng W, Norambuena L, Orellana A, Raikhel NV, Keegstra K (1999)** Xyloglucan Fucosyltransferase, an Enzyme Involved in Plant Cell Wall Biosynthesis. *Science* 284:1976-1979
- Porchia AC, Oxenboll-Sorensen S, Scheller HV (2002)** Arabinoxylan biosynthesis in wheat: characterization of arabinosyltransferase activity in Golgi membranes. *Plant Physiol* 130:432-441
- Pozueta-Romero J, Pozueta-Romero D, Gonzalez P, Etxeberria E (2004)** Activity of membrane-associated sucrose synthase is regulated by its phosphorylation status in cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus*). *Physiol Plant* 122:275-280
- Quentmeier H, Ingold E, Seitz HU (1987)** Purification of an autocatalytic protein-glycosylating enzyme from cell suspensions of *Daucus carota* L. *Planta* 171: 483-488
- Ray PM (1980)** Cooperative action of  $\beta$ -glucan synthetase and UDP-xylose xylosyl transferase of Golgi membranes in the synthesis of xyloglucan-like polysaccharide. *Bichim Biophys Acta* 629:431-444
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (1992)** *Biología de las Plantas*. Ed Reverte, Barcelona, España
- Richmond TA & Somerville CR (2000)** The cellulose synthase superfamily *Plant Physiol* 124: 495-498
- Richmond TA & Somerville CR (2001)** Integrative approaches to determining Csl function. *Plant Mol Biol* 47:131-143.
- Robert S, Bichet A, Grandjean O, Kierzkowski D, Satiat- Jeunemaitre B, Pelletier S, Hauser M-T, Hofte H, Vernhettes S (2005)** An *Arabidopsis* endo-(1-4)- $\beta$ -D-glucanase involved in cellulose synthesis undergoes regulated intracellular cycling. *Plant Cell* 17:3378-3389.
- Ross J, Li Y, Lim E-K, Bowles DJ (2001)** Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol* 2:3004.1–3004.6
- Rost B, Yachdav G, Liu J (2004)** The PredictProtein Server. *Nucleic Acids Research* 32(Web Server issue):W321-W326
- Rothschild A, Tandecarz JS (1994)** UDP-glucose: protein transglucosylase in developing maize endosperm. *Plant Sci* 97: 141-148
- Rothschild A, Wald FA, Bocca SN, Tandecarz JS (1996)** Inhibition of UDP-glucose: protein transglucosylase by a maize endosperm protein factor. *Cell Mol Biol* 42: 645-651
- Sandhu APS, Randhawa GS, Dhugga KS (2009)** Plant Cell Wall Matrix Polysaccharide Biosynthesis. *Mol Plant*. Doi: 10.1093/mp/ssp056

- Sagi G, Katz A, Guenoune-Gelbart D, Epel BL (2005)** Class 1 reversibly glycosylated polypeptide are plasmodesmal-associated proteins delivered to plasmodesmata via the Golgi apparatus. *Plant Cell* 17:1788-1800
- Sasai K, Ikeda Y, Tsuda T, Ihara H, Korekane H, Shiota K, Taniguchi N (2001)** The critical role of the stem region as a functional domain responsible for the oligomerization and Golgi localization of N-acetylglucosaminyltransferase V. The involvement of a domain homophilic interaction. *J Biol Chem* 276:759-765
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Saxena IM, Brown Jr RM, Fever M, Geremia RA, Henrissat B (1995)** Multidomain Architecture of b-Glycosyl Transferases: Implications for Mechanism of Action. *J Bact* 1419-1424
- Saxena IM & Brown RM Jr (1999)** Are the reversibly glycosylated polypeptides implicated in plant cell wall biosynthesis non-processive  $\beta$ -glycosyltransferases? *Trends Plant Sci* 4:6-7
- Saxena IM & Brown Jr RM (2005)** Cellulose Biosynthesis: Current Views and Evolving Concepts. *Annals of Botany* 96: 9-21
- Schagger H & von Jagow G (1991)** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199:223-231
- Schagger H, Cramer WA, von Jagow G (1994)** Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* 217:220-230
- Selth LA, Dogra SC, Rasheed MS, Randle JW, Rezaian MA (2006)** Identification and characterization of a host reversibly glycosylated peptide that interacts with the Tomato leaf curl virus V1 protein. *Plant Mol Biol* 61:297-310
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M (2003)** Regulatory network of gene expresión in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 6:410-17
- Singh DG, Lomako J, Lomako WM, Whelan WJ, Meyer HE, Serwe M, Metzger JW (1995)**  $\beta$ -Glucosylarginine: a new glucose-protein bond in a self-glycosylating protein from sweet corn. *FEBS Lett* 376:61-64
- Smeekens Sjef (2000)** **Sugar-induced signal transduction in plants.** *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:49-81
- Somerville CR (2006)** Cellulose synthesis in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:53-78.
- Staudte RG, Woodward JR, Fincher GB, Stone BA (1985)** Watersoluble (1-3),(1-4)- $\beta$ -d-glucans from barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. III. Distribution of cellotrisyl and cellotetraosyl residues. *Carbohydr Polym* 3: 299-312
- Tandecarz JS, Cardini CE (1979)** Effect of 1,5-gluconolactone on the formation of a glucoprotein in potato tuber. *Plan Sci Lett* 1: 151-158

- Tandecarz JS, Ardila FJ, Bocca SN, Moreno S, Rothschild A (1995)** On the initiation of starch synthesis. In: Pontis HG, Salerno GL, Echeverria E (ed) Current Topics in Plant Physiology, vol. 14. Amer Soc Plant Physiol, Rockville, pp 107-114
- Taylor NG, Gardiner JC, Whiteman R, Turner SR (2004)** Cellulose synthesis in the *Arabidopsis* secondary cell wall. *Cellulose* 2004, 11:329-338.
- Testasecca P, Wald FA, Cozzarín ME, Moreno S (2004)** Regulation of self-glycosylation of reversibly glycosylated polypeptides from *Solanum tuberosum*. *Physiol Plant* 121:27-34
- Thomas JA, Kaith K, Schlender K, Larner J (1968)** A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-[14C]glucose. *Anal Biochem* 25:486-499
- Tran H & Plaxton WC (2008)** Proteomic analysis of alterations in the secretome of *Arabidopsis thaliana* suspension cells subjected to nutritional phosphate deficiency. *Proteomics* 8:4317-4326,
- Towbin J, Staehelin T, Gordon J (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350–4354
- Ugalde JE, Parodi AJ, Ugalde RA (2003)** De novo synthesis of bacterial glycogen: *Agrobacterium tumefaciens* glycogen synthase is involved in glucan initiation and elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:10659-63
- Wald FA, Rothschild A, Moreno S, Tandecarz JS (1998)** Identification of a UPTG inhibitor protein from maize endosperm: high homology with sucrose synthase protein. *Cell Mol Biol* 44:397-406
- Wald FA, Kissen R, du Jardin P, Moreno S (2003)** Characterization of UDP-Glucose: Protein transglucosylase genes from potato. *Plant Mol Biol* 52:705-714
- Wang T, Ou Y, Guidotti G (1998)** The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *J Biol Chem* 273:24814-24821
- Wood PJ, Weisz J, Blackwell BA (1994)** Structural studies of (1-3),(1-4)- $\beta$ -d-glucans by <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectroscopy and by rapid analysis of cellulose-like regions using high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal Chem* 71: 301–307
- Wood PJ, Weisz J, Mahn W (1991)** Molecular characterization of cereal  $\beta$ -glucans. II. Size-exclusion chromatography for comparison of molecular weight. *Cereal Chem* 68:530-536
- Wu AM, Ling C, Liu JY (2006)** Isolation of a cotton reversibly glycosylated polypeptide (GhRGP1) promoter and its expression activity in transgenic tobacco. *J Plant Physiol* 163:426-435
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006)** Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. *Annu Rev Plant Biol* 57:781–803

- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002)** Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *Plant Cell*, S165–S183
- Zandleven J, Sørensen SO, Harholt J, Beldman G, Schols HA, Scheller HV, Voragen AJ (2007)** Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem* 68:1219-1226.
- Zavaliev R, Sagi G, Gera A, Epel BL (2009)** The constitutive expression of *Arabidopsis* plasmodesmal-associated class 1 reversibly glycosylated polypeptide impairs plant development and virus spread. *J Exp Bot* Doi:10.1093/jxb/erp301
- Zeng W, Jiang N, Nadella R, Killen TL, Nadella V, Faik A.(2010)** A glucurono(arabino)xylan synthase complex from wheat contains members of the GT43, GT47, and GT75 families and functions cooperatively. *Plant Physiol*. 154:78-97
- Zewe V, Fromm H (1962)** Kinetic studies of rabbit muscle lactate dehydrogenase. *J Biol Chem* 237:1668-1675
- Zhu J. (2002)** Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:247–73