

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

TD
355

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LA RUTA GLUCOLÍTICA EN LAS SEMILLAS EN DESARROLLO DE GIRASOL
(*Helianthus annuus* L.) DURANTE LA FASE DE ACUMULACIÓN DE PRODUCTOS DE RESERVA
Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ALGUNAS DE LAS ENZIMAS IMPLICADAS.

Directores:

Dr. Enrique Martínez Force

Dr. Rafael Garcés Mancheño

Tutor:

Dr. Antonio José Márquez Cabeza

Doctorando:

Manuel Adrián Troncoso Ponce



Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Estudio de la ruta glucolítica en las semillas en desarrollo de girasol (*Helianthus annuus* L) durante la fase de acumulación de productos de reserva y caracterización bioquímica de algunas de las enzimas implicadas.

Sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de usuarios.
- Otros términos.

Firmado:

Sevilla, a 18 de Sept de 2008.

Manuel Saldaña Troncoso Ponce

0122210

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor por el Licenciado
Manuel Adrián Troncoso Ponce.

Troncoso

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 185 número 43 del libro
correspondiente.

Sevilla, 20-11-07

Fdo. Manuel Adrián Troncoso Ponce.

El Jefe del Negociado de Teoría,

Ruiz de H. U.

Directores

Dr. Enrique Martínez Force
Científico Titular
Instituto de la Grasa (CSIC)
Sevilla

Dr. Rafael Garcés Mancheño
Investigador Científico
Instituto de la Grasa (CSIC)
Sevilla

[Signature of Enrique Martínez Force]

Fdo. Enrique Martínez Force

[Signature of Rafael Garcés Mancheño]

Fdo. Rafael Garcés Mancheño.

Tutor

Dr. Antonio José Márquez Cabeza
Profesor Titular
Facultad de Biología
Sevilla

[Signature of Antonio José Márquez Cabeza]

Fdo. Antonio José Márquez Cabeza.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Depositado en Dpto. Bioquímica V.
de la Facultad Biología
de esta Universidad desde el día 29/11/07
hasta el día 19 de diciembre de 2007
Sevilla 19 de diciembre de 2007

EL DIRECTOR DE

[Signature of A. Vique]
DPTO. BIOQUÍMICA VEGETAL
Y FISIOLÓGIA MOLECULAR

Sevilla, Noviembre de 2007

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.

1. El girasol.	1
1.1. Aspectos generales.	1
1.2. Historia, origen y botánica de <i>Helianthus annuus</i> L.	2
1.3. Morfología y fisiología.	2
2. Síntesis de productos de reserva durante la embriogénesis.	6
2.1. Fuentes de carbono para el metabolismo de las semillas.	7
2.2. Flujos de carbono desde los tejidos fotosintéticos a las semillas.	8
2.3. Metabolismo de la sacarosa en las semillas en desarrollo.	9
3. La ruta glucolítica.	11
3.1. Aspectos generales.	11
3.2. Regulación de la ruta.	13
4. Enzimas de la ruta glucolíticas.	15
4.1. Invertasas (EC 3.2.1.26).	15
4.2. Hexoquinasa (EC 2.7.1.1).	16
4.3. Fosfoglucosa isomerasa (EC 5.3.1.9).	17
4.4. Fosfoglicerato quinasa (EC 2.7.2.3).	18
4.5. Enolasa (EC 4.2.11).	

OBJETIVOS	21
------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Materiales.	23
1.1. Material vegetal.	23
1.1.1. Líneas de girasol utilizadas.	23
1.1.2. Condiciones de cultivo.	23
1.2. <i>Escherichia coli</i> .	23
1.2.1. Estirpes utilizadas.	23
1.2.2. Cultivo en medio líquido.	24
1.2.3. Cultivo en medio sólido.	24
1.3. Material animal.	24
2. Métodos.	24
2.1. Bioquímica.	24
2.1.1. Preparación del extracto enzimático total.	24

2.1.2. Determinación cuantitativa de proteínas.	25
2.1.3. Electroforesis de proteínas. SDS-PAGE.	25
2.1.4. Aislamiento de plastidios.	26
2.1.5. Ensayos enzimáticos en extracto crudo.	26
2.1.6. Cálculo de los parámetros cinéticos aparentes.	28
2.1.7. Ensayos de actividad para las enzimas purificadas.	28
2.1.8. Caracterización cinética de las enzimas purificadas.	30
2.1.9. Efecto del pH y la temperatura sobre las actividades.	30
2.1.10. Determinación de metabolitos.	31
2.1.11. Determinación del contenido lipídico y riqueza grasa.	31
2.1.12. Determinación de la composición aminoacídica mediante HPLC.	32
2.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.	33
2.2.1. Extracción con ácido perclórico de las semillas en desarrollo.	33
2.2.2. Condiciones de adquisición para la espectroscopia ¹ H-RMN.	33
2.2.3. Análisis estadístico.	34
2.3. Biología Molecular.	34
2.3.1. Extracción de mRNA.	34
2.3.2. Síntesis de la primera cadena de cDNA.	34
2.3.3. Estimación de la concentración de ácidos nucleicos.	34
2.3.4. Obtención de DNA plasmídico.	35
2.3.5. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa.	35
2.3.6. Amplificación rápida de los extremos del cDNA (RACE).	37
2.3.7. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	38
2.3.8. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa.	39
2.3.9. Tratamientos enzimáticos del DNA.	39
2.3.10. Análisis de la expresión de mRNA mediante PCR a tiempo real.	41
2.3.11. Transformación genética.	43
2.3.12. Expresión heteróloga en E.coli y purificación de las proteínas recombinates.	44
2.3.13. Análisis informático de secuencias de DNA y proteínas.	45
2.3.14. Modelado tridimensional de las proteínas.	46
2.4. Western blot.	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	
1. La glucolisis durante el periodo de llenado de las semillas.	49
1.1. Contenido en carbohidratos solubles de las semillas de girasol.	49
1.2. Determinación de los parámetros cinéticos aparentes en extracto crudo.	51

1.3. Estudio de las actividades glucolíticas plastidiales.	52
1.4. Evolución de las actividades durante la fase de síntesis de productos de reserva.	54
1.5. Comparación entre diferentes líneas de girasol.	60
2. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de protones de extractos de semillas.	67
3. Clonación, secuenciación y análisis de la expresión de varios genes de la ruta glucolítica en semillas en desarrollo.	71
3.1. Aislamiento, caracterización y niveles de expresión de un cDNA codificante de una invertasa putativa de pared celular.	71
3.1.1. Amplificación de un fragmento del cDNA Hacwinv1.	71
3.1.2. Obtención de la secuencia completa del cDNA Hacwinv1.	72
3.1.3. Características de la secuencia polipeptídica deducida del cDNA Hacwinv1.	72
3.1.4. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica derivada de Hacwinv1.	75
3.1.5. Predicción de la estructura terciaria de la proteína HaCWINV1.	76
3.1.6. Estudio de los niveles de expresión de Hacwinv1.	77
3.2. Aislamiento, caracterización y niveles de expresión de un cDNA codificante de una hexoquinasa .	80
3.2.1. Amplificación de un fragmento interno del cDNA Hahxk1.	80
3.2.2. Obtención de la secuencia completa del cDNA Hahxk1.	80
3.2.3. Características de la secuencia polipeptídica deducida del cDNA Hahxk1.	80
3.2.4. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica derivada de Hahxk1.	83
3.2.5. Estructura terciaria de la proteína HaHXK1.	84
3.2.6. Estudio de los niveles de expresión de Hahxk1.	86
3.3. Aislamiento, caracterización y niveles de expresión de un cDNA codificante de un fosfoglucoasa isomerasa.	88
3.3.1. Amplificación de un fragmento interno del cDNA Hapgi1	88
3.3.2. Obtención de la secuencia completa del cDNA Hacpgi1.	88
3.3.3. Características de la secuencia polipeptídica deducida del cDNA Hacpgi1.	89
3.3.4. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica derivada de Hacpgi1.	91
3.3.5. Estructura terciaria de la proteína HacPGI1	92
3.3.6. Estudio de los niveles de expresión de Hacpgi1.	93
3.4. Aislamiento, caracterización y niveles de expresión de un cDNA codificante de una fosfoglicerato quinasa citosólica.	95
3.4.1. Amplificación de un fragmento interno del cDNA Hacpgk1.	95
3.4.2. Obtención de la secuencia completa del cDNA Hacpgk1.	95
3.4.3. Características de la secuencia polipeptídica deducida del cDNA Hacpgk1.	95

3.4.4. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica derivada de Hacpgk1.	97
3.4.5. Estructura terciaria de la proteína HacPGK1	98
3.4.6. Estudio de los niveles de expresión de Hacpgk1.	99
3.5. Aislamiento, caracterización y niveles de expresión de un cDNA codificante de una enolasa putativa.	101
3.5.1. Amplificación de un fragmento interno del cDNA Haeno1.	101
3.5.2. Obtención de la secuencia completa del cDNA Haeno1.	101
3.5.3. Características de la secuencia polipeptídica deducida a partir de Haeno1.	101
3.5.4. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica derivada de Haeno1.	103
3.5.5. Estructura terciaria de la proteína HaENO1	105
3.5.6. Estudio de los niveles de expresión de Haeno1.	106
4. Expresión heteróloga, purificación y caracterización cinética de enzimas de la ruta glucolítica en semillas en desarrollo de girasol.	109
4.1. Expresión, purificación y determinación de los parámetros cinéticos de HaHXK1.	109
4.1.1. Expresión heteróloga y purificación de la proteína (6His) Δ HaHXK1.	109
4.1.2. Efectos del pH sobre la actividad de (6His) Δ HaHXK1.	110
4.1.3. Efectos de la temperatura sobre la actividad de (6His) Δ HaHXK1.	111
4.1.4. Características cinéticas de la proteína recombinante (6His) Δ HaHXK1.	112
4.1.5. Estudio del efecto de posibles metabolitos inhibidores de la actividad.	115
4.2. Expresión, purificación y determinación de los parámetros cinéticos de HacPGI1.	117
4.2.1. Expresión heteróloga y purificación de la proteína (6His)HacPGI1.	117
4.2.2. Efectos del pH sobre la actividad de (6His)HacPGI1.	117
4.2.3. Efectos de la temperatura sobre la actividad de (6His)HacPGI1.	119
4.2.4. Características cinéticas de la proteína recombinante (6His)HacPGI1.	120
4.2.5. Estudio del efecto de posibles metabolitos inhibidores de la actividad.	121
4.3. Expresión, purificación y determinación de los parámetros cinéticos de HacPGK1	123
4.3.1. Expresión heteróloga y purificación de la proteína (6His)HacPGK1.	123
4.3.2. Efectos del pH sobre la actividad de (6His)HacPGK1.	123
4.3.3. Efectos de la temperatura sobre la actividad de (6His)HacPGK1.	124
4.3.4. Características cinéticas de la proteína recombinante (6His)HacPGK1.	125
4.3.5. Estudio del efecto de posibles metabolitos inhibidores de la actividad.	126
5. Evolución de los niveles de las enzimas purificadas mediante western blot durante el desarrollo de las semillas.	129
5.1. Evolución de los niveles de la enzima fosfoglucoasa isomerasa citosólica durante el desarrollo de las semillas.	129

5.2. Evolución de los niveles de la enzima fosfoglicerato quinasa durante el desarrollo de las semillas.	130
CONCLUSIONES.	133
BIBLIOGRAFÍA.	137

Índice de figuras

Figura	Título	Página
1.1.	Evolución de la superficie cultivada y la producción mundial a lo largo de los años.	1
1.2.	Evolución de la superficie cultivada y la producción en España lo largo de los años.	1
1.3.	Sección longitudinal de un capítulo de girasol	3
1.4.	Sección longitudinal de un aquenio	4
1.5.	Esquema de la ruta glucolítica de plantas	12
1.6.	Localización subcelular y funciones propuestas para las invertasas de plantas.	16
1.7.	Distribución y funciones metabólicas de las diferentes clases de hexoquinasas de plantas.	17
3.1.	Cambios en el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa durante el periodo de acumulación de productos de reserva en las semillas de girasol en desarrollo.	49
3.2.	Actividades glucolíticas que disminuyen durante el periodo de llenado de las semillas	55
3.3.	Actividades glucolíticas que aumentan durante el periodo de llenado de las semillas.	56
3.4.	Actividades glucolíticas que no varían significativamente durante el periodo de llenado de las semillas.	57
3.5.	Actividades glucolíticas que no presentan un perfil definido durante el periodo de llenado de las semillas.	58
3.6.	Cinética de síntesis de ácidos grasos en las semillas en desarrollo de girasol de la líneas CAS-6.	59
3.7.	Comparación entre aquellas actividades glucolíticas que disminuyen durante el desarrollo de las semillas CAS-6 y las actividades correspondientes en líneas de girasol con diferente contenido graso.	61
3.8.	Comparación entre aquellas actividades glucolíticas que aumentan durante el desarrollo de las semillas de CAS-6 y las actividades correspondientes en líneas de girasol con diferente contenido graso.	62
3.9.	Comparación entre aquellas actividades glucolíticas que no se modifican en gran medida durante el desarrollo de las semillas de CAS-6 y las actividades correspondientes en líneas de girasol con diferente contenido graso.	63
3.10.	Comparación entre aquellas actividades glucolíticas que nopresentan un perfil definido durante el desarrollo de las semillas de CAS-6 y las actividades correspondientes en líneas de girasol con diferente contenido graso.	63
3.11.	Diferencias en la cinética de síntesis de ácidos grasos en las distintas líneas de girasol estudiadas.	64
3.12.	Espectro de ¹ H-RMN de un extracto perclórico de semillas de 21 DDF perteneciente a la línea ZEN-8.	67
3.13.	Espectros completos obtenidos a partir de los compuestos EDTA, Ca-EDTA y Mg-EDTA.	68
3.14.	Espectros completos obtenidos a partir de los compuestos glucosa y sacarosa.	69
3.15.	Alineamiento parcial de secuencias aminoacídicas de invertasas de pared celular de plantas mediante el programa ClustalX v1.8	71
3.16.	Análisis filogenético de secuencias de proteínas que presentan el motivo β-fructosidasa (NDPNG) y el sitio catalítico de cisteína (MWECP/V).	74
3.17.	Árbol filogenético de la familia “cell-wall type invertase-like cDNA”.	75

3.18.	Modelo estructural propuesto para <i>HaCWINV1</i> .	76
3.19.	Niveles de expresión de <i>Hacwinv1</i> durante el periodo de acumulación de productos de reserva en las semillas en desarrollo de girasol de la línea CAS-6.	77
3.20.	Análisis de los niveles de expresión de <i>Hacwinv1</i> en diferentes tejidos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea CAS-6.	78
3.21.	Alineamiento parcial de secuencias aminoacídicas de hexoquinasas de plantas mediante el programa Clustal X v1.8.	80
3.22.	Alineamiento de secuencias aminoacídicas de hexoquinasas de plantas.	82
3.23.	Análisis filogenético de las enzimas hexoquinasas de plantas.	83
3.24.	Figura 3.24. Modelo estructural propuesto para <i>HaHXX1</i> .	85
3.25.	Medida de los niveles de expresión del mRNA <i>Hahxk1</i> durante el desarrollo de las semillas de girasol pertenecientes a la línea CAS-6.	86
3.26.	Medida de los niveles de expresión en diferentes tejidos de girasol pertenecientes a la línea CAS-6.	87
3.27.	Alineamiento parcial de secuencias aminoacídicas de fofoglucosa isomerasas citosólicas de plantas mediante el programa Clustal X v1.8.	88
3.28.	Alineamiento de secuencias aminoacídicas de fosfoglucosas isomerasas citosólicas de plantas.	90
3.29.	Análisis filogenético de las enzimas fosfoglucosa isomerasa citosólicas de plantas.	91
3.30.	Estructura terciaria de la secuencia <i>HacPGI1</i> .	92
3.31.	Medida de los niveles de expresión del mRNA <i>Hacpgi1</i> durante el desarrollo de las semillas de girasol pertenecientes a la línea CAS-6.	93
3.32.	Medida de los niveles de expresión en diferentes tejidos de girasol pertenecientes a plántulas de la línea CAS-6.	94
3.33.	Alineamiento de secuencias aminoacídicas de fosfoglicerato quinasa de plantas.	96
3.34.	Análisis filogenético de las enzimas fosfoglicerato quinasa de plantas y cianobacterias.	97
3.35.	Modelo tridimensional propuesto para de la secuencia de aminoácidos codificados en el cDNA <i>Hacpgk1. A</i> ,	98
3.36.	Medida de los niveles de expresión del mRNA <i>Hacpgk1</i> durante el desarrollo de las semillas de girasol pertenecientes a la línea CAS-6.	99
3.37.	Medida de los niveles de expresión en diferentes tejidos de girasol pertenecientes a la línea CAS-6.	100
3.38.	Alineamiento de secuencias aminoacídicas de enolasas de plantas.	102
3.39.	Alineamiento de secuencias aminoacídicas de enolasas de diversos organismos.	103
3.40.	Árbol filogenético de las enzimas enolasas.	104
3.41.	Estructura tridimensional de la secuencia de aminoácidos codificados en <i>Hacpgk1</i>	105
3.42.	Medida de los niveles de expresión del mRNA <i>Haeno1</i> durante el desarrollo de las semillas de girasol pertenecientes a la línea CAS-6.	106
3.43.	Niveles de expresión del mRNA <i>Haeno1</i> en diferentes tejidos de plántulas de girasol de la línea CAS-6.	107
4.1.	Análisis mediante SDS-PAGE de los pasos de la purificación de la proteína recombinante (6His) Δ <i>HaHXX1</i> .	109
4.2.	Efectos de la variación del pH sobre la actividad de (6His) Δ <i>HaHXX1</i> .	110
4.3.	Efecto de la temperatura sobre la actividad glucoquinasa.	111
4.4.	Efecto de las concentraciones crecientes de monosacáridos sobre la actividad.	112
4.5.	Efecto de las concentraciones crecientes de nucleótidos sobre la actividad.	113
4.6.	Análisis mediante SDS-PAGE de los pasos de la purificación de la proteína recombinante (6His) <i>HacPGI1</i> .	117

4.7.	Efectos de la variación del pH sobre la actividad de (6His) <i>HacPGI1</i> .	118
4.8.	Efecto de la temperatura sobre la actividad glucoquinasa.	119
4.9.	Efecto de las concentraciones crecientes de sustratos sobre la actividad de la proteína (6His) <i>HacPGI</i>	120
4.10.	Análisis mediante SDS-PAGE de los pasos de la purificación de la proteína recombinante (6His) <i>HaPGK1</i> .	123
4.11.	Efectos de la variación del pH sobre la actividad de (6His) <i>HaPGK1</i> .	124
4.12.	Efecto de la temperatura sobre la actividad fosfoglicerato quinasa, (6His) <i>HaPGK1</i> .	125
4.13.	Efecto de las concentraciones crecientes de 3-fosfoglicerato y de ATP sobre la actividad fosfoglicerato quinasa los tres pHs ensayados.	126
5.1.	Western blot de extractos de semillas en desarrollo utilizando anticuerpos anti-6(His) <i>HacPGI</i>	129
5.2.	Western blot de extractos de semillas en desarrollo utilizando anticuerpos anti-6(His) <i>HaPGK</i> .	130

Índice de tablas.

Tabla	Título	Página
2.1.	Estirpes de <i>E. coli</i> empleadas en este trabajo.	23
2.2.	Cebadores degenerados utilizados para la amplificación mediante PCR	36
2.3.	Características y nombre de los tampones del kit de Optimización	37
2.4.	Cebadores específicos utilizados para la amplificación mediante PCR de los cDNA completos.	38
2.5.	Plásmidos empleados para la ligación de fragmentos de DNA.	41
2.6.	Cebadores utilizados en la PCR a tiempo real.	43
3.1.	Parámetros cinéticos aparentes correspondientes a las actividades glucolíticas totales.	52
3.2.	Actividades enzimáticas de la ruta glucolítica en preparaciones de plastidios aislados de la línea CAS-6 obtenidos a partir de semillas en desarrollo de 17 DDF.	53
3.3.	Composición en aminoácidos expresada en mg/g FW de las semillas maduras de las diferentes líneas de girasol estudiadas.	65
3.4.	Comparación entre los niveles de carbohidratos solubles en las semillas en desarrollo de las líneas CAS-6 y ZEN-8.	66
3.5.	Propiedades fisicoquímicas de la secuencia polipeptídica derivada del cDNA <i>Hacwinv1</i> .	72
3.6.	Propiedades fisicoquímicas de la secuencia polipeptídica <i>HaH XK1</i> .	81
3.7.	Propiedades fisicoquímicas de la proteína <i>HacPGI1</i> .	89
3.8.	Propiedades fisicoquímicas de la secuencia de aminoácidos deducida del cDNA <i>Hacpgk1</i> .	95
3.9.	Propiedades fisicoquímicas de la secuencia de aminoácidos <i>HaENO1</i> .	101
4.1.	Parámetros cinéticos determinados para la proteína recombinante (6His) Δ <i>HaH XK1</i> .	114
4.2.	Efecto de varios metabolitos sobre la actividad de la proteína recombinante (6His) Δ <i>HaH XK1</i> .	116
4.3.	Parámetros cinéticos determinados para la proteína recombinante (6His) <i>HacPGI1</i> .	120
4.4.	Efecto de varios metabolitos sobre la actividad de la proteína recombinante (6His) Δ <i>HacPGI1</i> .	121
4.5.	Parámetros cinéticos determinados para la proteína recombinante (6His) <i>HaPGK1</i> .	125
4.6.	Efecto de varios metabolitos sobre la actividad de la proteína recombinante (6His) <i>HaPGK1</i> .	127

Abreviaturas.

1,3-DPGA	1,3-difosfoglicerato
2-PGA	2-fosfoglicerato
3-PGA	3-fosfoglicerato
ADP	Adenosin difosfato
ALD	Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Seroalbúmina bovina
Cinv	Invertasa neutra citosólica
CoA	Coenzima A
cPGI	Fosfoglucosa isomerasa citosólica
CTP	Citosin trifosfato
CWinv	Invertasa ácida de pared de pared celular
DDF	Días después de floración
DHAP	Dihidroxiacetonafosfato
DTT	Ditiotreitol
ENO	Enolasa
FEH	Fructan exohidrolasa
FK	Fructoquinasa
Fru	Fructosa
Fru-1,2-P ₂	Fructosa-1,6-bisfosfato
Fru-6-P	Fructosa-6-fosfato
FW	Peso fresco
G3P	Gliceraldehido-3-fosfato
G3P-DH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada
Glu	Glucosa
Glu-1-P	Glucosa-1-fosfato
Glu-6-P	Glucosa-6-fosfato
GTP	Guanosin trifosfato
Ha	Hectáreas
HXX	Hexoquinasa
KDa	Kilodalton
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
OOA	Oxalacetato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PFK(ATP)	Fosfofructoquinasa dependiente de ATP
PFK(Pi)	Fosfofructoquinasa dependiente de Pi
PGK	Fosfoglicerato quinasa
PGM	Fosfoglicerato mutasa
Pi	Fosfato inorgánico
PK	Piruvato quinasa
pPGI	Fosfoglucosa isomerasa plastidial
PPi	Pirofosfato
SDS	Dodecil sulfato sódico
SS	Sacarosa sintasa
Suc	Sacarosa
T	Toneladas
TAG	Triacilglicéridos
TPI	Triosa-fosfato isomerasa
TSP	2,2' - 3,3' - tetrauterio-trimetil-silil- propionato sódico
UDP	Uridin difosfato
UTP	Uridin trifosfato
Vinv	Invertas ácida vacuolar
G6P-DH	Glu-6-P deshidrogenasa
CoA	Coenzima A
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
μmol	micromol
rpm	Revoluciones por minuto
v	Volumen

INTRODUCCIÓN

1. EL GIRASOL.

1.1 Aspectos generales.

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una planta anual dicotiledónea perteneciente a la familia de las *Compuestas*, que crece bien en climas templados. Por su alto contenido de aceite en la semilla (48-52%) es una típica planta oleaginosa.

En los últimos años, el cultivo del girasol, ha experimentado un importante desarrollo, triplicándose la superficie mundial dedicada a su cultivo desde 1961 hasta 2004, pasando de 6,6 a 21,3 millones de hectáreas (Ha). Y prácticamente, casi se ha cuadruplicado su producción pasando de 6,8 a 26,2 millones de toneladas (T). Como se puede observar en la Figura 1.1., esta tendencia ascendente tanto de la producción mundial como de la superficie cultivada se mantiene durante los últimos años, aunque en España se ha producido en este mismo periodo comprendido entre 1990 y 2005 un ligero descenso en ambos parámetros, como se aprecia en la Figura 1.2 (Faostat, 2007).

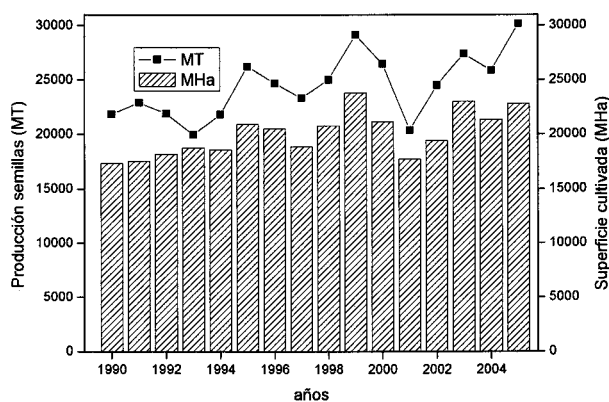


Figura 1.1. Evolución de la superficie cultivada y la producción mundial a lo largo de los años (Faostat, 2007).

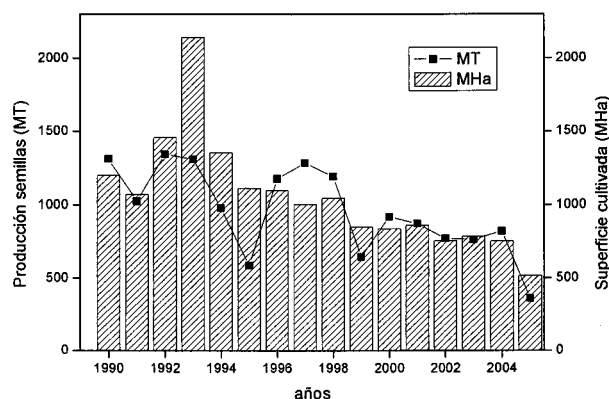


Figura 1.2. Evolución de la superficie cultivada y la producción en España lo largo de los años. (Faostat, 2007).

Las razones del éxito de este cultivo pueden resumirse en dos, el girasol es una planta rústica de fácil cultivo y de buena adaptación a una gran variedad de suelos. Su aceite ha encontrado, desde el primer momento, una excelente acogida entre los consumidores y ha obtenido el respaldo de científicos y dietistas, especialmente, como sustitutivo de las grasas de origen animal. La relativa sencillez de las técnicas industriales para su extracción, así como su fácil conservación, son otras de las ventajas para su industrialización y su comercio (Alba y Llanos, 1990).

Actualmente, el girasol es una de las cinco oleaginosas para consumo humano más cultivadas en todo el mundo.

1.2. Historia, origen y botánica de *Helianthus annuus* L.

El girasol pertenece al orden *Synandrales*, familia *Asteridae*, género *Helianthus* y especie *annuus*. El nombre latino del género alude a la forma y aspecto de la inflorescencia y el de la especie a la característica de anualidad del ciclo vegetativo-reproductivo de la planta. Se trata de una planta anual, con un desarrollo vigoroso en todos sus órganos. El género *Helianthus* comprende 68 especies, de las que *annuus* tiene la mayor extensión geográfica y es la más variable del género. Dentro de esta especie existen numerosos tipos o subespecies cultivadas como plantas ornamentales, oleaginosas y forrajeras.

En cuanto al origen del girasol actual, algunos autores piensan que *Helianthus*, con un número de cromosomas $n=17$, procede de la hibridación de dos especies ancestrales del género *Viguiera*, con $n=8$ y $n=9$ (Jackson y Murray, 1983). Así se produjo un híbrido con 17 cromosomas que pasó a tener 34 al duplicarse espontáneamente evitando la inestabilidad en meiosis. De esta forma, aunque se comporte como un diploide en general, hay que tener en cuenta el hecho de un posible origen tetraploide y de que existan cromosomas homeólogos.

Las variedades de girasol cultivadas en el mundo son el resultado de un largo proceso de adaptación a distintos ambientes y de selección, dirigida normalmente a la obtención de plantas con mayor contenido en aceite.

1.3. Morfología y fisiología.

La raíz es del tipo pivotante y con un sistema de raíces secundarias de las que nacen las terciarias, que exploran el suelo en sentido horizontal y vertical. Normalmente, la longitud de la raíz principal sobrepasa la altura del tallo. La raíz

cuando tropieza con obstáculos desvía su trayectoria vertical y deja de explorar las capas profundas del suelo, llegando a perjudicar el desarrollo del cultivo y, por tanto, el rendimiento de la cosecha.

El tallo es de consistencia semileñosa y maciza en su interior, siendo cilíndrico, con un diámetro variable entre 2 y 6 cm y una altura hasta el capítulo entre 40 cm y 2 m. La superficie exterior del tallo es rugosa, asurcada y vellosa; excepto en su base. En la madurez, el tallo se inclina en la parte terminal debido al peso del capítulo.

Las hojas son alternas, grandes, trinervadas, largamente pecioladas, acuminadas, dentadas y de áspera vellosidad tanto en el haz como en el envés. El número de hojas varía entre 12 y 40, según las condiciones de cultivo y la variedad. El color también es variable y va de verde oscuro a verde amarillento.

La inflorescencia consiste en un disco de 10 a 40 cm de diámetro (según variedades y condiciones de cultivo), que puede ser plano, cóncavo o convexo. El capítulo del girasol cultivado es solitario, rotatorio y está rodeado por brácteas involucrales. El número de flores varía entre 700 - 3000 en variedades para aceite y hasta 6000 o más, en variedades de consumo directo. Está formado por un tejido de naturaleza esponjosa en el que se insertan las flores que nacen sobre su cara superior (Figura 1.3. A). El verticilo o anillo exterior del capítulo está formado por flores liguladas, estériles, dispuestas radialmente (Figura 1.2. B: e), con una función de exhibición y atracción visual para los insectos polinizadores. Las flores propiamente dichas son las tubulosas, que están en el interior del capítulo y forman círculos espirales desde el centro (Figura 1.2. B: a-d). Estas flores están formadas por un ovario inferior, dos sépalos, una corola en forma de tubo compuesta por cinco pétalos, y cinco anteras unidas a la base del tubo de la corola.

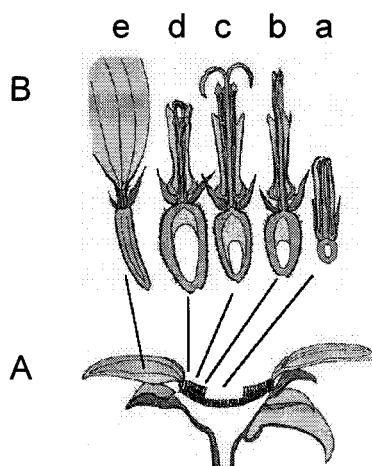


Figura 1.3 A. Sección longitudinal de un capítulo de girasol; B. Flores liguladas (e) y tubulosas en diferentes estadios de desarrollo: antes de abrirse (a); abriéndose (emergencia de estambres) (b); abierta (c) y después de fecundada (d) (Alba y Llanos, 1990).

El fruto, es un aquenio de tamaño comprendido entre 3 y 20 mm de largo, 2 y 13 mm de ancho, y 2,5 y 5 mm de grueso (Figura 1.4). Las flores del centro del capítulo generalmente no se transforman en frutos. El pericarpio (envuelta exterior del fruto) es duro y fibroso, y queda pegado a la semilla menos en sus aristas. La membrana seminal crece con el endospermo y forma una película fina que cubre el embrión de la semilla y asegura la adherencia entre pericarpio y semilla. Los cotiledones representan la reserva energética de la semilla, y entre estos está la gémula.

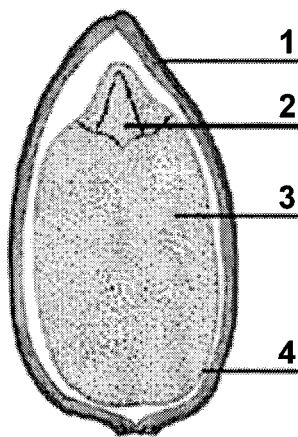


Figura 1.4. Sección longitudinal de un aquenio: 1. Pericarpio; 2. Gémula; 3. Cotiledón; 4. Membrana seminal (Vrănceanu, 1977).

La duración del ciclo del girasol depende de la variedad y el momento de la siembra, y se divide en varias etapas (Alba y Llanos, 1990).

La germinación y emergencia van desde la siembra hasta la aparición de los cotiledones. En función de la humedad y la temperatura puede durar de 10 a 30 días. La formación de las primeras hojas va desde la emergencia hasta la aparición de 4-5 pares de hojas. Durante esta fase se produce un rápido crecimiento de la raíz, lo que condiciona el posterior vigor de la planta. En esta etapa, la disponibilidad de agua es muy importante, siendo perjudicial tanto la falta como el exceso de ésta. Esta fase dura entre 15 y 25 días.

A partir de este momento, tiene lugar la fase de crecimiento más activa y de máxima absorción de elementos minerales del suelo, que dura hasta el principio de la floración. Cuando se forma el botón floral es cuando la planta es más sensible al estrés hídrico. Esta fase tiene una duración entre 40 y 50 días. La floración comprende todo el periodo en el que las flores se van abriendo.

Las primeras flores en abrir son las de la parte de afuera del capítulo y continúa con la apertura de los anillos exteriores hacia el centro, a razón de 1 a 5 anillos diarios. En esta etapa se determina el número de flores que van a convertirse en semillas. En

este momento la planta es muy sensible a la falta de agua y a las temperaturas elevadas. Las flores liguladas (pétalos amarillos) que rodean el capítulo se secan y empiezan a caerse un día después de abrirse las últimas flores del centro del capítulo. El proceso tarda en completarse de 10 a 12 días. La polinización y fecundación, llevada a cabo por insectos, es generalmente alógama (fecundación cruzada entre flores distintas). Los óvulos una vez fecundados reciben sustancias de reserva hasta que se convierten en semilla madura.

La fase de maduración de la semilla va desde el final de la floración, hasta el estado de madurez fisiológica. Durante este periodo, se llena la semilla y se produce la biosíntesis del aceite. Ésta finaliza cuando la semilla tiene aproximadamente un 40% de humedad. El periodo de maduración puede durar entre 35 y 50 días.

2. SÍNTESIS DE PRODUCTOS DE RESERVA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS.

Se ha estudiado en detalle la acumulación de productos de reserva durante la embriogénesis de semillas oleaginosas, y se ha comprobado que esta no ocurre de forma gradual y constante durante la formación de la semilla, sino que hay una etapa específica de acumulación y que dicha temporalidad está determinada por la presencia de ciertas actividades enzimáticas implicadas en la ruta de biosíntesis.

En semillas de colza (*Brassica napus* L.), se ha observado que la acumulación de productos de reserva durante los primeros 20 días después de floración (DDF) es escasa o nula, y que el embrión crece por división celular. Entre los 20 y 50 DDF sucede la máxima tasa de acumulación de aceite en semilla, y además, hay una acumulación temporal de almidón en la semilla que incrementa hasta los 33 DDF, para luego degradarse y casi no detectarse al final del desarrollo de la semilla periodo en el que la división celular cesa y comienza la expansión de las células. Después de este periodo, entre los 55 y los 85 DDF se sintetizan las proteínas de reserva (da Silva y col., 1997; Norton y Harris, 1975). En semillas de soja, el aceite y la proteína son los principales productos que se almacenan durante el desarrollo del embrión. El almidón también se acumula durante la etapa inicial del desarrollo, pero a diferencia de lo que ocurre en colza, la degradación del mismo es más tardía y sí se detecta en semilla madura (Wilson y col., 1978).

En semillas de girasol se ha estudiado la acumulación de productos de reserva durante el desarrollo existiendo una clara temporalidad en el depósito tanto de aceite como de proteína, pero no existiendo acumulación parcial ni final de almidón (Connor y Hall, 1997). Aunque existen ciertas diferencias en cuanto a la duración de la etapa de llenado de la semilla entre los distintos autores, probablemente causadas por el uso de distintos cultivares y distintas condiciones de cultivo, se puede afirmar que la acumulación de aceite en semilla se empieza a detectar a partir de los 12 DDF, y se alcanza la tasa más elevada entre los 16 DDF y los 24 DDF, momento en el que el contenido de aceite en semilla pasa aproximadamente del 16% al 30% del peso seco de semilla. A partir de dicha edad y hasta los 35 DDF el incremento, más o menos pronunciado, siempre es muy inferior. La acumulación de proteínas de reserva es temporalmente paralela a la acumulación del aceite, aunque durante todo el llenado de la semilla el porcentaje de estas se mantienen siempre por debajo del porcentaje de aceite, alcanzándose en semillas próximas a madurez (30 DDF) un

porcentaje de proteínas de más del 25% del peso total de la semilla (Martínez-Force y col., 2000).

2.1. Fuentes de carbono para el metabolismo de las semillas.

Las fuentes de carbono necesarias para el metabolismo de las semillas son suministradas por la fotosíntesis que se realiza en las hojas y en las inflorescencias de las plantas. La contribución relativa de estos tejidos depende tanto de la especie como del estado de desarrollo de la semilla. La contribución fotosintética de las inflorescencias varía entre el 10% y el 75% en cereales (Crookston y col., 1974) y entre el 0% y el 20% en leguminosas (Flinn y col., 1977). En embriones de guisante (*Pisum sativum* L.), la contribución relativa varía durante el desarrollo, de tal forma que la fotosíntesis realizada en las inflorescencias suministra más fotosintatos a las semillas en los estados intermedios de desarrollo que en los estados iniciales o finales (Flinn y col., 1977). En colza (*Brassica napus* L.), las semillas en desarrollo se encuentran dentro de una cápsula o silicua de color verde, y se cree que la asimilación fotosintética de carbono que se produce por la silicua es suficiente para soportar la mayor parte de demanda de carbono requeridas por la semilla durante el desarrollo. (Allen y col., 1971; Pechan y Morgan, 1985; Keiller y Morgan, 1988).

La síntesis intraplastidial de ácidos grasos requiere tanto unidades de acetil-CoA, como fuente de carbono, como ATP y poder reductor. Como el acetil-CoA no puede atravesar la membrana plastidial (Roughan y col., 1979; Weaire y Kekwick, 1975), los precursores para su síntesis deben ser generados dentro de los plastidios o importados desde el citosol. Los metabolitos citosólicos tales como la glucosa-6-fosfato, el fosfoenolpiruvato y el malato han sido descritos como moléculas que soportan la síntesis de ácidos grasos en plastidios aislados (Eastmond y Rawsthorne, 2000; Kang y Rawsthorne, 1996; Kang y col., 1994; Pleite y col., 2005; Qi y col., 1995; Smith y col., 1992). La capacidad de los plastidios para convertir estas fuentes de carbono en acetil-CoA depende del tejido y de las especies. La síntesis de ácidos grasos también necesita poder reductor en forma de NADH y NADPH. En las semillas verdes, la energía lumínica puede ser usada por los cloroplastos para el suministro de ATP y NADPH necesarios para la síntesis de ácidos grasos (Browse y Slack, 1985; Goffman y col., 2005; Ruuska y col., 2004; Schwende y col., 2004a, 2006), mientras que los plastidios aislados de tejidos heterotróficos requieren la

adición de ATP para alcanzar altas tasas de síntesis de ácidos grasos (Browse y Slack, 1985; Hill y Smith, 1991; Kang y Rawsthorne, 1996; Kleppinger-Sparace y col., 1992; Neuhaus y col., 1993; Smith y col., 1992).

Alonso y colaboradores (2007), han descrito en los embriones de girasol que un porcentaje entre el 91-95% del carbono para la síntesis de ácidos grasos proviene de las triosas-fosfato que se derivan vía ruta glucolítica de las hexosas que han sido importadas por los plastidios y sólo entre el 5-9% del carbono es atribuido al malato. Así como que la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, localizada dentro de los plastidios, produce suficiente poder reductor para la síntesis de aceite.

2.2. Flujos de carbono desde los tejidos fotosintéticos a las semillas.

En la mayoría de las plantas, el principal soluto transportado entre los tejidos fotosintéticos y las semillas es la sacarosa (Ap Rees, 1988), aunque en algunas ocasiones otros carbohidratos simples e incluso aminoácidos pueden ejercer de medio de transporte del carbono (Rijven y Gifford, 1983; Schussler y col., 1984). El carbono asimilado por fotosíntesis en los tejidos fuente puede ser convertido en almidón, permanecer en el cloroplasto y estar disponible para su re-movilización durante la noche, o puede exportarse al citosol en forma de triosas fosfato. Una vez en el citosol, las triosas fosfato se convierten en sacarosa que se transporta por el floema de la planta hasta los tejidos no fotosintéticos. La cantidad de sacarosa destinada a las semillas depende de múltiples factores entre los que se encuentran la tasa neta de fotosíntesis, la capacidad para sintetizar sacarosa y la capacidad de descargar sacarosa en el floema. La descarga de sacarosa desde el floema a las semillas requiere que en primer lugar la sacarosa pase simplásticamente desde los elementos de criba o tamizado del floema a las células de la cubierta de la semilla a través del plasmodesmata (Patrick y Offler, 1995; Stitt, 1996) y de ahí al espacio apoplástico que rodea al embrión (Wang y col., 1995).

Alkio y col., (2002), estudiaron en girasol el transporte de fotoasimilados desde las hojas hasta el capítulo durante el llenado de la semillas, después de aplicaciones foliares de pulsos de $^{13/14}\text{CO}_2$. Estos autores determinaron que 2/3 del total de las hojas, aquellas situadas en la parte superior del tallo, exportaban fotoasimilados al capítulo, y que lo hacían de forma sectorial, es decir, cada hoja suministraba fotoasimilados a un sector en forma de cuña que correspondía a 2/8-3/8

de la superficie total del capítulo. Demostraron que durante el llenado de las semillas, la máxima importación de fotoasimilados sucedía en los arcos intermedios del capítulo mientras que la mínima ocurría en los arcos centrales del capítulo y establecieron que la sacarosa era el único azúcar transportado a través del floema. Por otro lado, Goffner y col., (1988) suministrando $^{14}\text{CO}_2$ a hojas de plantas de girasol en desarrollo, estudiaron la radioactividad translocada a los fotoasimilados de la semilla y encontraron que a las 8 horas después del suministro de $^{14}\text{CO}_2$ la mayor parte de la radioactividad aparecía en forma de azúcares solubles. Pasadas 48 h el 60% de los fotoasimilados se habían metabolizado, siendo los compuestos lipídicos el principal destino de la radioactividad, aunque también se detectaba radiactividad en la fracción proteica y en la fracción de carbohidratos insolubles.

2.3. Metabolismo de la sacarosa en las semillas en desarrollo.

La sacarosa y sus productos de hidrólisis además de alimentar la ruta glucolítica son importantes señales metabólicas que afectan tanto al mantenimiento del potencial osmótico como a la expresión de diferentes clases de genes (Kock, 1996; Rolland y col., 2002) y que además participan en la regulación del desarrollo (Wobus y Weber, 1999). El uso de la sacarosa como fuente de carbono y energía requiere la hidrólisis del enlace α 1- β 1-glicosídico, esta reacción puede ser catalizada por dos tipos de enzimas. La reacción reversible catalizada por la sacarosa sintasa (EC 2.4.1.13) genera UDP-glucosa y fructosa, conservando el enlace energético. Mientras que las invertasas (EC 3.2.1.26, β -fructosidasa, β -fructofuranosidasa) catalizan la hidrólisis irreversible para generar glucosa y fructosa.

En las semillas de tabaco en desarrollo, coincidiendo con el cambio desde la fase de división celular a la fase de acumulación de productos de reserva, se produce a su vez un cambio en la enzima sacarolítica predominante, ya que la actividad invertasa es reemplazada por la sacarosa sintasa, aumentando la relación de concentraciones sacarosa/hexosas. Esta relación entre los cambios en el catabolismo de la sacarosa y el establecimiento de la fase de acumulación de productos de reserva es más fuerte para la síntesis del almidón (Borisjuk y col., 2003), aunque también se ha descrito para la síntesis proteica (Sanchez-Romero y col., 2002). Menos conocido es cómo se establece la acumulación de aceite y si los niveles de hexosa o sacarosa o la relación entre estos

carbohidratos son determinantes para la síntesis de aceite en las semillas en desarrollo (Tomlinson y col., 2004).

3. LA RUTA GLUCOLÍTICA.

3.1. Aspectos generales.

Durante la glucólisis se produce la oxidación de las hexosas generando ATP, poder reductor y piruvato. No todo el carbono que entra en la ruta glucolítica termina siendo oxidado completamente, ya que muchos metabolitos intermediarios de la vía sirven como precursores de la síntesis de numerosos compuestos del metabolismo secundario, como pueden ser isoprenoides, aminoácidos, ácidos nucleicos y ácidos grasos. Además la glucólisis también puede funcionar en sentido contrario de tal forma que a partir de moléculas de bajo peso molecular genera hexosas en un proceso dependiente de energía denominado gluconeogénesis.

En las plantas la conversión secuencial de las hexosas en piruvato puede darse independientemente en dos compartimentos subcelulares, ya que esta vía se localiza tanto en el citosol como en los plastidios/cloroplastos. Esta compartimentación concentra las enzimas de la ruta y previene la coexistencia de potenciales procesos metabólicos incompatibles (Plaxton, 1996). Las rutas glucolíticas citosólica y plastidiales pueden interactuar a través de transportadores selectivos que se localizan en la membrana plastidial (Emes y Tobin, 1993). Una de las principales funciones de la glucólisis en los plastidios no fotosintéticos consiste en la generación de esqueletos de carbono, poder reductor y ATP para los procesos anabólicos como la síntesis de ácidos grasos (Dennis y Mierynk, 1982). Aunque en los plastidios de varios tejidos no fotosintéticos de algunas especies vegetales, como ocurren en las semillas de ricino, han sido descritas rutas glucolíticas completas, algunos carecen de una o varias enzimas de la parte inferior de la glucólisis, como la enolasa o la fosfoglicerato mutasa (Emes y Tobin 1993; White y col., 2000). Las reacciones citosólicas y plastidiales están catalizadas por isoenzimas codificadas por diferentes genes nucleares. Estos genes tanto citosólicos como plastidiales podrían haber evolucionado por duplicación de genes nucleares ancestrales o bien algunos de los genes que codifican las enzimas plastidiales podrían provenir de procesos endosimbióticos (Tobin y Bowsher, 2005). La proporción relativa entre las enzimas citosólicas y plastidiales puede variar, no sólo en función del tipo de tejido y su estado de desarrollo sino también en función del estado nutricional (Plaxton, 1996), estando ambas vías controladas independientemente tanto a nivel transcripcional como postraduccional, por lo que parecen estar reguladas independientemente (Sweetlove y Fernie, 2005; Tobin y Bowsher, 2005). Una

característica importante de la ruta glucolítica citosólica de plantas es la presencia de varias reacciones enzimáticas paralelas, es decir existe más de una enzima que puede catalizar un determinado paso de la ruta a nivel de diferentes sustratos, entre ellos se encuentran la sacarosa, la fructosa-6-fosfato, el gliceraldehido-3-fosfato y el fosfoenolpiruvato, pudiendo ser estas reacciones no convencionales especialmente importantes en condiciones de estrés (Plaxton y Podestá, 2006).

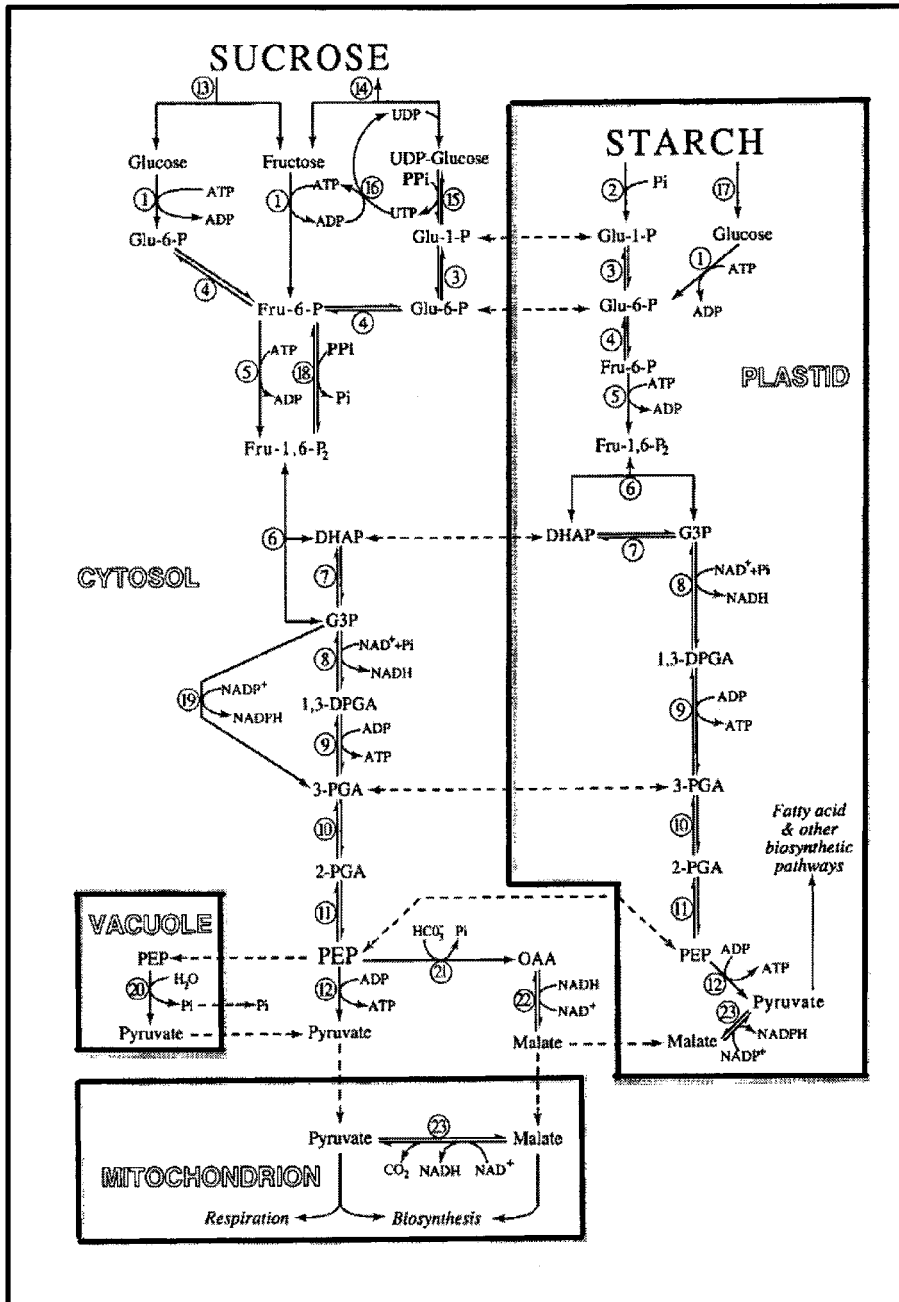


Figura 1.5. Esquema de la ruta glucolítica de plantas. Las enzimas que catalizan las reacciones numeradas son las siguientes: 1, hexoquinasa; 2, fosforilasa; 3, fosfoglucomutasa; 4, fosfoglucosa isomerasa; 5, fosfofructoquinasa dependiente de ATP; 6, aldolasa; 7, triosa fosfato isomerasa; 8, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD; 9, fosfoglicerato quinasa; 10, fosfogliceratomutasa; 11, enolase; 12, piruvato quinasa; 13, invertasa; 14, sacarosa sintasa; 15, UDP-glucosa pirofosforilasa; 16, nucleósido difosfato quinasa; 17, α - y β -amilasas; 18, fosfofructoquinasa dependiente de PPI; 19, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH; 20, fosfoenolpiruvato fosfatasa; 21, fosfoenolpiruvatocarboxilasa; 22, malato deshidrogenasa; 23, malato deshidrogenasa. Abreviaturas: Glu-1-P, glucosa-1-fosfata; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; G3P, gliceraldehido-3-fosfato; 1,3-DPGA, 1,3-difosfoglicerato; 2-PGA, 2-fosfoglicerato; OAA, oxalacetato. \rightarrow , indica reacción fisiológica irreversible; o \leftrightarrow , indica reacción fisiológica reversible. El número de sustratos y productos en todas las reacciones a partir del G3P hasta piruvato deben ser dobles debido a que a partir de una molécula de glucosa se producen dos de G3P. (Plaxton, 1996)

3.2. Regulación de la ruta glucolítica.

La magnitud del flujo de metabolitos a través de cualquier ruta metabólica va a depender de la actividad de las enzimas individuales involucradas. Los mecanismos de control tanto grosero como fino pueden hacer variar la velocidad de reacción de una determinada enzima *in vivo*. El control grosero consiste en modificar la cantidad total de la enzima, alterando la síntesis o degradación de ésta, mientras que el control fino actúa sobre las enzimas preexistentes. El primero de los mecanismos de control actúa en fenómenos a largo plazo, como puede ser la diferenciación celular, y el segundo ajusta las necesidades metabólicas que se requieren en unas determinadas circunstancias. Ambos mecanismos de control han sido descritos como responsables de la regulación de las enzimas de la ruta glucolítica.

a. Control transcripcional.

El análisis de los niveles de mRNA y las cantidades de proteínas de las enzimas piruvato quinasa citosólica y plastidial en las semillas en desarrollo de tabaco, demostraron que la expresión de estas isoenzimas puede ser controlada mediante mecanismos transcripcionales y postrcripcionales independientes (Gottlob-McHugh y col., 1995).

b. Control postraducciona.

Se han descrito cuatro posibles mecanismos de control fino que pueden modular la actividad de las enzimas glucolíticas preexistentes: variaciones en la concentración de sustrato, modificaciones del pH, efectores alostéricos y modificaciones covalentes (Plaxton y Podestá, 2006).

- Variaciones en la concentración de sustratos: la concentración celular de adenilatos y Pi disminuye durante la privación de Pi (Le Roux y col., 2006), afectando este descenso a las actividades de las enzimas que dependen de estas moléculas.

- Modificaciones del pH: la dependencia del pH intracelular de la actividad enzimática puede ser un aspecto importante del control glucolítico en las plantas, ya que tanto el pH citosólico como el plastidial pueden cambiar en función de determinados estímulos. De tal forma que se han descrito diversas enzimas sujetas a este mecanismo de regulación, entre ellas la piruvato quinasa citosólica o la fosfofructoquinasa dependiente de PPi (Plaxton y Podestá, 2006).
- Efectores alostéricos: algunos de los metabolitos que presentan un control alostérico sobre enzimas glucolíticas son el fosfoenolpiruvato, el Pi, la fructosa-2,6-bisfosfato, el piruvato, intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, aminoácidos como el aspartato y el glutamato, el NADPH y el NADH (Plaxton, 1996; Givan, 1999; Igamberdiev y Gardeström, 2003; Turner y col., 2005).
- Modificaciones covalentes: la regulación enzimática mediante modificaciones covalentes reversibles juega un papel importante en el control fino del metabolismo y es el principal mecanismo a través del cual los estímulos extracelulares tales como hormonas o la luz coordinan la regulación del metabolismo intermediario. Las modificaciones covalentes de fosforilación-desfosforilación e interconversiones disulfido-ditiol parecen ser los tipos más frecuentes usados en eucariotas superiores, incluidas las plantas, en el control enzimático (Plaxton y Podestá, 2006). Como ejemplo de este mecanismo podría citarse el caso de la piruvato quinasa citosólica que al ser fosforilada se inactiva (Tang y col., 2003).

El control fino de la glucólisis de plantas se realiza desde la parte inferior de la ruta hacia la superior, es decir, de abajo hacia arriba, existiendo un primer y un segundo nivel de control que se localizan sobre el fosfoenolpiruvato y la fructosa-6-fosfato respectivamente, estando las enzimas catalizadoras de estos pasos (fosfofructoquinasas, piruvato quinasa y fosfoenolpiruvatocarboxilasa) sujetas a el control por parte de diversos metabolitos (Plaxton y Podestá, 2006).

4. ENZIMAS DE LA RUTA GLUCOLÍTICA.

A continuación se describirán brevemente las enzimas glucolíticas que han sido estudiadas durante la elaboración de este trabajo.

4.1. Invertasas (EC 3.2.1.26).

La utilización de la sacarosa como fuente de carbono y energía depende de su ruptura en hexosas, pudiendo ser realizado este proceso mediante dos tipos de enzimas, la sacarosa sintasa (EC 2.4.1.13) y las invertasas (EC 3.2.1.26). La sacarosa sintasa convierte la sacarosa en presencia de UDP en UDP-glucosa y fructosa. Mientras que las invertasas hidrolizan la sacarosa en sus dos monosacáridos, glucosa y fructosa.

Basándose en su solubilidad, localización subcelular, pH óptimo y punto isoeléctrico, se pueden distinguir tres tipos de isoenzimas invertasa, que se denominan: invertasa vacuolar (Vinv), invertasa de pared celular (CWinv) o invertasa extracelular e invertasa citosólica (Cinv) (Tymowska-Lalanne y Kreis, 1998).

Las isoformas vacuolares y de pared celular tienen propiedades enzimáticas y bioquímicas similares, compartiendo un alto grado de homología en sus secuencias, presentando dos motivos conservados en sus secuencias primarias (NXDPNXG/A y WECP/V). Ambos tipos de isoformas son glicoproteínas que se engloban dentro del tipo β -fructofuranosidasa y presentan un pH óptimo ácido. La isoforma citosólica se caracteriza por ser una proteína no glicosilada que presenta un pH óptimo neutro o alcalino, además al metabolizar única o preferentemente la sacarosa no se agrupa dentro de las enzimas β -fructofuranosidasa (Roitsch y González, 2004).

La regulación transcripcional es el mecanismo fundamental que controla los niveles de invertasa, pudiendo ser aplicable este fenómeno tanto a la expresión específica en tejidos y durante el desarrollo como a los cambios por estímulos internos o externos, ya que en concreto la invertasa extracelular está sujeta a regulación por fitohormonas, estrés abiótico o azúcares (Roitsch y col., 2003).

La isoenzima de pared celular participa activamente en el desarrollo temprano de las semillas, fundamentalmente transfiriendo el fotosintato desde el tejido materno al embrión en desarrollo, de tal forma que los altos niveles de esta enzima provocarían una elevada concentración de hexosas que permitirían el mantenimiento

de una elevada tasa mitótica, como ha sido descrito durante la fase previa al inicio del periodo de almacenamiento en semillas de leguminosa (Wobus y Weber, 1999). Además en maíz el mutante *miniature-1 (mn-1)*, que es deficiente en una isoforma de pared celular, presenta un claro ejemplo de la importancia de estas isoenzimas en el aporte de carbohidratos durante la fase inicial del desarrollo de las semillas, ya que se produce una alteración del transporte del fotosintato desde el tejido materno al embrión que repercutirá en el desarrollo de las semillas, ya que éstas presentan una pérdida inferior al 70 % de su peso con respecto al silvestre (Miller y Chourey, 1992).

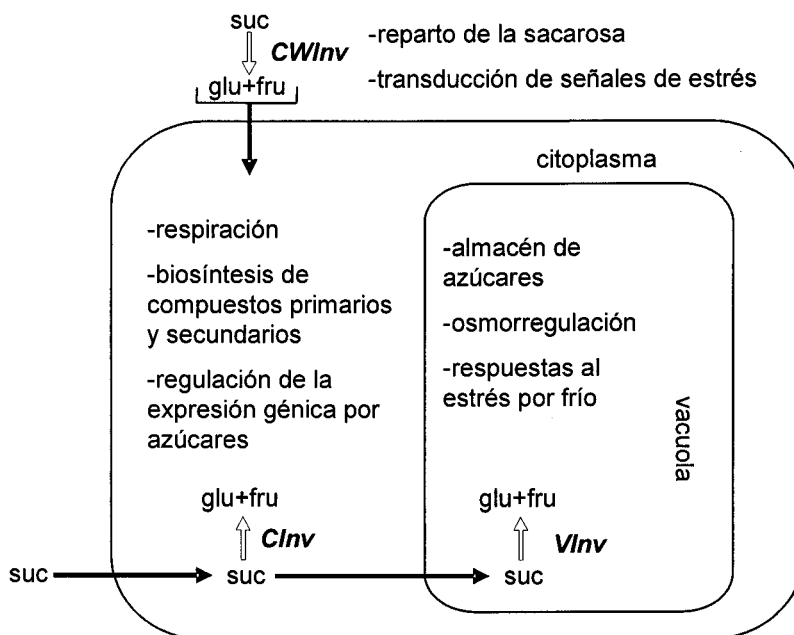


Figura 1.6. Localización subcelular y funciones propuestas para las invertasas de plantas. CWInv, invertasa de pared; CInv, invertasa citosólica; VInv, invertasa vacuolar.

4.2. Hexoquinasa (EC 2.7.1.1)

La fosforilación irreversible de las hexosas en hexosas-fosfato constituye el primer paso de la ruta glucolítica y es catalizado por la Hexoquinasa, que puede utilizar como sustratos diferentes hexosas, entre las que se encuentran la glucosa, fructosa y manosa.

La existencia del mutante *wrinkled-1* en *Arabidopsis thaliana*, en el cual aparece una disminución en la acumulación de TAG en las semillas junto con una reducción en las actividades glucolíticas, siendo una de las más afectadas la actividad hexoquinasa (Focks y Benning, 1998), pone de manifiesto la importancia que puede tener la hexoquinasa durante el proceso de acumulación de ácidos grasos en las

semillas oleaginosas. Además de su función metabólica, la hexoquinasa actúa como sensor de azúcares (Rolland y col., 2001, Frommer y col., 2003, Sheen y col., 1999, Harrington y Bush, 2003), de tal forma que esta enzima no sólo participa en procesos catalíticos sino que también cumple funciones reguladoras (Moore y col., 2003). Recientemente se ha descrito la participación de la hexoquinasa en el proceso de muerte celular controlada, lo que relacionaría el metabolismo de la glucosa y la apoptosis (Moonil y col., 2006).

En plantas existen diferentes isoformas que se diferencian tanto en sus propiedades bioquímicas como en su localización celular (Claeyssen y col., 2005), ya que se han descrito en el citosol (Galina y col., 1995), en el aparato de Golgi (da Silva y col., 2001), en el núcleo (Sheen y col., 1999), en el estroma cloroplastídico (Olsson y col., 2003), en la cara citosólica de la membrana externa plastidial (Wiese y col., 1999) y en la membrana externa mitocondrial (Giegé y col., 2003).

Basándose en la estructura de la región N terminal de las hexoquinasas, éstas se agrupan en dos tipos, denominados tipo A si presentan un péptido de transición al cloroplasto y tipo B si tienen una zona de anclaje a la membrana (Olsson y col., 2003).

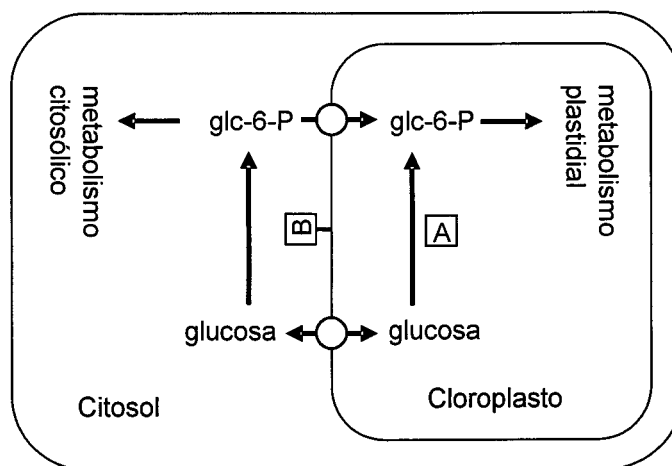


Figura 1.7. Distribución y funciones metabólicas de las diferentes clases de hexoquinasas de plantas. A, hexoquinasa con péptido de transición al cloroplasto; B, hexoquinasa con región de anclaje a la membrana.

4.3. Fosfoglucosa isomerasa (EC 5.3.1.9).

La fosfoglucosa isomerasa (PGI), una enzima dimérica que cataliza la isomerización reversible entre glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato, participa tanto en la glucólisis como en la gluconeogénesis. En plantas se han descrito dos isoenzimas, una citosólica y otra cloroplastica (Schnarrenberg y Oeser, 1974) codificadas por

distintos genes nucleares, esta última de origen endosimbiótico (Nowitzki y col., 1998), encontrándose en el género *Clarkia* la existencia de una duplicación génica para la PGI citosólica (Gottfried and Ford, 1997).

En *Arabidopsis thaliana* los mutantes *pgi1-1* presentan una disminución en la acumulación de almidón que se asocia a una reducción de la actividad fosfoglucoisomerasa plastidial (Yu y col., 2000). La ausencia de un posible mecanismo de regulación alostérica y la posibilidad de que ambas isoformas se encontrasen en exceso han justificado la consideración de ambas como isoenzimas no reguladoras, pese a ello, se han descrito resultados que sugieren la existencia de una acción reguladora por parte de la fosfoglucoisomerasa. En espinaca posiblemente la isoenzima cloroplástica se encuentre inhibida por eritrosa-4-fosfato a concentraciones fisiológicas (Backhausen y col., 1997), además en *Clarkia xanthiana* se ha descrito que una disminución de la actividad PGI puede alterar los flujos hacia almidón y sacarosa (Kruckeberg, 1989). En tomates irradiados se observó que el incremento de la actividad se correlacionaba con la hidrólisis del almidón y la síntesis de sacarosa (Ajlouni, 1988). En tejidos no fotosintéticos también se han descrito fenómenos que relacionan la actividad fosfoglucoisomerasa y el metabolismo del almidón y la sacarosa, ya que durante la maduración de las bananas, la actividad PGI y los cambios en la composición de carbohidratos observados sugieren la existencia de mecanismos de control (Cordenunsi y col., 2001). Recientemente se ha descrito en los nódulos fijadores de nitrógeno de *Lotus japonicus* como durante la fase temprana de nodulación se produce un aumento de la expresión de determinados genes del metabolismo glucídico, entre ellos el de una PGI plastidial putativa (Flemetakis y col., 2006), de tal forma que se produciría un aumento de la expresión como consecuencia de una modificación en las demandas energéticas celulares.

4.4. Fosfoglicerato quinasa (EC 2.7.2.3).

La fosfoglicerato quinasa (PGK), enzima asociada con la glucólisis y la gluconeogénesis, cataliza la transferencia reversible de un grupo fosfato desde el ATP al glicerato-3-fosfato generando ADP y 1,3-difosfoglicerato.

En plantas, existen dos isoenzimas, una citosólica y otra localizada en el estroma de los cloroplastos (Anderson y Advani, 1970), aunque también se ha descrito su localización en núcleos de hojas de guisante (Anderson y col., 2004). Ambas isoenzimas presentan un alto grado de homología, en hojas de trigo se ha descrito un

82% de homología en base a la secuencia de aminoácidos (Longstaff y col., 1989) y en hojas de espinaca ambas son monómeros estructuralmente relacionados (Köpke-Secundo y col., 1990), describiéndose en cebada reacciones cruzadas entre los antisueros obtenidos para ambas isoformas (Shah y Bradbeer, 1994). En tejidos fotosintéticos la isoenzima cloroplástica participaría en la fijación del CO₂ fotosintético, produciendo 1,3-difosfoglicerato, mientras que la isoforma citosólica estaría involucrada en la glucolisis generando 3-fosfoglicerato y ATP. En tabaco, ambas isoenzimas son diferentemente expresadas durante el desarrollo y presentan un patrón de expresión dependiente de tejido, además también se ha descrito un fenómeno de modulación de la expresión por luz (Bringloe y col., 1996). Ambas isoformas interaccionan con otras enzimas, existiendo evidencias *in vitro* de la interacción física dentro de los cloroplastos entre la fosfoglicerato quinasa y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Wang y col., 1996), existiendo evidencias de la colocalización de las enzimas citosólicas aldolasa, triosafosfato isomerasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada y fosfoglicerato quinasa (Anderson y Carol, 2005).

La PGK ha sido identificada como una de las proteínas implicadas en el mecanismo molecular del reloj circadiano de *Chlorella* (Walla y col., 1994).

4.5. **Enolasa (EC 4.2.11)**

La enolasa es una enzima dimérica que cataliza la deshidratación reversible dependiente de Mg²⁺ del 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato, el cual es convertido en piruvato por la piruvato quinasa.

Al igual que otras enzimas relacionadas con la glucolisis y la gluconeogénesis, la enolasa es una de las enzimas glucolíticas más conservadas evolutivamente (Fothergill-gilmore y Michels, 1993).

Aunque en *Arabidopsis thaliana* sólo ha sido descrita la presencia de una isoenzima citosólica (Van Der Straeten y col., 1991), en otras especies se ha demostrado la existencia de otra isoenzima plastidial (Miernyk y Dennis, 1992).

En *Arabidopsis thaliana*, la expresión de la enolasa es mayor en las raíces que en hojas (Van Der Straeten y col., 1991) y estudios de expresión de mRNA en semillas de colza han demostrado que la expresión de la enolasa es también mayor en raíces que en tejidos verdes. Siendo ambos datos consistentes con la alta demanda energética a partir de la glucolisis en los tejidos no verdes (Zhao y col., 2004).

Durante el desarrollo de los embriones de *Ricinus communis*, la actividad enolasa se incrementa coincidiendo con el pico máximo de acumulación de lípidos, para después disminuir hasta niveles prácticamente indetectables en semilla madura (Miernyk y Dennis, 1992).

En ausencia de oxígeno se produce una limitación de la fosforilación oxidativa del ADP, por lo que la mayoría de las plantas cambian su metabolismo desde la vía oxidativa hacia la fermentativa. Esta transición metabólica está marcada por la inducción a nivel transcripcional y traduccional de distintas proteínas, entre ellas la enolasa (Lal y col., 1998).

OBJETIVOS

OBJETIVOS.

1. Caracterización de las actividades glucolíticas en las semillas en desarrollo de girasol.
2. Determinación de las actividades glucolíticas intraplásticas.
3. Estudio de la evolución de las actividades glucolíticas durante el desarrollo de las semillas en relación con la acumulación de lípidos durante la fase de síntesis de productos de reserva.
4. Comparación de las actividades en semillas en desarrollo pertenecientes a líneas con diferente contenido graso.
5. Clonación, secuenciación y estudio de los niveles de expresión de algunos de los genes implicados en la ruta glucolítica.
6. Expresión heteróloga, purificación y caracterización bioquímica de las enzimas seleccionadas.
7. Estudio de la evolución de los niveles de enzimas y de los posibles mecanismos de regulación de éstas durante la fase de acumulación de productos de reserva mediante el empleo de anticuerpos policlonales, obtenidos mediante la inmunización con las proteínas purificadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES.

1.1. Material vegetal.

1.1.1. Líneas de girasol utilizadas.

Como material de trabajo se han empleado semillas en desarrollo y plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) de las líneas CAS-6 (control), HA-89 (alta riqueza grasa) y ZEN-8 (baja riqueza grasa).

1.1.2. Condiciones de cultivo.

Las semillas fueron germinadas en placa de Petri con perlita expandida húmeda. Previamente se les sometió a un tratamiento con solución de lejía al 50% con unas gotas de Tritón durante 20 minutos con agitación y aclaradas con abundante agua. Las semillas se incubaron a 25°C en oscuridad durante dos o tres días. A continuación se pasaron a macetas con turba húmeda.

El crecimiento de las plantas tiene lugar en cámaras de cultivo con temperatura y fotoperiodo controlado, siendo la temperatura de 25°C/15°C (día/noche) y la intensidad de luz de 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16 horas. El riego se realiza de forma automática tres veces al día y el abonado dos veces por semana.

La toma de muestras fue realizada durante el periodo comprendido entre los 10 y los 34 días después de floración, realizándose todas a primera hora de la mañana.

1.2. Escherichia coli.

1.2.1. Estirpes de *E.coli* utilizadas.

Durante el desarrollo de este trabajo se han utilizado dos estirpes diferentes de *E. coli*, que han sido empleadas en la clonación y la expresión de los diferentes genes que han sido objeto de estudio durante la elaboración de esta tesis. Tanto las células como sus genotipos aparecen descritos en la Tabla 2.1.

Estirpes	Genotipos
DH5- α	$\Phi 80dlacZ\Delta M15$, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+), <i>supE</i> Δ <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $\Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169}$
XL1-Blue MRF'	$D(\text{mcrA})183D(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173\text{endA1 } \text{supE44 } \text{thi-1 } \text{recA1gyrA}$ <i>relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac</i> ^q IZDM15 Tn10] (<i>Tet</i> ^r)

Tabla 2.1. Estirpes de *E. coli* empleadas en este trabajo.

1.2.2. Cultivo de *E.coli* en medio líquido.

Los cultivos de *Escherichia coli* se realizaron en medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.* 1989), cuya composición es: NaCl 10 g/l, bactotripton 10 g/l, y extracto de levadura 6 g/l. El medio completo tuvo un pH 7,0 y se esterilizó por autoclavado a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 min.

El antibiótico utilizado fue la Ampicilina, la cual una vez esterilizada por filtración se añadió al medio de cultivo, cuando fue necesario, a una concentración de 100 mg/ml

Los cultivos en medio líquido, se realizaron en tubos de 10 ml conteniendo estos 3,5 ml de medio e incubándose a 37°C con agitación continua a 220 rpm.

1.2.3. Cultivo de *E.coli* en medio sólido.

Para el cultivo en medio sólido se utilizó el mismo medio LB descrito en el apartado anterior, solidificado con agar de grado bacteriológico al 1,5% (p/v). La ampicilina, cuando fue necesaria, se incorporó a partir de una disolución concentrada esterilizada por filtración que se añadía a 55°C, justo antes de extender el medio en cajas de Petri.

1.3. Material animal.

Para la obtención de anticuerpos se utilizaron conejos SPF hembras New Zeland de 2 kg de peso y tanto el proceso de inmunización como la exanguinación se realizaron en el Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla.

2. MÉTODOS.

2.1. Bioquímica.

2.1.1. Preparación del extracto enzimático total.

Para la preparación del extracto se utilizaron cinco semillas peladas, las cuales fueron inmediatamente sumergidas en 1 mL de tampón de extracción cuya composición es 50 mM Tris, pH 8.0 y 5 mM DTT, posteriormente se homogeneizaron en un homogenizador de vidrio, realizándose todo el proceso en hielo. A continuación se procedió a la centrifugación del extracto a 13000 rpm durante diez minutos, constituyendo el sobrenadante la fracción utilizada para las determinaciones enzimáticas.

2.1.2. Determinación cuantitativa de proteínas.

La cuantificación de las proteínas se realizó utilizando una variante del método de Bradford (Bradford, 1976), usando como patrón concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA).

2.1.3. Electroforesis de proteínas. SDS-PAGE.

2.1.3.1. Preparación de las muestras.

Las muestras se suplementaron con 0,5 volúmenes de tampón de carga 2X compuesto por Tris-HCl 0,25 M [pH 6,8], SDS (dodecil sulfato sódico) al 4% (p/v), sacarosa al 27% (p/v), glicina al 0,3% (p/v), azul de bromofenol al 0,1% (p/v) y β -mercaptoetanol al 10% (p/v). Posteriormente, las proteínas se desnaturalizaron al calentar la mezcla de 10 minutos a 95°C.

2.1.3.2. Desarrollo de la electroforesis.

Las separaciones analíticas mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes se realizaron en su mayor parte en geles de poliacrilamida NuPage[®] Novex Bis-Tris Gels 4 - 12% gradient (Invitrogen). Los geles contenían SDS según el sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970). En este caso, el gel separador se preparaba a la concentración adecuada de poliacrilamida (acrilamida: bisacrilamida 38:2), con SDS al 0,1% (p/v) en tampón Tris-HCl 1,5 M [pH 8,8], y el de empaquetamiento de las muestras se preparaba al 5% de poliacrilamida (acrilamida: bisacrilamida 38:2) con SDS al 0,1% (p/v) en tampón Tris-HCl 0,5 M [pH 6,8]. Los geles se polimerizaban con persulfato amónico (APS) al 0,05% (p/v), usando como agente catalizador N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) al 0,07% (v/v).

La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de entre 80 y 175 V en una cubeta XCell II mini-Cell (Novex).

El tampón electrolito empleado estaba compuesto por MOPS 2,5 mM [pH 7,7], Tris base 2,5 mM, SDS 0,005% (p/v), EDTA 0,05% (p/v).

2.1.3.3. Teñido de los geles.

Una vez terminada la electroforesis, las muestras fueron fijadas con una solución ácido acético/metanol/agua (7,4:20:72 v/v/v) y a continuación teñidas en una solución de Coomassie Brilliant Blue G 250 al 0,5% en ácido acético/metanol/agua (7,4:20:72 v/v/v). El desteñido de los geles se realizó en la solución de fijado.

La determinación de los pesos moleculares de las proteínas se realizó para cada gel mediante rectas de calibración en las que se representaron las movilidades relativas

de las proteínas frente a los logaritmos de sus pesos moleculares. Como patrón se utilizó un kit de proteínas de bajo peso molecular compuesto por fosforilasa b (94 kDa), albúmina de suero bovino (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina de soja (20.1 kDa) y α -lactoalbúmina (14.4 kDa) (Bio-Rad).

2.1.4. Aislamiento de plastidios.

Todo el proceso se realizó en frío. Aproximadamente 1 gramo de semillas peladas fueron troceadas con cuchilla en medio de aislamiento de plastidios (PIM: 0.5 M sorbitol, 20 mM HEPES /NaOH (pH 7.4), 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10%(v/v) etanodiol, 5 mM DTT) (Kang y Rawsthorne, 1994). El extracto fue filtrado a través de tejido de Miracloth y el residuo de nuevo homogeneizado en medio PIM y vuelto a filtrar a través del tejido de Miracloth, este proceso se repitió una vez más siendo el volumen del homogenado inicial de aproximadamente 25 mL. 1 mL del homogenado inicial fue tomado y el resto se centrifugó a 750 g durante 5 min. 1 mL del sobrenadante fue obtenido y el resto se desechó. El precipitado, que contiene los plastidios, fue resuspendido en 1 mL de PIM y mezclado suavemente para obtener la fracción cruda de plastidios. Esta fracción se resuspendió nuevamente en 25 mL PIM, volviéndose a centrifugar a 750 g durante 5 min. El sobrenadante fue eliminado y se resuspendió el precipitado en 1 mL de PIM obteniéndose la fracción lavada de plastidios. Posteriormente los plastidios fueron rotos por sonicación.

Las muestras de sobrenadante anteriormente tomadas se utilizaron para hacer un seguimiento de la purificación de los plastidios, mediante la medida de la actividad fosfofructuquinasa dependiente de pirofosfato (Materiales y Métodos, apartado 2.2.1.5), que es un marcador citosólico.

2.1.5. Ensayos enzimáticos en extracto crudo.

Todos los ensayos fueron realizados mediante la utilización de reacciones acopladas y detección espectrofotométrica a 340 nm (Ultrospec™ 3300 pro Amersham Biosciences) a temperatura ambiente y el extracto (Materiales y Métodos, apartado 2.2.1.1) utilizado para todos los ensayos se mantuvo en hielo hasta su utilización, siendo 1 mL el volumen final de las reacciones (Burrell et al, 1994; Schaffer and Petreikov, 1997).

- **Invertasa neutra (EC 3.2.1.26)**

50 mM HEPES/KOH (pH 7), 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 15 mM KCl, 0.4 mM NAD, 1 mM ATP, 2 unidades de glucosa-6-P deshidrogenasa, 4 unidades de glucosa-6-P

isomerasa, 1 unidad de Hexokinasa de levadura, siendo la reacción iniciada por la adición de sacarosa.

- **Sacarosa sintasa (EC 2.4.1.13)**

50 mM HEPES/KOH (pH 7), 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 15 mM KCl, 0.4 mM NAD, 1 mM ATP, 1mM UDP, 2 unidades de Glucosa-6-P deshidrogenasa, 4 unidades de glucosa-6-P isomerasa, 1 unidad de hexokinasa de levadura, siendo la reacción iniciada por la adición de sacarosa.

- **Hexoquinasa (EC 2.7.1.1)**

50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 4 mM MgCl₂, 2.5 mM ATP, 0.33 mM NADP⁺, 17 nkat de glucosa-6-P deshidrogenasa, siendo la reacción iniciada por la adición de glucosa.

- **Fructoquinasa (EC 2.7.1.4)**

50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 4 mM MgCl₂, 2.5 mM ATP, 0.33 mM NADP⁺, 17 nkat de glucosa-6-P deshidrogenasa, 17 nkat de glucosa-6-P isomerasa, siendo la reacción iniciada por la adición de fructosa.

- **Fosfoglucoasa isomerasa (EC 5.3.1.9)**

75 mM glicilglicina (pH 8.5), 10 mM MgCl₂, 0.5 mM NAD y 0.5 unidades de glucosa-6-P deshidrogenasa, siendo la reacción iniciada por la adición de glucosa-6-P.

- **Fosfofructoquinasa dependiente de ATP (EC 2.1.7.11)**

100 mM Tris (pH 8), 5 mM MgCl₂, 0.1 mM NADH, 1 mM ATP, 1 unidad de aldolasa, 10 unidades de triosa-P-isomerasa, 1.3 unidades de glicerol-3-P deshidrogenasa, siendo la reacción iniciada por la adición de fructosa-6-P.

- **Fosfofructoquinasa dependiente de PPi (EC 2.7.1.90)**

100 mM Tris (pH 8), 5 mM MgCl₂, 0.1 mM NADH, 2 μM fructosa-2,6-bisfosfato, 0.2 mM Na₄P₂O₇, 1 unidad de aldolasa, 10 unidades de triosa-P-isomerasa, 1.3 unidades de glicerol-3-P deshidrogenasa, siendo la reacción iniciada por la adición de fructosa-6-P.

- **Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa (EC 4.1.2.13)**

40 mM HEPES (pH 7.7), 0.1 mM NADH, 1.7 unidades de glicerol-3-P deshidrogenasa, 17 unidades de triosa-P-isomerasa, siendo la reacción iniciada por la adición de fructosa-1,6-bifosfato.

- **Triosa-fosfato isomerasa (EC 5.3.1.1)**

100 mM HEPES (pH 8.0), 5 mM EDTA, 0.2 mM NADH, 1 unidad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, siendo la reacción iniciada por la adición de DL-gliceraldehido 3-fosfato.

- **Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada (EC 1.2.1.12)**
100 mM Taps (pH 8.6), 20 mM NaH₂PO₄, 1 mM NAD, 6 mM cisteína, siendo la reacción iniciada por la adición de DL-gliceraldehido 3-fosfato.
- **Fosfoglicerato quinasa (EC 2.7.2.3)**
100 mM HEPES (pH 7.6), 1 mM EDTA, 2 mM MgSO₄, 0.2 mM NADH, 1 mM ATP, 3.3 unidades de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, siendo la reacción iniciada por la adición de glicerato 3-fosfato.
- **Fosfoglicerato mutasa (EC 2.7.5.3)**
60 mM Tris (pH 7.6), 4 mM MgSO₄, 0.23 mM ADP, 0.075 mM NADH, 1 unidad de enolasa, 3 unidades de piruvato quinasa, 0.15 unidades de lactato deshidrogenasa, siendo la reacción iniciada por la adición de 3-fosfoglicerato.
- **Enolasa (EC 4.2.1.11)**
100 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 0.1 mM NADH, 2.7 mM ADP, 5 unidades de piruvato quinasa, 6 unidades de deshidrogenasa, siendo la reacción iniciada por la adición de 2-fosfoglicerato.
- **Piruvato quinasa (EC 2.7.1.40)**
50 mM HEPES (pH 7.0), 100 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.15 mM NADH, 1.0 mM ADP, 0.15 unidades de lactato deshidrogenasa, siendo la reacción iniciada por la adición de fosfoenolpiruvato.

2.1.6. Cálculo de los parámetros cinéticos aparentes.

Para el cálculo de los parámetros cinéticos aparentes se llevaron a cabo tres repeticiones utilizando distintas concentraciones de sustrato. Tanto la K_m como la V_{max} se obtuvieron aplicando la fórmula de Michaelis-Menten a los datos obtenidos.

2.1.7. Ensayos de actividad para las enzimas purificadas.

En todos los estudios con enzimas purificadas se ha utilizado un lector de placa VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), las reacciones fueron ensayadas a 30°C y las velocidades de reacción fueron lineales con el tiempo y proporcionales a la cantidad de enzima añadida.

2.1.7.1. Actividad hexoquinasa.

La actividad hexoquinasa se determinó de acuerdo a una modificación del método descrito por Martínez-Barajas y Randall (1998). La reacción catalizada por la

hexoquinasa estuvo acoplada a la glucosa-6-fosfato deshidrogenada (EC 1.1.1.49) y se monitorizó la reducción del NAD^+ a 340 nm. Los 200 μL de la mezcla de reacción contenían 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 0.3 mM NAD^+ , 1 mM ATP, 1.4 U/mL de glucosa-6-fosfato deshidrogenada de *Leuconostoc mesenteroides* y (i) 5 mM de glucosa para la medida de la actividad glucoquinasa (EC 2.7.1.2), (ii) 6.7 U/mL de fosfoglucoasa isomerasa (EC 5.3.1.9) y 5 mM de fructosa para la medida de la actividad fructoquinasa (EC 2.7.1.4) o (iii) 3,5 U/mL de fosfoglucoasa isomerasa, 3.5 U/mL de fosfomanosa isomerasa (EC 5.3.1.8) y 5 mM de manosa para la medida de la actividad manosaquinasa (EC 2.7.1.7).

El estudio de inhibición por glucosa-6-fosfato se realizó mediante el ensayo acoplado con la piruvato quinasa (EC 2.7.1.40) y la lactado deshidrogenada (EC 1.1.28), mientras que en el caso del posible efecto inhibitor del ADP y de la trealosa-4-fosfato no fue necesario modificar el ensayo arriba descrito. En todos los casos, la mezcla de reacción fue suplementada con diferentes cantidades de las moléculas con posible efecto inhibitor, manteniendo constante tanto el sustrato como el resto de componentes, siendo el ensayo iniciado por la adición de la preparación enzimática y corregido usando la actividad medida carente del posible inhibitor.

2.1.7.2. Actividad fosfoglucoasa isomerasa.

La actividad fosfoglucoasa isomerasa fue caracterizada en ambos sentidos de la reacción. En la dirección de producción de glucosa-6-fosfato a partir de fructosa-6-fosfato, el método empleado consistió en una modificación del descrito por Rivoal y col., (1989). Los 200 μL de mezcla de reacción contenían 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM MgCl_2 , 0.5 mM NAD^+ , 1 mM fructosa-6-fosfato y 0.48 U/mL de glucosa-6-fosfato deshidrogenada. Mientras que en la dirección de producción de fructosa-6-fosfato, los 200 μL de mezcla de reacción contenían 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl_2 , 0.2 mM NADH, 0.25 mM ATP, 2 mM Glucosa-6-fosfato, 1.2 U/mL de fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (EC 4.1.2.13), 1.2 U/mL de triosafosfato isomerasa (EC 5.3.1.1) y 3.48 U/mL de glicerol-3-fosfato deshidrogenada (EC 1.1.1.8).

El estudio del efecto de posibles inhibidores se realizó en ambos sentidos de la reacción y las moléculas elegidas para el ensayo fueron el 6-fosfogluconato el gliceraldehido-3-fosfato, la eritrosa-4-fosfato, la ribosa-5-fosfato y la dihidroxiacetona-fosfato, siendo el procedimiento similar al empleado en el caso anterior.

2.1.7.3. Actividad fosfoglicerato quinasa.

La actividad fosfoglicerato quinasa se ensayó en la dirección de producción de gliceraldehído-3-fosfato de acuerdo con una adaptación del método propuesto por Journet y col., (1986). Los 200 μL de mezcla de reacción contenían 100 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM MgCl_2 , 0.2 mM NADH, 2 mM ATP, 2 mM DTT, 5 mM 3-fosfoglicerato y 0.5 U/mL de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (EC 1.2.1.12).

Para el estudio de inhibición se seleccionaron los compuestos UTP, UDP, AMP, ADP, glicerol-3-fosfato y glicerol-2-fosfato, siendo el procedimiento igual que en los dos casos anteriores, estudiándose la actividad enzimática en presencia de diferentes concentraciones de los posibles inhibidores y comparando estos valores con la actividad en ausencia del inhibidor.

2.1.8. Caracterización cinética de las enzimas purificadas.

Los datos presentados se corresponden a la determinación por triplicado de las medidas realizadas y los parámetros cinéticos han sido calculados a partir de la ecuación de Michaelis-Menten, usando un programa de regresión no lineal con ajuste de mínimos cuadrados (SigmaPlot 8.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

2.1.9. Efecto del pH y la temperatura sobre las actividades.

El efecto del pH sobre las enzimas purificadas fue estudiado usando un tampón con tres componentes que mantiene constante la fuerza iónica a través del rango de pH utilizado (Ellis y col., 1982). El tampón Tris-HCl usado en las mezclas de reacción arriba descritas fue reemplazado por 0,05 M de ácido acético, 0,05 M ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES) y 0.1 M Tris-HCl, ajustándolo a diferentes valores de pH con 1 M de NaOH o 1 M de HCl. El pH fue medido directamente en la mezcla de reacción usando un microelectrodo inmediatamente después del ensayo espectrofotométrico.

Para estudiar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se sometió a las enzimas a choque térmico durante dos minutos, posteriormente se mantuvo en hielo durante cinco minutos y a continuación se midió la actividad siguiéndose en todo momento las condiciones de ensayo anteriormente descritas para cada enzima. Cada valor se corresponde a la media realizada sobre ocho determinaciones.

2.1.10. Determinación de metabolitos.

2.1.10.1. Determinación de glucosa y fructosa.

Las hexosas fueron ensayadas espectrofotométricamente mediante la medida de la formación de NADH a través de la monitorización del incremento de absorbancia a 340 nm.

La mezcla de reacción para un volumen de 1 mL estaba constituida por 100 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 0.8 mM NAD⁺ y 100 µL del extracto (Materiales y Métodos, apartado 2.2.2.1.). A continuación mediante la adición secuencial de 1,5 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 1,5 U de hexokinasa y 1 U de fosfoglucoisomerasa, se procedió a la medida de glucosa-6-fosfato, glucosa y fructosa respectivamente, adicionándose las enzimas cuando la reacción anterior ha terminado completamente y no aparecen cambios en la absorbancia.

2.1.10.2. Determinación de sacarosa.

El análisis del contenido en sacarosa se realizó mediante la hidrólisis ácida de ésta seguido de la determinación espectrofotométrica de la glucosa y fructosa generadas (Materiales y Métodos, apartado 2.2.1.10.1.). Originalmente la medida de la sacarosa era realizada mediante su digestión con invertasa ácida purificada, sin embargo la sacarosa es inherentemente sensible al medio ácido siendo el enlace glucosídico susceptible de ruptura a las condiciones ácidas utilizadas con la invertasa.

La mezcla de hidrólisis esta constituida por 100 µL del extracto (Materiales y Métodos, apartado 2.2.2.1.), 50 µL 300 mM de ácido cítrico (que proporciona una concentración final de 100 mM y pH inferior a 4). A continuación se incubaba a 60°C en tubos sellados, posteriormente se deja atemperar y se centrifuga brevemente. Por último se neutraliza la solución por adición de 100 µL 1M Tris-HCl (pH 8,0).

Para la determinación del contenido de sacarosa de la muestra se tomó en consideración el contenido en glucosa y fructosa de la misma previo a la hidrólisis ácida.

2.1.11. Determinación del contenido lipídico y riqueza grasa.

Al realizar la extracción de los lípidos totales podemos calcular tanto la riqueza grasa (mg lípidos/mg muestra) como la cantidad neta de un determinado ácido graso presente en la muestra gracias a la adición de un patrón interno, que servirá como referencia. Este patrón interno es el ácido heptadecanoico (17:0), por no estar presente en ninguna grasa natural.

Se prepararon disoluciones de éste ácido con concentraciones conocidas en metanol que se adicionaron a las muestras durante la extracción en un volumen adecuado para que el ácido heptadecanoico represente alrededor del 20% del total de ácidos grasos presentes en la muestra (el contenido en aceite de las semillas se puede considerar de un 30% del peso). Posteriormente se analizaron las muestras por cromatografía gaseosa (GC). El ácido heptadecanoico se separa perfectamente del resto de los ácidos grasos siendo fácilmente reconocible, con un tiempo de retención comprendido entre el ácido palmítico y el ácido esteárico. A partir del porcentaje de 17:0 en el cromatograma, y conociendo la cantidad añadida, se puede calcular la concentración del resto de los ácidos grasos, así como la cantidad de lípidos totales, expresada en ácidos grasos.

2.1.12. Determinación de la composición aminoacídica mediante HPLC.

El método empleado para su determinación de la composición aminoacídica en semillas maduras mediante HPLC fue el desarrollado por Alaiz y col. (1992).

2.1.12.1. Hidrólisis.

Las semillas, pertenecientes a las líneas CAS-6, HA-89 y ZEN-8, fueron trituradas y mezcladas con 200 µl del patrón interno ácido D,L- α -aminobutírico junto con 6,0 M de ácido clorhídrico. A continuación se procedió a la hidrólisis ácida (proceso que impide la medida del triptófano) por incubación de las muestras a 110°C durante 24 horas en atmósfera de nitrógeno.

2.1.12.2. Derivatización.

La formación de los N-[2,2-bis(etoxicarbonil)vinil] derivados de la mezcla de aminoácidos se realizó a partir del residuo seco procedente de la hidrólisis ácida junto con 1 M de tampón borato pH 9 conteniendo 0,02% de azida sódica y 0,8 µl de dietil etoximetilenmalonato. La reacción se llevó a cabo a 50°C durante 50 minutos en agitación. La mezcla resultante fue enfriada hasta temperatura ambiente y 15 µl fueron inyectados en el HPLC.

2.1.12.3. Cromatografía.

La separación de los aminoácidos derivatizados fue realizada utilizando un sistema de gradiente binario. Los solventes usados fueron (A) 25 mM acetato sódico conteniendo 0,02% de azida sódica (pH 6,0) y (B) acetonitrilo. Los solventes fueron introducidos en la columna con una velocidad de flujo de 0,9 ml/min como se describe a continuación: Tiempo 0,0-3,0 min, gradiente lineal de A-B (91:9) a A-B (86:14); 3,0-

13,0 min, elución con A-B (86:14); 13,0-30,0 min, gradiente lineal de A-B (86:14) a A-B (86:31); 30,0-35,0 min, elución con A-B (69:31).

2.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.

2.2.1. Extracción con ácido perclórico de las semillas en desarrollo.

A partir de siete semillas congeladas se obtuvo un polvo fino mediante su homogenización en mortero en presencia de nitrógeno líquido, añadiéndosele 1 mL 3 M HClO₄. La mezcla congelada fue transferida a tubos de centrifuga de 50 mL y se permitió su descongelación a 4°C. El homogenado fue suplementado con 1 mL 1 M HClO₄ y después centrifugado a 16000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante fue retirado y el pellet fue extraído usando 1 mL 1 M HClO₄ y centrifugado como antes. El sobrenadante fue retirado y el pellet vuelto a extraer usando 2 mL de agua y vuelto a centrifugar. Los sobrenadantes obtenidos fueron combinados ajustándose a pH 5 usando 2 M KOH. La fracción insoluble de KClO₄ generada fue retirada mediante centrifugación y el sobrenadante resultante fue liofilizado y redisolto en 1 mL de agua. La muestra fue centrifugada nuevamente a 16000 rpm durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante resultante fue liofilizado nuevamente siendo redisolto en agua (mínima cantidad posible) y vuelto a centrifugar a 16000 rpm durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante diluido a un volumen final de 2,5 mL conteniendo 10 mM EDTA y 10 mM KH₂PO₄ y ajustado a pH 7,5.

2.2.2. Condiciones de adquisición para la espectroscopia ¹H-RMN.

Los espectros de ¹H-RMN de la fracción soluble ácida fueron tomados a 20 °C y 599,83 MHz en un espectrómetro Varian UNity Inova 600 (Varian Inc., Palo alto, USA) usando una sonda de resonancia triple ¹H {¹³C/¹⁵N} de 5 mm de diámetro, un ángulo de pulso de 90°, una anchura de espectro de 10 ppm, un retardo de relajación de 2 s incluyendo un pulso de supresión de agua a 1,98 s, un tiempo de adquisición de 4 s y 320 transiciones por muestra. La caída libre de la inducción fue procesada con un ensanchamiento de línea de 1 Hz usando el programa Nuts para Windows (Acorn NMR Inc., Livermore, CA, USA). El desplazamiento químico de los espectros fue referenciado a la señal de TSP a 0,00 ppm.

2.2.3. Análisis estadístico.

Los espectros de RMN fueron convertidos en valores numéricos y tras la eliminación de los valores correspondientes al pico del agua, se procedió a la normalización de los datos en función de la suma de los valores restantes. Estos datos numéricos fueron objeto de estudio mediante el Análisis de Componentes Principales (ACP). En el ACP cada muestra es representada por un punto, de tal forma que aquellas muestras que se encuentren cercanas en la representación tendrán perfiles de espectros similares, mientras que las que se encuentren en posiciones alejadas tendrán espectros muy diferentes. Pudiéndose determinar que variables del espectro son responsables de los patrones y tendencias encontrados.

2.3. Biología Molecular.

2.3.1. Extracción de mRNA.

Las extracciones de mRNA se realizaron mediante el Kit Micro-Fast Track de Invitrogen a partir de aproximadamente 0,2 g de semillas, que fueron peladas y pulverizadas en morteros estériles con nitrógeno líquido. El mRNA se resuspendía en 50 μ l de 10 mM Tris-Cl pH 8,5. En el caso de emplearse para la síntesis de cDNA, se resuspendía en 66 μ l de agua destilada autoclavada.

2.3.2. Síntesis de la primera cadena de cDNA.

La síntesis de cDNA a partir del mRNA extraído, tal y como se indica en el apartado 2.3.1 de los Materiales y Métodos, se realizó con el kit Ready-To-Go™ T-Primed First-Strand Kit de Amersham-Pharmacia Biotech, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit utiliza la retrotranscriptasa del virus “Moloney Murine Leukemia Virus” (M-MuLV) y un cebador oligo(dT) para generar la primera cadena de cDNA.

2.3.3. Estimación de la concentración de ácidos nucleicos.

La concentración y pureza de los ácidos nucleicos se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 3300 pro (Pharmacia). La relación entre la absorbancia medida a 260 nm y a 280 nm (260/280), indica la pureza de los ácidos nucleicos, mientras que la absorbancia medida a 260 nm permite estimar la concentración de ácidos nucleicos presentes en la preparación.

Así, una relación 260/280 próxima a 1,8 indica que el DNA es puro, correspondiendo una unidad de absorbancia a 260 nm a una concentración de 50 µg/ml de DNA de doble cadena. Para el caso del RNA, la relación 260/280 debe aproximarse a 2, correspondiendo una unidad de absorbancia a 260 nm a una concentración de 40 µg/ml de RNA (Sambrook y col., 1989).

2.3.4. Obtención de DNA plasmídico.

Las extracciones de DNA plasmídico fueron llevadas a cabo mediante lisis alcalina y se purificaron mediante columnas, con el GFXTM Micro Plasmid Prep Kit de Amersham-Pharmacia Biotech. El DNA resultante se eluyó con 50-100 µl de H₂O.

Como comprobación de la presencia del inserto el DNA resultante fue digerido añadiendo 10 U de endonucleasa de restricción por cada µg de DNA en el tampón requerido por la enzima. La mezcla se incubaba al menos una hora y media a 37°C. El resultado de la restricción se visualizaba por electroforesis en gel de agarosa 1%.

2.3.5. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador TGradient de Whatman Biometra. La reacción se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía: tampón comercial de la enzima (1x), 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido (dNTPs), 0,5 µM de cada oligonucleótido, 0,1-1 µg de DNA y 1 U de Taq polimerasa de distintas marcas. Los resultados de las reacciones de amplificación se analizaban en geles de agarosa como se describe en el apartado 2.3.7. de los Materiales y Métodos.

2.3.4.1. Diseño de cebadores.

El diseño de cebadores se llevó a cabo siguiendo los siguientes requisitos:

- Longitud entre 18 y 25 pares de bases (pb).
- Contenido G+C mayor o igual al 50%.
- Temperatura de hibridación (T_m) igual o menor a 72°C [T_m = 4x(G+C) + 2x(A+T)].
- En posición 3' siempre una G o C.
- No formar estructuras secundarias.
- No hibridar entre los cebadores utilizados en la misma reacción

Nombre	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)
dINV	TGGGARTGYCCNGAYTTYTWYCC	62,4
dHXKF	GGNACNGGNACNAAAYGC	56,4
dHXKR	YTCNCCNARRTACATNCC	53,7
dPGIF	TTYGCNTTYTGGGAYTGGGTNGG	63,3
dPGIR	TGYTGNC CRTTNGTNCC	54,0
dPGKF	GCNGARHTNCCNGANGARGG	57,2
dPGKR	TCNARNCCCATCCANCC	55,2
dENOF	ACYGGBATHTAYGARGC	51,5
dENOR	GCCATBACCCCCANCC	58,0

Tabla 2.2. Cebadores degenerados utilizados para la amplificación mediante PCR. Las degeneraciones se indican de la siguiente forma: R (A,G), Y (CT), N (ACGT), W (AT), H (ACT), B(GCT). INV; hexoquinasa, HXK; fosfoglucoasa isomerasa, PGI; fosfoglicerato quinasa, PGK; enolasa, ENO. F, forward; R, reverse.

Los cebadores de secuencia específica (Tabla 2.2.) se diseñaron a partir de las secuencias nucleotídicas. Todos los cebadores fueron sintetizados por Amersham Biosciences (Roosendaal, The Netherlands).

2.3.4.2. Condiciones de amplificación.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador TGradient de Whatman Biometra. En condiciones estándares, la mezcla se sometió a una activación de la enzima y primera desnaturalización a 94°C durante 4 min. Posteriormente, se efectuaron 30 ciclos en los que la mezcla se sometía a una primera etapa de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, una etapa de alineamiento de secuencias en la que la temperatura fue la T_m más baja de los dos cebadores menos 2°C, y una etapa de extensión a 72°C durante 1 min. Finalmente la mezcla se sometió a 72°C durante 10 minutos en los que se produjo una extensión final de las secuencias. Estas condiciones estándares fueron a veces modificadas de acuerdo a la T_m de los cebadores, al molde, así como a la longitud esperada de los fragmentos.

2.3.4.3. Amplificación de cDNA mediante cebadores no específicos.

Para llevarla a cabo se utilizó un kit de Optimización de Invitrogen que consiste en distintos tampones que se diferencian en la concentración de MgCl₂ y el pH.

El volumen de reacción fue de 50 µl en los que había añadido 0,25 µg de cada cebador, 10 µl de tampón 5X, 5U de polimerasa y de 1 - 150 ng de cDNA. Las condiciones de amplificación son las mismas que se indicaron anteriormente. Las características de los tampones con su nombre correspondiente se indican en la Tabla 2.3.

Mg ²⁺ (mM)	pH			
	1,5	2,0	2,5	3,5
8,5	A	B	C	D
9,0	E	F	G	H
9,5	I	J	K	L
10,0	M	N	O	P

Tabla 2.3. Características y nombre de los tampones del kit de Optimización (Invitrogen) utilizado durante la clonación de los fragmentos iniciales de los cDNA estudiados.

2.3.6. Amplificación rápida de los extremos del cDNA (RACE).

Para amplificar el extremo 3' de los cDNA se empleó el kit de optimización con un cebador interno del fragmento obtenido con los oligos degenerados y otro diseñado a partir de la cola de poliadenina del mRNA (FA2Z). El procedimiento seguido es el descrito para este kit.

Para amplificar el extremo 5' de los cDNA obtenidos se utilizó el SmartTM-RACE cDNA amplification kit (Clontech). La extracción de mRNA se realizó como se describe en el apartado 2.2.3.1 de los Materiales y Métodos. Tras la síntesis de la primera cadena de cDNA siguiendo las instrucciones del kit, se realizó una reacción de PCR utilizando 5 µl del tampón BD Advantage 2PCR 10X, dNTPs en una concentración final de 0,2 mM para cada uno, 1 µl de BD Advantage 2Polimerasa Mix 50X y 5 µl de la mezcla de cebadores universal (UPM, Universal Primers Mix) 10X, suministrado todo por el kit. Y se añadieron los cebadores específicos diseñados a partir del extremo 3' de las secuencias conocidas a una concentración de 0,2 µM. Las condiciones de la PCR variaron con respecto a las anteriores, y consistieron en 25 ciclos en los que ocurría una primera etapa de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, una etapa de alineamiento a 68°C durante 30 segundos y una última etapa de extensión a 72°C durante 3 min.

Con los productos de esta reacción se realizó una segunda PCR, utilizando las condiciones anteriores pero en la que los cebadores fueron NUP 10X (Nested Universal Primers, del Kit de SmartTM-RACE) y otros cebadores específicos diseñados a partir de las secuencias conocidas pero en una localización más cercana al 5' que los anteriores y en la que solo se realizaron 20 ciclos.

2.3.7. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La separación de los fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa, según se describe en Sambrook y col. (1989). Los geles se preparaban en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM [pH 8,0]). La concentración de agarosa (p/v) en los geles variaba entre el 0,7% (para la separación de bandas de tamaños mayores o iguales a 1kb) y el 2% (para bandas de pequeño tamaño) (p/v). Antes de ser sometidas a electroforesis, las muestras se suplementaban con 1/6 del volumen de tampón de carga de DNA compuesto por azul de bromofenol al 0,25% (p/v), xileno-cianol FF al 0,25% (p/v) y glicerol al 30% (v/v) en agua. Para determinar el tamaño de los fragmentos de DNA se emplearon los marcadores de peso molecular: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, y MassRuler™ DNA Ladder Mix, suministrados por la casa comercial Fermentas. Las electroforesis se llevaron a cabo en un aparato horizontal ECPS 3000/150 suministrado por Pharmacia, aplicando diferencias de potencial entre 80 y 120 V.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)
INVR1	TGTCAAGTTCTGTGAAGC	51,4
INVR2	CTTGATTTCTCCACTGG	53,7
HXKR1	TTGGTGTAGTGTTCAAACAGCC	58,4
HXKR2	GAGTAGAATCATGATGCATTG	56,5
HXKF	TCCTAAATCAGGAGAGATGG	55,3
PGIR1	CCGTTTGTTCCTCCGGTTCACC	61,4
PGIR2	AGAGATAAAGGTAATACTCC	51,2
PGIF	TGCTCCACACAT TCAACAGG	61,4
PGKR1	CTAATAGTGACTCGATAACACC	56,5
PGKR2	ATCGTTGACGTACAGGTCGG	59,4
PGKF	ATGGCGCTAGAGTCATCC	56,0
ENOR1	AGTGAAGTCCACGAGGTCC	58,8
ENOR2	AGCTGAGAGAACGTGAGCTCC	61,8
ENOF	CTTGTTATGCCAGTTCCAGC	57,3
BamHIHXK	TAGGATCCCGGCACCGGATGAAGAACTCC	70,9
HindIIIHXK	CGCGAAGCTTGTGGACTCTATATATTCG	65,1
SphPGI	GACTGCATGCATGGCGACTCTAATCTCAGACACTGC	72,9
PstPGI	CTGACTGCAGTTATATCTTAGGCAATAGAGTTGTGG	68,3
SphPGK	GACTGCATGCATGGCCACCAAAAAGAGTGTTAGTAGC	71,7
PstPGK	TTAACTGCAGTCAAGCTTCATCCAACGCAGGCACACC	7,28
FA2Z	AACTGGAAGAATTCGCGG	53,7
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	58,4
NUP	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT	60,6

Tabla 2.4. Cebadores específicos utilizados para la amplificación mediante PCR de los cDNA completos. INV; hexoquinasa, HKX; fosfoglucoasa isomerasa, PGI; fosfoglicerato quinasa, PGK; enolasa, ENO. F, forward; R, reverse.

Para la detección del DNA en los geles y su visualización, éstos se sumergían en una solución de bromuro de etidio en agua. La visualización de los geles y el almacenamiento de las imágenes se llevaron a cabo con un transiluminador de luz ultravioleta Chemi Genius² Bio-Imaging System (Syngene) conectado con un ordenador personal.

2.3.8. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa.

Los fragmentos de DNA separados mediante electroforesis en gel de agarosa, tal y como se describe en el apartado 2.2.3.7 de los Materiales y Métodos, se extrajeron del mismo cortando las bandas de interés usando una cuchilla estéril y utilizando el kit NucleoSpin[®] Extract (Macherey-Hagel, Holanda), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3.9. Tratamientos enzimáticos del DNA.

2.3.9.1. Restricción del DNA.

Las reacciones de restricción fueron realizadas mediante endonucleasas (New England Biolabs y Amersham-Pharmacia) y se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl, según las recomendaciones del fabricante, en el tampón suministrado con cada enzima. Las digestiones con dos enzimas de restricción se realizaron en un tampón compatible de la misma casa comercial o purificando el producto de la primera restricción (Materiales y Metodos, apartado 2.2.3.8) y realizando posteriormente la segunda. Cuando era requerido, las enzimas eran inactivadas incubándolas durante 15 min a 65°C.

2.3.9.2. Desfosforilación de extremos del DNA.

Para realizar ligaciones de fragmentos de DNA con extremos romos fue necesaria la desfosforilación de los extremos del plásmido sobre el que iba a realizarse la ligación, con el fin de aumentar la eficiencia de la misma. Para ello, se obtenía una preparación de plásmido según el protocolo descrito en el apartado 2.2.3.4 de los Materiales y Métodos, con la salvedad de que, en el paso final, el DNA se resuspendía en agua MilliQ. Una fracción de 1 µg del plásmido así obtenido se sometía a restricción con la enzima deseada, en un volumen final de 40 µl. Una vez la digestión era completa, a esta mezcla de reacción se le añadían 6U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Boehringer Mannheim) y 5 µl de tampón 10X comercial y agua MilliQ, hasta un volumen final de 50 µl, y se incubaba durante 30 min a 37°C. A continuación, la mezcla

de reacción se suplementaba con EDTA 200 mM [pH 8,0] y se incubaba durante 15 min a 65°C para la inactivación de la enzima. Finalmente, el DNA se purificó utilizando el kit NucleoSpin® Extract (Macherey-Hagel, Holanda) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3.9.3. Ligación de fragmentos del DNA.

Para calcular la cantidad apropiada de inserto (producto de PCR) a incluir en la reacción de ligación, se usó la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{Kb de inserto}}{\text{Kb del vector}} \times \text{proporción inserto : vector} = \text{ng de inserto}$$

La ligación de fragmentos de DNA se realizaron mezclando preparaciones de los fragmentos (la proporción inserto: vector óptima fue 3:1) e incubando en presencia de la T4 DNA Ligasa (Fermentas o Promega), siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante. Las ligaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl del tampón comercial de la enzima 10X suministrado por los fabricantes.

El plásmido pGEM-T Easy Vector (Promega) lleva unas colas de deoxitimina de cadena simple en sus extremos 3', en el sitio de inserción. Estas colas aumentan la eficiencia de ligación para productos de PCR, previniendo la recirculación del vector y proporcionando colas compatibles a las generadas en la PCR por las polimerasas termoestables usadas, ya que, estas polimerasas añaden deoxiadenina al extremo 3' de los fragmentos amplificados. La ligación en el plásmido se realizó a 15°C durante 2 horas, en una mezcla de reacción que contenía Tris-HCl 30 mM [pH 7,8], MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 0,5 mM, PEG al 5%, 55 ng de vector, 3U de ligasa de T4 (Promega) y una cantidad apropiada del inserto de DNA.

La ligación en el plásmido pQE-80L se realizó a 22°C durante X horas, en una mezcla de reacción que contenía Tris-HCl 40 mM [pH 7,8], MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 0,5 mM, 400 ng de vector y 2U de ligasa de T4 (Fermentas) y una cantidad apropiada del inserto de DNA (40 – 80 ng). La enzima se inactivó al incubar durante 10 minutos a 65°C.

Plásmidos	Características	Ref/Casa comercial
pQE-80L	Vector de expresión	Quiagen
pGEM-T®	Vector de clonación y secuenciación Para productos de PCR	Promega

Tabla 2.5. Plásmidos empleados para la ligación de fragmentos de DNA.

2.3.9.4. Secuenciación del DNA.

La secuenciación de los insertos de vectores fue llevada a cabo en los laboratorios GATC GmbH (Konstanz, Alemania). Las secuencias remitidas fueron identificadas mediante homología con secuencias conocidas utilizando el programa BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tools).

2.3.10. Análisis de la expresión de mRNA mediante PCR a tiempo real.

Mediante la combinación de técnicas de fluorescencia y la capacidad de detección, la PCR a tiempo real permite monitorizar el proceso de reacción siguiendo su desarrollo ciclo a ciclo (Heid y col., 1996; Bustin, 2002).

Durante el proceso de la PCR la reacción pasa por dos fases distintas. Una primera fase donde tiene lugar un incremento exponencial de las moléculas de DNA, una mayor cantidad de DNA de partida implica mayor producto de reacción. Y una segunda fase, en la que la reacción alcanza una fase estacionaria en la que los componentes de la mezcla de reacción comienzan a ser limitantes, los inhibidores de la reacción se acumulan y la polimerasa pierde actividad.

El incremento en la emisión de fluorescencia (ΔR_n) que tiene lugar durante el transcurso de la reacción está directamente relacionado con el incremento en la amplificación de la secuencia diana. Cuando este incremento es expresado frente al número de ciclos se obtiene una curva de amplificación. El parámetro C_u (ciclo umbral) se define como el ciclo en el cual la señal de fluorescencia cruza el umbral superando la línea base. En este punto en el cual la curva de fluorescencia cruza el umbral, la reacción se encuentra en fase exponencial, existiendo relación lineal entre el logaritmo de cambio de fluorescencia y el número de ciclos. Cuanto mayor es la cantidad de DNA molde de partida menos ciclos son necesarios para que el producto de reacción se acumule y pueda ser detectado y, por tanto, más rápido se alcanza el C_u . El C_u nos permite cuantificar el DNA presente en la muestra y así, la expresión del gen.

Como método de generación de fluorescencia se empleó el SyberGreen®, cuya fluorescencia se ve incrementada cuando se une al surco menor del DNA de doble cadena generadas en la PCR. La diferenciación entre productos específicos y no específicos se logra mediante la representación de la fluorescencia como una función de la temperatura, generando una “curva de melting” para cada producto de amplificación. Así cada producto posee un “pico de melting” característico en función de su composición nucleotídica, que permite distinguirlo de posibles artefactos generados durante la amplificación.

Para la cuantificación del producto de PCR la señal de fluorescencia, medida durante el transcurso de la reacción, es digitalizada y transformada en un valor numérico que corresponde al valor de C_u para cada uno de los productos amplificados. En nuestro caso, los valores de C_u nos permitieron la cuantificación absoluta, es decir, la determinación del número de copias de los transcritos de los genes en estudio, relacionando la señal de PCR con una curva de calibración (Bustin, 2000).

2.3.10.1. Reacciones de PCR a tiempo real para los genes en estudio.

El mRNA se aisló de las muestras (Materiales y Métodos, apartado 2.2.3.1) obteniéndose posteriormente el cDNA (Materiales y Métodos, apartado 2.2.3.2) y éste fue cuantificado según el procedimiento previamente descrito (Materiales y Métodos, apartado 2.2.3.3).

El estudio de la expresión de cada uno de los genes fue realizado mediante la amplificación de una región concreta de los mismos, de unas 100 pb, empleándose los cebadores descritos en la tabla 2.6. Estos cebadores tienen un tamaño de entre 15 y 20 pb, su porcentaje de G/C es menor al 70%.

Como reactivo para la emisión de fluorescencia se empleó SYBR Green (Quiagen). Las reacciones de amplificación a tiempo real se realizaron en un volumen final de 25 μ l, conteniendo 12 μ l de 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master mix (con una concentración final de $MgCl_2$ de 2,5 mM), cebadores con concentración final de 0,3 μ M, agua libre de RNasa hasta llegar al volumen de 25 μ l, y 2 μ l de muestra.

Las reacciones de amplificación se realizaron empleando el sistema de detección Smart Cycler II (Cepheid), con tubos de 25 μ l (Cepheid), siguiendo un protocolo en tres pasos:

Desnaturalización: 95°C, 120 seg (1 ciclo).

Amplificación: 95°C, 30 seg; 55°C, 90 seg; 72°C 150 seg (40 ciclos).

Melting: comenzando a 60°C y subiendo 0,2°C por segundo hasta 95°C.

Tras finalizar la reacción se comprobó la ausencia de dímeros de cebadores y la especificidad de productos de PCR mediante el análisis de las “curvas de melting”.

2.3.10.2. Cuantificación de los productos de PCR.

Para la cuantificación del número de copias de los transcritos de los genes se realizó una curva de calibración para cada uno de ellos. Para ello se calcularon las C_u de diluciones diferentes diluciones de concentración conocida, utilizándose como molde construcciones del plásmido pGEM-T easy que contenían insertos de aproximadamente 500 pb que a su vez incluían las secuencias que posteriormente iban a ser utilizadas durante con las muestras de cDNA, manteniéndose en ambos casos las mismas condiciones de reacción. Las rectas de calibración se llevaron a cabo conociendo el número de copias de moléculas de plásmido/ μ l DNA y su C_u , con el mismo software del Smart Cycler II (Cepheid).

Nombre	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)
cINVf	TAGATAATCCCTCGGATGC	53,7
cINVR	CTTGATTCCTCCACTGG	53,7
cHXKf	CGAGTATGATGAAGGTCTTGATGG	61,0
cHXKR	CAAGACTCGTCTCACAACCTCC	60,3
cPGIf	TGCTCCACACATTCAACAGG	57,3
cPGIR	TAAGGCAGCATAGCTCTTGC	57,3
cPGKf	ACCTGTACGTCAACGATGC	56,7
cPGKR	CAACAAGGTAGTCAAGCTCC	57,3
cENOf	ATAGGAATGGATGTTGCTGCTTCC	57,3
cENOR	AGCTGAGAGAACGTGAGCTCC	61,8

Tabla 2.6. Cebadores utilizados en la PCR a tiempo real. invertasa, INV; hexoquinasa, HXK; fosfoglucosa isomerasa, PGI; fosfoglicerato quinasa, PGK; enolasa, ENO. F, forward; R, reverse.

2.3.11. Transformación genética.

2.3.11.1. Preparación de células competentes.

El método seguido fue el descrito por Sambrook y col., (1989). Las estirpes de *E. coli* utilizada fueron DH5- α y XL1-Blue. Para su preparación se siguió el protocolo siguiente:

Las células se cultivaron a 37°C en medio LB sólido (1% bacto triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7,0, para medio sólido se añadió 1,5% agar) durante la noche. Pasado este tiempo se usó una sola colonia para preinocular en 5 ml de medio ψ Broth (2% bacto triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,4% MgSO₄, 10 mM KCl) y se cultivó en agitación continua a 37°C hasta que la DO₅₅₀ fue 0,375 (3 horas aproximadamente). El preinóculo se añadió a 100 ml de ψ Broth precalentado a 37°C en

un matraz de 500 ml. Este se incubó a 37°C en agitación (200 rpm) hasta que la DO₅₅₀ fue de 0,48. A continuación el cultivo se incubó 10 min en hielo, se transfirió a tubos de centrifuga previamente enfriados en hielo, y se centrifugo durante 5 min a 4°C y a 3000 rpm, en una centrífuga Sorvall (modelo RC5C). Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante y las células sedimentadas se resuspendieron en 30 ml de solución TjBI (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂·4H₂O, 30 mM acetK, 10 mM CaCl₂, 15% glicerol; ajustado a pH 5,8 con acético 0,2 M y esterilizado por filtración) previamente enfriada. Se incubó en hielo 10 minutos, de nuevo se sedimentaron las células y se resuspendió en TjBII (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM Cl₂Ca, 15% glicerol; ajustado a pH 7 con NaOH, esterilizado por filtración) preenfriado. Finalmente las células se distribuyeron en alícuotas de 100 o 200 µl, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C.

2.3.11.2. Transformación mediante choque térmico.

El método utilizado para la transformación fue el descrito por Sambrook y col., (1989). El volumen de ligación se mezcló con 100 µl de células competentes previamente descongeladas en hielo. La mezcla se incubó durante 15-30 min en hielo y pasado este tiempo se sometió a un choque térmico durante un minuto y medio a 42°C. Posteriormente se mantuvo 7 min a temperatura ambiente e inmediatamente después se añadió 1,5 ml de LB líquido. Se incubó a 37°C y en agitación durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se sembró en medio LB sólido al 1% de agar (p/v) suplementado con 100 mg/ml de ampicilina y 250 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal). La placa de Petri fue incubada durante 10-12 horas a 37° C. En los transformantes que contienen el inserto se interrumpe la secuencia codificante del gen beta-galactosidasa y pueden ser identificados por el tipo color de las colonias en la placa suplementada con X-Gal como sustrato. Los clones que contienen el inserto producen colonias blancas y las que no lo tienen azules.

2.3.12. Expresión heteróloga en *E. coli* y purificación de las proteínas recombinantes.

Las células de *E. coli* que contenían las construcciones correspondientes a las proteínas recombinantes, fueron crecidas bajo agitación constante a 37°C en medio LB con ampicilina (100 mg/L). Las células fueron inducidas a DO₆₀₀ 0,5 con 0,6 mM isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG), y crecidas durante 2h a 37°C. Las células fueron recogidas mediante centrifugación (10 minutos a 10000 g) y el pellet fue

congelado a -80°C hasta su posterior uso. Todos los pasos de posterior siguientes se realizaron a 4°C . El pellet bacteriano fue descongelado en 10 mL de tampón de lisis (50 mM NaH_2PO_4 , 10 mM imidazol, 0,3 M NaCl) ajustándose a pH 8,0 con NaOH y suplementado con 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) y 0,1% de TritonX-100. Para lisar las células se empleó una prensa de French (18,00 psi). A continuación se centrifugó a 10000 g y el sobrenadante fue adsorbido en contacto simple en 1 mL de resina Ni-NTA preequilibrada con tampón de lisis durante 60 minutos. La solución fue posteriormente vertida sobre una columna desechable de 0,5 cm de diámetro. La columna fue lavada con 16 mL de tampón de lisis seguido de 12 mL de tampón de lavado (50 mM NaH_2PO_4 , 20 mM imidazole, 0,3 M NaCl). Las proteínas recombinantes unidas a la resina fueron eluidas de la columna con 4.5 mL de tampón de elución (50 mM NaH_2PO_4 , 250 mM imidazol, 0,3 M NaCl) y recogidas en nueve fracciones de 0,5 mL. Las diferentes fracciones fueron visualizadas mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie y las fracciones que contenían las proteínas fueron unidas y dializadas toda la noche frente a 2L de tampón de diálisis (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM MgCl_2 , 1 mM DTT) a 4°C con en agitación. La concentración de proteínas de las fracciones purificadas fue determinada mediante el método de Bradford (1976), usando el reactivo de ensayo de proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) albumina bovina como estándar. Por último se añadió glicerol a una concentración de 50% (v/v) y la solución fue almacenada a -20°C .

2.3.13. Análisis informático de secuencias de DNA y proteínas.

Las secuencias obtenidas tras la secuenciación (Materiales y Métodos, apartado 2.2.3.9.4.) fueron identificadas mediante homología con secuencias conocidas utilizando el programa BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tools).

El alineamiento de secuencias de aminoácidos se llevó a cabo utilizando el programa informático ClustalX v1.8 (Thompson y col. 1997) y la construcción de árboles filogenéticos mediante el uso del programa Treview 1.6.6 (Page, 1996). Asimismo, el paquete informático DNATools 6.0 (Calsberg) aportó numerosas herramientas para manejar las secuencias como la búsqueda de marcos abiertos de lectura (ORF) o la traducción de las secuencias de los nucleótidos a aminoácidos.

Para el estudio de la presencia de péptidos señal en la región N-terminal y el análisis de la localización celular de las proteínas, se utilizaron los distintos programas disponibles en las direcciones siguientes:

- <http://wolfsort.org/> (WOLF PSORT)
- <http://pprowler.imb.uq.edu.au/> (Protein Prowler Prediction)
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> (TargetP 1.1)

2.3.14. Modelado tridimensional de las proteínas.

A partir de modelos estructurales pertenecientes a proteínas homólogas descritos en la base de datos de estructuras tridimensionales de proteínas RCSB PDB (Berman et al., 2000) y mediante el uso de la secuencia de aminoácidos codificada en los mRNA clonados se postuló la estructura secundaria de las proteínas utilizando los métodos disponibles (PSIPRED, McGuffin et al., 2000; JPRED, Cuff and Barton 2000; PROF, Ouani y King 2000; PHD, Rost 1996 y SSpro, Pollastri y col., 2002). Las estructuras obtenidas presentaron una alta similitud con los homólogos cuyas estructuras previamente habían sido resueltas.

2.4. Western blot.

Las proteínas previamente separadas mediante electroforesis SDS-PAGE (Materiales y Métodos, apartado 2.2.1.3) fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm de poro (Nitrocellulose mebranes for blotting, Sigma-Aldrich®). Para ello se utilizó una cubeta de transferencia (XCell II mini-Cell, Novex) y un tampón Tris-Glicina (12 mM Tris base, 96 mM Glicina, 20% etanol) a 25 voltios constantes durante 2h. Para comprobar la eficacia de la transferencia la membrana fue teñida con Ponceau durante 15 minutos en agitación suave, pudiéndose visualizar el desarrollo de las proteínas. A continuación se eliminó el colorante lavando la membrana con TBST (0,8% NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,1% Tween 20).

Una vez finalizada la transferencia, la membrana fue introducida en la solución de bloqueo (5% leche en polvo desnatada en TBST) y sometida a agitación suave durante 1 hora. Pasado este tiempo se procedió a la retirada de la solución de bloqueo y al lavado de la membrana con TBST, siendo realizados tres lavados de 10 minutos cada uno.

A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo primario. Se utilizó una dilución 1/5000 en 1% BSA/TBST y se incubó durante una hora en agitación suave. Después de retirar la solución con el anticuerpo primario, la membrana se lavó de la misma forma que se describe en el párrafo anterior.

El siguiente paso consistió en la incubación con el anticuerpo secundario (Anti-Rabbit IgG-Peroxidase, Sigma®). Se utilizó una dilución 1/10000 en 1% BSA/TBST durante una hora en agitación suave. Tras la incubación la membrana fue lavada tres veces durante 10 minutos con TBST y otras tres con TBS (0,8% NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,6).

Par la detección se utilizó el kit de quimioluminiscencia Pierce ECL Western Blotting Substrate, siguiendo las instrucciones que aporta

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. LA GLUCOLISIS DURANTE EL PERIODO DE LLENADO DE LAS SEMILLAS.

1.1. Contenido en carbohidratos solubles de las semillas de girasol.

El metabolismo de los azúcares y su control juega un papel primordial en la fisiología de la planta, siendo éste un punto clave en el desarrollo de los tejidos no fotosintéticos. Los embriones dependen del aporte de sacarosa como principal fuente de carbono (King y col., 1997), siendo ésta hidrolizada irreversiblemente mediante las enzimas invertasas (β -fructofuranosa; EC 3.2.1.26) dando lugar a los monosacáridos glucosa y fructosa, de tal forma que ambas hexosa junto con la sacarosa constituyen los azúcares solubles más abundantes en las semillas en desarrollo.

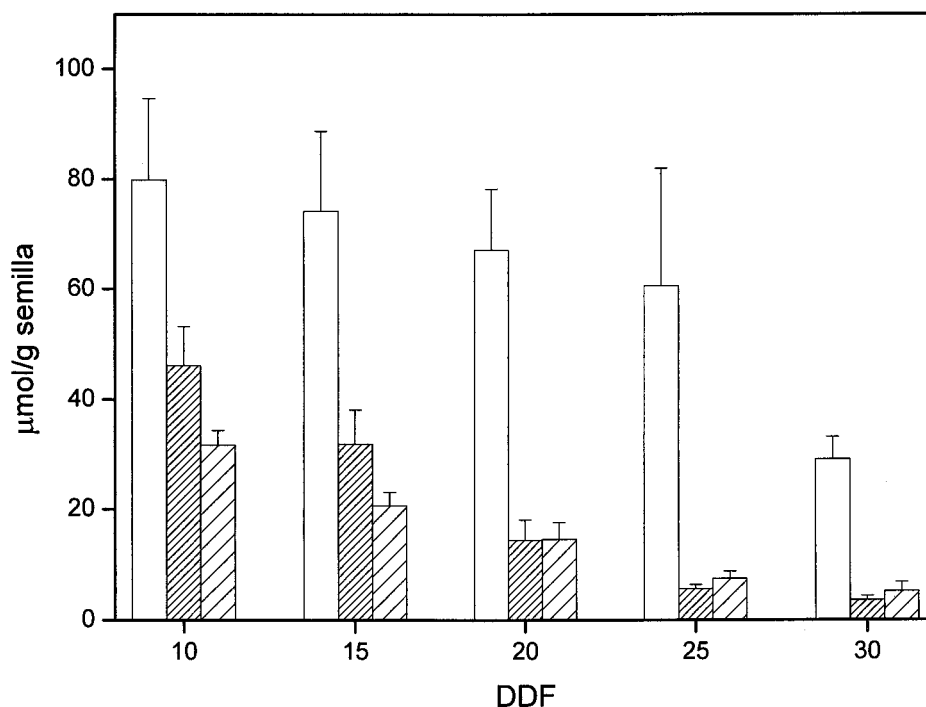


Figura 3.1. Cambios en el contenido de sacarosa (□), glucosa (▨) y fructosa (▩) durante el periodo de acumulación de productos de reserva en las semillas de girasol en desarrollo. DDF, días después de floración.

La regulación de la concentración de los azúcares en las semillas oleaginosas en desarrollo es importante por diferentes cuestiones, ya que tiene consecuencias sobre las condiciones osmóticas de las semillas, el mantenimiento del flujo de carbohidratos

(Patrick y Offler, 1995) y también está implicado en el control de la expresión génica durante el desarrollo (Hill y col., 2003).

Los cambios en los niveles de carbohidratos que se pueden observar en las semillas en desarrollo de girasol, pertenecientes a la línea CAS-6, muestran como se produce un descenso a lo largo del desarrollo de todos los carbohidratos estudiados, aunque esta disminución presenta diferencias en función del tipo de azúcar, ya que la caída en los niveles de sacarosa, que es el azúcar soluble mayoritario, aparece fundamentalmente a partir del día 25 después de floración, mientras que en el caso de las hexosas se alcanza un valor inferior al 50% del inicial sobre el día 20, siendo la glucosa el monosacárido que más desciende ya que al final del periodo de estudio la concentración que se determinó fue la menor de las tres.

En función de las variaciones que aparecen en los niveles de sacarosa y hexosas, se pueden identificar distintas fases en el desarrollo del embrión. La fase inicial en la cual los niveles de hexosas son los más elevados coincidiría con una etapa de alta actividad mitótica debido a que estos niveles elevados mantendrían la división celular y la expansión del embrión (Weber y col., 1996), produciéndose a continuación un descenso tanto de la glucosa como de la fructosa. A diferencia del fenómeno anteriormente descrito, el comportamiento de los niveles de sacarosa va a depender de la especie en estudio, ya que existen casos donde el disacárido aumenta durante el desarrollo (Hill y col., 2003; Tomlinson y col., 2004) y otros en los que no se aprecian importantes cambios a lo largo del tiempo (King y col., 1997). En el caso de las semillas en desarrollo de girasol los niveles de sacarosa son superiores a los de las hexosas desde el principio y no se produce un incremento en la concentración durante el desarrollo sino que al contrario se produce una disminución gradual del contenido en el disacárido.

Existen evidencias de la relación existente entre los niveles de azúcares y la acumulación de productos de reserva, como es el caso de la síntesis de almidón (Borisjuk y col., 2003), incluso para la síntesis de proteínas (Sanchez-Romero y col., 2002), teniéndose menos información sobre la relación entre estos niveles de metabolitos y el establecimiento de la fase de acumulación de lípidos (Tomlinson y col., 2004).

El descenso de los azúcares solubles indica su uso durante la fase de acumulación de productos de reserva, ya que los monosacáridos provenientes de la hidrólisis de la sacarosa serían convertidos en hexosas-fosfato, pudiendo entrar en la ruta glucolítica y actuar como fuente de carbono y suministrar poder reductor y energía

tanto para el crecimiento como para la síntesis de lípidos y proteínas, compuestos de reserva principales en las semillas de girasol.

La relación existente entre la sacarosa y la biosíntesis de ácidos grasos en las semillas oleaginosas en desarrollo se pone claramente de manifiesto en el caso de los mutantes *wrinkled-1* de *Arabidopsis thaliana*, en los cuales se ha descrito un menor contenido lipídico asociado con una mayor cantidad de azúcar solubles en las semillas en desarrollo (Focks y Benning, 1998).

1.2. Determinación de los parámetros cinéticos aparentes en extracto crudo.

Una vez que la sacarosa ha sido hidrolizada en las hexosas correspondientes, éstas entran a formar parte de los metabolitos precursores de la ruta glucolítica, que genera tanto los esqueletos de carbono como la energía y el poder reductor necesarios para la biosíntesis intraplasmática de los ácidos grasos.

El mutante *wrinkled-1*, que anteriormente fue citado para relacionar los niveles de azúcares y la síntesis de lípidos, presenta a su vez deficiencias en la ruta glucolítica, ya que varias de las actividades enzimáticas de esta vía se encuentran reducidas en comparación con el silvestre, fundamentalmente a nivel de la actividad hexoquinasa y fosfofructoquinasa dependiente de PPI, aunque también se ven afectadas las actividades fructoquinasa, fosfoglicerato mutasa, aldolasa, enolasa y piruvato quinasa, estando la actividad fosfoglicerato quinasa reducida en menor medida que las anteriores.

Debido a la relación existente entre la glucólisis y la acumulación de productos de reserva, se procedió al estudio de las actividades pertenecientes a esta ruta, de tal forma que se pueda determinar el grado de influencia que pudiesen presentar sobre los procesos biosintéticos.

Los parámetros cinéticos aparentes correspondientes a las actividades enzimáticas glucolíticas caracterizadas durante el desarrollo de las semillas de girasol se muestran en la Tabla 3.1. Para el cálculo de dichos valores se llevaron a cabo tres repeticiones utilizando distintas concentraciones de sustrato. Tanto la K_m como la V_{max} se obtuvieron aplicando la fórmula de Michaelis-Menten a los datos obtenidos.

Enzima	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m
Invertasa neutra	542	1836	3,4
Hexoquinasa	0,044	5,7	129,5
Fructoquinasa	0,06	55	916,6
Fosfoglucoquinasa	23,13	19890	860
Fosfofructoquinasa depn. de ATP	0,18	66	366,6
Fosfofructoquinasa depn. de PPI	1,41	115	81,5
Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa	0,007	38	5428
Triosa fosfato isomerasa	1,96	24730	12617
Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa	0,897	4121	4594
Fosfoglicerato quinasa	0,25	2971	11884
Fosfoglicerato mutasa	1,77	303	171
Enolasa	0,059	382	6474
Piruvato quinasa	0,4	143	357

Tabla 3.1. Parámetros cinéticos aparentes correspondientes a las actividades glucolíticas totales. Los valores de K_m y V_{max} se expresan en mM y nmol/min/mg proteína respectivamente.

Además de las enzimas anteriormente mencionadas, también se determinó la actividad sacarosa sintasa, que cataliza la hidrólisis reversible de la sacarosa en fructosa y UDP-glucosa, resultando ser ésta muy inferior a la actividad invertasa neutra.

Los niveles de actividad máximos fueron determinados para las enzimas triosa fosfato isomerasa y fosfoglucoquinasa, pudiéndose agrupar el resto de actividades en diferentes grupos en función de su actividad máxima, estando formado el segundo grupo por las actividades gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa e invertasa neutra, el tercero por fosfoglicerato mutasa y enolasa, seguidos de piruvato quinasa y fosfofructoquinasa dependiente de PPI, mientras que los dos últimos grupos corresponderían a los formados por fosfofructoquinasa dependiente de ATP, fructoquinasa y aldolasa, y la hexoquinasa como actividad con menor V_{max} .

Los valores inferiores de eficiencia catalítica (V_{max}/K_m) se corresponderían con posibles pasos limitantes dentro de la ruta, siendo las actividades invertasa neutra, fosfoglucoquinasa dependiente de PPI, hexoquinasa y fosfoglicerato mutasa aquellas que presentan los valores más bajos encontrados para las diferentes actividades de la vía glucolítica en las semillas en desarrollo de girasol.

1.3. Estudio de las actividades glucolíticas plastidiales.

La ruta glucolítica plastidial participaría de forma directa en el suministro de esqueletos carbonados, energía y poder reductor para la síntesis *de novo* de los ácidos grasos, que tiene lugar dentro de los plastidios. Por lo tanto con la finalidad de conocer las actividades presentes en los plastidios de las semillas en desarrollo de girasol se

llevó a cabo la determinación de éstas en preparaciones de plastidios aislados. Los resultados se muestran en la Tabla 3.2.

Además de los distintos controles que se tuvieron en cuenta para determinar la integridad de los plastidios aislados, para el análisis de los resultados obtenidos se ha considerado como marcador citosólico, tal y como está descrito en la literatura, la actividad fosfofructoquinasa dependiente de PPI [PFK(PP_i)]. Todas aquellas actividades cuyo porcentaje de recuperación con respecto al extracto total sean inferiores al del marcador citosólico se consideran inexistentes dentro de los plastidios. Por lo tanto, la principal conclusión a partir de estos resultados es que los plastidios de las semillas en desarrollo de girasol carecen de una ruta glucolítica completa que les permitan utilizar cualquier intermediario de ésta en la síntesis de ácidos grasos.

Enzimas	Extracto total	Plastidios	% actividad plastidial
HXK	0,5±0,1	0,01±0	2,0
FK	0,5±0,1	nd	0
PGI	5555,8±380	176,6±15,1	3,2
PFK(PP _i)	2,3±0,3	0,03±0	1,3
PFK(ATP)	1±0,2	0,02±0,01	2,0
ALD	2±0,1	0,04±0,01	2,0
TPI	280,9±93,4	6,9±0,5	2,5
G3P-DH	42±0,5	0,2±0,02	0,5
PGK	8,1±0,7	0,5±0,04	6,2
PGM	24,9±1,7	0,7±0,1	2,8
ENO	7,3±2,1	0,1±0,02	1,4
PK	13,8±3,1	0,3±0,02	2,2

Tabla 3.2. Actividades enzimáticas de la ruta glucolítica en preparaciones de plastidios aislados de la línea CAS-6 obtenidos a partir de semillas en desarrollo de 17 DDF. La actividad se expresa en nmol/min/mg proteína. Los datos presentados son medias de 3 experimentos con la desviación estándar que se muestra. HXK, hexoquinasa; FK, fructoquinasa; PGI, fosfoglucosa isomerasa; PFK(PP_i), fosfofructoquinasa dependiente de PPI; PFK(ATP), fosfofructoquinasa dependiente de ATP; ALD, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; TPI, triosafosfato isomerasa; G3P-DH, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; PGK, fosfoglicerato quinasa; PGM, fosfoglicerato mutasa; ENO, enolasa; PK, piruvato quinasa.

Al igual que en otras especies vegetales (Emes y Tobin, 1993) y a diferencia de lo que ocurre en los embriones de colza (Eastmond y Rawsthorne, 2000), los plastidios de las semillas en desarrollo de girasol carecen de una ruta glucolítica completa, no encontrándose presente ni la actividad fructoquinasa ni la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, ya que en el primero de los casos no se detectó la presencia de actividad alguna en los plastidios y en el siguiente el porcentaje de recuperación fue inferior al del marcador citosólico. Por lo que parece evidente que las rutas citosólica y

plastidial no operan de forma aislada sino que lo hacen intercambiando metabolitos de un compartimento a otro, que serán necesarios para la biosíntesis intraplastidial de ácidos grasos (Pleite y col., 2005), siendo identificados hasta la fecha determinados transportadores localizados en la membrana plastidial, que se encargan del transporte específico de metabolitos intermediarios de la ruta glucolítica entre los plastidios y el citosol (Tobin y Bowsher, 2005).

1.4. Evolución de las actividades durante la fase de síntesis de productos de reserva.

Se ha estudiado la evolución de las diferentes actividades glucolíticas en extracto crudo durante el desarrollo de las semillas, pudiéndose agrupar las enzimas en distintos grupos dependiendo de sus perfiles de actividad en función del tiempo, ya que existen tanto enzimas cuyas actividades aumentan, otras que disminuyen y otras que no presentan cambios significativos que permitan observar un determinado perfil durante el periodo de llenado de la semilla. Dentro del primer grupo se encuentran las actividades invertasa neutra, hexoquinasa, fosfoglucosa isomerasa y fosfoglicerato mutasa (Figura 3.2), en todos los casos aparece un máximo de actividad entre los 10 y los 12 días después de floración, seguido de un descenso que en los tres primeros casos se hace más patente a partir del día 18, mientras que en la fosfoglicerato mutasa aparece en el día 16.

Las actividades que aumentan durante el tiempo (Figura 3.3), gliceraldehido-3-P deshidrogenada, fosfoglicerato quinasa y enolasa, presentan un perfil común que se caracteriza por alcanzar un máximo entorno al día 18 que se mantiene sin muchas variaciones salvo en el caso de la enolasa, en el cual aparece un descenso no muy significativo a partir del día 24.

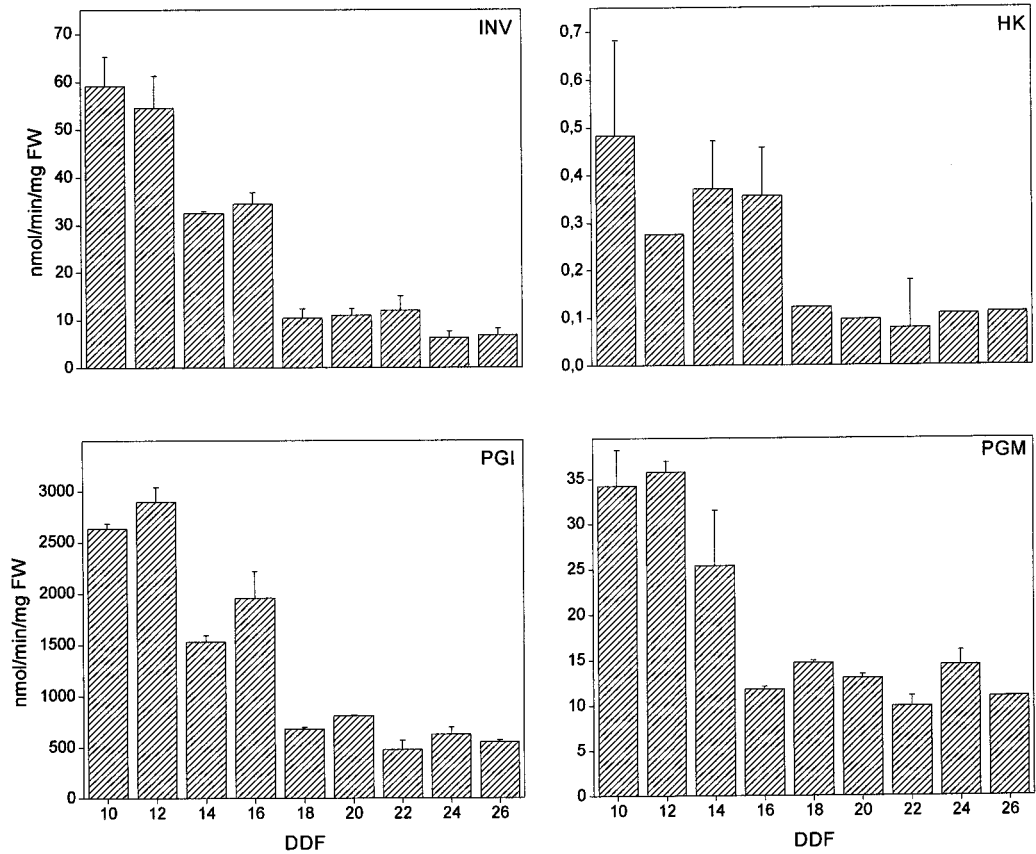


Figura 3.2. Actividades glucolíticas que disminuyen durante el periodo de llenado de las semillas. Invertasa neutra (IN), hexoquinasa (HK), fosfoglucoasa isomerasa (PGI) y fosfolicerato mutasa (PGM). En las gráficas se representa la actividad enzimática expresada como nmol/min/mg proteínas frente a los días después de floración (DDF).

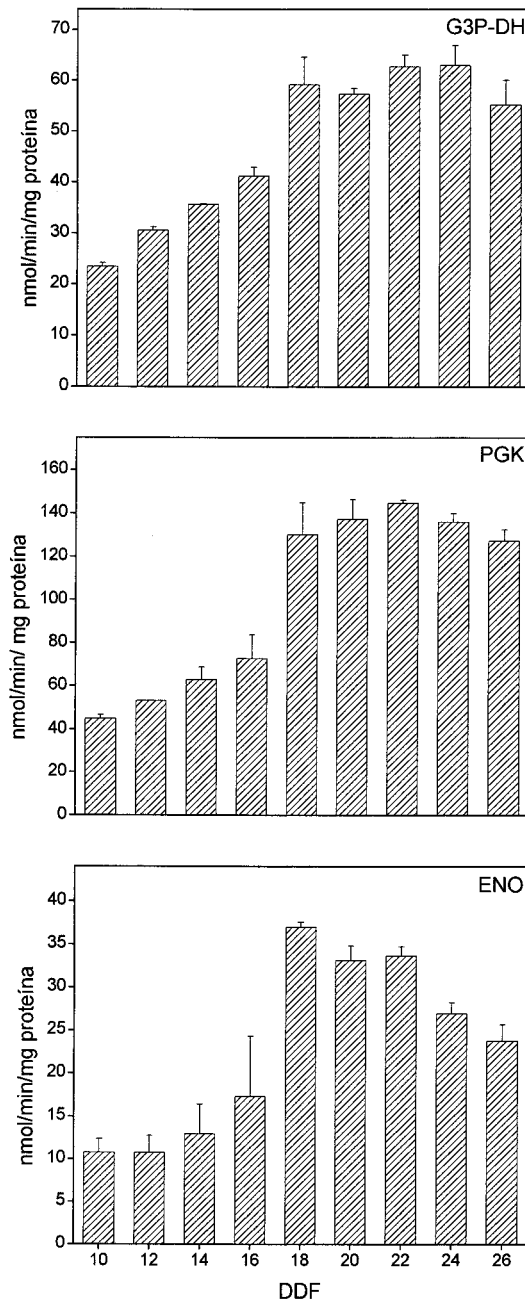


Figura 3.3. Actividades glucolíticas que aumentan durante el periodo de llenado de las semillas. Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa (G3PDH), fosfoglicerato quinasa (PGK), enolasa (ENO). En las gráficas se representa la actividad enzimática expresada como nmol/min/mg proteínas frente a los días después de floración (DDF).

El resto de enzimas de la ruta no presentan variaciones tan marcadas como en los casos anteriores, incluso en los caso de las actividades fosfofructoquinasa dependiente de PPi y triosafosfato isomerasa (Figura 3.4), prácticamente la actividad no varía durante el desarrollo ya que alcanzan valores cercanos al máximo de actividad durante todo el periodo de llenado, aunque en el primero de los casos a partir del día 16 se produce un leve descenso de la actividad.

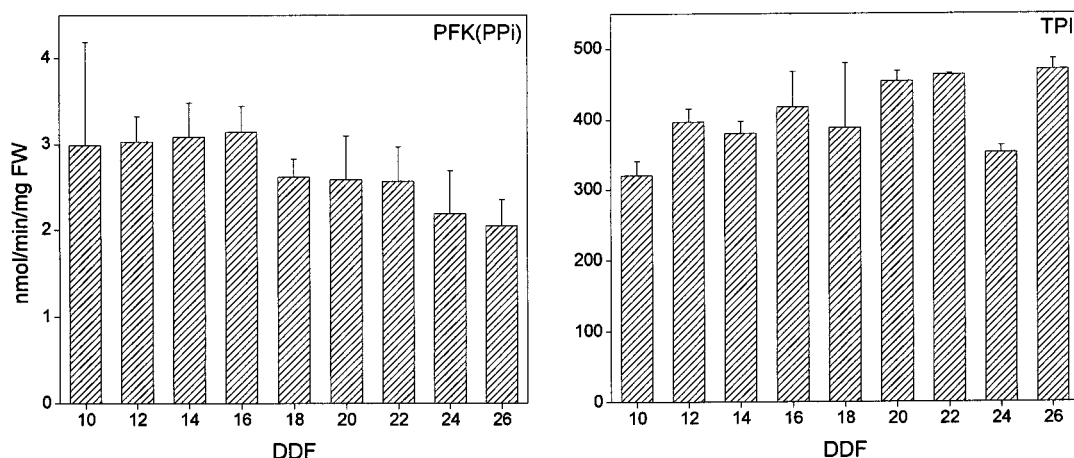


Figura 3.4. Actividades glucolíticas que no varían significativamente durante el periodo de llenado de las semillas. Fosfofructoquinasa dependiente de PPi (PFK(PPi)) y triosafosfato isomerasa (TPI). En las gráficas se representa la actividad enzimática expresada como nmol/min/mg proteínas frente a los días después de floración (DDF).

Las actividades restantes, fructoquinasa, fosfofructoquinasa dependiente de ATP, aldolasa y piruvato quinasa (Figura 3.5), no presentan un perfil claro durante el desarrollo. La actividad fructoquinasa es máxima de los días 16 al 20, volviendo a alcanzar valores similares a los iniciales a partir del días 22, por lo que los máximos se encuentran en la zona media del periodo de llenado. La fosfofructoquinasa dependiente de ATP, presenta un mínimo durante el día 14 aunque posteriormente vuelve a aumentar hasta el día 18 donde prácticamente se mantendrá constante hasta el día 26. Esta actividad es en todo momento inferior a la fosfofructoquinasa dependiente de PPi, que además presenta una mayor eficiencia catalítica (Tabla 3.1), que compite con ella a nivel citosólico por el sustrato, aunque a medida que se desarrolla la semilla esta diferencia se reduce. Las dos restantes actividades, aldolasa y piruvato quinasa, no presentan una tendencia clara aunque en el primer caso parece que la actividad siguiera un patrón ascendente con un máximo durante el día 16.

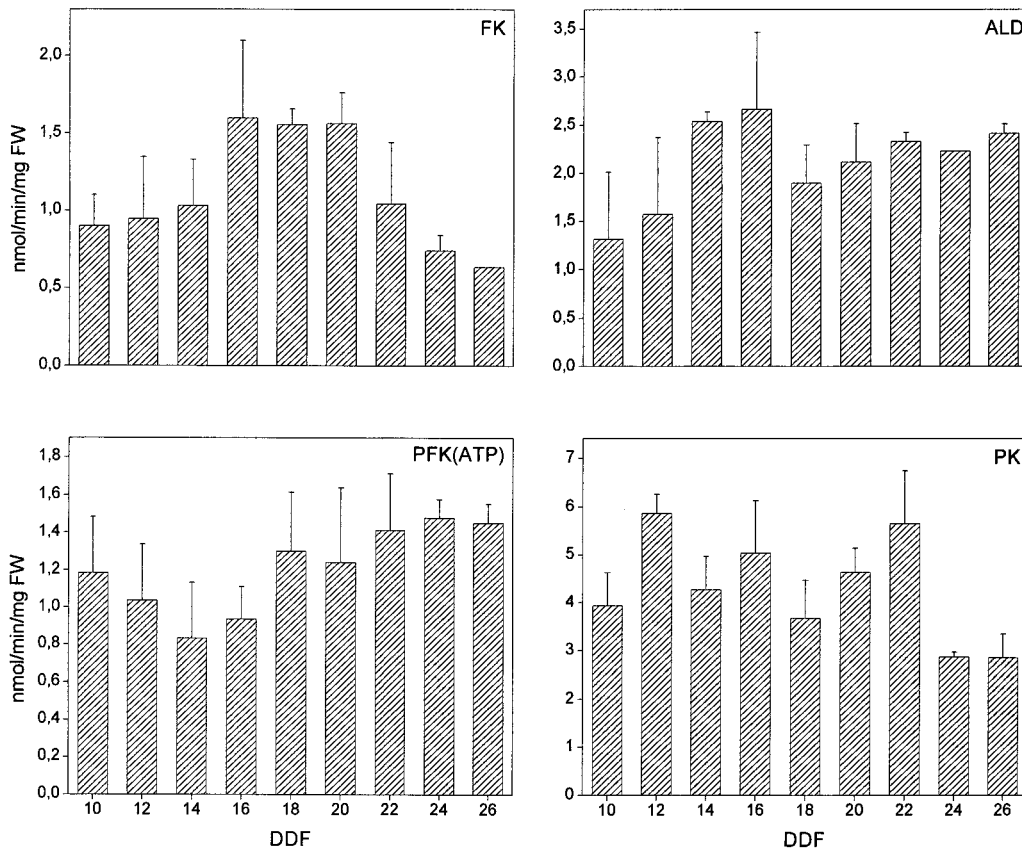


Figura 3.5. Actividades glucolíticas que no presentan un perfil definido durante el periodo de llenado de las semillas. Fructoquinasa (FK), aldolasa (ALD), fosfofructoquinasa dependiente de ATP (PFK) y piruvato quinasa (PK). En las gráficas se representa la actividad enzimática expresada como nmol/min/mg proteínas frente a los días después de floración (DDF).

Comparando los niveles de actividad de las enzimas de la ruta glucolítica con la cinética de biosíntesis de ácidos grasos en las semillas en desarrollo de girasol (Figura 3.6), se puede observar como alguna de estas actividades correspondientes fundamentalmente a la parte inicial de la ruta presentan máximos de actividad durante el periodo inicial del desarrollo de las semillas, coincidiendo con los niveles más altos de sacarosa, glucosa y fructosa y a medida que descienden las hexosas también lo hacen las actividades invertasa neutra, hexoquinasa y fosfoglucosa isomerasa, siendo más difícil de establecer una relación entre el nivel de sacarosa y la actividad invertasa, ya que en las semillas existen diferentes enzimas capaces de hidrolizar el disacárido, aunque una de ellas, la sacarosa sintasa, presenta un nivel de actividad muy inferior a la actividad invertasa neutra descrita, por lo que parece que es más crítico el papel de esta última en la hidrólisis de la sacarosa. Tanto la hexoquinasa como la fosfoglucosa isomerasa participan de forma activa en el metabolismo de la glucosa-6-fosfato, siendo este metabolito precursor de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, que suministra parte

del poder reductor intraplastidial necesario para la síntesis *de novo* de las moléculas de ácido graso.

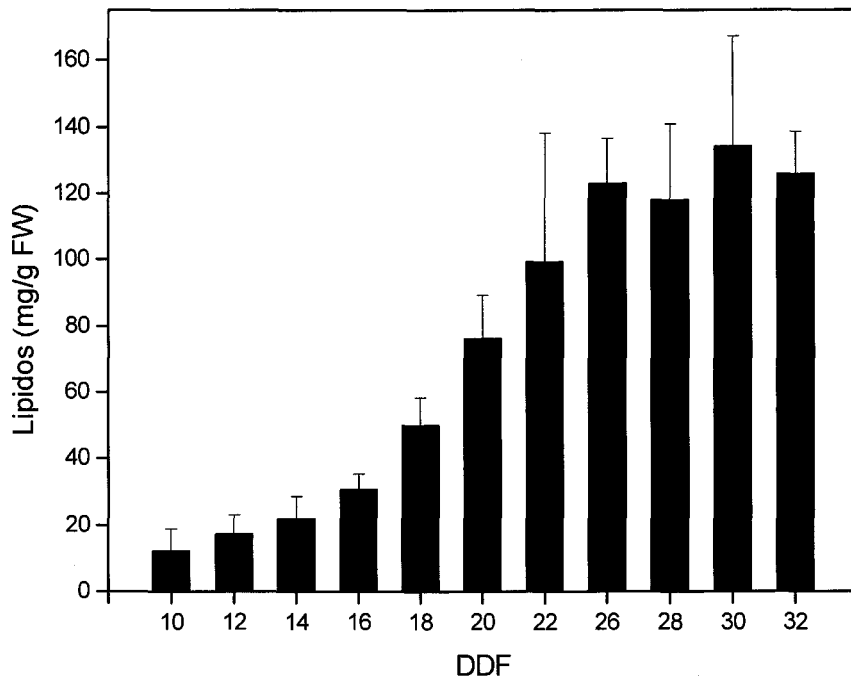


Figura 3.6. Cinética de síntesis de lípidos en las semillas en desarrollo de girasol de la línea CAS-6.

A diferencia de lo que ocurre con la evolución durante el desarrollo de las actividades anteriormente comentadas, otras localizadas en la parte media e inferior de la ruta como son la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa y la enolasa, presentan un perfil contrario, ya que tienen sus mínimos de actividad al inicio de la fase de acumulación lipídica y aumentan conforme avanza el desarrollo de la semilla y la biosíntesis intraplastidial de ácidos grasos, de tal forma que parece que estas últimas podrían presentar mayor influencia en el proceso de acumulación de productos de reserva en las semillas en desarrollo de girasol.

La gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada y la fosfoglicerato quinasa aportan poder reductor y energían en forma de ATP respectivamente, por lo que a medida que aumentan las demandas intraplastidiales para la síntesis lipídica, ambas encimas aumentan sus niveles de actividad.

En ricino se ha descrito un aumento de la actividad enolasa plastidial paralelo a la fase de acumulación de lípidos (Tobin y Bowsher, 2005), coincidiendo con lo ocurre en la semilla de girasol, aunque en este caso se ha determinado la actividad enolasa total, no diferenciándose entre los dos compartimentos.

El incremento durante el desarrollo de las semillas de estas actividades, junto con el mantenimiento de la actividad triosafosfato isomerasa a niveles máximos, podría servir para suplir las demandas de triosas-fosfato que requiere la biosíntesis lipídica.

1.5. Comparación entre diferentes líneas de girasol.

Una vez estudiada la evolución de las actividades enzimáticas glucolíticas durante la fase de acumulación de productos de reserva en las semillas en desarrollo de girasol de la línea CAS-6, y localizadas aquellas actividades en las cuales sus máximos de actividad coinciden con el periodo activo de síntesis de ácidos grasos, se procedió al estudio comparativo con otras líneas de girasol (Figura 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10) que presentan diferencias en la cinética de acumulación lipídica (Figura 3.11), teniendo además variaciones en la composición de aminoácidos en las semillas maduras (Tabla 3.3).

Comparando las actividades entre las semillas pertenecientes a las diferentes líneas podemos observar como las mayores diferencias se encuentran en las actividades de la línea ZEN-8, existiendo menores diferencias entre CAS-6 y HA-89.

Durante la fase inicial del periodo de síntesis lipídica, entre los días 10 y 12 después de floración, las semillas de la línea ZEN-8 presentan mayor nivel de actividad para las enzimas invertasa neutra, hexoquinasa, fosfoglucosa isomerasa, fosfofructoquinasa dependiente de PPI y piruvato quinasa, presentando también mayor nivel de actividad gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Figura 3.7, 3.8, 3.10) que el resto durante el periodo final de llenado. A diferencia de lo que ocurre con las actividades anteriormente descritas, la actividad fosfoglicerato quinasa (Figura 3.8) presenta un nivel inferior a las otras dos líneas aunque evolucionan de forma paralela, fenómeno que no ocurre en el caso de la enolasa, ya que aunque los niveles de actividad no son muy diferentes, tanto la línea HA-89 como la ZEN-8 alcanzan el máximo con un retardo de varios días con respecto a CAS-6.

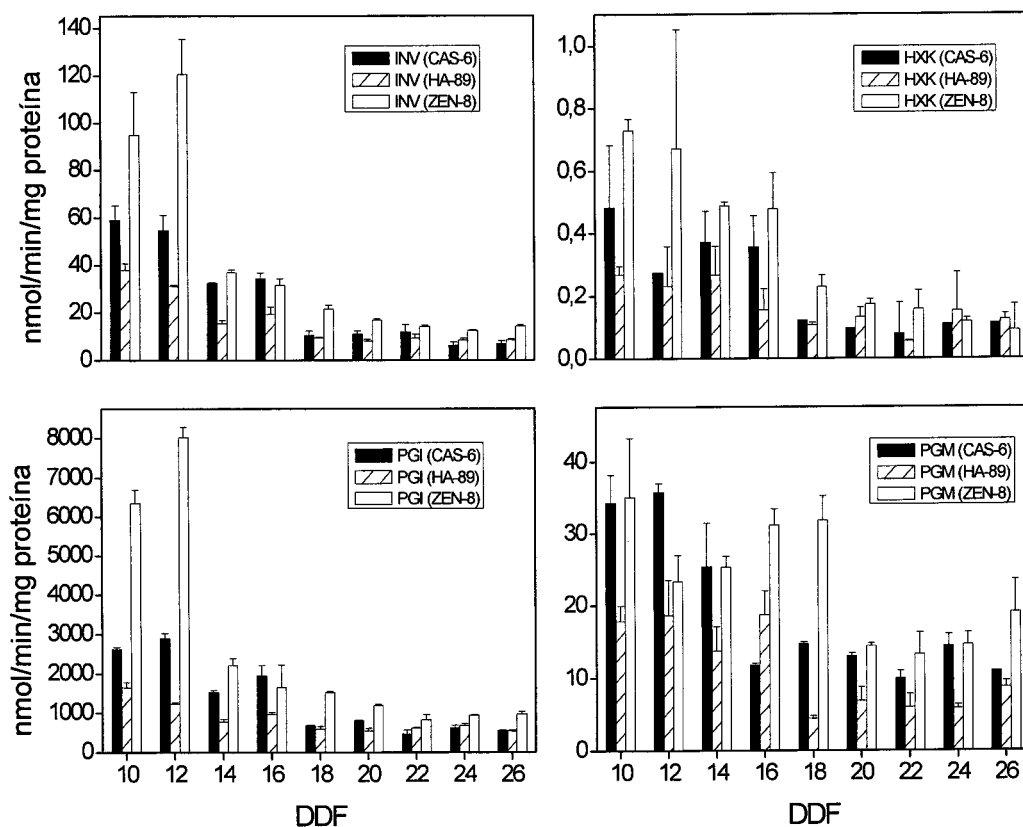


Figura 3.7. Comparación entre aquellas actividades glucolíticas que disminuyen durante el desarrollo de las semillas de CAS-6 y las actividades correspondientes en líneas de girasol con diferente contenido graso. En las gráficas se representa la actividad expresada en nmol/min/mg FW frente a los días después de floración. CAS-6 (■), HA-89 (▨), ZEN-8 (□). INV, invertasa neutra; HK, hexoquinasa; FK, fructoquinasa; PGI, fosfoglucoasa isomerasa; PGM, fosfoglicerato mutasa.

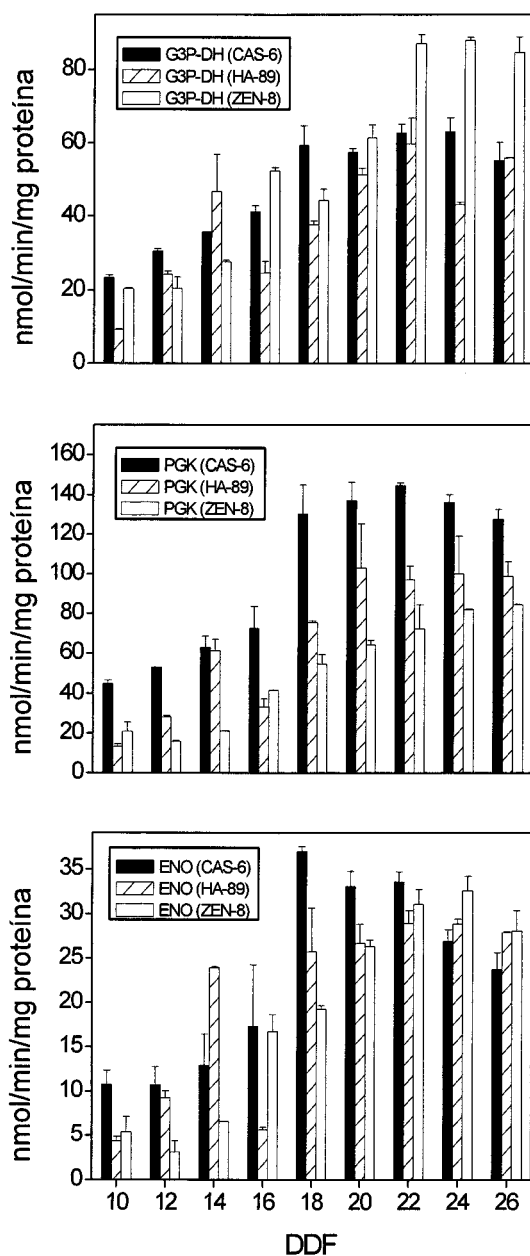


Figura 3.8. Comparación entre aquellas actividades glucolíticas que aumentan durante el desarrollo de las semillas de CAS-6 y las actividades correspondientes en líneas de girasol con diferente contenido graso. En las gráficas se representa la actividad expresada en nmol/min/mg FW frente a los días después de floración. CAS-6 (■), HA-89 (▨), ZEN-8 (□). G3PDH, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; PGK, fosfoglicerato quinasa; ENO, enolasa.

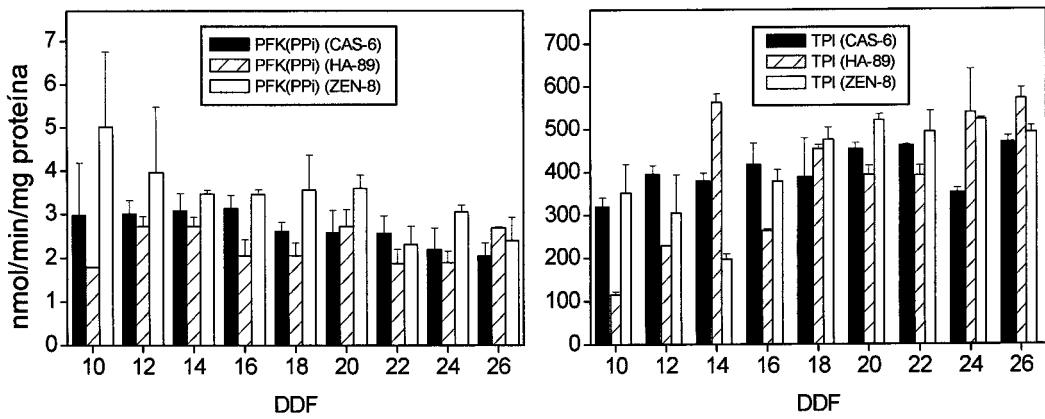


Figura 3.9. Comparación entre aquellas actividades glucolíticas que no se modifican en gran medida durante el desarrollo de las semillas de CAS-6 y las actividades correspondientes en líneas de girasol con diferente contenido graso. En las gráficas se representa la actividad expresada en nmol/min/mg FW frente a los días después de floración. CAS-6 (■), HA-89 (▨), ZEN-8 (□). PFK(PPi), fosfofructoquinasa dependiente de PPi; TPI, triosafosfato isomerasa.

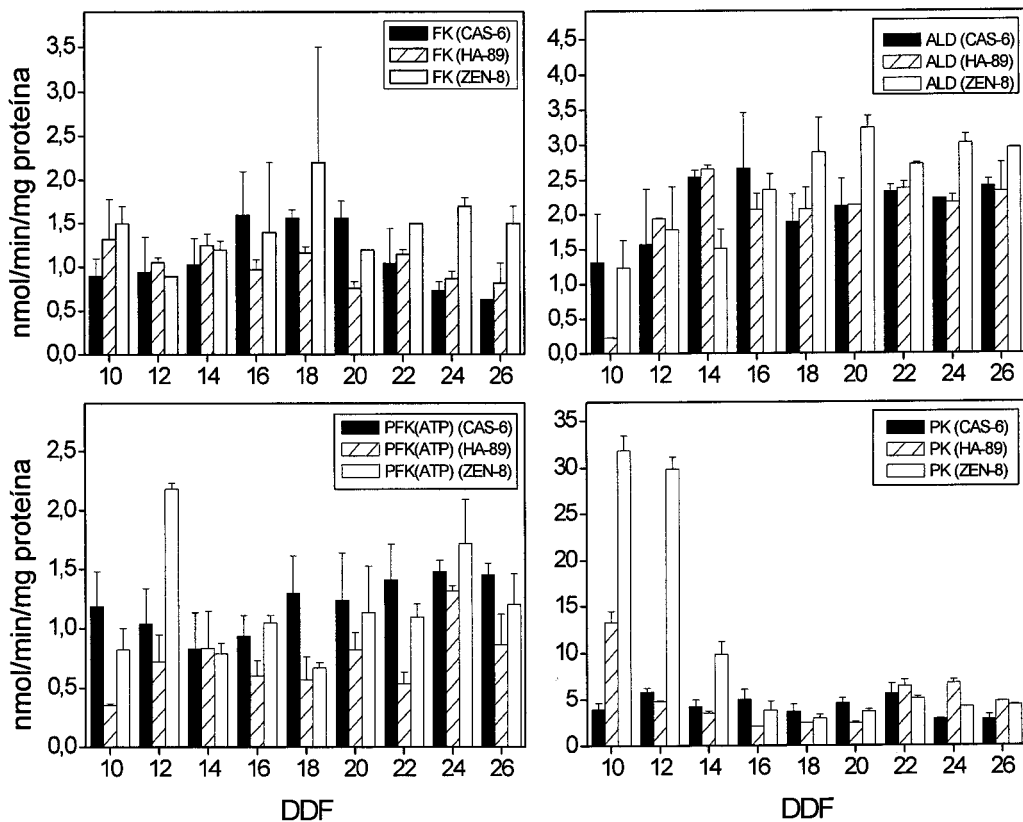


Figura 3.10. Comparación entre aquellas actividades glucolíticas que no presentan un perfil definido durante el desarrollo de las semillas de CAS-6 y las actividades correspondientes en líneas de girasol con diferente contenido graso. En las gráficas se representa la actividad expresada en nmol/min/mg FW frente a los días después de floración. CAS-6 (■), HA-89 (▨), ZEN-8 (□). FK, fructoquinasa; PFK (ATP), fosfofructoquinasa dependiente de ATP; ALD, aldolasa; PK, piruvato quinasa.

Las principales diferencias entre las líneas CAS-6 y HA-89 frente a ZEN-8 se localizan en la etapas inicial del periodo de acumulación de productos de reserva, coincidiendo esto con la menor acumulación lipídica que presenta ZEN-8 durante los días 10, 12 y 14 después de floración con respecto a las otras dos líneas (Figura 3.11).

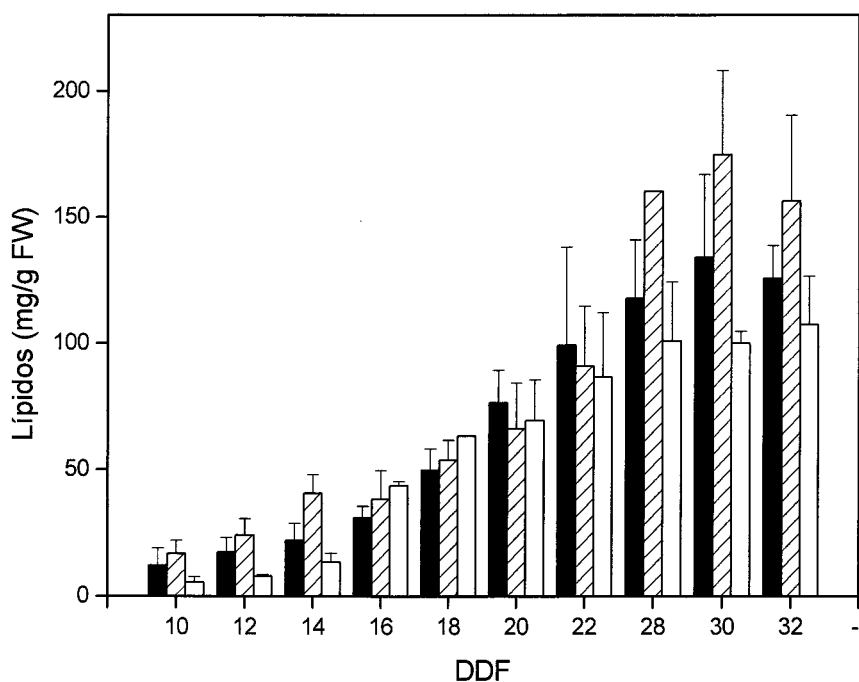


Figura 3.11. Diferencias en la cinética de síntesis de lípidos en las distintas líneas de girasol estudiadas. CAS-6 (■), HA-89 (▨), ZEN-8 (□).

Las diferencias encontradas entre los niveles de acumulación de ácidos grasos disminuyen durante el periodo medio, volviéndose a incrementar a partir del día 28, siendo las semillas de la línea HA-89 las que presentan un mayor contenido en lípidos, junto que una mayor proporción de aminoácidos en semilla madura, salvo para la prolina que es mayor en CAS-6, siendo ZEN-8 la que menor contenido en aminoácidos presenta (Tabla 3.3).

Aminoácidos	CAS-6	HA-89	ZEN-8
Aspártico	27,0	31,8	24,2
Glutámico	59,8	64,2	52,1
Serina	12,9	14,3	11,0
Histidina	6,4	6,8	5,4
Glicina	16,3	17,7	14,3
Treonina	9,8	10,5	8,5
Arginina	25,0	25,8	20,1
Alanina	11,1	12,8	9,7
Prolina	12,7	6,4	4,0
Tirosina	4,5	5,2	3,8
Valina	10,2	11,2	9,4
Metionina	0,5	0,9	0,7
Cisteína	3,2	4,0	3,0
Isoleucina	7,7	8,6	7,1
Triptófano	-	-	-
Leucina	16,3	18,2	13,9
Fenilalanina	11,5	13,1	9,7
Lisina	8,3	9,5	7,9

Tabla 3.3. Composición en aminoácidos expresada en mg/g FW de las semillas maduras de las diferentes líneas de girasol estudiadas.

Debido a que las diferencias encontradas entre las líneas CAS-6 y HA-89 son menores que las descritas entre éstas y ZEN-8 y que el contenido lipídico de HA-89 es el mayor de los tres, parece difícil encontrar una relación entre los diferentes niveles de actividad glucolítica y el mayor contenido lipídico de las semillas pertenecientes a HA-89, aunque sí parece existir esta relación entre los mayores niveles iniciales en las semillas ZEN-8 y el menor contenido lipídico durante la fase inicial de acumulación de productos de reserva, indicando que las semillas pertenecientes a la líneas ZEN-8 se encuentran posiblemente en un estadio metabólico diferente a las otras, presentando un retardo fisiológico con respecto a las semillas de CAS-6 y ZEN-8, aunque cuando se han comparado los niveles de carbohidratos solubles, sólo se aprecian diferencias en los niveles de sacarosa, no encontrándose variaciones en las cantidades de hexosas (Tabla 3.4).

DDF	CAS-6	ZEN-8	CAS-6	ZEN-8	CAS-6	ZEN-8
	Glucosa ($\mu\text{mol/g}$ semilla)		Fructosa ($\mu\text{mol/g}$ semilla)		Sacarosa ($\mu\text{mol/g}$ semilla)	
10	46,12 \pm 7,04	47,53 \pm 12,42	31,67 \pm 2,64	31,08 \pm 6,11	79,79 \pm 14,80	65,36 \pm 14,56
15	31,85 \pm 6,16	25,75 \pm 10,19	20,57 \pm 2,52	19,90 \pm 7,77	74,23 \pm 14,37	53,84 \pm 10,38
20	14,49 \pm 3,63	11,79 \pm 2,29	14,60 \pm 3,02	12,16 \pm 3,10	67,14 \pm 11,03	41,53 \pm 4,38
25	5,65 \pm 0,81	5,60 \pm 2,02	7,54 \pm 1,29	8,09 \pm 1,45	60,51 \pm 21,41	36,08 \pm 2,56
28	6,07 \pm 1,34	2,13 \pm 0,34	6,64 \pm 1,71	2,95 \pm 0,52	35,88 \pm 5,04	29,02 \pm 1,86
30	3,59 \pm 0,77	1,67 \pm 0,23	5,24 \pm 1,65	3,01 \pm 0,51	29,12 \pm 4,04	22,09 \pm 1,98

Tabla 3.4. Comparación entre los niveles de carbohidratos solubles en las semillas en desarrollo de las líneas CAS-6 y ZEN-8.

2. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE EXTRACTOS DE SEMILLAS.

Con el fin de estudiar las posibles diferencias que pudieran existir entre las líneas de girasol CAS-6 y ZEN-8 a nivel del metabolismo de los carbohidratos durante el periodo de llenado de las semillas, se inició una aproximación al estudio metabólico mediante la Resonancia Magnética Nuclear de protones.

Los espectros de ^1H -RMN (Materiales y Métodos, apartado 2.2.2.2) obtenidos a partir de los extractos perclóricos de las semillas en desarrollo pertenecientes a las líneas CAS-6 y ZEN-8 fueron procesados y estudiados a través del Análisis de Componentes Principales (ACP). (Materiales y Métodos, apartados 2.2.2.1 y 2.2.2.3 respectivamente).

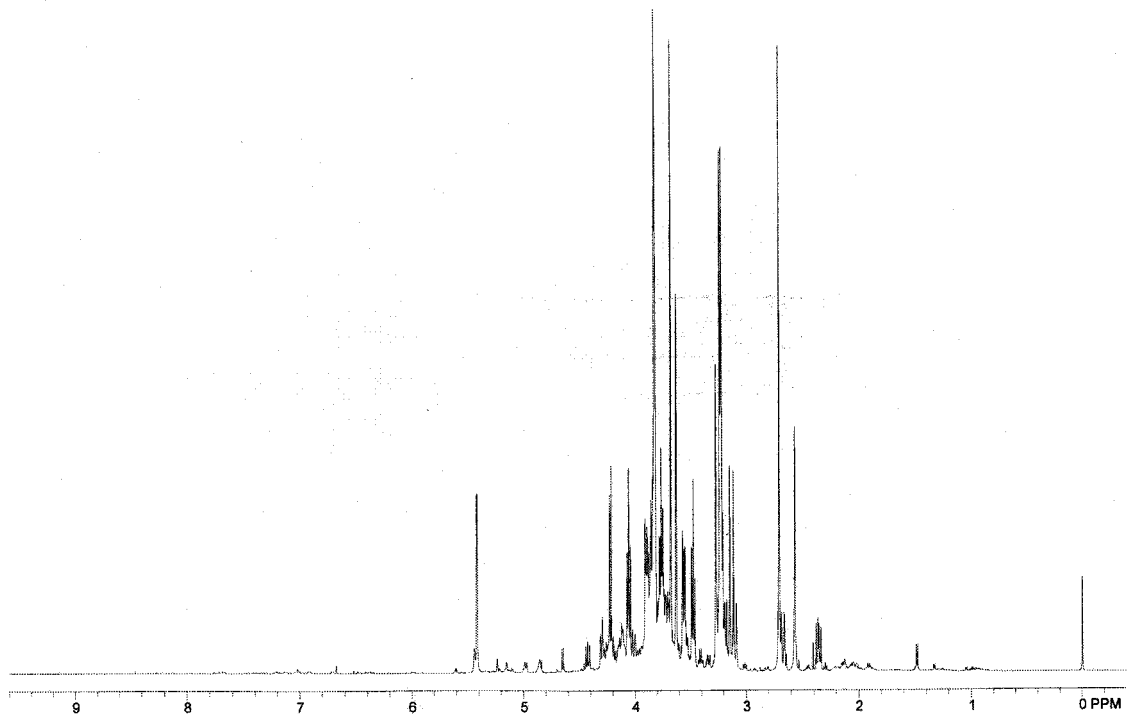


Figura 3.12. Espectro de ^1H -RMN de un extracto perclórico de semillas de 21 días después de floración perteneciente a la línea ZEN-8.

En la Figura 3.12 se muestra uno de los muchos espectros obtenidos a partir de las muestras. Los espectros fueron utilizados completos desde -0,40 hasta 9,00 ppm, excluyéndose la región 4,80-4,90 correspondiente al pico del agua, además también se eliminaron todas aquellas regiones cuyas intensidades fueron no sustancialmente superiores a las del ruido de fondo, normalizándose posteriormente los valores de intensidad con respecto a la suma total de intensidades de los picos restantes. A

continuación se procedió a la comparación estadística de los valores obtenidos de los diferentes espectros mediante el Análisis de los Componentes Principales (ACP).

Cuando se realizó el análisis mediante ACP de los datos totales, la representación de los puntos permitió la discriminación de los diferentes estados del desarrollo de las semillas, aunque no se encontraron diferencias entre los dos genotipos. Estos puntos se correspondieron con los picos relativos al EDTA y al EDTA conjugado Ca-EDTA y Mg-EDTA (3,2391, 3,6379, 3,2401, 3,6391, 2,5676, 3,1729, 3,1458, 3,1122, 3,0851, 3,2004, 3,6391, 2,7064, 3,2632, 3,2404, 3,2196, 3,1915 ppm) (Figura 3.13), de tal forma que los datos sugirieron que ambos cationes aumentaron durante el desarrollo, aunque no se encontraron diferencia entre ambos genotipos.

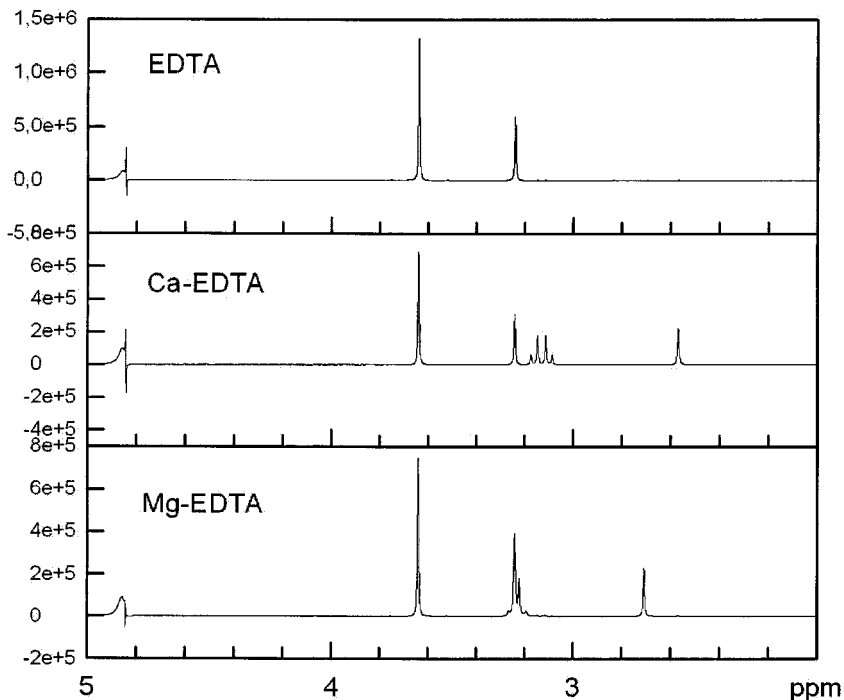


Figura 3.13. Espectros completos obtenidos a partir de los compuestos EDTA, Ca-EDTA y Mg-EDTA. Estos picos se corresponden con aquellos que presentaron mayor influencia en las diferencias encontradas durante el análisis de componentes principales a los espectros realizados a los extractos perclóricos de las semillas en desarrollo de las líneas CAS-6 y ZEN-8.

Para estudiar potenciales diferencias en la composición de metabolitos durante el desarrollo de las semillas, se eliminaron las regiones del espectro correspondientes a los picos provenientes de las señales del EDTA y sus conjugados principales (Ca-EDTA y Mg-EDTA). El análisis de componentes principales tras la eliminación de las regiones anteriores permitió la identificación de las regiones características de la sacarosa y glucosa (Figura 3.14) como aquellos dos factores que explicaron la mayoría de las

diferencias entre las muestras (sacarosa, 5,42; glucosa, 5,24 y 4,56). Al igual que en el caso anterior la representación de los puntos indicó que estos dos factores discriminan entre diferentes etapas del desarrollo pero no permite encontrar diferencias entre los dos genotipos.

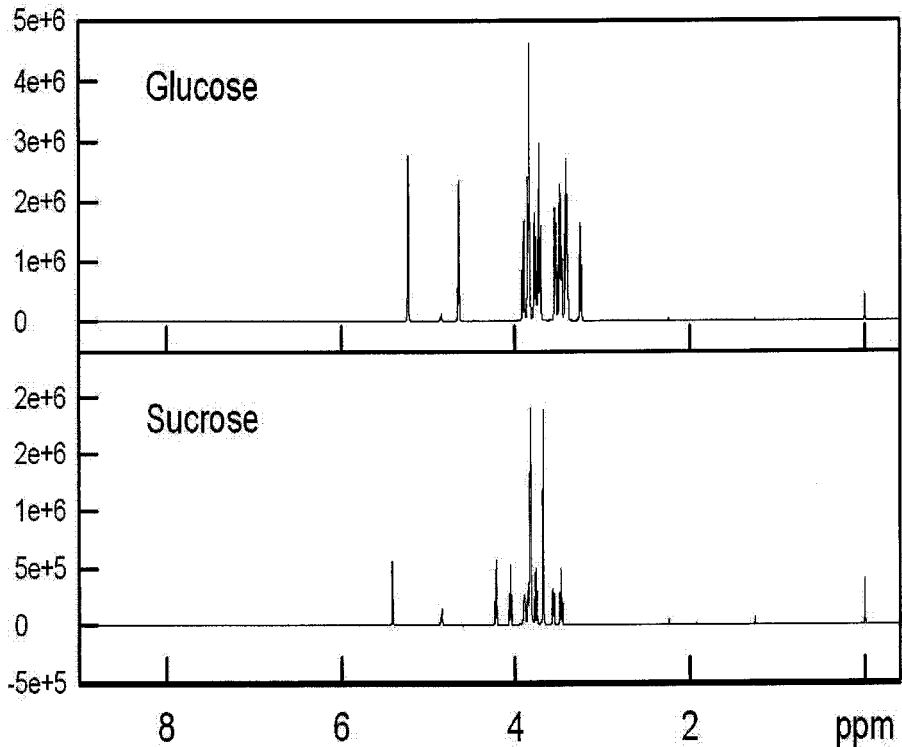


Figura 3.14. Espectros completos obtenidos a partir de los compuestos glucosa y sacarosa. Estos picos se corresponden con aquellos que presentaron mayor influencia en las diferencias encontradas durante el análisis de componentes principales a partir de los datos obtenidos de los espectros una vez eliminadas las regiones correspondientes al EDTA y sus conjugados.

Estos cambios en los niveles tanto de sacarosa como de glucosa fueron confirmados mediante la determinación espectrofotométrica (Materiales y Métodos, apartado 2.2.1.10) de las concentraciones de ambas durante el desarrollo de las semillas (Resultados y Discusión, Figura 3.1.)

3. CLONACIÓN, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE VARIOS GENES DE LA RUTA GLUCOLÍTICA EN SEMILLAS EN DESARROLLO.

3.1. Aislamiento, caracterización y niveles de expresión de un cDNA codificante de una invertasa de pared celular putativa.

3.1.1. Amplificación de un fragmento del cDNA *Hacwinv1*.

A partir de las secuencias de invertasas de pared celular disponibles en las bases de datos públicas, se realizó un alineamiento para la identificación de regiones homólogas usando el programa ClustalX v 1.8 (Thompson y col. 1997), diseñándose a continuación un oligonucleótido degenerado a partir de zonas altamente conservadas (Figura 3.15). Usando este oligonucleótido denominado dINV (Materiales y Métodos, Tabla 2.2) y el oligonucleótido externo FA2Z (Materiales y Métodos, Tabla 2.4), que es complementario de una secuencia incorporada durante la síntesis inicial del cDNA (Materiales y Métodos, apartado 2.2.3.2), se amplificó mediante PCR (Materiales y Métodos, apartado 2.2.3.5) a partir de cDNA de semillas de 15 días después de floración pertenecientes a la línea CAS-6 de girasol un fragmento de 1176 pb que incluía el extremo 3'. Este fragmento fue clonado en el plásmido pGEM-T-Easy® (Promega) (Materiales y Métodos, apartado 2.2.3.9.3) y varios clones fueron secuenciados en ambos sentidos por GATC GmbH (Konstanz, Germany). El análisis mediante el programa Blast (Altschul y col. 1990) de la secuencia amplificada presentó una alta homología con las secuencias de las enzimas β -fructosidasas de plantas, incluidas las invertasas de pared celular.

	dINV																		
BvCWINV	--VK	W	E	C	P	D	F	F	Y	P	V	S	I	N	G	K	D	--	
GmCWINV	--LG	S	G	M	W	E	C	P	D	F	F	F	V	L	N	N	D	Q	L
VfCWINV	--KG	T	G	M	W	E	C	P	D	F	F	F	V	L	K	N	G	I	K
AtCWINV	--DG	S	G	M	W	E	C	P	D	F	F	F	V	T	R	F	G	S	N
LeCWINV	--QG	T	G	N	W	E	C	P	D	F	F	F	V	S	L	K	N	E	--
DcCWINV	--AN	T	G	M	W	E	C	P	D	F	F	F	V	S	L	K	G	L	--
CpCWINV	--PD	T	G	M	W	E	C	P	D	F	F	F	V	P	K	S	G	E	--
MaCWINV	--KD	T	G	M	W	E	C	P	D	F	F	F	V	A	V	K	G	R	--

Figura 3.15. Alineamiento parcial de secuencias aminoacídicas de invertasas de pared celular de plantas mediante el programa ClustalX v1.8. Bv, *Beta vulgaris* (CAD19323); Gm, *Glycine max* (CAD91338); Vf, *Vicia faba* (AAT09980); At, *Arabidopsis thaliana* (BAD44438); Le, *Lycopersicon esculentum* (AAM28823); Dc, *Daucus carota* (CAA49162); Cp, *Carica papaya* (AAL16015); Ma, *Musa acuminata* (AAO21213). La línea discontinua delimita la zona conservada utilizada para el diseño de los cebadores.

3.1.2. Obtención de la secuencia completa del cDNA *Hacwinv1*.

El extremo 5' fue obtenido utilizando el kit comercial Smart™- RACE cDNA amplification kit (Clontech) y los oligonucleótidos internos INVR1 y INVR2 (Materiales y Métodos, Tabla 2.4). Los fragmentos de PCR fueron clonados, secuenciados y ensamblados obteniéndose una secuencia completa de cDNA de 1797 pb presentando una secuencia de aminoácidos deducida a partir de la pauta abierta de lectura de 561 aminoácidos. Esta secuencia ha sido depositada en GenBank con el número de acceso AAY85659 [gi: 68137461]

3.1.3. Características de la secuencia polipeptídica deducida del cDNA *Hacwinv1*.

La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la pauta abierta de lectura del cDNA *Hacwinv1* presenta una serie de características que se resumen en la Tabla 3.5

Tamaño	560 aa
Peso molecular	62,90 KDa
Punto isoeléctrico	6,33
Solubilidad	81 % insoluble
Hidrofobicidad	41,6 %
Hidrofilicidad	37,1 %
Básico	11,1 %
Ácido	10,2 %

Tabla 3.5. Propiedades fisicoquímicas de la secuencia polipeptídica derivada del cDNA *Hacwinv1*.

La secuencia aminoacídica derivada del cDNA denominado *Hacwinv1* (Figura 3.16) se caracteriza por la presencia de los motivos β -fructosidasa (NDPNG/A) y por el sitio catalítico de cisteína (WECV), que permite diferenciar las invertasas ácidas de pared celular, que poseen una prolina, de las vacuolares que tienen una valina. Las invertasas ácidas son traducidas como pre-proteínas, conteniendo un péptido señal y un prepéptido N-terminal, pudiéndose diferenciar las vacuolares ya que presentan un prepéptido mayor (Tymowska-Lalanne y Kreis, 1998), además estas últimas tienen en su secuencia una extensión corta hidrofóbica C-terminal que las de pared no presentan (Unger y col., 1994).

Además de la relación existente entre las invertasa ácidas vacuolares y las de pared celular, estas últimas presentan un alto grado de homología con las enzimas relacionadas con el metabolismo del fructan, llegando a ser imposible actualmente predecir basándose únicamente en las secuencia de aminoácidos si pertenecen a un grupo u otro, agrupándose ambos tipos de cDNA en el grupo denominado “cell-wall type invertase-like cDNAs” (De Coninck y col., 2005).

Otra característica diferencial entre las invertasas y las enzimas del metabolismo del fructan reside en el punto isoeléctrico (pI) que presentan, ya que normalmente tanto las invertasas vacuolares como las enzimas fructan exohidrolasas presentan un pI inferior a las invertasas de pared celular, debido a que esta característica les facilita la interacción con los componentes ácidos de la pared celular (De Coninck y col., 2005). Sin embargo también se han descrito un pequeño número de invertasas de pared celular que presentan un pI ácido, apoyando la idea de la existencia de un segundo tipo de invertasa de pared que no estaría interaccionando irónicamente con la pared celular (Roitsch y González, 2004).

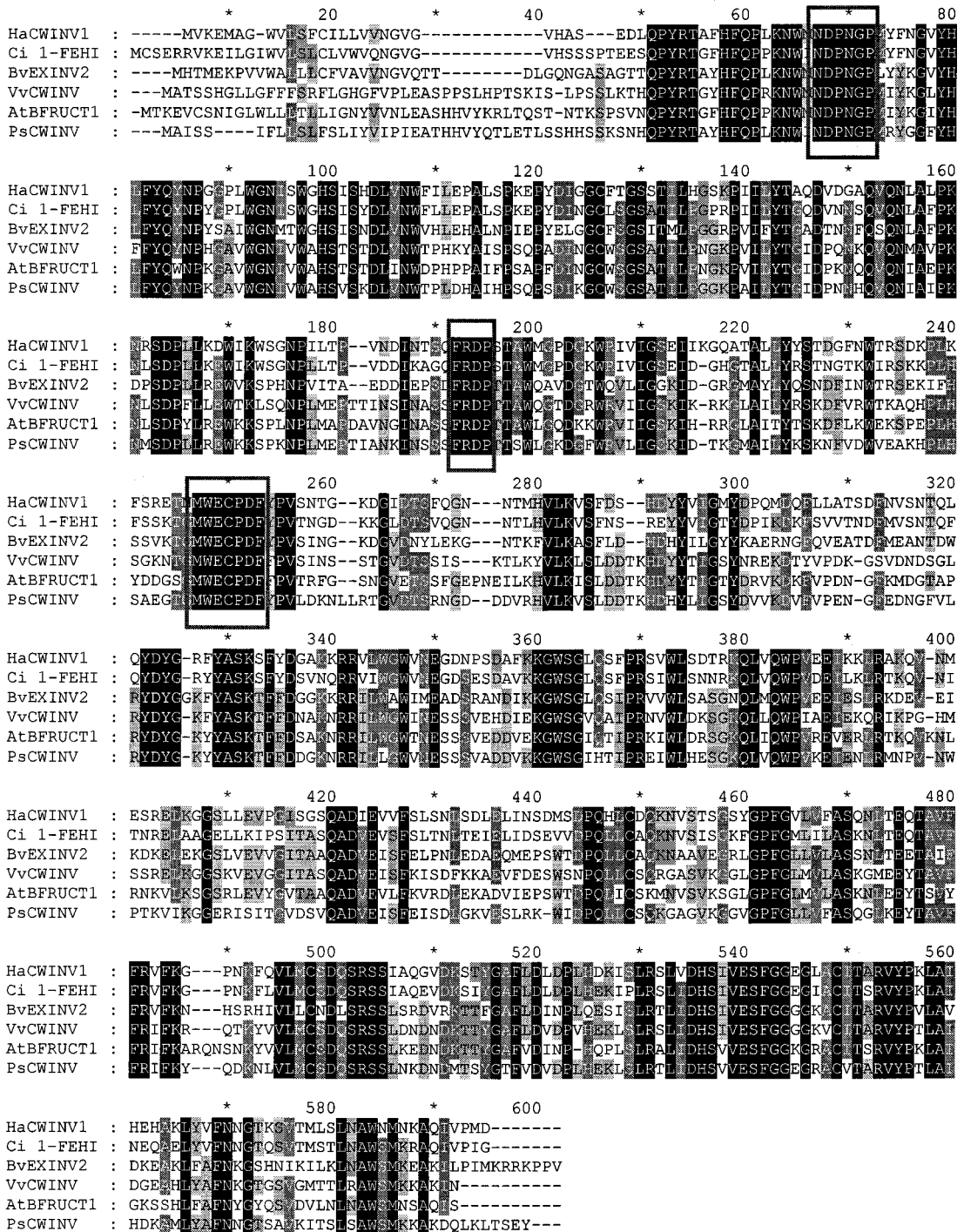


Figura 3.16. Análisis filogenético de secuencias de proteínas que presentan el motivo β -fructosidasa (NDPNG) y el sitio catalítico de cisteína (MWECVP). Ha; *Helianthus annuus* (AAY85659); Ci, *Cichorium intybus* (CAC19366); Bv, *Beta vulgaris* (CAD19323); Vv, *Vitis vinifera* (AAT09980); At, *Arabidopsis thaliana* (NP_566464); Ps, *Pisum sativum* (AAC17166). CWINV, invertasa de pared celular; 1-FEH, fructan 1-exohidrolasa; EX, exocelular; BFRUCT, β -fructosidasa.

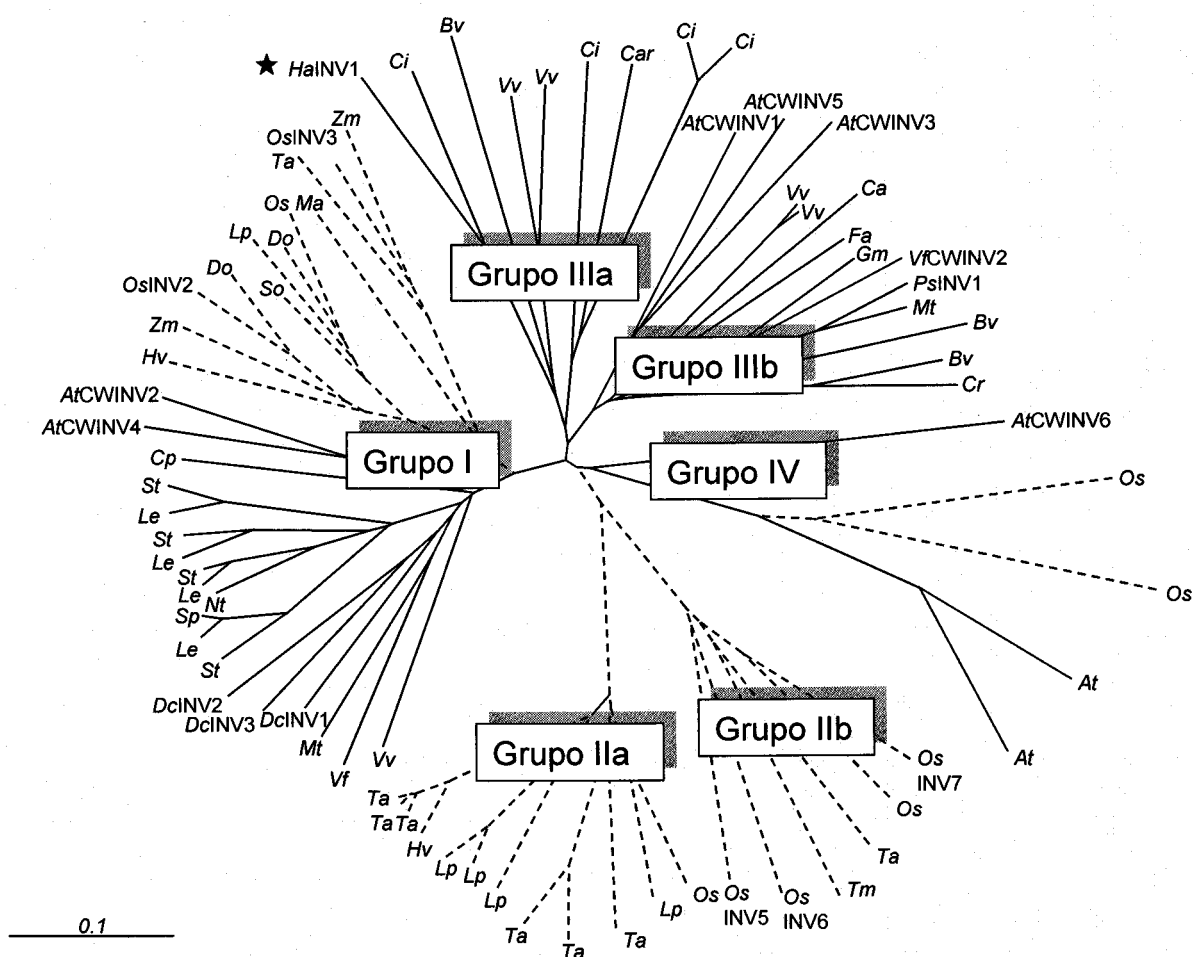
3.1.4. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica derivada de *Hacwinv1*.

Figura 3.17. Árbol filogenético de la familia "cell-wall type invertase-like cDNA". Las abreviaturas de las especies vegetales incluidas en el árbol filogenético y los números de identificación de las secuencias proteicas utilizadas son los siguientes: At, *Arabidopsis thaliana* (CWINV1 18400170; CWINV2 30693668; CWINV3 15231374; CWINV4 18404067; CWINV5 18405222; CWINV6 18416711; 18391368; 18407630); Bv, *Beta vulgaris* (21322514, 21322516, 38488412); Ca, *Coffea anephora* (112383512); Car, *Campanula rapunculoides* (53127612); Ci, *Cichorium intybus* (11967654, 13940209, 13940211, 4127660); Cp, *Carica papaya* (16225878); Cr, *Chenopodium rubrum* (2597853); Dc, *Daucus carota* (INV1 124712; INV2 2500928; INV3 2500929); Do, *Dendrocalamopsis oldhamii* (82470026, 82470028); Fa, *Fragaria x ananassa* (4205115); Gm, *Glycine max* (33636090); Ha, *Helianthus annuus* (68137461); Hv, *Hordeum vulgare* (26986190, 38141533); Le, *Lycopersicon esculentum* (20467113, 20805671, 20805672, 7414362); Lp, *Lolium perenne* (151461786, 152001646, 70780260, 71153893, 71153895); Ma, *Musa accuminata* (27802647); Mt, *Medicago trunculata* (87162708, 87240831); Nt, *Nicotiana tabacum* (551259); Os, *Oryza sativa* (CWINV2, 115458296; CWINV3, 115458294; 115442449, 115443693, 115446509, 115459644, 4105125; INV5, 73920071; INV6, 73920072; INV7, 158513653); Ps, *Pisum sativum* (INV1, 3152880); So, *Saccharum officinarum* (31872120); Sp, *Solanum pennellii* (7414364); St, *Solanum tuberosum* (313129, 397631, 7162115, 7162116); Ta, *Triticum aestivum* (28411218, 30024213, 3342240, 41581373, 66766191, 66766193, 75674196, 83697983); Tm, *Triticum monococcum* (26518370); Vf, *Vicia faba* (CWINV2, 861157; 861155); Vv, *Vitis vinifera* (157339271, 157339272, 157340035, 157346189, 47078691) y Zm, *Zea mays* (4105123, 4105719).

En la Figura 3.17 se muestra un árbol filogenético de las “cell-wall type-like cDNAs” incluyendo la HaCWINV1 de girasol. Dentro del árbol se pueden distinguir varios grupos: el grupo I incluye las secuencias de invertasas de pared celular con alto punto isoeléctrico tanto de dicotiledóneas como de monocotiledóneas. En los grupos IIa y IIb se localizan las secuencias de monocotiledóneas que presentan un bajo pI, mientras que las secuencias tanto de invertasas de pared como de fructan exohidrolasas (enzimas implicadas en el metabolismo de fructan, evolutivamente relacionadas con las invertasas de pared celular) se agrupan en la rama IIIa y IIIb del árbol. El grupo IV está formado por aquellas secuencias asociadas a la secuencia AtCWINV6. Esta última secuencia junto con la AtCWINV3 han sido catalogadas como enzimas fructan exohidrolasas y no como invertasas de pared celular (De Coninck y col., 2005).

3.1.5. Predicción de la estructura terciaria de la proteína HaCWINV1.

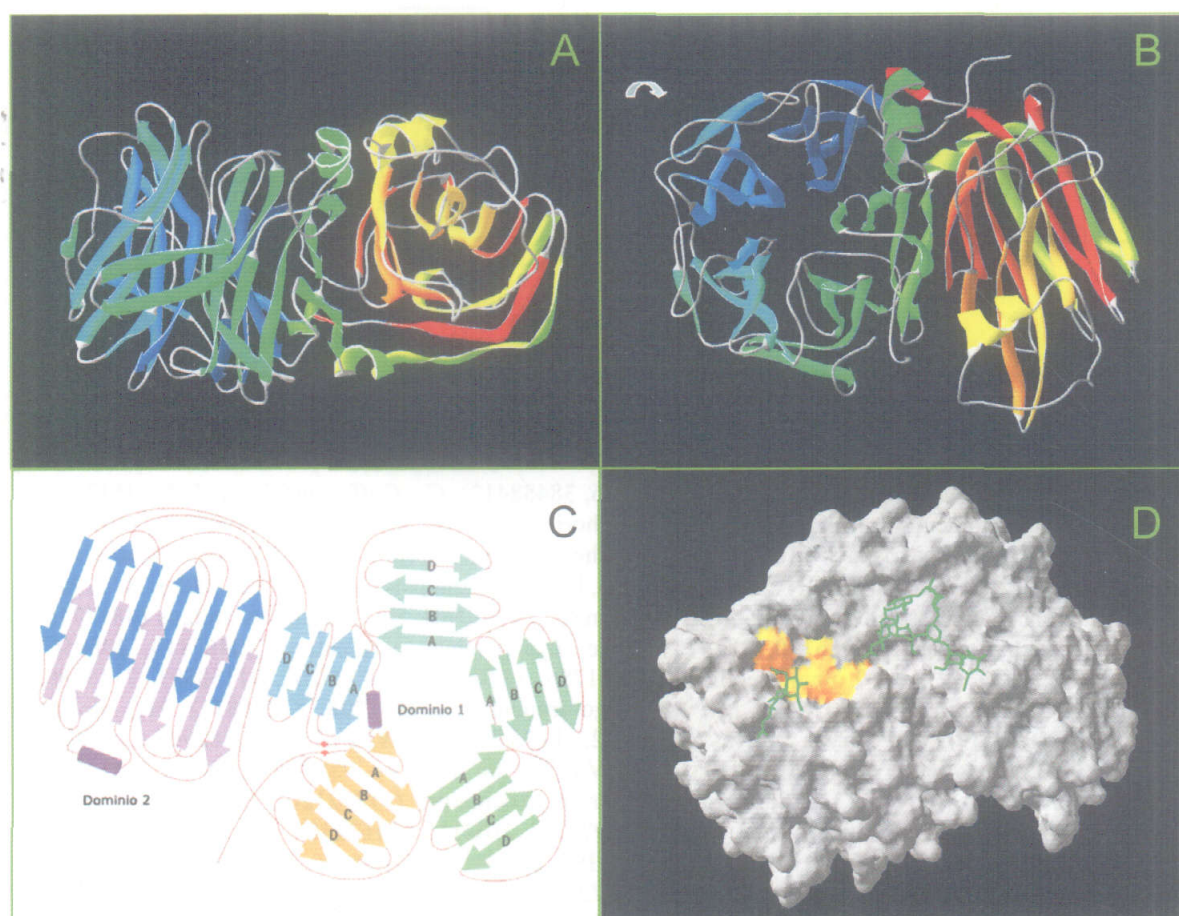


Figura 3.18. Modelo estructural propuesto para *HaCWINV1*. A y B, dos vista diferentes del diagrama de cintas (Ribbon diagrams) de la estructura; C, representación esquemática de los dominios de la proteína; y D, modelo de la superficie molecular de la vista mostrada en B. En naranja se muestran los residuos que forma el sitio activo del enzima (Asn46, Asp47, Trp106, Ser107, Arg170, Asp171, Gly188, Glu226, Cys227, Asp262, Tyr298 y Ala299) y en verde el sustrato de la enzima.

La secuencia de *HaCWINV1* muestra un 54% de identidad con la invertasa de pared celular de *Arabidopsis thaliana AtCWINV1*, invertasa de la cual se conoce su estructura por difracción de rayos X (Verhaest y col., 2006). Este alto grado de identidad junto con la utilización de programas de modelado de proteínas basados en la homología con proteínas de estructuras cristalinas conocidas (Swiss-Model, Schwede *et al.* 2003; 3D-JIGSAW, Bates *et al.* 2001) permitió la obtención del modelo estructural de *HaCWINV1* (Figura 3.18 A, B). Al igual que en otras invertasas, dentro de la estructura, se pueden distinguir dos dominios, el N-terminal, un dominio “ β -propeller” de cinco palas, y el C-terminal, formado por dos hojas de 6 hojas plegadas β (Figura 3.18 C). El sitio activo se localiza en el dominio N-terminal e implica a los siguientes residuos: Asn46, Asp47, Trp106, Ser107, Arg170, Asp171, Gly188, Glu226, Cys227, Asp262, Tyr298 y Ala299 (Figura 3.18 D). Estos residuos forman parte de las secuencias conservadas NDPNG, FRDP y WECPD, tienen un papel crucial en la hidrólisis del enlace glucosídico (Reddy y Maley 1990; Batista *et al.* 1999), y, concretamente, los residuos Asp47 y Glu226 están directamente implicados en la catálisis. La función del dominio C-terminal no se conoce.

3.1.6. Estudio de los niveles de expresión de *Hacwinv1*.

Con el fin de estudiar la expresión del gen *Hacwinv1* en las semillas en desarrollo de girasol y en otros tejidos de la planta se optó por la PCR cuantitativa absoluta que permite determinar el número de moléculas de mRNA en las muestras estudiadas (Materiales y Métodos, apartado 2.2.3.10.).

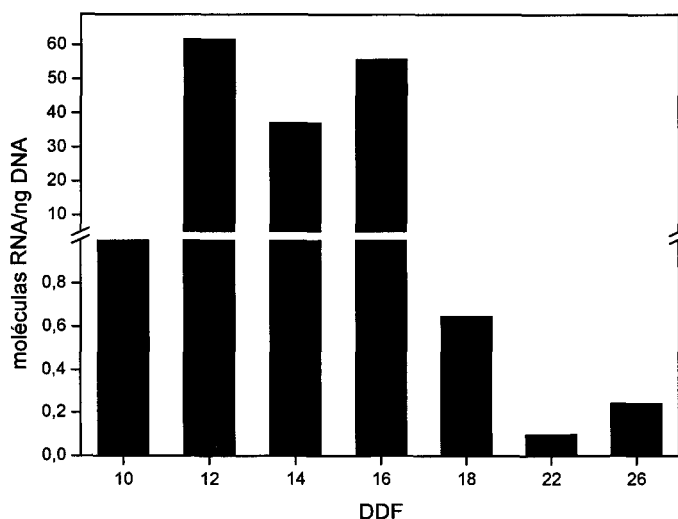


Figura 3.19. Niveles de expresión de *Hacwinv1* durante el periodo de acumulación de productos de reserva en las semillas en desarrollo de girasol de la línea CAS-6. DDF, días después de floración.

Como muestra la Figura 3.19, durante el desarrollo de la semilla los niveles de expresión de *Hacwinv1* se modifican significativamente, ya que presentan un periodo máximo de expresión entre los 12 y los 16 días después de floración disminuyendo a partir del día 18 de forma considerable.

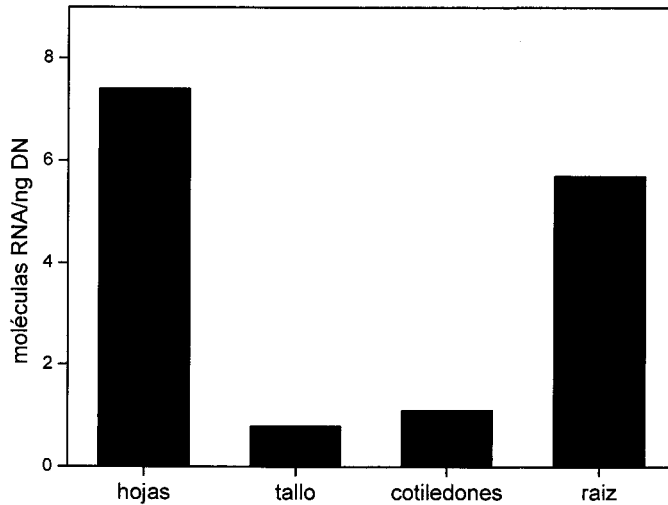


Figura 3.20. Análisis de los niveles de expresión de *Hacwinv1* en diferentes tejidos de plántulas de girasol pertenecientes a la línea CAS-6.

A partir de los niveles de mRNA obtenidos tanto para las semillas en desarrollo como para los diferentes tejidos de las plántulas, se puede observar como el mRNA *Hacwinv1* presenta una amplia distribución, ya que aunque su expresión es máxima durante la fase inicial del desarrollo de las semillas (12, 14 y 16 días después de floración) también se expresa en el resto de tejidos estudiados, siendo el tallo y los cotiledones los tejidos en los que menos expresión se ha encontrado.

Como consecuencia de la imposibilidad de predecir basándose únicamente en la secuencia de aminoácidos si HaCWINV1 es una invertasa de pared celular o por el contrario pertenece al grupo de las fructan exohidrolasas (De Coninck y col., 2005) y debido a que se han descrito invertasas putativas de pared celular que presentan un pI ácido, igual que ocurre en el caso de la *HacwINV1*, que constituirían un subgrupo de invertasas que no están unidas de forma iónica a la pared celular (Roitsh y González, 2004), se ha decidido incluir a la secuencia polipeptídica derivada del cDNA obtenido a partir del oligonucleótido dINV en el grupo de las invertasas putativas de pared celular y no en el de las enzimas degradativas del fructan fundamentalmente por su patrón de expresión durante el desarrollo de las semillas de girasol.

El girasol es una planta que no acumula fructan aunque se han descrito enzimas fructan exohidrolasa en *Beta vulgaris* (Van den Ende y col., 2003) y *Arabidopsis thaliana* (De Coninck y col., 2005), que al igual que *Helianthus annuus* son plantas que no sintetizan este carbohidrato. Estas enzimas se denominadas FEH tipo B y sus funciones putativas serían participar en los mecanismos de defensa de la planta y en la estabilización de procesos simbióticos entre la planta y bacterias endofíticas productoras de fructan (Van den Ende y col., 2004), además las enzimas fructan exohidrolasas no degradan eficientemente la sacarosa y muchas de ellas son inhibidas por este disacárido (Verhaest y col., 2006).

El patrón de expresión que presenta el gen *Hacwinv1* no se ajusta a las funciones arriba descritas para las FEH tipo B, ya que el tejido donde se aprecian mayores niveles de expresión se corresponde con las semillas en desarrollo (Figura 3.19), teniendo además una cinética de expresión que se ajusta a lo esperado para una enzima que participe en el metabolismo de la sacarosa, presentando un patrón de expresión en las semillas en desarrollo similar al de otras enzimas de la ruta que han sido estudiadas y que se describen a continuación. Además sus niveles máximos de expresión se corresponden con los máximos niveles de sacarosa, glucosa y fructosa descritos en la semilla que caracterizan la fase inicial del desarrollo del embrión, siendo coincidente esta característica con las de otras invertasas de pared que participan de forma activa en esta fase donde predomina la actividad mitótica (Wobus y Weber, 1999).

3.2. Aislamiento, caracterización y niveles de expresión de un cDNA codificante de una hexoquinasa.

3.2.1. Amplificación de un fragmento interno del cDNA Hahxk1.

A diferencia con la obtención del fragmento inicial descrita anteriormente (Resultado y Discusión, apartado 3.1.1), en este caso el fragmento inicialmente amplificado mediante PCR (Materiales y Métodos, apartado 2.2.3.5) fue obtenido utilizando dos oligonucleótidos degenerados (Resultados y Discusión, Figura 3.21; Materiales y Métodos, Tabla 2.2), mediante los cuales se amplificó un fragmento de 222 pb a partir de cDNA de semillas de 15 DDF de la línea CAS-6, presentando este fragmento alta homología con las secuencias de hexoquinasas de plantas.

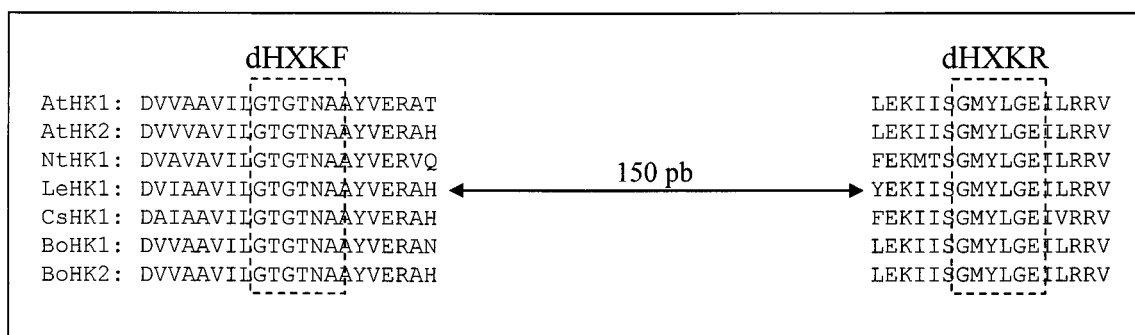


Figura 3.21. Alineamiento parcial de secuencias aminoacídicas de hexoquinasas de plantas mediante el programa Clustal X v1.8. At, *Arabidopsis thaliana* (NP_194642, NP_179576); Nt, *Nicotiana tabacum* (Q9SEK2); Le, *Lycopersicon esculentum* (AAG35735); Cs, *Citrus sinensis* (AAG28503); Bo, *Brassica oleracea* (AAL60583, AAL6058). Las cajas en línea discontinua delimitan las zonas conservadas utilizadas para el diseño de los cebadores.

3.2.2. Obtención de la secuencia completa del cDNA Hahxk1.

El extremo 3' del cDNA fue obtenido mediante PCR utilizando el oligonucleótido externo FA2Z y el interno HXKF (Materiales y Métodos, Tabla 2.4), mientras que el extremo 5' fue obtenido mediante el kit comercial Smart™- RACE cDNA amplification kit (Clontech) y los oligonucleótidos internos HXKR1 y HXKR2 (Materiales y Métodos, Tabla 2.4). Teniendo la secuencia completa de cDNA 1901 pb y una pauta abierta de lectura de 498 aminoácidos. La secuencia HaHXK1 se encuentra depositada en el GenBank con el número de acceso DQ835563.

3.2.3. Características de la secuencia polipeptídica deducida del cDNA Hahxk1.

La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la pauta abierta de lectura del cDNA Hahxk1 presenta una serie de características que se resumen en la Tabla 3.6

Tamaño	498 aa
Peso molecular	53,90 KDa
Punto isoelectrico	5,29
Solubilidad	54 % insoluble
Hidrofobicidad	44,2 %
Hidrofilicidad	29,7 %
Básico	12,7 %
Ácido	13,5 %

Tabla 3.6. Propiedades fisicoquímicas de la secuencia polipeptídica *HaHXX1*.

Al comparar la secuencia polipeptídica *HaHXX1* presentó gran homología con el resto de hexoquinasa de plantas (Figura 3.22). Estas pueden clasificarse en dos tipos: El tipo A se caracteriza por poseer una región N-terminal cargada con residuos básicos que constituye un péptido de tránsito al cloroplasto (Kandel-Kfir y col., 2006). Mientras que las proteínas del tipo B presentan una región hidrofóbica de anclaje a la membrana en la zona N-terminal, mediante la cual se insertan en la envuelta externa de la membrana del cloroplasto situándose hacia la cara citoplasmática. Este grupo está representado por la hexoquinasa de espinaca *SoHXX1* cuya localización intracelular ha sido determinada (Wiese y col., 1999).

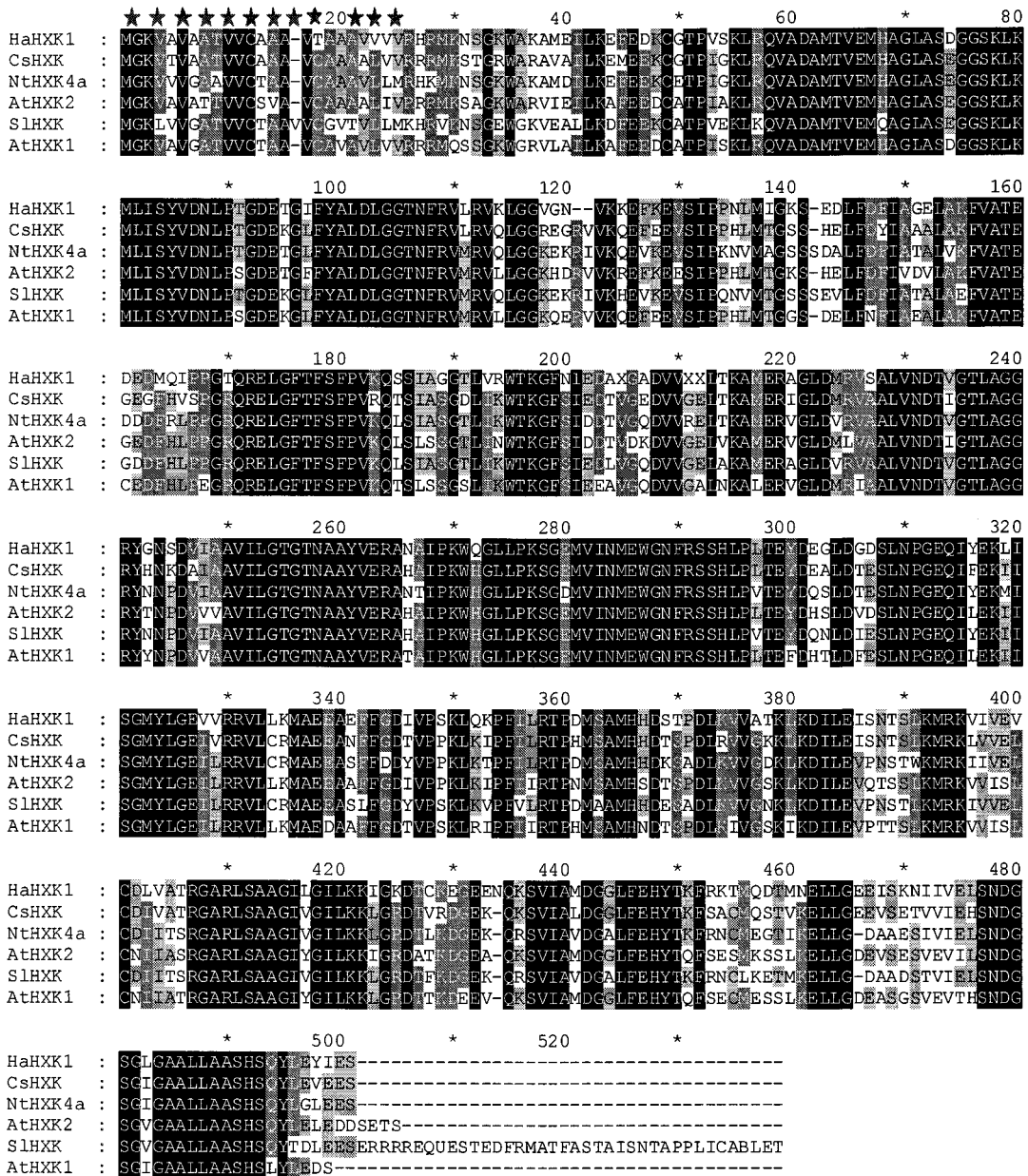


Figura 3.22. Alineamiento de secuencias aminoácidas de hexoquinasas de plantas. Ha, *Helianthus annuus* (DQ835563); At, *Arabidopsis thaliana* (NP_179576, NP_194642); Nt, *Nicotiana tabacum* (AAS60195); Le, *Lycopersicon esculentum* (AAY60841). Las regiones oscuras corresponden a zonas con alta homología. Los primeros 24 aminoácidos de la región N-terminal fueron eliminados de la construcción utilizada para la expresión y purificación de la proteína.

3.2.4. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica derivada de *HaHxk1*.

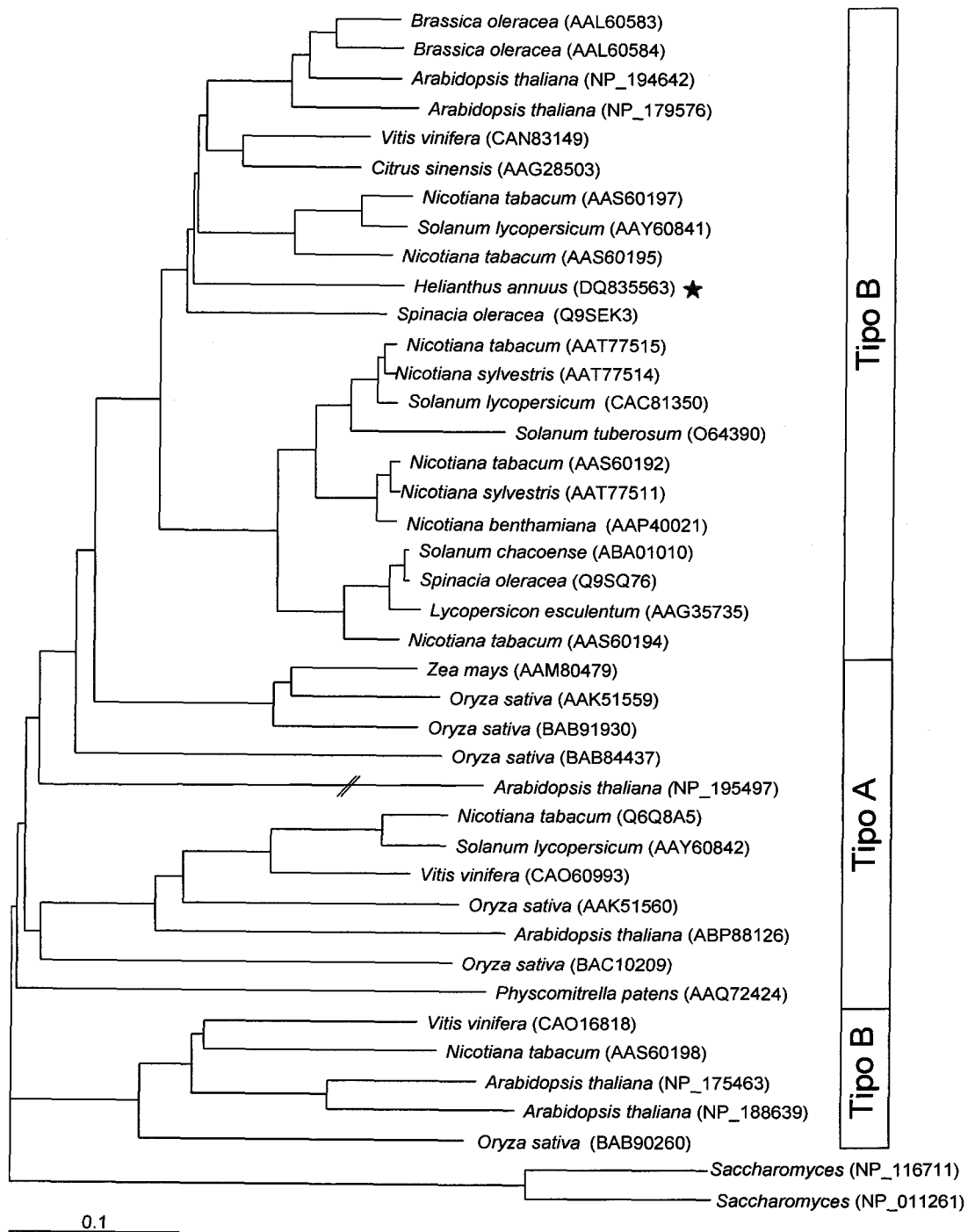


Figura 3.23. Análisis filogenético de las enzimas hexoquinasas de plantas.

Como se muestra en la Figura 3.23, la enzima *HaHxk1* mostró una mayor homología con las hexoquinasas de tipo B

Como consecuencia a las diferentes localizaciones celulares que presentan las hexoquinasa pertenecientes a ambos grupos, es posible que presente diferentes

funciones fisiológicas. La hexoquinasa *HaHXK1*, perteneciente al grupo que se caracteriza por la presencia de una secuencia de anclaje a la membrana, estaría implicada en la fosforilación de la glucosa citosólica, es decir, aquella que proviene de la hidrólisis de la sacarosa, pudiendo la glucosa-6-fosfato resultante entrar en la ruta glucolítica citosólica o bien ser transportada al plastidio donde puede participar tanto en la ruta oxidativa de las pentosas fosfato como en la glucolisis plastidial, estando en ambos casos relacionada con la biosíntesis lipídica.

3.2.5. Estructura terciaria de la proteína *HaHXK1*.

Al igual que en el caso de la anterior enzima, el grado de identidad de la secuencia aminoacídica con proteínas cuya estructura cristalina es conocida, en este caso un 36.5% con la hexoquinasa PII de *Sacharomyces cerevisiae* (Kuser et al. 2000), permitió utilizando programas de modelado de proteínas basados en la homología con proteínas de estructuras cristalinas conocidas (Swiss-Model, Schwede *et al.* 2003; 3D-JIGSAW, Bates *et al.* 2001) la obtención del modelo estructural de *HaHXK1* (3.24 A, B). El modelo estructural obtenido para *HaHXK1* se asemeja al de otras estructuras de hexoquinasas, la cadena polipeptídica se pliega en dos dominios de tamaño diferente, mayor y menor, separados por una grieta donde se encuentran los residuos que participan en el sitio activo del enzima (Asp101, Thr105, Lys193, Asp228, Thr253, Asp438, Gly440 y Ser473). La estructura secundaria está formada por 14 α -hélices y 13 hojas plegada β , mientras que en el dominio mayor se localizan 6 hojas plegada β y 10 α -hélices, en el menor se encuentran 7 y 4, respectivamente. Ambos dominios se encuentran en una posición abierta debida a la repulsión entre los residuos de los laterales de la grieta. Tal y como se ha mencionado anteriormente, los residuos que forman parte del sitio activo (Asp101, Thr105, Lys193, Asp228, Thr253, Asp438, Gly440 y Ser473) se encuentran posicionados a ambos lados de la grieta (Figura 3.24 C), la entrada de los sustratos o de los inhibidores del enzima en el sitio activo provocan el cierre de los dominios sobre el mismo.

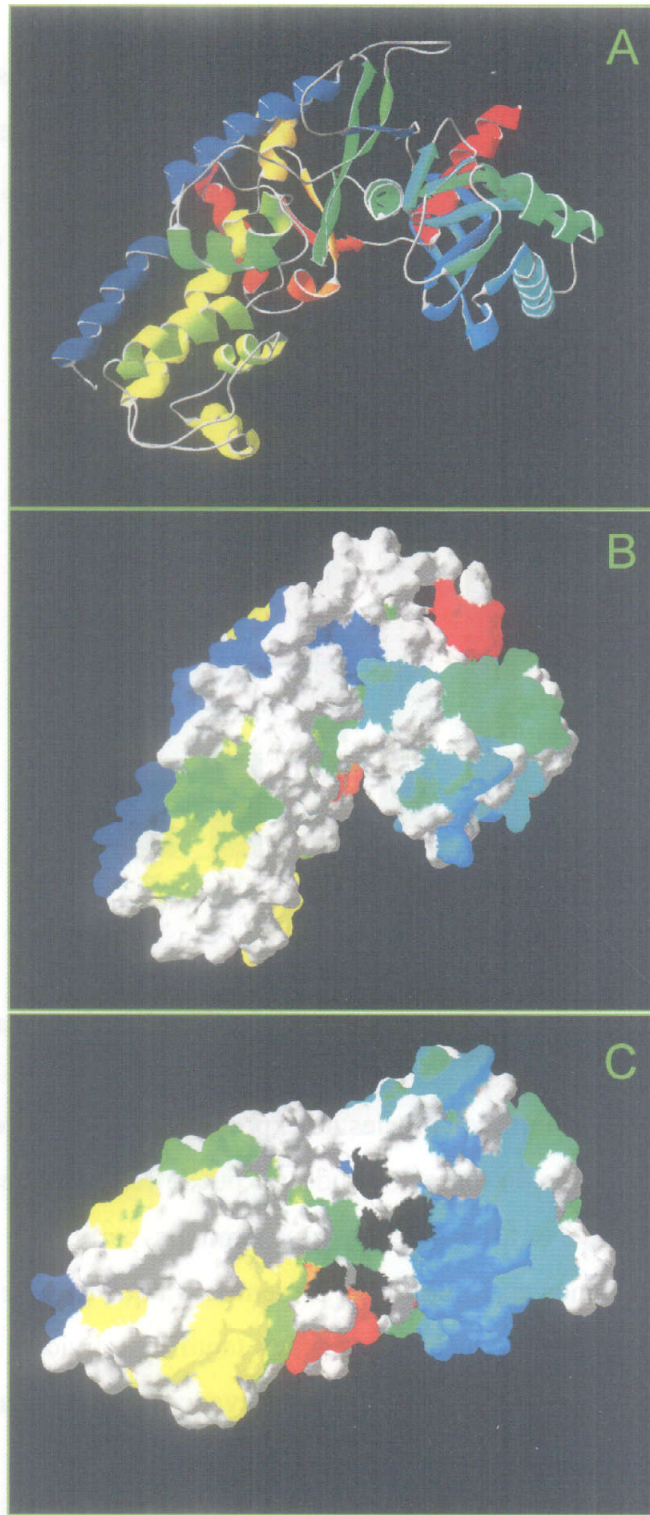


Figura 3.24. Modelo estructural propuesto para *HaHXK1*. A y B, diagrama de cintas y superficie molecular, respectivamente, de la estructura propuesta; y C, modelo de la superficie molecular mostrando el interior de la grieta donde se encuentra el sitio activo. En negro se muestran los residuos que forma el sitio activo del enzima (Asp101, Thr105, Lys193, Asp228, Thr253, Asp438, Gly440 y Ser473).

3.2.6. Estudio de los niveles de expresión de *Hahxk1*.

En las semillas en desarrollo se pueden diferenciar dos etapas en función de la expresión del gen, ya que desde el día 10 hasta el día 16 después de floración existen altos niveles de mRNA, disminuyendo fuertemente a partir del día 18, siendo muy claro la existencia de dos periodos, uno de alto y otro de bajo nivel de expresión (Figura 3.25).

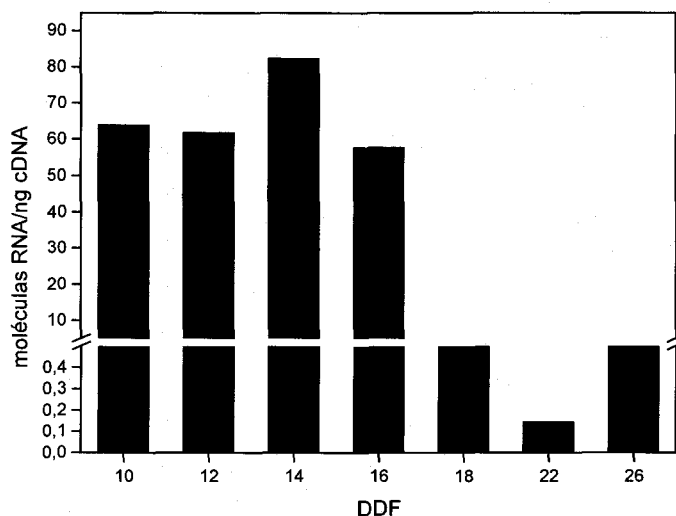


Figura 3.25. Medida de los niveles de expresión del mRNA *Hahxk1* durante el desarrollo de las semillas de girasol pertenecientes a la línea CAS-6.

Aunque la relación entre los niveles de expresión del gen *Hahxk1* y la evolución de la actividad hexoquinasa en extracto crudo no puede relacionarse de forma directa debido a la existencia de otras isoenzimas que también participan en el proceso, si coinciden ambos fenómenos en el perfil que presentan, ya que durante la fase inicial del periodo de acumulación de productos de reserva tanto la actividad hexoquinasa total como la expresión del gen en estudio presentan elevados valores, disminuyendo ambas durante el desarrollo de las semillas.

El estudio de la expresión diferencial en distintos tejidos de la planta (Figura 3.26) muestra como el gen se expresa fundamentalmente en las semillas y en la raíz, por lo que presentaría mayores niveles en los tejidos no fotosintéticos.

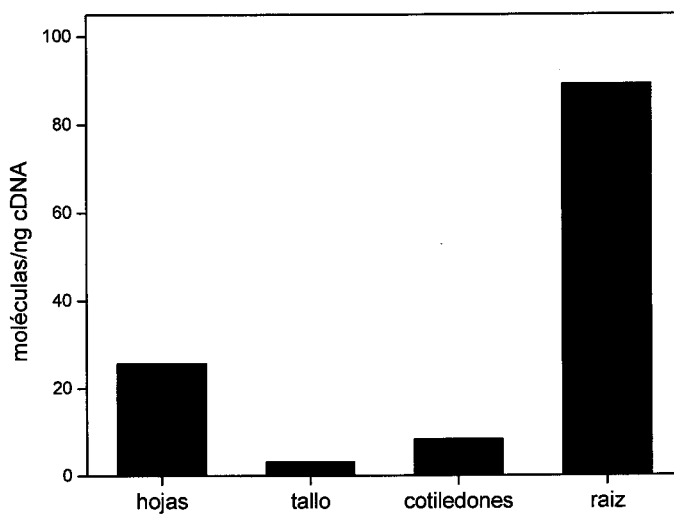


Figura 3.26. Medida de los niveles de expresión en diferentes tejidos de girasol pertenecientes a la línea CAS-6.

3.3. Aislamiento, caracterización y niveles de expresión de un cDNA codificante de una fosfoglucosa isomerasa citos.

3.3.1. Amplificación de un fragmento interno del cDNA *Hacpgi1*.

Al igual que en el caso anterior, se utilizaron dos oligonucleótidos degenerados (Figura 3.27) y se amplificó un fragmento de 381 pb a partir de cDNA de semillas de 15 días después de floración de la línea CAS-6 que presentó alta homología con las enzimas fosfoglucosas isomerasas citosólicas de plantas.

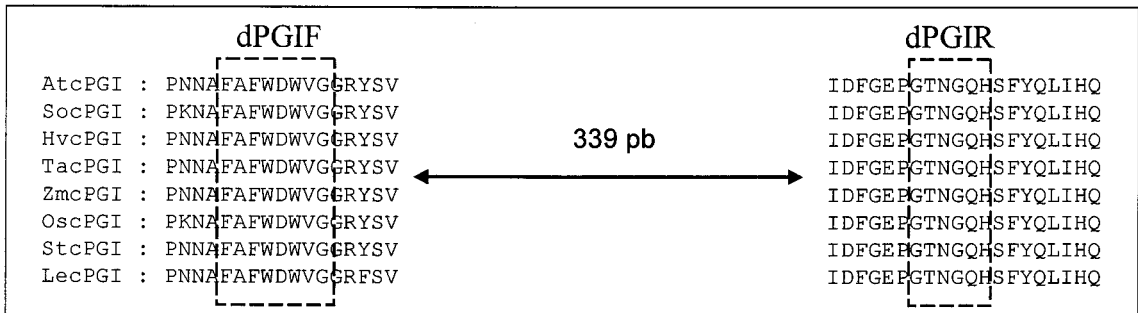


Figura 3.27. Alineamiento parcial de secuencias aminoacídicas de fosfoglucosa isomerasas citosólicas de plantas mediante el programa Clustal X v1.8. At, *Arabidopsis thaliana* (BAB17636); So, *Spinacia oleracea* (O82059); Hv, *Hordeum vulgare* (ABE41789); Ta, *Triticum aestivum* (ABE41790); Zm, *Zea mays* (P49105); Os, *Oryza sativa* (NP_001051434); St, *Solanum tuberosum* (AAU00726); Le, *Lycopersicon esculentum* (ABE03628). Las cajas de líneas discontinuas delimitan las zonas conservadas utilizadas para el diseño de los cebadores.

3.3.2. Obtención de la secuencia completa del cDNA *Hacpgi1*.

La secuencia completa del cDNA fue obtenida utilizando el mismo procedimiento empleado para la obtención de los extremos del cDNA anterior (Resultados y Discusión, apartado 3.2.2), siendo utilizados los cebadores internos PGIF para el extremo 3' y PGIR1 y PGIR2 para el 5' (Materiales y Métodos, Tabla 2.4).

La secuencia completa de cDNA presentó un tamaño de 1959 pb teniendo la secuencia polipeptídica deducida a partir de la pauta abierta de lectura 566 aminoácidos. La secuencia de *Hacpgi1* fue depositada en el GenBank con el número de acceso AAY85660 [gi: 68137463]

3.3.3. Características de la secuencia polipeptídica deducida del cDNA *Hacpgi1*.

Las propiedades fisicoquímicas de la secuencia de aminoácidos derivada del cDNA *Hacpgi1* se resumen en la tabla 3.

Tamaño	566 aa
Peso molecular	62,31 KDa
Punto isoeléctrico	7,00
Solubilidad	73 % insoluble
Hidrofobicidad	44,5 %
Hidrofilicidad	32,3 %
Básico	12,7 %
Ácido	10,4 %

Tabla 3.7. Propiedades fisicoquímicas de la proteína *HacPGI1*.

Como se muestra en la Figura 3.28, la secuencia polipeptídica derivada del cDNA *Hacpgi1* presenta un alto grado de homología con el resto de fosfoglucoasa isomerasas citosólica de plantas que hasta la fecha han sido clonadas y secuenciadas, de tal forma que comparten amplias regiones conservadas.

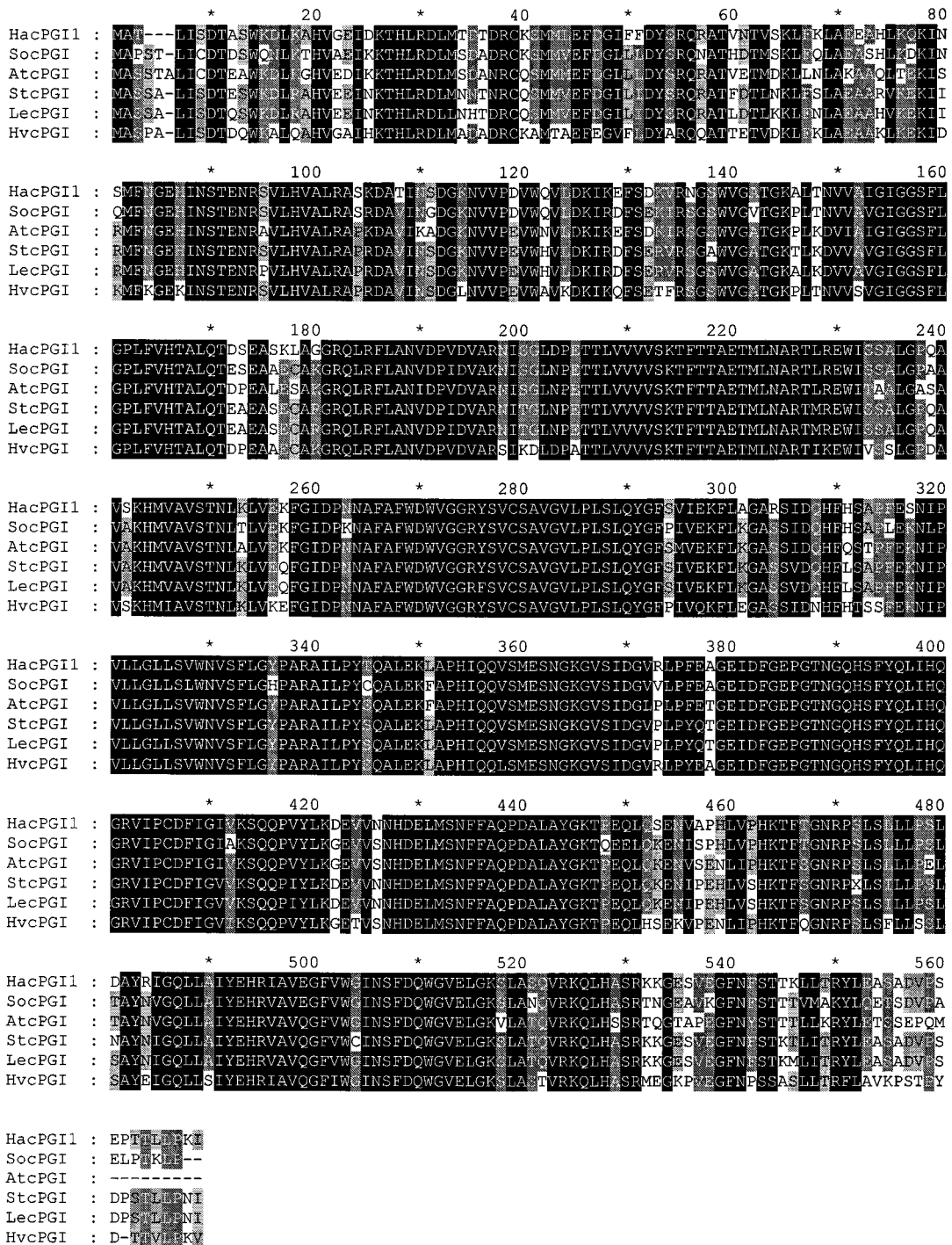


Figura 3.28. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de fosfogluosas isomerasas citosólicas de plantas. Ha, *Helianthus annuus* (AAY85660); At, *Arabidopsis thaliana* (BAB17636); St, *Solanum tuberosum* (AAU00726); So, *Spinacia oleracea* (O82059); Le, *Lycopersicon esculentum* (ABE03628); Hv, *Hordeum vulgare* (ABE41789). Las regiones oscuras corresponden a zonas con alta homología.

3.3.4. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica derivada de *Hacpgi1*.

En plantas superiores se han descrito dos isoenzimas, una de localización citosólica y otra plastidial (Schnarrenberg y Oeser, 1974) ambas codificadas por distintos genes nucleares, esta última de origen endosimbiótico (Nowitzki et al., 1998).

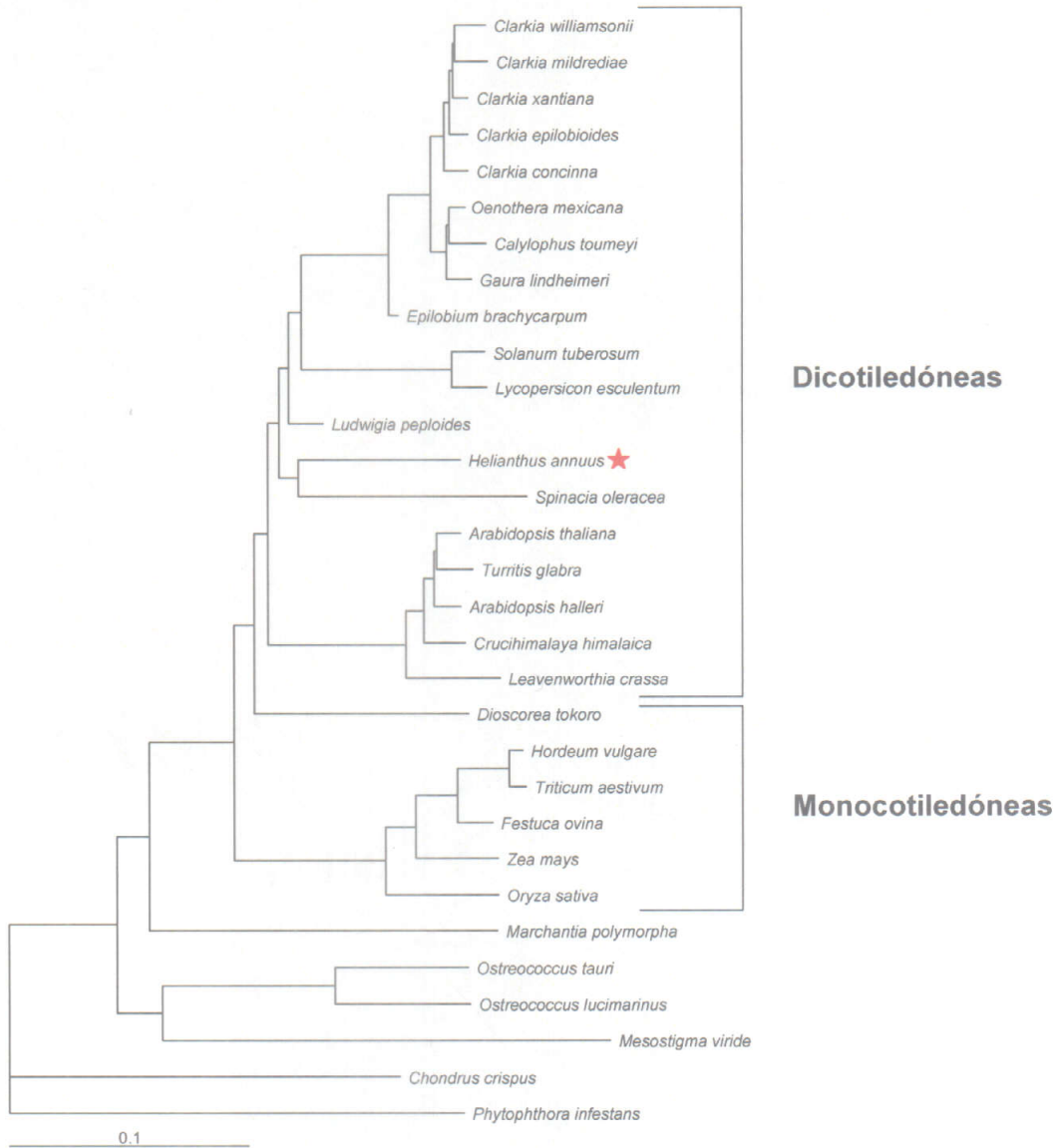


Figura 3.29. Análisis filogenético de las enzimas fosfoglucoasa isomerasa citosólicas de plantas. *Clarkia williamsonii* (P54239); *Clarkia mildrediae* (P54237); *Clarkia xantiana* (P54240); *Clarkia epilobioides* (CAC82578); *Clarkia concinna* (P54235); *Oenothera mexicana* (P54243); *Calylophus toumeyi* (CAD79579); *Calylophus toumeyi* (CAD79579); *Gaura lindheimeri* (CAD79580); *Epilobium brachycarpum* (CAD79584); *Solanum tuberosum* (AAU00726); *Lycopersicon esculentum* (ABE03628); *Ludwigia peploides* (CAD79578); *Helianthus annuus* (AAY85660); *Spinacia oleracea* (O82059); *Arabidopsis thaliana* (BAB17636); *Turritis glabra* (BAC11913); *Arabidopsis halleri* (BAC77717); *Crucihimalaya himalaica* (BAC11914); *Leavenworthia crassa* (AAC08411); *Dioscorea tokoro* (BAA23181); *Hordeum vulgare* (ABE41789); *Triticum aestivum* (ABE41790); *Festuca ovina* (ABB90111); *Zea mays* (P49105); *Oryza sativa* (NP_001051434); *Marchantia polymorpha* (ABK00059); *Ostreococcus tauri* (CAL55903); *Ostreococcus lucimarinus* (XP_001420367); *Mesostigma viride* (ABK00064); *Chondrus crispus* (ABH11442); *Phytophthora infestans* (AAP51080).

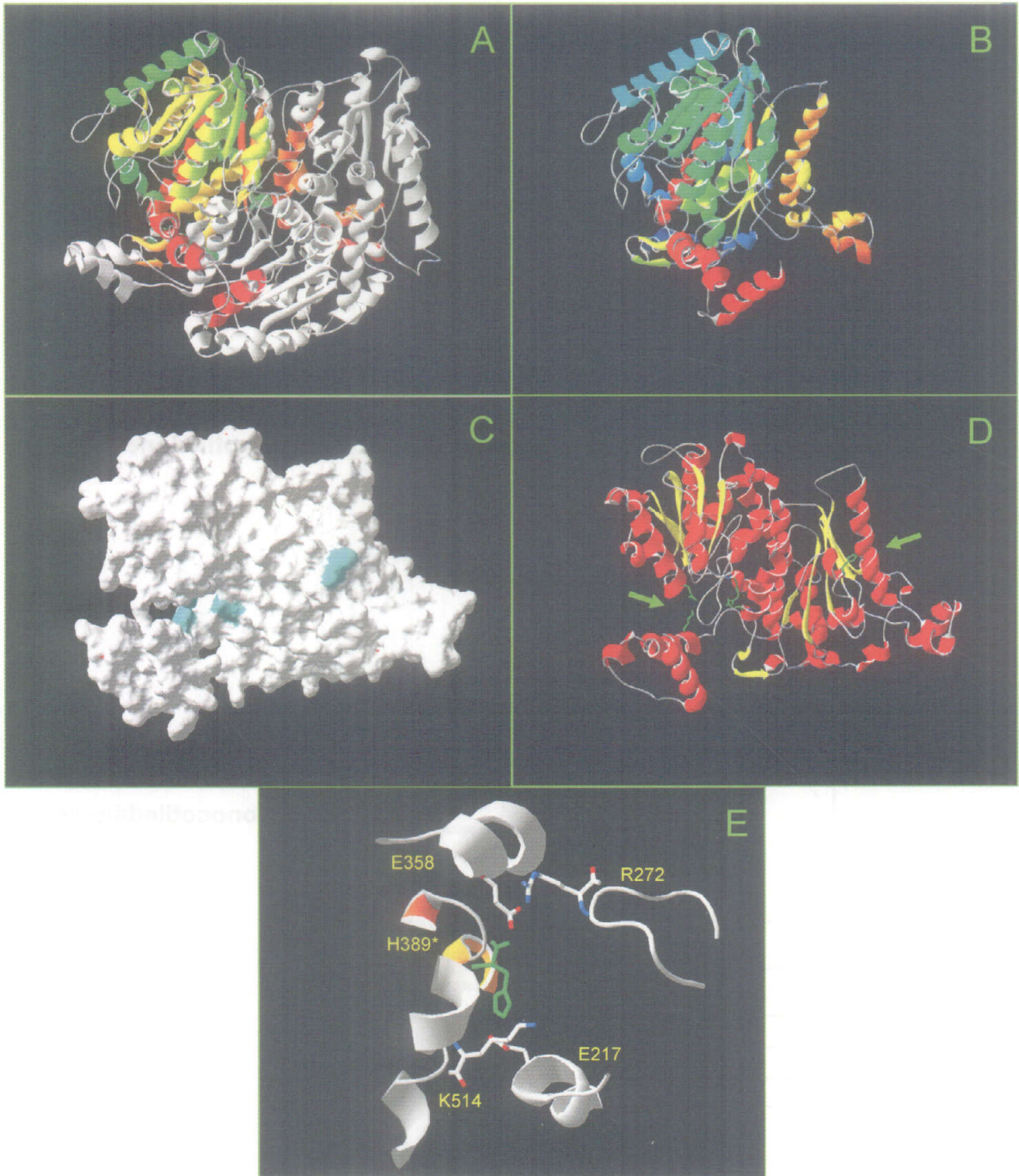
3.3.5. Estructura tridimensional de la proteína *HacPGI1*.

Figura 3.30. Modelo estructural propuesto para *HaPGI1*. A y B, dos vistas diferentes del diagrama de cintas de la estructura del dímero y el monómero de *HaPGI1*; C, modelo de la superficie molecular de la enzima mostrando en azul claro la posición de los residuos que forman parte de los sitios activos del dímero (Glu217, Arg272, Glu357, His389 y Lys514); D, diagrama de cintas mostrando las cadenas laterales de los residuos del sitio activo (señalados con flechas); y E, detalle del sitio activo mostrando la posición relativa de las cadenas laterales de los distintos residuos. El asterisco indica que el residuo His389, en verde, pertenece al otro monómero.

La secuencia polipeptídica de *HaPGII* mostró una alta identidad, un 46%, con la fosfogluco isomerasa de conejo (*Oryctolagus cuniculus*), cuya estructura es conocida (Jeffery *et al.* 2001), permitiendo la utilización de programas de modelado de proteínas basados en la homología con proteínas de estructuras cristalinas conocidas (Swiss-Model, Schwede *et al.* 2003; 3D-JIGSAW, Bates *et al.* 2001) y la obtención de un modelo estructural tanto del homodímero como del monómero de *HaPGII* (Figura 3.30 A, B). Cada subunidad contiene dos dominios sándwich α/β y una región C-terminal que se extiende abrazando a la otra subunidad del dímero. Cada sitio activo está formado principalmente por aminoácidos de uno de los monómeros, con unos pocos residuos de aminoácidos de la otra subunidad del homodímero (Lee *et al.* 2001). De esta forma, los residuos implicados en la interacción y catálisis del sustrato en cada sitio activo son Glu217, Arg272, Glu358, y Lys514 de uno de los monómeros, e His389 del otro monómero (Figura 3.30 C, D y E).

3.3.6. Estudio de los niveles de expresión de *Hacpgi1*.

El estudio de los niveles de expresión del gen *Hacpgi1* en las semillas en desarrollo (Figura 3.31), permitió, como en el caso de las enzimas anteriores, distinguir dos etapas claramente diferenciadas, una inicial donde se observan los niveles máximos de expresión y otra final, que se caracteriza por unos niveles mínimos de expresión.

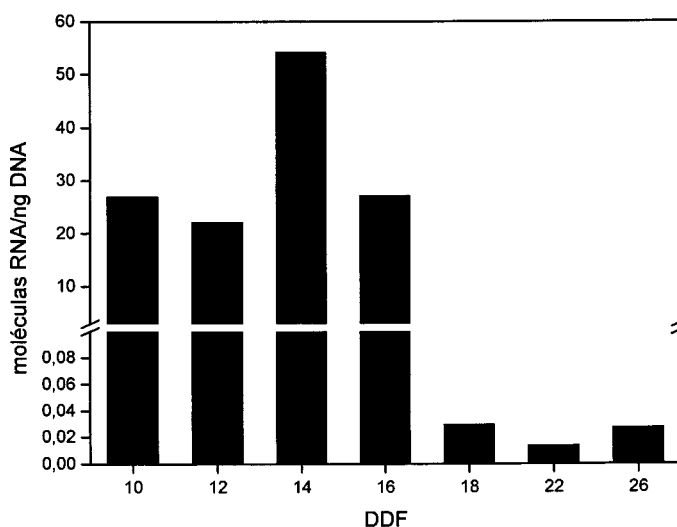


Figura 3.31. Medida de los niveles de expresión del mRNA *Hacpgi1* durante el desarrollo de las semillas de girasol pertenecientes a la línea CAS-6.

La existencia de dos etapas en los niveles de mRNA de *Hacpgi1* coincide con el perfil de la actividad total fosfoglucoasa isomerasa (Resultados y Discusión, Figura 3.2) en las semillas en desarrollo, ya que es a partir del día 18 cuando se produce la máxima caída tanto de la expresión de *Hacpgi1* como de la actividad fosfoglucoasa isomerasa, aunque al igual que en el caso anterior, no se puede establecer una relación directa entre ambas debido entre otros factores a la existencia de dos isoenzimas, que participarían ambas en la actividad total medida en el extracto crudo.

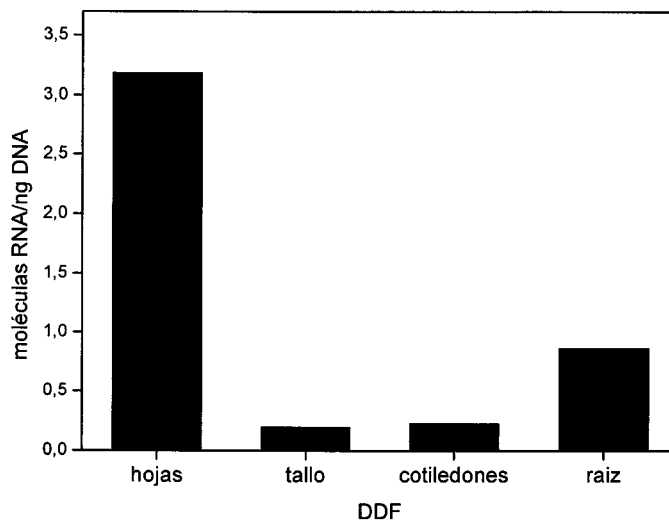


Figura 3.32. Medida de los niveles de expresión en diferentes tejidos de girasol pertenecientes a plántulas de la línea CAS-6.

La comparación de los niveles de expresión en los distintos tejidos (Figura 3.32) muestra como el gen se expresa fundamentalmente en la fase inicial de las semillas en desarrollo y en las hojas, mientras que en el resto de tejidos las cantidades de mRNA *Hacpgi1* encontradas son inferiores, siendo mínimas en tallo y cotiledones.

3.4. Aislamiento, caracterización y niveles de expresión de un cDNA codificante de una fosfoglicerato quinasa citosólica.

3.4.1. Amplificación de un fragmento interno del cDNA *Hacpgk1*.

Siguiendo la metodología anteriormente descrita y utilizando los oligos degenerados dPGKF y dPGKR (Materiales y Métodos, Tabla 2.2) se amplificó un fragmento de 575 pb cuya secuencia presento alta homología con las fosfoglicerato quinazas de plantas.

3.4.2. Obtención de la secuencia completa del cDNA *Hacpgk1*.

Para la amplificación de los extremos del cDNA se procedió de la misma forma que en los casos anteriores, utilizándose en este caso los oligos internos PGKF para el extremo 3' y PGKR1 y PGKG2 para el 5' (Materiales y Métodos, Tabla 2.4)

Una vez ensamblados los fragmentos obtenidos la secuencia *Hapgk1* presentó un tamaño de 1468 pb, obteniéndose una secuencia polipeptídica deducida a partir de la pauta abierta de lectura de 401 aminoácidos. Esta secuencia fue depositada en GenBank con el número de acceso ABI18157 [gi: 121485004].

3.4.3. Características de la secuencia polipeptídica deducida del cDNA *Hacpgk1*.

Las propiedades fisicoquímicas deducidas de la proteína *HacPGK1* se resumen en la tabla siguiente.

Tamaño	401 aa
Peso molecular	42,30 KDa
Punto isoeléctrico	6,06
Solubilidad	68 % insoluble
Hidrofobicidad	47,4 %
Hidrofilicidad	25,9 %
Básico	13,5 %
Ácido	13,2 %

Tabla 3.8. Propiedades fisicoquímicas de la secuencia de aminoácidos deducida del cDNA *Hacpgk1*.

En la Figura 3.33 se muestra el alineamiento de *HacPGK1* con otras fosfoglicerato quinazas de plantas, incluyendo aquellas con localización en el citosol y en plastidios. Las isoenzimas citosólicas y plastidiales descritas en otras especies vegetales presentan un alto grado de homología (McMorrow y Bradbeer, 1990), difiriendo ambos grupos en la presencia o ausencia de un péptido señal para su entrada en plastidio/cloroplasto.

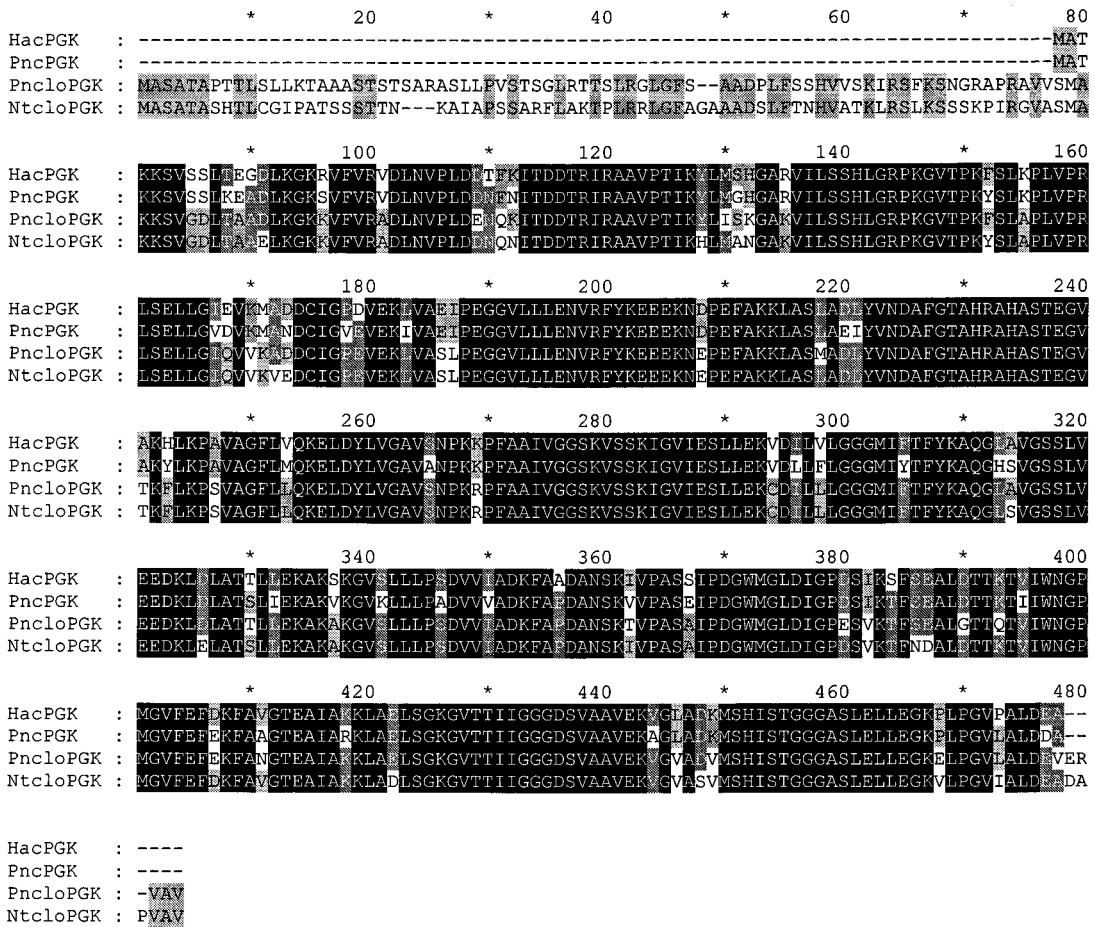


Figura 3.33. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de fosfoglicerato quinasas de plantas. Ha, *Helianthus annuus* (ABI18157); Pp, *Populus nigra* (BAA33801, BAA33803); Nt, *Nicotiana tabacum* (Q42961). Las regiones oscuras corresponden a zonas con alta homología. cPGK, fosfoglicerato quinasa citosólica; cloPGK, fosfoglicerato quinasa cloroplástica.

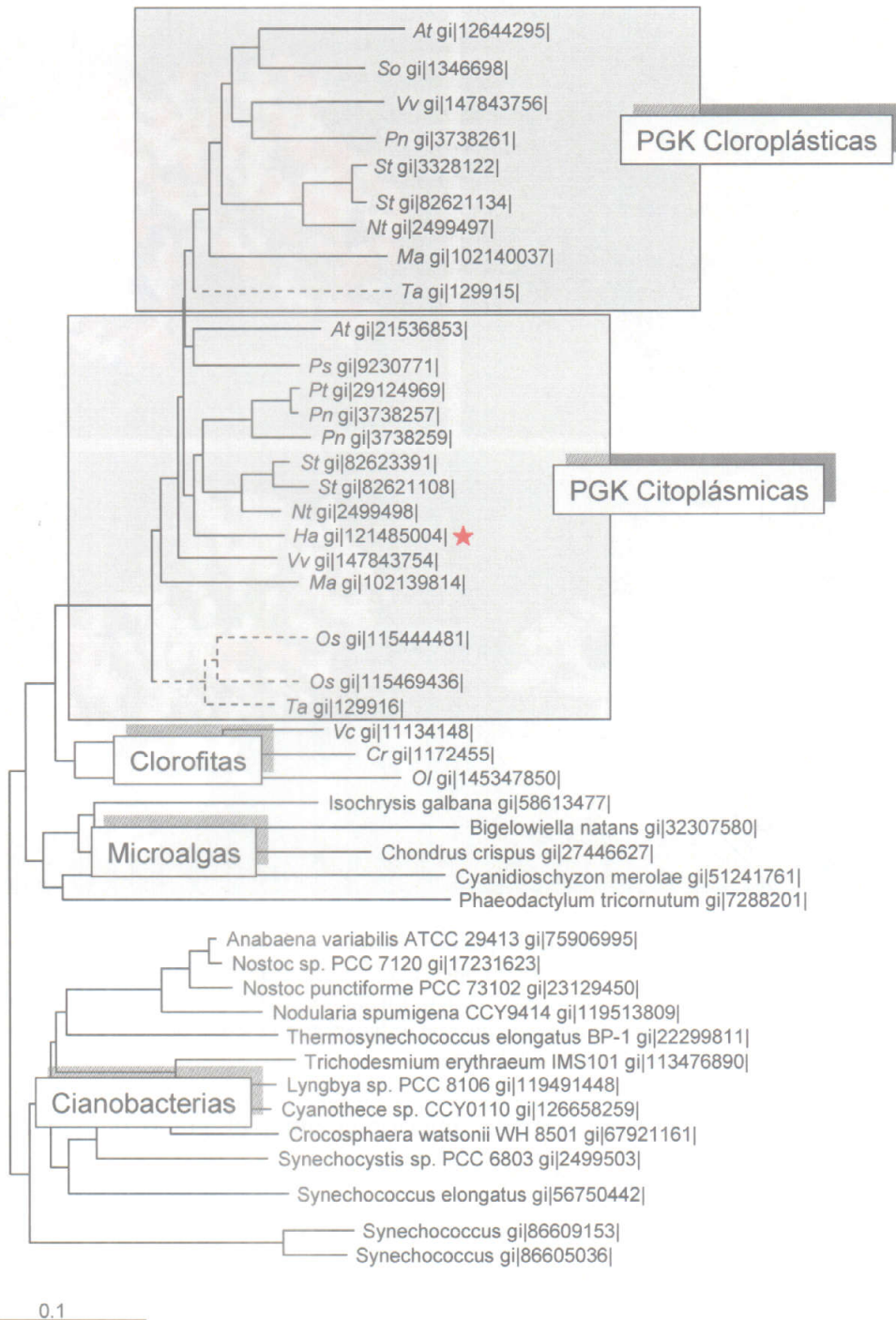
3.4.4. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica derivada de *Hacpgk1*.

Figura 3.34. Análisis filogenético de las enzimas fosfoglicerato quinasa de plantas y cianobacterias. Se pueden apreciar dos grupos dentro de las proteínas de plantas superiores, un primer grupo formado por las enzimas cloroplásticas, y un segundo que incluyen las isoenzimas citosólicas. En ambos se distinguen también aquellas presentes en especies dicotiledóneas y monocotiledóneas (ramas en líneas discontinuas). La numeración que sigue a cada entrada en el árbol corresponde con la identificación de la proteína en GenBank. Las abreviaturas usadas en plantas superiores y clorofilas son las siguientes: *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Cr*, *Chlamydomonas reinhardtii*; *Ha*, *Helianthus annuus*; *Ma*, *Musa acuminata*; *Nt*, *Nicotiana tabacum*; *Ol*, *Ostreococcus lucimarinus*; *Os*, *Oryza sativa*; *Pn*, *Populus nigra*; *Ps*, *Pisum sativum*; *Pt*, *Populus tremulus*; *So*, *Spinachia oleracea*; *St*, *Solanum tuberosum*; *Ta*, *Triticum aestivum*; *Vc*, *Volvox carteri*, and *Vv*, *Vitis vinifera*.

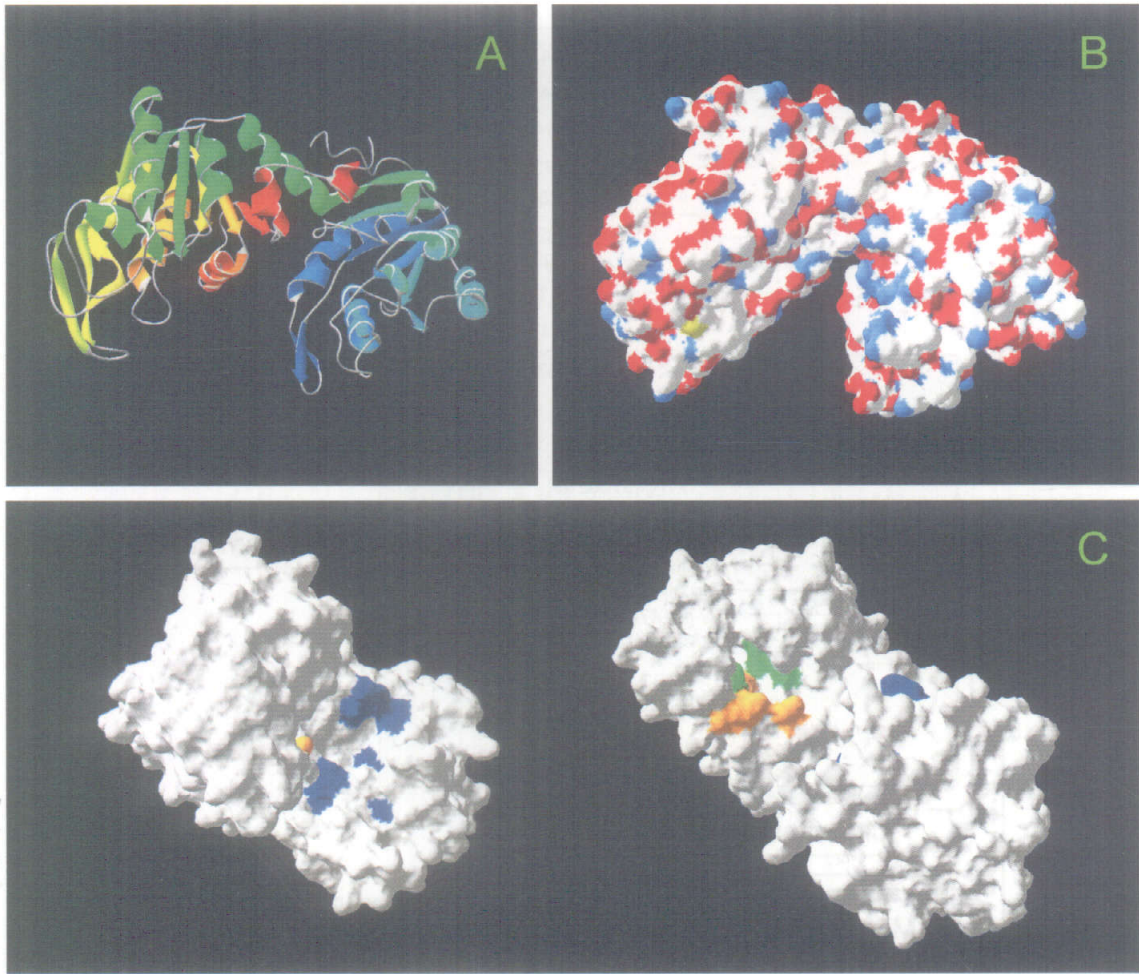
3.4.5. Estructura terciaria de la proteína *HacPGK1*.

Figura 3.35. Modelo estructural propuesto para *HaPGK1*. A y B, diagrama de cintas y superficie molecular, respectivamente, de la estructura propuesta; y C, vista de la superficie molecular mostrando el interior de la grieta donde se encuentra el sitio activo. En azul se muestran los residuos que interaccionan con la molécula de 3-fosfoglicerato, en verde los que lo hacen con el anillo de adenina de la molécula de ATP, y en naranja aquellos que lo hacen con la ribosa.

Al igual que en el caso de la anterior enzima, el grado de identidad de la secuencia aminoacídica con proteínas cuya estructura cristalina es conocida, en este caso un 60% con la fosfoglicerato quinasa de la bacteria hipertermófila *Thermotoga maritima* (Auerbach *et al.* 1997), permitió utilizando programas de modelado de proteínas basados en la homología con proteínas de estructuras cristalinas conocidas (Swiss-Model, Schwede *et al.* 2003; 3D-JIGSAW, Bates *et al.* 2001) la obtención del modelo estructural de *HaPGK1* (Figura 3.35 A, B). El modelo estructural obtenido para *HaPGK1* se asemeja, al igual que el modelo generado para la *HaHXK1*, al de otras estructuras de hexoquinasas, plegándose la cadena polipeptídica en dos dominios separados por una grieta donde se encuentran los residuos que participan en el sitio activo del enzima. La estructura secundaria está formada por 13 α -hélices y 17 hojas

plegada β , mientras que en el dominio mayor se localizan 9 hojas plegada β y 8 α -hélices, en el menor se encuentran 8 y 5, respectivamente. De nuevo, ambos dominios se encuentran en una posición abierta debida a la repulsión entre los residuos de los laterales de la grieta. Tal y como se ha mencionado anteriormente, los residuos que forman parte del sitio activo se encuentran posicionados a ambos lados de la grieta (Figura 3.35 C), y la entrada de los sustratos o de los inhibidores del enzima en el sitio activo provocan el cierre de los dominios sobre el mismo. Los residuos implicados en la interacción con la molécula de 3-fosfoglicerol son Arg23, Arg41, His64, Arg67, His154, Arg155 y His157; los que lo hacen con el anillo de adenina del ATP Gly199, Gly200, Gly223, Gly224, Gly225, Gly325, Leu301 y Val326; y, finalmente, los que lo hacen con la ribosa Gly325, Pro323, Glu328 y Asp359.

3.4.6. Estudio de los niveles de expresión de *Hacpgk1*.

Comparando los valores de los diferentes genes estudiados se puede ver como el valor máximo de expresión se corresponde con el mRNA *Hacpgk1*.

Durante el desarrollo de las semillas la evolución de la expresión del gen *Hacpgk1* (Figura 3.36) es similar al perfil que presentan el resto de genes de la ruta glucolítica en estudio en este trabajo, pudiéndose diferenciar dos etapas, una inicial y otra final que se corresponden con los valores máximos y mínimos de expresión respectivamente, aunque a diferencia con el resto, el máximo de expresión se alcanza el día 16 después de floración mientras que en el resto los máximos de expresión se alcanzan en días anteriores.

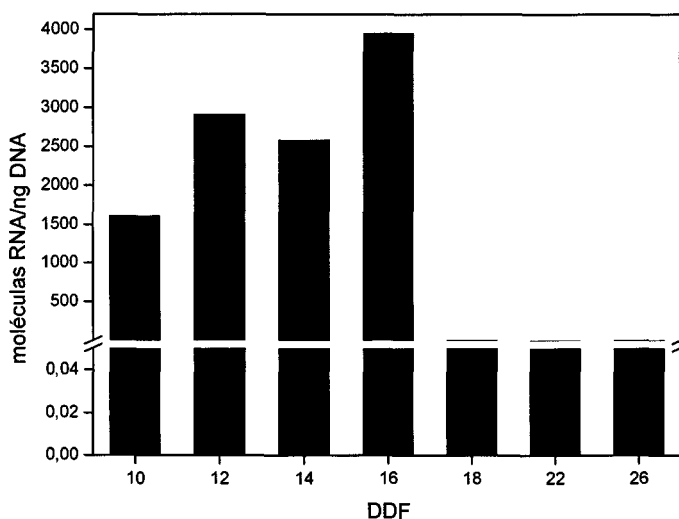


Figura 3.36. Medida de los niveles de expresión del mRNA *Hacpgk1* durante el desarrollo de las semillas de girasol pertenecientes a la línea CAS-6.

La expresión diferencial del gen en los tejidos de las plántulas (Figura 3.37) muestra como este se expresa fundamentalmente en los tejidos no fotosintéticos, ya que los niveles de mRNA son máximos en las semillas en desarrollo y el la raíz.

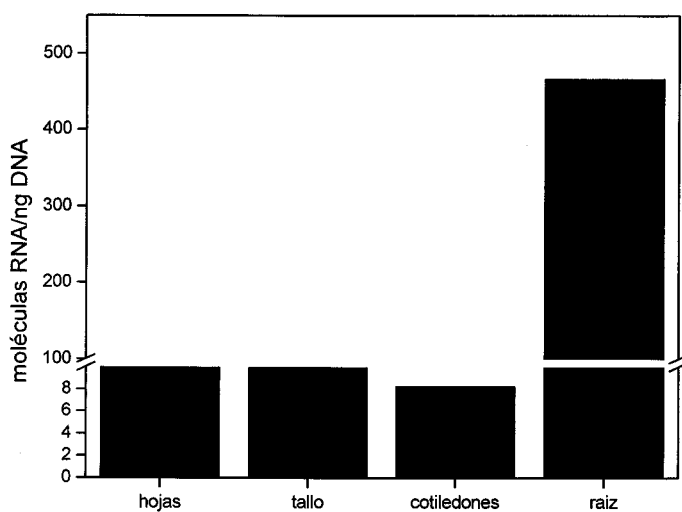


Figura 3.37. Medida de los niveles de expresión en diferentes tejidos de girasol pertenecientes a la línea CAS-6.

3.5. Aislamiento, caracterización y niveles de expresión de un cDNA codificante de una enolasa putativa.

3.5.1. Amplificación de un fragmento interno del cDNA *Haeno1*.

A partir de regiones conservadas obtenidas del alineamiento de diversas secuencias de enolasas de plantas se diseñaron dos oligonucleótidos degenerados, denominados dENO1 y dENO2 (Materiales y Métodos, Tabla 2.2), que fueron utilizados para la amplificación mediante PCR (Materiales y Métodos, apartado 2.2.3.5) de un fragmento interno de cDNA de semillas en desarrollo pertenecientes a la línea CAS-6, que presentó un alto grado de homología con el resto de enzimas enolasas.

3.5.2. Obtención de la secuencia completa del cDNA *Haeno1*.

Siguiendo la metodología empleada en los casos anteriores, se obtuvo tanto el extremo 3' como el 5'. Los oligonucleótidos específicos utilizados fueron ENOF1 para el 3' y ENOR1 y ENOR2 para el 5' (Materiales y Métodos, Tabla 2.4). A partir de la pauta abierta de lectura que presentó el cDNA completo, cuyo tamaño fue 1840 pb, se dedujo una secuencia polipeptídica de 493 aminoácidos. Esta secuencia fue depositada en el GenBank con el número de acceso EF137905.

3.5.3. Propiedades de la secuencia polipeptídica deducida a partir del cDNA *Haeno1*.

Las características de la proteína putativa *HaENO1* se describen en la tabla siguiente.

Tamaño	493 aa
Peso molecular	52.478 KDa
Punto isoeléctrico	6,30
Solubilidad	83 % insoluble
Hidrofobicidad	42,4 %
Hidrofilicidad	34,9 %
Básico	11,6 %
Ácido	11,2 %

Tabla 3.9. Propiedades fisicoquímicas de la secuencia de aminoácidos *HaENO1*.

En la Figura 3.38 se muestra el alineamiento de *HaENO1* con enolasas de otros organismos, como se puede apreciar las enolasas presentan un alto grado de homología entre especies de distintos reinos, siendo esto debido a que es una de las enzimas glucolíticas mas conservadas durante la evolución (Fothergill-Gilmore y Michels, 1993).

Debido a las múltiples posibilidades de localización celular de las enolasas, se llevó a cabo el análisis de la existencia de secuencias de localización celular dentro de la proteína. Este se realizó, tal y como se describe el apartado 2.2.3.13 de los Materiales y Métodos, mediante los programas WOLF PSORT, Protein Prowler Prediction y TargerP 1.1, en todos la máxima probabilidad de localización se encontró en el cloroplasto (WOLF PSORT: chlo, 8; mito, 6; Protein Prowler Prediction: cTP, 0,99; TargerP 1.1: cTP, 0,976; mTP, 0,03; SP, 0,003; otros, 0,038; Loc, C; Tplen, 81)

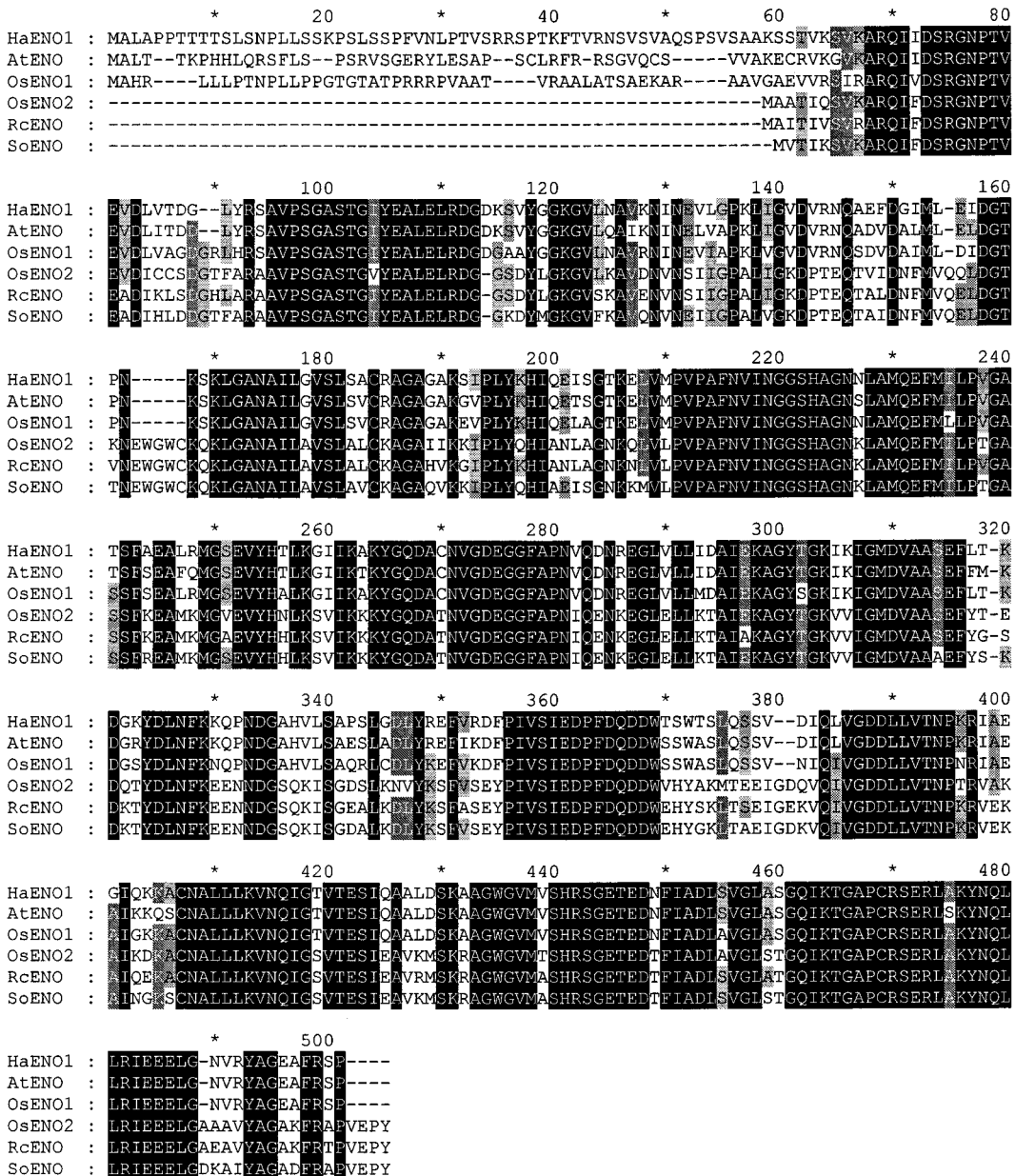


Figura 3.38. Alineamiento de secuencias aminoácidas de enolasas de plantas. Las regiones conservadas se muestran enmarcadas. Las secuencias empleadas en el alineamiento son: *Helianthus annuus* (EF137905), *Arabidopsis thaliana* (NP_177543), *Oryza sativa* (EAO08879, NP_001049556), *Ricinus communis* (P42896), *Spinacia oleracea* (CAB96173).

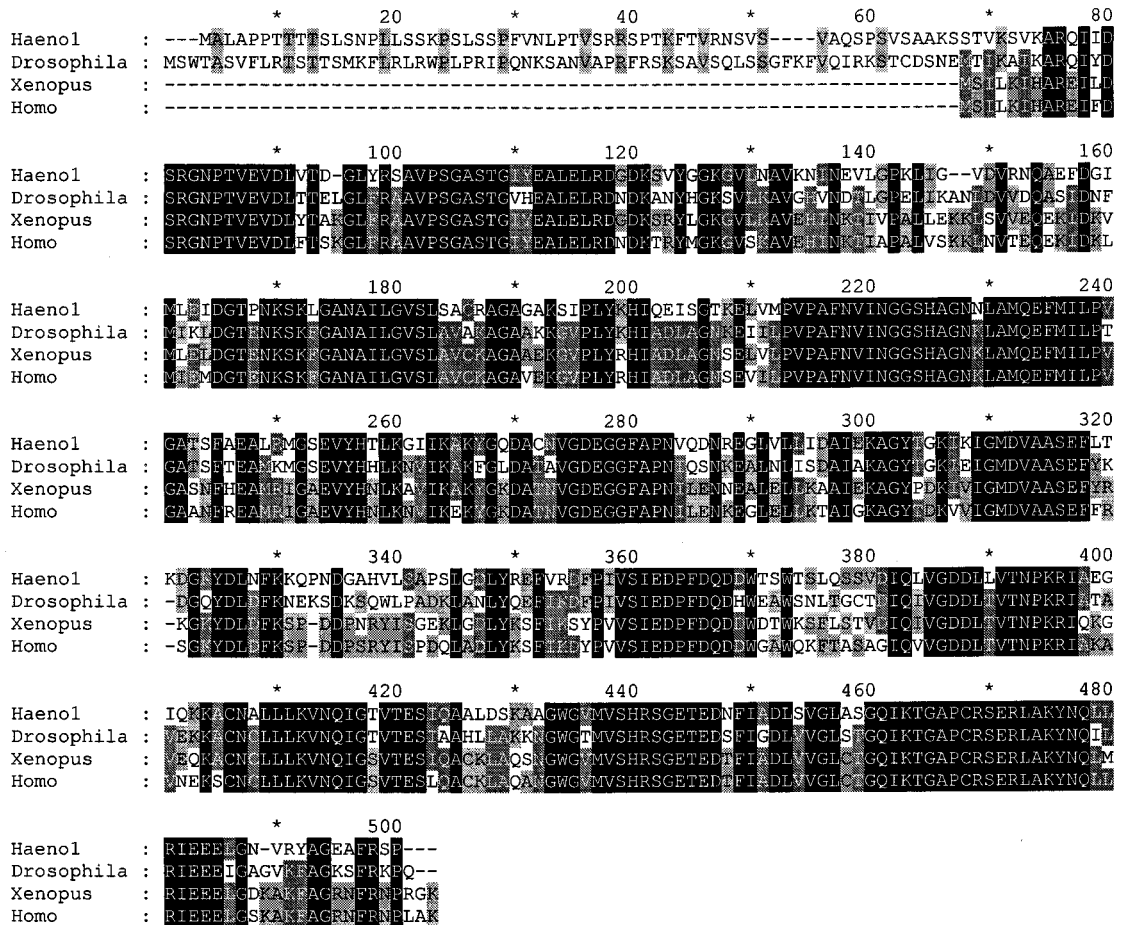


Figura 3.39. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de enolasas de diversos organismos. Las cajas conservadas se muestran enmarcadas. Las secuencias empleadas en el alineamiento son: *Helianthus annuus* (EF137905), *Drosophila melanogaster* (NP_722721), *Xenopus laevis* (NP_001080346) y *Homo sapiens* (NP_001419)

3.5.4. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica derivada de *Haeno1*.

La secuencia polipeptídica derivada del cDNA *Haeno1* se localiza junto con una enolasa de *Arabidopsis thaliana* y otra de *Oryza Sativa*, estando este grupo dentro de la rama mayoritaria que engloba a las enolasas de plantas, ya que aparece otra rama minoritaria que se sitúa dentro del árbol en una posición más próxima a las enolasas bacterianas.

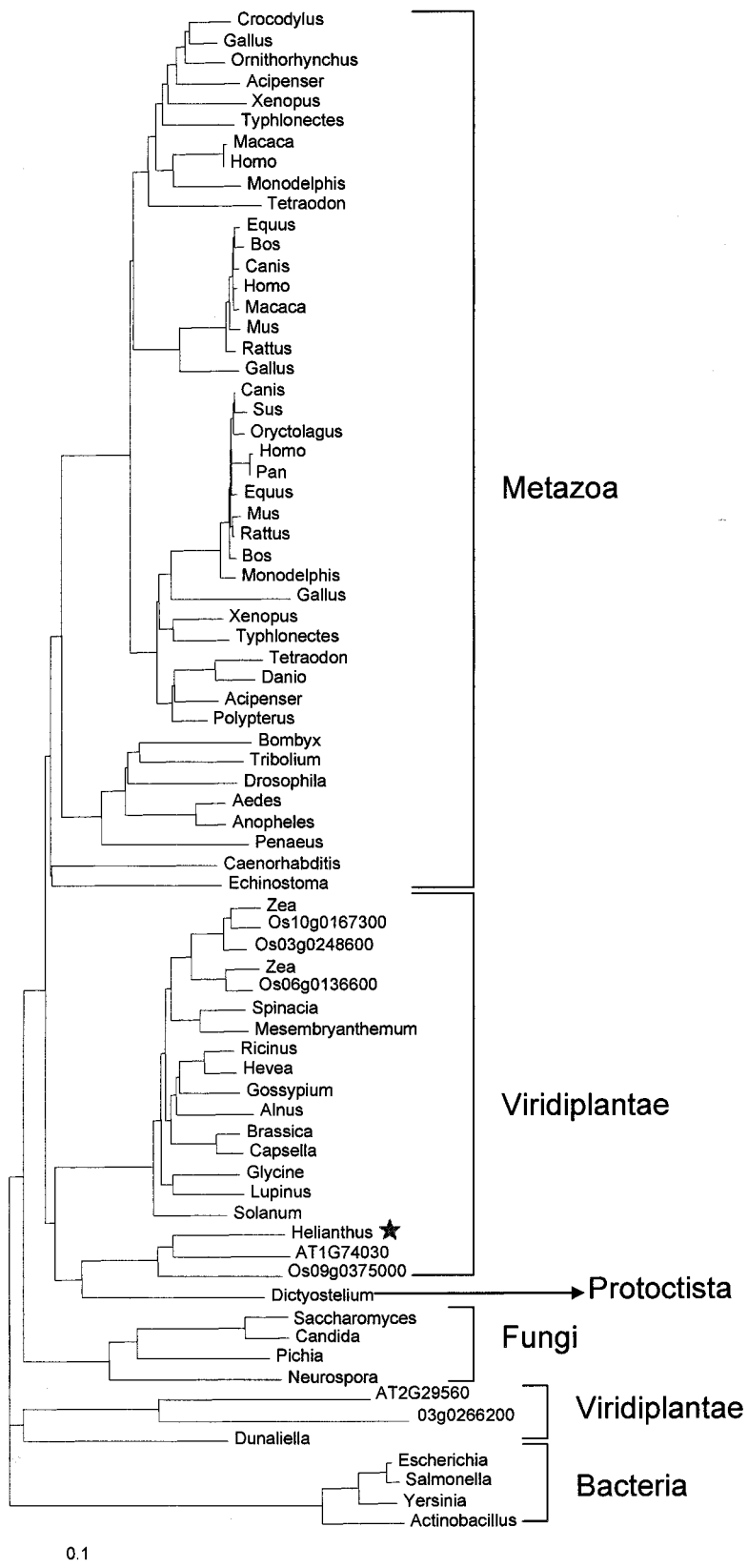


Figura 3.40. Árbol filogenético de las enzimas enolasas.

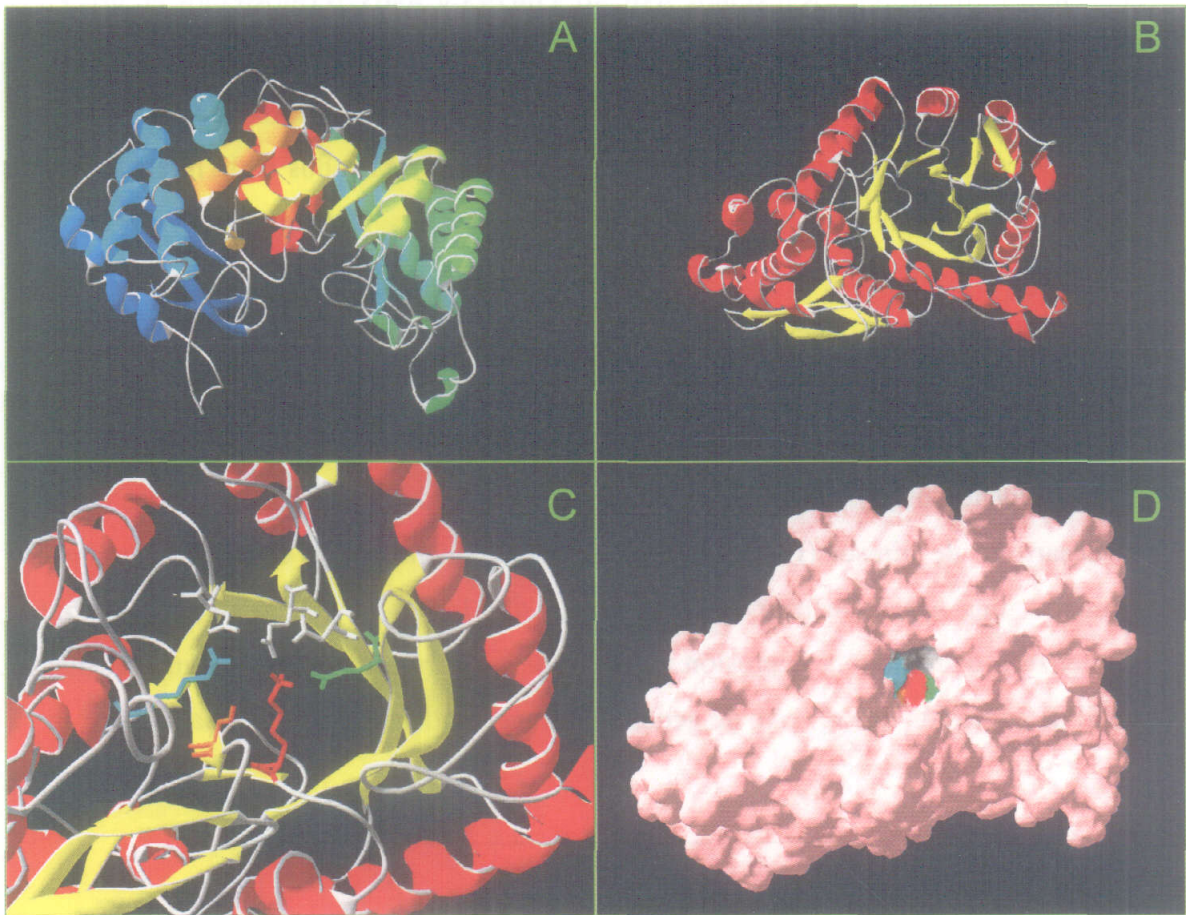
3.5.5. Predicción de la estructura terciaria de la proteína *HaENO1*.

Figura 3.41. Modelo estructural propuesto para *HaENO1*. A y B, dos vistas diferentes del diagrama de cintas de la estructura; C, detalle del sitio activo del enzima mostrando los residuos implicados en la catálisis (Glu224, verde; Lys453, rojo; Ser429, naranja; y Lys402, azul) y aquellos implicados en la unión a un ión metálico con alta afinidad (Asp246, Glu295 y Asp320 en gris); y D, modelo de la superficie molecular mostrado la oquedad del sitio activo y la disposición de los distintos residuos.

La secuencia polipeptídica de *HaENO1* mostró una alta identidad, un 67%, con la enolasa de humanos (*Homo sapiens*), cuya estructura es conocida (Chai *et al.* 2004), permitiendo la utilización de programas de modelado de proteínas basados en la homología con proteínas de estructuras cristalinas conocidas (Swiss-Model, Schwede *et al.* 2003; 3D-JIGSAW, Bates *et al.* 2001) y la obtención de un modelo estructural de *HaENO1* (Figura 3.41 A, B). En la estructura se pueden distinguir dos dominios, el N-terminal y el C-terminal, estando este último formado por un barril α/β de 8 pliegues con una topología $\beta\beta\alpha(\beta\alpha)_6$ (Figura 3.41 B). El sitio activo se encuentra situado en el extremo carboxilo del barril (Figura 3.41 C y D), algo que es común a todas las enzimas conteniendo una estructura en barril α/β (Farber and Petsko 1990). Para su actividad, la enolasa requiere de dos iones metálicos, unidos a un sitio de alta-afinidad o

conformacional, y otro de baja-afinidad o catalítico (Chai et al. 2004). El primero se encuentra formado por los residuos Asp246, Glu295 y Asp320 (mostrados en gris en la Figura 3.41 C), mientras que el segundo ión metálico se une a la enolasa en presencia del sustrato o inhibidor mediante dos oxígenos del sustrato, dos oxígenos del residuo S95 y dos moléculas de agua. El resto de los residuos implicados en la interacción con el sustrato y la catálisis son Glu224, Lys453, Ser429 y Lys402 (Figura 3.41 C y D).

3.5.6. Estudio de los niveles de expresión de *Haeno1*.

Los niveles de expresión se determinaron tal y como se describe en el apartado 2.2.3.10 de los Materiales y Métodos, caracterizándose la cinética de expresión del mRNA *Haeno1* durante la fase de acumulación de productos de reserva en las semillas en desarrollo de girasol (Figura 3.42), por el incremento de la expresión durante los primeros días hasta alcanzar un máximo el día 14 DDF. A partir de este punto comienza a disminuir la expresión del gen, de tal forma que éste presenta el mismo perfil de expresión que el resto de genes de la ruta estudiados en este trabajo.

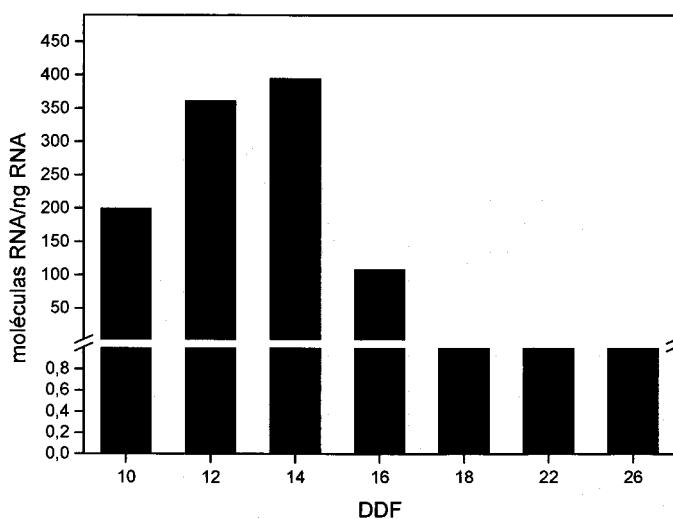


Figura 3.42. Medida de los niveles de expresión del mRNA *Haeno1* durante el desarrollo de las semillas de girasol pertenecientes a la línea CAS-6.

El análisis de los niveles de expresión en diferentes tejidos de la planta (Figura 3.43), nos indica que este gen se expresa fundamentalmente en los tejidos no fotosintéticos, ya que los niveles de mRNA determinados en los tejidos verdes son muy inferiores al de semillas en desarrollo y raíz.

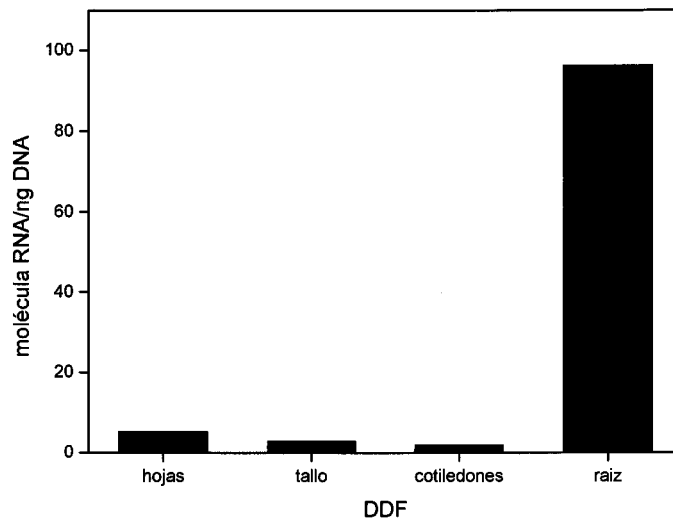


Figura 3.43. Niveles de expresión del mRNA *Haeno1* en diferentes tejidos de plántulas de girasol de la línea CAS-6.

4. EXPRESIÓN HETERÓLOGA, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE ENZIMAS DE LA RUTA GLUCOLÍTICA EN SEMILLAS EN DESARROLLO.

4.1. Expresión, purificación y determinación de los parámetros cinéticos de HaHXK1.

4.1.1. Expresión heteróloga y purificación de la proteína (6His) Δ HaHXK1.

Para la expresión heteróloga de *Hahxk1* se diseñaron un par de oligonucleótidos denominados BamHIHXK y HindIIIHXK (Materiales y Métodos, Tabla 2.4) que cumplieren dos condiciones, la primera de ellas fue que se eliminasen los primeros 24 aminoácidos del extremo N-terminal, de tal forma que la región de anclaje a la membrana no influyese durante el proceso y la segunda condición fue que ambos cebadores incluyesen en sus extremos dianas de restricción para las enzimas *BamHI* y *HindIII* (Materiales y Métodos, apartado 2.2.3.9.1). El producto de PCR obtenido fue clonado dentro del vector de expresión pQE-80L y la construcción resultante fue utilizada para transformar *E. coli* XL1-Blue (Materiales y Métodos, apartado 2.2.3.11). La proteína de fusión resultante presenta una extensión de seis histidinas en el extremo N-terminal y un tamaño de 482 aminoácidos, siendo su peso molecular estimado de 52,6 KDa.

Una vez transformadas las bacterias con la construcción se procedió a la inducción del cultivo (Materiales y Métodos, apartado 2.2.3.12) y por último se purificó la proteína recombinante (Materiales y Métodos, apartado 2.2.3.12) a homogeneidad electroforética (Figura 4.1)

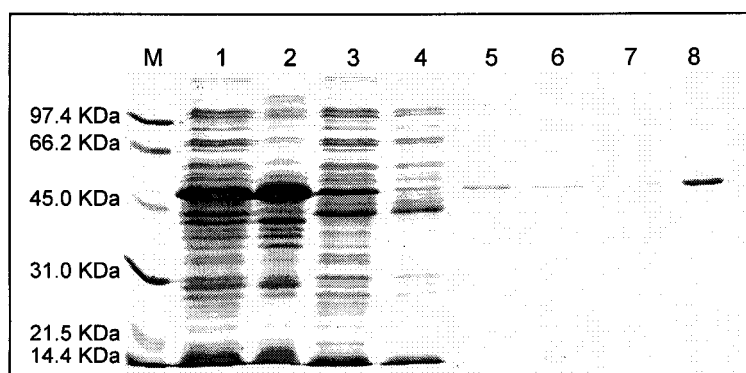


Figura 4.1. Análisis mediante SDS-PAGE de los pasos de la purificación de la proteína recombinante (6His) Δ HaHXK1. M, marcador molecular; 1, extracto total; 2, fracción insoluble; 3, sobrenadante; 4, fracción a través de la columna; 5, 6 y 7, fracciones de lavado de la columna; 8, proteína purificada.

La proteína purificada presentó una actividad de 19,3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína (19,3 U/mg proteína), que hasta la fecha se corresponde con la actividad específica más alta descrita para hexoquinasas de plantas (Claeyssen y col., 2005).

4.1.2. Efectos del pH sobre la actividad de (6His) Δ HaHXK1.

Una vez purificada la proteína y determinada su actividad específica se procedió a estudiar el comportamiento de ésta en función del pH, para lo cual se midió la actividad glucoquinasa en medios con distintos valores de pH (Materiles y Métodos, apartado 2.2.1.9).

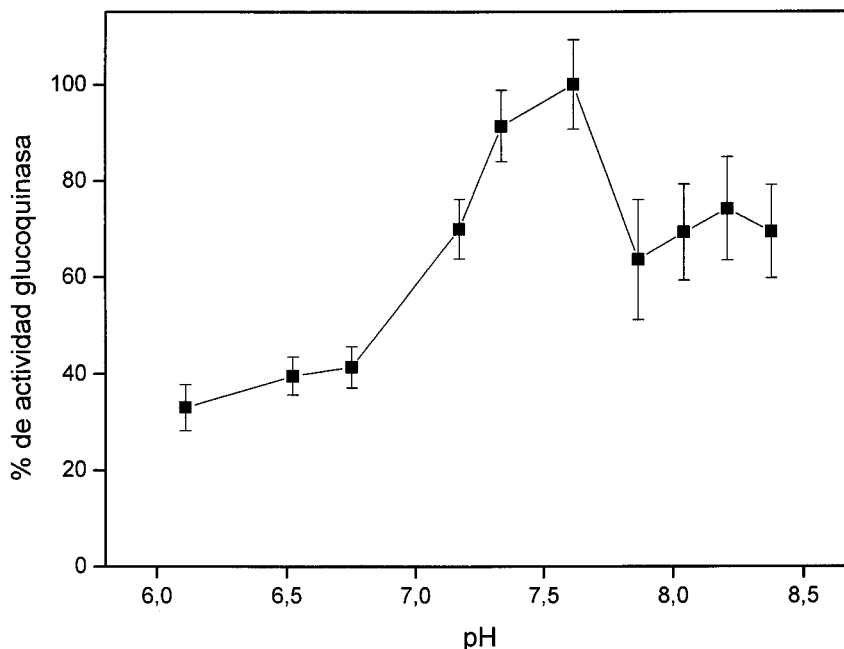


Figura 4.2. Efectos de la variación del pH sobre la actividad de (6His) Δ HaHXK1. Los datos presentados son medias de 3 experimentos con la desviación estándar que se muestra.

A valores de pH ácido la actividad es mínima, siendo inferior al 40 %, pero a medida que el pH del medio se acerca a valores próximos a la neutralidad la actividad aumenta rápidamente, volviendo a disminuir una vez alcanzado el valor óptimo, que a diferencia de otras isoenzimas que presentan el máximo de actividad para valores comprendidos entre 8 y 8,7 (Doehlert, 1989; Renz y Stitt, 1993; Veramendi y col., 1999; Claeyssen y col., 2005), la proteína recombinante 6(His) Δ HaHXK1 alcanza su máximo de actividad entorno a 7,5.

Al igual que para otras isoenzimas (Renz y Stitt, 1993; Galina y col., 1995; Bouny y Saglio, 1996; Claeysen y col., 2005), la proteína recombinante (6His) Δ HaHXK1 disminuye su actividad en condiciones ácidas citoplasmáticas, pudiendo ser esta caída de la actividad un mecanismo de adaptación a la acidosis citoplasmática que aparece en condiciones de hipoxia, que modifica el pH de 7,5 a 6,8.

4.1.3. Efectos de la temperatura sobre la actividad de (6His) Δ HaHXK1.

La estabilidad térmica, estudiada tal y como se describe en el apartado 2.2.1.9 de Materiales y Métodos de la proteína recombinante (6His) Δ HaHXK1 se representa en la siguiente figura.

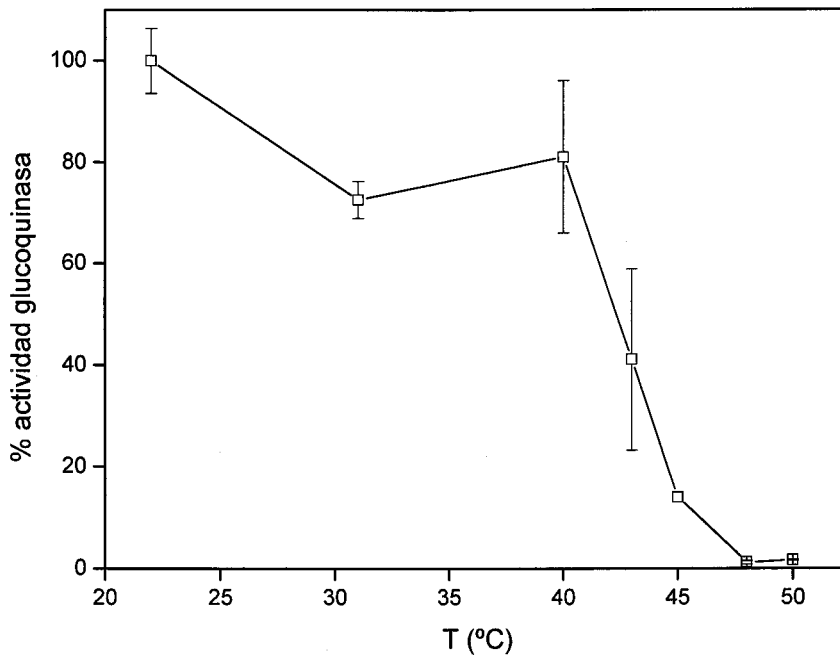


Figura 4.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad glucoquinasa. Los datos presentados son medias de tres experimentos con la desviación estándar que se muestra.

A partir de los datos que aparecen en la gráfica se deduce que a partir de los 40°C la proteína comienza a perder actividad de forma significativa, alcanzándose valores cercanos a cero entorno a los 50°C.

4.1.4. Características cinéticas de la proteína recombinante (6His) Δ HaHXK1.

Se han determinado las constantes cinéticas para la proteína recombinante (6His) Δ HaHXK1 utilizando diferentes sustratos (glucosa, fructosa, manosa, ATP, UTP, CTP y GTP) a distintos valores de pH (7, 7,6 y 8,2) tal y como se describe en el apartado 2.2.1.8 de los Materiles y Métodos.

En la Figura 4.4 se muestra el efecto de la concentración de los distintos monosacáridos utilizados: glucosa, fructosa y manosa.

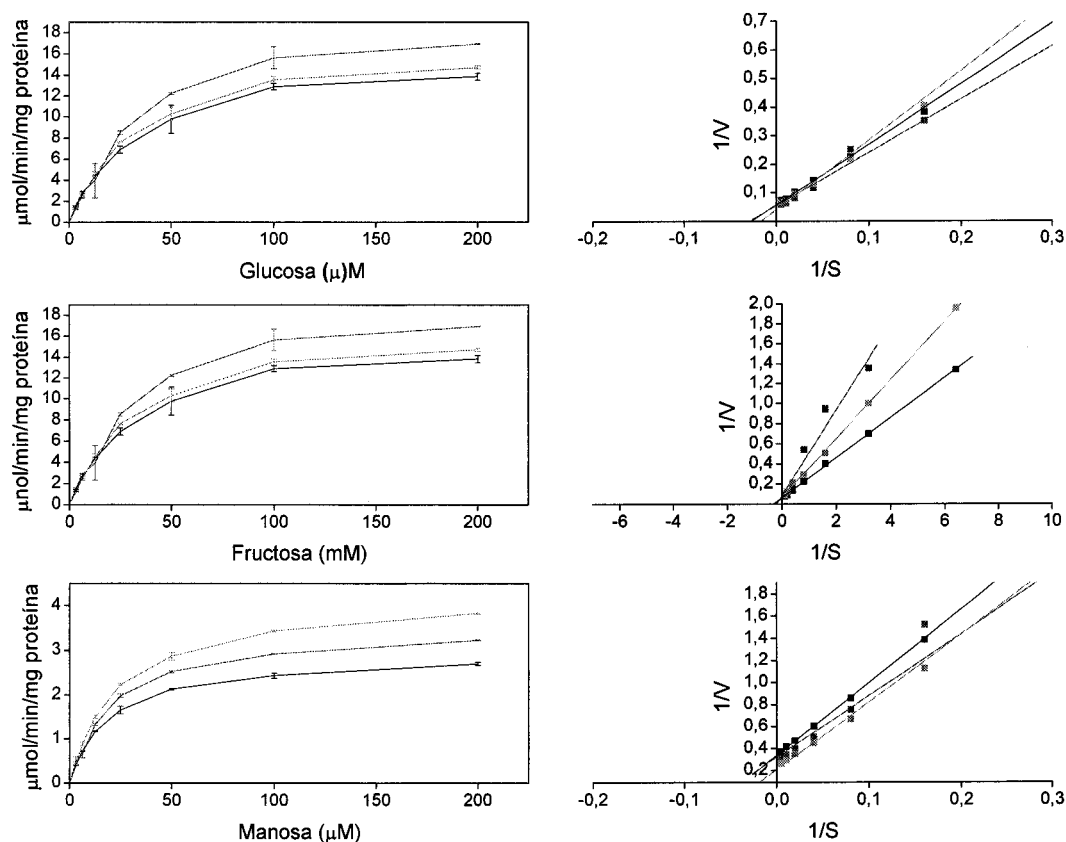


Figura 4.4. Efecto de las concentraciones crecientes de sustrato sobre la actividad. En el panel de la derecha se muestra la evolución de la actividad en función del incremento de la concentración de sustrato para los tres valores de pH estudiados. En el panel de la izquierda se muestra la representación de Lineweaver-Burk de los valores obtenidos. El valor de pH empleado en cada una de las determinaciones se identifica mediante el color de las líneas representadas en la Figura (pH 7 negro; pH 7,6 rojo; pH 8,2 verde). Los datos muestran la media de tres repeticiones junto con la desviación típica.

A continuación se determinó las constantes cinéticas utilizando como sustratos los nucleótidos ATP, UTP, CTP y GTP (Figura 4.5).

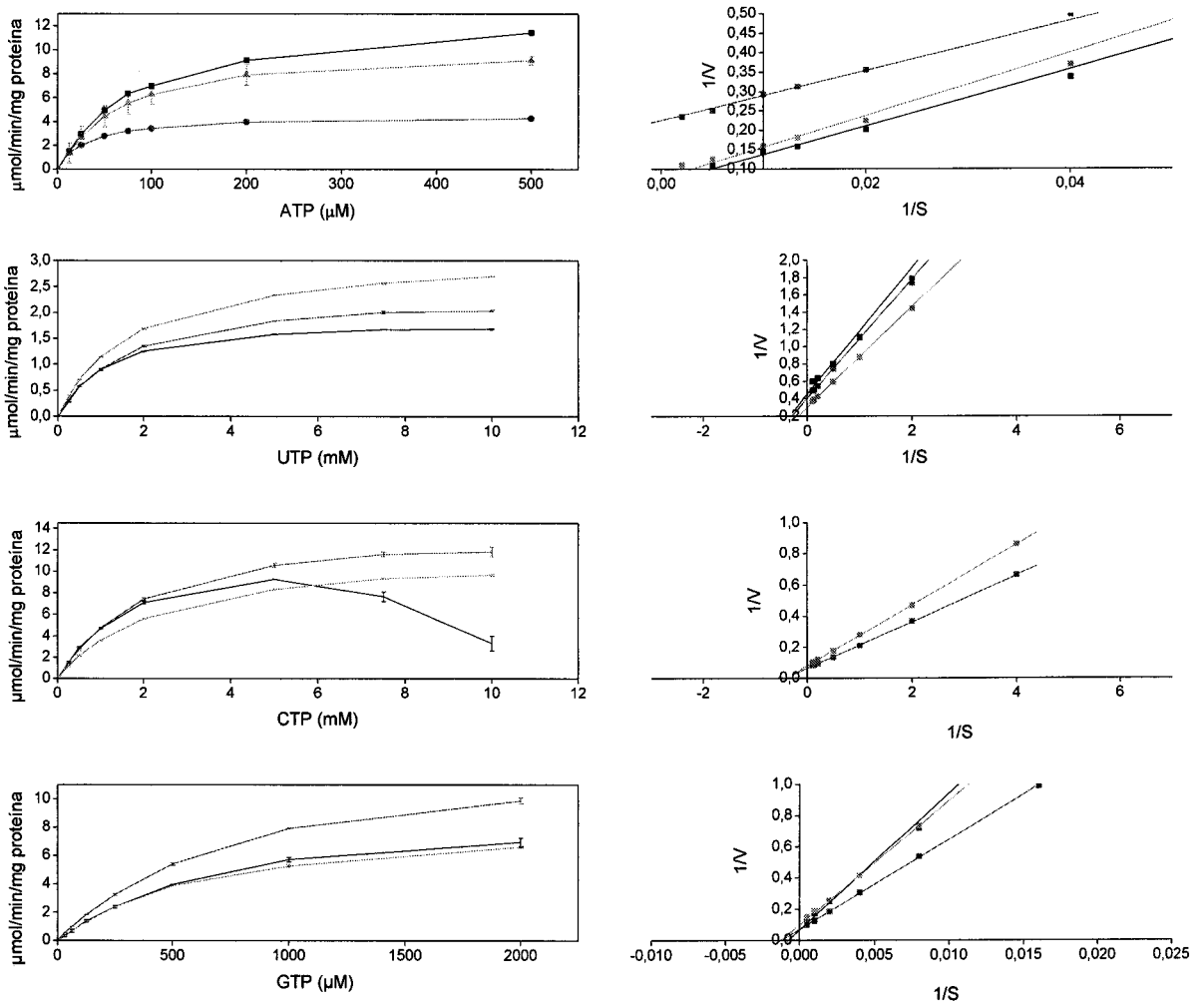


Figura 4.5. Efecto de las concentraciones crecientes de sustrato sobre la actividad. En el panel de la derecha se muestra la evolución de la actividad en función del incremento de la concentración de sustrato para los tres valores de pH estudiados. En el panel de la izquierda se muestra la representación de Lineweaver-Burk de los valores obtenidos. El valor de pH empleado en cada una de las determinaciones se identifica mediante el color de las líneas representadas en la figura (pH 7 negro; pH 7,6 rojo; pH 8,2 verde). Los datos muestran la media de tres repeticiones junto con la desviación típica.

Sustrato	Parámetros cinéticos	pH 7	pH 7,6	pH 8,2
Glucosa	Vmax	16,56± 0,36	20,93± 0,94	17,63± 0,41
	Km	33,80± 2,15	38,72± 4,86	34,46± 2,30
	Vmax/Km	0,49	0,54	0,51
Fructosa	Vmax	17,88± 0,35	17,57± 0,64	16,10± 1,06
	Km	3625,60± 163,80	4567,00± 372,00	5145,70± 697,40
	Vmax/Km	0,005	0,004	0,003
Manosa	Vmax	2,93± 0,02	3,59± 0,08	4,26± 0,04
	Km	19,11± 0,40	21,64± 1,54	23,39± 0,62
	Vmax/Km	0,15	0,17	0,18
ATP	Vmax	13,38± 0,20	4,52± 0,04	10,54± 0,18
	Km	88,16± 3,47	30,54± 0,95	69,48± 3,38
	Vmax/Km	0,15	0,15	0,15
UTP	Vmax	19,14± 0,33	23,95± 0,27	31,69± 0,08
	Km	1162,60± 72,30	1598,20± 59,10	1791,70± 13,70
	Vmax/Km	0,02	0,01	0,02
CTP	Vmax	-	14,52± 0,26	12,08± 0,14
	Km	-	1993,00± 109,50	2317,50± 76,30
	Vmax/Km	-	0,01	0,01
GTP	Vmax	9,60± 0,22	13,92± 0,23	8,79± 0,10
	Km	717,64± 37,85	788,74± 28,69	654,10± 18,11
	Vmax/Km	0,01	0,02	0,01

Tabla 4.1. Parámetros cinéticos determinados para la proteína recombinante (6His) Δ HaHXK1. Vmax, velocidad máxima ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteínas); Km, constante de Michaelis-Mente (μM). Los datos se corresponden a la media de tres repeticiones junto con la desviación estandar correspondiente.

La eficiencia catalítica, representada por la relación Vmax/Km, no se ve afectada en gran medida por los diferentes valores de pH empleados, afectando éstos fundamentalmente a las velocidades máximas descritas para los distintos nucleótidos y para la glucosa, ya que los valores determinados tanto para la fructosa como la manosa no se modifican significativamente dentro del rango de pH estudiado.

Atendiendo a los sustratos susceptibles de ser fosforilados por la enzima, se aprecia como la máxima afinidad se observa para la glucosa ($K_m = 38,72 \pm 4,86 \mu\text{M}$, pH 7.6) y la manosa ($K_m = 17,57 \pm 0,64 \mu\text{M}$, pH 7.6), mientras que la enzima presenta una afinidad muy inferior por la fructosa ($K_m = 4567,00 \pm 372,00 \mu\text{M}$, pH 7.6), siendo además la eficiencia catalítica para las dos primeras muy superior a la fructosa, por lo que la enzima fosforilaría preferentemente la glucosa o manosa existentes en el citosol.

De todos los nucleósidos trifosfatos estudiados, la enzima utilizaría preferentemente el ATP ya que presenta una eficiencia catalítica muy superior al resto. Similares resultados han sido descritos en diferentes tejidos de plantas (Claeyssen y col., 2006; Renz y Stitt, 1993; Doehlert, 1989).

La determinación de los parámetros cinéticos de la enzima cuando se utilizó CTP como sustrato a pH 7 (Figura 4.5) no pudo realizarse, ya que la evolución de la actividad con respecto al incremento de la concentración de sustrato no se ajustó a una cinética de Michaelis-Mente, presentando un máximo y posteriormente una disminución de la actividad, pudiendo ser debido este fenómeno a mecanismos de inhibición por sustrato.

4.1.5. Estudio del efecto de posibles metabolitos inhibidores de la actividad.

Se ha estudiado el posible efecto inhibitor de varios metabolitos sobre la actividad glucoquinasa de la proteína recombinante (6His) Δ HaXK1 (Tabla 4.2). Los metabolitos incluidos fueron: ADP, glucosa-6-fosfato y trealosa-6-fosfato.

El metabolito trealosa-6-fosfato ha sido propuesto como un posible regulador de la glucolisis de plantas a través de su efecto inhibitor sobre la actividad hexoquinasa (Schluepmann y col., 2003) por analogía con el modelo descrito en levaduras (Thevelein y col., 1995). Sin embargo, coincidiendo con otros resultados obtenidos en plantas (Wiese y col., 1999; Eastmond y col., 2002; Claeyssen y col., 2006), la actividad de la enzima (6His) Δ HaHXK1 no se ve afectada por la trealosa-6-fosfato.

Otro de las moléculas estudiadas fue la glucosa-6-fosfato, que aunque a diferencia de lo descrito para animales donde sí presenta un efecto inhibitor sobre las enzimas hexoquinasas, en levaduras y en la mayoría de plantas no se ha descrito un efecto de retroinhibición mediado por la glucosa-6-fosfato (Schluepmann y col., 2003), coincidiendo con lo encontrado en el caso de la proteína recombinante de girasol, donde incluso se produce un leve aumento de la actividad, siendo este fenómeno igualmente descrito en otras especies vegetales (Claeyssen y col., 2006).

De los metabolitos estudiados el único que presentó un claro efecto inhibitor de la actividad fue el ADP. La inhibición mediada por esta molécula ha sido descrita con anterioridad en otras plantas (Galina y col., 1995; Menu y col., 2001; da Silva y col., 2001; Galina y col., 1999; Claeyssen y col., 2006), pudiendo estos datos sugerir un mayor papel importante de la relación ATP/ADP en la regulación de la actividad hexoquinasa en plantas.

El efecto inhibitor del ADP junto con la modificación de la actividad en función del pH (Figura 4.2), podrían afectar a la enzima en determinadas condiciones. Durante los periodos de hipoxia se produce un descenso del pH (Roberts y col., 1984) junto con un aumento del ADP (Hooks y col., 1994), por lo que se vería afectada la actividad hexoquinasa disminuyendo la fosforilación de hexosas.

Metabolitos ensayados	Concentración (mM)	% Actividad glucoquinasa
ADP	0,05	92,6
	0,1	59,5
	0,25	41,4
	0,5	37,2
	1	23,0
Glucosa-6-fosfato	0,1	101,6
	0,5	108,0
	1	98,4
	5	122,8
	10	137,0
Trealosa-6-fosfato	0,25	97,4
	0,5	98,4
	1	115,6

Tabla 4.2. Efecto de varios metabolitos sobre la actividad de la proteína recombinante (6His) Δ HaHXK1.

4.2. Expresión, purificación y determinación de los parámetros cinéticos de la enzima fosfoglucoasa isomerasa citosólica de girasol HacPGI1.

4.2.1. Expresión heteróloga y purificación de la proteína (6His)HacPGI1.

A diferencia del caso anterior, para la expresión heteróloga y posterior purificación de la proteína recombinante (6His)HacPGI1 no se eliminó ninguna secuencia aminoacídica de ésta y los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la secuencia utilizada para la expresión heteróloga incluyeron las dianas de restricción *Sph I* y *Pst I* (Materiales y Métodos, Figura 2.4). El resto del proceso fue realizado de igual forma que en el caso anterior (Resultados y Discusión, apartado 4.1.1), obteniéndose, tal como se muestra en la Figura 4.6, una proteína recombinante de un tamaño de 572 aminoácidos y un peso molecular estimado de 63.1 KDa.

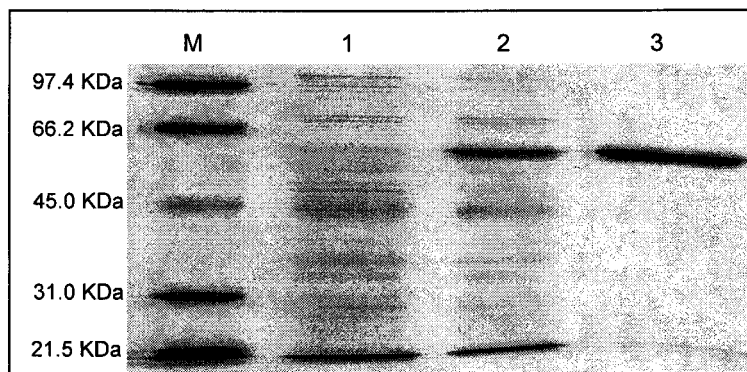


Figura 4.6. Análisis mediante SDS-PAGE de los pasos de la purificación de la proteína recombinante (6His)HacPGI1. M, marcador molecular; 1, extracto total sin inducción; 2, extracto total inducido; 3, proteína purificada.

Una vez purificada la proteína recombinante se determinó la actividad en ambos sentidos de la reacción, ya que ésta es reversible, es decir, cataliza la formación de glucosa-6-P a partir de fructosa-6-P y viceversa. A pH 7,6, la actividad específica de la enzima es de aproximadamente 1242 y 752 U/mg proteína para la glucosa-6-fosfato y la fructosa-fosfato, respectivamente.

4.2.2. Efectos del pH sobre la actividad de (6His)HacPGI1.

Una vez purificada la proteína y determinada su actividad específica se procedió a estudiar el comportamiento de ésta en función del pH, para lo cual se determinó la actividad enzimática utilizando ambos sustratos, estudiándose la influencia de los diferentes sustratos en la actividad dependiendo del pH del medio (Figura 4.7).

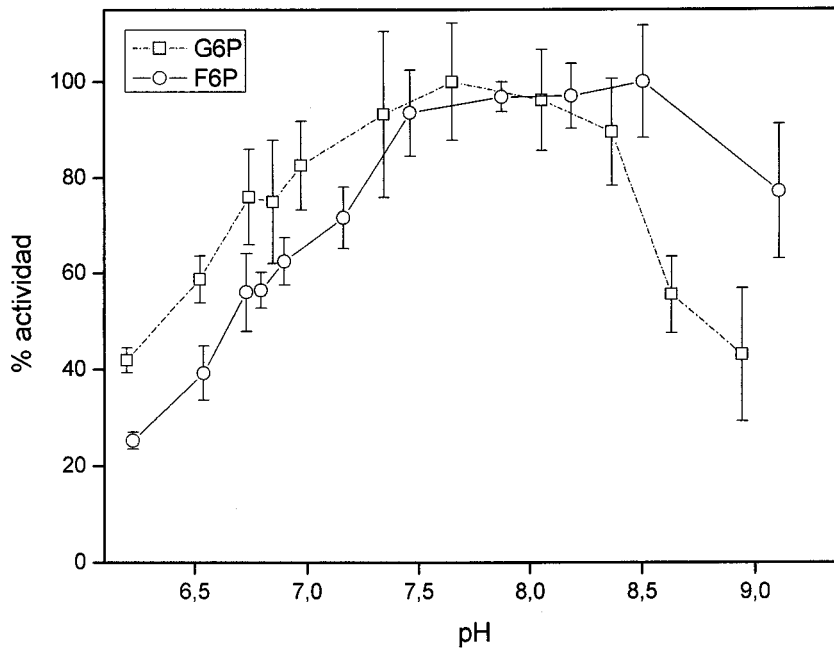


Figura 4.7. Efectos de la variación del pH sobre la actividad de (6His)HacPGII. Los datos presentados son medias de tres experimentos con la desviación estándar que se muestra.

Tal y como se muestra en la Figura 4.7, la evolución de la actividad en función del pH dependió del metabolito utilizado como sustrato, ya que cuando se inicia la reacción con la glucosa-6-fosfato el valor óptimo de actividad se alcanza antes, entre 7,5 y 8, disminuyendo rápidamente a valores más altos de pH, mientras que por el contrario, cuando se utiliza la fructosa-6-fosfato el valor óptimo se alcanza a valores más básicos, alrededor de 8,5.

4.2.3. Efectos de la temperatura sobre la actividad de (6His)*HacPGI1*.

Una vez estudiado el efecto del pH sobre la actividad se determinó el que produciría la temperatura sobre la misma (Figura 4.8)

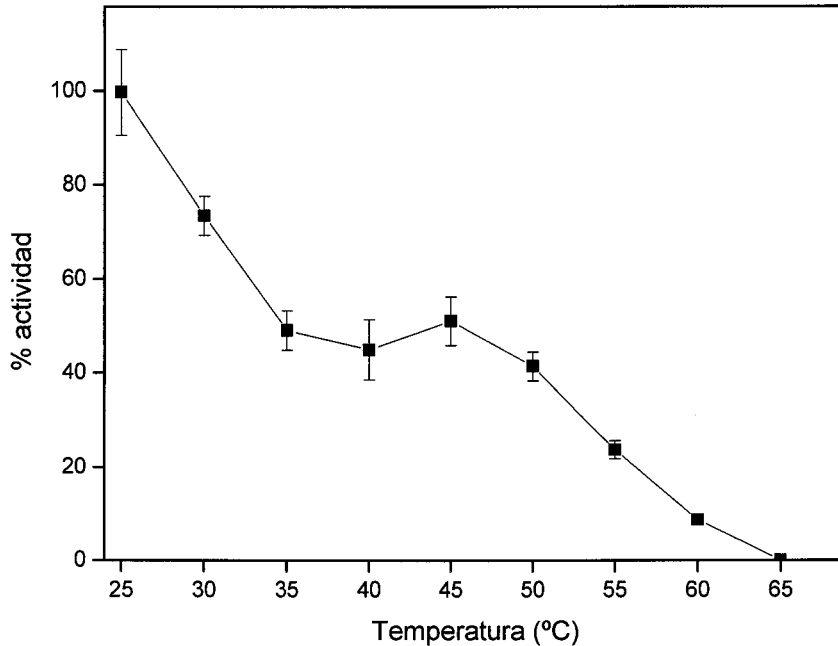


Figura 4.8. Efecto de la temperatura sobre la actividad glucoquinasa. Los datos presentados son medias de tres experimentos con la desviación estándar que se muestra.

Al estudiar el efecto de la temperatura sobre la actividad se pudieron distinguir tres etapas, una primera donde para pequeños incrementos de temperatura se produce una disminución importante de la actividad, una segunda, desde 35°C a aproximadamente 50°C, donde la enzima parece no verse afectada en gran medida por los cambios de temperatura y una tercera etapa en la cual al igual que la inicial se produce un fuerte descenso de la actividad llegando a ser indetectable a valores entorno a 65°C.

HacPGI es una enzima dimérica, puede estar indicando la temperatura de disociación del dímero y la pérdida de actividad del monómero.

4.2.4. Características cinéticas de la proteína recombinante (6His)*HacPGI1*.

Se han determinado los parámetros cinéticos en ambos sentidos de la reacción (Tabla 4.3), empleándose tanto la glucosa-6-fosfato como la fructosa-6-fosfato como sustratos iniciadores de la reacción.

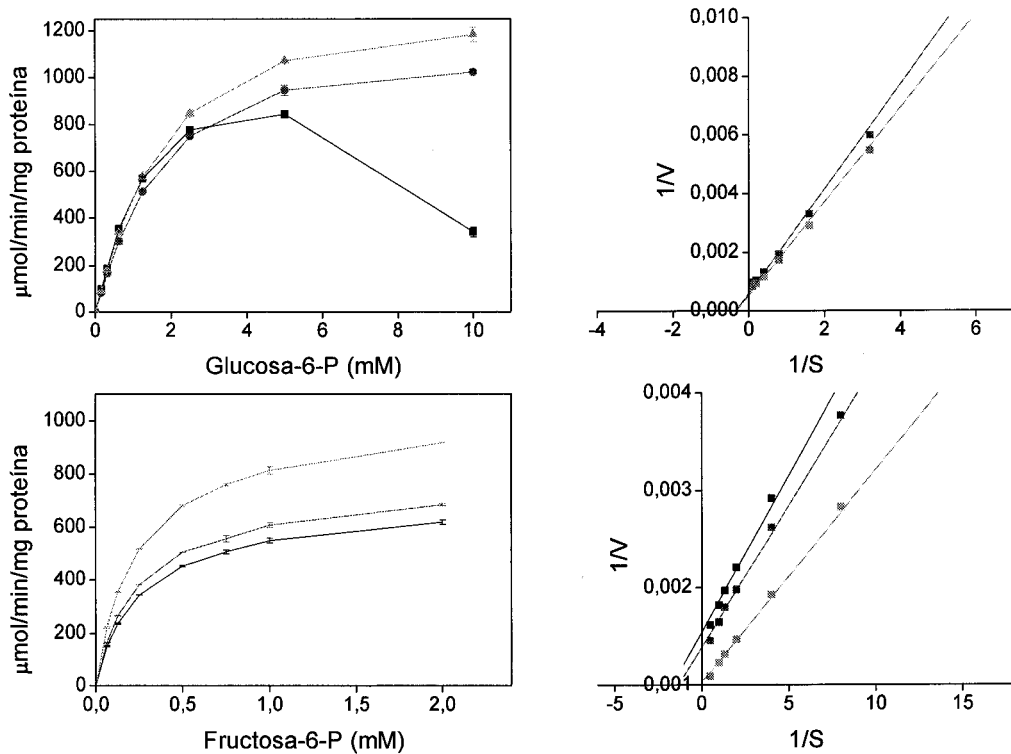


Figura 4.9. Efecto de las concentraciones crecientes de sustrato sobre la actividad. En el panel de la derecha se muestra la evolución de la actividad en función del incremento de la concentración de sustrato para los tres valores de pH estudiados. En el panel de la izquierda se muestra la representación de Lineweaver-Burk de los valores obtenidos. El valor de pH empleado en cada una de las determinaciones se identifica mediante el color de las líneas representadas en la figura (pH 7 negro; pH 7,6 rojo; pH 8,2 verde). Los datos muestran la media de tres repeticiones junto con la desviación típica.

Sustrato	Parámetros cinéticos	pH 7	pH 7,6	pH 8,2
Glucosa-6-P	V _{max}	-	1242,09± 35,07	1436,96± 34,83
	K _m	-	1779,20± 0,14	1866,70± 0,13
	V _{max} /K _m	-	0,70	0,77
Fructosa-6-P	V _{max}	682,86± 10,33	752,06± 11,62	1011,91± 11,02
	K _m	243,40± 0,01	238,00± 0,01	236,70± 0,01
	V _{max} /K _m	2,81	3,16	4,28

Tabla 4.3. Parámetros cinéticos determinados para la proteína recombinante (6His)*HacPGI1*. V_{max}, velocidad máxima (μmol/min/mg proteínas); K_m, constante de Michaelis-Mente (μM). Los datos se corresponden a la media de tres repeticiones junto con la desviación estándar correspondiente.

De los parámetros cinéticos descritos en la tabla 4.3, se deduce que aunque la velocidad máxima es superior para el sustrato glucosa-6-P la eficiencia catalítica es mayor para la fructosa-6-P, además la eficiencia catalítica para este sustrato se ve afectada por el pH del medio. La determinación de los parámetros cinéticos cuando se utilizó la glucosa-6-P a pH 7 no se pudo realizar debido a un posible mecanismo de inhibición por sustrato ya que como se aprecia en la gráfica se produce un descenso de la actividad a partir de una determinada concentración de sustrato.

4.2.5. Estudio del efecto de posibles metabolitos inhibidores de la actividad.

Se han ensayado diversas moléculas para estudiar posibles efectos de inhibición sobre la enzima recombinante (6His)*HacPGI1* (Tabla 4.4).

Metabolitos ensayados	Concentración (mM)	%Actividad
Eritrosa-4-P	8	-
Ribosa-5-P	8	-
3-Fosfoglicerato	10	-
Dihidroxiacetonafosfato	1.4	-
6-Fosfogluconato	0,3125	83,2
	0,625	75,5
	1,25	60,8
	2,5	37,7
	5	26,2
	10	12,6
Gliceraldehido-3-P	0,06	95,4
	0,12	86,5
	0,24	72,4
	0,48	59,3
	0,96	41,3

Tabla 4.4. Efecto de varios metabolitos sobre la actividad de la proteína recombinante (6His) Δ *HacPGI1*.

De todas las moléculas estudiadas solo el 6-fosfogluconato y el gliceraldehido3-fosfato presentaron efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima recombinante. Ambos metabolitos podrían tener un importante papel regulador ya que son metabolitos

intermediarios de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato y de la glucólisis respectivamente. Aunque para conocer el efecto *in vivo* de estas moléculas sería necesario determinar primero las concentraciones celulares en las que se encuentran.

4.3. Expresión, purificación y determinación de los parámetros cinéticos de la enzima fosfoglicerato quinasa citosólica de girasol, *HacPGK1*.

4.3.1. Expresión heteróloga y purificación de la proteína (6His)*HacPGK1*.

La expresión heteróloga y posterior purificación de la proteína recombinante (6His)*HacPGK1* se realizó siguiendo el protocolo utilizado en el caso anterior (Resultados y Discusión, apartado 4.2.1).

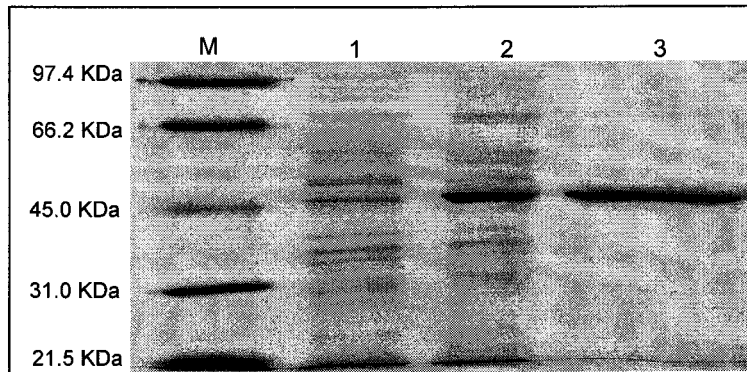


Figura 4.10. Análisis mediante SDS-PAGE de los pasos de la purificación de la proteína recombinante (6His)*HacPGK1*. M, marcador molecular; 1, extracto total sin inducción; 2, extracto total inducido; 3, proteína purificada.

La actividad específica determinada para la proteína recombinante a pH 8,2 fue de aproximadamente 15,3 U/mg proteína.

4.3.2. Efectos del pH sobre la actividad de (6His)*HacPGK1*.

Al igual que en los casos anteriores también se estudió el efecto del pH sobre la actividad (Figura 4.11)

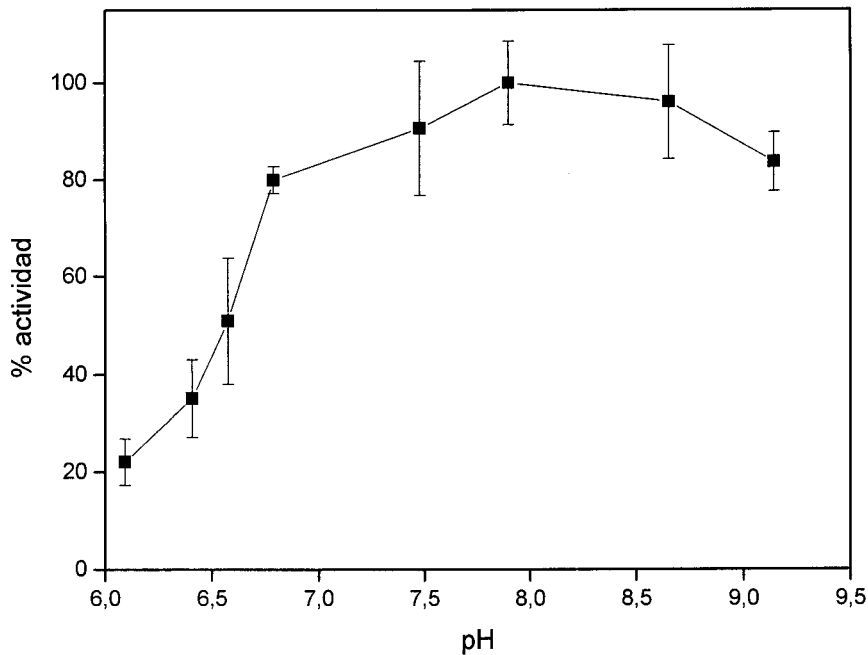


Figura 4.11. Efectos de la variación del pH sobre la actividad de (6His)HacPGK1. Los datos presentados son medias de tres experimentos con la desviación estándar que se muestra.

Como se observa en la Figura 4.11, la enzima presenta un pH óptimo entorno a 8, mientras que a valores superiores comienza a disminuir la actividad. La actividad enzimática comienza a aumentar a medida que lo hace el pH hasta llegar a valores cercanos a 7, donde se estabiliza hasta sobrepasar 8,5 donde comienza a disminuir la actividad.

4.3.3. Efectos de la temperatura sobre la actividad de (6His)HacPGK1.

Como se puede observar en la Figura 4.12, la actividad enzimática no se ve muy afectada hasta pasado los 40°C, momento a partir del cual se hace más pronunciada la pendiente y pequeños incrementos de temperatura provocan importantes bajadas de la actividad, hasta desaparecer ésta entorno a los 60°C.

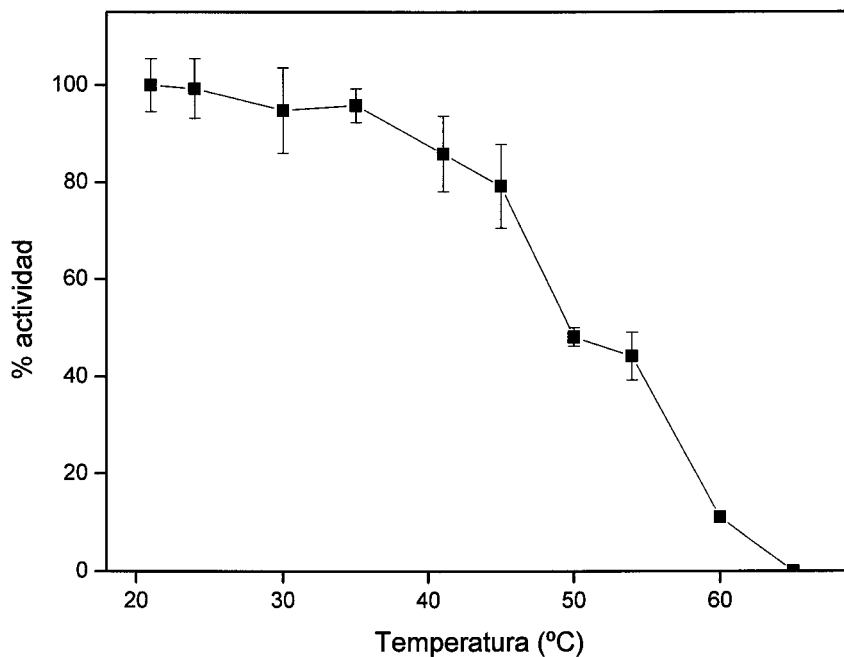


Figura 4.12. Efecto de la temperatura sobre la actividad fosfoglicerato quinasa, (6His)HacPGK1. Los datos presentados son medias de tres experimentos con la desviación estándar que se muestra.

4.3.4. Características cinéticas de la proteína recombinante (6His)HacPGK1.

Para la caracterización cinética de la proteína recombinante (6His)HacPGK1 y debido a la reversibilidad de la reacción, ésta fue ensayada utilizando como sustrato el 3-fosfoglicerato y como donador de grupos fosfato se utilizó el ATP.

Sustrato	Parámetros cinéticos	pH 7	pH 7,6	pH 8,2
3-PGA	Vmax	14,62 ± 0,23	14,67 ± 0,31	15,26 ± 0,20
	Km	1948,60 ± 96,4	1787,90 ± 121,1	1635,10 ± 176,7
	Vmax/Km	0,008	0,008	0,009
ATP	Vmax	10,62 ± 0,09	10,75 ± 0,31	10,13 ± 0,28
	Km	243,30 ± 5,7	227,60 ± 17,4	215,70 ± 15,9
	Vmax/Km	0,044	0,047	0,047

Tabla 4.5. Parámetros cinéticos determinados para la proteína recombinante (6His)HacPGK1. Vmax, velocidad máxima ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteínas); Km, constante de Michaelis-Mente (μM). Los datos se corresponden a la media de tres repeticiones junto con la desviación estándar correspondiente.

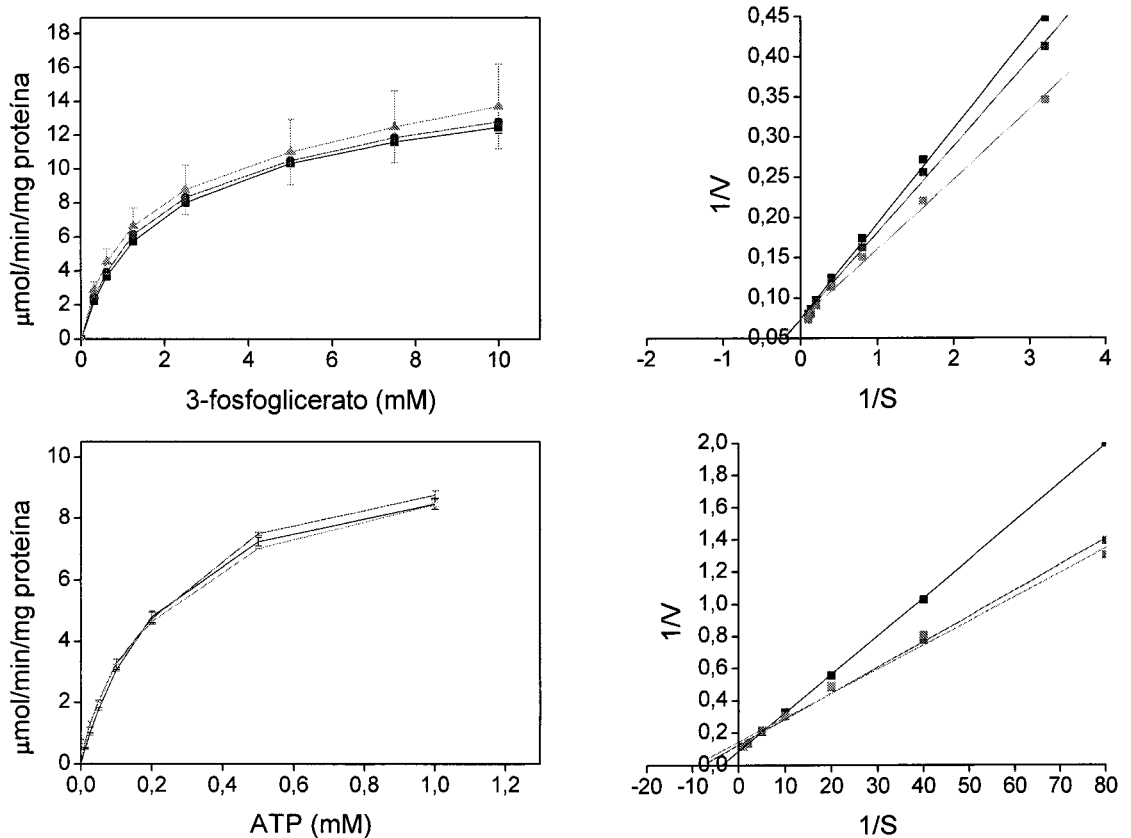


Figura 4.13. Efecto de las concentraciones crecientes de sustrato sobre la actividad. En el panel de la derecha se muestra la evolución de la actividad en función del incremento de la concentración de sustrato para los tres valores de pH estudiados. En el panel de la izquierda se muestra la representación de Lineweaver-Burk de los valores obtenidos. El valor de pH empleado en cada una de las determinaciones se identifica mediante el color de las líneas representadas en la figura (pH 7 negro; pH 7,6 rojo; pH 8,2 verde). Los datos muestran la media de tres repeticiones junto con la desviación típica.

Cuando se comparan los resultados obtenidos durante la caracterización cinética de la enzima recombinante (6His)HacPGK1 y otras enzimas fosfoglicerato quinasas de plantas (los parámetros cinéticos pueden ser consultados en la base de datos BRENDA, <http://www.brenda-enzymes.info/>) se observa como aunque los valores descritos para las constantes de Michaelis-Mente son similares, los niveles de actividad son superiores a los determinados para la isoenzima de girasol.

4.3.5. Estudio del efecto de posibles metabolitos inhibidores de la actividad.

Para finalizar la caracterización de la enzima recombinante (6His)HacPGK1, se precedió al estudio de los posibles metabolitos inhibidores de la actividad (Tabla 4.6).

De todos los metabolitos estudiados tan solo el ADP y el AMP tuvieron un efecto inhibitor significativo sobre de la actividad de la proteína (6His)*HacPGK1*, pudiendo relacionarse de esta forma el estado energético celular y la actividad glucolítica a nivel de la enzima (6His)*HacPGK1* al igual que ocurría en el caso de la hexoquinasa (Resultados y Discusión, apartado 4.1.5).

Metabolitos ensayados	Concentración (mM)	%Actividad
Glicerol-3-P	10	-
Glicerol-2-P	10	-
UTP	7.5	-
UDP	10	-
ADP	0,1	63,1
	0,25	62,4
	0,5	47,6
	1	32,3
	0,625	104,3
AMP	1,25	99,8
	2,5	96,5
	5	78,1
	10	40,6

Tabla 4.6. Efecto de varios metabolitos sobre la actividad de la proteína recombinante (6His)*HacPGK1*.

5. EVOLUCIÓN DE LOS NIVELES DE LAS ENZIMAS PURIFICADAS MEDIANTE WESTERN BLOT DURANTE EL DESARROLLO DE LAS SEMILLAS.

5.1. Evolución de los niveles de la enzima fosfoglucosa isomerasa citosólica durante el desarrollo de las semillas.

Tal y como se describe en el apartado 2.1.3 de los Materiales y Métodos, a partir de la proteína purificada (6His)*HacPGI1* (Resultados y Discusión, apartado 4.2.1) se inmunizaron conejos cuyo suero fue utilizado para el estudio de los niveles de la proteína durante el desarrollo de las semillas de girasol. Durante el proceso los anticuerpos reconocieron específicamente a la proteína *HacPGI1*, no observándose reacciones cruzadas cuando se empleó una dilución 1/5000.

El estudio de los niveles de la isoenzima *HacPGI1* (Figura 5.1) durante el desarrollo de las semillas de girasol de la línea CAS-6, mostró como esta proteína no disminuye durante la fase de llenado del embrión, aunque si disminuye tanto la expresión de gen *Hacpgi1* (Resultados y Discusión, Figura 3.31) como la actividad fosfoglucosa isomerasa total en el extracto crudo (Resultado y Discusión, Figura 3.2).

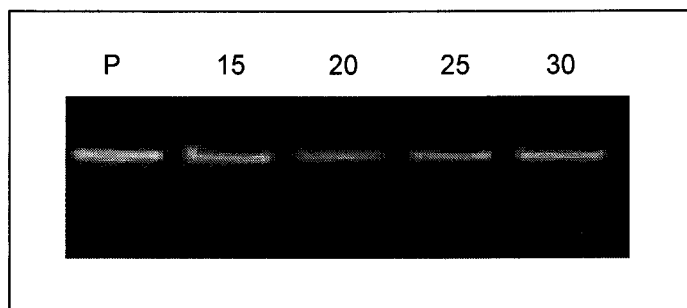


Figura 5.1. Western blot de extractos de semillas en desarrollo utilizando anticuerpos anti-6(His)*HacPGI1*. P, proteína purificada; 15, 20, 25, 30 días después de floración. Las muestras utilizadas presentaron la misma concentración de proteínas.

El mantenimiento de los niveles de la proteína durante el desarrollo indicaría la existencia de un posible mecanismo de regulación postraduccional, ya que tanto la expresión del gen como la actividad total, en la que también participará la isoenzima plastidial, disminuyen notablemente durante la maduración de la semilla.

5.2. Evolución de los niveles de la enzima fosfoglicerato quinasa durante el desarrollo de las semillas.

Al igual que en el caso anterior, el estudio de los niveles de la isoenzima *HaPGK1* durante el desarrollo del embrión se mantuvieron, no observándose cambios significativos (Figura 5.2). Además los anticuerpos también reconocieron específicamente a la proteína *HacPGK1*, no observándose reacciones cruzadas cuando se empleó una dilución 1/5000.

Aunque la expresión del gen *Hapgk1* aumenta hasta alcanzar un máximo entorno al día 16 y posteriormente disminuye (Resultados y Discusión, Figura 3.36), la actividad del extracto total aumenta (aunque al igual que en el caso anterior se debe tener en cuenta la existencia de otras isoenzimas) (Resultados y Discusión, Figura 3.3) los niveles de de la proteína *HaPGK1* se mantienen, lo que podría indicar que la proteína presenta una vida media lo suficientemente grande como para mantenerse activa durante el final del periodo de llenado de la semilla.

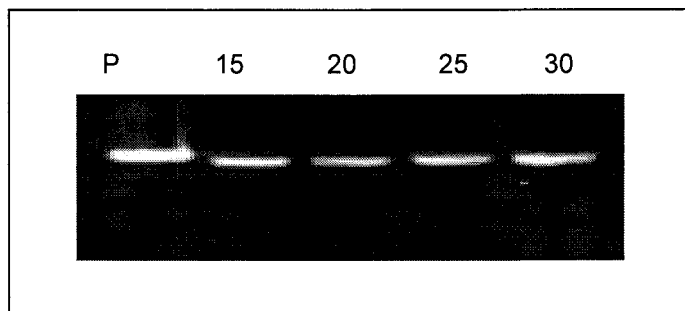


Figura 5.2. Western blot de extractos de semillas en desarrollo utilizando anticuerpos anti-6(His)*HaPGK*. P, proteína purificada; 15, 20, 25, 30 días después de floración. Las muestras utilizadas presentaron la misma concentración de proteínas.

La isoenzimas citosólicas y plástidiales presentan un alto grado de homología, diferenciándose en la región N-terminal debido a la presencia de un péptido señal en el caso de las últimas. Como consecuencia del alto grado de homología entre ellas cabría esperar la existencia de reacciones cruzadas entre los anticuerpos obtenidos para la enzima recombinante (6His)*HaPGK1* y la isoforma plástidial, pero la localización mayoritaria de la actividad en el citosol durante el desarrollo de las semillas (6% de porcentaje de actividad plástidial) (Resultado y Discusión, apartado 3.1.3), justifica la ausencia de una segunda banda de mayor tamaño en el gel, que se correspondería a la enzima junto con el péptido señal que la localizaría dentro de los plastidios.

Los resultados tanto de la *HacPGI* como de la *HaPGK*, podrían apuntar a una fase de síntesis activa de enzimas biosintéticas durante las fases iniciales de desarrollo

de la semilla y una segunda fase en la que las enzimas producidas son reguladas mediante otros mecanismos distintos de su síntesis y utilizadas en la síntesis de productos de reserva (proteínas y triacilglicéridos).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La determinación de los parámetros cinéticos aparentes en extracto crudo para las actividades glucolíticas en las semillas en desarrollo, permitió identificar aquellas actividades que presentan una menor eficiencia catalítica y que podrían actuar como pasos limitantes dentro de la ruta, siendo estas actividades la invertasa neutra, la fosfofructoquinasa dependiente de PPI, la hexoquinasa y la fosfoglicerato mutasa. Además, y a diferencia de lo descrito en otras especies vegetales, la actividad sacarosa sintasa fue muy inferior a la actividad invertasa, lo que indicaría la mayor influencia de esta última en el suministro de hexosas provenientes de la hidrólisis de la sacarosa.

2. El estudio de las actividades glucolíticas en extractos de plastidios aislados permitió determinar la existencia de una ruta glucolítica plastidial incompleta. Las actividades fructoquinasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa parecen no localizarse dentro de los plastidios de las semillas en desarrollo de girasol, mientras que los niveles correspondientes a la actividad enolasa están cercanos a los del marcador citoplasmático, por lo que de existir esta actividad intraplastial sus niveles serían muy bajos con respecto a la citosólica.

3. Durante la fase de acumulación de productos de reserva en las semillas en desarrollo de girasol, las actividades glucolíticas se pueden agrupar en función de su evolución, ya que existen diferentes perfiles de actividad, destacando aquellas que aumentan conforme se desarrolla el embrión y que podrían participar más activamente en el suministro de esqueletos carbonados y energía para la biosíntesis lipídica. Este grupo de actividades está formado por las enzimas gliceraldehido-3-P deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa y enolasa. Tanto el aumento de las actividades conforme se desarrolla la semilla de este grupo de enzimas como el mantenimiento a niveles máximos de la actividad triosa-fosfato isomerasa, mostrarían la relación existente entre el incremento de la demanda de triosas-fosfato, que se produce debido a que éstas constituyen el suministro principal de esqueletos de carbono para la biosíntesis lipídica y el suministro de éstas a través de la ruta glucolítica.

4. Cuando se compararon los niveles de las actividades glucolíticas en semillas en desarrollo pertenecientes a diferentes líneas de girasol con distinto contenido graso, se

observó que en aquellas líneas de contenido similar, CAS-6 y HA-89 eran muy similares, diferenciándose de la línea ZEN-8, con menor riqueza grasa, que parece presentar un retraso fisiológico con respecto a las primeras, siendo este retraso fisiológico el responsable del menor contenido lipídico de las semillas.

5. El análisis de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protones de los extractos perclóricos de las semillas en desarrollo de las líneas CAS-6 y ZEN-8 no permitió encontrar diferencias a nivel cualitativo ni cuantitativo entre ambas líneas, aunque si determinó que en ambos casos los carbohidratos que experimentan una mayor cambio en su concentración durante el desarrollo fueron la sacarosa y la glucosa, siendo este dato confirmado mediante medidas espectrofotométricas.

6. A partir de semillas en desarrollo se ha clonado y secuenciado el cDNA *Hacwin1*, codificante de una invertasa de pared celular putativa. Este gen se expresa en todos los tejidos estudiados aunque su expresión es máxima durante la primera fase del desarrollo de las semillas, coincidiendo los niveles máximos de expresión con la etapa más activa de hidrólisis de la sacarosa.

7. A partir de semillas en desarrollo se ha clonado y secuenciado el cDNA *Hahxk1*, codificante de una hexoquinasa de Tipo B. El gen presenta los mayores niveles de expresión en tejidos no fotosintéticos, ya que ésta es máxima en semillas en desarrollo y en raíz. El cDNA *Hahxk1* sin la región codificante correspondiente a los primeros 24 aminoácidos fue expresado en *E.coli*, purificándose posteriormente la proteína recombinante (6His) Δ *HaHXK1* y caracterizándose los parámetros cinéticos de la misma. Hasta la fecha la actividad específica de esta proteína se corresponde con el valor máximo descrito para una hexoquinasa de plantas.

8. A partir de semillas en desarrollo se ha clonado y secuenciado el cDNA *Hacpgi1*, codificante de una fosfoglucoasa isomerasa citosólica de girasol. Una vez expresada y purificada se determinaron los parámetros cinéticos de la enzima recombinante en ambos sentidos de la reacción y se obtuvieron anticuerpos específicos inmunizando conejos con la proteína purificada, lo que permitió comparar los niveles de expresión génica y la evolución de los niveles de proteína durante el desarrollo de las semillas, observándose como aunque se produzca una fuerte disminución de la expresión del gen a lo largo del

periodo de maduración de la semilla, los niveles de su proteína no disminuyen, por lo que deben existir mecanismos de regulación postraducciona de la actividad fosfoglucoosa isomerasa citosólica.

9. A partir de semillas en desarrollo se ha clonado y secuenciado el cDNA *Hapgk1*, que codifica una fosfoglicerato quinasa de girasol. Como consecuencia de la similitud entre las isoenzimas citosólicas y plastidiales, la enzima clonada se ha englobado dentro del primer grupo debido a la ausencia de un péptido señal, que le permitiese acceder al interior del plastidio. Posteriormente se procedió a la expresión heteróloga, purificación y determinación de los parámetros cinéticos de la proteína recombinante. Al igual que en caso anterior se obtuvieron anticuerpos específicos, que permitieron estudiar los niveles de la enzima durante la fase de acumulación de productos de reserva en las semillas en desarrollo. Determinándose igualmente la existencia de mecanismos postraduccionales que regulan la actividad enzimática.

10. Por último, se clonó y secuenció el cDNA *Haeno1*, que codifica una enzima enolasa de girasol. Mediante RT-PCR se determinaron los niveles de expresión génica tanto en las semillas en desarrollo como en otros tejidos de la planta, siendo mayoritaria la expresión en los tejidos no verdes y que por lo tanto dependen fundamentalmente del aporte del fotosintato por parte de los tejidos fotosintéticamente activos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ajlouni S and Hamdy M K** (1988) Effect of combined gamma-irradiation and storage on biochemical changes in sweet potato. *J Food Sci* 53: 477-481
- Alaiz M, Navarro JL, Giron J, Vioque E.** (1992) Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *J Chromatogr.* 591(1-2):181-6.
- Alba, A. y Llanos, M** (1990) El cultivo del girasol. Colección agroguías mundi-prensa.
- Alkio M, Diepenbrock W, Grimm E** (2002) Evidence for sectorial photoassimilate supply in the capitulum of sunflower (*Helianthus annuus*). *New Phytologist* 156 (3): 445-456
- Allen EJ, Morgan DG, Ridgman WJ** (1971) A physiological analysis of the growth of the oilseed rape. *Journal of Agricultural Science* 77: 339-341
- Alonso AP, Goffman FD, Ohlrogge JB, Shachar-Hill Y** (2007) Carbon conversion efficiency and central metabolic fluxes in developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) embryos. *Plant J.* Oct;52(2):296-308.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* Oct 5;215(3):403-10.
- Anderson LE and Advani VR** (1970) Chloroplast and cytoplasmic enzymes: three distinct isoenzymes associated with the reductive pentose phosphate cycle. *Plant Physiol* 45: 583-585
- Anderson LE and Carol AA** (2005) Enzyme co-localization in the pea leaf cytosol: 3-P-glycerate kinase, glyceraldehyde-3-P dehydrogenase, triose-P isomerase and aldolase. *Plant Science* 169: 620-628
- Anderson LE, Bryant JA, Carol AA** (2004) Both chloroplastic and cytosolic phosphoglycerate kinase isozymes are present in the pea leaf nucleus. *Protoplasma* 223: 103-110.
- Ap Rees T** (1988) Hexose phosphate metabolism by non-photosynthetic tissues of higher plants. En: *The Biochemistry of Plants* (Davies, DD ed.) Academic press, New York 14: 1-33
- Auerbach G, Jacob U, Grattinger M, Schurig H, and Jaenicke R** (1997) Crystallographic analysis of phosphoglycerate kinase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Biol. Chem.* 378: 327-329.
- Backhausen J E, Jöstingmeyer P, Scheibe R** (1997) Competitive inhibition of spinach leaf phosphoglucose isomerase isoenzymes by erythrose-4-phosphate. *Plant Science* 130: 121-131

- Bates PA, Kelley LA, MacCallum RM, and Sternberg MJE** (2001) Enhancement of protein modelling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, Suppl 5:39-46.
- Batista FR, Hernandez L, Fernandez JR, Arrieta J, Menendez C, Gomez R, Tambara Y, and Pons T** (1999) Substitution of Asp-309 by Asn in the Arg-Asp-Pro (RDP) motif of *Acetobacter diazotrophicus* levansucrase affects sucrose hydrolysis, but not enzyme specificity. *Biochemical Journal* 337: 503-506.
- Berman MM, Westbrook IN, feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, shindyalov IN, Bourne PE** (2000) the protein data bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235-242
- Borisjuk L, Rolletschek H, Wobus U, Weber H.** (2003) Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *J Exp Bot.* 54(382):503-12.
- Bouny JM, Saglio PH** (1996).Glycolytic Flux and Hexokinase Activities in Anoxic Maize Root Tips Acclimated by Hypoxic Pretreatment. *Plant Physiol.* 111(1):187-194.
- Bradford M.M** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72: 248–254
- Bringloe DH, Rao SK, Dyer TA, Raines CA, Bradbeer JW** (1996) Differential gene expresión of chloroplast and cytosolic phosphoglycerate kinase in tobacco. *Plant Molecular Biology* 30: 637-640
- Browse J, Slack CR.** (1985) Fatty acid synthesis in plastids from maturing safflower and linseed cotyledons. *Planta* 166:74–80
- Burrell MM, Mooney PJ, Blundy M, Carter D, Wilson F, Green J, Blundy KS, Rees T** (1994) Genetic manipulation of 6-phosphofructokinase in potato tubers. *Planta* 194:95-101.
- Bustin SA** (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol Endocrinol.* 25: 169-193.
- Bustin SA** (2002) Quantificacion of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29: 23-39.
- Chai G, Brewer JM, Lovelace LL, Aoki T, Minor W, and Lebioda L** (2004) Expression, purification and the 1.8 angstroms resolution crystal structure of human neuron specific enolase. *J. Mol. Biol.* 341: 1015-1021.

- Claeyssen E, Wally O, Matton DP, Morse D, Rivoal J** (2005) Cloning, expression, purification, and properties of a putative plasma membrane hexokinase from *Solanum chacoense*. *Protein expression and purification* 47 (1): 329-339
- Connor DJ, Hall AJ** (1997) Sunflower physiology. En: AA Schneider and AA Seiler, (Eds.). *Sunflower Technology and Production*, Agronomy Monograph, American Society of Agronomy, Madison, USA, 35: 113-182
- Cordenunsi BR, Oliveira do Nascimento JR, Vieira da Mota R, Lajola FM** (2001) Phosphoglucose isomerase from bananas: partial characterization and relation to main changes in carbohydrate composition during ripening. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 65(10): 2174-80.
- Crookston RK, O'Toole J, Ozbun JL** (1974) Characterization of the bean pod as a photosynthetic organ. *Crop Science* 14: 708-712
- Cuff JA and Barton GJ** (2000) Application of enhanced multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *PROTEINS: Struct Funct Genet* 40: 502-511
- Da Silva PMFR, Eastmond PJ, Hill LM, Smith AM, Rawsthorne S** (1997) Starch metabolism in developing embryos of oilseed rape. *Planta* 2003: 480-487
- Da Silva WS, Rezende GL, Galina A**, (2001) Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation, *J. Exp. Bot.* 52 1191–1201.
- De Coninck B, Le Roy K, Francis I, Clerens S, Vergauwen R, Halliday AM, Smith SM, Van Laere A, Van den Ende W** (2005) *Arabidopsis* AtcwINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant Cell and Environment* 28 (4): 432-443
- Dennis DT and Mierynk JA** (1982) Compartmentation of non-photosynthetic carbohydrate metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 27–50.
- Doehlert DC** (1989) Separation and characterization of four hexose kinases from developing maize kernels, *Plant Physiol.* 89 1042–1048.
- Eastmond PJ, Rawsthorne S.** (2000) Coordinate changes in carbon partitioning and plastidial metabolism during the development of oilseed rape embryos. *Plant Physiol.* 122(3):767-74.
- Eastmond PJ, van Dijken AJ, Spielman M, Kerr A, Tissier AF, Dickinson HG, Jones JD, Smeekens SC, Graham IA** (2002) Trehalose-6-phosphate synthase 1, which

catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant J.* 29(2):225-35.

Ellis KJ, Morrison JF (1982) Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods Enzymol* 87: 405-26

Emes MJ, Tobin AK (1993) Control of metabolism and development in higher plant plastids. *Int Rev Cytol* 145:149–216

Farber GK, and Petsko GA (1990) The evolution of alpha-beta-barrel enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 15: 228-234.

Flemetakis E, Efrose RC, Ott T, Stedel C, Aivalakis G, Udvardi MK, Katinakis P (2006) Spatial and temporal organization of sucrose metabolism in *Lotus japonicus* nitrogen-fixing nodules suggests a role for the elusive alkaline/neutral invertase. *Plant Mol Biol* 62(1-2):53-69.

Flinn AM, Atkins CA, Pate JS (1977) Significance of photosynthetic and respiratory exchange in the carbon economy of the developing pea fruit. *Plant Physiology* 60: 412-418

Focks N, Benning C (1998) *Wrinkled1*: a novel, low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiol* 118:91–101

Fothergill-Gilmore LA, Michels PA (1993) Evolution of glicólisis. *Prog Biophys Mol Biol*, 59: 105-235

Frommer WB, Schulze WX, Lalonde S (2003) Hexokinase, Jackof-all-trades. *Science* 300:261–263

Galina A, Reis M, Albuquerque MC, Puyou AG, Puyou MT, de Meis L. (1995) Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots. *Biochem J* 309 (Pt 1): 105-112.

Galina A, Logullo L, de Sousa EF, Rezende GL, da Silva WS (1999) Sugar phosphorylation modulates ADP inhibition of maize mitochondrial hexokinase. *Physiol. Plant.* 105 17–23.

Giegé P, Heazlewood JL, Ressner-Tunali U, Millar H, Fernie AR, Leaver CJ, Sweetlove LJ (2003), Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells, *Plant Cell* 15 2140–2151.

Givan CV (1999) Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress. *Biol. Rev.* 74: 277-309

- Goffner D, Cazalis R, Percie du Sert C, Calmes J, Cavalié G** (1988) ^{14}C photoassimilate partitioning in developing sunflower seeds. *Journal of Experimental Botany* 39: 1411-1420
- Gottlieb LD, Ford VS.** (1997) A recently silenced, duplicate PgiC locus in *Clarkia*. *Mol Biol Evol.* 14(2):125-32.
- Gottlob-McHugh S, Knowles VL, Blakeley SD, Sangwan RS, Miki LB, Dennis DT, Plaxton WC** (1995) Differential expression of cytosolic and plastidic pyruvate kinases in tobacco. *Physiol. Plant.* 95:507-14
- Harrington GN, Bush DR** (2003) The bifunctional role of hexokinase in metabolism and glucose signaling. *Plant Cell* 15:2493–2496
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ and Williams PM** (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-94.
- Hill LM, and Smith AM** (1991) Evidence that glucose-6-phosphate is imported as the substrate for starch synthesis by the plastids of developing pea embryos. *Planta* 1985: 91-96
- Hill LM, Morley-Smith ER, Rawsthorne S.** (2003) Metabolism of sugars in the endosperm of developing seeds of oilseed rape. *Plant Physiol.* 131(1):228-36.
- Hooks MA, Shearer GC, Roberts J** (1994) Nucleotide availability in maize (*Zea mays* L.) root tips (estimation of free and protein-bound nucleotides using ^{31}P -nuclear magnetic resonance and a novel protein– ligand-binding assay), *Plant Physiol.* 104 581–589.
- Igamberdiev AU, Gardeström P** (2003) Regulation of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. *Biochim. Biophys. Acta.* 1606: 117-125
- Jackson RC and Murray BG** (1983) Colchicine induced quadrivalent formation in *Helianthus*: evidence of ancient polyploidy. *Theoretical and Applied Genetics* 64: 219-222.
- Jeffery CJ, Hardre R, and Salmon L** (2001) Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase complexed with 5-phospho-D-arabinonate identifies the role of Glu357 in catalysis. *Biochemistry* 40: 1560-1566.
- Journet EP, Bligny R, Douce R** (1986) Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. *J Biol Chem* 261(7): 3193-9
- Kandel-Kfir M, Damari-Weissler H, German MA, Gidoni D, Mett A, Belausov E, Petreikov M, Adir N, Granot D** (2006) Two newly identified membrane-associated

- and plastidic tomato HXKs: characteristics, predicted structure and intracellular localization. *Planta*. 224(6):1341-52.
- Kang F, Rawsthorne S** (1994) Starch and fatty acid biosynthesis in plastids from developing embryos of oil seed rape (*Brassica napus* L.). *Plant J.* 6: 795-805
- Kang F, Rawsthorne S.** (1996) Metabolism of glucose-6-phosphate and utilisation of multiple metabolites for fatty acid synthesis by plastids from developing oilseed rape embryos. *Planta* 199, 321–327.
- Kang F, Ridout CJ, Morgan CL, Rawsthorne S** (1994) The activity of acetyl-Coa carboxylase is not correlated with the rate of lipid-synthesis during development of oilseed rape (*Brassica napus* L) embryos. *Planta* 193: 320-325
- Keiller DR and Morgan DG** (1988) Effect of pod removal and plant growth regulators on the growth, development and carbon assimilate distribution in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Agricultural Science* 111: 357-362
- King SP, Lunn JE, Furbank RT.** (1997) Carbohydrate Content and Enzyme Metabolism in Developing Canola Siliques. *Plant Physiol.* 114(1):153-160.
- Koch KE** (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 509-540.
- Köpke-Secundo E, Molnar I, Schnarrenberger C** (1990) Isolation and characterization of the cytosolic and chloroplastic 3-phosphoglycerate kinase from spinach leaves. *Plant Physiol* 93: 40-47
- Kruckeberg AL, Neuhaus HE, Feil R, Gottlieb LD, Stitt M** (1989) Decreased-activity mutants of phosphoglucose isomerase in the cytosol and chloroplast of *Clarkia xantiana*. Impact on mass-action ratios and fluxes to sucrose and starch, and estimation of Flux Control Coefficients and Elasticity Coefficients. *Biochem J.* 261(2):457-67.
- Kuser PR, Krauchenco S, Antunes OAC, and Polikarpov I** (2000) The high resolution crystal structure of yeast hexokinase PII with the correct primary sequence provides new insights into its mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry* 275: 20814-20821.
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage. *Nature* 227: 680-685.
- Lal SK, Lee C, Sachs MM** (1998) Differential regulation of enolase during anaerobiosis in Maize. *Plant Physiol* 118: 1285-1293

- Lee JH, Chang KZ, Patel V, and Jeffery CJ** (2001) Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase complexed with its substrate D-fructose 6-phosphate. *Biochemistry* 40: 7799-7805.
- Le Roux MR, Ward CL, Botha FC, Valentine AJ** (2006) Routes of pyruvate synthesis in phosphorus-deficient lupin roots and nodules. *New Phytol.* 169: 399-408
- Longstaff M, Raines CA, McMorro EM, Bradbeer JW, Dyer TA** (1989) Wheat phosphoglycerate kinase: evidence for recombination between the genes for the chloroplastic and cytosolic enzymes. *Nucleic Acids Res* 17: 6569-6580
- Martínez-Barajas E, Randall DD** (1998) Purification and characterization of a glucokinase from young tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) fruit. *Planta* 205(4): 567-73
- Matínez-Force E, Cantisán S, Serrano-Vega MJ, Garcés R** (2000) Acyl-acyl carrier protein thioesterase activity from sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Planta* 211: 637-678
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT** (2000) The PSIPRED protein structure prediction Server. *Bioinformatics* 16: 404-405
- McMorro EM, Bradbeer JW** (1990) Separation, Purification, and Comparative Properties of Chloroplast and Cytoplasmic Phosphoglycerate Kinase from Barley Leaves. *Plant Physiol.* 93(2):374-383.
- Menu T, Rothan C, Dai N, Petreikov M, Etienne C, Destrac-Irvine A, Schaffer A, Granot D, Ricard B.** (2001) Cloning and characterization of a cDNA encoding hexokinase from tomato. *Plant Sci.* 160(2):209-218.
- Miernyk JA and Dennis DT** (1992) A developmental Analysis of the Enolase Isozymes from *Ricinus communis*. *Plant Physiol* 99: 748-750
- Miller E M and Chourey P S** (1992) The maize invertase-deficient *miniature-1* seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm infection. *Plant Cell* 2: 1107-1119 *Mol Biol Evol.* 14(2):125-32.
- Moonil Kim, Jeong-Hwa Lim, Cang Sook Ahn, Kyoungsook Park, Gyung Tae Kim, Woo Taek Kim and Hyun-Sook Pai** (2006) Mitochondria-Associated Hexokinases Play a Role in the Control of programmed cell Death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant cell* 18 (9): 2341-2355
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J** (2003) Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signalling. *Science*, 300:332-336.

- Neuhaus HE, Batz O, Thom E, Scheibe R** (1993) Purification of highly intact plastids from various heterotrophic plant-tissues-analysis of enzymatic equipment and precursor dependency for starch biosynthesis. *Biochem. J.* 296: 395-401
- Norton G and Harris JF** (1975) Compositional changes in developing rape seed (*Brassica napus* L.). *Planta* 123: 163-174
- Nowitzki U, Flechner A, Kellermann J, Hasegawa M, Schnarrenberger C, Martin W.** (1998) Eubacterial origin of nuclear genes for chloroplast and cytosolic glucose-6-phosphate isomerase from spinach: sampling eubacterial gene diversity in eukaryotic chromosomes through symbiosis. *Gene.* 3; 214(1-2):205-13.
- Olsson T, Thelander M, Ronne H,** (2003) A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens*, *J. Biol. Chem.* 278 44439–44447.
- Ouani M and King RD** (2000) cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. *Protein Sci* 9: 1162-1176
- Page RDM** (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Patrick JW and Oflfer CE** (1995) Post-sieve element transport os sucrose in developing seed. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 681-702
- Pechan PM and Morgan DG** (1985) Defoliation and its effects on pod and seed development in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany* 36: 485-468
- Plaxton WC and Podestá FE** (2006) The functional organization and control of plant respiration. *Critical reviews in plant sciences* 25:159 2006.
- Plaxton WC** (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 47:185-214.
- Pleite R, Pike MJ, Garces R, Martinez-Force E, Rawsthorne S.** (2005) The sources of carbon and reducing power for fatty acid synthesis in the heterotrophic plastids of developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) embryos. *J Exp Bot.* 2005 56(415):1297-303
- Pollastri G, Przybylski D, Rost B, Balde P** (2002) Improving the prediction of protein secondary structure in three and eight classes using recurrent neural networks and profiles. *Proteins* 47: 228-235

- Qi QG, Kleppinger-Sparace KF, Sparace SA** (1995) The utilization of glycolytic-intermediates as precursors for fatty acid biosynthesis by pea root plastids. *Plant Physiol.* 107: 413-419
- Renz A, Stitt M** (1993) Substrate specificity and product inhibition of different forms of fructokinases and hexokinases in developing potato tubers, *Planta* 190 166–175.
- Rijven AHGC and Gifford RM** (1983) Accumulation and conversion of sugars by developing wheat grains. 3. Non-diffusional uptake of sucrose, the substrate preferred by endosperm slices. *Plant Cell and Environment* 6: 417-425
- Reddy VA, and Maley F** (1990) Identification of an active-site residue in yeast invertase by affinity labelling and site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* 265: 10817-10820.
- Rivoal J, Ricard B, Pradet A** (1989) Glycolytic and fermentative enzyme-induction during anaerobiosis rice seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 27(1): 43-52
- Roberts JK, Callis J, Wemmer D, Walbot V, Jardetzky O** (1984) Mechanisms of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its role in survival under hypoxia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 3379–3383.
- Roitsch T and González MC** (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* 9: 606-613
- Roitsch T, Balibrea M E, Hofmann M, Proels R, Sinha A K** (2003) Extracellular invertase: Key metabolic enzyme and PR protein. *J Exp Bot.* 54: 513-524
- Rolland F, Moore B, Sheen J** (2002) Sugars sensing and signalling in plants. *Plant cell* 14, S185-S205.
- Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM** (2001) Glucose sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* 26: 310–317
- Rost B** (1996) PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol* 266: 525-539
- Roughan PG, Holland R, Slack CR** (1979) Control of long-chain fatty acid synthesis in isolated intact spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochem. J.* 184, 193-202
- Sambrook J, Fritsh EF and Maniatis T** (1989). *Molecular cloning. A laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Sanchez-Romero C, Peran-Quesada R, Barcelo-Munoz A, Pliego-Alfaro F** (2002) Variations in storage protein and carbohydrate levels during development of avocado zygotic embryos. *Plant Physiol Biochem* 40:1043–1049

- Schaff A and Petreikov M** (1997) Sucrose-to-starch metabolism in tomato fruit undergoing transient starch accumulation. *Plant Physiol.* 113, 739-746.
- Schluepmann H, Pellny T, van Dijken A, Smeekens S, Paul M.** (2003) Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 27;100(11):6849-54.
- Schnarrenberger C, Oeser A** (1974) Two isoenzymes of glucosephosphate isomerase from spinach leaves and their intracellular compartmentation. *Eur J Biochem* 45: 77-82.
- Schussler JR, Brenner ML, Brun WA** (1984) Abscisic acid and its relationship to seed filling in soybeans. *Plant Physiology* 76: 301-307
- Schwede T, Kopp J, Guex N, and Peitsch MC** (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31: 3381-3385.
- Shah N and Bradbeer JW** (1994) The occurrence of chloroplastic and cytosolic isoenzymes of phosphoglycerate kinase in a range of plant species. *Planta* 193: 232-237
- Sheen J, Zhou L, Jang J-C** (1999) Sugars as signalling molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 410-418
- Smith RG, Gauthier DA, Dennis DT, Turpin DH.** (1992) Malate- and pyruvate-dependent fatty acid synthesis in leucoplasts from developing castor endosperm. *Plant Physiology* 98, 1233-1238.
- Stitt M** (1996) Plasmodesmata play an essential role in sucrose export from leaves: a step toward an integration of metabolic biochemistry and cell biology. *Plant Cell* 8: 565-571
- Sweetlove LJ, Fernie AR.** (2005) Regulation of metabolic networks: understanding metabolic complexity in the systems biology era. *New Phytol.* 168(1):9-24
- Tang G-Q, Hardin SC, Dewey R, Huber S** (2003) A novel C-terminal proteolytic processing of cytosolic pyruvate kinase, its phosphorylation and degradation by the proteasome in developing soybean seeds. *Plant J.* 34: 77-93.
- Thevelein JM, Hohmann S.** (1995). Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem Sci.* 20(1):3-10.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG** (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 15;25(24):4876-82.
- Thompson GA and Li C** (1997) Altered fatty acid composition of membrana lipids in seeds and seedling tissues of high-stearate canola. *Physiology, Biochemistry and*

Molecular Biology of Plant Lipids, Williams J.P., Khan M.U. and Lem N.W., (eds), Kluwer, Dordrecht. ISBN 0-7923-4379-4. 313-315.

Tobin AK, Bowsher CG (2005) Nitrogen and carbon metabolism in plastids: Evolution, integration, and coordination with reactions in the cytosol. *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology* 42: 113-165

Tomlinson KL, McHugh S, Labbe H, Grainger JL, James LE, Pomeroy KM, Mullin JW, Miller SS, Dennis DT, Miki BL (2004). Evidence that the hexose-to-sucrose ratio does not control the switch to storage product accumulation in oilseeds: analysis of tobacco seed development and effects of overexpressing apoplastic invertase. *J Exp Bot.* 55(406):2291-303.

Turner WL, Knowles VL, Plaxton WC (2005) Cytosolic pyruvate kinase: subunit composition, activity, and amount in developing castor and soybean seeds, and biochemical characterization of the purified castor seed enzyme. *Planta* 222: 1051-1062.

Tymowska-Lalanne Z, Kreis M (1998) The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. *Adv Bot Res* 28: 71-117

Unger C, Hardegger M, Lienhard S, Sturm A (1994) cDNA cloning of carrot (*Daucus carota*) soluble acid beta-fructofuranosidases and comparison with the cell wall isoenzyme. *Plant Physiol.* 104(4):1351-7.

Van den Ende W, De Coninck B, Clerens S, Vergauwen R, Van Laere A (2003) Unexpected presence of fructan 6-exohydrolases (6-FEHs) in non-fructan plants: characterization, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel "cell-wall invertase-like" specific 6-FEH from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant J.* 36(5):697-710.

Van Der Straeten D, Rodrigues-Pousada RA, Goodman HM, Van Montagu M (1991) Plant Enolase: Gene Structure, Expression, and Evolution. *The Plant Cell* 3: 719-735

Veramendi J, Roessner U, Renz A, Willmitzer L, Trethewey RN (1999) Antisense repression of hexokinase 1 leads to an overaccumulation of starch in leaves of transgenic potato plants but not to significant changes in tuber carbohydrate metabolism, *Plant Physiol.* 121 123-134.

Verhaest M, Lammens W, Le Roy K, De Coninck B, De Ranter CJ, Van Laere A, Van den Ende W, Rabijns A (2006) X-ray diffraction structure of a cell-wall invertase from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 62(Pt 12):1555-63.

Vrânceanu AV (1977) El girasol. Ediciones mundi-prensa. Madrid.

- Walla OJ, Degroot EJ, Schweiger M** (1994) On the molecular mechanism of the circadian clock. The 41,000 M(r) clock protein of *Chlorella* was identified as 3-phosphoglycerate kinase. *J Cell Sci* 107: 719-726
- Wang X, Tang X, Anderson LE** (1996) Enzyme-enzyme interaction in the chloroplast: physical evidence for association between phosphoglycerate kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Vitro*. *Plant Science* 117: 45-53
- Wang Xd, Harrington G, Patrick JW, Offler CE, Fieuw S** (1995) Cellular pathways of photosynthate transport in coats of developing seed of *Vicia faba* L. and *Phaseolus vulgaris* L: principal cellular sites of efflux. *Journal of Experimental Botany* 45: 49-63
- Weaire W and Kekwick RGO** (1975) Fractionation of fatty-acid synthetase activities of avocado mesocarp plastids. *Biochem. J.* 146, 439-445
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U.** (1996) Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: A role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. *Plant Journal.* 10 (5): 823-834
- White JA, Todd J, Newman T, Focks N, Girke T, de Ilarduya OM, Jaworski JG, Ohlrogge JB, Benning C.** (2000) A new set of Arabidopsis expressed sequence tags from developing seeds. The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. *Plant Physiol.* 124(4):1582-94.
- Wiese A, Groner F, Sonnewald U, Deppner H, Lerchl J, Hebbeker U, U. Flugge, Weber A** (1999) Spinach hexokinase I is located in the outer envelope membrane of plastids, *FEBS Lett.* 461 13-18.
- Wilson LA, Birmingham VA, Monn DP, Snyder HE** (1978) Isolation and characterization of starch from mature soybean. *Cereal Chemistry* 55: 661-670
- Wobus U. and Weber H** (1999). Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol. Chem.* 380, 937-944
- Yu TS, Lue WL, Wang SM, Chen J.**(2000) Mutation of Arabidopsis plastid phosphoglucose isomerase affects leaf starch synthesis and floral initiation. *Plant Physiol.* 123(1):319-26.
- Zhao JY, Zuo KJ, Qin J, tang KX** (2004) Molecular Cloning and Characterization of Enolase from Oilseed Rape (*Brassica napus*). *Acta Botanica Sinica* 46: 1226-1233



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el tribunal en el día de la fecha, integrado por los abajo firmantes, para evaluar la tesis doctoral de D. **MANUEL ADRIAN TRONCOSO PONCE** titulada **ESTUDIO DE LA RUTA CITOQUINICA EN LAS SEMILLAS EN DESARROLLO DE GRASO L. DELANTE LA FASE DE ACUMULACION DE PRODUCTOS DE RESERVA Y CARACTERIZACION DE ENZIMAS IMPLICADAS** acordó otorgarle la calificación de **SOBRESALIENTE CON LOPDE**

Sevilla, a 8 de Febrero de 2008

Vocal,

A. RURO
Presidente,

José María Maldonado

Vocal,

F. J. CERUDO
Secretario,

Joaquín J. SALAS

Vocal,

F. J. Florêncio
Doctorando,