



Dpto. Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Farmacia

Caracterización de ZmXTH1, una nueva Xiloglucano endoTransglucosilasa-Hidrolasa en maíz

Valeria Genovesi

Barcelona, abril 2007



Facultad de Farmacia

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de Doctorado en Biotecnología

Bienio 2002-2004

Caracterización de ZmXTH1, una nueva Xilogucano endoTransglucosilasa-Hidrolasa en maíz

Memoria presentada por Valeria Genovesi para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona.

El presente trabajo ha sido realizado en el Laboratori de Genètica Molecular Vegetal del Consorci CSIC-IRTA, bajo la dirección del Dr. Joan Rigau Lloveras y del Dr. David Caparrós-Ruiz.

Becada por la Generalitat de Catalunya con la beca predoctoral para la formación del personal investigador 2003FI 00090.

Directores

Tutor

Autora

Dr. Joan Rigau Lloveras

Dr. Albert Ferrer Prats

Valeria Genovesi

Dr. David Caparrós-Ruiz

abril 2007

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA PARED CELULAR

La célula vegetal secreta en su superficie un conjunto complejo de polisacáridos, proteínas y otros compuestos que se ensamblan en una estructura polimérica compleja externa a la membrana plasmática: la pared celular. Desde las primeras observaciones de las células vegetales hechas por Robert Hooke en el 1665 y hasta los años 80, la pared siempre ha sido considerada como una estructura rígida y estática, cuya función principal es la de conferir un soporte mecánico a la célula. Sin embargo a lo largo de los últimos 20 años se ha hecho más evidente que la pared celular vegetal es una estructura altamente dinámica e integralmente involucrada en el ciclo vital de una planta: es básica en procesos como la división, el crecimiento y la diferenciación celular, determinando la forma, el tamaño y la velocidad de crecimiento de cada célula. También es esencial para las respuestas frente a estreses tanto bióticos como abióticos, actuando como barrera física y biológica. Además está implicada en rutas de señalización, mediando los contactos entre células (Somerville et al., 2004).

Su composición química, su organización tridimensional y sus propiedades varían constantemente a lo largo del crecimiento y de la diferenciación de la célula. Además, normalmente las células de un determinado tejido tienen una pared característica y relacionada con su función (Brett and Waldron, 1996).

La pared celular (fig.1.1) es externa a la membrana plasmática, y por lo tanto la síntesis, el transporte y la secreción de sus componentes implican complejos mecanismos relacionados con el metabolismo celular y la funcionalidad del sistema de endomembranas (retículo endoplásmico, aparato del Golgi, vesículas y membrana plasmática). Entre la pared y el protoplasto existe, por lo tanto, un continuo y recíproco intercambio de informaciones que permiten las variaciones

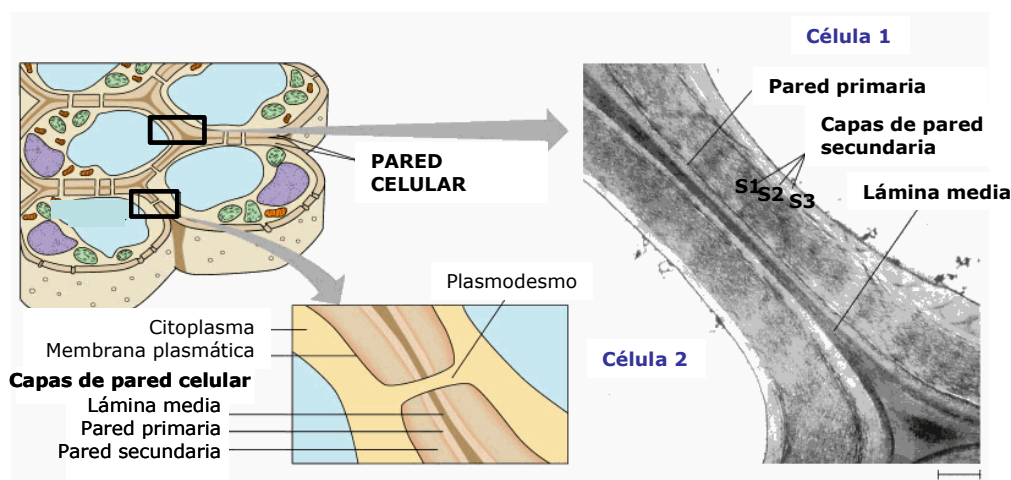


Fig. 1.1 Representación de la pared celular vegetal. Figura adaptada de la página web <http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/cm1504/Image120.gif>

necesarias de las propiedades físico-químicas de la pared en respuesta a las condiciones ambientales, al crecimiento y al estadio de diferenciación celular. La continua interacción entre pared y protoplasto de cada célula se extiende a las paredes y a los protoplastos de las células adyacentes, de tal manera que las modificaciones de la pared se realizan no sólo durante las fases de crecimiento y diferenciación sino también después de la muerte celular, a través de la acción de las células adyacentes.

1.1.1 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR

La pared, secretada por la célula viva, tiene tres partes fundamentales, de manera que la capa más vieja está hacia afuera y la más joven hacia adentro, junto al protoplasma, demarcando el lumen o cavidad celular (fig. 1.1). Las 3 capas de la pared, desde el exterior hacia el lumen celular, son:

- la **lámina media**; sustancia amorfa constituida principalmente por pectinas y agua que sirve para cementar las paredes de células adyacentes; su hidrólisis parcial determina la formación de espacios intercelulares.
- la **pared primaria**; constituida por un esqueleto de fibrillas de celulosa encajadas en una matriz de polisacáridos, pectinas y glucoproteínas. La pared celular primaria está presente en todas las células vegetales, normalmente mide entre 100 y 200 nm de espesor y se forma inmediatamente después de la división celular, antes de que la célula complete su crecimiento. Está asociada a protoplastos vivos, por lo tanto los cambios que experimenta son reversibles.
- la **pared secundaria**; no está siempre presente, ya que en muchos casos las células presentan sólo la pared primaria. En otros casos a ésta se añade la pared secundaria, que se forma en el interior de la primaria después de que la célula ya haya acabado el crecimiento y está relacionada con la especialización de cada célula. Su presencia está restringida a células de determinados tejidos, como el tejido mecánico, en el cual la pared secundaria es característica de las fibras y esclereides del esclerénquima, y el tejido vascular, en los vasos y traqueidas del xilema. Cuando existe, la pared secundaria es la capa más adyacente a la membrana plasmática. La pared secundaria de traqueidas y fibras generalmente consta de tres capas con características físico-químicas diferentes, que se denominan de afuera hacia adentro S1 (subcapa externa), S2 (subcapa media o central) y S3 (subcapa interna).

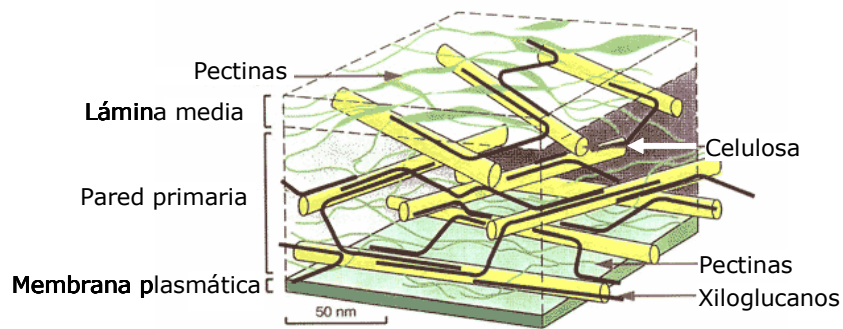


Fig.1.2. Pared celular primaria (figura adaptada de la página web <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/C/cellwall.html>). La lámina media, sustancia amorfa constituida principalmente de pectinas, sirve para cementar las paredes de células adyacentes. La pared primaria está constituida por un esqueleto de fibrillas de celulosa (**fase fibrilar**) encajadas en una matriz (**fase amorfa**) de hemicelulosas, pectinas y glicoproteínas.

En general los componentes de la pared celular son de tres tipos: polisacáridos (celulosa, hemicelulosas, pectinas), glicoproteínas, y algunas sustancias no-polisacáridicas como la lignina, la suberina, y la cutina. Las microfibrillas de celulosa constituyen el esqueleto de la pared, confiriéndole rigidez y constituyen la **fase fibrilar** que está encajada en la **fase amorfa**, una matriz compuesta por los otros componentes (Somerville et al., 2004) (fig.1.2).

En la pared primaria la matriz, formada por hemicelulosas, pectinas y glicoproteínas, es dominante, ya que constituye entre el 60 y el 75% del peso seco, siendo la fase fibrilar entre un 25 y 40%. En el caso de la pared secundaria domina la fase fibrilar (60%); en este caso la matriz está formada básicamente por hemicelulosas y lignina (30%), mientras que las pectinas y las proteínas prácticamente desaparecen.

Así pues, la relación entre los diferentes polisacáridos, y su composición exacta varían entre las diferentes partes de la pared al igual que a nivel filogenético (Popper and Fry, 2003), a nivel espacial entre tejidos de una misma planta (Selvendran and O'Neill, 1987; Lynch and Staehelin, 1995) y a nivel temporal durante el desarrollo de una determinada célula (Brett and Waldron, 1996).

En particular, la composición cuantitativa y cualitativa en hemicelulosas, y cuantitativa en pectinas, varía entre las especies vegetales y es la base para la distinción entre dos tipos de pared celular primaria (O'Neill and York, 2003):

-Pared celular primaria de tipo I: Representativa de las gimnospermas, de todas las dicotiledóneas y de las monocotiledóneas no gramíneas. Contiene altos niveles de xiloglucanos y pectinas. Su estructura es la mejor conocida.

-Pared celular primaria de tipo II: Característica de las monocotiledóneas de la familia de las gramíneas que comprende los cereales, entre los cuales hay especies

de importante interés agronómico como el arroz y el maíz. Contiene bajos niveles de xiloglucanos y pectinas, siendo mayoritarias otras hemicelulosas como los xilanos, como se explicará más en detalle en el apartado 1.1.6.

1.1.2 CONSTITUYENTES DE LA PARED CELULAR PRIMARIA

1.1.2.1 CELULOSA

Además de ser considerada el biopolímero más abundante de la naturaleza, la celulosa es ubicuitaria en las plantas, siendo el polisacárido principal de las paredes y representado su componente fibrilar (Saxena and Brown, 2005).

Su estructura base consiste de una cadena lineal de moléculas de glucosa unidas de manera covalente por un enlace glucosídico de tipo β (1 \rightarrow 4) (cadena glucánica). Estas cadenas están estabilizadas por enlaces hidrógeno internos entre las diferentes unidades de glucosa (enlaces hidrógeno intramoleculares); También existen otros enlaces hidrógeno que se realizan entre unidades de glucosa que pertenecen a cadenas diferentes (enlaces hidrógeno intermoleculares); a través de estos puentes de hidrógeno varias cadenas adyacentes de celulosa (60-70) se combinan formando fibrillas elementales que se reúnen en microfibrillas cuyo diámetro es típicamente de unos 3 nm (Fig. 1.3). Las microfibrillas están caracterizadas por zonas en las que las cadenas glucánicas están organizadas en una estructura altamente ordenada y por lo tanto son rígidas e insolubles (zonas **crystalinas**); estas regiones, a su vez, son frecuentemente intercaladas con áreas amorfas, en las que las cadenas glucánicas son menos ordenadas (zonas **paracrystalinas**).

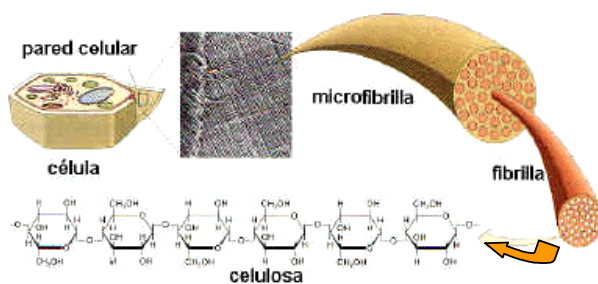


Fig. 1.3 En la figura (adaptada de la página web <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema7/7-3pared2.htm>) se representan los enlaces de tipo β (1 \rightarrow 4) entre varias moléculas de glucosa que forman la cadenas glucánicas de celulosa, que a su vez se reúnen en microfibrillas.

1.1.2.2 HEMICELULOSAS

Son un grupo heterogéneo de polisacáridos cuya estructura general está constituida por una larga cadena lineal β (1 \rightarrow 4) de un azúcar, desde la que se ramifican cadenas laterales cortas de otros azúcares (O'Neill and York, 2003). Comprenden:

a) Xiloglucanos

Estos polisacáridos representan las hemicelulosas más abundantes de la pared de las dicotiledóneas, en las que constituyen alrededor del 20% del peso seco total, mientras que sólo representan alrededor del 2% en las monocotiledóneas gramíneas. Su estructura base es muy similar a la de la celulosa, ya que está constituida por una cadena lineal de residuos de glucosa (Glc) unidos por enlaces de tipo $\beta(1\rightarrow4)$. Más del 75% de este esqueleto está ramificado: la cadena celulósica principal presenta residuos laterales de xilosa (Xyl), que a su vez pueden estar unidos a residuos de fucosa (Fuc) o galactosa (Gal) (Fig.1.4).

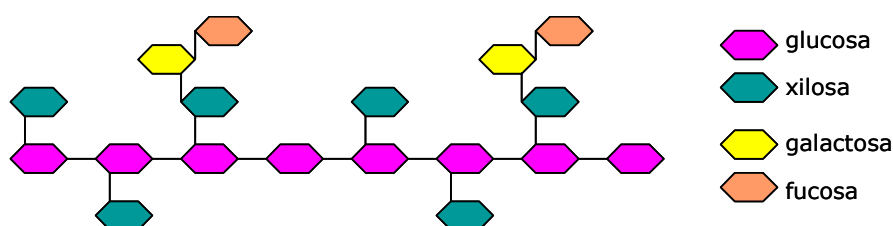


Fig.1.4. Representación esquemática de una molécula de xiloglucano.

Ya que el esqueleto principal no varía entre los xiloglucanos de diferentes plantas y tejidos, la clasificación de los xiloglucanos se realiza en base a la naturaleza de las ramificaciones; de esta manera, los xiloglucanos se nombran con un código de letras (tabla 1.1) que constituye un listado ordenado del patrón de sustituciones de las cadenas laterales (Fig.1.5). Cada letra corresponde al residuo de azúcar que constituye la última ramificación lateral y se refiere a la sub-estructura entera a la que pertenece dicho residuo, a partir del esqueleto glucosídico. Además, la letra G se refiere a los residuos de glucosa del esqueleto principal, cuando estos no están ramificados.

Código	Azúcar presente en la última ramificación lateral
G	Glucosa
X	Xilosa
L	Galactosa
F	Fucosa
A	Arabinosa

Tabla 1.1. Código de letras utilizado para la nomenclatura de los xiloglucanos.

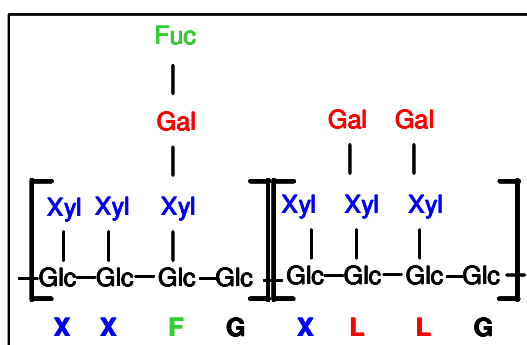


Fig.1.5 Ejemplo de estructura primaria de xiloglucano, XXFGXLLG; los paréntesis representan dos fragmentos oligosacáridicos que se generan después de tratamiento con endoglucanasa.

Los xiloglucanos se clasifican como del tipo "XXXG" o "XXGG" en base al número de residuos glucosídicos de la cadena principal que están ramificados (Vincken et al., 1997). Los xiloglucanos de tipo "XXXG" presentan tres residuos consecutivos de glucosa de la cadena principal que están ramificados, y un cuarto residuo de glucosa no ramificado. Por otra parte, los xiloglucanos de tipo "XXGG" presentan sólo dos residuos de glucosa ramificados.

La estructura general de los xiloglucanos está conservada entre especies en el reino vegetal. En general los xiloglucanos fucosilados del tipo "XXXG" (ejemplos: XXFG, XLFG, XXLG) son predominantes en dicotiledóneas y en las monocotiledóneas con pared celular de tipo I, mientras que las monocotiledóneas que tienen una pared celular primaria de tipo II presentan en general cadenas de xiloglucanos menos ramificadas y con muy poca cantidad de fucosa. Los xiloglucanos de las gramíneas no han sido tan bien caracterizados como los de las dicotiledóneas, pero algunas evidencias sugieren que presentan una estructura de tipo "XXGG" (O'Neill and York, 2003).

b) Xilanos

Son componentes minoritarios de la pared primaria de las dicotiledóneas y de las monocotiledóneas no gramíneas. En cambio, son muy abundantes en la pared primaria de las gramíneas y en la pared secundaria de las plantas leñosas.

La estructura base de estas hemicelulosas es una cadena lineal de residuos de xilosa (Xyl) con enlaces de tipo $\beta(1\rightarrow4)$. La presencia de residuos laterales permite clasificarlas en:

- **Arabinoxilanos:** ramificados con arabinosa.
- **Glucuronoxilanos:** ramificados con ácido glucurónico.
- **Glucuronoarabinoxilanos:** ramificados con ácido glucurónico y arabinosa.
- **4-O-metil-glucuronoxilanos:** ramificados con ácido 4-O-metilglucurónico.

c) Mananos

Estas hemicelulosas presentan un esqueleto principal constituido por residuos de manosa unidos con enlaces de tipo $\beta(1\rightarrow4)$ que pueden estar ramificados con residuos de galactosa (**galactomananos**) o glucosa (**glucomananos**).

d) β -glucanos

Estos polímeros presentan una estructura química similar a la celulosa, pero los enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ que unen las unidades de glucosa están intercalados al azar con enlaces de tipo $\beta(1\rightarrow3)$, por lo que su definición exacta es de **enlaces mixtos $\beta(1\rightarrow3)$, $(1\rightarrow4)$ glucanos**, aunque son comúnmente denominados **β -glucanos**.

Son característicos exclusivamente de la pared celular primaria de tipo II (Smith and Harris, 1999).

1.1.2.3 PECTINAS

Las pectinas son un grupo complejo y heterogéneo de polisacáridos ramificados y muy hidratados, cuyo componente más relevante es el ácido D-galacturónico (Ridley et al., 2001). Las pectinas estructuralmente más simples son los **homogalacturonanos (HG)**, constituidas por una cadena lineal de residuos de ácido galacturónico, unidos mediante enlaces de tipo $\alpha(1\rightarrow4)$ (ácido poligalacturónico). En otro tipo de pectinas, los **ramnogalacturonanos I (RGI)**, los residuos de ácido galacturónico pueden estar intercalados con residuos de ramnosa a los que se unen cadenas laterales neutras de arabanos (unidades de arabinosa), galactanos (unidades de galactosa) y arabinogalactanos (unidades de arabinosa y galactosa).

Finalmente, los **ramnogalacturonanos II (RGII)** presentan un esqueleto de HG con cadenas laterales diversas y pueden dimerizar a través de un enlace diestérico de borato (Cosgrove, 2005).

Los grupos carboxilos de los residuos de ácido galacturónico (COO^-) están a menudo esterificados con grupos metilos ($-\text{COOCH}_3$). El nivel de esterificación es fisiológicamente muy importante ya que modula la capacidad de las pectinas de formar geles semi-rígidos que controlan la ultraestructura y la porosidad de la pared. De hecho, la carga negativa de los residuos de ácido galacturónico "libres" (no esterificados) favorece la afinidad de estos polisacáridos para cationes, como por ejemplo el Ca^{2+} , y la consecuente formación de puentes de Ca^{2+} , cuya presencia tiene varios efectos como por ejemplo la de limitar la expansión celular (Fry, 2004). Además del control de la porosidad de la pared, otra función de las pectinas es la de controlar la adhesión entre células, y de hecho son los constituyentes de la lámina media.

1.1.2.4 GLICOPROTEÍNAS (PROTEÍNAS ESTRUCTURALES)

Las proteínas de la pared son ricas en los aminoácidos serina e hidroxiprolina, tienen dominios con secuencias repetidas y están glicosiladas en mayor o menor grado (Josè-Estanyol and Puigdomènech, 2000). Se cree que dichas glicoproteínas actúan como elementos estructurales, porque tienen estructura fibrilar y se inmovilizan mediante enlace covalente entre ellas o con azúcares como arabinosa, glucosa y galactosa. Se acumulan en la pared en diferentes etapas del desarrollo y en respuesta a diferentes condiciones de estrés. Entre ellas están las **extensinas** o

Proteínas Ricas en Hidroxiprolina (HRGPs), las **Proteínas Ricas en Prolina** (PRPs), las **Proteínas Ricas en Glicina** (GRPs) y las **Arabinogalactanas** AGPs.

1.1.3 MODIFICACIONES DE LA PARED CELULAR

En general, en determinados casos en los que se desarrolla la pared celular secundaria aparecen sustancias adicionales que no afectan la apariencia de las células pero sí las propiedades físico-químicas de las paredes. Entre estas modificaciones está la **lignificación**, cuya función es la de aumentar la resistencia mecánica, la impermeabilidad y la rigidez de la pared. La lignina, el polímero vegetal más abundante después de la celulosa, es uno de los componentes más importantes de la pared celular secundaria, aunque puede estar presente también en la pared primaria y en la lámina media. Es un polímero de cuerpos fenólicos (monolignoles) que son exocitados por dictiosomas y se entrelazan en una red tridimensional alrededor de las microfibrillas por la acción de proteínas enzimáticas que se encuentran en la membrana plasmática (Boudet, 2003).

Otra modificación de la pared es la **suberificación**, típica de células de la peridermis que constituyen el súber o corcho. La suberina es un polímero insoluble de unidades monoméricas de ácidos grasos ligados de manera covalente a compuestos fenólicos. Los monómeros se forman en el retículo endoplásmico liso y son secretadas por difusión. La suberina se deposita en el interior de la pared primaria en finas laminillas que se alternan con capas de cera (Franke and Schreiber, 2007).

La **cutina** es otro polímero, químicamente muy similar a la suberina, compuesto por largas cadenas de ácidos grasos. Se deposita sobre la pared externa de las células epidérmicas formando una capa llamada **cutícula**, delgada, continua e impermeable, que recubre las hojas y algunos tallos. Su función es la de constituir una barrera física al ataque de patógenos. Además, junto a la presencia de ceras, la cutina limita la excesiva transpiración y confiere impermeabilidad a la superficie externa de la parte aérea de la planta (Jeffree, 1996).

Las **ceras**, ésteres de ácidos grasos con alcoholes, son sustancias altamente insolubles que suelen depositarse por encima de la cutícula, recubriendo, junto con la cutina o la suberina, la epidermis de frutos y tallos, y evitando de esa manera la pérdida de agua por evaporación (Jetter et al., 2006).

Finalmente, las paredes pueden presentar **compuestos minerales**. La mineralización de las paredes, que endurece determinadas estructuras como los

pelos radicales, consiste en la impregnación con sales inorgánicas como la sílice, el carbonato de calcio, el oxalato de calcio.

1.1.4 BIOSÍNTESIS DE LOS POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR

Los polisacáridos de la pared se sintetizan en diferentes membranas del protoplasto. La mayoría de los componentes de la matriz se sintetizan en el aparato del Golgi y son liberados en la pared por vesículas secretoras, siguiendo esta ruta general: cisternas Golgi *cis*→cisternas Golgi medianas→cisternas Golgi *trans*→*trans* Golgi *network*→vesículas derivadas del Golgi→membrana plasmática→apoplasto (Fry, 2004). La celulosa al contrario, se sintetiza en el lado apoplástico de la membrana plasmática, utilizando un sustrato citosólico, probablemente la UDP-glucosa, y se deposita directamente en la pared (Doblin et al., 2002; 2003; Fig. 1.6).

El complejo hexamérico de membrana celulosa-sintasa (CESA) es el responsable de la síntesis de microfibrillas de celulosa y está compuesto por 6 subunidades, reunidas en una estructura típica definida "roseta"; a su vez cada subunidad de la roseta contiene 6 proteínas CESA, con un total de 36 proteínas CESA por cada roseta. Las rosetas se extienden de un lado al otro de la membrana plasmática, reciben las moléculas de glucosa en el lado citoplasmático de la membrana, y las unen formando las moléculas de celulosa que se depositan en el lado externo, se alinean y cristalizan formando las microfibrillas. A medida que las microfibrillas crecen, las rosetas se desplazan en la membrana plasmática, gracias a su estructura en mosaico fluido (Somerville, 2006). Una de las características clave de la biosíntesis de la celulosa es que las microfibrillas se depositan en una orientación controlada, en las paredes primarias perpendiculares al eje de elongación de la célula. La orientación de las microfibrillas está en buena correlación con los microtubulos corticales, llevando a la hipótesis de que los microtubulos de alguna manera controlan la deposición de la microfibrillas (Baskin, 2001).

Las proteínas CESA pertenecen a familias multigénicas: en maíz y *Arabidopsis thaliana* (arabidopsis) existen 10 genes CESA, en arroz al menos 9 (Keegstra and Walton, 2006), y en chopo 18 (Djerbi et al., 2005). Evidencias genéticas apoyan la idea de que en una roseta existen al menos 3 CESA diferentes y se ha sugerido que la celulosa en la pared primaria se sintetiza por un conjunto de genes diferentes de los de la secundaria (Lerouxel et al., 2006).

Las semejanzas estructurales entre las cadenas glucánicas $\beta(1\rightarrow4)$ de la celulosa y el esqueleto de tipo $\beta(1\rightarrow4)$ de las hemicelulosas ha hecho avanzar la hipótesis de

que los genes *Cellulose Synthase Like (CSL)* codificarían para polisacárido-sintasas localizadas en el Golgi (Hazen et al., 2002). Las *CSLs* son familias génicas con similitud de secuencia con los genes *CESA* y se encuentran en todos los genomas vegetales. En los últimos años, muchos genes involucrados directamente en la biosíntesis de las hemicelulosas han sido identificados (Lerouxel et al., 2006), pero queda todavía mucho trabajo por hacer para lograr un listado completo de estos genes, y entender la bioquímica y la regulación de los procesos biosintéticos.

También el estudio de la biosíntesis de las pectinas está en sus fases iniciales, ya que hasta la fecha ningún enzima biosintético ha sido purificado con técnicas tradicionales de bioquímica, debido a la dificultad que presenta la purificación de proteínas de membrana. Sin embargo, y como en el caso de las hemicelulosas, las estrategias genéticas están siendo utilizadas con éxito para la identificación de genes involucrados en la biosíntesis de las pectinas (Lerouxel et al., 2006).

En conclusión, muchos aspectos de los procesos biosintéticos de la pared siguen siendo desconocidos, en particular los procesos que permiten el ensamblaje funcional de la pared a partir de cada uno de sus componentes sintetizados en varios sitios celulares (Lerouxel et al., 2006). Una razón para la falta de información sobre estos procesos es la dificultad en el uso de técnicas de bioquímica tradicionales para su estudio. En los últimos años, sin embargo, la aplicación de estrategias de genética y genómica ha permitido progresos significativos en la identificación de genes y proteínas involucrados en la biosíntesis de la pared celular.

1.1.5 ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR PRIMARIA

Por lo expuesto anteriormente, la pared se presenta como una gran red macromolecular compuesta por microfibrillas de celulosa encajadas en una matriz de otros compuestos. Ya que las modificaciones en el interior de esta red de la pared son las que permiten muchos procesos fisiológicos, la manera en la que los componentes de la pared están ensamblados ha sido objeto de muchas investigaciones. Según los modelos actuales existen dos redes independientes que contribuyen a la ultraestructura de la pared celular: la primera red está constituida por las pectinas, y la segunda por celulosa y hemicelulosas. Además, puede haber una red adicional constituida por glicoproteínas (O'Neill and York, 2003).

La **red de pectinas** actuaría como un andamio que controla la porosidad de la pared y que, a través de la carga negativa de los residuos de ácido galacturónico establece interacciones electroestáticas con moléculas cargadas positivamente,

como enzimas de la pared. Por lo tanto, el gel constituido por las pectinas puede compartimentalizar el espacio apoplástico, previniendo la difusión de enzimas y otras moléculas de la pared en sitios inapropiados.

La **red celulosa-hemicelulosas** a su vez es considerada la componente estructural más importante de la pared, ya que por un lado reprime la expansión celular y favorece la formación de una presión de turgencia interna a la célula, por otro lado, mediante sus modificaciones, permite a la célula de extenderse bajo de esta presión (fig. 1.6).

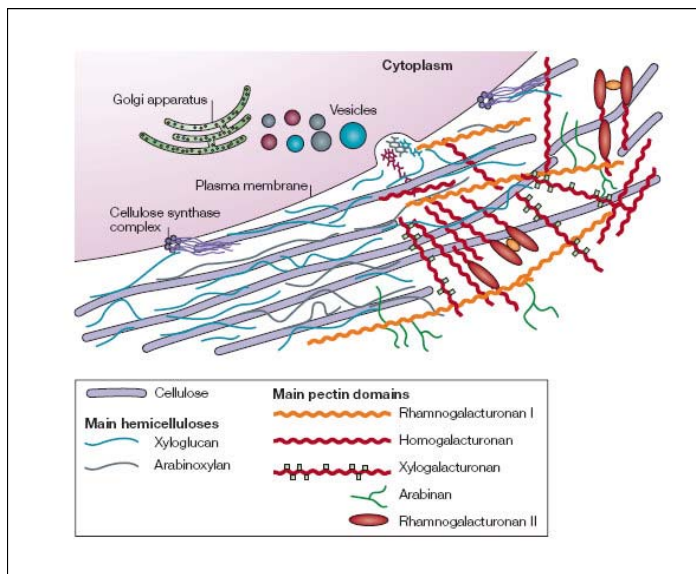


Fig. 1.6 En la figura, tomada de Cosgrove, 2005, se evidencia la estructura de la pared celular primaria, y se visualiza tanto el proceso de síntesis y secreción en el apoplasto de sus polímeros, como la presencia de dos entramados, uno constituido por hemicelulosas y celulosa, y otro constituido por pectinas.

En particular, siendo los xiloglucanos las hemicelulosas predominantes en las paredes celulares de tipo I, su enlace con la celulosa ha sido objeto de muchas investigaciones y se han propuesto, a lo largo de los años, varios modelos ultraestructurales de la pared celular primaria. El primer modelo de pared (Fig. 1.7A), propuesto por el grupo de Albersheim (Keegstra et al., 1973) sugería que los

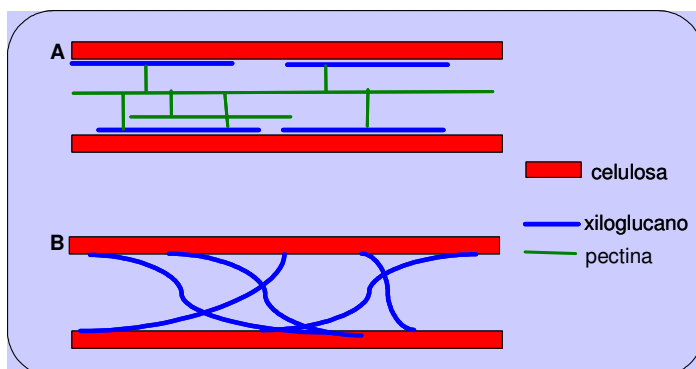


Fig.1.7. Representación ejemplificada de los modelos de enlace celulosa-xiloglucanos en la pared celular.

polímeros de la matriz, consistentes en xiloglucanos, pectinas y proteínas estructurales, estuvieran ligados entre ellos de manera covalente, formando una red macromolecular en la que la celulosa estaría unida a esta matriz mediante enlaces hidrógeno con los xiloglucanos. Cuando un trabajo posterior no confirmó la unión entre pectinas y xiloglucanos, se propuso otro modelo (**Tethered network model**; Fry, 1989; Hayashi, 1989; Fig.1.7B) según el cual las microfibrillas de celulosa estarían ligadas a través de largas cadenas de xiloglucanos que actuarían como puentes entre microfibrillas.

Las pectinas y las proteínas de la matriz constituirían una malla que enredaría físicamente la red celulosa-xiloglucanos, pero serían independientes y no ligados covalentemente a esa red. En la figura 1.7 se esquematizan los modelos A y B, poniendo el acento sólo en los enlaces entre la celulosa y los xiloglucanos y evidenciando otros componentes, como las pectinas, sólo en el modelo A, en el que se consideran elemento estructural indispensable para los enlaces celulosa-celulosa. Un tercer modelo (**Multicoat model**; Talbott and Ray, 1992b) propone que las microfibrillas estarían recubiertas por diferentes capas de polisacáridos progresivamente ligadas menos fuertemente. La diferencia principal entre los modelos B y C es que en el primero las microfibrillas estarían ligadas entre ellas de manera directa a través de "puentes" de xiloglucanos, en el segundo de manera indirecta a través de uniones laterales no covalentes con las sucesivas capas de polisacáridos. En la actualidad, ambos modelos son considerados posibles y tienen como punto en común que hay porciones de xiloglucanos que recubren las microfibrillas de celulosa y establecen enlaces no covalentes con las microfibrillas de celulosa y entre ellos, constituyendo así una red molecular con la celulosa (Cosgrove, 2001).

En realidad, estudios bioquímicos y bioinformáticos sugieren que el modelo descrito de interacción celulosa-xiloglucanos podría ser en realidad más complejo (Rose and Bennet, 1999): es probable que la **red de microfibrillas de celulosa-xiloglucanos** presente diferentes dominios funcionales, que deriva de la fortaleza de la unión de las diferentes porciones de xiloglucanos a las microfibrillas, hipótesis apoyada con datos experimentales (Edelmann and Fry, 1992). Ensayos de solubilización alcalina de los xiloglucanos de la pared han demostrado que una población de xiloglucanos puede ser solubilizada mediante tratamiento de la pared con 1M KOH, mientras que otra población es más resistente y necesita una extracción con 4M KOH (Edelmann and Fry, 1992).

Sea cual sea la ultraestructura exacta de la red celulosa-xiloglucanos, la manera en la que estos polisacáridos son ensamblados en la pared es un punto de particular interés.

Según los modelos actuales (Whitney et al., 1995; Morris et al., 2002) un punto fundamental de control para el ensamblaje funcional de la red celulosa-xiloglucanos ocurre en el momento de la extrusión de las microfibrillas de celulosa desde las rosetas localizadas en la membrana plasmática hacia la matriz, en la que se encuentran los xiloglucanos que ya han sido exportados en el apoplasto desde el aparato del Golgi. Los xiloglucanos, una vez en contacto con las nacientes microfibrillas, las recubrirían limitando su agregación y conectándolas, sea de manera directa o indirecta, regulando así las propiedades mecánicas de la pared.

1.1.6 CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DE LA PARED CELULAR DE MAÍZ

Polímero	% peso Seco		Esqueleto principal
	Pared Tipo I	Pared Tipo II	
Celulosa	20-30	20-30	1,4 β -D-Glcp
Hemicelulosas			
Xiloglucanos	10-20	1-5	1,4 β -D-Glcp
Glucomananos	5-10	n.d.	1,4 β -D-Manp 1,4 β -D-Glcp
Xilanos	5	20-40	1,4 β -D-Xylp
β -glucanos	Ausentes	10-30	1,4 y 1,3 β -D-Glcp
Pectinas			
Homogalacturonanos	15-20	1-5	1,4 α -D-GalpA
Ramnogalacturonanos I	10-15	2	1,4 α -D-GalpA y 1,2 α -L-Rhap
Ramnogalacturonanos I	2-5	1	1,4 α -D-GalpA
Proteínas estructurales			
Proteínas ricas en hidroxiprolina	1-10	1	Proteína rica en Hyp y Ser
Proteínas ricas en glicina	1	1	Proteína rica en Gly

Tabla 1.2. En la tabla, adaptada de O'Neill and York (2003), se resumen las diferencias principales que existen entre los dos tipos de pared primaria.

Como se ha mencionado en el apartado 1.1.1, las gramíneas presentan un tipo particular de pared celular, el tipo II, que se diferencia de la pared de tipo I, típica de las dicotiledóneas. Como se puede observar en la tabla 1.2, las diferencias mayores entre la pared de tipo I y II son a nivel de la composición en hemicelulosas y pectinas. En particular existen algunas hemicelulosas, como los β -glucanos, que son exclusivos de las paredes de tipo II. Los β -glucanos se caracterizan por ser unos de los pocos polisacáridos conocidos cuya presencia está regulada de manera específica según el estadio de desarrollo. Inicialmente están ausentes en las células meristemáticas, luego se acumulan durante la elongación

del coleoptilo hasta constituir el 20% del peso seco de la pared, para ser finalmente degradados una vez terminada la elongación (Kim et al., 2000). Se ha propuesto, por lo tanto, un papel de la degradación de los β -glucanos en el control de la expansión celular (Carpita et al., 2001). Además de la presencia de los β -glucanos, otra diferencia entre los dos tipos de pared es que en las paredes de tipo II las pectinas y los xiloglucanos son constituyentes minoritarios, mientras xilanos altamente substituidos, como los glucuronoarabinoxilanos, están presentes en grandes cantidades (Carpita, 1996).

Según el primer, único y todavía actual modelo propuesto para las paredes de tipo II (Carpita and Gibeaut 1993), los glucuronoarabinoxilanos tendrían un papel parecido al de las pectinas en el control de la porosidad de la pared, y al mismo tiempo actuarían como los xiloglucanos en las dicotiledóneas, haciendo de puentes que unen las microfibrillas de celulosa. Por lo tanto, la ultraestructura de la pared de tipo II sería similar a la de las paredes de tipo I, con la diferencia que el papel clave de los xiloglucanos en la constitución de una red con las microfibrillas de celulosa sería en este caso llevado a cabo por este tipo de xilanos. Una consecuencia lógica de este modelo es que el papel estructural minoritario de los xiloglucanos en este tipo de pared se refleje también en una función de menor importancia. Sin embargo, hay varias evidencias experimentales que desmienten esta idea. Primero, el *turnover* de los xiloglucanos en algunas gramíneas está en correlación con la expansión celular (Inouhe et al., 1984), mientras que esto no se ha observado nunca para los xilanos. Además, Kerr y Fry (2003) en un estudio sobre el tráfico y el metabolismo de los xiloglucanos *in vivo* en suspensiones celulares de maíz, han evidenciado la presencia de xiloglucanos de alto peso molecular; eso, según los autores, podría explicar en parte porqué las gramíneas pueden "sobrevivir" con cantidades diferentes de xiloglucanos respecto a las dicotiledóneas. Es probable que xiloglucanos de alto peso molecular, posiblemente ligados a otros polisacáridos, tengan un papel más importante en la arquitectura de la pared respecto a los xiloglucanos de bajo peso presentes en las dicotiledóneas. Finalmente, como se analizará más en detalle en el apartado 1.3, recientemente se ha demostrado que una clase de enzimas que tienen como sustrato los xiloglucanos, las xiloglucanoendotransglucosilasas-hidrolasas (XTHs) son, contrariamente a lo esperado, muy abundantes en algunas especies vegetales que presentan una pared de tipo II como el arroz y la cebada (Yokoyama et al., 2004; Strohmeier et al., 2004). Este dato, junto con la presencia de alta actividad de esta clase de enzimas en las gramíneas (Fry et al., 1992) sugiere que el posible papel de los xiloglucanos en la organización de la pared de las gramíneas tienda a

estar infravalorado y deja suponer una relevancia funcional mayor de lo esperado para estas hemicelulosas.

1.1.7 FUNCIONES DE LA PARED CELULAR

La pared celular, cuya estructura confiere a la célula forma y rigidez, representando un soporte mecánico, es un compartimento celular muy complejo asociado a un amplio espectro de eventos del desarrollo, procesos metabólicos y de respuesta a muchos estímulos externos. En tal contexto, cuando se considera la pared como compartimento metabólico altamente activo, se utiliza a menudo el término **apoplasto**. Éste se define como el compartimento celular exterior a la membrana plasmática, incluyendo todo el espacio extracelular. Por lo tanto, el apoplasto incluye la pared celular, la lámina media, los espacios intercelulares, agua y solutos. Debido a que la diferencia de significado es sutil, la mayoría de los autores utilizan los términos pared y apoplasto como sinónimos, sobretodo en referencia a la acción de las proteínas de este compartimento extracelular, que se definen como proteínas "de pared", "apoplásticas" o "extracelulares" con el mismo significado, y no implicando la definición "proteína de pared" una necesaria asociación física con esta estructura, aunque sí su localización externa a la membrana plasmática (Jamet et al., 2006; Lee et al., 2004). Asimismo, en determinados apartados de este trabajo, en los que se considera la pared desde el punto de vista funcional más que estructural, utilizaremos los términos apoplasto/pared y extracelular/apoplástico/de pared con el mismo significado.

Los procesos que están controlados por este compartimento celular incluyen la expansión y la diferenciación celular, donde el ensamblaje, la deposición, la reorganización y la selectiva degradación de la pared requieren las actividades de un complejo conjunto de enzimas. La expansión celular está regulada por varios estímulos ambientales, como la luz, la gravedad, la anoxia, el estrés hídrico y las hormonas; Así, hay numerosas evidencias de una correlación entre la organización estructural de los polisacáridos de la pared celular primaria y la expresión de proteínas de pared o la presencia de determinadas actividades enzimáticas.

Además, un gran número de proteínas apoplásticas están involucradas en fenómenos de defensa de la planta, en respuesta a herida, ataque por insectos, infección fúngica, elicitores y el ácido jasmónico, hormona relacionada con mecanismos de defensa. Estas proteínas se definen en su conjunto "proteínas PR" (*pathogenesis-related proteins*). En los últimos años, se han identificado un número cada vez más alto de proteínas de pared involucradas en fenómenos de

señalización y reconocimiento no sólo frente a patógenos, sino también entre distintos tipos celulares, como por ejemplo en las interacciones polen-pistilo. Esto evidencia el papel de la pared en la comunicación intercelular durante el proceso de desarrollo. Además de ser una efectiva barrera contra patógenos, la pared es también un sitio de respuesta a muchos estreses ambientales. De hecho, se han detectado cambios cualitativos o cuantitativos a nivel de su estructura o de su proteoma después de exposición a ozono, metales pesados, estrés osmótico e hídrico, estrés por frío o aclimatación (Lee et al., 2004).

Finalmente, el apoplasto es también un compartimento muy importante para el transporte y la secreción de iones, asimilados y otros metabolitos. En definitiva, estos ejemplos muestran los cambios importantes que pueden producirse en el apoplasto durante el ciclo vital de una planta.

1.1.7.1 EXPANSIÓN CELULAR Y WALL LOOSENING

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, una función muy importante de la pared es la de permitir la expansión de la célula vegetal: por un lado la pared tiene que ser muy rígida para sostener el estrés conferido por la presión de la turgencia interna de la célula, por otro lado tiene que mantener la capacidad de extenderse bajo de esta presión. Las células meristemáticas, después de una determinada secuencia de divisiones, empiezan un proceso programado de crecimiento y diferenciación celular que determina cambios notables a nivel de metabolismo, de organelos, y en gran medida a nivel de la pared.

La pared, que durante estas fases se encuentra en el estadio de pared primaria, acompaña el crecimiento celular modificando la organización de polímeros preexistentes y sintetizando nuevo material polimérico. La coordinación entre estos dos eventos permite a la pared seguir el crecimiento de la célula, que modifica, a menudo en gran medida, sus dimensiones. La fuerza que guía el crecimiento celular es un aumento en la presión de turgencia que se produce en el interior de la célula en respuesta al desequilibrio osmótico que existe entre los fluidos extracelulares y los intracelulares. Dicha presión se ejerce de manera uniforme sobre la pared que se extiende y desencadena el paso de una organización rígida a una plástica.

La relajación de la pared, que reside en la modificación de los enlaces que existen entre sus diferentes componentes poliméricos, tiene tanto una base biofísica, como una base bioquímica.

La base biofísica reside en un proceso viscoelástico, refiriéndose la viscoelasticidad a las propiedades mecánicas de un material de naturaleza viscosa que se deforma de manera elástica en respuesta a un estrés; en el caso de la expansión celular, se puede referir a la pared que se modifica mediante relajación (Cosgrove, 1993). Para definir los aspectos biofísicos a la base de las modificaciones de la pared

algunos autores utilizan el termino **cell wall creep** (literalmente deslizamiento), que se puede definir como el movimiento de los polímeros que constituyen la pared, aumentando de esa manera su superficie y produciendo su extensión (Cosgrove, 2005).

Por otro lado, la relajación de la pared no sería posible sin una base bioquímica, que reside en la modificación de los enlaces que existen entre los diferentes componentes poliméricos de la pared y que ha sido indicada con el término de **cell wall loosening**.

El término *wall loosening* ha sido utilizado a lo largo de los años por diferentes autores con varios significados y aun hoy en día esta confusión en su definición genera una falta de acuerdo entre los autores en atribuir a determinadas proteínas un papel en este fenómeno.

La definición más simple y general de *wall loosening* es la de una modificación de la estructura de la pared que se relaja en respuesta a la presión de turgencia e implica su expansión. En un sentido, este término puede indicar un aflojamiento mecánico de la pared, que se puede medir en ensayos mecánicos de viscoelasticidad, y en tal sentido vendría a coincidir con el *wall creep* (Hoson and Masuda, 1992). Otra definición, esta vez bioquímica, entiende por *wall loosening* el efecto resultante en la pared de cualquier corte en sus polímeros estructurales (Fry et al., 1992; Nishitani and Tominaga, 1992). Finalmente, este término puede también denotar cualquier acción que causa relajación y extensión de la pared, sin tener en cuenta su base bioquímica o mecánica (Taiz, 1984). Así, el *wall loosening* podría ocurrir sin ninguna relajación viscoelástica de la pared, ni hidrólisis de sus polímeros (Cosgrove, 1993). Según Cosgrove (2005), la definición más apropiada de *wall loosening* es la de un fenómeno de modificación de la pared, que conduce a su extensión y que tiene su fundamento tanto en una base biofísica como bioquímica, ninguna de las cuales puede prescindir de la otra.

1.1.7.2 WALL LOOSENING DURANTE EL DESENSAMBLAJE DE LA PARED

Según la definición de Cosgrove (2005), el *wall loosening* estaría asociado exclusivamente a fenómenos de expansión celular, que se caracterizan por unas modificaciones de la pared necesarias para su extensión, aunque su integridad estructural se mantiene.

Sin embargo, la pared está sometida a importantes cambios que son en parte parecidos no sólo durante la expansión celular, sino también durante fenómenos de diferente naturaleza, como el ablandamiento de los frutos (*fruit softening*) que conlleva su maduración (*fruit ripening*), la maduración de las semillas, la abscisión de órganos, la formación de elementos traqueales, la formación del aerénquima

etc. En tales procesos, la pared sufre cambios importantes de carácter irreversible en su arquitectura, definidos como "desensamblaje" (*cell wall disassembly*). Este término se utiliza para indicar la degradación controlada de los polímeros que constituyen la pared, necesaria durante determinados eventos de desarrollo como los mencionados anteriormente (Rose et al., 2003). Las modificaciones que se llevan a cabo durante el desensamblaje de la pared sugieren un paralelismo con los cambios presentes durante la expansión celular. Por esa razón, el concepto de *wall loosening* se extiende a menudo también a fenómenos diferentes de la expansión celular, pero implican igualmente cambios a nivel de la pared (Rose and Bennet, 1999).

De manera similar, el término "agentes del *wall loosening*", utilizado en un primer momento para indicar exclusivamente los responsables bioquímicos de la expansión celular capaces de inducir la extensión de la pared *in vitro* (Cosgrove 1999), es utilizado actualmente por la mayoría de los autores para definir el conjunto de mecanismos enzimáticos, proteínas, o incluso compuestos responsables de las modificaciones de la pared celular a la base de diferentes fenómenos fisiológicos (Fry, 2004; Rose et al., 2004).

1.2 LOS AGENTES DEL WALL LOOSENING

Los avances en el campo bioquímico, proteómico y bioinformático han permitido en los últimos años identificar varios mecanismos enzimáticos, proteínas, o compuestos responsables de fenómenos de modificación de la pared celular. Además, es probable que todavía queden muchos por determinar. Esto por un lado permitirá un conocimiento más profundo de los mecanismos a la base de las modificaciones de la pared, por otro lado abre nuevas preguntas sobre la posible coordinación de diferentes procesos de modificación de la pared (Rose et al., 2004). A continuación se describen los agentes del *wall loosening* mejor caracterizados hasta la fecha.

1.2.1 LAS EXPANSINAS

El estudio de los factores responsables del fenómeno del *wall loosening* durante el crecimiento de la célula vegetal empezó ya en los años 70, con la observación de la capacidad de la pared de extenderse a pH ácido, dando lugar a la **teoría del crecimiento ácido** de las plantas. Veinte años más tarde fueron identificadas las proteínas mediadoras de ese proceso, la expansinas (McQueen-Mason et al., 1992). Estas proteínas fueron identificadas por su capacidad de restablecer *in vitro* y de

una manera pH dependiente la extensión de paredes de células aisladas de tejidos en fase de crecimiento. Su mecanismo de acción todavía no está claro, pero parece que actúen destruyendo los enlaces hidrógeno entre la fibrillas de celulosa y los polisacáridos de la matriz. La purificación y secuenciación de una expansina de pepino (*Cucumis sativus*) permitió el aislamiento del primer gen de expansina (Shcherban et al., 1995). Enseguida fueron identificados muchos otros genes homólogos en gimnospermas y angiospermas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. El grande número de genes que codifican para expansinas (38 en arabidopsis, un mínimo de 30 en maíz, 80 en arroz) sugieren una función tejido-específica de estas proteínas. Estos genes pertenecen a una familia multigénica altamente conservada y han sido divididos inicialmente en dos subfamilias: las α -expansinas (*EXP*) y las β -expansinas (*EXPB*). Además, hay un tercer subgrupo relacionado, las *expansin-like* (*EXPL*), identificadas en los genomas de arabidopsis y arroz. Las dos familias *EXP* y *EXPB* sólo tienen el 20% de identidad aminoacídica pero comparten varios motivos conservados y una actividad similar de relajación de la pared.

Las expansinas están involucradas en todos aquellos procesos que requieren la relajación y expansión de la pared celular y por eso no sólo juegan un papel importante en el crecimiento, sino también en diferentes aspectos del desarrollo de la planta, como la organogénesis de la hoja, la maduración de los frutos, la penetración del tubo polínico en las gramíneas y la abscisión de las flores y las hojas. Estos procesos requieren la degradación de la pared en áreas controladas y por lo tanto confirman el paralelismo, antes mencionado, entre los fenómenos de expansión celular y los fenómenos de diferenciación.

Las expansinas se configuran por lo tanto como importantes agentes efectores del *wall loosening*, aunque no se les puede adscribir ninguna acción enzimática concreta. De hecho, el mecanismo bioquímico exacto de acción de estas proteínas, las que mejor se han caracterizado por su efecto en la pared, curiosamente es todavía desconocido (Cosgrove, 1999; Fry, 2004).

1.2.2 RADICALES OXIDRILOS

Si a las expansinas no se les puede atribuir una actividad enzimática, hay otros agentes del *wall loosening* que no son ni siquiera de naturaleza proteica, como los radicales oxidrilos ($\cdot\text{OH}$). Estos son una forma muy activa de especies reactivas del oxígeno, con un papel muy importante en fenómenos de señalización durante el estrés oxidativo y la respuesta al ataque de patógenos (respuesta hipersensible). Estudios recientes han avanzado la hipótesis de un papel de estos radicales en el *wall loosening*: los $\cdot\text{OH}$ serían utilizados por células en fase de crecimiento para

relajar su pared y estimular la extensión celular. Esta hipótesis se basa en la evidencia experimental de que los polisacáridos pueden ser cortados con radicales oxidrilos *in vitro* mediante una reacción no enzimática (Fry, 1998), y además se ha demostrado que la extensión de paredes aisladas puede ser inducida artificialmente por radicales oxidrilos (Liszkay et al., 2003). Finalmente, los $\cdot\text{OH}$ pueden solubilizar las pectinas de la pared de frutos de tomate *in vitro*, indicado así una función en las modificaciones que intervienen en los mecanismos de maduración de los frutos (Dumville and Fry, 2003).

1.2.3 ENZIMAS RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DE LOS XILOGLUCANOS: LA FAMILIA DE LAS GLICOSIL HIDROLASAS (GH)

Los xiloglucanos constituyen las hemicelulosas más abundantes en la pared primaria de las plantas que presentan pared de tipo I, en las cuales unen mediante enlaces cruzados microfibrillas de celulosa adyacentes con enlaces no covalentes y por lo tanto se les atribuye un papel estructural clave: los enlaces cruzados xiloglucano-celulosa son capaces de restringir la expansión celular y permiten así la generación de la presión de turgencia.

Por otro lado, cuando la célula está sometida a expansión y extensión, las microfibrillas necesitan ser desatadas y reorganizadas para permitir la incorporación de nuevo material a la pared. La evidencia de que los xiloglucanos fueran sitios primarios de acción en procesos de *wall loosening* se logró con el descubrimiento que la elongación inducida por auxinas de epicotilos de guisante está asociada con el metabolismo de los xiloglucanos (Labavitch and Ray, 1974). Además, se demostró que el crecimiento inducido por auxinas induce una disminución en el peso molecular de los xiloglucanos extraídos de epicotilos de judía azuki (Nishitani and Masuda, 1983) y guisante (Talbot and Ray, 1992a).

En tal contexto, el metabolismo de estas hemicelulosas es un elemento central en los modelos de modificaciones de la pared durante el *wall loosening* transitorio en las células en fase de expansión, o bien durante la degradación terminal de la pared que ocurre durante procesos como la maduración de los frutos y la abscisión de los órganos (Cosgrove 2003; Rose and Bennet 1999). Por consiguiente, los enzimas asociados con el metabolismo de los xiloglucanos representan un importante mecanismo potencial para regular la fuerza, la extensibilidad y la integridad de la pared.

Los xiloglucanos se utilizan también para almacenar reservas en las semillas de algunas especies vegetales, como la capuchina (*Tropaeolum majus*), en las cuales se acumulan en forma de depósitos en el interior de la pared del cotiledón para ser luego hidrolizados al momento de la germinación (Buckeridge et al, 2000).

A lo largo de los años han sido propuestas varias clases de proteínas que interactúan con la red celulosa-xiloglucanos, que se agrupan en tres grandes familias: las **GLICOSIL HIDROLASA 5, 9 y 16 (GH5, GH9, GH16)**.

La **GH5** y **GH9** son dos familias a las que pertenecen las **endo-1,4- β -glucanasas**, termino general para indicar enzimas hidrolíticos, llamados también "celulasas", cuyos sustratos potenciales en la pared son la celulosa, los xiloglucanos, y los β -glucanos específicos de las gramíneas. A pesar de que la expresión de las endoglucanasas vegetales ha sido durante años objeto de estudio en relación a fenómenos de maduración de los frutos, abscisión y crecimiento, las propiedades bioquímicas de estos enzimas y su posible papel en el *wall loosening* han sido objeto de muy poca atención.

El genoma de arabidopsis contiene 13 genes clasificados como miembros de la familia GH5, pero hasta la fecha estos genes son conocidos solo por su secuencia. El hecho de que para enzimas de la familia GH5 de bacterias se ha demostrado no sólo actividad endoglucanasa, sino también endo-xilanasas, endo-mannanasas y hidrolasa con otros sustratos preferentes, permite suponer que los genes GH5 vegetales codifican proteínas sin una exclusiva actividad endo-1,4- β -glucanasas (Cosgrove, 2002).

También, en arabidopsis, hay 25 genes que codifican para miembros de la familia GH9. Tres de ellos codifican endoglucanasas ancladas a membrana (KORRIGAN). Mutantes *korrigan* de arabidopsis presentan defectos en la citocinesis y en la elongación celular (Lane et al., 2001). Las restantes 22 proteínas de la familia GH9 de arabidopsis se localizan extracelularmente según predicción, y su función es desconocida. Curiosamente las endoglucanasas mejor caracterizadas provienen de otra especie vegetal, el chopo (PopCel1 y PopCel2); estos enzimas presentan muy baja afinidad para los xiloglucanos, pero alta actividad contra las regiones no cristalinas de la celulosa, regiones que se considera involucradas en el enredamiento físico de los xiloglucanos con las microfibrillas. Por lo tanto, se ha propuesto que estos enzimas tengan un papel en el *wall loosening* mediante la liberación de los xiloglucanos enredados en las microfibrillas (Ohmiya et al., 2000). Además, la sobreexpresión de PopCel1 en arabidopsis produce un fenotipo que se caracteriza por un aumento del crecimiento celular y una mayor extensibilidad de la pared. Asimismo, la supresión por antisentido de este enzima en chopo produce una reducción en el crecimiento del 32%. En arabidopsis se obtuvieron resultados similares mediante silenciamiento de un gen endógeno homólogo (Tsay et al., 2003).

La gran familia 16 de las glicosil hidrolasas (**GH16**) comprende cinco subgrupos en base a la especificidad de sustrato (Strohmeier et al., 2004; <http://www.ghdb.uni-stuttgart.de>):

- **Xiloglucano-endotransglucosilasas/hidrolasas (XTHs)**
- (1,3)- β -galactanasas
- (1,4)- β -galactanasas/ carrageenasas
- (1,3) (1-4)- β -glucanasas
- (1,3) (1-4)- β -glucanasas "no especifica"

La primera subfamilia, la de las XTHs ha sido involucrada en procesos de modificación de la pared y es por lo tanto objeto específico de nuestro interés.

1.3 LAS XILOGLUCANO-ENDOTRANSGLUCOSILASAS/HIDROLASAS (XTHs)

1.3.1 DESCUBRIMIENTO DE LAS XTHs

El corte de los xiloglucanos mediante enzimas hidrolíticas es consistente con una rápida relajación de la pared. Sin embargo, en ausencia de una acción significativa de síntesis y refuerzo de la pared, el resultado final para la célula sería una reducción de la fuerza mecánica de la pared, con un potencial efecto estructural desastroso. Por lo tanto, en el año 1976, Albersheim propuso que pudiera existir una actividad transglucosilasa* que permitiera a la célula expandirse sin afectar la estructura de la pared. El corte endolítico de una cadena de xiloglucano permitiría así a las microfibrillas de celulosa separarse, y la reconexión de una extremidad de un xiloglucano con otra molécula presente en la pared serviría para restablecer una estructura estable. La dificultad en encontrar un enzima con esa actividad reside en la naturaleza de esa reacción. La mayoría de los ensayos enzimáticos se realizan midiendo la conversión de un sustrato en un producto; sin embargo para una transglucosilasa, que primero hidroliza y luego forma otro enlace idéntico en un sitio nuevo, el sustrato y el producto no se pueden distinguir fácilmente, aunque haya una variación en la longitud de las cadenas de xiloglucanos.

En los primeros años '90 varios grupos de investigación que estudiaban enzimas que modifican los xiloglucanos identificaron de manera independiente una clase de enzimas con un alto nivel de especificidad para los xiloglucanos, hoy denominadas xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasas (XTHs; Rose et al., 2002). Fry y col.

*En este trabajo el término transglucosilasa hace referencia al corte específico de un enlace entre residuos de glucosa (constituyentes del esqueleto de xiloglucano). Con el término transglicosilasa se considera la posibilidad de un corte de un azúcar no especificado (puede ser glucosa pero también residuos como galactosa, manosa u otros).

descubrieron una nueva actividad enzimática, capaz de cortar y reconectar moléculas de xiloglucanos de tejidos en fase de activo crecimiento, y la definieron como xiloglucano endotransglucosilasa (XET; Smith and Fry, 1991); al mismo tiempo Nishitani y Tominaga (1992) purificaron una proteína, con actividad similar, que nombraron endoxiloglucan transferasa (EXT, más tarde renombrada EXGT). Como parte de una tercera línea de investigación independiente, se caracterizó una "xiloglucano-especifico endo- β -1,4-glucanasa, o "xiloglucanasa" involucrada en la depolimerización de los xiloglucanos de semillas de capuchina después de la germinación. Esta enzima mostró actividad XET *in vitro* (Farkas et al., 1992; Fanutti et al., 1993). Esta evidencia contrasta con su conocida actividad xiloglucano endohidrolasa (XEH) y ejemplifica una interesante distinción entre actividades transglucosilasa o hidrolasa detectadas *in vitro*, y acción *in vivo* de una determinada enzima.

A lo largo de una década el aislamiento y la caracterización de un gran número de genes homólogos de varias especies vegetales cuyos productos exhiben actividad exclusiva XET por un lado, XEH por otro lado, o ambas, ha hecho necesaria la introducción de una nueva nomenclatura para esta clase de proteínas, que se definieron finalmente como **XiloglucanoendoTransglucosilasa-Hidrolasa (XTH)** (Rose et al., 2002). Asimismo, las dos actividades enzimáticas que presentan estas enzimas se definen:

- **Xiloglucanoendotransglucosilasa (XET)**
- **Xiloglucanoendohidrolasa (XEH)**

En realidad, la actividad presente en la mayoría de las XTHs y por lo tanto mejor caracterizada es la actividad XET. Alternativamente, algunas XTHs actúan de manera preferencial o incluso exclusivamente como hidrolasas, (actividad xiloglucano endo-hidrolasa, **XEH**). Estas dos actividades podrían tener funciones fisiológicas distintas, debidas a efectos diferentes en la integridad de la pared (Rose et al., 2002).

1.3.2 ACTIVIDAD XET (XILOGLUCANO ENDOTRANGLUCOSILASA)

La mayoría de las XTHs pueden actuar como transglucosilasas (actividad xiloglucano endotransglucosilasa, **XET**), catalizando el corte de un polímero de xiloglucano (donador) y su transferencia a la extremidad de otra molécula de xiloglucano (aceptor).

Aunque la existencia de una acción endotransglucosilasa fue por primera vez detectada *in vivo* (Baydoun and Fry, 1989; Smith and Fry, 1991), su caracterización rigurosa se realizó mediante estudios *in vitro*, es decir en términos

de una reacción catalizada y de su especificidad de sustrato en el marco de estudios sobre extractos enzimáticos. Extractos crudos de cualquier planta en fase de crecimiento eran capaces de catalizar la reacción de transglucosilación en presencia de un xiloglucano (polisacárido) y un oligosacárido derivado de un xiloglucano, marcado con tritio ($^3\text{H-XGO}$) (Fry et al., 1992; Nishitani and Tominaga, 1991).

La actividad XET se define como una reacción que utiliza dos sustratos: un **sustrato donador** y un **sustrato aceptor**. El enzima xiloglucano-endotransglucosilasa-hidrolasa (XTH) efectúa un corte en el extremo reductor de un xiloglucano (que representa el sustrato donador), (Fig 1.8a) formando un complejo covalente polisacárido-enzima (xiloglucano-XTH) (Fig.1.8b)

Una vez formado el intermedio transitorio enzima-sustrato, el enzima es capaz de incorporar al extremo reductor de la molécula de xiloglucano previamente cortada (sustrato donador), el extremo no reductor de la molécula de otro xiloglucano, o de un oligosacárido de xiloglucano (sustrato aceptor) (actividad transglucosilasa) (Fig1.8c).

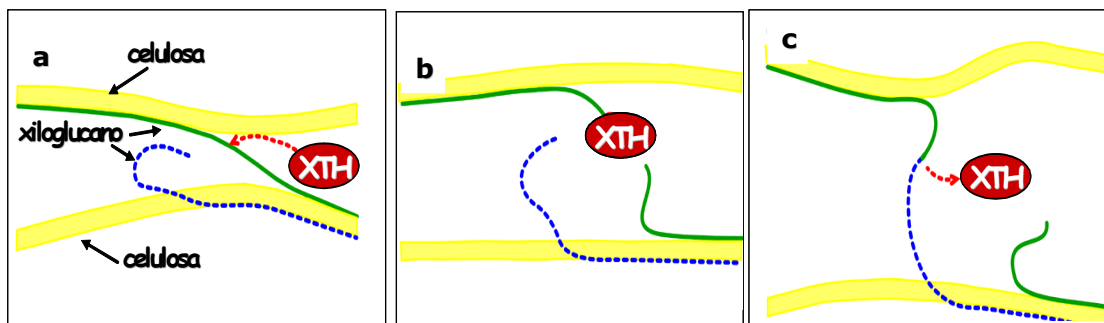


Figura 1.8. Representación esquemática de la actividad XET. Figura adaptada del sitio web <http://homepages.ed.ac.uk/sfry/research.html>

Como ya se ha mencionado, en este tipo de reacción enzimática, *in vivo*, los sustratos y los productos no necesariamente difieren químicamente el uno del otro; de hecho, los xiloglucanos no sólo sirven de sustrato donador, sino también pueden actuar como sustrato aceptor (alternativamente a oligosacáridos de xiloglucano). Consecuentemente, un requisito fundamental para los ensayos *in vitro* es que los sustratos se puedan distinguir de los productos. Para ello, se han puesto a punto ensayos que utilizan como sustrato donador un polisacárido (como el mismo xiloglucano), y como sustrato aceptor se utiliza un oligosacárido derivado de un xiloglucano, cuya masa molecular es mucho inferior. De tal manera, sustratos y productos se puedan diferenciar por su masa molecular.

Los **oligosacáridos de xiloglucanos (XGOs)** se definen como el producto de la hidrólisis, *in vivo* o *in vitro*, de xiloglucanos por parte de endo-1,4- β -glucanasas microbianas o vegetales. El extremo reductor de los oligosacáridos es normalmente un residuo de glucosa no sustituido, es decir sin ramificaciones laterales.

Según la nomenclatura de uso corriente (Fry et al., 1993), los oligosacáridos se definen con el mismo código de letras utilizadas para los xiloglucanos. Además el sufijo "ol" se refiere a un oligosacárido reducido (fig. 1.9).

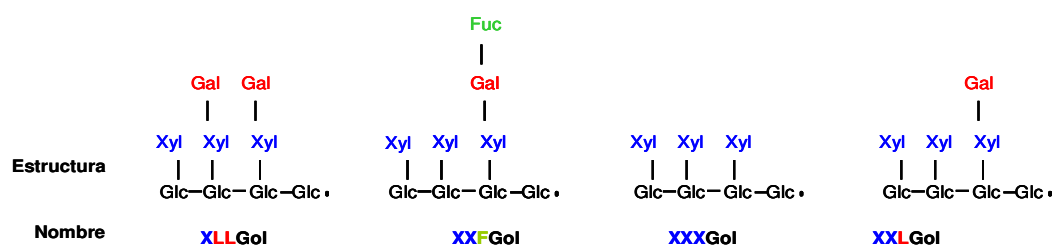


Fig. 1.9 Ejemplos de oligosacáridos de xiloglucanos, comúnmente utilizados como sustratos aceptores en los ensayos XET

1.3.2.1 ENSAYOS XET

En base a la presencia de moléculas de xiloglucano como sustrato aceptor, y de oligosacáridos como sustrato donador, se han puesto a punto varios métodos de detección de actividad XET *in vitro*, que se basan en una diferencia en peso molecular entre sustrato donador y sustrato aceptor, la cual implica una consecuente diferencia en peso molecular entre sustrato y producto, y por lo tanto es posible la detección de la reacción enzimática.

La capacidad de los xiloglucanos de alto peso molecular de unirse de manera estable a la celulosa presente en papel de filtro ha sido explotada para poner a punto técnicas de detección de actividad XET que se basan en la detección en papel de filtro de xiloglucanos ligados a sustratos aceptores (oligosacáridos) marcados, o radiactivamente o por fluorescencia (Fry et al., 1992; Fry, 1997). Otros métodos de detección de actividad se basan en técnicas cromatográficas (Nishitani and Tominaga, 1992; Catalá et al., 2001) o colorimétricas (Sulová et al., 1995)

Además se ha puesto a punto un método microscópico de detección *in vivo* de la actividad XET, que se basa en la infiltración de tejidos vegetales con oligosacáridos marcados por fluorescencia. Su incorporación a productos de alto peso molecular se identifica por la fluorescencia, después del lavado. La ventaja de este método es el uso del sustrato donador endógeno, permitiendo así la colocalización *in situ* enzima-sustrato (Vissenberg et al., 2000).

1.3.2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA ACTIVIDAD XET

Los parámetros que pueden influenciar en la actividad XET *in vitro* han sido extensivamente examinados. Algunas de las características analizadas son las siguientes:

a) Especificidad de sustrato donador

La única molécula que puede funcionar de sustrato donador es el xiloglucano. Como única excepción, se ha descrito una XTH de capuchina, capaz de catalizar la trasglucosilación utilizando como sustrato donador un oligosacárido de xiloglucano con estructura XXXGXXXG (Fanutti et al., 1993; 1996). Sin embargo, la totalidad de las otras XTHs ensayadas por su actividad no utilizan este sustrato. En la mayoría de los ensayos, se emplea comúnmente xiloglucanos de tamarindo; se ha observado que la presencia de residuos de fucosa en la molécula de xiloglucano puede afectar la velocidad de reacción; sin embargo, la definición del papel del este residuo está lejos de ser clara, ya que se han descrito efectos exactamente opuestos en la velocidad de la reacción, que puede ser más rápida (Nishitani and Tominaga, 1992; Campbell and Braam, 1999a) o más lenta (Fry et al., 1992; Campbell and Braam, 1999a; Rose et al., 1996)

b) Especificidad de sustrato aceptor

Los requisitos estructurales mínimos para un buen oligosacárido aceptor son la presencia de dos residuos de xilosa y tres de glucosa (Lorences and Fry, 1993); por lo tanto, determinados oligosacáridos como los que se han mostrado en la fig. 1.9 son buenos sustratos aceptores, mientras que los que se muestran en la fig. 1.10 no lo son.

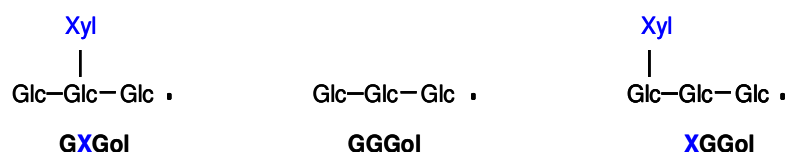


Fig. 1.10 Ejemplos de oligosacáridos que no son buenos sustratos aceptores

Un esqueleto rico en glucosa y xilosa es esencial para la función de aceptor, mientras que no son necesarios ni residuos de galactosa ni de fucosa (Fry et al., 1992; Nishitani and Tominaga, 1992), aunque puedan influenciar la interacción con el enzima.

c) Óptimo de pH

La actividad XET endógena presente en una amplia gama de especies vegetales es máxima a pH 5,5 (Fry et al., 1992). Eso es consistente con el pH ácido del apoplasto. El perfil de actividad en función del pH de varias XTHs ha evidenciado como la mayoría de las isoformas analizadas, a pesar de presentar sutiles diferencias, son todas activas en una amplia gama de pH, entre 4,5 y 7, manteniendo su máximo de actividad en los pH fisiológicos de la pared (pH 5,5-6) (Campbell and Braam, 1999a; Van Sandt et al., 2006).

d) Sitio de corte del sustrato donador

La posición del corte en la molécula de sustrato donador ha sido ampliamente estudiada (Steele et al., 2001) y se ha demostrado que las XTHs hidrolizan la molécula de xiloglucano al azar, según un patrón ya descrito y definido como *random cleavage* (Nishitani and Tominaga, 1992). Eso significa que no hay una preferencia de corte hacia un extremo o el otro de la cadena de xiloglucano; esta observación ha desmentido la hipótesis según la cual las XTHs escogerían el sitio de corte a una distancia determinada desde el extremo del xiloglucano, implicando así que los productos finales de la reacción pueden tener pesos moleculares muy diferentes.

e) Longevidad del complejo XTH-Xiloglucano.

Otra característica emergida de la caracterización de la actividad XET *in vitro* es la capacidad del enzima XTH en mantenerse ligada covalentemente a su sustrato donador durante un tiempo considerable, llegando a ser de hasta varias horas (Sulová et al., 1998). Esta característica ha sido explotada para poner a punto métodos de purificación de proteínas con actividad XET (Steele and Fry, 1999; Sulová and Farkas, 1999). Además, la observación *in vitro* de la longevidad del complejo enzima-sustrato sugiere que *in vivo* del enzima se quede un tiempo considerable buscando un aceptor apropiado en la pared (Fry, 2004).

1.3.3 ACTIVIDAD XEH (XILOGLUCANO ENDOHIDROLASA)

La otra actividad de las XTHs, la actividad xiloglucano endohidrolasa (XEH), consiste en la hidrólisis de una molécula de xiloglucano. De hecho, la actividad XEH representa una variante de la actividad XET, en la que la molécula aceptora es agua en lugar de un xiloglucano. Esta actividad ha sido descrita, entre otras especies, en capuchina, guisante, judía azuki, frutos de tomate en maduración y kiwi (Rose et al., 2002).

La viscosidad de los polisacáridos disminuye después de su hidrólisis. Por lo tanto, para la determinación *in vitro* de la actividad XEH, el método más utilizado es el método viscométrico, en el que se mide la reducción de la viscosidad de los polisacáridos hidrolizados (Sulová et al., 1995).

La mayoría de las XTH actúan *in vitro* como endotransglucosilasas (actividad XET), mientras que otras actúan preferentemente como endohidrolasas (actividad XEH). Esta segunda actividad prevalece *in vitro* en presencia de bajas cantidades de sustratos aceptores.

Que estas dos actividades sean presentes *in vivo* es discutible: Tabuchi y col. (2001) han descrito una XTH de judía azuki que presenta *in vitro* actividad XEH pero no XET, ni siquiera en presencia de altos niveles de sustrato aceptor. Esta evidencia indicaría una actividad XEH exclusiva para esta enzima. Sin embargo, otros autores consideran que todas las XTHs podrían presentar *in vivo* tanto actividad XET como XEH, aunque a diferentes niveles (Saladié et al., 2006). De esa manera, hay algunas XTHs, como la TmXTH1 de capuchina, que presentan una potente actividad XEH, pero también pueden llevar a cabo transglucosilación cuando en presencia de altas cantidades de oligosacáridos aceptores (Fanutti et al., 1993); en contraposición hay otras XTHs que presentan una marcada preferencia hacia los xiloglucanos como aceptores, explicando así una actividad transglucosilasa, pero también presentarían igualmente una baja actividad hidrolasa (Saladié et al., 2006).

1.3.4 LAS XTHs PERTENECEN A FAMILIAS MULTIGÉNICAS

La secuenciación de varios genomas vegetales ha evidenciado la presencia de familias multigénicas de XTHs, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. En particular la familia de XTHs de *Arabidopsis* consta de 33 miembros (Yokoyama and Nishitani, 2001a), 29 la de arroz (Yokoyama et al., 2004), 25 la de tomate (Saladié et al., 2006), 22 la de cebada (Strohmeier et al., 2004), y al menos 9 la de *Selaginella kraussiana* (Van Sandt et al., 2007).

Las XTHs presentes en los diferentes genomas vegetales pueden ser agrupadas en 3 o 4 subgrupos filogenéticos (Campbell and Braam, 1999b; Rose et al., 2002); sin embargo, todavía no está claro si estas agrupaciones tienen una base fisiológica o bioquímica.

A nivel fisiológico, para el subgrupo 1 y el subgrupo 2 se han podido delinear algunas características distintivas.

El **subgrupo 1** agrupa genes de muchas especies con alta identidad de secuencia (70-89%; Campbell and Braam, 1999b), que se expresan en tejidos jóvenes en fase de desarrollo; de hecho, a este subgrupo están asociadas XTHs con un papel en fenómenos de elongación y expansión, como la SIXTH1 de tomate (nombre anterior LeEXT, Catalá et al., 1997), la GhXET de algodón (Shimuzu et al., 1997), la VrXTH1 de garbanzo verde (*Vigna radiata*, Yun et al., 2005), la CaXTH1 de *Cicer arietinum* (Romo et al., 2005), la BcXTH1 de *Brassica campestris* (Shin et al., 2006). En algunos casos la expresión de estas XTHs aumenta en respuesta al tratamiento con hormonas que promueven el crecimiento, como en el caso de la SIXTH1 de tomate, cuya expresión es estimulada por auxinas (Catalá et al. 1997)

En contraposición, una característica de las XTHs del **subgrupo 2** es que son a menudo estimuladas por estreses ambientales u hormonales no siempre asociados con fenómenos de crecimiento. Es el caso de la Zm1005, la única XTH de maíz descrita hasta la fecha, que se induce por sumergimiento durante la formación del aerénquima (Saab and Sachs, 1996), las BvXTH1 y BvXTH2 de caña de azúcar inducidas por herida (Dimmer et al., 2004), la AtXTH22 de arabidopsis (antiguo nombre TCH4, Xu et al., 1995), inducida por auxinas, brasinosteroides y estímulos ambientales, y la SIXTH2 de tomate (nombre anterior LeXET2, Catalá et al., 2001), reprimida por auxinas. Particularmente interesante es el caso de las SIXTH1 y SIXTH2 de tomate, pertenecientes a los subgrupos 1 y 2 respectivamente. Estas dos XTHs presentan dos patrones de expresión diametralmente opuestos, la primera en la zona de elongación de los hipocotilos y en estadios de rápida expansión durante el desarrollo del fruto de tomate, la segunda en estadios más avanzados del desarrollo del fruto, cuando la expansión ya está terminando y empieza el proceso de maduración (Saladié et al., 2006). Además, estas dos XTHs responden diferentemente a la misma hormona, las auxinas: mientras que la SIXTH1 está estimulada, mientras que la SIXTH2 está reprimida. Estos datos confirman la presencia de funciones metabólicas que pueden ser diametralmente opuestas para diferentes XTHs, filogenéticamente lejanas, de una misma especie.

El **subgrupo 3** representa una subfamilia más divergente, para la cual no es posible efectuar el mismo tipo de agrupación funcional en base a la observación de un patrón de expresión similar, como en el caso del subgrupo 1, o de la inducción por diferentes estímulos, como en el caso del subgrupo 2. El análisis de las XTHs pertenecientes a este subgrupo ha planteado la hipótesis de que la divergencia filogenética que permite la subdivisión de las XTHs en diferentes subgrupos refleja un mecanismo bioquímico de acción diferente (Rose et al., 2002). De hecho, este subgrupo incluye proteínas para las cuales se ha demostrado una dominante actividad hidrolasa (XEH), como la NXG1 de capuchina (de Silva et al., 1993). Estas

observaciones han llevado a la hipótesis que la actividad hidrolítica preferente es una característica de las XTHs del subgrupo 3. Esto sería consistente, a nivel funcional, con fenómenos que conllevan la despolimerización de los xiloglucanos, tal como ocurre durante la movilización de los xiloglucanos de reserva en las semillas de capuchina. Sin embargo, esta hipótesis ha sido recientemente desmentida por la caracterización enzimática de SIXTH5 de tomate, que pertenece a este subgrupo y se expresa de manera específica durante la maduración del fruto de tomate, proceso que comporta una masiva despolimerización de los xiloglucanos. La caracterización enzimática de la proteína recombinante expresada en un sistema heterólogo ha evidenciado como, *in vitro*, la SIXTH1 recombinante posee una actividad XET dominante respecto a una actividad XEH (Saladié et al., 2006).

Sea cual sea la base funcional de la subdivisión en subgrupos filogenéticos, el carácter multigénico de las XTHs refleja una amplia gama de funciones, tanto en fenómenos de activa elongación y expansión celular, como en fenómenos de desarrollo que, sin comportar crecimiento, llevan a cambios importantes a nivel de la pared, que tiene que ser degradada, sintetizada o reforzada. En tal contexto, la multifuncionalidad de las XTHs en la pared encaja con la observación que los procesos de *wall loosening* están asociados a una gran variedad de fenómenos fisiológicos, tanto durante el crecimiento como durante la diferenciación celular.

Algunos autores concuerdan en añadir un cuarto subgrupo minoritario, el **subgrupo 4**, al que pertenecen, en la mayoría de los casos, sólo XTHs de monocotiledóneas gramíneas (Campbell and Braam, 1999b; Catalá et al., 2001; Divol et al., 2007). Según otros trabajos, esta subfamilia agruparía tanto XTHs de monocotiledóneas como de dicotiledóneas (Jan et al., 2004) o incluso exclusivamente XTHs de dicotiledóneas (Saladié et al., 2006). Las bases funcionales de la presencia de este cuarto subgrupo más divergente son desconocidas y no han sido investigadas hasta la fecha. Sólo en un caso, se ha caracterizado un gen de arroz que codifica la OsXTH8 (Jan et al., 2004), y se ha evidenciado la sustitución, común a las XTHs de este subgrupo, de dos aminoácidos en el dominio catalítico conservado. Las dos sustituciones ocurren a nivel de la fenilalanina, sustituida por una isoleucina, y una leucina, sustituida por una metionina (DEID**FE**FLG →DEID**IE**FMG). Además, *OsXTH8* se induce por giberelinas, así como ocurre en otras dos XTHs de cebada anteriormente caracterizadas, *HvPM2* y *HvPM5* (Smith et al., 1996).

1.3.5 CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA PROTEICA DE LAS XTHs

Todas las XTHs presentan varios caracteres comunes que se han conservado en la estructura primaria de la proteína:

- Una **región N-terminal** altamente hidrofóbica, correspondiente a un putativo péptido señal, responsable de la entrada de la proteína en la ruta de secreción.
- Un **dominio catalítico** (DEIDFEFLG) homólogo al centro activo de la β -glucanasa de la bacteria *Bacillus*, y altamente conservado en la familia de las glicosil-hidrolasas 16 (GH16). Análisis tanto cristalográficos (Johansson et al., 2004) como de mutagénesis dirigida (Campbell and Braam, 1998) determinaron los aminoácidos catalíticos esenciales que corresponden a los dos residuos de glutamato altamente conservados en toda la familia GH16 (DEIDFEFLG). En el resto del dominio catalítico, se han observado sustituciones de fenilalanina por leucina (Van Sandt et al., 2006) o isoleucina (Jan et al., 2004; de Silva et al., 1993) y de leucina por metionina (Jan et al., 2004).
- Un **sitio** potencial **de N-glicosilación**. Su posición es adyacente al sitio catalítico en la mayoría de las XTHs, mientras que en las XTHs del subgrupo 3 está típicamente desplazado en la región C-terminal. Se ha demostrado que esta modificación post-traducciona es fundamental para varias XTHs, como las AtXTH22 y AtXTH24 de *Arabidopsis* (Campbell and Braam, 1999a) y la SkXTH1 de *Selaginella kraussiana* (Van Sandt et al., 2006). En contraposición, la deglicosilación casi completa de la PttXTH34 de chopo y de la BobXET16A de coliflor mantiene buena parte de la actividad XET de estas proteínas (Henriksson et al., 2003; Kallas et al., 2005). Es por lo tanto probable que la N-glicosilación no tenga un papel directo en la catálisis de la reacción, pero que influya en el correcto plegamiento de la proteína y su estabilidad, como resultado de una serie de interacciones en la proteína.
- Cuatro **cisteínas** en la región C-terminal, que probablemente formen puentes disulfuro.

1.3.6 LAS XTHs EN LAS GRAMÍNEAS

La baja cantidad de xiloglucanos presente en las paredes de tipo II ha hecho que los modelos de arquitectura de las paredes de tipo II no atribuyan a estas hemicelulosas un papel importante desde el punto de vista estructural.

Como consecuencia, a las XTHs se les ha atribuido históricamente un papel minoritario en las gramíneas, dejando abiertas muchas dudas. Dos estudios sobre una amplia gama de especies vegetales indican que la actividad total XET tanto en tejidos de la parte aérea (Fry et al., 1992) como en raíz (Wu et al., 1994) es considerablemente más alta en las gramíneas respecto a las dicotiledóneas, lo cual constituye una discrepancia importante. A nivel de caracterización génica, a principios de los años 90 se clonó el primer cDNA de una XTH de trigo (Okazawa et al., 1993). Unos años más tarde se clonó y caracterizó la Zm1005 de maíz (Saab and Sachs, 1996). Más recientemente, se han clonado cuatro genes XTH de arroz, y dos de ellos están además implicados en fenómenos de elongación (Uozu et al., 2000). Quizás la evidencia experimental más contundente que llevó a replantear la hipótesis de un papel secundario de las XTHs en las gramíneas y abrió nuevas preguntas sobre su significado biológico en las paredes de tipo II, llegó una vez estuvo disponible la secuencia completa del genoma de arroz (Goff et al., 2002). Un amplio estudio bioinformático llevado a cabo por el grupo de Nishitani (Yokoyama et al., 2004) reveló la existencia de una gran familia multigénica de XTHs en arroz, compuesta por 29 miembros. En el mismo año otro estudio evidenció un número inesperado de XTHs, 22, también en otra gramínea, la cebada (Strohmeier et al., 2004). La caracterización de los patrones de expresión de todos los miembros de la familia de XTHs de arroz ha puesto en evidencia un perfil de expresión específico a nivel temporal y espacial, relacionado con fenómenos de elongación y crecimiento. Otros estudios en arroz (Uozu et al., 2000) y otras gramíneas como cebada (*Hordeum vulgare*; Smith et al., 1996) y maíz (Pritchard et al., 1993; Wu et al., 1994; Palmer and Davies, 1996) habían evidenciado correlaciones entre la velocidad de crecimiento de determinados tejidos y la abundancia en *mRNAs* codificantes para *XTHs* y/o actividad XET.

En su conjunto estos datos han demostrado que las XTHs en las monocotiledóneas gramíneas no sólo tienen una complejidad similar a la que tienen en las dicotiledóneas a nivel filogenético, sino también características similares a nivel funcional.

Esto hace suponer que, aunque sean cuantitativamente menos abundantes, los polímeros de los xiloglucanos contribuyen de manera importante a las propiedades de las paredes de tipo II, ya sea a nivel de las uniones con las microfibrillas o en

otra conformación (Yokoyama et al., 2004). Por ejemplo, una población de xiloglucanos podría ser dirigida a la pared para su modificación junto con otros polímeros como los glucuronoarabinoxilanos. A favor de esta hipótesis, están las observaciones de Inouhe et al. (1984) que han evidenciado cambios importantes a nivel del peso molecular de los xiloglucanos en coleoptilos de avena, una gramínea, que disminuye después de tratamiento con auxina, hormona que induce la elongación en estos coleoptilos. Tal resultado sería consistente con una posible actividad hidrolítica dominante de las XTHs de las gramíneas. A favor de esta hipótesis, Yokohama y col. (2004) hacen insistencia en el alto número de genes de XTHs del subgrupo 3, que se ha asociado con la hidrólisis de los xiloglucanos (Rose et al., 2002), en arroz respecto a *Arabidopsis*. Sin embargo, datos recientes obtenidos con la SIXTH5 de tomate, perteneciente al subgrupo 3, han desmentido la hipótesis de una actividad hidrolítica preferencial de las XTHs de este subgrupo, dejando abierto el estudio de las bases funcionales efectivas de las agrupaciones en subfamilias, que son aún hoy en día desconocidas (Saladié et al., 2006).

También los niveles más altos de actividad XET en las gramíneas, en combinación con una disponibilidad de sustrato mucho más limitada, muestran un papel estructural de los xiloglucanos en las monocotiledóneas más importante que en las dicotiledóneas, o como mínimo igual. Una objeción a esta observación es que las actividades enzimáticas (Fry et al., 1992; Wu et al., 1994) no han sido ensayadas empleando los sustratos nativos, pero aun así las diferencias son sorprendentes.

Otra posibilidad es que los xiloglucanos tengan un papel estructural casi insignificante en las paredes de tipo II, y que la abundancia en genes XTH, y su relacionada expresión génica y actividad se refleje en modificaciones de los xiloglucanos que no sean críticas para la organización de la pared. Pero si así fuera, arroz y *Arabidopsis* no tendrían una similitud tan alta a nivel de familias génicas, número de genes y perfil de expresión.

Una tercera hipótesis es la de una diferente especificidad de sustrato: las XTHs en las gramíneas podrían estar catalizando la hidrólisis o la transglicosilación de otros polisacáridos que son componentes mayoritarios en las paredes de tipo II, como arabinoxilanos y β -glucanos (Yokoyama et al., 2004; Strohmeier et al., 2004). De hecho predicciones estructurales han establecido una correlación evolutiva y estructural entre las XTHs, las xilano-endohidrolasas y las β -glucano endohidrolasas (Strohmeier et al., 2004). Sin embargo hasta la fecha no hay evidencias experimentales que respalden o desmientan esta hipótesis.

1.3.7 FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LAS XTHs

Las XTHs están presentes en todo el reino vegetal y en todos los tipos celulares, y muchos estudios han descrito su expresión tanto durante el crecimiento celular como durante la diferenciación, y su regulación por hormonas y estímulos tanto bióticos como abióticos (Imoto et al., 2005; Lee et al., 2005). Las XTHs están por lo tanto implicadas en varios procesos fisiológicos, que se describen a continuación.

1.3.7.1 EXPANSIÓN CELULAR Y CRECIMIENTO

En base a su acción enzimática, las XTHs tienen la capacidad de efectuar un *wall loosening* tanto reversible (actividad XET) como irreversible (actividad XEH), y por lo tanto permitir la expansión celular. Se han descrito dos mecanismos mediante los cuales estas enzimas, a través de su actividad XET, pueden tener un papel en la expansión celular: la **"reestructuración de la pared"** por un lado (Rose et al., 2002; Fry, 2004), y el **"ensamblaje o biogénesis de la pared"** por el otro (Xu et al., 1996; Nishitani, 1997). En el primer caso, estas enzimas actuarían modificando los enlaces entre xiloglucanos pre-existentes en la pared, a través de una **"transglucosilación re-estructurante"**; alternativamente, la actividad XET podría contribuir a la expansión celular favoreciendo la integración de xiloglucanos recién sintetizados en la pared, mediante una **"transglucosilación integracional"**; estudios *in vivo* han demostrado la presencia de ambos tipos de actividad (Rose et al., 2002; Fry, 2004). Referente a la transglucosilación integracional, esta estaría implicada de manera específica en la biogénesis de la pared; esta hipótesis es consistente con la observación de que cuando la célula vegetal se expande, las paredes mantienen su grosor y por lo tanto, material nuevo de pared debe ser incorporado a la estructura de la pared pre-existente (McCann and Roberts, 1994). Evidencias experimentales en favor de un papel de las XTHs en la incorporación de nuevos xiloglucanos en la pared son las obtenidas por McCann y col. (1992) en cebolla: sus datos sugieren que los polímeros de xiloglucanos son ensamblados en la pared mediante la unión de los polímeros nacientes de xiloglucanos con otros polímeros presentes en la pared.

La hipótesis de un papel de las XTHs en la expansión celular está confirmada por las observaciones que se han obtenido a lo largo de muchos años, tanto a nivel de caracterización de la expresión génica, como de caracterización enzimática, que relacionan las XTHs con fenómenos de crecimiento y elongación.

Una primera evidencia experimental en tal sentido es la buena correlación existente entre altos niveles de actividad XET y la expansión celular. Tanto en raíces como en hojas de maíz, la actividad XET mayor se encuentra en zonas en fase de expansión. A medida que la velocidad de crecimiento celular disminuye, la actividad XET baja;

aun así, se puede detectar actividad en regiones que han terminado de crecer (Pritchard et al., 1993; Palmer and Davies, 1996).

Dos estudios exhaustivos de ensayos de actividad XET *in situ* sobre una amplia gama de especies vegetales, incluyendo *arabidopsis* y maíz, han demostrado la presencia de altos niveles de actividad XET, y su conservación a nivel evolutivo, en la zona de elongación de la raíz, sugiriendo así un papel importante en la elongación celular (Vissenberg, et al., 2000; 2003). Otras correlaciones entre la presencia de proteínas XTH o actividad XET y los fenómenos de elongación y crecimiento han sido obtenidas en varias especies, como *arabidopsis* (Antosiewicz et al., 1997), tabaco (Vissenberg et al., 2000), arroz (Uozu et al., 2000), zanahoria (Hetherington and Fry, 1993), guisante (Potter and Fry, 1993), cebada (Smith et al., 1996), maíz (Pritchard et al., 1993), lechuga y pepino (Potter and Fry, 1994).

Varios estudios de expresión génica, mediante análisis *northern*, hibridaciones *in situ* y/o fusiones con genes testigo, han evidenciado la presencia de expresión de genes *XTH* en sitios con rápida expansión celular (Medford et al., 1991; Zurek and Clouse, 1994; Nishitani, 1995; Xu et al., 1995; Catalá et al., 1997, 2000; Oh et al., 1998; Akamatsu et al., 1999).

Otro argumento a favor de un papel de las XTHs en fenómenos de crecimiento es el hecho de que la expresión de muchos genes que codifican para XTHs está regulada positivamente por hormonas que promueven el crecimiento, como las giberelinas, las auxinas y los brasinosteroides (Zurek and Clouse, 1994; Xu et al., 1996; Catalá et al., 1997; Jan et al., 2004). Se ha visto además que el tratamiento con ácido giberélico (GA), que induce la elongación en internudos de guisante, hipocotilo de lechuga y pepino, y hojas de cebada, es concomitante con un aumento de la actividad XET (Potter and Fry, 1993, 1994; Smith et al., 1996).

Finalmente, la sobreexpresión en *arabidopsis* de la XTH de *arabidopsis* MER15 (Verica and Medford, 1997) y de BcXTH1 de *Brassica campestris* (Shin et al., 2006) producen una alteración en la expansión celular de las plantas transgénicas, confirmando su implicación en la expansión celular.

Sin embargo, a pesar de las correlaciones existentes entre actividad XET y la correspondiente expresión génica con fenómenos de crecimiento, todavía no hay evidencias experimentales de que las XTHs estén involucradas de manera directa en fenómenos de *wall loosening*. De hecho, las XTHs no son capaces de inducir extensión celular *in vitro* (McQueen-Mason et al., 1993) a diferencia de las expansinas. El hecho de que las expansinas sean suficientes para inducir directamente la extensión de la pared hace que hayan sido definidas por Cosgrove (1999) como agentes primarios del *wall loosening* (capaces de alterar directamente las propiedades mecánicas de los componentes de la pared), en contraposición a

proteínas como las XTHs, definidas por el mismo autor como agentes secundarios del *wall loosening*. Tal definición justifica que las XTHs no induzcan directamente la extensión, aunque se pueda suponer que modifican la estructura de la pared para favorecer la acción de los agentes primarios. Sin embargo hasta la fecha no ha sido posible demostrar una interacción sinérgica de las XTHs con las expansinas (Darley et al., 2001; Saladié et al., 2006), lo que pondría en duda la hipótesis de una "cooperación" entre agentes primarios y secundarios del *wall loosening*.

Por lo tanto en la actualidad, 15 años después de su descubrimiento, no hay una visión unívoca sobre el papel de las XTHs en el *wall loosening*. Por un lado, algunos autores (Cosgrove, 2005) siguen remarcando que no existen evidencias *in vitro* que apoyen este papel para las XTHs. Por otro lado, la clara y ampliamente demostrada correlación entre actividad XET y expresión de XTHs con fenómenos de crecimiento y elongación se considera una condición suficiente para asignar a estas proteínas un rol en el *wall loosening* (Thompson and Fry, 2001; Vissenberg et al., 2005; Van Sandt et al., 2007).

1.3.7.2 RESPUESTA A ESTRÉS

El patrón de expresión de un gen XTH de arábido, *AtXTH22* (TCH4), ejemplifica otra posible función para las XTHs: la respuesta a estrés mecánico (Xu et al., 1995). El análisis de expresión del gen testigo *TCH4::GUS* en plantas transgénicas de arábido indica una correlación muy fuerte entre expresión génica y tejidos en fase de expansión. Sin embargo, la expresión de *TCH4* está también regulada positivamente por un estímulo mecánico, la fricción, que es un tratamiento que provoca una reducción general en el crecimiento y elongación de arábido (Braam and Davis, 1990). Para explicar eso, los autores han sugerido que TCH4 tiene un papel tanto en la expansión celular como en la respuesta a estrés mecánico. En este contexto, esta XTH favorecería el refuerzo de la pared bajo de la tensión causada por una perturbación mecánica, como la fricción o el viento, mediante la reorganización de los polímeros pre-existentes en la pared y la incorporación de nuevas moléculas de xiloglucanos.

También hay otras evidencias que sugieren que las XTHs podrían favorecer la adaptación a estreses abióticos, como sequía y salinidad, que típicamente afectan el crecimiento y el desarrollo de plantas que crecen en suelo.

Entre varios clones inducidos por sequía en *Capsicum annuum* (pimentón), se han identificado 3 clones homólogos a XTHs (Park et al., 2003). En particular, la sobreexpresión en arábido de uno de estos tres clones, *CaXTH3*, mejora de manera considerable la tolerancia no sólo a la sequía, sino también al estrés salino de las plantas transgénicas de arábido (Cho et al., 2006). Los autores sugieren

que esta XTH podría actuar reforzando la pared, de manera similar a lo que ocurre con la TCH4 de *arabidopsis*.

Finalmente, se ha demostrado también un papel de estas enzimas en la adaptación a estreses que provocan cambios en la composición de la pared. De hecho, el tratamiento de células de judía con un inhibidor de la biosíntesis de la celulosa, que conlleva un ablandamiento de la pared, está asociado a un aumento de actividad XET, que podría según los autores servir para conferir más rigidez a la pared, de manera similar al papel propuesto para las XTHs en respuesta a otros tipos de estrés (Alonso-Simon et al., 2007).

1.3.7.3 FENÓMENOS DE DIFERENCIACIÓN Y DESARROLLO

Como ya se ha descrito en el apartado 1.1.7.2, hay varios fenómenos diferentes de la expansión celular en los cuales son necesarias modificaciones de la pared. Asimismo, la actividad XET está presente a menudo en regiones que han terminado el crecimiento y ha sido por lo tanto asociada a varios fenómenos de diferente naturaleza, en los que la pared está sometida a una degradación selectiva. Un primer ejemplo es la maduración de los frutos: de hecho, el desarrollo del fruto de tomate ha sido utilizado ampliamente como sistema modelo para estudiar la función de las XTHs, porque engloba en sí tanto fenómenos de expansión celular durante el crecimiento del fruto, como la selectiva despolimerización y solubilización de polímeros de la pared durante el ablandamiento y luego la maduración del fruto (Rose and Bennet, 1999). Como es de esperar, la caracterización de la expresión de varios genes *XTH* de tomate durante los procesos de expansión y maduración ha demostrado que las XTHs han diversificado su función para participar en ambos procesos (Saladié et al., 2006).

Otros fenómenos, que llevan a un extensivo desensamblaje de la pared, a los cuales han sido asociadas las XTHs, son la formación del aerénquima y la germinación de la semilla. En el primer caso, se ha observado que la expresión de la *Zm1005* de maíz se induce por sumergimiento en raíces que luego darán lugar al aerénquima (Saab and Sachs, 1996). En el segundo caso, la *SIXTH4* de tomate ha sido asociada con modificaciones de la cofia del endospermo durante la germinación del tomate (Chen et al., 2002).

Las XTHs también han sido asociadas a la re-estructuración de la pared primaria que ocurre durante otro fenómeno de diferenciación celular que es la formación de los elementos traqueales, como es el caso de la *AtXTH27* de *arabidopsis* (Matsui et al., 2005). Además, mediante el método de detección *in situ* de actividad XET (Vissenberg et al., 2000) se ha demostrado la presencia de actividad XET en fibras de xilema y floema de chopo (Bourquin et al., 2002). Estos datos sugieren un

posible papel de las XTHs en la reestructuración de la pared primaria durante la deposición de las capas de pared secundaria. Estas enzimas probablemente crearían y reforzarían las conexiones entre pared primaria y secundaria.

Finalmente, se ha detectado también la presencia de alta actividad XET en los sitios de emergencia de los pelos radicales (Vissenberg et al., 2001), sugiriendo una vez más un papel de estas enzimas en fenómenos de diferenciación.

1.3.7.4 FUNCIONES NO RELACIONADAS CON LA PARED CELULAR

Como se ha comentado en el apartado 1.2.3, los xiloglucanos se utilizan también como polisacáridos de reserva en semilla de capuchina, en las cuales se acumulan a altos niveles. Durante la germinación, estas reservas son hidrolizadas y movilizadas en la semilla en fase de desarrollo. Por lo tanto, se puede sugerir que en las semillas germinantes existe una actividad tanto transglucosilasa como hidrolasa (Edwards et al., 1986; Fanutti et al., 1993).

Estas evidencias experimentales, en su conjunto, demuestran como las XTHs son capaces de desarrollar una amplia gama de funciones a veces muy diferentes entre sí, cuyo fundamento reside tanto en la especialización funcional de diferentes XTHs, como en diferentes mecanismos probables de acción de la misma enzima *in vivo*.

Referente a la especialización funcional de las XTHs, hay que tener en cuenta la multigenicidad de estas familias. En este sentido, lo más probable es que diferentes productos génicos de *XTHs* intervengan en diferentes aspectos del metabolismo de la pared celular. De hecho, la observación *in vivo* del patrón de actividad XET por medio de sustratos fluorescentes ha identificado tanto un patrón de fluorescencia fibrilar como uniforme, que han sido asociados a la actividad de diferentes isoenzimas XTH en diferentes fenómenos como la elongación por un lado, y la integración de xiloglucanos en células que no están en fase de expansión por el otro (Vissenberg et al., 2005).

Además, estudios de expresión de los miembros de varias familias multigénicas de XTHs en *Arabidopsis* (Becnel et al., 2006; Vissenberg et al., 2005) arroz (Yokoyama et al., 2004) y tomate (Saladié et al., 2006) indican para cada gen un patrón específico de expresión órgano- y tejido-específico, así como patrones específicos de regulación hormonal, lo que permite suponer una especialización funcional de las diferentes isoformas de XTHs.

Además del carácter multigénico de las familias de XTHs, algunos autores remarcan como el factor regulador clave de los efectos fisiológicos de esta enzima es la disponibilidad de sustrato (Campbell and Braam, 1999b). Si los niveles de

xiloglucanos recién sintetizados son altos, es plausible que la actividad XET aumente a medida que los xiloglucanos son secretados en la pared, favoreciendo así su ensamblaje en la pared y una actividad "integracional". Por el contrario, si los xiloglucanos no se encuentran disponibles, la actividad XET probablemente consistirá tanto en la reorganización como en la degradación de polímeros de xiloglucanos pre-existentes.

1.3.8 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS XTHs

Las XTHs son comúnmente consideradas proteínas de pared. Sin embargo, las evidencias experimentales que se han acumulado hasta la fecha en diferentes sistemas vegetales sugieren que su localización subcelular está todavía por investigar en profundidad.

En los primeros estudios efectuados sobre la actividad XET, se demostró la naturaleza soluble de esta actividad enzimática, que no presentaba ninguna interacción iónica con la pared (Fry et al., 1992). Otros estudios han demostrado la naturaleza extraprotoplásmica de estas enzimas, presentes en los fluidos apoplásticos (Nishitani and Tominaga, 1991; 1992) o en el medio de cultivo de suspensiones celulares (Hetherington and Fry, 1993). Sin embargo, hay también evidencias experimentales de presencia de actividad XET *in vitro* en fracciones celulares intraprotoplásmicas (Pritchard et al., 1993; Hetherington and Fry, 1993; Barrachina and Lorences, 1998) o bien insolubles, es decir asociadas a la pared de manera iónica o covalente (Potter and Fry, 1994; Takeda et al., 1996; Barrachina and Lorences, 1998; Herbers et al., 2001).

Este conjunto de evidencias experimentales a veces contrapuestas, según las cuales hay actividad XET en diferentes fracciones celulares, tanto solubles como insolubles, sugiere la presencia de proteínas XTH en diferentes fracciones del espacio extracelular, tanto asociadas físicamente a la pared como no. Esto, podría ser explicado por la presencia de diferentes isoenzimas XTHs *in vivo* con papeles distintos (Okazawa et al., 1993; Aubert and Herzog, 1996). Por otro lado, la existencia *in vitro* de actividad XET en fracciones intraprotoplásmicas sugiere la presencia de un fino mecanismo de control en la localización de estas enzimas, que podrían estar localizadas en sitios celulares diferentes de la pared, y explicar su acción *in vivo* en la pared sólo bajo el control de algún mecanismo específico de regulación (Hetherington and Fry, 1993; Barrachina and Lorences, 1998). Esta hipótesis está apoyada por la localización en retículo endoplásmico, detectada por inmunolocalización, de la EXGT-A1 en células de tabaco (Yokoyama and Nishitani, 2001b).

Las evidencias experimentales a favor de la localización en la pared de determinadas XTHs no son muchas; hasta la fecha, se han estudiado sobretodo XTHs expresadas en sistemas heterólogos de diferente naturaleza (plantas, suspensiones celulares vegetales, células de insectos y levadura). Los trabajos con sistemas de expresión en insectos o levadura han permitido demostrar la funcionalidad del péptido señal de algunas XTHs para secretar la proteína en el medio de cultivo (Campbell and Braam, 1998; 1999b; Saladié et al., 2006). Además se ha demostrado por inmunocitoquímica la presencia en pared de una XTH de *Brassica campestris* sobreexpresada en plantas de arabisopsis (Shin et al., 2006), y la funcionalidad del péptido señal de una XTH fusionada a GFP sobreexpresada en células de tabaco; sin embargo, en este caso no ha sido posible demostrar la localización en pared, ya que la proteína queda retenida en el retículo endoplásmico (Yokoyama and Nishitani, 2001b); según los autores, no se puede excluir que esta retención en retículo pueda deberse a un artefacto derivado de la sobreexpresión bajo el promotor constitutivo 35 S del virus del mosaico de la coliflor; sin embargo, el hecho de que el mismo patrón de localización se detecte por inmunohistoquímica sobre una proteína endógena deja abierta la hipótesis de la existencia de algún mecanismo que regule el tráfico de estas proteínas hacia la pared.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El grupo de investigación en el que he realizado este trabajo está interesado en el estudio de genes de la pared celular en una planta de gran relevancia científica y económica para la industria forrajera como es el maíz.

Con la finalidad de identificar proteínas de la pared celular, se obtuvo un extracto de maíz enriquecido en proteínas de pared. Esta fracción de proteínas fue inyectada en conejos para producir anticuerpos, que fueron posteriormente utilizados para cribar una librería de expresión y aislar genes cuyas proteínas se localizan mayoritariamente en la pared. El cribado de esta librería de expresión de maíz permitió aislar varios clones de cDNA, que se identificaron sistemáticamente por secuenciación. La secuencia de uno de estos clones presenta homología con las xiloglucanoendotransglucosilasa-hidrolasas (XTHs), y se ha denominado ZmXTH1.

Debido al creciente interés en el estudio de estas enzimas en gramíneas, junto con la escasa información en maíz (sólo se ha caracterizado hasta la fecha una XTH, Saab and Sachs 1996) se ha decidido profundizar en el estudio de este gen.

Para ello, el objetivo de la presente tesis es la caracterización de dicho gen y de la proteína que codifica, a través de los puntos siguientes:

- **Caracterización molecular en maíz.** Para ello, se ha efectuado un análisis filogenético de la proteína ZmXTH1, a través de la comparación con otras XTHs de maíz cuya secuencia estaba presente en la base de datos, y otras secuencias tanto de monocotiledóneas como dicotiledóneas ya descritas. Además, se ha llevado a cabo el estudio de la expresión génica de *ZmXTH1*, a fin de poder relacionar la expresión en determinados estadios de crecimiento o condiciones con una posible función.
- **Caracterización enzimática de ZmXTH1.** Para detectar si ZmXTH1 presenta actividad endotransglucosilasa, se ha producido la proteína recombinante en dos sistemas heterólogos, la bacteria *Escherichia coli* y la levadura *Pichia pastoris*. La sobreexpresión en *Pichia pastoris* se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Pau Ferrer del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat Autònoma de Barcelona. La caracterización enzimática de ZmXTH1 se llevó a cabo en el laboratorio dirigido por el Prof. Stephen Fry del Institute of Molecular Plant Sciences de la Universidad de Edimburgo (UK), durante una estancia de 3 meses.

- **Estudios de localización subcelular de ZmXTH1.** Se ha utilizado el sistema heterólogo de cebolla para estudiar la localización de ZmXTH1 fusionada a GFP, y métodos inmunoenzimáticos para estudiar la presencia de la proteína en maíz.
- **Caracterización funcional de ZmXTH1.** Se ha sobreexpresado ZmXTH1 en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. El análisis del fenotipo microscópico de las plantas transgénicas, por microscopía electrónica de transmisión, se ha llevado a cabo en el laboratorio dirigido por la Dra. Katia Ruel del Centre de Recherche sur les Macromolécules Vegetales (CERMAV) en el Centre de Recherche Scientifique (CNRS) de Grenoble (Francia), durante una estancia de 1 mes.

2. RESULTADOS

2.1 CARACTERIZACIÓN DE *ZmXTH1* EN MAÍZ

2.1.1 ESTUDIO DE LA SECUENCIA DEL CLON DE cDNA *ZmXTH1*

Estudios previos permitieron el aislamiento de varios genes de la pared celular de maíz mediante el cribado de un banco de cDNA de la región de elongación de la raíz usando anticuerpos generados contra una fracción enriquecida en proteínas de pared celular de maíz. Entre todos los clones aislados y secuenciados se aisló un clon de cDNA que codifica una Xiloglucano-endoTransglucosilasa-Hidrolasa (*XTH*) y que se denominó *ZmXTH1* (Fig. 2.1).

```

gaccacactaccaccccactccactactgacgaccgattcccagaaagctcgatctagc 60
gcgcgcggtctgcagagtgacagacgacgacgtacaccatggcgcggcggtccctggcctg 120
1      M A R R S L A L
ctgctcgcgctcgtcgtcgcctgatggcggcgccgctcgcgctcggcggactcgtggctc 180
9      L L A S S L A L M A A A V A S A D S W L
tacgacaaattcaacacggacggcaccgtccgcaccagtagcagcgcgctcggggcaggag 240
29     Y D K F N T D G T V R T Q Y D A S G Q E
gtggcgatgctcagcctggaccgcagctctggcggcggcttcaactccaaggagcagtag 300
49     V A M L S L D R S S G A G F N S K E Q Y
ctgtacggcgagttcagcgtccagatgaagtcacccccggcaactccgcccggcaccgtc 360
69     L Y G E F S V Q M K L I P G N S A G T V
tcgtgcttctacctctcgtcggggcagggcgacggggcacgacgagatcgacatggagttc 420
89     S C F Y L S S G D G D G H D E I D M E F
atgggcaacgcgagcgggcagccgggtggtgctgaacacgaacgtgtgggcccagcggcgac 480
109    M G N A S G Q P V V L N T N V W A S G D
ggcaagaaggagcaccagttcgacctctggttcgaccctccgcccactaccacacctac 540
129    G K K E H Q F D L W F D P S A D Y H T Y
acatcatctggaacccgaccaacatcctgttcaaggtggacggcgacgtgatccggtgc 600
149    T I I W N P T N I L F K V D G D V I R C
ttcaagcgtctacggcaccctgccgtaccggagcgcgagggcccatggcgctgcacgccacg 660
169    F K R Y A D L P Y P S A R P M A L H A T
ctgtgggacggcagctactggccaccgagaagggcaaggtgcccgtggactggtccgcc 720
189    L W D G S Y W A T E K G K V P V D W S A
gcgccttctcgtcgtctcctaccggggctactccgccaacgcctgcgtcagcggcggggcc 780
209    A P F F V V S Y R G Y S A N A C V S G G A
tgccggcggcggcgacgacgggtggatgagcaagcagcccgcagcagcggagtggggc 840
229    C G G G G D D G W M S K Q P D D A E W G
accgtccgggtgggcccagagcaactacatgcgctacaactactgcgacgacggctggcgg 900
249    T V R W A E S N Y M R Y N Y C D D G W R
ttccccagggcctcccggcggagtgacggcagcagctagctgattccgcccgttttctgtg 960
269    F P Q G L P P E C S R S *
cggcgctccgctgatgacacctcttgttggttgttcttgcgtggatggacaatcatacatc 1020
tctatatgcatgattcttgttctgttattgttaaactcgtgattacagtagtacttgaagaa 1080
gtgtgtgggcacgggagtatatcactgtagttttaatttgcttgaagaaaagaaggggt 1140
tttttttacttgtgacgcgggagctagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc 1200
atggatgatgatgcatgtacgcagc 1225

```

Fig. 2.1: Secuencia nucleotídica de *ZmXTH1* (en letra minúscula) y secuencia aminoacídica deducida (en letra mayúscula). En negro se indica la secuencia nucleotídica codificante, en gris las secuencias 5' UTR y 3' UTR. El sombreado violeta indica el péptido señal putativo, el verde el dominio catalítico, el amarillo el sitio de N-glicosilación (NXS/T, donde X es diferente de P), y el azul las cuatro cisteínas en la región C-terminal. La numeración en la parte izquierda se refiere a la secuencia aminoacídica codificante, en la parte derecha a la secuencia nucleotídica.

El clon de cDNA que contiene la secuencia codificante de *ZmXTH1* (numero de acceso en Genbank AJ875021) tiene una longitud de 1225 pb; la secuencia codificante deducida empieza en la posición 97 y se extiende hasta el nucleótido 939 y tiene una longitud de 843 pb o 281 aminoácidos (Fig.2.1)

El análisis de la secuencia aminoacídica de *ZmXTH1* denota que esta proteína presenta las características típicas de las XTH: el dominio catalítico (DEIDMEFMGN) homólogo al centro activo de la β -glucanasa de *Bacillus*, un sitio putativo de glicosilación (NAS) inmediatamente después del dominio catalítico, y 4 cisteínas en la región central y C-terminal. Análisis bioinformáticos permiten predecir un péptido señal N-terminal de 24-25 aminoácidos y un dominio transmembrana de 22 aminoácidos desde la posición 7 hasta la 29.

Además, según predicción PFAM (*Protein Families databases of Alignments and hidden Markov models*) la proteína presenta un dominio C-terminal de 48 aminoácidos (desde la posición 229 hasta la 277) típico de las XTHs y un dominio central de 181 aminoácidos (desde la posición 27 hasta la 208) de la familia 16 de las glicosil-hidrolasas (GH16). Todas las XTHs conocidas presentan este dominio.

Ya que la mayoría de las XTHs conocidas pertenecen a familias multigénicas, y que hasta la fecha se ha descrito en maíz sólo una XTH (*Zm1005*, Saab and Sachs 1996) se efectuó una búsqueda en base de datos de ESTs (*expressed sequence tags*) de maíz, para identificar otras XTHs. Entre los varios ESTs presentes hasta la fecha en base de datos, algunos eran incompletos. Así que se ha restringido la búsqueda solamente a ESTs que presentaran una secuencia codificante completa, y en base a este criterio se identificaron seis ESTs correspondientes a XTHs de maíz y que se denominaron *ZmXTH2*, *ZmXTH3*, *ZmXTH4*, *ZmXTH5*, *ZmXTH6* y *ZmXTH7* (tabla 2.1).

Num. Acceso	Nombre
AJ875021	<i>ZmXTH1</i>
AY105107	<i>ZmXTH2</i>
AY106262	<i>ZmXTH3</i>
AY103775	<i>ZmXTH4</i>
AY106776	<i>ZmXTH5</i>
AY104207	<i>ZmXTH6</i>
AY106744	<i>ZmXTH7</i>
U15781	<i>Zm1005</i>

Tabla. 2.1. Números de acceso en base de datos correspondientes a las XTHs de maíz *ZmXTH1*, *ZmXTH2*, *ZmXTH3*, *ZmXTH4*, *ZmXTH5*, *ZmXTH6*, *ZmXTH7* y *Zm1005*.

2.1.2 ESTUDIO FILOGENÉTICO DE *ZmXTH1*

Para investigar la relación evolutiva entre *ZmXTH1*, *ZmXTH2*, *ZmXTH3*, *ZmXTH4*, *ZmXTH5*, *ZmXTH6*, *ZmXTH7* y *Zm1005* y averiguar su relación con *XTHs* de otras especies vegetales, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, que normalmente están agrupadas en dos o tres subfamilias, se ha construido un árbol filogenético (Fig.2.2).

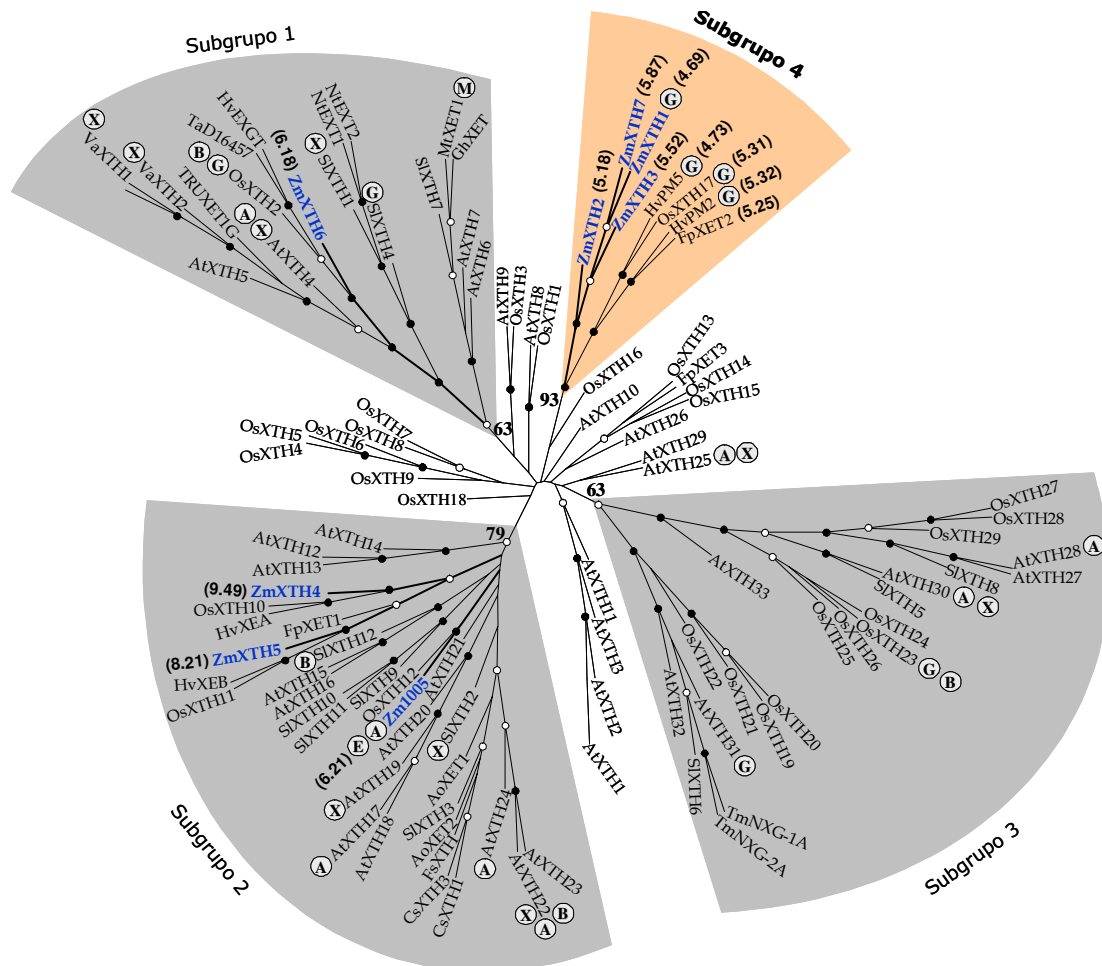


Figura 2.2. Árbol filogenético basado en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de *ZmXTH1* y otras *XTHs*. Los círculos negros se refieren a las ramificaciones con valores de probabilidad (*bootstrap*) $\geq 90\%$. Los círculos blancos se refieren a las ramificaciones con valores de probabilidad $\geq 60\%$. Las ramificaciones indicadas en negrita corresponden a *XTHs* de maíz. Las proteínas que pertenecen al subgrupo 4 están agrupadas en el área naranja, aquellas que pertenecen a los subgrupos 1, 2 y 3 están agrupadas en áreas grises. Los números indicados en la bifurcación de cada subgrupo corresponden a los valores de *bootstrap*. Los números entre paréntesis se refieren al punto isoeléctrico de las proteínas. Las referencias o números de acceso de las *XTHs* de especies diferentes del maíz son las siguientes: TaD16457 (Okazawa et al., 1993); HvPM2 y HvEXGT (Smith et al., 1996); HvPM5, HvXEA and HvXEB (Schünmann et al., 1997); GmEXT2 (Okazawa et al., 1993); TRUXET1G (Rose et al., 1996); TmNXG-1A y TmNXG-2A (de Silva et al., 1993); GhXET (Shimizu et al., 1997); FpXET1, FpXET2, y FpXET3 (Reidy et al., 2001); VaXTH1 y VaXTH2 (Nakamura et al., 2003); MtXTH1 (Maldonado-Mendoza et al., 2005); NtEXT1 y NtEXT2 (Num.acc. AB017025 y D86730); AoXET1 y AoXET2 (Num.acc. AF223419 y AF223420); CsXET1 y CsXET2 (Num.acc. CAD87535 y CAD87536); FsXET (Num.acc. CAA10231). Las secuencias de *XTHs* de arroz se obtuvieron de Yokoyama et al., (2004). OsXTH17 corresponde a OsXTH8 de Jan et al., (2004). Las secuencias de *XTHs* de arabis y tomate (*Solanum lycopersicum*) se obtuvieron del sitio Internet <http://labs.plantbio.cornell.edu/XTH/>. **G:** *XTHs* reguladas por giberelinas. **B:** *XTHs* reguladas por brasinosteroides. **E:** *XTHs* reguladas por etileno. **A:** *XTHs* reguladas por estreses abióticos. **X:** *XTHs* reguladas por auxinas. **M:** *XTHs* inducidas por micorrizas

En particular, como ejemplos de XTHs de especies cuyos genomas están completamente secuenciados, se han añadido al árbol XTHs de *Arabidopsis* y arroz. El árbol filogenético obtenido presenta una distribución de secuencias que se agrupan en cuatro subgrupos filogenéticos. Los subgrupos 1, 2 y 3 agrupan la mayoría de las proteínas analizadas y corresponden a los subgrupos principales en los que están típicamente distribuidas muchas XTHs ya descritas; además en el árbol destaca un cuarto subgrupo más pequeño, el 4, apoyado por un valor de probabilidad muy alto ($\geq 93\%$). El resto de secuencias están distribuidas por el árbol sin pertenecer a ningún grupo claro, aunque las secuencias de *Arabidopsis* AtXTH11, AtXTH1, AtXTH2 y AtXTH3 han sido recientemente agrupadas en un subgrupo 4 específico de *Arabidopsis* (Saladié et al., 2006). ZmXTH1 pertenece al subgrupo 4, así como ZmXTH2, ZmXTH3 y ZmXTH7. El análisis de las secuencias que constituyen este subgrupo denota un dato interesante: todas pertenecen a monocotiledóneas gramíneas (maíz, arroz, cebada y festuca), especies con una pared celular de tipo II. Las restantes XTHs de maíz que no pertenecen al subgrupo 4 están distribuidas entre los subgrupos 1 y 3, mientras que hasta la fecha no hay XTHs de maíz que pertenezcan al subgrupo 3. En particular, Zm1005 (Saab and Sachs, 1996) pertenece al subgrupo 2, así como ZmXTH4 y ZmXTH5. ZmXTH6, que corresponde a una proteína recientemente identificada en un análisis proteómico de proteínas de maíz apoplásticas solubles o levemente asociadas a la pared (Zhu et al., 2006), pertenece al subgrupo 1. Ya que se ha descrito que la agrupación en subfamilias de las XTHs podría tener una común base funcional, se han analizado algunas de las características, como regulación hormonal, que se han descrito para las XTHs del árbol ya caracterizadas. En el subgrupo 4, para 3 sobre 4 XTHs ya caracterizadas (HvPM2 y HvPM5 de cebada, OsXTH17 de arroz y FpXet2 de *Festuca*), se ha descrito una inducción por giberelinas (Jan et al., 2004). Además se han analizado las secuencias aminoacídicas de todas las XTHs del subgrupo 4: las predicciones derivadas de base de datos indican que todas las proteínas de este subgrupo son ácidas, ya que tienen un punto isoeléctrico (pI) putativo comprendido entre 4,69 (ZmXTH1) y 5,87 (ZmXTH7). Las restantes XTHs de maíz del árbol presentan todos puntos isoeléctricos superiores, que les confieren propiedades básicas al pH fisiológico de la pared: 6,21 (Zm1005), 6,18 (ZmXTH6), 9,49 (ZmXTH4) y 8,21 (ZmXTH5).

La existencia en el genoma de maíz de otras XTHs filogenéticamente cercanas a ZmXTH1 ha sido corroborada mediante un análisis *Southern* utilizando como sonda el cDNA entero: el resultado fue la hibridación de dos o tres bandas (fig.2.3). Este dato está en línea con los análisis en base de datos, que permitieron identificar 3 ESTs filogenéticamente cercanos a ZmXTH1, sugiriendo que en maíz hay un mínimo

de tres otros genes relacionados a ZmXTH1 y que presumiblemente pertenecen al pequeño y menos abundante subgrupo 4.

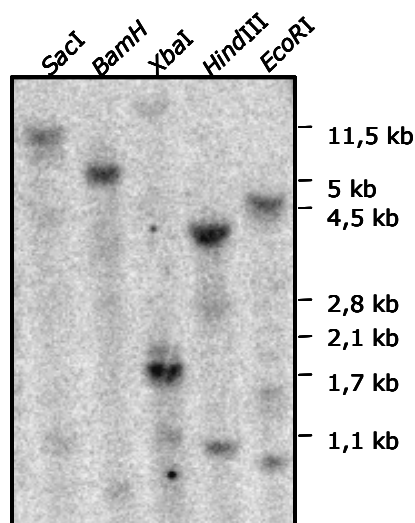


Fig. 2.3. Análisis Southern del gen *ZmXTH1*. 10 μ g de DNA genómico de maíz se digirieron con los enzimas de restricción indicados en la figura. La hibridación se llevó a cabo con el cDNA entero *ZmXTH1*.

2.1.3 ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA PROTEÍNA ZmXTH1 y COMPARACIÓN CON LAS DEMÁS XTHs DE MAÍZ Y DEL SUBGRUPO 4

La comparación por alineamiento de la estructura primaria de ZmXTH1 con todas las XTHs del subgrupo 4 y con el resto de XTHs de maíz que no pertenecen a este subgrupo (Fig. 2.4) revela ciertas características peculiares a destacar. En primer lugar, se ha analizado en las secuencias de este alineamiento la presencia de determinados residuos conservados, que pueden jugar un papel importante en la actividad y/o el correcto plegamiento de la proteína. Tales residuos han sido recientemente identificados gracias a la cristalización de la PttXTH34 de chopo, que ha permitido profundizar en el conocimiento de la estructura tridimensional de las XTHs (Johansson et al., 2004; Kallas et al., 2005). Después del sitio de N-glicosilación, todas las XTHs analizadas presentan dos residuos aminoacídicos (indicados en la figura 2.4 con "n") que supuestamente interactúan con el N-glicano; asimismo, es presente un residuo de tirosina (Y) o fenilalanina (F) que interactuaría con el dominio catalítico ("i" en la figura 2.4; Van Sandt et al., 2006). También se ha descrito la presencia de dos residuos de tirosina que podrían tener un papel en el reconocimiento del xiloglucano sustrato ("r" en la figura 2.4; Van Sandt et al., 2006). Sin embargo, solo el segundo de estos residuos de tirosina está conservado en las XTHs del subgrupo 4 (posición 262 de ZmXTH1); la primera

tirosina en todas las XTHs de este subgrupo está substituida con una histidina (H) (posición 185 de ZmXTH1). Además, el análisis de la estructura terciaria de la PttXTH34 ha permitido identificar una estructura conservada (*acceptor binding loop*) en la cual destacan tres residuos aminoacídicos como responsables de la unión al xiloglucano sustrato ("b" en la figura 2.4): un aspartato (D), un triptofano (W), y una glicina (G) (Kallas et al., 2005; Van Sandt et al., 2006). Nuestros datos demuestran que estos residuos están conservados también en las XTHs de maíz de los subgrupo 1 y 2, mientras que en el caso de las XTHs del subgrupo 4 está conservado sólo uno de los tres residuos, el triptofano. De hecho, el aspartato está substituido por una tirosina, mientras que la glicina está substituida por una histidina (H) en las XTHs de especies diferentes al maíz, y por una glutamina (Q) o una lisina (K) en las XTHs de maíz. Finalmente, se han descrito unas posiciones conservadas por la presencia de aminoácidos ácidos, como el aspartato (D) o el glutamato (E), o básicos, como el arginina(R), que podrían generar puentes salinos, participando así en la estabilización de la proteína ("+" en la figura 2.4; Kallas et al., 2005; Van Sandt et al., 2006). De todas las XTHs analizadas en este trabajo, sólo ZmXTH6 presenta unos residuos que pueden formar estos puentes salinos (D89-R117 y R206-E210).

La característica más peculiar de las XTHs del subgrupo 4 es su dominio catalítico, homólogo al dominio de la β -glucanasa de *Bacillus*, DEIDFEFLG. En todas las XTHs del subgrupo 4, la leucina está substituida por una metionina; por contra, ZmXTH4, ZmXTH5 y Zm1005 (subgrupo 2) y ZmXTH6 (subgrupo 1) presentan el típico residuo de leucina. Por lo tanto, la metionina en posición 8 del dominio catalítico se configura como una característica de las XTHs de gramíneas del subgrupo 4, tal como se indicó en el estudio de OsXTH17 de arroz (Jan et al., 2004).

Además, ZmXTH1, ZmXTH2, ZmXTH3 y ZmXTH7 presentan otra metionina, en posición 5 del dominio catalítico (DEID**M**EFG). Dicha sustitución resulta ser una característica exclusiva de las XTHs de maíz del subgrupo 4, pero no de arroz, cebada o festuca: de hecho, HvPM5, HvPM2, FpXet2 OsXTH17 presentan en la misma posición una isoleucina (DEID**I**EFG).

En la misma posición del dominio catalítico de las otras XTHs de maíz analizadas, ZmXTH4 y Zm1005 presentan la típica fenilalanina, mientras que ZmXTH6 presenta una serina y ZmXTH5 una leucina.

En su conjunto, las características peculiares a nivel de secuencia aminoacídica de las XTHs del subgrupo 4 dejan suponer alguna relevancia que atribuya a estas XTHs de gramíneas algún posible papel todavía desconocido.

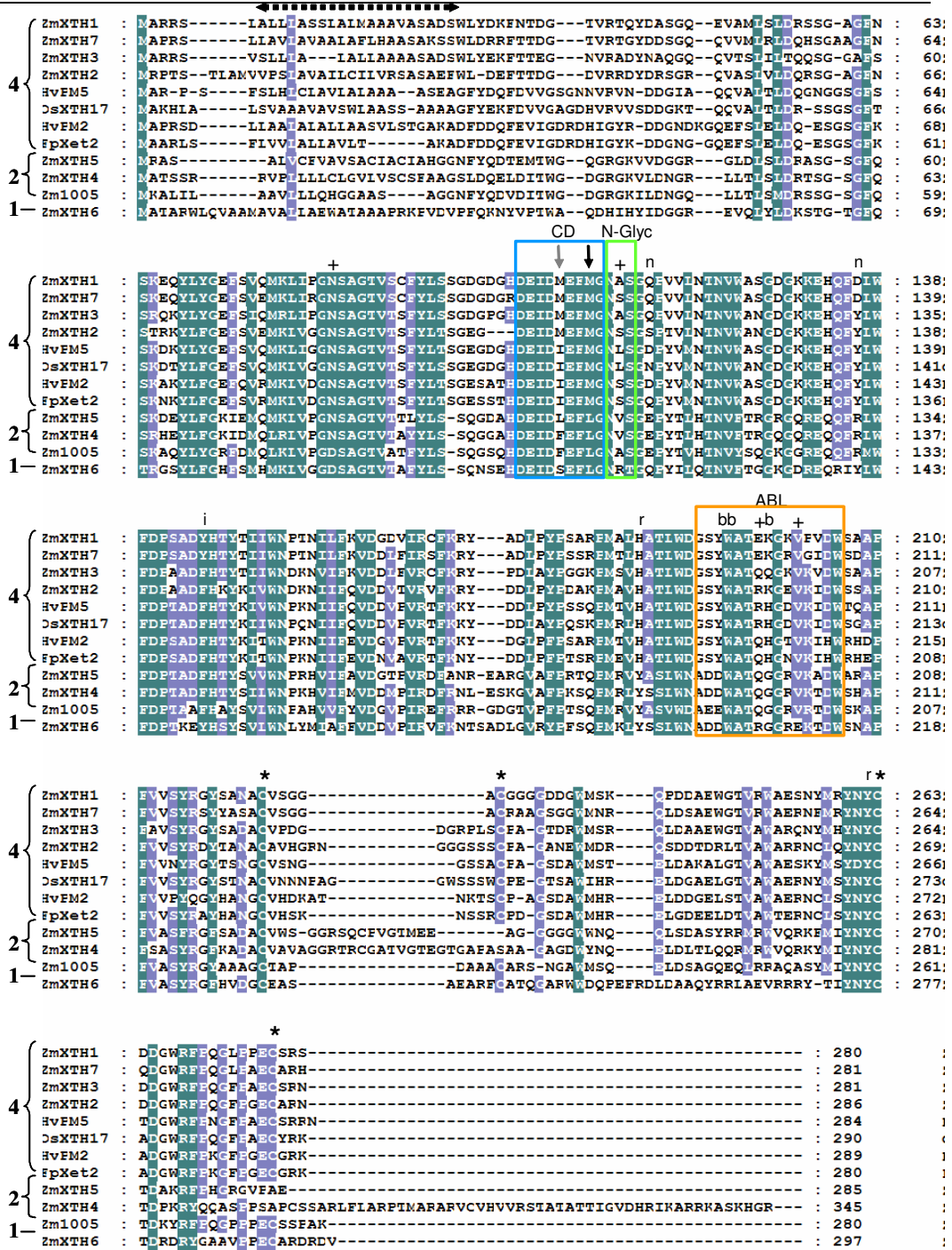


Figura 2.4. Alineamiento múltiple por ClustalW de las secuencias aminoácidas de ZmXTH1 con las otras XTHs del subgrupo 4 y las XTHs de maíz que pertenecen a otros subgrupos filogenéticos. El sombreado verde azulado indica identidad o similitud en todas las secuencias analizadas, el sombreado violeta indica identidad o similitud en al menos 10 de las 12 secuencias analizadas. El péptido señal está marcado con una flecha discontinua. El dominio catalítico (CD) está enmarcado en azul. El residuo de metionina del dominio catalítico, típicamente atribuido a las XTHs del subgrupo 4 se indica con una flecha negra. La flecha gris indica el residuo de metionina presente en el dominio catalítico de las XTHs de maíz del subgrupo 4. El sitio putativo de N-glicosilación (N-glyc) está enmarcado en verde, el *acceptor binding loop* (ABL) en naranja. "i" se refiere al residuo aminoácido que posiblemente interactúa con el dominio catalítico. "+" se refiere a los residuos aminoácidos posiblemente involucrados en la formación de puentes salinos (ZmXTH6). "n" se refiere a los residuos que posiblemente interactúan con el N-glicano. "r" y "b" representan los residuos posiblemente involucrados en el reconocimiento y en la unión de los xiloglucanos, respectivamente. Los asteriscos se refieren a las cuatro cisteínas conservadas. El número de residuos aminoácidos de cada proteína se indica a la derecha de cada figura. Los números a la izquierda de la figura se refieren al subgrupo al que pertenece cada proteína.

2.1.5 ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *ZmXTH1*

Una vez establecidas las características de la estructura primaria de *ZmXTH1*, se ha caracterizado la expresión del gen correspondiente en maíz en hoja y raíz a lo largo del desarrollo, y al fin de tener una visión global, la expresión de *ZmXTH1* se ha comparado con la expresión de los otros genes *XTHs* de maíz objeto del estudio filogenético.

Para ello, se ha efectuado un análisis por RT-PCR semi cuantitativa, amplificando para cada gen una región de la secuencia del 3'UTR con exclusión de *ZmXTH7*, de la que, a pesar de varios intentos, no se consiguió amplificar ni el cDNA ni el DNA genómico (fig. 2.5).

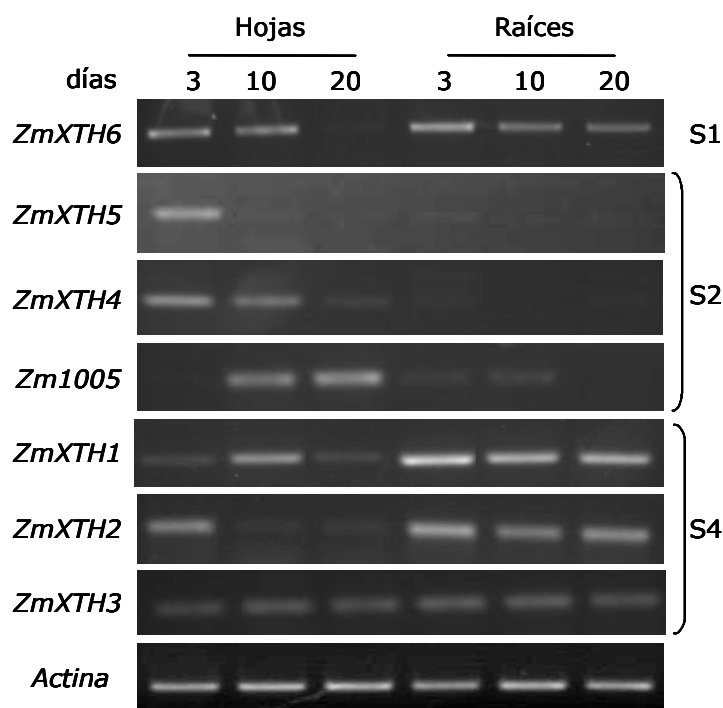


Fig. 2.5. Cinética de expresión de los genes *XTHs* de maíz mediante RT-PCR. S1, S2, y S4 indican las *XTHs* que pertenecen respectivamente a los subgrupos 1, 2, y 4. La acumulación de transcritos en hoja y raíz de plantas de 3, 10, 20 días fue analizada por RT-PCR semi-cuantitativa. Como control de la concentración del cDNA se amplificó un fragmento del gen de la actina.

Los resultados de este análisis indican que *ZmXTH6*, la única *XTH* que pertenece al subgrupo 1, se expresa a lo largo del desarrollo tanto en hoja como en raíz, aunque la expresión en hoja acaba de manera temprana (a los 20 días ya no se detectan transcritos). Los tres genes que pertenecen al subgrupo 2, *Zm1005* (Saab and Sachs, 1996), *ZmXTH4*, y *ZmXTH5* se expresan de manera preferente en hoja. Además, su expresión parece complementarse: *ZmXTH5* se expresa sólo en plántulas de 3 días, *ZmXTH4* en plántulas de 3 y 10 días y *Zm1005* en plántulas de

10 y 20 días, pero no a los 3 días. *ZmXTH1*, que pertenece al subgrupo 4, se expresa de manera preferente en raíz, mientras que en hoja su mRNA se acumula mayoritariamente a los 10 días. Se han analizado otros 2 genes que pertenecen al subgrupo 4: *ZmXTH2* y *ZmXTH3*. Es interesante notar que, así como *ZmXTH1*, *ZmXTH2* tiene un patrón de expresión preferencial en la raíz, mientras que en hoja la expresión se limita a las plántulas de 3 días. Los transcritos de *ZmXTH3* se detectan en todos los estadios analizados, tanto en hoja como en raíz.

En conclusión, los experimentos de RT-PCR indican que las XTHs de maíz del subgrupo 2 tienen un patrón de expresión más específico en hoja, mientras que las del subgrupo 1 y 4 parecen expresarse de manera más ubicuitaria, aunque de manera preferente en raíz, por lo que concierne a *ZmXTH1* y *ZmXTH2*.

El patrón de expresión de *ZmXTH1* también fue analizado mediante *northern blot*. Para ello, primero nos aseguramos que la región 3' UTR del gen fuera apropiada para ser utilizada como sonda específica. El análisis *Southern* demuestra que la región 3' UTR del gen *ZmXTH1* reconoce sólo a un gen en maíz, y por lo tanto esta región de la secuencia es suficientemente específica para efectuar estudios de expresión (Fig. 2.6)

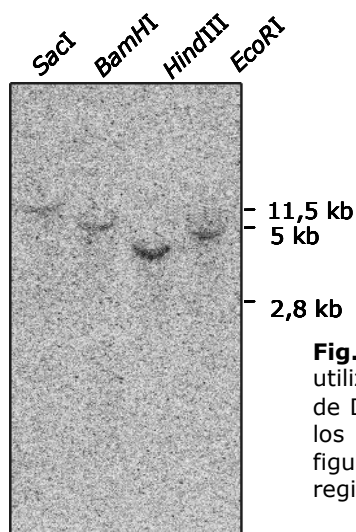


Fig.2.6. Análisis *Southern* del gen *ZmXTH1* utilizando con una sonda específica. 10 μ g de DNA genómico de maíz se digirieron con los enzimas de restricción indicados en la figura. La hibridación se llevó a cabo con la región 3' UTR de *ZmXTH1*.

Como primer análisis, se quiso confirmar por *northern* el patrón de expresión de *ZmXTH1* en hoja y raíz a lo largo del desarrollo; también en ese caso, es evidente como, tanto a los 3 como a los 10 días, hay una acumulación de mRNA preferencial en raíz, mientras que en hoja de 10 días se detectan bajos niveles de transcritos. En los anteriores análisis por RT-PCR se ha utilizado como ultimo punto de la cinética plantas de 20 días, y es evidente que en este estadio de desarrollo la expresión en la hoja ha disminuido, mientras que en raíz se mantiene constante. Se

investigó, por lo tanto, la expresión de *ZmXTH1* en un estadio aun más avanzado de crecimiento de la planta, a 45 días. En este caso, los niveles detectables de transcritos son muy bajos tanto en hoja como en raíz, sugiriendo que *ZmXTH1* ya ha terminado su función en la planta (Fig. 2.7).

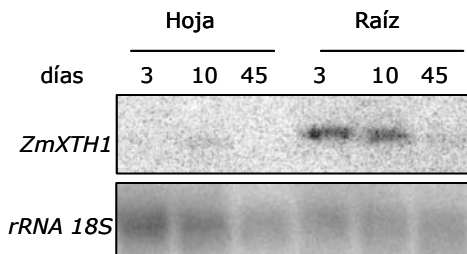


Fig. 2.7. Análisis *northern* de *ZmXTH1* en hoja y raíz de plantas de maíz de 3, 10 y 45 días. La hibridación se llevó a cabo con la región 3' UTR del cDNA *ZmXTH1* y, como control de carga del RNA en la membrana, esta se hibridó con rRNA ribosomale 18 S.

Para investigar más a fondo el patrón de expresión espacial de *ZmXTH1*, se efectuó un análisis más preciso tanto para la raíz como para el tallo; se dividió la raíz de plántulas de 6 días (de una longitud media de 8 cm) en tres zonas: punta (zona apical de 5 mm), zona de elongación (5 mm a 1 cm de distancia de la punta) y zona de maduración (5 mm a 5 cm de distancia de la punta); subdividimos además el tallo en mesocotilo, nudo y hoja (Fig.2.8). Los resultados obtenidos por *northern* blot indican que, aunque el mRNA de *ZmXTH1* se detecta en toda la parte aérea de la planta, su expresión preferente es en hoja, mientras que en la raíz los transcritos se detectan de manera mayoritaria en la zona de elongación de la raíz.

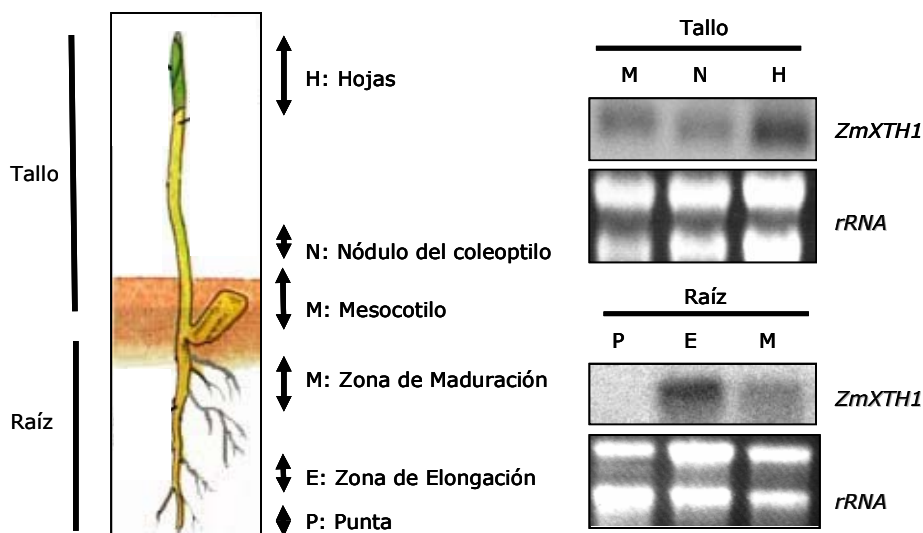


Fig. 2. 8. Expresión de *ZmXTH1* en diferentes tejidos. Se llevó a cabo análisis *northern* con 10 µg de RNA total extraído de mesocotilo (M), nódulo del coleoptilo (N), hojas (H), punta de raíz (P), zona de elongación de la raíz (E) y zona de maduración (M) de plántulas de maíz de 6 días. La hibridación se llevó a cabo con el 3' UTR del cDNA *ZmXTH1* y, como control de carga del RNA en la membrana, esta se hibridó con rRNA ribosomal 18, se muestra la tinción del rRNA con bromuro de etidio.

2.1.6 LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LA PLANTA AFECTAN LA EXPRESIÓN DE *ZmXTH1*

El estudio del patrón de expresión temporal de *ZmXTH1* y otras *XTHs* (Fig. 2.5 y 2.7) se efectuaron sobre plantas crecidas en tierra, para simular las condiciones de crecimiento naturales del maíz; sin embargo, para efectuar el análisis más específico de los tejidos (Fig. 2.8), en el que fue necesario subdividir tallo y raíz en diferentes zonas, se crecieron las plantas en rollo de papel vertical en agua, para que las raíces pudieran ser fácilmente separadas en sus diferentes zonas. Este segundo método de crecimiento, en agua, fue considerado en nuestras condiciones experimentales "hidropónico". Al momento de comparar la expresión de *ZmXTH1*, en plantas crecidas con estos dos métodos, fue evidente que en plántulas de 10 días crecidas en tierra hay una acumulación de transcritos mayoritaria en la raíz, mientras que en plántulas de la misma edad crecidas en cultivo hidropónico hay una acumulación mayoritaria en la hoja (Fig.2.9A): por lo tanto el método de crecimiento de la plántula de maíz determina el nivel de expresión de *ZmXTH1* en hoja y en raíz. Para ver si la diferente expresión de *ZmXTH1* pudiera estar relacionada a un diferente nivel de crecimiento de las plantas, comparamos la biomasa de hoja y raíz en los dos métodos de cultivo: las plantas crecidas en tierra, tanto de 6 como 10 días, presentan una reducción general de la relación de biomasa hoja/raíz respecto a las plantas crecidas en condiciones hidropónicas (Fig. 2.9B). Este resultado apunta a un paralelismo entre una mayor expresión de *ZmXTH1* y una mayor biomasa relativa, abriendo posibles especulaciones sobre un posible papel de *ZmXTH1* en fenómenos de crecimiento celular.

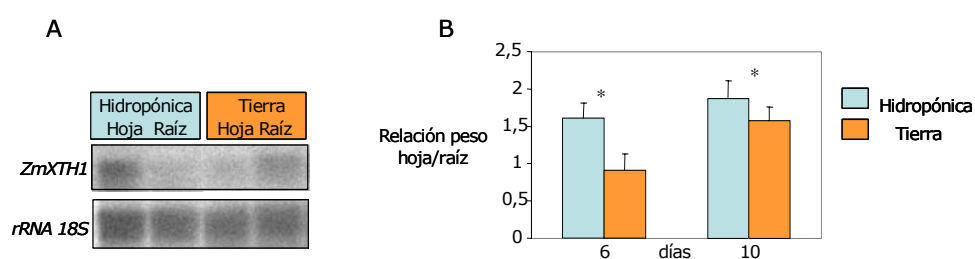


Fig. 2.9. A: expresión de *ZmXTH1* en diferentes métodos de crecimiento. Análisis *northern* con 10 µg de RNA total extraído de hojas y raíces de plantas de maíz de 10 días crecidas en tierra o en cultivo hidropónico. La hibridación se llevó a cabo con el 3' UTR del cDNA *ZmXTH1* y, como control de carga del RNA en la membrana, ésta se hibridó con rRNA ribosomal 18 S. **B:** comparación entre la relación de biomasa hoja/raíz en condiciones de crecimiento hidropónico (azul) y en tierra (naranja). Las plántulas de maíz se crecieron durante 10 días y el peso fresco total de la hoja y de la raíz fue determinado a los 6 y 10 días. Las muestras estaban constituidas por 7 plantas cada una y los datos se expresan como promedios ± desviación estándar. * representa $p < 0.05$ (análisis T de Student).

2.1.7 LA EXPRESIÓN DE *ZmXTH1* ESTÁ INDUCIDA POR GIBERELINAS

La expresión génica de las *XTHs* está regulada por varios estímulos abióticos (Xu et al., 1996; Rose et al., 2002). Por lo tanto, investigamos el posible efecto sobre *ZmXTH1* de estrés salino, estrés osmótico, herida y metiljasmonato. Los resultados obtenidos por *northern blot* indican que la expresión de *ZmXTH1* no está afectada por ninguno de estos tratamientos (resultados no mostrados).

Se ha descrito también una regulación de varias *XTHs* por hormonas; en concreto, la expresión de algunas *XTHs* del subgrupo 4 está inducida por las hormonas giberelinas (Jan et al., 2004). Por lo tanto, se ensayó también el efecto de ácido giberélico (GA_3) sobre la expresión de las *XTHs* de maíz que pertenecen al subgrupo 4. Fragmentos de lamina foliar de plantas de 10 días crecidas en tierra se sumergieron en GA_3 5 y 50 μM durante 1, 3 y 6 horas. Los resultados obtenidos por *northern blot* indican que la expresión de *ZmXTH1* está inducida por giberelinas: la inducción se detecta ya a la hora y sigue hasta las 6 horas, pero no parece ser dosis dependiente, ya que tanto 5 como 50 μM de GA_3 tienen el mismo efecto inductor (Fig.2.10)

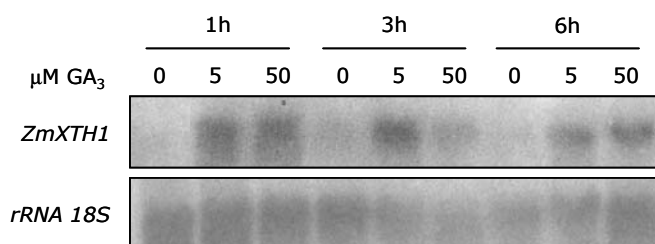


Fig. 2.10. Efecto de las giberelinas sobre la expresión de *ZmXTH1* analizada por *northern blot*. 10 μg de RNA total extraído de segmentos de hojas de plantas de maíz de 10 días crecidas en tierra e incubados con 5 o 50 μM de GA_3 durante 1, 3 o 6 horas. La hibridación se llevó a cabo con la región 3' UTR del cDNA *ZmXTH1* y, como control de carga del RNA en la membrana, esta se hibridó con rRNA ribosomal 18 S.

La inducción por giberelinas de *ZmXTH1*, junto al hecho que otras *XTHs* filogenéticamente cercanas estén inducidas por esta hormona, abre la hipótesis de que también la expresión de *ZmXTH2* y *ZmXTH3*, que pertenecen al mismo subgrupo filogenético, pueda estar inducida por giberelinas. Por lo tanto, se ensayó el efecto de GA_3 también sobre la expresión de estas dos *XTHs*. Los resultados obtenidos por RT-PCR indican que el tratamiento con GA_3 5 μM durante 1 y 3 horas no afecta la expresión ni de *ZmXTH2* ni de *ZmXTH3* (Fig.2.11): por lo tanto, la inducción por GA_3 es una característica sólo de algunas *XTHs* del subgrupo 4, y por lo tanto no distintiva de este subgrupo.

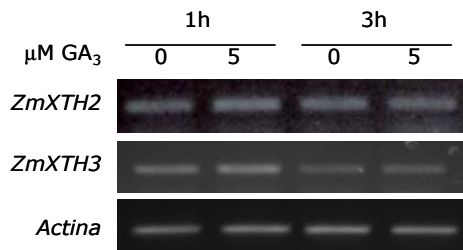


Fig. 2.11. Efecto de las giberelinas sobre la expresión de *ZmXTH2* y *ZmXTH3* analizada por RT-PCR. El RNA total fue extraído de segmentos de hojas de plantas de maíz de 10 días crecidas en tierra e incubados con 5 μM de GA_3 durante 1 y 3 horas. El cDNA amplificado por retrotranscripción fue amplificado con oligonucleótidos específicos para la región 3' UTR de *ZmXTH2* y *ZmXTH3*. Como control de la concentración del cDNA se amplificó un fragmento del gen de la actina.

En conclusión, el estudio del patrón de expresión de *ZmXTH1*, cuya expresión preferencial es en órganos jóvenes en activa elongación y crecimiento, junto con su regulación por giberelinas, sugieren que *ZmXTH1* puede estar implicada en modificaciones de la pared necesarias para la expansión celular, así como se ha descrito por otras XTHs.

2.2. SOBREENPRESIÓN DE ZmXTH1 EN DIFERENTES SISTEMAS HETERÓLOGOS

Una vez efectuado el estudio filogenético de la proteína ZmXTH1 y su caracterización en maíz a través de análisis de expresión, se abordó un estudio más profundo de ZmXTH1, a través de estudios de actividad enzimática, localización subcelular y estudios funcionales. Para estas finalidades fue necesario expresar la proteína en diferentes sistemas heterólogos. En la tabla 2.2 se resume de manera esquemática el trabajo realizado en expresión de ZmXTH1 en diferentes sistemas heterólogos.

Organismo	<i>E.coli</i>	<i>P.pastoris</i>	Cebolla	<i>A.thaliana</i>
Vector de expresión	pET 28	pPICZa	pCambia 1302	pCambia 1300
Proteína	ZmXTH1Full ZmXTH1Int	ZmXTH1Int	ZmXTH1Full-GFP ZmXTH1Int-GFP	ZmXTH1Full
Transformación	Choque térmico	Electroporación	Biolística (transitoria)	<i>A.tumefaciens</i>
Diseño experimental	Sobreexpresión Purificación ZmXTH1Int en condiciones desnaturalizantes (cuerpos inclusión) Renaturalización	Sobreexpresión Selección cepas transformantes Puesta a punto sistema de expresión Expresión en bioreactor Concentración ZmXTH1Int	Incubación tejidos transformados durante 24 h, 48 h, 60 h Plasmolisis Observación fluorescencia por microscopia confocal (antes y después plasmolisis)	Identificación líneas 35S::ZmXTH1 homocigotas (selección en antibiótico) Estudio expresión de ZmXTH1 (<i>northern</i> y <i>western</i>)
Finalidad	Obtención anticuerpos Ensayos enzimáticos XET	Ensayos enzimáticos XET y ET	Localización subcelular	Análisis enzimático XET Análisis fenotípico -Macroscópico -Microscópico (TEM)

Tabla. 2.2. Representación esquemática de los pasos experimentales que se han llevado a cabo para la sobreexpresión de ZmXTH1 en diferentes sistemas heterólogos. También se evidencian las diferentes construcciones utilizadas, y la finalidad de cada experimento.

ZmXTH1Full: proteína ZmXTH1 entera

ZmXTH1Int: proteína ZmXTH1 sin el péptido señal N-terminal

ZmXTH1Full-GFP: proteína ZmXTH1 entera fusionada a GFP en C-terminal

ZmXTH1Intl-GFP: proteína ZmXTH1, sin el péptido señal, fusionada a GFP en C-terminal

ZmXTH1sp-GFP: péptido señal de ZmXTH1 fusionado a GFP en C-terminal

Ensayo XET: ensayo xiloglucano endotransglucosilasa

Ensayo ET: ensayo endotransglucosilasa

TEM: microscopia electrónica de transmisión

2.2.1 SOBREEXPRESIÓN DE ZmXTH1 EN *E. coli*

La sobreexpresión de ZmXTH1 en *E. coli* se llevó a cabo con dos finalidades: por un lado, la obtención de anticuerpos policlonales para estudiar el patrón de expresión de la proteína ZmXTH1; por otro lado, para realizar ensayos *in vitro* de actividad enzimática. Se sobreexpresó tanto la proteína entera, ZmXTH1Full, de 281 aminoácidos, como la proteína sin el dominio N-terminal, ZmXTH1Int, de una longitud de 247 aminoácidos. Las proteínas recombinantes ZmXTH1Full y ZmXTH1Int presentan un peso molecular teórico de 30,8 y 27,3 kDa respectivamente, y un punto isoeléctrico de 4,69 y 4,59. La adición en el extremo N-terminal de una cola de 6 histidinas incrementa el peso molecular teórico a 33 y 29,4 kDa respectivamente, según predicciones bioinformáticas (fig.2.12).

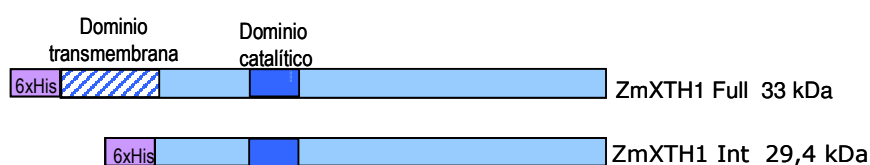


Fig. 2.12. Representación esquemática de las proteínas recombinantes ZmXTH1Full y ZmXTH1Int. La región de cDNA de ZmXTH1 que codifica la proteína entera y la parcial han sido clonadas en el vector de expresión pET28 (Invitrogen), que incorpora en el extremo N-terminal una cola de 6 histidinas.

Ambos cDNAs se clonaron en el vector de expresión pET28-a(+) (Novagen) y, una vez verificadas las secuencias de los clones transformantes, se llevó a cabo la sobreexpresión como se indica en el apartado 4.10.2.1.

En condiciones de inducción estándar, a 37°C, ZmXTH1Int se produce en cantidad mucho mayor que ZmXTH1Full, como resulta de la comparación con el extracto proteico bacteriano antes de la inducción. Por lo tanto, para optimizar la expresión de ZmXTH1Full, se llevó a cabo la inducción a una temperatura más baja, a 30°C.

En estas nuevas condiciones, ZmXTH1Full se expresa mejor (fig. 2.13).

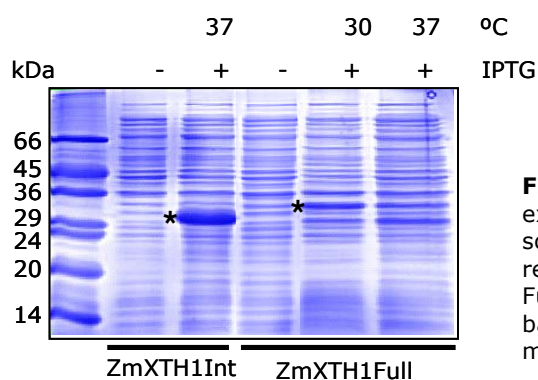


Fig. 2.13. 12.5% SDS-PAGE de los extractos crudos bacterianos que sobreexpresan las proteínas recombinantes ZmXTH1 Int y ZmXTH1 Full. - y + se refieren al cultivo bacteriano no inducido o inducido con 1 mM IPTG

ZmXTH1Int presenta en SDS-PAGE un peso molecular de alrededor de 30 kDa, ZmXTH1Full un peso de 35 kDa. Después de la lisis celular, ambas proteínas se quedan en los cuerpos de inclusión de *E.coli* (fracción insoluble), aunque se hicieron varios intentos de solubilización modificando el protocolo de lisis (Fig.2.14). Fue por lo tanto necesario un tratamiento desnaturizante con urea 8 M para la solubilización de ZmXTH1 Int, mientras que para ZmXTH1Full ni siquiera este tratamiento fue efectivo para la completa solubilización de la proteína. Esto es consistente con el carácter hidrofóbico del péptido señal, presente en la proteína ZmXTH1Full.

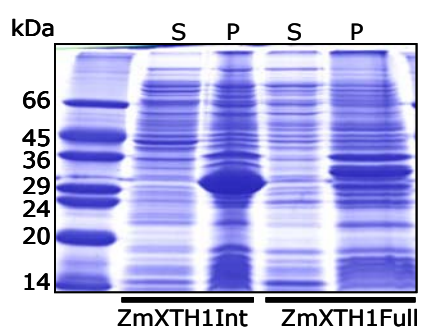


Fig. 2.14. 12.5% SDS-PAGE del sobrenadante(S) o precipitado (P) de los extractos proteicos bacterianos, que sobreexpresan las proteínas recombinantes ZmXTH1 Int o ZmXTH1 Full después de la lisis celular.

2.2.1.2 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA ZmXTH1Int

La purificación de la proteína recombinante ZmXTH1Int se efectuó por cromatografía de afinidad, tal como se describe en el apartado 4.10.2.1, utilizando una columna equilibrada con una resina comercial cargada con iones Ni^{2+} , capaces de retener las proteínas portadoras de la cola de histidinas.

La elución se realizó en condiciones desnaturizantes usando concentraciones crecientes de imidazol, entre 40 y 500 mM. La proteína eluye casi pura a una concentración de imidazol entre 40 y 200 mM (fig. 2.15)

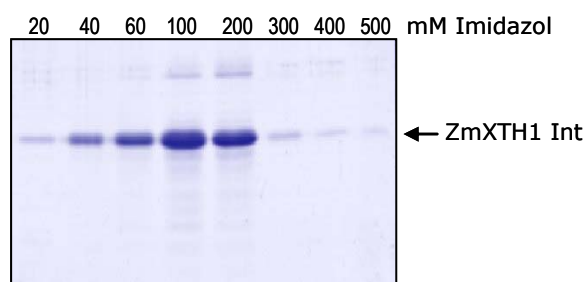


Fig. 2.15 12.5% SDS-PAGE de la proteína recombinante ZmXTH1 Int purificada mediante un gradiente de 20 hasta 500 mM de imidazol.

2.2.1.2 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES anti ZmXTH1

Una vez purificada la proteína ZmXTH1Int expresada en *E.coli*, se utilizó una fracción de ésta para la inmunización de gallinas de laboratorio y la obtención de anticuerpos policlonales anti-ZmXTH1, así como se describe en el apartado 4.10.4. Estos son una buena herramienta para la identificación de la proteína tanto en maíz como en otros sistemas de expresión. Para la inmunización se utilizaron las fracciones de proteínas eluidas con imidazol 100 y 200 mM, las que presentaban una mayor concentración de ZmXTH1Int. Una vez obtenidas las IgYs totales, estas se titularon por *dot blot* con diferentes cantidades de antígeno. La hibridación por *western blot* del antígeno con las IgYs de las gallinas inmunizadas con ZmXTH1, o alternativamente con las IgYs preinmunes, demuestra que los anticuerpos policlonales obtenidos reconocen la proteína ZmXTH1Int, a diferencia de los anticuerpos preinmunes (fig. 2.16).

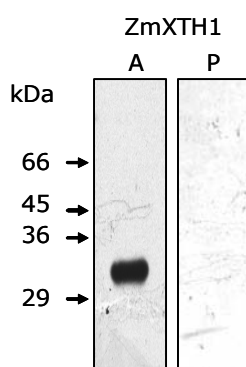


Fig. 2.16. *Western blot* análisis sobre 100 ng de proteína recombinante ZmXTH1Int hibridada con el anticuerpo policlonal anti ZmXTH1 a una dilución de 1:8000 (A) o bien con el anticuerpo preinmune (P) a la misma dilución.

Sin embargo, ensayos de *western blot* sobre extractos proteicos totales de maíz revelan que el anticuerpo policlonal anti ZmXTH1 extraído de las IgYs totales de las gallinas es altamente inespecífico; de hecho, los ensayos de *western blot* indican que este anticuerpo reconoce más proteínas en maíz (fig.2.17, izquierda). Se llevó a cabo por lo tanto su purificación por afinidad, tal como se describe en el apartado 4.10.4.2. Los resultados obtenidos por *western blot* indican que la inmunopurificación ha sido efectiva, ya que el anticuerpo inmunopurificado reconoce de manera específica una sola banda (fig.2.17, derecha).

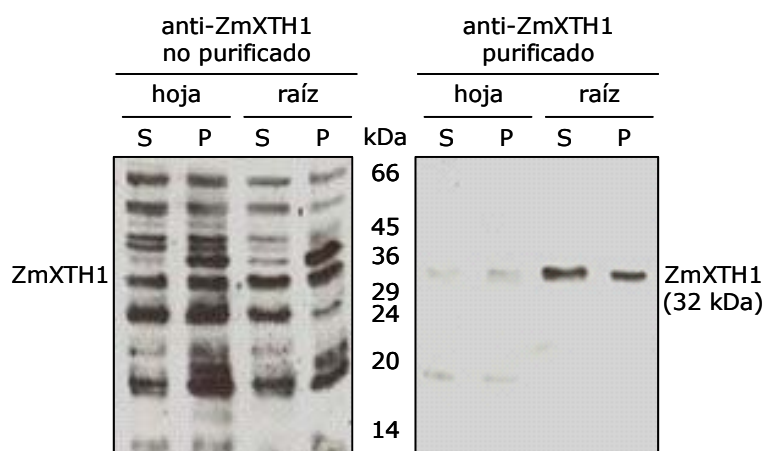


Fig. 2.17. *Western blot* análisis sobre fracciones proteicas solubles (S) e insolubles (P) de hoja y raíz de plántulas de maíz de 3 días. 23 μ g de proteína de cada fracción se separaron por SDS-PAGE y transfirieron a membrana para su hibridación con el anticuerpo anti-ZmXTH1 antes de su purificación, a una dilución de 1:3000 (izquierda de la figura) o bien el anticuerpo ZmXTH1 después de su purificación, a una dilución de 1.500 (derecha de la figura).

El resultado de este *western blot* efectuado sobre extractos de hoja y raíz de plántulas de maíz de 3 días, nos proporciona algunas informaciones: en primer lugar, está en acuerdo con los experimentos de RT-PCR semi-cuantitativa y *northern*, es decir que en un estadio muy temprano de desarrollo la proteína ZmXTH1 se localiza mayoritariamente en la raíz. Otro dato que emerge es que ZmXTH1, de un peso aproximado de 32 kDa, está presente tanto en fracciones solubles como insolubles de extractos proteicos de maíz. Esto podría ser debido a una compartimentación de la proteína en diferentes sitios celulares, y sugiere la existencia de algún mecanismo de regulación. Sin embargo, no se puede excluir que el método de extracción utilizado no es adecuado, o bien que el anticuerpo reconozca alguna otra XTH de maíz filogenéticamente cercana a ZmXTH1.

2.2.2 SOBREENPRESIÓN DE ZmXTH1 en *P. pastoris*

Paralelamente a la sobreexpresión de ZmXTH1 en *E. coli*, se llevó a cabo también la expresión en otro sistema heterólogo, la levadura *Pichia pastoris*. La razón de utilizar este segundo sistema de sobreexpresión, además de la bacteria *E. coli*, que representa el sistema más comúnmente utilizado, reside en el hecho que se ha descrito que determinadas modificaciones post-traduccionales, como la N-

glicosilación, posibles sólo en sistemas de expresión eucariotas, pueden ser importantes para la actividad enzimática de las XTHs. Además, siendo el proceso de renaturalización, necesario para el correcto plegamiento de la proteína sobreexpresada en *E.coli*, un proceso altamente empírico, se consideró oportuno añadir otro sistema de sobreexpresión.

El sistema de sobreexpresión en *P.pastoris* se basa en la integración estable de un gen de interés en el genoma de levadura por recombinación homóloga, y su expresión dirigida bajo el control del promotor fuerte de *P.pastoris* de la alcohol oxidasa, AOX1 sensible a metanol. Respecto a las modificaciones post-traduccionales generadas por *P.pastoris*, éstas se asemejan más a las de organismos eucariotas superiores que las realizadas, por ejemplo, por *S.cerevisiae*. A diferencia de este último, *P.pastoris* no hiperglicosila (Lin Cereghino et al, 2001). La estrategia elegida para la sobreexpresión de ZmXTH1 en levadura fue su secreción en el medio de cultivo de levadura mediante su fusión en N-terminal a la secuencia codificante *prepo* del factor- α de *S.cerevisiae*. Esta estrategia, ampliamente utilizada para la producción de proteínas en *P.pastoris*, entre las cuales algunas XTHs (Kallas et al., 2005; Van Sandt et al., 2006) tiene la ventaja de que esta levadura secreta muy pocas proteínas nativas en el medio extracelular, lo que simplifica el proceso de recuperación de las proteínas extracelulares.

2.2.2.1 CLONACIÓN DE ZmXTH1Int EN pPicZ α , TRANSFORMACIÓN DE *P.pastoris* Y SELECCIÓN DE LOS TRANSFORMANTES

Debido a la presencia de un péptido señal de levadura, se sobreexpresó la proteína ZmXTH1 sin su péptido señal nativo, ZmXTH1Int.

Un fragmento de 743 pb correspondiente a la secuencia codificante para ZmXTH1 fue amplificado por PCR y clonado en las dianas *EcoRI* y *XbaI* en el plásmido pPICZ α A (Invitrogen) que incorpora en su extremo N-terminal el péptido señal α -factor. La fusión de la proteína ZmXTH1 con el factor α produce una proteína con un peso molecular teórico de 36,9 kDa (fig.2.18).

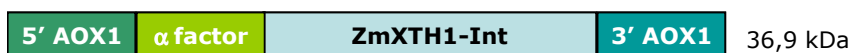


Fig. 2.18 Esquema de la caja de expresión del cDNA *ZmXTH1 Int* bajo el promotor inducible por metanol AOX1 de *P.pastoris*. *ZmXTH1-Int* se ha clonado en pauta en N-ter con la secuencia de secreción extracelular de levadura α factor.

Una vez verificada la secuencia de la construcción pPICZ α -XTH1Int, la cepa silvestre de *P.pastoris* X-33 (Mut+) (Invitrogen) fue transformada tanto con esta construcción como con el plásmido vacío pPICZ α como control negativo, tal como se describe en el apartado 4.8.3. Una vez efectuada la transformación, se seleccionaron en antibiótico 10 clones transformantes, denominados pPICZ-XTH1 (serie del 1 al 10), que fueron analizados mediante PCR a partir de células; para demostrar la presencia de una banda cuyo tamaño coincidía con el esperado. De la misma manera, se seleccionaron 5 clones transformados con el plásmido vacío, utilizados como control negativo.

2.2.2.2 PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE ZmXTH1

Una vez seleccionadas las cepas de *P.pastoris* transformantes, se comprobaron la producción y los niveles de expresión de la proteína ZmXTH1*. Para ello, se creció cada uno de los 10 clones pPICZ-XTH1 (1-10) en cultivo líquido a pequeña escala y se indujo la expresión de la proteína, tal como se describe en el apartado 4.10.2.2. La producción de proteínas en *P.pastoris* es un proceso empírico que depende de varios parámetros, tanto intrínsecos al sistema de expresión, como relacionados con la proteína a expresar. Otro gran bloque de factores que influye sobre el proceso de producción está formado por aquellos parámetros relacionados con la operación de cultivo, es decir, los parámetros físicos como la temperatura, la agitación y la aireación, el pH o la composición del medio de cultivo, así como la estrategia a seguir para la inducción con metanol. Fue por lo tanto necesario un proceso de puesta a punto de la producción de ZmXTH1 en *P.pastoris*, seleccionando, entre los clones transformantes, aquellos que presentaban mayores niveles de producción de la proteína, y analizando varios parámetros que pudieran influenciar la expresión de ZmXTH1.

La presencia de la proteína ZmXTH1 en el medio de cultivo de *P.pastoris* se comprobó por *western blot*, utilizando el anticuerpo inmunopurificado anti-ZmXTH1. Un primer paso en la puesta a punto del proceso de expresión fue el seguimiento de la producción de la proteína a través de una cinética a diferentes tiempos desde el momento de la inducción, hasta 72 horas. Los resultados indican que la proteína ZmXTH1 se detecta en el medio de cultivo de levadura sólo a partir de 48 horas

* El término ZmXTH1Int utilizado previamente es para remarcar el hecho de que la proteína producida no presenta el péptido señal, en analogía con la proteína producida en *E.coli*. Sin embargo, tratándose de la proteína madura, y de la única que se ha expresado en *P.pastoris*, a partir de ahora se la denominará por simplificación ZmXTH1.

(Fig.2.19A). La banda inmunoreconocida presenta un peso molecular de alrededor de 30 kDa, similar al peso molecular de la proteína madura; además, según las condiciones de cada experimento, en algunos casos son evidentes una o dos bandas más altas, entre 31 y 35 kDa (Fig. 2.19B); estas bandas podrían corresponder a diferentes formas glicosiladas de ZmXTH1, aunque no se pueda excluir que corresponda a un incorrecto procesamiento del factor α .

También está presente una banda de alrededor de 64 kDa. Esta banda, cuyo tamaño se acerca al doble del tamaño de ZmXTH1, podría representar un dímero de ZmXTH1. En total de los 10 clones analizados, 4 expresan la proteína ZmXTH1, aunque a diferentes niveles.

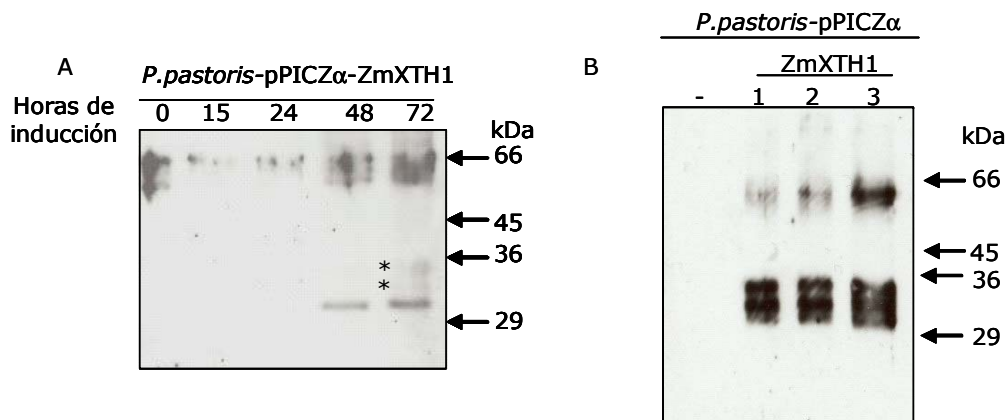


Fig. 2.19. Western blot análisis con el anticuerpo inmunopurificado anti ZmXTH1 sobre fracciones proteicas del medio de cultivo de *P.pastoris* inducido para la expresión de ZmXTH1. A) Fracciones proteicas de un mismo clon antes de la inducción (0) o bien inducido durante 15, 24, 48 y 72 horas. B) Fracciones proteicas de tres diferentes clones transformantes (1, 2, 3) y de un clon transformado con el plásmido vacío (-) inducidos durante 72 horas.

2.3 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE ZmXTH1

2.3.1 ENSAYOS XET (XILOGLUCANO ENDOTRANSGLUCOSILASA)

Una vez producidas las proteínas recombinantes ZmXTH1 en *E.coli* y *P.pastoris* se abordó la caracterización enzimática de ZmXTH1, mediante la realización de ensayos de actividad Xiloglucano-EndoTransglucosilasa (XET); para ello, han sido necesarios unos pasos previos.

En el caso de la proteína de *E.coli*, fue necesario un proceso de renaturalización mediante diálisis en un gradiente reverso de urea ya que la proteína, presente en los cuerpos de inclusión bacterianos, había sido desnaturalizada en urea 8 M para hacer posible su solubilización y siguiente purificación. El proceso de diálisis se realizó tal como se detalla en el apartado de 4.10.2.1.

Referente a la proteína ZmXTH1 de *P.pastoris*, ésta se produce en el medio extracelular de levadura en muy baja cantidad, no detectable por tinción Coomassie de SDS-PAGE, aunque sí por *western blot*. Fue por lo tanto necesaria su concentración mediante una solución saturante (90%) de amonio sulfato.

Los ensayos de actividad XET se llevaron a cabo con el método radiométrico descrito por Fry y col. (1992). Se utilizó como sustrato donador xiloglucanos de tamarindo y como sustrato aceptor oligosacáridos de xiloglucanos XXXG-ol marcados con ^3H .

Como primera aproximación se ensayó la actividad XET de la proteína presente en el medio de cultivo de un clon seleccionado de *P.pastoris*, inducido durante 72 horas para la producción de ZmXTH1. Los niveles de radioactividad incorporada durante 1 hora no mostraban diferencias significativas con el control negativo,

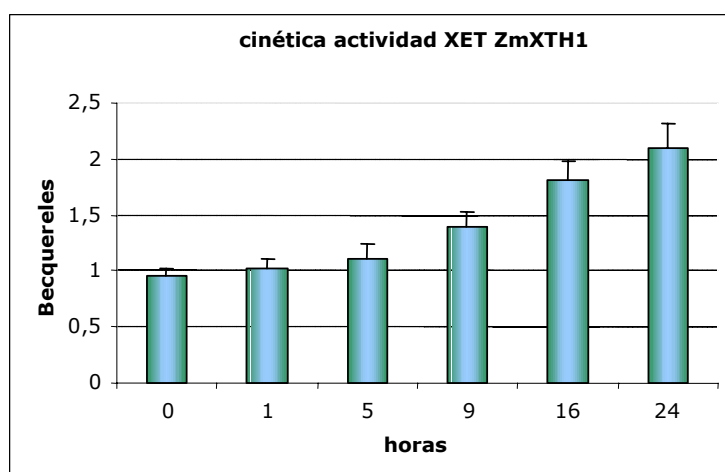


Fig.2.20 Ensayo de actividad XET de ZmXTH1. A diferentes tiempos, indicados en la figura, se bloqueó la reacción. Cada valor representa el promedio de tres ensayos independientes \pm SD.

representado por el tiempo 0, en el que se bloquea la reacción con ácido fórmico antes de añadir los sustratos. Por lo tanto se repitió el ensayo bloqueando la reacción a diferentes tiempos, desde 1 hasta 24 horas (fig. 2.20).

El seguimiento de la actividad XET a lo largo del tiempo muestra que, en comparación al control, constituido por el tiempo 0, hay un progresivo aumento en los niveles de radioactividad incorporada por los xiloglucanos incubados con la proteína ZmXTH1, sugiriendo una baja actividad XET para dicha proteína, detectable sólo a tiempos largos de reacción. Los valores de radioactividad muestran un aumento progresivo a lo largo del tiempo; aún así, se mantienen muy bajos. Se investigó por lo tanto el efecto de posibles parámetros que pudieran afectar la actividad de la proteína recombinante ZmXTH1 expresada en *P.pastoris*, como por ejemplo unas condiciones no apropiadas de su producción. Se ha descrito por ejemplo que la actividad XET de la proteína PttXTH16A de chopo expresada en *P.pastoris* aumenta de manera considerable cuando la cepa de levadura que sobreexpresa la proteína crece en un medio de cultivo "rico" (con extracto de levadura y peptona) (Bollok et al., 2005). Eso podría ser debido al hecho que la presencia de un medio rico previene la degradación de la proteína recombinante, y favorece así la producción de una forma activa, tal como se ha descrito también para otras proteínas (Kobayashi et al., 2000). Asimismo, se ha observado como la temperatura puede influenciar la producción de una proteína activa, ya que bajando hasta 15°C la temperatura de la inducción, que se lleva a cabo habitualmente a 30°C, se consigue una actividad XET mucho más alta (Bollok et al., 2005; Kallas et al., 2005). Para verificar si estos parámetros pudieran influenciar la actividad XET de ZmXTH1, se efectuó la expresión de la proteína ZmXTH1 creciendo la cepa de

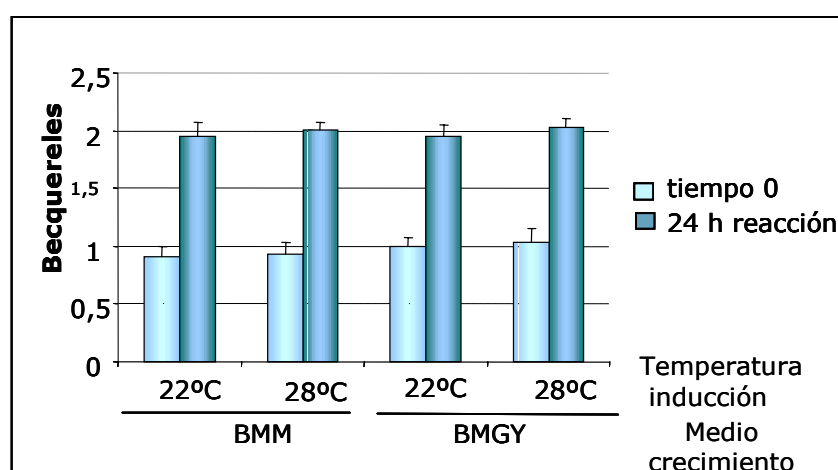


Fig.2.21 Ensayo de actividad XET de ZmXTH1 durante 24 horas. Se han utilizado dos medios de crecimiento diferentes a dos temperaturas. El control se representa por el tiempo 0. Cada valor representa el promedio de tres ensayos independientes \pm SD. BMM: medio "mínimo"; BMGY: medio "rico".

P.pastoris pPICZ-XTH1-3 a dos temperaturas alternativas (22°C y 28°C), y en dos medios de crecimiento diferentes, uno "mínimo" (BMM), y uno "rico" (BMGY) (su composición se detalla el apartado 4.10.2.2) (fig. 2.21). Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencias significativas en los valores de radioactividad incorporada ni a diferentes temperaturas, ni con diferentes medios de crecimiento.

Para asegurar que los bajos niveles de radioactividad incorporada correspondan efectivamente una baja actividad XET de ZmXTH1, se efectuaron dos tipos de controles: primero, para excluir que la actividad detectada derivara de alguna actividad XET endógena presente en levadura (aunque no ha sido nunca demostrada) se ensayó paralelamente la actividad XET también de la cepa de *P.pastoris* control, es decir transformada con el plásmido pPICZ α vacío.

Además, para excluir la posibilidad de una incorporación inespecífica de los sustratos radioactivos aceptores (^3H XXXGol) en el producto de reacción, se llevó a cabo la reacción en ausencia de xiloglucano (sustrato donador).

El resultado de este análisis (fig.2.22) indica que la presencia de xiloglucano en la mezcla de reacción es indispensable para producir un aumento en la radioactividad incorporada en la reacción. Eso excluye la posibilidad de que a lo largo de 24 horas haya alguna degradación de los sustratos aceptores de tal manera que esos puedan ser incorporados de forma inespecífica en el producto de reacción.

Además, la cepa de *P.pastoris* control presenta también un ligero aumento en la radioactividad incorporada durante 24 horas, pero este aumento es muy inferior al aumento detectado para la proteína ZmXTH1.

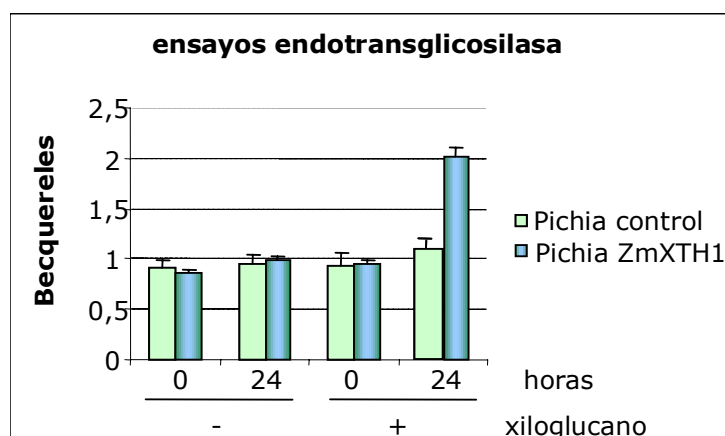


Fig. 2.22. Ensayo de actividad XET de ZmXTH1 durante 24 horas, en presencia o ausencia de sustrato donador (xiloglucano). Se ha ensayado en paralelo como control negativo una cepa de levadura transformada con el plásmido vacío. Cada valor representa el promedio de tres ensayos independientes \pm SD.

También se ha ensayado la actividad XET de la proteína recombinante expresada en *E.coli*. En este caso, se detectó un aumento de radioactividad incorporada aún más bajo respecto a la cepa de *P.pastoris* control (fig. 2.23). Ese resultado indica que esta proteína no presenta ninguna actividad XET. Esto podría ser debido a una renaturalización incorrecta, o bien a la falta de modificaciones post-traduccionales, como la N-glicosilación, necesaria para la actividad de esta proteína.

Por otro lado, tanto el hecho de que la proteína de *E.coli* purificada, (presente de manera proporcional en cantidades mayores en el ensayo de reacción), como el extracto crudo de la cepa de *P.pastoris* control, muestran una incorporación de radioactividad en los productos de reacción muy inferior a la de la proteína ZmXTH1 expresada en levadura, dejan concluir que esta proteína presenta efectivamente una baja actividad XET.

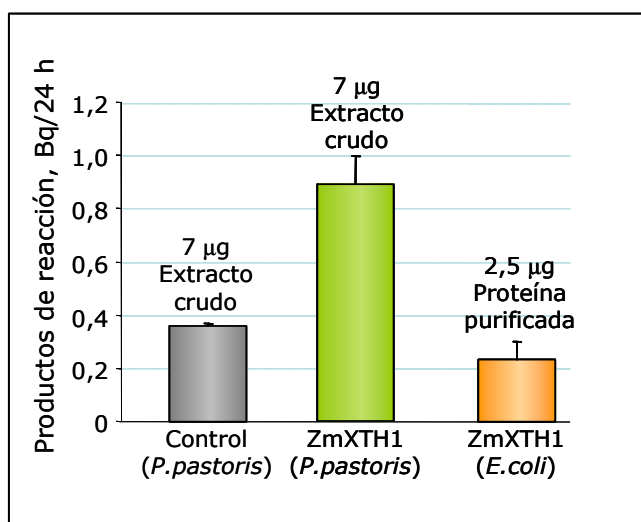


Fig.2.23 Ensayo de actividad XET de la proteínas recombinantes ZmXTH1Int expresadas en *E.coli*, *P.pastoris*, y de la cepa de *P.pastoris* control. Cada valor representa el promedio de tres ensayos independientes \pm SD. Los valores indicados se refieren a la radioactividad incorporada en 24 horas de reacción, a la que se ha sustraído la radioactividad del tiempo 0.

2.3.2 ENSAYOS ET (ENDOTRANSGLICOSILASA)

Los ensayos de actividad XET demuestran que la proteína ZmXTH1 expresada en *P.pastoris*, presenta una baja actividad XET. Eso por un lado es consistente con la baja cantidad de xiloglucanos presentes en la pared celular de maíz, y por otro lado abre la hipótesis de que estas hemicelulosas no sean el sustrato preferente de ZmXTH1. Se ensayaron por lo tanto otras posibles actividades endotransglicosilasa, con la finalidad de indagar la existencia de algún otro sustrato preferente para ZmXTH1.

Se llevaron a cabo un total de 200 reacciones diferentes empleando todas las posibles combinaciones de potenciales sustratos donadores y aceptores, como se indica en la tabla 2.3.

Sustratos donadores	Sustratos aceptores
arabinano	[³ H]Xyl6-ol, β-(1-4)
arabinogalactano	[³ H]XXXGol
arabinoxilano	[³ H]Ara9-ol, β-(1-5)
celulosa	[³ H]XLLG-ol
galactano	[³ H]Man6-ol, β-(1-4)
goma guar	[³ H]Cellobiitol
goma arábica	[³ H]GalA5-ol
goma ghatti	[³ H]M4-ol (maltotetraitol)
goma tragacanto	[³ H]Gal6-ol, β-(1-4)
laminarina	[³ H]Glicerol
liquenano	
hemicelulosa A de maíz	
hemicelulosa B de maíz	
mannano	
metilglucuronoxilano	
pectina	
ácido poligalacturónico	
almidón	
xilano	
xiloglucano	

Tabla 2.3. En azul se representa todos los polisacáridos utilizados como sustrato donador en la reacción endotransglicosilasa. En verde se representa todos los oligosacáridos de la misma reacción. La combinación de estos sustratos donadores y aceptores generan 200 reacciones endotransglicosilasa diferentes.

Las diferentes reacciones enzimáticas se llevaron a cabo utilizando la proteína ZmXTH1 expresada en *P.pastoris*.

En particular, se valoró la hipótesis de que ZmXTH1 pudiera actuar mejor sobre hemicelulosas de maíz, denominadas A y B. Estos dos tipos de polisacáridos corresponden a dos fracciones diferentes obtenidas de suspensiones celulares de maíz después de extracción alcalina: aquellas hemicelulosas que precipitan después de neutralización son las "A", mientras que las que se quedan en solución son las "B".

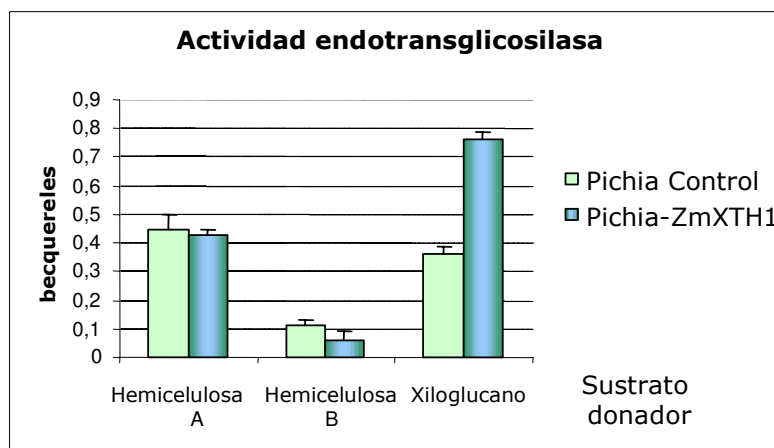


Figura 2.24. Actividad endotransglicosilasa de ZmXTH1 utilizando tres alternativos sustratos donadores: hemicelulosa A y B de maíz y Xiloglucanos de tamarindo. El sustrato aceptor es en cualquier caso el oligosacárido [³H]XXXGol. Los valores indicados se refieren a la radioactividad incorporada en 24 horas de reacción, a la que se ha sustraído la radioactividad del tiempo 0.

Los resultados obtenidos (Fig. 2.24) indican que para ambos tipos de hemicelulosas no hay diferencias entre los valores de los productos de reacción de la cepa de *P.pastoris* control respecto a la cepa de *P.pastoris* que sobreexpresa ZmXTH1, diferentemente de lo que ocurre con los xiloglucanos.

Resultados similares se obtuvieron utilizando diferentes sustratos aceptores con hemicelulosas, y los otros sustratos donadores diferentes de las hemicelulosas, incluso el liquenano, un polisacárido derivado del liquen, químicamente muy similar a los enlaces mixtos β -(1→3),(1→4) de los β -glucanos de plantas herbáceas y cereales (resultados no mostrados).

El global de estos resultados indica pues que el xiloglucano es el sustrato preferente de ZmXTH1.

2.4 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE ZmXTH1

Tanto la estructura primaria de ZmXTH1, como la presencia de un péptido señal putativo de secreción, y su actividad XET, son elementos que sugieren que ZmXTH1 es una proteína que tiene su lugar de acción en la pared celular. Para corroborar esta hipótesis, se ha investigado su localización subcelular mediante dos tipos diferentes de aproximaciones experimentales:

- Transformación transitoria de ZmXTH1 fusionada a GFP en células de epidermis de cebolla y análisis de su localización por microscopia confocal.
- Extracción de proteínas apoplásticas a partir de raíces de maíz, e inmunoreconocimiento de ZmXTH1 por *western blot*.

2.4.1 EXPRESIÓN TRANSITORIA DE ZmXTH1 EN CEBOLLA

Una aproximación experimental utilizada para aclarar la localización subcelular de ZmXTH1 ha sido la transformación transitoria de células de epidermis de cebolla con ZmXTH1 fusionada al gen testigo codificante para la proteína verde fluorescente (GFP). Se han producido tres construcciones diferentes de fusión a GFP: la secuencia codificante para la proteína ZmXTH1 entera (ZmXTH1-Full-GFP); la secuencia codificante para la proteína ZmXTH1 excluyendo el péptido señal (ZmXTH1-Int-GFP); la secuencia codificante sólo para el péptido señal (ZmXTH1sp-GFP). Además, como control negativo se transformó la GFP sola (fig. 2.25)

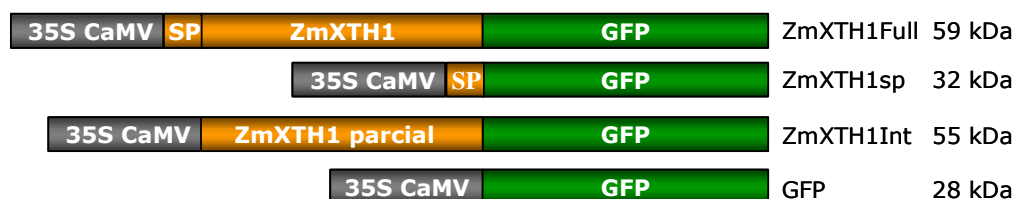


Fig. 2.25. Representación esquemática de las proteínas recombinantes ZmXTH1Full, ZmXTH1sp y ZmXTH1Int

Una vez efectuada la transformación, se analizó por microscopia confocal la distribución de la fluorescencia de la GFP de las células transformadas con las diferentes construcciones. Después de 20-24 horas de la transformación, la distribución de la fluorescencia de ZmXTH1Full es muy característica; tanto las

secciones ópticas individuales como las proyecciones de varias secciones evidencian que la proteína fluorescente queda excluida del núcleo y forma una estructura similar a una malla de membranas tubulares que enreda la célula (fig. 2.26).

Otros autores han encontrado una estructura de red de membranas con morfología muy similar cuando han expresado una proteína de fusión de GFP con una señal de retención en el retículo endoplásmico (KDEL o HDEL) (Boevink et al., 1998; 1999; Ridge et al., 1999). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la proteína ZmXTH1 está localizada en el retículo endoplásmico, en la ruta de secreción hacia el apoplasto. De hecho, el retículo endoplásmico es el compartimiento de entrada de proteínas a la vía secretora. El mismo patrón de localización se observa con ZmXTH1 sp; (Fig. 2.26); por lo tanto, este resultado confirma a esta región de la proteína como péptido señal funcional y suficiente para dirigir la proteína hacia la ruta de secreción. En acuerdo con estos resultados, la proteína ZmXTH1 sin el péptido señal (ZmXTH1 Int) no se localiza en la ruta de secreción. De hecho, se observa una distribución irregular de la fluorescencia que se reparte en toda la célula, tanto en el citoplasma como en el núcleo por difusión pasiva.

Como es esperable, el mismo patrón de localización inespecífico se observa con la construcción utilizada como control negativo, GFP (Fig.2.26).

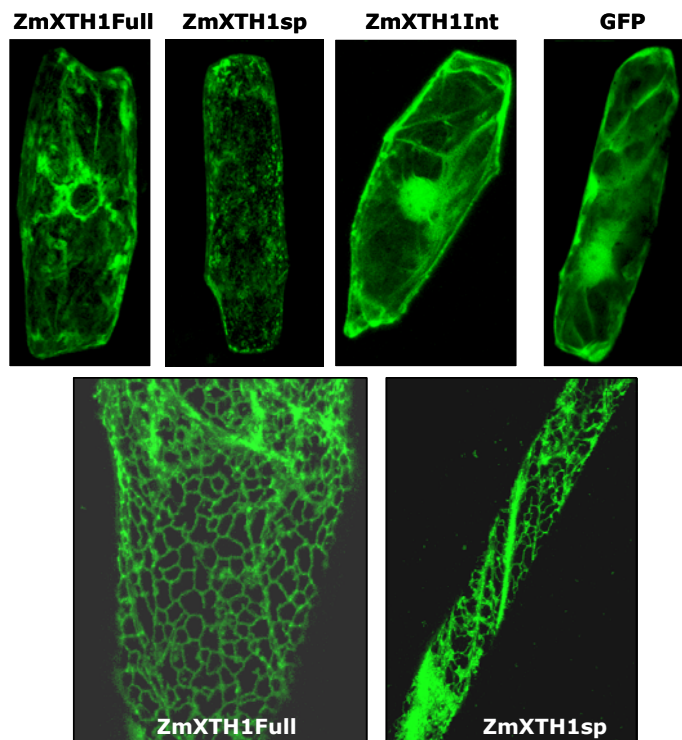


Fig. 2.26. Proyecciones de secciones sucesivas de células de cebolla transformadas con ZmXTH1Full, ZmXTH1sp, ZmXTH1Int y GFP y observadas por microscopia confocal. En la parte superior de la figura, se observa la diferencia en los patrones de distribución de la fluorescencia de ZmXTH1Full y ZmXTH1sp, que queda excluida del núcleo, respecto a los patrones, muy similares entre ellos, de ZmXTH1 Int y GFP, en los que la proteína fluorescente difunde en el núcleo. En la parte inferior, se muestran detalles, a mayor aumento, de células transformadas con ZmXTH1Full y ZmXTH1sp, donde es evidente la localización en retículo.

Estos datos indican la entrada de ZmXTH1 en la ruta de secreción, pero no aportan ninguna información sobre su posible localización final en pared.

Consecuentemente, con el fin de investigar si la proteína, visible en el retículo, está también (al menos parcialmente) localizada en pared, su supuesto destino final, se han efectuado ensayos de plasmolisis (Fig.2.27).

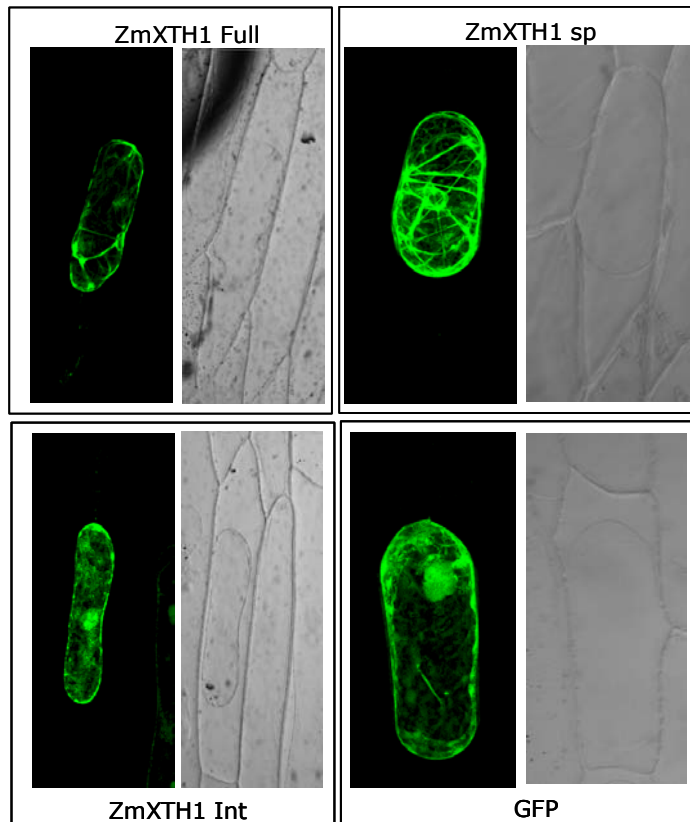


Fig. 2.27 Imágenes de fluorescencia y sus respectivas imágenes de transmisión de células de cebolla plasmolizadas mantenidas a **pH 5,8, 24 horas después de la transformación**. Se observa como en las cuatro construcciones la fluorescencia colocaliza con el protoplasto en retracción.

En condiciones habituales para este tipo de experimentos (incubando la piel de la cebolla en medio MS a pH 5,8 y observando la fluorescencia hasta 48 horas después del bombardeo) ZmXTH1Full no se observa en pared; de hecho, después de la plasmolisis la fluorescencia colocaliza enteramente con el protoplasto que se retrae de la pared celular después del choque osmótico. El mismo resultado se obtiene con la proteína ZmXTH1sp, y no permite evidenciar diferencias con la localización de ZmXTH1Int y GFP, exceptuando el hecho de que en el caso de estas dos construcciones la fluorescencia sigue visible en el núcleo del protoplasto de la célula plasmolizada, a diferencia de lo que ocurre con ZmXTH1Full y ZmXTH1sp.

Cabe destacar que se ha descrito en la literatura que la fluorescencia de la GFP es pH-dependiente y puede disminuir a bajos valores de pH, como es el caso del pH ácido de la pared, produciendo como posible efecto la total falta de detección de fluorescencia en este compartimento celular en experimentos similares (Scott et al., 1999; Chen et al., 2007). Por lo tanto, se ha vuelto a efectuar el mismo tipo de

experimento incubando la cebolla en un tampón a pH 7 desde el momento de la transformación hasta la observación al microscopio. En estas nuevas condiciones experimentales, tanto la proteína ZmXTH1Full como ZmXTH1sp se localizan en pared al cabo de 24 horas del bombardeo (fig. 2.28).

De hecho, las células plasmolizadas presentan agregados esféricos fluorescentes en la pared, que mantiene continuidad con el protoplasto en retracción a través de unas evaginaciones también fluorescentes. Estas estructuras corresponden probablemente a los "filamentos de Hectian" (*Hectian strands*), típicas estructuras filamentosas derivadas de la membrana plasmática que conectan el protoplasto con la pared de células plasmolizadas (Oparka, 1994; Lang et al., 2004). Al contrario, tanto la GFP sola como la construcción ZmXTH1Int no son afectadas por el cambio de pH, ya que, también en este caso, la fluorescencia queda totalmente limitada al protoplasto, de manera igual a lo que ocurre a pH 5,8 (resultados no mostrados).

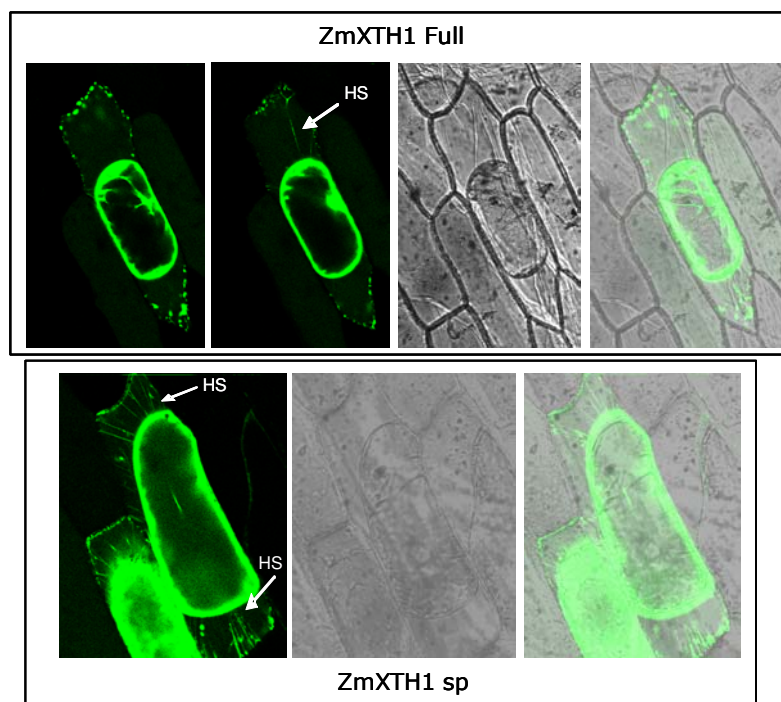


Fig. 2.28 Imágenes de fluorescencia y sus respectivas imágenes de transmisión de células de cebolla plasmolizadas mantenidas a **pH 7, 24 horas después de la transformación**. Se observa como en este caso la fluorescencia de la GFP de las células transformadas tanto con ZmXTH1Full como ZmXTH1sp es presente tanto en el protoplasto en retracción como en la pared. Además, son evidentes unas estructuras típicas de células plasmolizadas, los *Hectian strands* (HS).

Una posterior observación de células transformadas con la proteína ZmXTH1Full muestra como al cabo de 60 horas del bombardeo es mucho más evidente la localización en la pared de la proteína, que ya no se detecta en la ruta secretora (Fig.2.29); esto sugiere que en este tiempo la proteína ha completado su exportación en el apoplasto. Como ulterior demostración de la localización en pared de ZmXTH1, también en este caso se ha efectuado plasmolisis. Este experimento evidencia la ausencia de fluorescencia en el protoplasto en retracción, confirmando la localización apoplástica de ZmXTH1. Además, el seguimiento del proceso de plasmolisis indica que, a medida que el protoplasto plasmolizado se retira, la fluorescencia no queda retenida en la pared, sino que se expande por toda la región apoplástica, desde la pared hasta la membrana plasmática del protoplasto en progresiva retracción, ofreciendo una imagen de la distribución de la fluorescencia de la célula plasmolizada (fig.2.29) que parece complementar la imagen obtenida con las células control, en las que se observa la fluorescencia siempre limitada al protoplasto que gradualmente se aleja de la pared (fig.2.27).

En su conjunto, estas observaciones sugieren que ZmXTH1 es una proteína apoplástica no estrechamente asociada a la pared.

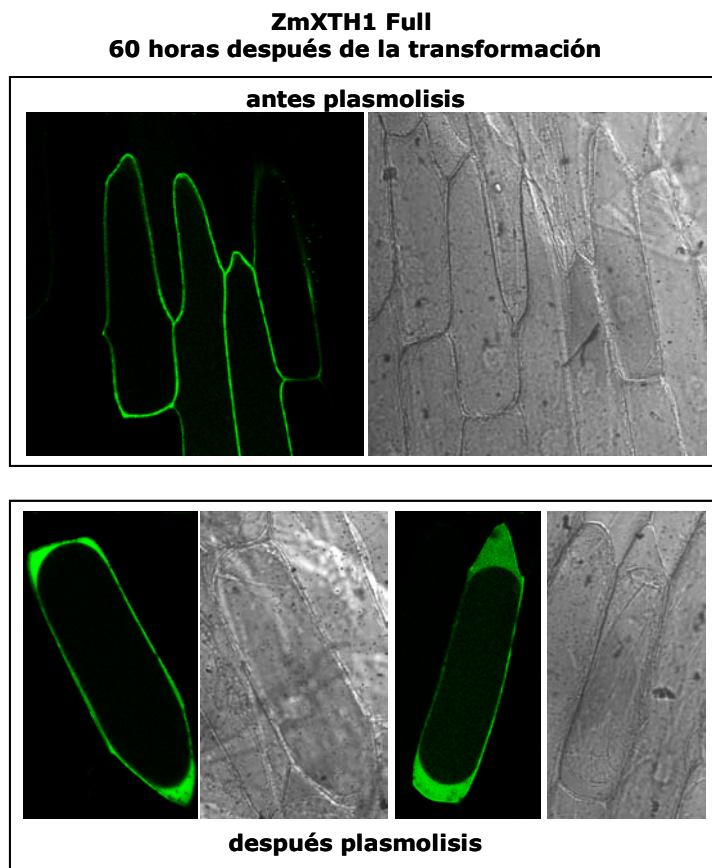


Fig. 2.29 Imágenes de fluorescencia y sus respectivas imágenes de transmisión de células de cebolla transformadas con ZmXTH1 Full mantenidas a pH 7, 60 horas después de la transformación. Respecto a la observación a 24 horas de la transformación, en este caso la fluorescencia está localizada exclusivamente en la pared, y no en la ruta de secreción. Además, a medida que el protoplasto se retrae después de la plasmolisis, la fluorescencia se expande en toda la zona entre la pared y la membrana plasmática.

2.4.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS APOPLÁSTICAS

ZmXTH1 es una proteína parcialmente soluble: de hecho, se detecta en los experimentos de *western blot* en el sobrenadante de extractos de proteínas totales. Este dato está en acuerdo con la naturaleza soluble de las fracciones celulares que presentan actividad XET (Fry et al., 1992), y sugiere que ZmXTH1 sea una proteína extracelular que mantiene una interacción débil con la pared. Sin embargo, la naturaleza soluble de ZmXTH1 no representa en sí la demostración de que esta proteína está localizada en pared con asociaciones débiles, de aquí su carácter soluble, sino sólo un indicio. De hecho, se ha demostrado la presencia de actividad XET en fracciones intraprotoplásmicas, lo que implica la necesidad de aplicar métodos de extracción selectivos para proteínas apoplasticas solubles, eliminando de esa manera el riesgo de contaminaciones citosólicas.

Para ello, se han extraído los fluidos apoplásticos de raíces de maíz de tres días con bajas concentraciones salinas, tal como se describe en el apartado 4.10.1.1. Los resultados obtenidos por *western blot* evidencian que, al menos en parte, ZmXTH1 se encuentra en fracciones apoplásticas extraídas con 200 mM KCl o bien con 50 mM MgCl₂ (fig.2.30) Este resultado sugiere una asociación débil de ZmXTH1 a la pared, como se ha propuesto para otras proteínas de pared extraídas con métodos similares (Zhu et al., 2006). Además, se ha ensayado también un tercer método de extracción con manitol 300 mM, sin añadir ninguna cantidad de sal. Se ha demostrado que este método de extracción es capaz de solubilizar proteínas localizadas en los espacios intercelulares que no presentan interacciones iónicas con la pared (Boudart et al., 2005). También en este caso, ha sido inmunoreconocida por *western blot* una banda correspondiente a ZmXTH1 (fig.2.30). ZmXTH1 está además presente en el extracto proteico total procedente de los tejidos después la extracción de los fluidos apoplásticos (en la fig. 2.30 se enseña sólo el extracto total de las muestras previamente extraídas con manitol, pero el mismo resultado se ha obtenido con los tejidos extraídos con MgCl₂ y KCl). Estos datos indican que ZmXTH1, al menos en parte, está localizada en el apoplasto y presenta una débil interacción con la pared. Sin embargo, debido al desigual contenido proteico de las muestras cargadas en los diferentes carriles del gel (los fluidos apoplásticos presentaban una concentración de proteínas muy inferior respecto a los extractos totales), no es posible efectuar ninguna valoración de tipo cuantitativo sobre el porcentaje de proteína presente en una fracción proteica apoplástica con respecto a la fracción proteica total.

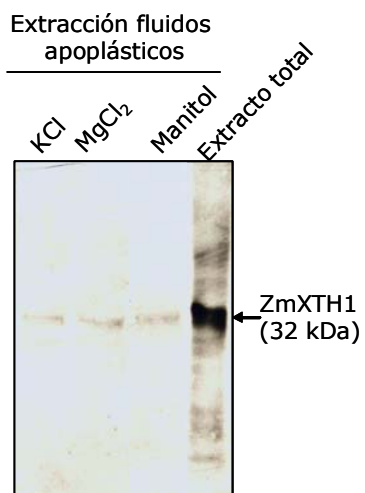


Fig.2.30. *Western blot* análisis de ZmXTH1 en fluidos apoplásticos extraídos de raíces de plántulas de maíz de 3 días. "extracto total" se refiere a las proteínas extraídas de las raíces después de la extracción con manitol

2.5 ESTUDIO FUNCIONAL DE ZmXTH1

2.5.1 OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE ARABIDOPSIS QUE SOBREENPRESAN ZmXTH1.

Los resultados anteriores llevan en su conjunto a sugerir que ZmXTH1 actúa en la pared celular modificando su estructura, sí como se ha demostrado por otras proteínas homólogas. Sin embargo, no hay evidencias directas sobre un posible papel en la pared de esta proteína. Por lo tanto, con la finalidad de investigar la función de ZmXTH1, se han producido plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan esta proteína. Para ello, la secuencia correspondiente al cDNA entero de ZmXTH1, que comprende las regiones 5' y 3' UTR y la región codificante, ha sido subclonada en una caja de expresión bajo el control del doble promotor constitutivo 35 S del virus del mosaico de la coliflor y su terminador (Fig. 2.31).



Fig.2.31. Esquema de la caja de expresión del cDNA ZmXTH1 bajo el doble promotor constitutivo 35 S

Se transformaron plantas de arabidopsis (Col 0) mediante la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Mediante selección en antibiótico, se seleccionaron las plantas resistentes y se obtuvieron un total de 54 plantas transformantes, de las cuales 4 líneas eran independientes homocigotas y con una sola copia del transgen, cuya presencia ha sido verificada por PCR.

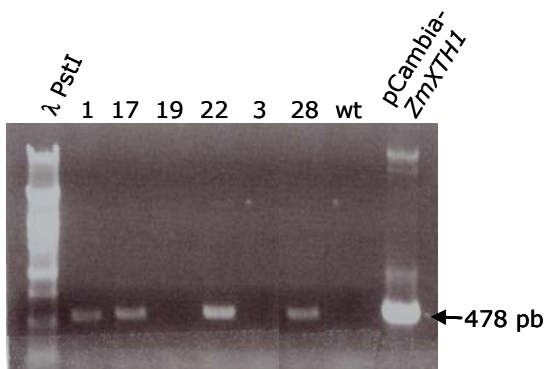


Fig. 2.32. PCR sobre DNA genómico de algunas líneas de las plantas de arabidopsis seleccionadas por resistencia a antibiótico. Para la PCR se utilizaron el oligonucleótido correspondiente a una secuencia del 3'UTR de ZmXTH1 como directo (3'UTR Fw), y el oligo del terminador del 35 S como reverso (Ter 35S). El fragmento a amplificado corresponde a la banda esperada de 478 pb.

Las plantas transgénicas presentan transcritos codificantes para ZmXTH1, como se muestra en los análisis *northern* (fig. 2.33A); los análisis *western* demuestran además en estas mismas plantas la presencia de la proteína ZmXTH1, identificable con una banda de 32 kDa presente sólo en los extractos proteicos de las plantas transgénicas y no en la planta silvestre (Col 0) (Fig2.33B). En este estudio, las líneas 1-4, 17-6 y 22-4 presentan altos niveles de expresión, mientras que la línea 28-4 presenta niveles muy bajos tanto de transcritos como de proteína ZmXTH1.

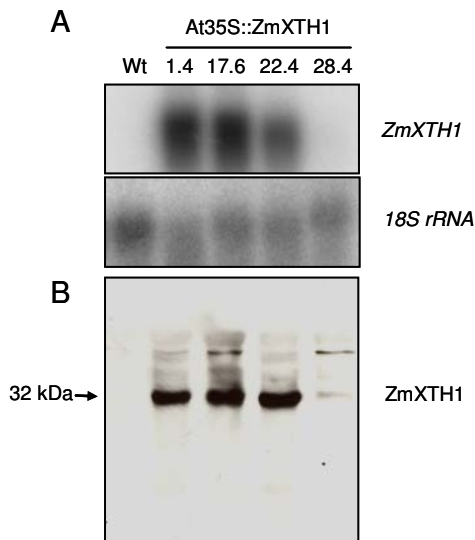


Fig. 2.33. Análisis *northern* (A) y *western* (B) de 4 líneas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan ZmXTH1, y la cepa silvestre Col 0 (wt). Para el *northern* se ha utilizado como sonda la región 3'UTR de ZmXTH1, mientras que el anticuerpo inmunopurificado anti ZmXTH1 se ha utilizado para el *western*.

2.5.2 ENSAYOS DE ACTIVIDAD XET SOBRE LAS PLANTAS DE ARABIDOPSIS QUE SOBREENPRESAN ZmXTH1

Una vez verificada la sobreexpresión de ZmXTH1 en *Arabidopsis*, se investigó si las plantas transgénicas presentaban un aumento en actividad XET.

Para ello, se efectuaron ensayos XET sobre extractos vegetales de las tres líneas transgénicas con alta expresión de ZmXTH1 y se compararon con la actividad XET de las plantas silvestres (Col0).

Como primera aproximación se ensayó la actividad XET desde 15 minutos hasta 1 hora utilizando extractos totales de plántulas de 8 días. Los resultados obtenidos demuestran que, tanto en las plantas transgénicas como en las silvestres, hay actividad XET que sigue una cinética lineal en función del tiempo; además, la comparación de los valores de radioactividad incorporada indica que no hay diferencias significativas de actividad XET entre las líneas sobreexpresantes y la línea silvestre (Fig.2.34).

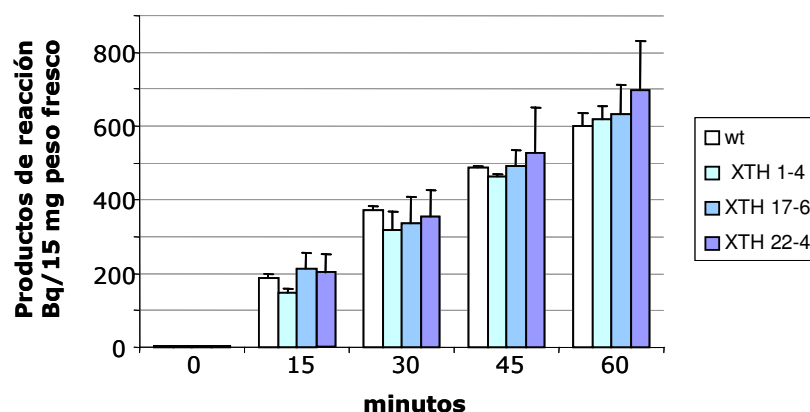


Fig. 2.34 Cinética de actividad XET de las líneas 1-4, 17-6 y 22-4 de plantas transgénicas de *arabidopsis* que sobreexpresan ZmXTH1 y plantas silvestres (wt).

La ausencia de una diferencia detectable de actividad XET en las plantas transgénicas respecto a las silvestres puede ser debida a la alta actividad XET endógena presente en *arabidopsis*, derivada de la presencia de 33 XTHs.

Por lo tanto, una segunda aproximación utilizada fue la de estudiar la actividad XET en regiones diferentes de plantas adultas, con la finalidad de encontrar zonas en las cuales la actividad endotransglucosilasa endógena fuera más baja y, por lo tanto, con más probabilidad de detectar un aumento de actividad en las plantas transgénicas. Se preparó extractos vegetales de flor, silicua, lamina foliar, pecíolo y tallo de plantas de 5 semanas de dos líneas transgénicas (XTH 17-6 y XTH 22-4) y de la línea silvestre (Col 0) y se ensayó la actividad XET durante 15 minutos. Los resultados (fig. 2.35) indican que hay una alta variabilidad en actividad específica también en plantas de la misma línea; esto puede ser debido al hecho de que, estando la actividad XET típicamente afectada por varios factores internos (estadio de desarrollo) y externos (factores ambientales) es suficiente una mínima diferencia en el estado de un determinado órgano entre dos plantas para determinar diferencias en actividad específica.

Estos ensayos indican que la lamina foliar y la flor son los órganos de *arabidopsis* con la menor actividad XET. Además, también en este caso no se detecta ningún aumento de actividad XET de las plantas transgénicas respecto a las silvestres.

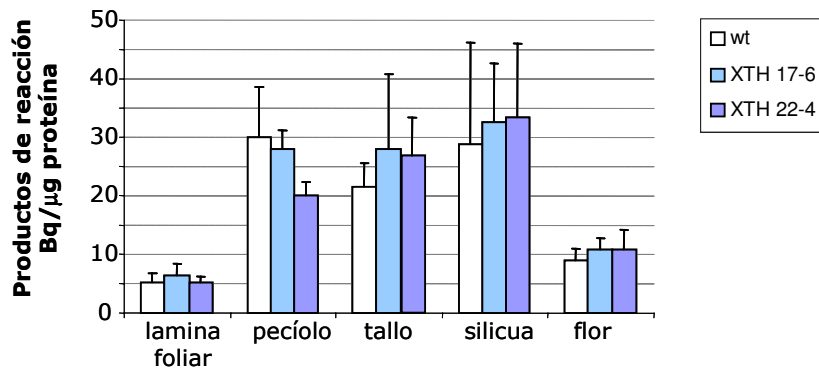


Fig. 2.35 Actividad XET de diferentes extractos de las líneas 17-6 y 22-4 de plantas transgénicas de arábidoopsis que sobreexpresan ZmXTH1 y plantas silvestres (wt)

En su conjunto, estos ensayos indican que las plantas transgénicas no presentan un aumento detectable de actividad XET respecto a las plantas silvestres. Eso puede ser debido a la alta actividad XET endógena presente en arábidoopsis, junto a la muy baja actividad XET que presenta ZmXTH1, como muestran los ensayos enzimáticos efectuados con la proteína recombinante producida en *P. pastoris*.

2.5.3 FENOTIPO DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS

A nivel macroscópico, las plantas transgénicas no presentan alteraciones significativas en la altura y desarrollo respecto a las silvestre. Sin embargo, las plantas transgénicas presentan algunas leves diferencias respecto a las silvestres: la roseta es más ancha y el tallo más grueso, sugiriendo un papel de ZmXTH1 (fig.2.36) en fenómenos de expansión celular.

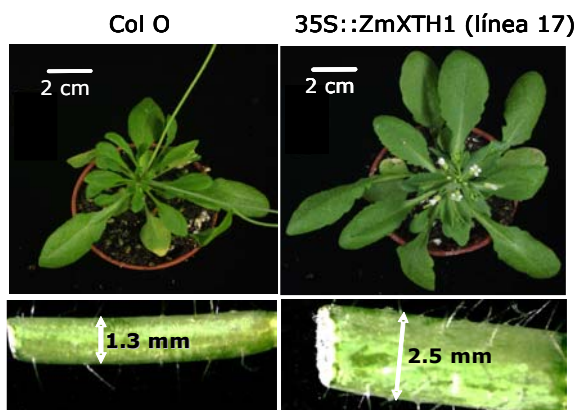


Fig. 2.36. Rosetas y tallos de plantas de arábidoopsis silvestres (col 0) y sobreexpresantes ZmXTH1

Para examinar más en detalle las células de las plantas transgénicas, se observaron por microscopía óptica secciones gruesas (200 μm) de tallo de plantas de 5 semanas, pero no fue posible evidenciar diferencias de las plantas transgénicas respecto a las silvestres. Una segunda aproximación fue la realización de un estudio más detallado mediante la producción de secciones ultrafinas (50 nm) que se analizaron por microscopía electrónica de transmisión. En este caso sí fue posible evidenciar unas claras alteraciones ultraestructurales a nivel de la pared celular. De hecho, la lamina media que cementa las células parenquimáticas del tallo de las plantas transgénicas es más ancha y menos compacta, y a consecuencia de eso la pared es más ancha entre dos células contiguas, con un asociado colapso de las paredes (Fig. 2.37). Eso podría explicar la presencia de un tallo más grueso de las plantas transgénicas.

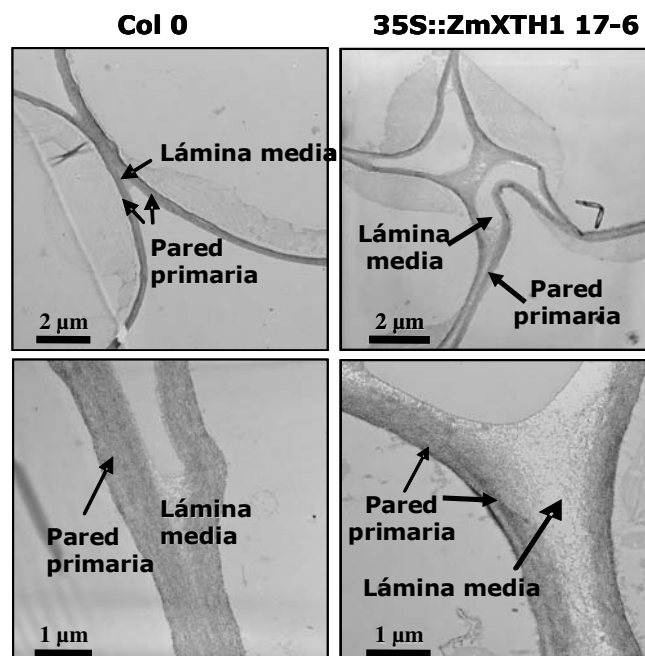


Fig. 2.37. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de tallos de plantas de arabisopsis silvestres (col 0) y sobreexpresantes ZmXTH1.

En conjunto, a pesar de su baja actividad enzimática XET, el análisis de las plantas transgénicas que sobreexpresan ZmXTH1, que presentan alteraciones a nivel de la pared celular primaria, permite sugerir un papel de ZmXTH1 en fenómenos de *wall loosening*.



3. DISCUSIÓN

3.1 ESTUDIO DE LA SECUENCIA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE ZmXTH1

En esta memoria se presenta la caracterización de una nueva xiloglucanoendotransglucosilasa-hidrolasa de maíz, denominada *ZmXTH1*. El cDNA que codifica *ZmXTH1* fue aislado mediante un cribado de una librería de expresión de cDNA de la zona de elongación de la raíz de maíz con anticuerpos producidos contra una fracción proteica enriquecida en proteínas de pared de maíz. El análisis de la secuencia aminoacídica de *ZmXTH1* reveló la presencia de todas las características típicas de esta clase de enzimas: un posible péptido señal N-terminal, necesario para la secreción de la proteína al apoplasto; un posible dominio catalítico homólogo al dominio de la β -glucanasa de la bacteria *Bacillus* (DEIDFEFLG); justo después del dominio catalítico existe un sitio de N-glicosilación; finalmente, en el dominio central hay cuatro cisteínas típicamente conservadas que son probablemente necesarias para la formación de puentes disulfuro necesarios para el correcto plegamiento de la proteína.

3.1.2 LAS XTHS DE MAÍZ PERTENECEN A FAMILIAS MULTIGÉNICAS

Hasta la fecha se ha caracterizado sólo una XTH en maíz, Zm1005, aunque no se ha demostrado su actividad enzimática (Saab and Sachs, 1996). Además, al inicio de este trabajo se conocía muy pocas secuencias XTHs de otras gramíneas. Eso era considerado consistente con el hecho de que en las monocotiledóneas gramíneas los sustratos de las XTHs, los xiloglucanos, son un componente minoritario de la pared, a diferencia de lo que ocurre en dicotiledóneas, en las cuales las XTHs pertenecen a grandes familias multigénicas. La búsqueda en base de datos de secuencias codificantes (ESTs) de maíz ha permitido la identificación de varias XTHs en esta especie. En particular, se han encontrado seis XTHs, cuya secuencia codificante estaba completa en el momento de la búsqueda, además de otras secuencias incompletas, que no fueron objeto de ulterior estudio. Por lo tanto, los datos bioinformáticos obtenidos en este trabajo apuntan a que en maíz las XTHs pertenecen a familias multigénicas, así como ocurre en dicotiledóneas, e indican que las XTHs probablemente tienen en las gramíneas un papel tan importante como en las dicotiledóneas. De hecho, datos recientes obtenidos en otras gramíneas como el arroz, cuya secuencia completa del genoma ha permitido la identificación de 29 XTHs putativas (Yokoyama et al, 2004), y cebada, en la que se han identificado 22 XTHs putativas (Strohmeier et al., 2004), están en línea con las

observaciones en maíz y permiten revisar una idea errónea según la cual, durante varios años, se había creído que las *XTHs* no tienen en monocotiledóneas con pared de tipo II un papel tan importante como en dicotiledóneas.

La próxima secuenciación del genoma de maíz, elucidará el número exacto de *XTHs*, pero de momento los datos de este trabajo permiten afirmar que es plausible que en maíz existan un mínimo de ocho *XTHs*.

3.1.3 ZmXTH1 PERTENECE A UN SUBGRUPO DE PROTEÍNAS ÁCIDAS DE GRAMÍNEAS

Para investigar la relación evolutiva entre ZmXTH1 y las otras *XTHs* descritas en varias especies vegetales se ha efectuado un estudio filogenético. La clasificación de *XTHs* en subgrupos filogenéticos es controvertida: algunos autores han clasificado las *XTHs* de diferentes especies en dos o tres subgrupos (Yokoyama et al., 2004), mientras que otros en cuatro subgrupos (Jan et al., 2004; Saladié et al., 2006; Divol et al., 2007). Según los resultados de nuestro árbol, derivado del alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de ZmXTH1, Zm1005, las otras *XTHs* de maíz identificadas en base de datos y otras *XTHs* tanto de monocotiledóneas como de dicotiledóneas, las *XTHs* se agrupan en cuatro subfamilias; la mayoría de las *XTHs* analizadas pertenecen a los subgrupos 1, 2 y 3, que corresponden a los subgrupos principales en los que están típicamente distribuidas estas proteínas. ZmXTH1 pertenece a un subgrupo minoritario, el 4, así como ZmXTH2, ZmXTH3 y ZmXTH7. Los análisis por *Southern* hechos con una sonda correspondiente al cDNA entero de *ZmXTH1* confirman la hipótesis de que en maíz existen al menos tres otras *XTHs* filogenéticamente cercanas a ZmXTH1. Una característica distintiva de esta subfamilia es que agrupa solo *XTHs* de monocotiledóneas gramíneas, que presentan una pared celular de tipo II, en la que los xiloglucanos son componentes minoritarios. Por lo tanto es plausible que esta subfamilia, que agrupa enzimas XTH sólo de especies en las que su sustrato típico no tiene un papel prioritario, pueda tener alguna base funcional todavía desconocida.

Además, todas las *XTHs* del subgrupo 4 presentan un punto isoeléctrico (pI) ácido. Esto es un carácter que las diferencia de la mayoría de las otras *XTHs* de este análisis filogenético y también del conjunto de las proteínas de pared que son típicamente básicas, como se ha mostrado en recientes análisis sobre el proteoma de pared de *Arabidopsis thaliana*: más del 60% de las proteínas de pared celular tienen un pI entre 8,0 y 12,9 (Jamet et al., 2006). Eso es consistente con la posible

interacción de estas proteínas, cargadas positivamente, con los residuos negativos del ácido galacturónico de las pectinas, que contribuyen de hecho a compartimentalizar el espacio apoplástico. En contra, el carácter ácido de las XTHs del subgrupo 4, que presentan una carga neta negativa o neutra a pH fisiológico de la pared (pI inferior a 6) implica el hecho que no sean posibles dichas interacciones con los residuos de ácido galacturónico, y eso es consistente con la idea que estas proteínas puedan fluir libremente en el espacio apoplástico. En línea con esta hipótesis, análisis proteómicos en *Arabidopsis* han evidenciado que la naturaleza ácida es una característica distintiva de proteínas apoplásticas débilmente asociadas a la pared (Jamet et al., 2006).

3.1.4 CARACTERÍSTICAS DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE ZmXTH1

La secuencia aminoacídica de ZmXTH1 muestra homología, y muchas secuencias conservadas, con el conjunto de las otras XTHs descritas. Además, hay algunas características peculiares en la secuencia que agrupan ZmXTH1 a las otras XTHs del subgrupo 4 y la diferencian de las XTHs que pertenecen a otros subgrupos filogenéticos. Una primera diferencia importante es a nivel del dominio catalítico: el dominio catalítico altamente conservado, (DEIDFEFLG), presenta en todas las XTHs del subgrupo 4 una sustitución en posición 8, de la leucina por una metionina. Esta característica ya había sido observada con la caracterización de OsXTH17 de arroz (Jan et al., 2004); sin embargo, en este caso no se consideraba ninguna XTH de maíz. Además, en el presente trabajo se ha mostrado otra sustitución en el dominio catalítico: la fenilalanina en posición 5 está sustituida por una metionina. Esta segunda modificación resulta ser aún más restrictiva, ya que es exclusiva de las XTHs de maíz del subgrupo 4. Estas observaciones sugieren la presencia de alguna relevancia funcional, todavía desconocida, para las sustituciones aminoacídicas conservadas en las XTHs del subgrupo 4, que por otro lado no ven afectados los residuos cruciales para la actividad. De hecho los dos residuos de glutamato (E) y el segundo aspartato (D) del dominio catalítico, que se han descrito como críticos para la actividad catalítica en *Bacillus* (Planas et al., 1992; Juncosa et al., 1994), están conservados en todas las secuencias de las XTHs analizadas en el alineamiento aminoacídico.

El hecho de que varias secuencias de otras gramíneas, como maíz, arroz y cebada, que pertenecen a otros subgrupos filogenéticos, presentan los típicos residuos en el dominio catalítico, excluye la posibilidad de que el significado funcional de estos cambios aminoacídicos resida en el hecho de que estas XTHs pertenezcan a

especies con diferentes disponibilidad de sustrato para estas enzimas, y remarca el interés en el estudio más profundo de las razones de la divergencia filogenética de las XTHs del pequeño subgrupo 4.

A parte del dominio catalítico, las XTHs del subgrupo 4 presentan otras características peculiares a nivel de la estructura primaria. Se han descrito en la secuencia de las XTHs dos residuos de tirosina posiblemente involucrados en el reconocimiento del sustrato (Van Sandt et al., 2006). En todas las secuencias del subgrupo 4, uno de estos dos residuos está modificado por una histidina. Asimismo, de los tres residuos aminoacídicos del acceptor binding loop responsables de la unión al xiloglucano (Kallas et al., 2005; Van Sandt et al., 2006), sólo uno, el residuo de triptofano, está conservado en las XTHs del subgrupo 4. Finalmente, ninguna de las XTHs presenta en determinadas posiciones conservadas anteriormente descritas (Kallas et al., 2005; Van Sandt et al., 2006) unos residuos ácidos o básicos responsables de la posible formación de puentes salinos y de la consiguiente estabilización de la estructura terciaria de la proteína.

En su conjunto, las características que se han puesto en evidencia para las XTHs del subgrupo 4, como (i) el hecho que provienen todas de monocotiledóneas gramíneas, (ii) presentan todas un punto isoeléctrico ácido, y (iii) con determinadas sustituciones aminoacídicas en la estructura primaria de la proteína, dejan suponer que la divergencia evolutiva de estas proteínas refleja alguna relevancia funcional específica de este subgrupo.

3.2 CARACTERIZACIÓN DE ZmXTH1 EN MAÍZ A TRAVÉS DE SU PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA

Los estudios de expresión espacial y temporal efectuados con las XTHs de las familias multigénicas de arábido (*Arabidopsis*) (Becnel et al., 2006) y arroz (*Oryza sativa*) (Yokoyama et al., 2004) han evidenciado que estas proteínas están ampliamente expresadas en todos los estadios de desarrollo y en todos los órganos de la planta. De manera similar, la existencia de una familia multigénica de XTHs de maíz sugiere que los miembros individuales de esta familia exhiben patrones de expresión distintos.

De hecho, el conjunto de las XTHs de maíz analizadas se expresan tanto en hoja como en raíz de maíz desde los 3 hasta los 20 días, sugiriendo que en maíz, así como ocurre en otras especies vegetales, estas proteínas contribuyen a fenómenos morfogénicos en todo el ciclo vital de la planta. Además, la expresión diferencial de algunas XTHs sugiere que estas proteínas hayan diversificado evolutivamente su

función, como por ejemplo las *XTHs* del subgrupo 2, expresadas mayoritariamente en hoja, mientras que las *XTHs* de los subgrupos 1 y 4 parecen tener una expresión más ubicuitaria, aunque hay una ligera expresión preferencial en raíz de las *XTHs* del subgrupo 4.

Los datos obtenidos también sugieren que la expresión diferencial no se lleva a cabo sólo entre proteínas filogenéticamente distantes, sino también en el interior del mismo subgrupo filogenético, como es el caso del subgrupo 2, en el que la expresión de *ZmXTH4*, *ZmXTH5* y *Zm1005* se complementan en la hoja a lo largo del desarrollo. Se ha descrito que cuatro *XTHs* de *Arabidopsis* filogenéticamente relacionadas están expresadas de manera preferente en raíz, pero sus perfiles de expresión tejido-específicos indican una especialización regional en el interior de este órgano (Vissenberg et al., 2005); de manera análoga, nuestros resultados sugieren que las *XTHs* del subgrupo 2 han diversificado y especializado su expresión de manera temporal en la hoja. La observación de los patrones de expresión de las *XTHs* de maíz sugiere también que las *XTHs* del subgrupo 2 tienen una expresión más limitada, y deja suponer que para estas *XTHs* exista alguna estimulación, como ya se ha observado para *Zm1005* (Saab and Sachs, 1996). Esto estaría en acuerdo con el hecho de que las *XTHs* del subgrupo 2 están típicamente reguladas por estímulos ambientales u hormonales (Catalá et al., 2001).

En el caso del subgrupo 4, se observa un solapamiento de la expresión en raíz de *ZmXTH1* y *ZmXTH2*. Una situación análoga ya se ha descrito para otras *XTHs*, y abre la pregunta de si cada uno de estos genes con expresión solapada y cercanía evolutiva, como es el caso de *ZmXTH1* y *ZmXTH2*, tienen un papel particular, o si al revés son funcionalmente redundantes (Vissenberg et al., 2005; Becnel et al., 2006).

El estudio del patrón de expresión de *ZmXTH1* se llevó a cabo de manera más detallada, subdividiendo la parte aérea y la raíz de la planta en diferentes zonas. Los resultados indican que, aunque su expresión sea preferencial en raíz, *ZmXTH1* no se expresa de manera homogénea en este órgano: la presencia de transcritos es mayoritaria en zona de elongación, lo que está en acuerdo con el hecho de que su cDNA fue aislado a partir de una librería de la región de elongación de la raíz de maíz. Además, trabajos anteriores en esta zona de la raíz de maíz han detectado una alta actividad XET (Vissenberg et al., 2003), dejando suponer que parte de la actividad detectada sea debida a *ZmXTH1*, que por lo tanto actuaría como xiloglucano-endotransglucosilasa.

Debido a que la expresión de muchas *XTHs* descritas resultan estar reguladas por diversos estímulos, tanto bióticos como abióticos (Campbell and Braam, 1999a; Rose et al., 2002), se ensayó el posible efecto sobre la expresión de *ZmXTH1* de

algunos estímulos ambientales, incluida la herida, el estrés salino, la sequía, el estrés osmótico y hormonas como el metiljasmonato. La expresión de *ZmXTH1* no resulta estar modificada por ninguno de estos estímulos. Contrariamente, su expresión está inducida por giberelinas. Ya se ha demostrado para otras XTHs la regulación a nivel transcripcional por estas hormonas; sin embargo, el mecanismo de esta regulación no está claro (Uozu et al., 2000; Jan et al., 2004). Las giberelinas regulan la elongación en varias plantas, y se ha propuesto para estas hormonas un efecto en la extensibilidad de la pared, y también en fenómenos de relajación de la pared (Cosgrove and Sovonick-Dunford, 1989). Se ha demostrado un importante papel de las giberelinas en la elongación de los internodos, especialmente en la activación de la división celular y de la elongación (Kamijima, 1981). Además, se ha propuesto un papel de estas hormonas para estimular la elongación de la hoja a través de la acción de varias XTHs (Smith et al., 1996; Schunmann et al., 1997; Jan et al., 2004) Estos datos sugieren que, de manera similar, *ZmXTH1* actúa en respuesta a giberelinas alterando la estructura de la pared celular y favoreciendo de esa manera la elongación de la hoja.

La misma regulación por giberelinas se ha descrito para otras XTHs del subgrupo 4 cuales *OsXTH17* de arroz (Jan et al., 2004). y *HvPM2* y *HvPM5* de cebada (Smith et al., 1996; Schunmann et al., 1997). Por lo tanto, se investigó si esta regulación pudiera ser una característica de las XTHs de este subgrupo filogenético.

El hecho de que *ZmXTH2* y *ZmXTH3*, también del subgrupo 4, no estén reguladas por estas hormonas, indica que esa no es una característica de las XTHs de este subgrupo.

En nuestras condiciones experimentales, las plantas crecidas en tierra presentan una significativa reducción de la relación de la biomasa hoja/raíz, respecto a las plantas crecidas en condiciones hidropónicas. Una posible explicación es la reducida disponibilidad de oxígeno a la que están sometidas las raíces de las plantas crecidas en condiciones hidropónicas, y la consecuente reducción del crecimiento de sus raíces respecto al crecimiento en tierra (Drew, 1997; Verslues et al., 1998). Además, en condiciones hidropónicas toda la superficie de las raíces está en contacto con el agua (Verslues et al., 1998), mientras que las plantas crecidas en tierra necesitan expandir el sistema radical para absorber agua desde el suelo (Sharp and Davies, 1989). Nuestros datos indican que la expresión génica de *ZmXTH1* varía según las condiciones de crecimiento. Las raíces de plantas crecidas en tierra presentan unos niveles de expresión de *ZmXTH1* más altos respecto a las raíces crecidas en condiciones hidropónicas. Eso concuerda con estudios que han demostrado un aumento de actividad XET en raíces de maíz crecidas en condiciones limitantes de agua (Wu et al., 1994). Finalmente, la reducida relación de biomasa

hoja/raíz en plantas crecidas en tierra podría también ser debida a una relativa reducción del crecimiento de la hoja. De hecho, se ha demostrado que en condiciones limitantes de agua, el desarrollo del sistema radical está normalmente menos inhibido que el crecimiento del tallo, e incluso puede hasta ser estimulado (Sharp and Davies, 1989). Esos resultados sugieren una función de *ZmXTH1* en fenómenos de crecimiento, y eso concuerda por otro lado con la inducción por giberelinas, hormonas relacionadas con la elongación. Además, el patrón de expresión de *ZmXTH1* en los diferentes estadios de desarrollo también concuerda con un posible papel en mecanismos de elongación celular. De hecho, su expresión es más alta en órganos de plantas jóvenes, que están sometidas a crecimiento activo, y disminuye en órganos maduros. En su conjunto, los estudios de expresión apoyan la hipótesis de que la función de *ZmXTH1* esté relacionada con fenómenos de crecimiento y elongación.

3.3 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE *ZmXTH1*

Para abordar la caracterización enzimática de *ZmXTH1* se han utilizado diferentes sistemas de producción heteróloga. El primer sistema ha sido la bacteria *E.coli*, que representa uno de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes más ampliamente utilizados, debido a la gran disponibilidad de herramientas de genética molecular y al extenso conocimiento sobre su fisiología, vectores de expresión y sobre los métodos de sobreexpresión de proteínas en este sistema. Sin embargo, siendo un procariota, *E.coli* no realiza procesamientos post-traduccionales. Esto puede constituir un problema para la actividad de determinadas proteínas; en particular, se ha demostrado que la N-glicosilación puede afectar la actividad XET de determinadas XTHs, aunque no todas (Campbell and Braam, 1998; 1999a; Van Sandt et al., 2006). Por ello, se ha sobreexpresado *ZmXTH1* también en un sistema heterólogo eucariota, la levadura *P.pastoris*, ya utilizada con éxito para la sobreexpresión de otras XTHs (Catalá et al., 2001; Henriksson et al., 2003; Kallas et al., 2005; Saladié et al., 2006; Van Sandt et al., 2006). La proteína madura expresada en *E.coli*, *ZmXTH1*, se puede identificar tanto por tinción de Coomassie como por *western blot* como una única banda de alrededor de 30 kDa, de peso molecular similar al teórico, teniendo en cuenta la presencia de una cola de histidinas. Un peso similar presenta la banda principal inmuno-reconocida de *ZmXTH1* expresada en levadura; sin embargo, en este caso también están presentes otras bandas, de 31 kDa, 35 kDa, y 64 kDa. Mientras que esta última banda podría corresponder por su tamaño a un dímero de *ZmXTH1*, las otras bandas de peso superior a 30 kDa podrían representar modificaciones post-traduccionales de la proteína, como la N-glicosilación. En este sentido, ensayos de

deglicosilación (Van Sandt et al., 2006; Kallas et al., 2005) y la secuenciación (Kallas et al., 2005) de las bandas múltiples derivadas de la expresión en *P.pastoris* de otras dos XTHs han demostrado que efectivamente en este caso la presencia de múltiples bandas es debida a la glicosilación, y apoya la hipótesis de una glicosilación de la proteína recombinante ZmXTH1 expresada en *P.pastoris*. Sin embargo, serian necesarios ensayos de deglicosilación sobre los extractos proteicos de *P.pastoris* que sobreexpresan ZmXTH1 para confirmar esta hipótesis.

Además, ZmXTH1 es inmuno-reconocida en maíz como una proteína de 32 kDa, con un peso molecular más alto del peso teórico, de 30 kDa; esa diferencia podría ser debida a la presencia de glicosilación.

3.3.1 ZmXTH1 PRESENTA ACTIVIDAD XET

Los ensayos de actividad XET efectuados con la proteína recombinante ZmXTH1 expresada en levadura han revelado que ZmXTH1 presenta actividad XET. Esta actividad resulta ser muy baja, sobretodo si se considera que el tipo de ensayo utilizado es muy sensible, siendo utilizado con éxito con una amplia gama de extractos de dicotiledóneas, monocotiledóneas y briofitas (Fry et al., 1992). Sin embargo, la proteína expresada en *E.coli* no presenta ninguna actividad XET; este resultado puede ser debido a la falta de modificaciones post-traduccionales; aún así, no se puede excluir que esto sea debido a un plegamiento incorrecto de la proteína durante el proceso de renaturalización.

De igual manera, la baja actividad XET observada para la proteína expresada en levadura podría ser una característica exclusiva y peculiar de las XTHs del subgrupo 4. De hecho, hace falta remarcar que ZmXTH1 es la primera XTH del subgrupo 4 de la que se ha ensayado actividad XET. En este contexto, el dominio catalítico peculiar para las XTHs de este subgrupo así como las otras características peculiares evidenciadas en la estructura primaria podrían jugar un papel importante en su actividad enzimática.

Además, la falta de información sobre la actividad enzimática no es sólo para las XTHs del subgrupo 4, sino también para el conjunto de XTHs que presentan una pared de tipo II. La única XTH de gramínea para la cual se ha ensayado actividad XET hasta la fecha, HvEXGT de cebada, perteneciente al subgrupo 1, posee una muy baja actividad XET cuando es expresada en *E.coli* (Schunman et al., 1997).

Como han propuesto Yokoyama y col. (2004), una hipótesis atractiva para explicar la existencia de familias multigénicas de XTHs en gramíneas es que estas enzimas podrían presentar una especificidad de sustrato diferente, catalizando la transglicosilación de polisacáridos diferentes de los xiloglucanos. Esta hipótesis está apoyada por predicciones estructurales que han establecido una correlación entre

las XTHs y algunas enzimas involucradas en el metabolismo de otros polisacáridos de la pared, como las xilano-endohidrolasas y las β -glucano endohidrolasas (Strohmeier et al., 2004). Sin embargo, los mismos autores observan como hasta la fecha no hay informaciones sobre la posibilidad de una actividad endotransglicosilasa con sustratos diferentes de los xiloglucanos para las XTHs de gramíneas (Yokoyama et al., 2004). Asimismo, otros autores han remarcado la falta de conocimiento y la consiguiente necesidad de abordar un estudio de las características enzimáticas de XTHs que presentan dominios catalíticos atípicos (Van Sandt et al. 2007). En consecuencia, las características atípicas del dominio catalítico de ZmXTH1 y su baja actividad XET la hacen un candidato ideal para poseer una especificidad de sustrato diferente de los xiloglucanos. Al fin de detectar otras posibles actividades endotransglicosilasa, además del xiloglucano, se han ensayado con ZmXTH1 19 sustratos donadores diferentes del xiloglucano, en combinación con 10 sustratos aceptores diferentes. Los resultados obtenidos indican que el único sustrato donador para ZmXTH1 son los xiloglucanos, respecto a todos los demás sustratos ensayados, incluido el liquenano, un polisacárido estructuralmente muy similar a los β -glucanos de las gramíneas. También se ha ensayado la actividad de ZmXTH1 sobre extractos de hemicelulosas de suspensiones celulares de maíz, que se supone puedan contener cualquier significativo sustrato donador localizado en pared. Además, ensayos endo-hidrolasa (XEH) preliminares sugieren que ZmXTH1 no tiene esta actividad enzimática. Por lo tanto, aunque ZmXTH1 posee una actividad xiloglucano endotransglucosilasa muy baja, y un dominio catalítico atípico, esta actividad resulta ser la única actividad de esta enzima, aun teniendo en cuenta el hecho de que su sustrato no es mayoritario en maíz.

3.4 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE ZmXTH1

3.4.1 ZmXTH1 SE LOCALIZA EN LA PARED CELULAR EN CÉLULAS DE CEBOLLA

El interés en el estudio de la localización subcelular de ZmXTH1 deriva del hecho que, aunque las XTHs sean típicamente definidas "proteínas de pared", en realidad hay muy pocas evidencias experimentales que aporten informaciones tanto sobre su localización en pared, como sobre su sistema de secreción. De hecho, varios autores han remarcado el interés que constituye el estudio del sistema de secreción de estas proteínas, para las cuales se ha propuesto la presencia de algún mecanismo específico de regulación tanto de su localización como de su tráfico

(Johansen et al., 2006; Yokoyama and Nishitani, 2001; Hetherington and Fry, 1993; Barrachina and Lorences, 1998).

Los experimentos de localización subcelular por fusión de ZmXTH1 a GFP indican que el péptido señal de ZmXTH1 es funcional y sirve para dirigir la proteína en la ruta de secreción hacia el apoplasto a través del retículo endoplásmico. De hecho, tanto la proteína entera ZmXTH1 como el péptido señal fusionados a GFP pueden visualizarse en el retículo endoplásmico.

Los ensayos de plasmolisis, efectuados en las condiciones experimentales que son habituales para este tipo de experimentos (a pH 5,8), no permiten detectar la proteína en la pared celular. En este sentido, otros autores han obtenido resultados similares con una XTH fusionada a GFP y retenida en el retículo endoplásmico de células de tabaco transformadas (Yokoyama and Nishitani, 2001b). Los autores explican estos resultados con la hipótesis de que exista un fino mecanismo de regulación de la compartimentalización de estas enzimas, como también ha sido sugerido por otros autores (Johansen et al., 2006; Hetherington and Fry, 1993).

No obstante, cabe destacar que se ha descrito que la GFP puede ser inestable al pH ácido de la pared y por lo tanto, en experimentos análogos al nuestro (utilizando otras proteínas de pared) se ha variado el pH del medio de incubación de la cebolla, subiéndolo de 5,8 a 7, para que la proteína fluorescente pudiera estar en un ambiente más adecuado (Scott et al., 1999). Un ejemplo de ello es la proteína rica en glicina AtGRP9 de arabis que se visualiza en pared en células de cebolla plasmolizadas a pH 7, pero no a pH 5,8 (Chen et al., 2007). De manera similar, ZmXTH1 se puede detectar en la pared celular en estas nuevas condiciones. Además, la proteína se detecta también en el protoplasto de las células plasmolizadas, y en los filamentos de Hectian, unas estructuras típicas derivadas de la membrana plasmática que mantienen continuidad con la pared de células plasmolizadas (Oparka et al., 1994). Por lo tanto, en este trabajo se ha demostrado tanto la localización en pared de ZmXTH1, como la funcionalidad de su péptido señal.

Ya se ha demostrado la funcionalidad del péptido señal de otras XTHs expresadas en sistemas heterólogos como levadura e insectos (Saladié et al., 2006; Campbell and Braam, 1998, 1999b). Sin embargo, en estos casos la funcionalidad del péptido se demuestra únicamente con la presencia de la proteína en un medio de cultivo. Otro trabajo ha demostrado la funcionalidad de un péptido señal de una XTH para dirigir la proteína en la ruta de secreción hacia el apoplasto a través del retículo endoplásmico; sin embargo, en este caso no se ha demostrado la presencia de la proteína en pared (Yokoyama and Nishitani, 2001b). En contraposición, en este

trabajo se ha demostrado la funcionalidad de un péptido señal de una XTH para que ésta se localice en la pared celular.

Además, el seguimiento de la localización de ZmXTH1 hasta 60 horas después del bombardeo demostró como la proteína en este tiempo ha completado su secreción, ya que está localizada enteramente en la pared, a diferencia de lo que ocurre después de 24 horas del bombardeo, cuando la proteína después de la plasmolisis es visible tanto en el protoplasto como en la pared. Finalmente, los experimentos de plasmolisis evidencian que, a medida que el protoplasto se retrae de la pared después del choque osmótico, la fluorescencia no se queda localizada sólo en la pared, sino que se expande en toda la región del apoplasto. Este resultado permite sugerir que ZmXTH1 esté sólo débilmente asociada a la pared y concuerda con la naturaleza soluble de ZmXTH1 y con el punto isoeléctrico ácido, característica de proteínas asociadas sólo débilmente a la pared celular (Jamet et al., 2006).

3.4.2 ZmXTH1 SE LOCALIZA EN EL APOPLASTO EN MAÍZ

Otra aproximación empleada para profundizar en el estudio de la localización subcelular de ZmXTH1 ha sido la extracción diferencial de fluidos apoplásticos de maíz. Las características variables del conjunto de las proteínas apoplásticas, que mantienen asociaciones diferentes con la pared (siendo algunas insolubles y de difícil extracción y otras solubles y de fácil extracción) implican la necesidad de la aplicación de métodos específicos de extracción, ya que no existe un método general de extracción de proteínas apoplásticas (Lee et al., 2004). La naturaleza soluble de ZmXTH1, demostrada por su presencia en fracciones proteicas totales, no aporta ninguna información sobre su posible localización en pared, pero representa un indicio de que ZmXTH1 podría estar, al menos en parte, presente en el espacio extracelular con una débil asociación con la pared celular. Esta hipótesis está apoyada por los análisis proteómicos de *Arabidopsis*, que identifican en proteínas con punto isoeléctrico ácido y extraíbles con tampones a baja fuerza iónica una fracción de proteínas apoplásticas con baja (Jamet et al., 2006) o incluso ninguna asociación con la pared, en el caso de extracción sin sal, por simple infiltración (Boudart et al., 2005). El carácter soluble de ZmXTH1, y su punto isoeléctrico ácido, característica no típica de las proteínas de pared, apoyan la idea de que esta proteína pertenezca a un grupo de proteínas que mantiene una débil interacción con la pared en maíz. Los resultados obtenidos con métodos no destructivos de extracción de proteínas apoplásticas demuestran que ZmXTH1 está presente en el apoplasto; además, el hecho de que la proteína se pueda extraer con tampones con baja o ninguna concentración salina, confirma la hipótesis de que

ZmXTH1 mantiene muy débil o ninguna asociación con la pared celular, y está además en acuerdo con los resultados obtenidos por microscopia confocal. Por otro lado, este resultado no puede excluir que la proteína se encuentre también en compartimentos celulares diferentes. De hecho ZmXTH1 se detecta también en la fracción insoluble de extractos celulares, tanto de raíz como de hoja. Una hipótesis atractiva es que exista un control de la compartimentalización de este enzima. De hecho, las evidencias aportadas por otros autores de actividad XET en fracciones tanto solubles como insolubles, tanto intraprotoplásmicas como extraprotoplásmicas sugieren la existencia de algún mecanismo de control de la localización de estas enzimas (Pritchard et al., 1993; Hetherington and Fry, 1993; Potter and Fry, 1994).

En su conjunto, (i) la localización subcelular en cebolla, (ii) la presencia en fluidos apoplásticos de maíz y (iii) el punto isoeléctrico ácido, concuerdan y apoyan la idea de que ZmXTH1 es una proteína extracelular con débil interacción con la pared celular en maíz.

3.5 ESTUDIOS FUNCIONALES

3.5.1 ZmXTH1 AFECTA LA PARED CELULAR EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE ARABIDOPSIS

Finalmente, para profundizar sobre la posible función de ZmXTH1, se ha sobreexpresado dicha proteína en un sistema heterólogo vegetal, la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. La elección de este sistema de sobreexpresión, ampliamente utilizado en biología molecular vegetal, deriva de su profundo conocimiento y de la relativa rapidez de su manipulación respecto a los tiempos necesarios para un estudio en maíz. Además de eso, por un lado se ha considerado interesante valorar el posible efecto en arabisopsis de ZmXTH1, que contiene características peculiares no descritas para XTHs de dicotiledóneas. Por otro lado, aun teniendo en cuenta que el maíz presenta una pared celular diferente de la de arabisopsis, se ha considerado que este sistema podría aportar informaciones sobre la posible función de esta proteína, de la cual se ha demostrado que no presenta como sustratos preferentes otros polisacáridos mayoritarios en maíz. La expresión de ZmXTH1 en arabisopsis ha sido comprobada por experimentos de *northern* y *western blot*. Sin embargo, las plantas transgénicas no muestran un aumento en los niveles de actividad XET, de manera similar a lo que ocurre con la inducción específica de la XTH1 de apio por infestación por áfidos (Divol et al., 2007). Esto puede ser explicado por la alta actividad XET endógena presente en arabisopsis, que deriva

de 33 XTHs, junto con la muy baja actividad XET demostrada para la proteína recombinante ZmXTH1 expresada en levadura. De hecho, el fenotipo de las plantas transgénicas deja suponer una relevancia funcional de la sobreexpresión de ZmXTH1 en *Arabidopsis*. Las plantas transgénicas, aun no presentando particulares alteraciones a nivel morfológicos y de desarrollo, muestran una roseta más ancha y un tallo más grueso, caracteres que dejan suponer una función de ZmXTH1 en fenómenos de expansión celular, como se ha observado para la BcXTH1 de *Brassica campestris* expresada en *Arabidopsis* (Shin et al., 2006). Además, la observación por microscopia electrónica de los tallos de las plantas transgénicas revela la presencia de alteraciones a nivel de las paredes celulares, que en diferentes casos presentan un aspecto más colapsado, y un engrosamiento de la región de la lamina media. Estos resultados permiten sugerir que ZmXTH1 podría estar alterando la morfología de las paredes a través de una actividad XET activa sobretodo para la incorporación de xiloglucanos en la pared, durante su biogénesis (actividad XET "Integracional"). En este caso, durante la movilización en la pared de xiloglucanos necesarios para su ensamblaje, una alterada actividad XET provocaría que las cadenas de xiloglucanos nacientes pudieran ser prematuramente asociadas entre ellas, más que a los xiloglucanos preexistentes en la pared. De esa manera, el efecto final sería en aflojamiento de la pared, así como se observa por microscopia electrónica. Un efecto similar se ha descrito para la XTH MER15 de *Arabidopsis* (Verica and Medford, 1997). En tal contexto, sería interesante estudiar la composición de las paredes de las células de las plantas transgénicas, y en particular valorar el peso molecular de los xiloglucanos, que podría ser diferente en las plantas transgénicas, como ya se ha observado en plantas transgénicas de tabaco antisentido para una XTH (Herbers et al., 2001) y en suspensiones celulares con una actividad XET alterada (Alonso-Simón et al., 2007).

Además, no se puede excluir que las modificaciones provocadas por la sobreexpresión de ZmXTH1 favorezcan el acceso de otros agentes del *wall loosening* en la pared celular de *Arabidopsis*, tal como se ha considerado en otros análisis de plantas transgénicas sobreexpresantes un agente del *wall loosening* (Verica and Medford 1997; Rochange et al., 2001). En tal contexto, se puede sugerir que ZmXTH1 provoque unas modificaciones que a su vez favorezcan el acceso de otros enzimas de la pared de las plantas transgénicas de *Arabidopsis*.

En conclusión, en este trabajo se ha caracterizado la primera XTH de maíz que pertenece a un subgrupo filogenético divergente, el subgrupo 4, que agrupa sólo

XTHs de gramíneas. Tanto el análisis de expresión de ZmXTH1, como su caracterización enzimática, su localización subcelular y su expresión ectópica en arabidopsis permiten sugerir un papel de ZmXTH1 en modificaciones de la pared celular similares a las modificaciones operadas por otras XTHs. Además, su dominio catalítico atípico, su punto isoeléctrico ácido, y su baja actividad XET, permiten sugerir la existencia de características particulares de las XTHs del subgrupo 4, todas pertenecientes a especies que presentan una pared celular en la cual los xiloglucanos son una componente minoritaria.

CONCLUSIONES

1. En esta memoria se presenta la caracterización de una nueva xiloglucano endotransglucosilasa-hidrolasa de maíz, denominada *ZmXTH1*, cuyo clon de cDNA fue aislado mediante un cribado de una librería de expresión de cDNA de la zona de elongación de la raíz con anticuerpos contra una fracción proteica enriquecida en proteínas de pared de maíz. El análisis de la secuencia aminoacídica de *ZmXTH1* reveló la presencia de todas las características típicas de esta clase de enzimas.
2. La búsqueda en base de datos de otras secuencias codificantes (ESTs) de maíz ha permitido la identificación de varias XTHs putativas en esta especie. En maíz, por lo tanto, las XTHs pertenecen a familias multigénicas, así como ocurre en dicotiledóneas y en otras monocotiledóneas gramíneas como arroz y cebada. Este dato sugiere que las XTHs de gramíneas tienen un papel tan importante como en las dicotiledóneas. Esto es un aspecto interesante ya que en gramíneas los sustratos de estas enzimas, los xiloglucanos, representan un componente minoritario de la pared celular.
3. El estudio filogenético de *ZmXTH1* revela que esta proteína pertenece a un subgrupo filogenético minoritario, el subgrupo 4, que agrupa sólo XTHs de gramíneas. Los componentes de este subgrupo presentan algunas características peculiares a nivel de estructura aminoacídica, como el dominio catalítico. Finalmente, todas las XTHs de este subgrupo filogenético tienen un punto isoeléctrico ácido, característica de proteínas débilmente asociadas a la pared. Estas evidencias configuran al pequeño subgrupo 4 como un subgrupo filogenético atípico, alejándose del conjunto de las XTHs ya descritas en otros subgrupos filogenéticos.
4. Los estudios de expresión espacial y temporal efectuados con las XTHs de la familia multigénica de maíz indican que, así como se ha demostrado para otras familias multigénicas de XTHs, los miembros de esta familia exhiben patrones de expresión distintos y están ampliamente expresados en todos los estadios de desarrollo y en todos los órganos de la planta. Esto sugiere

que en maíz, así como sucede en otras especies vegetales, estas proteínas participan en fenómenos morfo-genéticos en todo el ciclo vital de la planta.

5. La expresión preferencial de *ZmXTH1* en órganos de plantas jóvenes, en activa elongación y crecimiento, así como su inducción por giberelinas apoya la hipótesis de que la función de *ZmXTH1* está relacionada con fenómenos de crecimiento y elongación.
6. La caracterización enzimática de la proteína recombinante *ZmXTH1* indica que esta proteína actúa como una xiloglucanoendotransglucosilasa, ya que presenta actividad enzimática XET. Además, la actividad XET resulta ser la única actividad que presenta esta proteína, ya que no presenta afinidad para otros sustratos diferentes del xiloglucano, incluidos sustratos que son componentes mayoritarios de la pared celular de maíz.
7. Los estudios de localización subcelular indican que el péptido señal de *ZmXTH1* es funcional, ya que dirige la proteína a la ruta de secreción para enviarla al apoplasto. Se ha demostrado la localización de *ZmXTH1* en pared en el sistema heterólogo de cebolla. Además su presencia en los fluidos apoplásticos de maíz, junto con los ensayos de plasmolisis de cebolla sugieren que *ZmXTH1* es una proteína apoplástica débilmente asociada a la pared celular.
8. Los análisis funcionales de *ZmXTH1*, mediante su expresión en *Arabidopsis thaliana*, indican que *ZmXTH1* actúa en la pared celular, ya que las plantas transgénicas presentan alteraciones a nivel de la pared celular primaria y de la lamina media.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

4.1.1 MAÍZ

Se han utilizado plantas de *Zea mays* de la variedad W64+/+. Las condiciones de crecimiento de las plántulas han sido dos: en el invernadero (para el crecimiento en tierra), o bien en rollo de papel en cámara de germinación (para el crecimiento en cultivo hidropónico), con un fotoperíodo de 16 h luz a 28°C/8 h de oscuridad a 26°C y una humedad del 60%. Las semillas germinadas en cultivo hidropónico fueron sometidas a un proceso previo de esterilización para evitar el crecimiento de hongos, mediante el lavado de las mismas en etanol 100% durante 5 min, hipoclorito de sodio al 5% durante 10 min y una serie de lavados sucesivos con agua estéril.

Los tejidos han sido recogidos a diferentes estadios de desarrollo, congelados en nitrógeno líquido y guardados a -80 °C hasta su procesamiento.

Para estudiar el efecto de las condiciones de crecimiento en el desarrollo, se crecieron plantas durante 10 días en tierra o en cultivo hidropónico. A los 6 y a los 10 días se recogieron 7 plantas de cada sistema de crecimiento y se determinó el peso fresco de la parte aérea y de la raíz. Los valores resultantes se compararon por su relación de biomasa parte aérea/raíz. Los datos se analizaron por su relevancia estadística (test T de Student).

4.1.2 ARABIDOPSIS

Se han utilizado plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia 0 (Col 0).

4.1.2.1 Esterilización de las semillas

Antes de la siembra, las semillas se han esterilizado con vapores de cloro. Para ello, se incuban las semillas durante 4 h en un tubo eppendorf abierto dentro de un desecador herméticamente cerrado que contiene un vaso de precipitados con una mezcla de 100 ml de lejía comercial (hipoclorito de sodio en solución acuosa) + 3 ml de ácido clorhídrico concentrado. La acidez del medio produce la liberación de gas cloro a partir del hipoclorito.

4.1.2.2 Germinación de las semillas

Una vez esterilizadas, las semillas se han germinado *in vitro*, en placas de medio MS/gelrita. En el caso de las semillas transgénicas se han sembrado en placas de medio MS/gelrita más el antibiótico higromicina para su selección (la composición de los medios y la concentración de los antibióticos se detallan en los apartados 4.4 y 4.5 respectivamente). Las condiciones de crecimiento eran las siguientes: 18-22°C de temperatura; 45% de humedad; 16 h luz/8 h oscuridad. Para conseguir una óptima germinación de las semillas, una vez sembradas se les ha sometido a un periodo de vernalización (48-72 h a 4°C en oscuridad) suficiente para romper su estadio de dormancia. A los 7-10 días, las plántulas se han transplantado a tierra

en maceta, para su crecimiento en invernadero en las siguientes condiciones: 18-22°C de temperatura; 45% de humedad; 16 h luz/8 h oscuridad.

4.2 CEPAS DE BACTERIA Y LEVADURA

4.2.1 BACTERIAS

Cepa	Utilización	Referencia o fuente
<i>E.coli</i> K-12 DH5 α	Amplificación de DNA plasmídico	Hanahan, 1983
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	Sobreexpresión ZmXTH1	Stratagene
<i>A.tumefaciens</i> C58C1	Transformación <i>A.thaliana</i> con ZmXTH1	Deblaere et al., 1985

4.2.2 LEVADURA

Cepa	Utilización	Referencia o fuente
<i>P.pastoris</i> X-33	Sobreexpresión ZmXTH1	Invitrogen

4.3 VECTORES

Vector	Utilización	Referencia o fuente
pTZ57R/T	Clonación de productos de PCR	Fermentas
pCR®II y pCR®2.1	Clonación de productos de PCR	Invitrogen
pBluescript® II SK (+)	Clonación de fragmentos de DNA	Stratagene
pET-28a	Sobreexpresión proteínas en <i>E.coli</i>	Novagen
pPICZ α A	Sobreexpresión proteínas en <i>P.pastoris</i>	Invitrogen
PUC19	Transformación transitoria	
pCKGFP-modificado	Construcción del casete de sobreexpresión 2X35S-Ter 35S	Reichel et al. ,1996
pCambia 1300	Vector binario utilizado en la transformación de <i>A.thaliana</i>	Cambia™
pCambia 1302	Vector binario utilizado en la transformación transitoria de cebolla	Cambia™

4.4 MEDIOS

LB (Luria Bertani): 10 g/L bactotripton, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L NaCl. Para medio sólido añadir 15 g/L agar.

LB low salt: 10 g/L bactotripton, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L NaCl. Para medio sólido añadir 15 g/L agar. Ajustar a pH 7,5 con NaOH. Autoclavar.

MS (Murashige-Skoog): 4,41 g/L MS+vitaminas (Duchefa), 20 g/L sacarosa, 0,5 g/L MES. Para medio sólido añadir 2 g/L gelrita. Ajustar a pH 5,8 con KOH. Autoclavar.

YPD (Yeast extract Peptone Dextrose médium): 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona y 20 g/L de dextrosa (glucosa). Para medio sólido añadir 20g/L agar.

Para 1 L de medio:

- Disolver 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona (con o sin agar) en 900 ml finales de agua (medio YP). Autoclavar durante 20 min.
- Preparar a parte una solución de glucosa 200 g/L (glucosa 10x), autoclavar durante 15 min.
- Añadir 100 ml de glucosa 10X a 900 ml de medio YP.

YEB (Yeast Extract Broth) 5 g/L extracto de buey, 1 g/L extracto de levadura, 5 g/L peptona bacteriológica, 5 g/L sacarosa, 0,048% MgSO₄. Para medio sólido añadir 15 g/L agar. Ajustar a pH 7,2 con NaOH / HCl. Autoclavar.

4.5 ANTIBIÓTICOS Y REACTIVOS

Antibiótico o reactivo	Abreviación	Concentración final (µg/ml)			
		<i>E.coli</i>	<i>P.pastoris</i>	<i>A.tumefaciens</i>	<i>A.thaliana</i>
Carbenicilina	Carb	100	-	100	-
Kanamicina	Kan	25	-	50	-
Zeocina ⁽¹⁾	Zeo	25	100	-	-
Higromicina	Higro	-	-	-	32
Timentina	Tim	-	-	-	100
Rifampicina	Rif	-	-	100	-
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside	IPTG	23,8	-	-	-
5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside	X-Gal	40	-	-	-

(1)

- Las placas con Zeocina, mantenidas en la oscuridad a 4°C, son estables por un máximo de dos semanas.
- La alta fuerza iónica reduce la actividad de la zeocina. Por lo tanto, hace falta utilizar un medio con contenido reducido en sal (*LB low salt*)

4.6 OLIGONUCLEÓTIDOS

Nombre	Secuencia	Aplicación
pET28-XTH1-Full Fw	5'- <u>tcatat</u> ggcgcgggcctctgg-3' (<i>NdeI</i>)	Construcciones para expresión en <i>E.coli</i>
pET28-XTH1-Int Fw	5'- <u>gcatat</u> gacggacggcacc-3' (<i>NdeI</i>)	
pET28-XTH1 Rv	5'- <u>taagctt</u> ctagctgcggtgcac-3' (<i>HindIII</i>)	
pPICZ-XTH1 Fw	5'- <u>agaatt</u> cacggacggcacc-3' (<i>EcoRI</i>)	Construcciones para expresión en <i>P.pastoris</i>
pPICZ-XTH1 Rv	5'- <u>atctaga</u> ctagctgcggtgcac-3' (<i>XbaI</i>)	
pCambia-XTH1-Full-GFP Fw	5'- <u>aagatc</u> tcatggcgcggtcc-3' (<i>Bgl II</i>)	Construcciones para expresión transitoria en cebolla
pCambia-XTH1-Int-GFP Fw	5'- <u>aagatc</u> tgacggaccgctccgacc-3' (<i>Bgl II</i>)	
pCambia-XTH1 Rv	5'- <u>tactagt</u> tggtggtgatagctgcggtgcactcggg-3' (<i>SpeI</i>)	
pCambia-XTH1 sp Rv	5'- <u>tactagt</u> ggtgcgacggtgccgtc-3' (<i>SpeI</i>)	
3'UTR XTH1 Fw	5'-acaactactgcgacgacg-3'	Northern <i>ZmXTH1</i> (sonda 3'UTR)
3'UTR XTH1 Rv	5'-catttacgcgaacaggacg-5'	
Zm1005 Fw	5'-accgctcgcttggttttg-3'	RT-PCR <i>ZmXTHs</i> (amplificación 3'UTR)
Zm1005 Rv	5'-tacgatgcaggtatactgag-3'	
XTH1 Fw	5'-tagctgattccgccggtttcg-3'	
XTH1 Rv	5'-gctgcgtacatgcatcatcatcc-3'	
XTH2 Fw	5'-tccaccatctgcctgc-3'	
XTH2 Rv	5'-gtttatcctcagtttctgc-3'	
XTH3 Fw	5'-cattggtttgttttatcccc-3'	
XTH3 Rv	5'-tggaatggaaggcaacaacatctg-3'	
XTH4 Fw	5'-aggacttgacgattgtaacg-3'	
XTH4 Rv	5'-gtatcaatcgatctgcacgcg-3'	
XTH5 Fw	5'-taaagtggtggtgagcga-3'	
XTH5 Rv	5'-cagatgaaagaatatcactgcg-3'	
XTH6 Fw	5'-tgatgatgatgctgggccc-3'	
XTH6 Rv	5'-agctgccgaaatttcgatac-3'	
Actina Fw	5'-ccaaggccaacagagagaaa-3'	Control interno RT-PCRs
Actina Rv	5'-tgaccatcaggcatctcgta-3'	
3'UTR XTH1 Fw	5'-acaactactgcgacgacg-3'	Análisis plantas transgénicas <i>A.thaliana</i>
Ter 35 S	5' atgctcaacacatgagcgaacc-3'	
M13 Fw	5'-gtaaacgacggccagt-3'	PCR fragmentos clonados
M13 Rv	5' caggaaacagctatgac 3'	

4.7 CONSTRUCCIONES

Construcción	Información inserto	Aplicación
pTZ-3'UTRZmXTH1	PCR con oligos 3'UTR XTH1 Fw y 3'UTR XTH1 Rv	Sonda específica (3'UTR) para ensayos de <i>northern</i>
pET28-XTH1Full	PCR con oligos pET28-XTH1Full Fw y pET28-XTH1 Rv, dianas <i>NdeI</i> y <i>HindIII</i>	Sobreexpresión en <i>E.coli</i> de la proteína entera ZmXTH1
pET28-XTH1Int	PCR con oligos pET28-XTH1Int Fw y pET28-XTH1 Rv, dianas <i>NdeI</i> y <i>HindIII</i>	Sobreexpresión en <i>E.coli</i> de la proteína parcial ZmXTH1, sin el péptido señal
pPicZ α -XTH1Int	PCR con oligos pPicZ-XTH1Int Fw y pPicZ-XTH1 Rv, dianas <i>EcoRI</i> y <i>XbaI</i>	Sobreexpresión en <i>P.pastoris</i> de la proteína parcial ZmXTH1, sin el péptido señal
pCambia-XTHFull-GFP	PCR con oligos pCambia-XTH1Full Fw y pCambia-XTH1 Rv, dianas <i>BglII</i> y <i>SpeI</i>	Expresión transitoria en cebolla de la proteína entera ZmXTH1 fusionada a GFP
pCambia-XTH1Int-GFP	PCR con oligos pCambia-XTH1Int Fw y pCambia-XTH1 Rv, dianas <i>BglII</i> y <i>SpeI</i>	Expresión transitoria en cebolla de la proteína parcial (sin péptido señal) ZmXTH1 fusionada a GFP
pCambia-XTH1sp-GFP	PCR con oligos pCambia-XTH1Full Fw y pCambia-XTH1 sp Rv, dianas <i>BglII</i> y <i>SpeI</i>	Expresión transitoria en cebolla del péptido señal de ZmXTH1 fusionado a GFP
pCambia-XTH1	La secuencia de cDNA ZmXTH1 (incluyendo el 5'UTR y 3'UTR) aislada de la librería de expresión se ha digerido (dianas <i>EcoRI</i> y <i>KpnI</i>) del vector de aislamiento PBsK y ligado en el plásmido descrito por Reichel et al. (1996) para la construcción del casete de expresión 35S::ZmXTH1-Ter35S. El casete ha sido luego subclonado en el vector binario pCambia 1300 en la diana <i>HindIII</i> .	Producción de plantas transgénicas de <i>A.thaliana</i> que sobreexpresan ZmXTH1

4.8 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS Y LEVADURA

4.8.1 TRANSFORMACIÓN DE *E.coli*

4.8.1.1 Preparación de células competentes

El protocolo seguido para la preparación de células competentes de *E.coli* para transformación por choque térmico es una variación del descrito por Hanahan (Hanahan, 1983), que permite obtener una eficiencia teórica de transformación de, aproximadamente, 106-107 cfu/Ug DNA.

Procedimiento:

1. Inocular un precultivo de 5 ml de LB a partir de una colonia aislada de *E.coli* DH5 α , crecida en placa de medio LB, e incubar a 37°C en agitación durante 14-16 h (toda la noche).
2. Inocular 2,5 ml del precultivo crecido en 250 ml de LB. Incubar a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5 (2-3 h).
3. Enfriar el cultivo en hielo durante 15 min. Trabajar siempre en frío.
4. Centrifugar a 4500 rpm durante 10 min a 4°C.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender el precipitado de células en 50 ml de solución TFB1 fría (con cuidado de no lisar las células).
6. Incubar 10 min en hielo.
7. Centrifugar a 4500 rpm durante 10 min a 4°C.
8. Decantar el sobrenadante y resuspender el precipitado de células en 5 ml de solución TFB2 fría (con cuidado de no lisar las células).
9. Hacer alícuotas de 100 μ l y congelar inmediatamente en nitrógeno líquido. Almacenar a -80°C.

Soluciones:

- TFB1: 30 mM KAc; 50 mM MnCl₂; 10 mM CaCl₂; 100 mM RbCl; 15% glicerol.
- TFB2: 10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl; 15% glicerol. Esterilizar por filtración y guardar a 4°C.

4.8.1.2 Transformación por choque térmico

1. Añadir 50-100 ng de DNA plasmídico o el producto de ligación a una alícuota de células competentes, previamente descongelada en hielo. Mezclar e incubar en hielo durante 20-30 min.
2. Aplicar un choque térmico de 42°C durante 45 s.
3. Incubar en hielo durante 2 min.
4. Añadir 800 μ l de medio LB e incubar durante 45-60 min a 37°C en agitación.
5. Centrifugar a 6000 rpm durante 1 min. Resuspender el sedimento bacteriano en 200 μ l del sobrenadante.

Sembrar en placas de LB (con el antibiótico correspondiente para la selección de transformantes) e incubar a 37°C, en posición invertida, durante toda la noche (12-16 h).

4.8.2 TRANSFORMACIÓN DE *A. tumefaciens*

4.8.2.1 Preparación de células competentes

1. Inocular una colonia de *A. tumefaciens* C58C1 en 10 ml de medio de cultivo YEB-Rif. Incubar a 28°C con agitación, durante 24h aproximadamente.
2. Inocular 50 μ l del cultivo anterior en 50 ml de medio YEB-Rif. Incubar a 28°C hasta obtener una DO₆₀₀ de 0,5 (20 h aproximadamente).
3. Centrifugar las células a 5000 rpm durante 5 min a 4°C. A partir de este momento hay que mantener las células en frío y manipularlas con cuidado.

4. Resuspender suavemente el sedimento de células en 10 ml de solución A, atemperada a 4°C.
5. Repetir la misma centrifugación que en el punto 3 y resuspender el sedimento de células en 1 ml de solución de CaCl₂ 20 mM, previamente enfriada en hielo.
6. Repartir las células competentes en alícuotas de 200 µl, congelarlas en nitrógeno líquido y guardarlas a -80°C hasta su uso.

- Solución A: 10 mM Tris HCl pH 7,5, 1 mM EDTA

4.8.2.2 Transformación por choque térmico

1. Añadir 1 µg de DNA plasmídico a una alícuota de 200 µl de células competentes, mezclar, e incubar en hielo durante 5 min.
2. Introducir la muestra en nitrógeno líquido durante 5 min y seguidamente en un baño a 37°C durante 5 min más.
3. Añadir 1 ml de medio YEB a la muestra e incubar durante 3-4 h a 28°C con agitación suave.
4. Sedimentar las células transformadas centrifugando 5 min a 2000 rpm en una centrífuga eppendorf.
5. Resuspender las células en 200 µl de medio YEB Rif-Kana-Carb. Incubar las placas a 28°C protegidas de la luz, durante 2 días aproximadamente (hasta la aparición de colonias).
6. Seleccionar algunas colonias e inocular en 3 ml de medio YEB suplementado con los mismos antibióticos que en el paso 5. Crecer los cultivos hasta saturación a 28°C y con agitación.
7. Comprobar los clones positivos por reacción de PCR y mediante digestión con enzimas de restricción.

4.8.3 TRANSFORMACIÓN DE *P. pastoris*

4.8.3.1 Preparación de células competentes

1. Inocular un precultivo de 10 ml de YPD a partir de una colonia de *P.pastoris* X-33 y crecer a 30°C en agitación durante toda la noche.
2. Inocular el precultivo anterior en 500 ml de medio YPD. Crecer a 30°C en agitación alcanzar una DO₆₀₀ de 1,3-1,5.
3. Transferir el cultivo a botellas de polipropileno y centrifugar a 2000 rpm durante 10 min a 4°C.
4. Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 100 ml de medio YPD + 20 ml HEPES 1 M pH 8.
5. Añadir 2,5 ml de DTT 1M, mezclar e incubar en ligera agitación (100 rpm) durante 15 min a 30°C.

6. Añadir H₂O estéril enfriada a 4°C hasta un volumen de 500 ml y centrifugar a 2000 rpm durante 10 min a 4°C.
7. Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 250 ml H₂O. Centrifugar como en el paso anterior.
8. Decantar el sobrenadante, secar y resuspender las células en 20 ml de sorbitol estéril 1M enfriado a 4°C. Volver a centrifugar.
9. Decantar el sobrenadante, secar y resuspender las células en 0,5 ml de sorbitol estéril 1 M enfriado a 4°C.
10. Alicuotar en 80 µl y transformar (alternativamente las células se pueden guardar a -80°C, pero utilizar células no frescas disminuye el rendimiento de la transformación).

4.8.3.2 Transformación por electroporación

1. Descongelar las células competentes en hielo y añadir 5-10 µg de DNA linearizado (resuspendido en 5-10 µl de H₂O).
2. Mantener 5 min en hielo.
3. Transferir las células a cubetas estériles.
4. Proceder a la descarga a 2,5 kV en el electroporador (BioRad Gene –Pulser, a 25 µF de capacidad, 400 Ω de resistencia).
5. Inmediatamente añadir 1 ml de sorbitol 1 M a 4°C, mezclar y dejar en hielo 5 min.
6. Sembrar las células (250 µl por cada placa) en placas YPD-agar-Zeocina.
7. Incubar durante 72 h a 30°C.
8. Seleccionar un mínimo de 10 colonias transformantes por construcción, y replicar cada una nuevamente, por un total de 3 resiembras.

Es oportuno no conservar las colonias en placas por tiempos largos; por lo tanto a partir de las colonias individuales aisladas se preparan glicerizados tal como se describe:

1. Inocular un precultivo de 1,5 ml de YPD-Zeocina e incubar a 30°C en agitación toda la noche.
2. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 min a T.A.
3. Resuspender en 1,2 ml YPD /glicerol 20% final.
4. Guardar a -80°C.

4.9 ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.9.1 EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

1. Preparar un inoculo con 3-5 ml LB y el antibiótico adecuado e incubar a 37°C toda la noche en agitación.
2. Centrifugar todo el cultivo a 13000 rpm durante 1 min a T.A.
3. Resuspender el pellet en 150 µl de solución 1 fría utilizando el vórtex.
4. Añadir 300 µl de solución 2 (preparación *in situ*), invertir suavemente 5 veces (no utilizar el vortex) e incubar 5 min a T.A.
5. Añadir 225 µl de solución 3 fría, invertir 5 veces (no vortear) e incubar en hielo mínimo 10 min.
6. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min a T.A. y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
7. Añadir 1 v de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), agitar y centrifugar 5 min a 13000 rpm.
8. Transferir la fase superior a un nuevo tubo.
9. Añadir 1 v de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), agitar y centrifugar 5 min a 13000 rpm.
10. Transferir la fase superior a un nuevo tubo.
11. Añadir 0,6 v de isopropanol a T.A., invertir e incubar 10 min a T.A.
12. Centrifugar 10 min a 13000 rpm a T.A. y descartar el sobrenadante.
13. Lavar el pellet con 1 ml de EtOH 70%.
14. Centrifugar 5 min a 13000 rpm a T.A. y eliminar el sobrenadante.
15. Dejar secar el pellet y resuspender en 30-50 µl de H₂O.
16. Añadir 1 µl RNasa e incubar 15 min a 37°C.

Soluciones:

- Solución 1: 50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA
- Solución 2: 0,2 N NaOH, 1% SDS
- Solución 3: 3 M acetato de potasio pH 5,5

Alternativamente se ha utilizado el kit comercial Plasmid Mini Kit (QIAGEN®), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Asimismo, para obtener mayores cantidades de DNA plasmídico se han realizado midipreparaciones, con el kit Plasmid Midi Kit (QIAGEN®).

4.9.2 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

4.9.2.1 Método Dellaporta

Este método, modificado de Dellaporta y col. (1983) se ha utilizado para la extracción de DNA genómico de maíz, para su uso para *Southern*. El protocolo utilizado es el siguiente:

1. Triturar 5 g de tejido en mortero con nitrógeno líquido. Pasar el material pulverizado y congelado a un tubo de centrífuga de 15 ml (Corex®).

2. Añadir 10 ml de tampón de extracción y 10 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar por inversión.
3. Centrifugar 15 min a 10000 rpm a T.A.
4. Extraer la fase acuosa y añadir acetato de amonio a una concentración final de 2,7 M. Mezclar por inversión y añadir 0,6 v de isopropanol. Incubar 30 min a T.A.
5. Centrifugar 20 min a 10000 rpm y desechar la fase acuosa.
6. Lavar el precipitado con EtOH 70%.
7. Resuspender el precipitado en 1 ml de H₂O estéril con RNasa (100 µg/ml).
8. Incubar durante 30 min a T.A.
9. Añadir 1 v de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar.
10. Centrifugar 20 min a 10000 rpm.
11. Extraer la fase acuosa y añadir 1 v de cloroformo. Centrifugar 20 min a 10000 rpm.
12. Añadir 0,1 v de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2 v de EtOH 100%. Mezclar suavemente. Observar la aparición del precipitado en forma de hilos.
13. Centrifugar 20 min a 10000 rpm.
14. Lavar el precipitado con etanol 70% y dejar secar un poco.
15. Resuspender el precipitado en 100 µl de H₂O estéril.
16. Guardar a 4°C.

- Tampón de extracción: 7 M Urea, 0,3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 1% sarcosil

4.9.2.2 Método Edwards

En el caso de los análisis por PCR de las plantas transgénicas de arabisopsis se ha seguido un protocolo adaptado del método de extracción rápida de DNA genómico de planta descrito por Edwards y col. (1991). Todos los pasos de este protocolo se pueden realizar a T.A.

Procedimiento:

1. Recoger la muestra (muy pequeña cantidad), colocarla dentro de un vial de microcentrífuga.
2. Añadir 400 µl de tampón de extracción y triturar la muestra en el mismo vial, con ayuda de un émbolo estéril durante 15 s y mezclar bien mediante agitación en vórtex durante 5 s.
3. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 min.
4. Transferir 300 µl del sobrenadante a un nuevo vial. Añadir 1 V de isopropanol e incubar durante 2 min.
5. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 min.
6. Descartar el sobrenadante y dejar secar el precipitado.
7. Resuspender el precipitado en 100 µl de H₂O.
8. Utilizar 2,5 µl de DNA para el análisis por PCR estándar.

- Tampón de extracción: 200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8, 0,5% SDS.

4.9.3 EXTRACCIÓN DE RNA

4.9.3.1 Método del tampón Z6

Se ha seguido el método descrito por Logemann y col. (1987) modificado así como sigue:

1. Enfriar el mortero con nitrógeno líquido.
2. Triturar el tejido (congelado) en el mortero con nitrógeno líquido. Pasar el pulverizado a eppendorf (llenar 2/3 partes del eppendorf, aprox. 1 ml)
3. Añadir a cada eppendorf 200 μ l de tampón Z6 (enfriado en hielo) y 20 μ l β -mercaptoetanol. Mezclar bien.
4. Añadir 200 μ l más de tampón Z6. Volver á homogeneizar.
5. Añadir 400 μ l fenol/chloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Agitar vigorosamente al vortex.
6. Centrifugar 30 min a 13000 rpm en cámara fría.
7. Recuperar el sobrenadante y transferirlo a un eppendorf nuevo (frío).
8. Añadir 0,1 v ácido acético 1 M y 1 v EtOH 100%. Mezclar al vortex.
9. Dejar precipitar toda la noche a -20 °C ó 20 min a -70 °C.
10. Centrifugar 10 min a 13000 rpm a 4°C. Descartar sobrenadante.
11. Lavar el pellet con EtOH 70%. Agitar, o con una punta separar el pellet de la pared.
12. Centrifugar 5 min a 13000 rpm a 4°C. Descartar el sobrenadante.
13. Lavar el pellet con 200 μ l de acetato sodico 3M.
14. Centrifugar 5 min a 13000 rpm a 4°C. Descartar el sobrenadante. Lavar 2 veces más con EtOH 70%.
15. Dejar secar el pellet.
16. Resuspender en 50-100 μ l H₂O estéril.
17. Agitar en un mixer de eppendorf 15-20 min.
18. Calentar a 65°C durante 5 min.
19. Centrifugar 2 min a 13000 rpm y recuperar el sobrenadante.

- Tampón Z6: 8 M Guanidina-HCl, 20 mM MES, 20 mM EDTA pH 7. No autoclavar. Guardar a T.A.

4.9.3.2 Método del Trizol

Este método está basado en el uso del reactivo Trizol[®] de la casa Invitrogen que minimiza el tiempo invertido en el proceso de extracción. El protocolo seguido ha sido el descrito por el fabricante con alguna modificación.

Procedimiento:

1. Homogeneizar 50-100 mg de tejido en un mortero con nitrógeno líquido.
2. Transferir el material a un tubo eppendorf. Añadir 1 ml de Trizol^R y mezclar por inversión.
3. Incubar 5 min a T.A.
4. Añadir 0,2 v cloroformo, mezclar por inversión e incubar 2-3 min a T.A.

5. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 min a 4°C. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo.
6. Precipitar el RNA con 0,5 ml de isopropanol e incubar 10 min a T.A.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min a 4°C y eliminar el sobrenadante.
8. Lavar el pellet con 1 ml EtOH 70%, agitar y centrifugar a 7500 rpm durante 5 min a 4°C.
9. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet.
10. Resuspender en H₂O estéril e incubar 10 min a 60°C.
11. Centrifugar 2 min a 13000 rpm y recuperar el sobrenadante.

4.9.4 TRATAMIENTO CON DNasa

El tratamiento del RNA total con DNasa permite degradar el DNA genómico, que podría interferir en posteriores análisis y/o ensayos. Este tratamiento se ha llevado a cabo en el caso de la extracción de RNA con el método Z6, para su posterior uso por RT-PCR. Se ha seguido el protocolo que se detalla a continuación:

1. Mezclar en un vial de microcentrífuga: 10-20 µg de RNA de la extracción; 3 µl de 10x tampón de DNasa; 1 µl RNasina; 1 µl DNasa; H₂O estéril hasta 30 µl.
2. Incubar 30 min a 37°C.
3. Ajustar con H₂O hasta 200 µl, y añadir 1 v de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar agitando en vigorosamente.
4. Centrifugar 5 min a 13000 rpm y recuperar la fase acuosa.
5. Añadir 0,1 v de acetato de sodio 3 M pH 5,5 y 2,5 v de EtOH 100%.
6. Dejar precipitar el RNA durante 30 min a -20°C.
7. Centrifugar 20 min a 13000 rpm.
8. Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con 200 µl EtOH 70% y centrifugar 5 min a 13000 rpm.
9. Secar el precipitado y resuspender en 20 µl de H₂O estéril.
10. Guardar el RNA a -80°C.

Reactivos:

- Tampón DNasa 10X: 0,4 M Tris-HCl pH 7,5; 60 mM MgCl₂.
- RNA guardTM RNase Inhibitor Porcine (24,8U/µl) (Amersham Bioscience)
- DNase I Rnase free (10 U/µl) (Roche)

4.9.5 DIGESTIÓN DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

La digestión con enzimas de restricción se ha utilizado tanto en DNA genómico, para los análisis Southern, como en DNA plásmidico para la liberación del inserto o fragmento de DNA clonado en dicho plásmido y su posterior clonación dirigida en otros vectores o el uso directo de dicho fragmento como sonda. Una unidad de enzima es la cantidad necesaria de enzima para digerir 1 µg de DNA durante 1 hora a 37°C, en el tampón apropiado para cada enzima.

De forma general, la relación DNA/enzima utilizada ha sido, en exceso, 2-3 unidades de enzima por cada μg de DNA durante 2 h a 37°C. La concentración de glicerol que contiene la enzima no debe sobrepasar el 10% del volumen final de la reacción. Los enzimas que han sido empleados durante este trabajo pertenecen a las casas comerciales Fermentas o Roche.

4.9.6 LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA A UN VECTOR DE CLONACIÓN

La eficiencia de la reacción de ligación está determinada por las cantidades de vector e inserto presentes en ella. El cálculo de estas cantidades, cuya proporción se indica a continuación, así como la propia reacción de ligación se han realizado según lo descrito por Sambrook y Russel (2001).

Fórmula para calcular la cantidad de inserto en la mezcla de reacción:

$$\text{ng inserto} = \text{ng vector} \times \text{PM del inserto (kb)} / \text{PM del vector (Kb)}$$

Esta fórmula determina una relación inserto:vector de 1:1. Generalmente, para las reacciones de ligación hemos utilizado una relación inserto:vector entre 3:1 y 5:1.

A la cantidad de inserto y vector estimadas se añade el volumen necesario de tampón T4 DNA ligasa 10X y 0,1-0,5 U de enzima T4 DNA ligasa para cada 100 ng de vector. La reacción se ha realizado a 16°C durante toda la noche.

En este trabajo se ha empleado mayoritariamente el enzima T4 DNA ligasa y el tampón T4 DNA ligasa 10X de la casa comercial Roche. Los vectores principalmente utilizados para clonar productos de PCR han sido el vector pTZ57R (Fermentas) y el vector pCRII-TOPO (Invitrogen).

Para la clonación de productos de PCR en el vector pCRII-TOPO el proceso de ligación no requiere la presencia de DNA ligasa y puede llevarse a cabo en 5 min con una elevada eficiencia. Esto se debe a la actividad de la DNA topoisomerasa I que lleva conjugada el vector en los extremos 3'OH.

4.9.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Esta metodología se ha utilizado para amplificar fragmentos de DNA a partir de las siguientes cantidades de diferentes DNA molde:

DNA MOLDE	CANTIDAD DE DNA MOLDE UTILIZADA	FINALIDAD DE LA PCR
colonias bactericas	Una colonia individual	Confirmar presencia inserto
plásmidos	10-20 ng	Confirmar presencia inserto Clonar fragmentos de DNA
DNA genómico	100 ng	Confirmar presencia transgen
cDNA	100-500 ng	Clonar fragmentos de DNA Análisis expresión por RT-PCR

Las condiciones habituales de la reacción utilizadas han sido:

a. Mezcla de reacción

DNA molde	Según el tipo de DNA
Tampón de PCR 10 X	5 µl
dNTPs	0,2 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Primer Fw	10 pmol
Primer Rv	10 pmol
Taq polimerasa	2,5 U
H ₂ O	Hasta 50 µl

- Tampón de PCR 10X: 500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl pH 8,6, 1% Triton X-100.

b. Condiciones de la reacción

1 ciclo	5 min 94°C	Pre-desnaturalización
X ciclos (entre 24 y 35) ⁽¹⁾	30 seg 94°C 30 seg X°C ⁽²⁾ X seg 72°C ⁽³⁾	Desnaturalización Hibridación Extensión
1 ciclo	7 min 72 °C	Extensión final

(1) El numero de ciclos de amplificación depende del tipo de PCR: para comprobar las presencia de un inserto se han efectuado normalmente 30 ciclos, para clonar fragmentos de DNA 35 ciclos, y en el caso de análisis de expresión por RT-PCR entre 24 y 30.

(2) En general, se ha utilizado una temperatura 2°C inferior a la T_m del oligo con T_m más baja.

(3) Depende de longitud del fragmento; la Taq incorpora 1Kb/min.

4.9.8 RT-PCR (reverse transcriptase PCR)

La RT-PCR ha sido realizada siguiendo el procedimiento establecido en el kit M-MLV reverse Transcriptase (Invitrogen), utilizando un oligonucleótido poli-dT, el cual se une a la cola de poliA del mRNA. Esta reacción consta de dos pasos: a) síntesis de la molécula de cDNA (retrotranscripción) y b) una reacción de PCR convencional, que utiliza como molde este cDNA.

a. Reacción de retrotranscripción.

Mezclar:

RNA	1-5 µg
Oligo-dT (50 µM)	1 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
H ₂ O	Hasta 12 µl

Desnaturalizar el RNA 5 min a 65° C y transferir inmediatamente a hielo.

Luego añadir:

Tampón RT 5X	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNAguard™ (39,88 U/µl)	1 µl

Incubar 2 min a 37°C.

Añadir 1 µl de M-MLV RT (200 U).

Incubar 50 min a 37 °C.

Bloquear la reacción incubando 15 min a 70°C.

Guardar a - 20°C.

b.PCR sobre el cDNA

Se han utilizado siempre 2 µl de los 20 µl de la mezcla de la reacción de retrotranscripción. La PCR se ha llevado a cabo como descrito en el apartado 4.9.7. En cada caso específico, se ha optimizado el número de ciclos, entre 24 y 28.

En el caso de la actina, utilizada como control interno, se han utilizado una Ta de 55°C y una extensión de 1 min.

En el caso de las XTHs de maíz se ha utilizado una extensión de 45 s, y las siguientes Ta.

XTH	Ta
ZmXTH1	57°C
ZmXTH2	49°C
ZmXTH3	49°C
ZmXTH4	49°C
ZmXTH5	51°C
ZmXTH6	49°C
Zm1005	51°C

4.9.9 ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE AGAROSA

La migración electroforética del DNA se ha llevado a cabo, generalmente, en geles de agarosa al 1%. El porcentaje de agarosa se ha variado en aquellos casos que así lo requerían, aumentándolo o disminuyéndolo con el fin de poder discriminar entre fragmentos pequeños de DNA o entre fragmentos de gran tamaño de DNA, respectivamente. Un gel de agarosa a 1% se prepara fundiendo 1 g de agarosa en 100 ml de tampón TAE 1X. La solución se enfría hasta 55°C y se le añade 0,5 µl/ml de bromuro de etidio, para la visualización de los ácidos nucleicos por luz U.V. en un transiluminador. Antes de cargar el gel se añade tampón de carga a las muestras y la electroforesis se lleva a cabo en tampón TAE 1X y un voltaje de 80-100 V durante el tiempo necesario. Para cargar el DNA en el gel se le añade tampón colorante de carga en el gel.

La migración se realiza, normalmente, a un voltaje constante de 100 V en 1X TAE.

Soluciones:

- TAE 1X: 40 mM Tris Base, 20 mM HAC, 2 mM EDTA pH 8.
- Tampón de carga 10X: 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol, 50% glicerol, 10 mM EDTA pH 8.

4.9.10 EXTRACCIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA DESDE GEL DE AGAROSA

Para la extracción de fragmentos de DNA desde gel de agarosa, tras la migración de los mismos, se ha utilizado el kit QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN), según las indicaciones del fabricante.

4.9.11 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La cuantificación de ácidos nucleicos se ha realizado por espectrofotometría utilizando un NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer y el programa informático ND-1000 V3.1.0 (NanoDrop Technologies Inc.).

4.9.12 TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.9.12.1 Southern blot

El método de detección de secuencias específicas de DNA descrito por Southern (Southern, 1975), permite estimar el número de copias que hay en el genoma de un gen concreto, o bien analizar si pertenece a una familia multigénica, mediante la digestión con 2 o más enzimas de restricción por separado del DNA genómico.

Procedimiento:

1. Digerir 10 µg de DNA genómico por separado por cada enzima de restricción (utilizar 4-5 enzimas diferentes)
2. Realizar una electroforesis de una pequeña alícuota de las muestras digeridas en gel de agarosa para verificar que la digestión es completa.
3. Realizar la electroforesis de las muestras en un gel de agarosa al 0,8%, a 70 V, durante el tiempo que sea necesario.
4. Incubar el gel 10 min en 0,2 M HCl (para facilitar la transferencia de fragmentos de DNA de gran tamaño)
5. Lavar ligeramente con agua e incubar 15 min en solución desnaturizante.
6. Lavar nuevamente e incubar 30 min en solución neutralizante.
7. Preparar la transferencia como descrito en el apartado 4.9.12.3

Soluciones:

- Solución desnaturizante: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
- Solución neutralizante: 0,5 M Tris-HCl pH7,5, 1,5 M NaCl

4.9.12.2 Northern blot

La electroforesis de RNA se ha realizado en geles desnaturalizantes de formaldehído/agarosa al 1%.

a. Preparación del gel (200 ml)

- Lavar la bandeja, el peine y la cubeta de electroforesis con NaOH 0,1 N.
- Fundir en microondas 2 g agarosa en 132 ml H₂O estéril.
- Dejar enfriar en un baño a 55°C
- Añadir (precalentados a 55°C) 20 ml de MEN 10X y 48 ml formaldehído 37%.
- Mezclar y verter en la bandeja
- Una vez que el gel está solidificado, poner la bandeja con el gel en la cubeta de electroforesis conteniendo MEN 1X. Tapar la cubeta para evitar la difusión del formaldehído.

b. Preparación de la muestra

- Preparar el tampón de carga.
- Añadir a 25 µl de muestra de RNA 25 µl de tampón de carga.
- Calentar durante 10 min a 65°C.
- Cargar en gel

La electroforesis se realiza en tampón MEN 1X y a 90 V durante 2 h.

Soluciones:

- MEN 10X: 0,2 M MOPS pH 7, 50 mM acetato de sodio, 10 mM EDTA pH 8. Ajustar a pH 7 y autoclavar. Almacenar a 4°C.
- Tampón de carga. Para 500 µl, añadir 50 µl MEN 10X, 90 µl formaldehído, 250 µl formamida, 100 µl glycerol 28%, 10 µl BrEt 10 mg/ml

4.9.12.3 Transferencia por capilaridad

La misma técnica se ha utilizado para la transferencia tanto de DNA (*Southern*) como RNA (*northern*). La movilización de los ácidos nucleicos desde el gel hasta la membrana se consigue por capilaridad, con un tampón adecuado, ascendiendo verticalmente a través de una pila de papel absorbente compactado por presión. Se han utilizado membranas de nylon (Hybond-NTM, Amersham).

Procedimiento:

1. Colocar una placa de vidrio limpia sobre una cubeta que contenga SSC 10X (solución de transferencia).
2. Extender sobre la placa una tira de papel Whatman 3MM empapado en SSC 10X que sobresalga de la placa y esté en permanente contacto con la solución de transferencia. Debe ser de mayor tamaño que el gel.
3. Colocar uno sobre otro y en el orden siguiente:
 - Gel, cubriendo el resto de la tira de papel Whatman con plástico para evitar el contacto con los papeles absorbentes.
 - Membrana de nylon del mismo tamaño que el gel y tratada previamente con SSC 10X.

- 3 papeles Whatman 3MM del tamaño del gel.
- Pila de papeles absorbentes de 5-10 cm de grosor.
- Placa de vidrio.
- Peso de 0,5-1 Kg.

Es muy importante que no haya burbujas entre el gel y el resto de capas.

4. Dejar transferir durante toda la noche. El tiempo dependerá de la cantidad de los ácidos nucleicos.

Una vez transferido, se fija el DNA o RNA a la membrana mediante irradiación con luz U.V. La luz U.V. consigue que se entrecrucen las moléculas del ácido nucleico con las fibras de nylon de la membrana y, de esta forma, queden fijadas covalentemente en la misma. La fijación por U.V. se ha realizado utilizando el U.V. Stratalinker® 2400 de Stratagene, seleccionando la opción de auto crosslink (irradiación de una energía total de 120 mJ). En su defecto se puede fijar los ácidos nucleicos a la membrana manteniéndola a 80°C durante 2 h.

- SSC 20X: 300 mM citrato de sodio pH7,5, NaCl 0,5 M. Ajustar a pH 7 con NaOH.

4.9.13 HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.9.13.1 Marcaje y purificación de la sonda

El marcaje de las sondas de DNA utilizadas tanto en las hibridaciones *Southern* como en los *northern* ha sido por marcaje radioactivo con [α -³²P]dCTP mediante el kit comercial Random Primed DNA Labeling Kit de Roche, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante con algunas modificaciones.

a. Marcaje

1. Añadir H₂O a 50-100 ng de DNA hasta un volumen final 12 μ l.
2. Incubar 10 min a 95°C y transferir a hielo inmediatamente.
3. Añadir: 1 μ l dATP, 1 μ l dGTP, 1 μ l dTTP, 2 μ l reaction mixture, 2 μ l [α -³²P]dCTP, 1 μ l enzima Klenow.
4. Mezclar y centrifugar brevemente.
5. Incubar 1 h a 37°C.
6. Transferir en hielo y seguir con la purificación.

b. Purificación

En la purificación de la sonda se utilizaron las columnas comerciales ProbeQuant™ G-50 (Amersham Biosciences) con el fin de eliminar los nucleótidos marcados no incorporados en la sonda.

Procedimiento:

1. Preparar la columna: resuspender la resina de la columna agitando, abrir levemente el tapón, desprecintar la parte inferior de la columna y colocarla en un tubo de microcentrífuga.

2. Añadir a la reacción de marcaje 30 μ l STE.
3. Añadir la reacción de marcaje a la columna y centrifugar 2 min a 3000 rpm.
4. Descartar la columna y guardar la sonda eluida en hielo.
5. Antes de añadir la sonda a la solución de hibridación, desnaturalizarla durante 10 min a 95°C.
 - STE: 150 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA.

4.9.13.2 Hibridación

Las prehibridaciones, hibridaciones y lavados, se han realizado con el mismo método para *Southern* y *northern*, en tubos de vidrio y en estufas rotatorias a 65°C.

a. Hibridación

1. Preparar la solución de hibridación/prehibridación.
2. Prehibridar como mínimo 1 h a 65°C en solución prehibridación (20 ml para una membrana).
3. Cambiar la solución y añadir la sonda desnaturalizada a 12 ml de solución de hibridación (nueva).
4. Dejar hibridar durante toda la noche en rotación a 65°C.
5. Tras la hibridación lavar la membrana a 65°C.

Soluciones:

- Solución de pre-hibridación y hibridación: SSC 4X, 40 mM Tris HCl pH 8, 0,8 mM EDTA, 0,16% SDS, reactivo de Denhardt 1X, dextrán sulfato 8%, 100 μ g/ml DNA de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado.
- Reactivo de Denhardt 100X: 2% Ficoll 400, 2% PVP (polivinilpirrolidona), 2% BSA. Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C.

b. Lavados

El número de lavados depende de las condiciones de astringencia para la sonda en cada caso, y antes de sellar la membrana se ha comprobado con un geiger que la señal radioactiva estuviera localizada en una zona específica de la membrana.

En el caso de *los Southern*s, los lavados generalmente han sido los siguientes:

- SSC 2X / SDS 0,5%, 1 lavado a 65°C de 5 min.
- SSC 0,5X / SDS 0,1%, 2 lavados a 65°C de 30 min.
- SSC 0,1X / SDS 0,1%, 2 lavados a 65°C de 30 min.

En el caso de *los northern*s, se han efectuado los siguientes lavados:

- SSC 2X / SDS 0,5%, 1 lavado a 65°C de 5 min.
- SSC 0,5X / SDS 0,1%, 3 o 4 lavados a 65°C de 20 minutos (antes de sellar la membrana se ha controlado con el geiger)

c. Exposición y revelado

Una vez acabados los lavados, se sella la membrana dentro de una bolsa de plástico, de manera que no se seque.

En la mayoría de los casos, la membrana se ha dejado exponiendo durante una noche dentro de un casete de exposición (Hypercassette™, Amersham Biosciences) frente a una pantalla (Storage Phosphor Screen, Amersham Biosciences), cuya superficie se ve alterada (activada)

por la radiación que recibe desde la membrana, pudiendo ser leída (revelada) posteriormente en el escáner Molecular Imager® FX (BIO-RAD) utilizando el paquete informático Quantity One® 4.1.1., proporcionado por la misma casa comercial. La pantalla de fósforo se desactiva otra vez al exponerla ante la fuente de luz emitida por el Screen Eraser-K (BIO-RAD). Alternativamente, la membrana se ha expuesto en un film de autoradiografía con una pantalla intensificadora a -80°C durante 2-3 semanas.

4.10 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

4.10.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE TEJIDO VEGETAL

4.10.1.1. Extractos totales

Los extractos proteicos, tanto de tejidos de maíz como de Arabidopsis, se obtuvieron mediante el siguiente protocolo:

1. Homogeneizar el tejido en un mortero con nitrógeno líquido.
 2. Resuspender el polvo obtenido con un tampón de extracción y centrifugar 15 min a 13000 rpm a 4°C para eliminar los restos celulares.
 3. Recuperar el sobrenadante y centrifugar otra vez 5 min a 13000 rpm a 4°C.
 4. Guardar el sobrenadante a -20°C.
- Tampón de extracción: 50 mM Tris HCl pH 8, 10 mM NaCl, 1% SDS, 2 mM DTT, 1 mM PMSF.

4.10.1.2 Extracción de proteínas apoplásticas.

La homogenización de tejido no es en muchos casos apropiada para la extracción de proteínas de pared, vista la frecuente pérdida de material soluble de pared, junto con la presencia de contaminantes citoplasmáticos. Varios autores han puesto por lo tanto a punto protocolos "no destructivos" para la extracción de fluidos apoplásticos que no prevén ninguna homogenización de tejidos, sino su infiltración al vacío en una solución salina (Morrow and Jones, 1986; Nishitani and Tominaga, 1991; Zhu et al., 2006) o simplemente en un osmolito (0,3 M manitol es capaz de solubilizar proteínas localizadas en los espacios intercelulares) (Boudart et al., 2005); una vez terminada la infiltración, el fluido se recupera con una centrifugación a baja velocidad. El método utilizado ha sido una adaptación de métodos similares ya descritos (Morrow and Jones, 1986; Nishitani and Tominaga, 1991; Zhu et al., 2006; Boudart et al., 2005). Todos los pasos se han llevado a cabo en frío (en hielo o a 4°C).

Procedimiento:

1. A partir de plántulas de maíz de 2-3 días, cortar segmentos de 1 cm de raíz (incluyendo la punta) y transferirlos en 10 mM tampón fosfato pH 6.

2. Transferir las muestras a un tubo eppendorf de 1,5 ml (unas 15 secciones/eppendorf) que contiene alternativamente la solución 1, 2 o 3. Orientar las muestras de manera vertical en el eppendorf, asegurarse que estén cubiertas de líquido y eliminar el líquido en exceso (quedarán alrededor de 100 µl de líquido).
3. Dejar durante 5 min en hielo.
4. Infiltrar en vacío durante 10 min.
5. Centrifugar durante 15 min a 1000 rpm a 4°C.
6. Recoger el sobrenadante, añadir a las muestras más solución y repetir los pasos de 3 a 5.
7. Recoger el sobrenadante y añadirlo al sobrenadante obtenido en el paso 6. Esta fracción se considera fracción apoplástica.
8. Proceder a la extracción de las proteínas totales así como se ha descrito en el apartado 4.10.1.1.

Soluciones :

- Solución 1: 200 mM KCl en 10 mM MES pH 5,5
- Solución 2: 50 mM MgCl₂
- Solución 3: 300 mM manitol

Para evitar la degradación de la proteína ZmXTH1, el proceso de extracción se llevó a cabo en presencia de los siguientes inhibidores de proteasas: 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinina, 21 µM leupeptina, 1,46 µM pepstatina, 1 µM E-64.

4.10.2 SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para sobreexpresar ZmXTH1 en los sistemas heterólogos de bacteria y levadura se han seguido los protocolos que se detallan a continuación.

4.10.2.1 Sobreexpresión en *E. coli*

a. Sobreexpresión

1. Transformar células competentes de *E. coli* BL21 con las construcciones apropiadas y seleccionar en placas LB-Kan.
2. Inocular una colonia en 4 ml LB-Kan e incubar toda la noche a 37°C a 250 rpm.
3. Inocular 1 ml cultivo en 50 ml LB-Kan(dilución 1:50). Dejar crecer a 37° C hasta que alcance una DO₆₀₀ de 0,7-0,8 (tarda unas 2h).
4. Guardar una alícuota de 1ml de cultivo (control negativo pre-inducción)
5. Inducir con IPTG 1mM (alternativamente se puede utilizar 0,5 mM IPTG, el crecimiento de la bacterias es más lento pero favorece la producción de las proteínas en la fracción soluble más que en los cuerpos de inclusión). Crecer 3-5 h a 37°C a 250 rpm.

6. Centrifugar a 6500 rpm 15 min a 4°C, recoger el pellet bacteriano y guardarlo a -80°C sino se purifica inmediatamente.

b. Extracción de proteínas bacterianas

La lisis celular no fue suficiente para solubilizar la proteína ZmXTH1, que se encontraba en los cuerpos de inclusión, y por lo tanto se necesitó el uso de urea como agente desnaturizante.

El protocolo seguido es el siguiente:

1. Resuspender el pellet bacteriano en tampón de lisis (4 ml cada 100 ml de cultivo celular) y dejar 30 min en hielo.
2. Sonicar el lisado manteniéndolo en hielo. Realizar tres tandas de pulsos de 30 s y 15 s de pausa para evitar el excesivo calentamiento de la muestra.
3. Centrifugar a 8000 rpm durante 30 min a 4°C.
4. Repetir los pasos 1 y 3.
5. Resuspender el pellet en tampón urea e incubar en hielo durante 2 h, agitando a menudo.
6. Repetir el paso 3.
7. Pasar el sobrenadante a través de la columna de purificación, como se describe a continuación en el punto 3.

Soluciones:

- Tampón de lisis: 500 mM NaCl, 20 mM Tris HCl pH 7,9, 2% sarcosil, 1 mg/ml lisozima, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinina, 10 µM leupeptina, 1 µM pepstatina A
- Tampón urea: 500 mM NaCl, 20 mM Tris HCl pH 7,9, 8 M urea

c. Purificación

La proteína de interés se ha expresado como una proteína de fusión con el marcador *His Tag* en su extremo N-terminal. Este marcador interacciona con el NiSO₄ presente en la resina en la que se purifica la proteína, que se eluye con una solución que contiene imidazol, el cual disrupta la interacción anterior. Se utilizó una columna Poly-Prep[®] Chromatography (BioRad) equilibrada con la resina comercial Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences) cargada con iones Ni²⁺. Todos los pasos se realizan a 4°C.

En nuestro caso todos los pasos se han realizado en condiciones desnaturizantes en presencia de urea 8 M.

Procedimiento:

1. Añadir en la columna 1 ml de resina (corresponde a cerca 600 µl, ya que la resina está en EtOH 40%).
2. Dejar que el líquido salga de la columna.
3. Comprobar el volumen de resina que queda en la columna y efectuar los pasos siguientes:

ETAPA DEL PROCESO	nº volúmenes resina cargados	REACTIVOS
Preparación columna	3	H ₂ O
	5	Tamp. carga 1x
	3	Tamp. unión
Carga de muestra	1-2 ml	Sobrenadante punto 7
Lavados	6	Tamp. unión + Imidazol 20 mM
Elución	3	Tamp. Unión + Imidazol 40 mM
	3	Tamp. Unión + Imidazol 60 mM
	3	Tamp. Unión + Imidazol 100 mM
	3	Tamp. Unión + Imidazol 200 mM
	3	Tamp. Unión + Imidazol 300 mM
	3	Tamp. Unión + Imidazol 400 mM
	3	Tamp. Unión + Imidazol 500 mM

- Todos los eluyentes se guardan a 4°C.
- Usar 20 µl de cada eluyente para preparar las muestras de proteínas y analizarlas en SDS-PAGE.
- Si se quiere reutilizar la columna, se puede desactivar con EDTA

Soluciones:

- Tampón de carga 8X : 400 mM NiSO₄
- Tampón de unión: 500 mM NaCl, 160 mM Tris HCl pH 7,9, 8 M Urea

d. Renaturalización de ZmXTH1Int

Una vez purificada la proteína ZmXTH1Int, una fracción de esta fue utilizada para la producción de anticuerpos mientras que otra fracción se utilizó para ensayos de actividad enzimática. Como paso previo fue necesario un proceso de renaturalización mediante diálisis a 4°C en un gradiente reverso de urea; se realizaron 4 pasos de diálisis, así como se detalla:

Etapa	Tampón	Duración
1	4 M Urea 500 mM NaCl 40 mM TrisHCl pH7,4 20 mM β-mercaptoetanol	Toda la noche
2	2 M Urea 500 mM NaCl 40 mM TrisHCl pH7,4 20 mM β-mercaptoetanol	7 h
3	500 mM NaCl 40 mM TrisHCl pH7,4 20% glicerol 20 mM β-mercaptoetanol	Toda la noche
4	500 mM NaCl 40 mM TrisHCl pH7,4 20% glicerol	Toda la noche

4.10.2.2 Sobreexpresión en *P.pastoris*

P. Pastoris es una levadura metilotrofa: en ausencia de glucosa como fuente de carbono, es capaz de utilizar el metanol, encendiendo así su promotor *AOX1*, empleado para dirigir la expresión de proteínas recombinantes.

La inducción a la producción de proteínas heterólogas se lleva a cabo por lo tanto añadiendo metanol al medio de cultivo.

a. Expresión a pequeña escala en *erlen meyer*

Una vez individuadas las colonias transformantes, es oportuno hacer un cribado para seleccionar aquellas que expresan mejor la proteína de interés, mediante el siguiente procedimiento:

1. Inocular 25 ml de medio de cultivo BMG con una colonia transformante (desde placa o glicerinado).
2. Crecer a 30°C en agitación (250 rpm) hasta alcanzar una DO_{600} de 2-6 (cerca 48 h).
3. Centrifugar el cultivo a 3000 rpm durante 5 min a T.A.
4. Descartar el sobrenadante y resuspender las células en un volumen de medio con metanol hasta alcanzar una DO_{600} de 10. Para la expresión se han utilizado dos medios alternativos con metanol: un medio "rico" (BMGY) y un medio "mínimo" (BMM)
5. Crecer a 180 rpm a 30°C durante 72 h. Cada 24 h añadir metanol hasta el 0,5% final; recoger alícuotas de 1 ml cada 24 h, incluido antes de inducir la expresión con el medio que lleva metanol (esto constituye el tiempo 0).
6. Centrifugar cada muestra colectada a 3000 rpm durante 5 min, recoger el sobrenadante y guardarlo a -20°C, o bien utilizarlo inmediatamente para SDS-PAGE y *western blot*.

Soluciones:

- YNB 10X : disolver 34 g de *Yeast nitrogen base* y 100 g de sulfato de amonio en 1 litro de H₂O destilada. Filtrar y guardar a 4°C.
- 1M Potassium Phosphate Buffer, pH 5,5 (1 litro): mezclar 132 ml de 1M K₂HPO₄ y 868 ml de 1M KH₂PO₄ y chequear el pH 5,5. Autoclavar. Guardar a T.A.

BMG (buffered minimal glycerol)

Potassium phosphate buffer 1M pH5.5	100 mM
YNB	1X
Biotina	4x10 ⁻⁵ %
Glycerol	1%

BMM (buffered minimal methanol)

Potassium phosphate buffer 1M pH5.5	100 mM
YNB	1X
Biotina	4x10 ⁻⁵ %
Metanol	0,5%

BMGY (Buffered Methanol-complex Medium)

extracto de levadura	10g/L
peptona	20g/L
Potassium phosphate buffer 1M pH5,5	100 mM
YNB	1X
Biotina	4x10 ⁻⁵ %
Metanol	0,5%

b. Expresión a gran escala en bioreactor

Para producir elevada cantidad de proteína recombinante, se efectuaron experimentos de cultivo a elevada densidad celular en un bioreactor Braun Biotech con capacidad de 2 litros, y el cultivo se concentró con un Pellicon® Tangential Flow Ultrafiltration System (Millipore), y se dializó con el mismo sistema contra un tampón sodio citrato a pH 5,5. Estos experimentos se llevaron a cabo en Departament de Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, en colaboración con el grupo del Dr. Pau Ferrer.

Para la producción en bioreactor, se siguió el siguiente protocolo:

1. Inocular en erlen meyer, a partir de un precultivo de 10 ml, un cultivo de 100 ml de cultivo BMGY.
2. Crecer a 30°C en agitación (250 rpm) durante 24 h.
3. Centrifugar el cultivo a 3000 rpm durante 5 min a T.A.
4. Inocular un cultivo de 1,5 litros en bioreactor, con las siguientes condiciones: 30°C de temperatura, velocidad de agitación de 800 rpm y pH 5,5 mantenido por adición de KOH 2 M, concentración de oxígeno disuelto constante en un 20% de saturación a través de la modificación del caudal de aire, entre 1,5 and 2 l min⁻¹.
5. Empezar el cultivo utilizando un medio de cultivo fuente de glicerol (BMGY).
6. Una vez terminado el glicerol (indicado por un aumento de concentración de oxígeno disuelto) añadir metanol hasta una concentración final de 1% (p/v).
7. Terminado el cultivo, eliminar las células mediante centrifugación durante 5 min a 4000 rpm.

4.10.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para determinar la concentración de proteínas se ha utilizado el método descrito por Bradford (1976). Su rango de detección varía entre 1-20 µg/ml y se basa en el cálculo de una recta de regresión a partir de una serie de diluciones de concentración conocida. Una vez calculada la recta, se puede extrapolar la concentración de la muestra problema.

Procedimiento:

1. Preparar 6 muestras estándar, con BSA, de concentraciones conocidas, hasta 20 µg/ml.
2. Añadir a esos volúmenes H₂O hasta 800 µl.
3. Preparar el blanco, diluyendo 2 µl de tampón en el que están diluidas las muestras en 798 µl de H₂O.
4. Preparar las muestras, diluyendo 2 µl de estas en 798 µl de H₂O.
5. Añadir 200 µl de reactivo de Bradford (Bio-Rad), agitar y dejar durante 20 min a T.A.
6. Leer la absorbancia a 595 nm.
7. Calcular la recta de regresión y extrapolar la concentración de las muestras.

4.10.4 OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES EN GALLINA

Para la obtención del anticuerpo policlonal contra ZmXTH1 se ha inmunizado a gallinas de laboratorio en el servicio de Estabulario del IBMB-CSIC. Se han efectuado cuatro inyecciones de 250 µg cada una de antígeno (la proteína recombinante ZmXTH1 expresada en *E.coli* y purificada por afinidad). 15 días después de cada inyección se recogieron los huevos de las gallinas inmunizadas, desde los cuales se purificaron las IgYs tal como se detalla a continuación. Como control negativo, se realizó en paralelo la extracción de las IgYs de las gallinas antes de la inmunización (IgYs pre-impunes).

4.10.4.1 Purificación de las IgYs de gallinas

1. Cascar los huevos y separar las yemas de las claras. Recoger las yemas en una probeta y medir su volumen (v_0), llegando a un volumen máximo de 80 ml (3-4 huevos).
2. Añadir 2 v de solución A y agitar durante 5 min a T.A.
3. Transferir a botes de centrifuga y centrifugar a 12000 rpm durante 10 min a 4°C.
4. Filtrar el sobrenadante a través de dos capas de gasa y medir el volumen recogido (v_1).
5. Añadir 1/3 del volumen v_1 de solución B y agitar durante 5 min a T.A.
6. Centrifugar a 12000 rpm durante 15 min a 4°C.
7. Resuspender el pellet en 1/3 del volumen inicial de las yemas v_0 en PBS 1X.
8. Alicuotar en volúmenes de 500 µl y guardar a -20°C o bien liofilizar hasta la total sequedad.

Soluciones:

- Solución A: 10 mM tampón fosfato sódico pH 7,5, 100 mM NaCl, 5,25% PEG 8000
- Solución B: 10 mM tampón fosfato sódico pH 7,5, 100 mM NaCl, 37,5% PEG 8000

4.10.4.2 Purificación del anticuerpo anti-ZmXTH1 por cromatografía de afinidad

La purificación del anticuerpo anti-ZmXTH1 se llevó a cabo mediante la utilización de la columna HiTrap NHS-activated (1ml, Amersham Pharmacia Biotech). Este protocolo consta de 3 partes: inmovilización del antígeno a la columna, absorción del anticuerpo policlonal de interés y elución del anticuerpo. El protocolo seguido fue el recomendado por la casa comercial con algunas modificaciones. Todos los pasos se han realizado utilizando jeringas de 2 ml y la suave presión del embolo, sin utilizar pompas peristálticas.

Procedimiento:

1. Inmovilización del antígeno a la columna

El antígeno utilizado fue la proteína ZmXTH1-Int expresada en *E.coli* y purificada como se ha descrito en el apartado 4.10.2.1.

Método:

1. Dializar la proteína en tampón de unión durante toda la noche a 4°C. (Es importante tener entre 0,85 y 1 mg total de proteína disuelta en 1 ml de tampón de unión).
2. Montar la columna en un soporte vertical. Desprecintar la parte inferior de la columna y colocar una pieza de cierre.
3. Abrir la columna por la parte superior y colocar un adaptador para jeringas.
4. Lavar el isopropanol de la columna mediante 1 mM HCl frío (3x2 ml). Establecer un flujo de 1ml/min.
5. Lavar con 2 ml de tampón de unión.
6. Inyectar la solución de antígeno.
7. Cerrar la columna e incubar 30 min a T.A.
8. Realizar los siguientes lavados para eliminar las uniones inespecíficas y desactivar el exceso de grupos NHS activos que no se unieron al ligando, y finalmente neutralizar la columna con PBS

REACTIVO	LAVADOS
Tampón de unión	3x2 ml
Tampón A	3x2 ml
Tampón B	3x2 ml
Tampón A	3x2 ml
Tampón B	3x2 ml
PBS	2x2 ml

Soluciones:

- Tampón de unión: 0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8
- Tampón A: 0,5 M etanolamina, 0,5 M NaCl pH 8,3
- Tampón B: 0,5 M acetato de sodio, 0,5 M NaCl pH 4

2. Absorción del anticuerpo a la columna

En nuestro caso el anticuerpo, estando ya en PBS, no necesitaba diálisis previa. En caso de sueros, es importante la previa dialización del suero en PBS.

1. Centrifugar el anticuerpo inmediatamente antes de aplicarlo a la columna.
2. Inyectar el anticuerpo. El flujo recomendado es de 0,2-1 ml/min.
3. Lavar la columna con 10 ml de PBS.

3. Elución del anticuerpo.

1. Preparar los tubos eppendorf donde se va a recolectar el anticuerpo purificado: adicionar a cada tubo 300 µl de 1 M Tris pH 8 para neutralizar.
2. Eluir con 3 ml de solución de elución. Recoger alícuotas de 700 µl en los tubos preparados en el paso anterior. Comprobar el pH.
3. Lavar la columna con PBS y guardar a 4°C en PBS/azida sodica 0,1%.

- Solución de elución: 0,2 M glicina-HCl pH 2,8

4.10.5 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

La electroforesis en gel desnaturante de SDS/poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó como está descrito por Sambrook y col. (1989), utilizando los sistemas Miniprotean Gel-2 y 3 (Biorad), con espaciadores de 1,5 mm en el primer caso, y 0,75 mm en el segundo. La concentración de acrilamida del gel separador fue siempre del 12,5 %. El voltaje utilizado ha sido 80-100 V.

Para la preparación de los geles, se han utilizado los siguientes reactivos. Los volúmenes indicados son suficientes para preparar 2 geles de 0,75 mm de espesor, o 1 gel de 1,5 mm de espesor.

REACTIVO	GEL SEPARADOR	GEL CONCENTRADOR
Acilamida-bisacrilamida 40% (37,5:1)	3,25 ml	0,35 ml
Lower buffer	2,5 ml	----
Upper buffer	----	1 ml
H ₂ O	4,25 ml	2,65 ml
APS 15% (p/v)	40 µl	40 µl
TEMED	5 µl	4 µl

Soluciones:

- Lower buffer: 1,5 M Tris HCl pH 8,8; 0,4% SDS
- Upper Buffer: 0,5 M Tris HCl pH 6,8; 0,4% SDS
- Tampón de electroforesis 10X: 1,92 M glicina; 0,25 M Tris HCl, pH 8,3; 1% SDS
- Tampón de muestras 2X: 125 mM Tris HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 0,04% azul de bromofenol

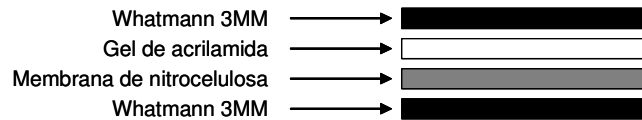
4.10.5.1 Visualización de las proteínas por tinción de Coomassie

Si no se ha realizado una inmunotransferencia, una vez finalizada la electroforesis se ha teñido el gel con una solución de azul de coomassie durante 20 min a T.A., y luego se ha destiñido con metanol/acético/agua (30:10:60), hasta poder ver las bandas de proteínas.

- Solución de Coomassie: 50% (p/v) ácido tricloroacético; 0,45% (p/v) Coomassie Brilliant Blue (Sigma)

4.10.6 WESTERN BLOT

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa utilizando el aparato Transfer Blot Semidry (Bio-Rad). El montaje de la transferencia se realizó como se indica en el siguiente esquema, utilizando papel Whatmann 3MM embebido en el tampón de transferencia. La membrana y el gel se equilibran en este tampón también.



Condiciones de transferencia: 30 min, amperaje constante de 200 mA/cada gel que se transfiere en el aparato.

- Tampón de transferencia: 48 mM Tris, 39 mM Glicina, 20% Metanol, 0,037% SDS

4.10.6.1 Tinción de membranas de nitrocelulosa con solución Ponceau s

1. Una vez finalizada la transferencia, teñir la membrana con rojo Ponceau durante 1 min.
2. Eliminar el exceso de colorante con agua.
3. Marcar con un lapiz la posición de los marcadores de peso molecular.
4. Dejar secar sobre papel de filtro y guardar a T.A., o bien lavar durante 5 min con agua y seguir con la inmunodetección

- Solución Ponceau: 0,1% (p/v) ponceau en 1% ácido acético

4.10.6.2 Inmunodetección

- Todos los pasos se llevan a cabo en agitación suave.
- La dilución del anticuerpo primario inmunopurificado anti-ZmXTH1 fue 1:500 durante un mínimo de 3 h a T.A., o bien toda la noche a 4°C.
- El anticuerpo secundario utilizado es el AffinyPure Donkey Anti Chicken IgY (Jackson ImmunoResearch), a una dilución de 1:10000, durante 1 h a T.A.

Procedimiento:

1. Incubar la membrana con solución de bloqueo 1 h a T.A. (o toda la noche a 4°C).
2. Incubar con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, toda la noche a 4°C.
3. Realizar 4 lavados de 5 min cada uno en PBS-T.
4. Incubar en el anticuerpo secundario durante 1 h.
5. Repetir el paso 3.
6. Realizar la detección.

Soluciones:

- PBS-T: 1X PBS, 0,1% Tween 20
- Solución de bloqueo: 5% (p/v) leche desnatada en PBS-T

Detección

Se ha utilizado el sistema de detección ECL (Amersham), que detecta por quimioluminiscencia la actividad peroxidasa de anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa. Todos los pasos se llevan a cabo en la cámara oscura.

1. Decantar el líquido en exceso de la membrana sobre papel de filtro y colocar la membrana en un casete de autoradiografía sobre Saran wrap, con la cara en la que están las proteínas hacia arriba.
2. Mezclar volúmenes iguales de los componentes 1 y 2 del kit (para dos membranas, 1 ml de cada componente).
3. Añadir la solución a la membrana hasta cubrirla completamente, cubrir con Saran wrap y colocar encima una película de autoradiografía.
4. Exponer durante el tiempo necesario (entre 30 s y 30 min) y revelar la autoradiografía. En nuestro caso hemos incubado entre 2 y 10 min.

4.11 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

4.11.1 ENSAYO XILOGLUCANOENDOTRANSGLUCOSILASA (XET)

Se ha utilizado el ensayo radiométrico, puesto a punto por Fry y col. (1992). Este tipo de ensayo se basa en la reacción entre una molécula de xiloglucano de alto peso molecular (sustrato donador) con un oligosacárido (bajo peso molecular) marcado con ³H (sustrato aceptor), en presencia de un extracto que contiene el enzima XTH. El producto de la reacción se inmoviliza en papel de filtro, que viene lavado exhaustivamente y luego es sumergido en

solución de centelleo para la cuantificación de la radioactividad. Este método se basa en la capacidad de los polisacáridos de alto peso molecular de quedar unidos al papel de filtro después de lavado con agua. De esa manera el producto de la reacción se puede distinguir tanto del sustrato donador, que no es radioactivo, como del sustrato aceptor, que presenta un peso molecular mucho más bajo y por lo tanto no se une por enlace-hidrogeno al papel. La radioactividad detectada será por lo tanto aquella que deriva de los polisacáridos que se han unido a oligosacáridos.

Este tipo de ensayo se ha utilizado para determinar la actividad XET de la proteína recombinante sobreexpresada tanto en *E.coli* como en *P.pastoris*, o bien en extractos vegetales de plantas de *A. thaliana* silvestres o sobreexpresantes ZmXTH1.

En el caso de los extractos vegetales, se prepararon así como sigue:

1. Homogenizar el material vegetal a T.A. con tampón de extracción (1ml/g peso fresco)
2. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 min y recoger el sobrenadante
3. Cuantificar el contenido proteico de cada extracto
4. Ensayar para actividad XET.

- Tampón de extracción: 300 mM Succinato Na⁺ pH 5,5, 10 mM CaCl₂, 10% glicerol

En algunos casos se han ajustado los volúmenes de los diferentes extractos de tal manera de ensayar la misma cantidad de proteína para cada extracto, en otros casos se han ensayado los mismos volúmenes, refiriéndose en este segundo caso la actividad enzimática al peso fresco inicial del tejido.

El protocolo utilizado para efectuar ensayos XET *in vitro* es el siguiente:

1. Preparar una mezcla de reacción, de un volumen de 30 µl finales, que contiene:
 - extracto enzimático
 - 3,3 KBq [³H]XXXGol (sustrato aceptor)
 - 2 mg/ml xiloglucano de tamarindo (sustrato donador)
 - 300 mM Succinato Na⁺ pH 5,5
 - 10 mM CaCl₂
2. Incubar a 25° C a diferentes tiempos (entre 1 y 24 h) y bloquear la reacción añadiendo 30 µl de ácido fórmico 30%. Como control negativo se utiliza el tiempo 0, en el que el ácido fórmico (solución de bloqueo) se añade al extracto enzimático antes que los sustratos.
3. Inmovilizar la solución de reacción en papel de filtro (Whatman 3MM, de aprox. 3cmx3cm), dejar secar (durante aproximadamente 30 min) y lavar exhaustivamente con H₂O para remover toda la radioactividad no incorporada.
4. Dejar secar, poner el papel en un vial de centelleo, añadir 2 ml de líquido de centelleo y medir la radioactividad en un contador de centelleo.

4.11.2 ENSAYOS ENDOTRANSGLICOSILASA (ET)

Para detectar la existencia de otras posibles actividades endotransglucosilasa para ZmXTH1, se ha efectuado ensayos enzimáticos con sustratos donadores diferentes de los xiloglucanos.

4.11.2.1 Reacción enzimática

El ensayo se ha llevado a cabo tal como se describe para el ensayo XET (puntos 1 y 2 del apartado 4.11.1), utilizando los sustratos donadores y aceptores que se indican en la tabla 2.3 en la página 72.

4.11.2.2 Detección

Para la detección, en el caso de determinados sustratos donadores, como las hemicelulosas A y B de maíz, ha sido posible aplicar el mismo método que se utiliza para la actividad XET (puntos 3 y 4). En otros casos, para determinar la incorporación de los oligosacáridos (sustratos aceptores) en productos de alto peso molecular ha sido necesario utilizar la técnica de cromatografía en papel, tal como se describe a continuación.

Cromatografía en papel

La cromatografía en papel se basa en la distribución de moléculas en dos fases: una fase estacionaria, normalmente una hoja de papel de filtro de alta calidad, y una fase móvil, un solvente orgánico que asciende o desciende (según el tipo de cromatografía) por capilaridad por el papel llevando los compuestos que sean afines para el solvente. Los diferentes componentes de una muestra se separan según su mayor o menor absorción a la fase estacionaria respecto a cuanto rápidamente se absorben en la fase móvil. En nuestro caso, se ha explotado esta técnica (cromatografía de tipo descendente) para detectar la posible incorporación de oligosacáridos marcados con ^3H (que migran en el papel durante la cromatografía) en polisacáridos de alto peso molecular, que no migran y por lo tanto se quedan retenidos en el sitio de carga de la muestra.

El solvente orgánico utilizado ha sido Etil acetato/acido acético/ H_2O (10:5:6).

El protocolo seguido es el siguiente:

1. Aplicación de las muestras a analizar.

- Trazar con un lápiz una línea muy débil a unos 9 cm de uno de los dos bordes inferiores de una hoja de papel Whatman 3MM.
- Señalar débilmente en la línea 22 puntos, distribuidos equitativamente a lo ancho de la hoja (por lo tanto a una distancia de 2 cm cada uno). Señalar también por debajo de cada punto el nombre de cada muestra que se aplicará en ello.
- Aplicar en cada punto una muestra diferente (productos de la reacción). Se aplican 10 μl a la vez, procurando que se extienda lo menos posible, y esperando que el spot esté seco entre cada aplicación.

2. Elución de las muestras.

La cromatografía se realiza en una caja saturada de vapor de agua, atravesada por un cajetín semicilíndrico lleno con el solvente orgánico.

- Depositar el papel con la banda de muestras justo al salir el papel del cajetín.
- Introducir una varilla a lo largo de la caja, al fin de sujetar el papel.
- Cerrar la caja y dejar 24 h. El solvente comenzará ascendiendo por el papel por capilaridad y continuará bajando al salir de la cajetilla, pasando por la zona de muestra y arrastrándola, consiguiéndose así la separación.
- Una vez acabada la cromatografía, dejar secar el papel.
- Cuando el papel está seco, recortar (3x3 cm aprox.) el sitio de carga de las diferentes muestras (origen).
- Poner los trozos de papel recortados, cada uno por separado, en un vial de centelleo, añadir 2 ml de líquido de centelleo y medir la radioactividad en un contador de centelleo.

4.12 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA MEDIANTE BIOLÓGICA

4.12.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA BIOLÓGICA

Las células epidérmicas de escamas de bulbo de cebolla se colocan en placas con medio MS, 2 h antes de bombardear.

4.12.2 PREPARACIÓN DE LAS PARTÍCULAS DE ORO

1. En eppendorf de 1,5 ml de la marca Treff Lab, pesar 60 mg de partículas y añadir 1 ml de EtOH HPLC. Agitar en vortex durante 10 min.
2. Centrifugar 1 min a 10000 rpm y descartar el sobrenadante.
3. Añadir 1 ml de glicerol estéril 50% y agitar en vortex durante 30 s. Repetir el paso 2.
4. Repetir el lavado con glicerol dos veces más.
5. Resuspender las partículas en 1 ml de glicerol estéril 50%, y agitar al vortex durante 1 min.
6. Repartir en alícuotas de 20 μ l y guardar a -20°C.

4.12.3 PRECIPITACIÓN DEL DNA

1. Sonicar durante 2 min las partículas de oro anteriormente preparadas
2. Agitando al vortex las partículas (20 μ l), añadir por el siguiente orden (todo en frío):
 - 0,5 μ g/ μ l de DNA (en un total de aproximadamente 10 μ l)
 - 25 μ l CaCl₂ 2.5 M
 - 15 μ l espermidina 0,1 M
3. Agitar 30 s e incubar 15 min en hielo.

4. Spin de centrifuga y descartar el sobrenadante.
5. Añadir 1 ml de EtOH HPLC frío.
6. Agitar 30 s e incubar 15 min en hielo.
7. Repetir el paso 4.
8. Añadir 150 μ l de EtOH HPLC frío
9. Agitar 30 s e incubar en hielo hasta el momento de bombardear.

4.12.4 DISPARO DE LOS MICROPROYECTILES: BOMBARDEO CON EL PDS1000/He

1. Poner en marcha la cabina de flujo laminar. Esterilizar el aparato y las piezas sueltas con EtOH absoluto. En placas Petri, esterilizar brevemente con EtOH absoluto las membranas portadoras y las rejillas de parada. A continuación se ponen a secar (es importante que todo esté bien seco para su correcto uso).
2. Centrifugar el DNA precipitado, descartar el sobrenadante y resuspender en 15 μ l de EtOH HPLC frío. Sonicar 3 veces durante 3 s y agitar. Aplicar 7,5 μ l /membrana portadora (cantidad para preparar 2 membranas).
3. Esterilizar los discos de ruptura con isopropanol y dejarlos secar.
4. Encender la bomba de vacío. Abrir el grifo de la bombona de helio. Ajustar la presión para que sea 200 psi mayor que la resistencia de los discos de ruptura que se van a usar (psi: "pound per square inch", unidad de presión inglés: libra por pulgada cuadrada). En nuestro caso, se utilizaron discos de ruptura de 900 psi, por lo tanto la presión se ajustó a 1100.
5. Poner el disco de ruptura en su soporte y enroscarlo en la extremidad del cilindro de gas hasta que se quede fijo (dar el ajuste final con el palillo de hierro).
6. Montar el soporte disparador: poner una rejilla y a continuación el soporte con la membrana, de manera que la cara de las partículas quede mirando hacia la rejilla. Cerrar con el tapón del disparador.
7. Poner el soporte disparador por debajo del soporte del disco, en el nivel 5 (considerando como 1 el más cerca de la base). Ajustar la distancia con el soporte del disco para que sea 11 mm.
8. Poner la placa con el material a ser bombardeado en el nivel 3 y cerrar la cámara. Asegurarse de que se ha quitado la tapa de la placa Petri.
9. Accionar la bomba de vacío hasta que el manómetro llegue a 27 (0,1 atm). Accionar el botón de disparo hasta que se rompa la membrana. Abrir el vacío inmediatamente.
10. Una vez que la presión hay subido a nivel normal, sacar la muestra.
11. Realizar dos disparos por cada placa Petri, girando la placa de 90° entre cada disparo.

Una vez acabada la transformación, las células epidérmicas han seguido dos tratamientos alternativos: se han dejado en las mismas placas MS (pH 5,8) en las que se ha efectuado el bombardeo; alternativamente, se han incubado en placas con 20 mM PIPES (pH 7 con KOH). En ambos casos, las placas se han colocado en oscuridad a 22-24 °C durante 24-60 h.

Los ensayos de plasmolisis se efectuaron incubando la epidermis de cebolla en manitol 0,8 M durante 15 min-1 h.

4.12.5 OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO CONFOCAL

Las muestras fueron observadas en el microscopio confocal Leica TCS SP del IBMB-CSIC (Barcelona).

4.13 TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE *A. thaliana* CON *A. tumefaciens*

Para la obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresaran ZmXTH1, se han transformado plantas por infiltración, por el método descrito por Clough y Bent (1998). Una vez transformada la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* tal como se describe en el apartado 4.8.2, se han transformado las plantas siguiendo el método que se detalla a continuación.

Procedimiento:

1. Crecer las plantas de Arabidopsis a 22°C, con un fotoperíodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad, para potenciar el crecimiento de las hojas de la roseta basal. Al cabo de 4 semanas cambiar el fotoperíodo para que las plantas inicien el ciclo de reproducción.
2. Cuando las plantas tengan ya el tallo primario desarrollado, seccionarlo con un bisturí en la base para promover la aparición de tallos secundarios (interesa que las plantas a transformar sean frondosas y contengan el mayor número posible de inflorescencias). Repetir esta operación de 3 a 4 veces.
3. Cuando las plantas estén listas para ser infiltradas (8-9 semanas desde que fueron transplantadas), realizar una estría a partir de un cultivo congelado de *Agrobacterium* transformado con el DNA de interés, en una placa de medio YEB suplementado con Carb, Rif y Kan. Incubar a 28°C hasta que crezcan las colonias (aproximadamente dos días).
4. Escoger una colonia individual e inocular con ella un cultivo de 5 ml de medio YEB suplementado con Carb, Rif y Kan. Crecer el cultivo durante 24 h con agitación a 200 rpm, y 28°C.
5. Inocular 1 ml del cultivo anterior en 500 ml de YEB suplementado con Rif y Kan. Crecer el cultivo durante 24 h con agitación a 200 rpm, y 28°C.
6. Controlar el crecimiento del cultivo por determinación de la densidad óptica a 600 nm hasta que se obtenga un valor de 0,8 a 1. Sedimentar las células a 4500 rpm durante 25 min y 4°C. Resuspender el sedimento celular en 250 ml de la solución de infiltración.

7. Llenar un recipiente con la solución de infiltración. Agitar suavemente dicha solución e introducir los brotes florales de la planta en el líquido. Dejar la planta en contacto con la solución entre 15 y 20 s.
 8. Cubrir la planta con un plástico durante 48 h para mantener la humedad e introducirlas en el incubador a 22°C y con un fotoperíodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad.
 9. Poner las plantas a crecer en el incubador a 22°C en invernadero hasta la recolección de las semillas.
 10. Para la selección de las semillas transgénicas, sembrar las semillas obtenidas en placas de Petri con medio MS suplementado con Higo y Tim. Transplantar después a tierra las plántulas resistentes.
- Solución de infiltración: 5 % de sacarosa, 0,03 % del tensoactivo Silwet L-77. La solución de infiltración se prepara en el momento de utilizarla y no es necesario autoclavarla.

4.14 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para analizar la ultraestructura celular de las plantas de arabidopsis que sobreexpresan ZmXTH1, se procesaron muestras de tallo para su observación por microscopía electrónica de transmisión.

Para ello, segmentos de tallo basal de plantas adultas de 5 semanas, transgénicas y silvestres, se incluyeron en la resina LR White[®] (London Resin Company) para su siguiente corte al ultramicrotomo.

4.14.1 PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS

La impregnación de los tejidos en la resina LR White[®] es un proceso que consta de tres etapas.

4.14.1.1 Fijación

Se utilizó una mezcla de paraformaldehído y glutaraldehído. El paraformaldehído penetra rápidamente y fija las estructuras celulares y el glutaraldehído las estabiliza permanentemente, produciendo puentes transversales entre las proteínas.

Procedimiento:

1. Incubar las muestras en solución fijadora.
2. Aplicar vacío durante 5 h para que la solución fijadora penetre bien en las muestras.
3. Incubar a 4°C durante toda la noche.
4. Cambiar la solución fijadora por la solución de lavado, y realizar 4 lavados de 15 min cada uno.

5. Realizar 4 lavados de 15 min cada uno en agua.

Soluciones:

- Solución de fijación: 2% paraformaldehído y 0,2% glutaraldehído, disueltos en tampón fosfato de sodio 0,1 M pH 7,2
- Solución de lavado: 0,1 M Tampón fosfato de sodio pH 7,2

4.14.1.2 Deshidratación

Ya que la resina de inclusión es sólo parcialmente hidrofoba, es suficiente una deshidratación parcial. El agente deshidratante del tejido para la inclusión en la resina LR White fue etanol con una serie creciente hasta el 90%.

Procedimiento:

Incubar las muestras en etanol 25% durante 20 min.

Incubar las muestras en etanol 50% durante 40 min, cambiando la solución cada 20 min.

Incubar las muestras en etanol 70% durante 20 min.

Incubar las muestras en etanol 80% durante 20 min.

Incubar las muestras en etanol 90% durante 40 min, cambiando la solución cada 20 min.

4.14.1.3 Inclusión

- La LR White es una resina acrílica parcialmente hidrófoba (compatible con 12% de agua), cuya polimerización es activada por el calor.
- Es muy tóxica por lo que se recomienda utilizar guantes y evitar inhalar los vapores que se desprenden.
- La incorporación de oxígeno interfiere en la polimerización; por lo tanto, la resina tiene que ser previamente desgasificada por burbujeo de gas nitrógeno con la ayuda de una pipeta Pasteur.

Durante la inclusión, el etanol es progresivamente substituido por la resina.

Procedimiento:

1. Incubar las muestras en una mezcla de etanol/resina (2:1), durante 30 min.
2. Incubar en una mezcla de etanol/resina (1:1) durante 30 min.
3. Incubar en una mezcla de etanol/resina (1:2) durante 30 min.
4. Incubar en resina pura durante 30 min.
5. Realizar un cambio con resina pura y aplicar vacío durante 5 min.
6. Dejar incubando toda la noche, a 4°C.
7. Al día siguiente incluir cada muestra individual en una cápsula de gelatina rellena con resina (para introducirlas utilizar un palillo), cerrar las cápsulas intentando que entre el mínimo de aire posible e incubarlas a 50° C durante 24 h.

En su conjunto, todos los pasos están resumidos en la siguiente tabla

ETAPA	REACTIVO	DURACIÓN
FIJACIÓN	2% paraformaldehído/ 0,2% glutaraldehído/ tampón fosfato 0,1 M	2-4 h temp. ambiente. 12-16 h 4°C
LAVADOS	Tampón fosfato 0,1 M H ₂ O	4x15 min 3x15 min
DESHIDRATACIÓN	EtOH 25% EtOH 50% EtOH 70% EtOH 80% EtOH 90%	1x20 min 2x20 min 1x20 min 1x20 min 2x20 min
INFILTRACIÓN	EtOH:LR White (2:1) EtOH:LR White (1:1) EtOH:LR White (1:2) LR White	1x30 min 1x30 min 1x30 min 2x30 min 12-16 h 4°C
POLIMERIZACIÓN	LR White	24 h 50°C

4.14.2 PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS INCLUIDOS

El corte, la tinción y la observación de las muestras por microscopía electrónica se han realizado en el laboratorio de investigación dirigido por la D.ra Katia Ruel en el CERMAV-CNRS de Grenoble (Francia).

4.14.2.1 Obtención de cortes ultrafinos

Una vez polimerizados, los bloques son estables a T.A. y están listos para ser manipulados (cada cápsula con una muestra individual constituye un bloque). Para realizar los cortes ultrafinos de las muestras, de 50 nm, se ha utilizado un ultramicrotomo Leica UC6. Las secciones cortadas se han recogido en agua en anillos de plástico y se han mantenido en los anillos de plástico hasta el final del procedimiento de tinción (alternativamente se han utilizado rejillas de cobre, pero la manipulación en anillos de plástico es más fácil).

4.14.2.2 Tinción PATAg

El PATAg (PA: Periodic Acid, T: Thio carbohydrazide, Ag: silver) es un método para teñir los polisacáridos (celulosa, hemicelulosas, pectinas etc.) de la pared (Ruel et al., 1977) en análisis por microscopía electrónica. En nuestro caso, se utilizó para la observación de las paredes de las plantas transgénicas de arabidopsis sobreexpresantes ZmXTH1 y su comparación con plantas silvestres.

Procedimiento:

Transferir secciones ultrafinas montadas en rejillas de cobre o flotantes en anillos de plástico en diferentes soluciones, tal como se describe en la tabla siguiente. Todos los pasos se efectúan a T.A.

REACTIVO	DURACIÓN
Ácido periódico 5%	1 h 30 min
H ₂ O	4x3 min
Tiocarbohidrazide 0,2% en ácido acético 20%	48 h
ácido acético 20%	3x5 min
ácido acético 10%	4x3 min
ácido acético 5%	1x2 min
ácido acético 2,5%	1x2 min
H ₂ O	4x3 min
H ₂ O	1 h
Proteinato de plata 1%	30 min (en oscuridad)
H ₂ O	1x1 min
H ₂ O	3x3 min

Si el proceso se ha efectuado en anillos de plástico, las muestras se transfieren a rejillas de cobre. Las rejillas se dejan secar en papel de filtro y se guardan en cajitas apropiadas.

Reactivos:

- Ácido periódico 5%: disolver 2,5 g de ácido periódico en 50 ml de agua. La solución se guarda a 4° C por un máximo de una semana.
- Tiocarbohidrazide (TCH) 0,2%: disolver 200 mg de TCH en 100 ml de ácido acético 20%. La solución se guarda a 4°C por un máximo de 48 h.
- Proteinato de plata 1%: disolver 500 mg de proteinato de plata en 50 ml de agua. La solución se guarda a 4° C en oscuridad por un máximo de 3 semanas.

4.14.2.3 Observación al microscopio electrónico

Las muestras fueron observadas a 80 kV en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM200 "cryo" en el CERMAV-CNRS de Grenoble (Francia).

4.15 ANÁLISIS DE DATOS

La secuenciación se ha realizado mediante un secuenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) en el servicio de Secuenciación del centro IBMB-CSIC.

Las comparaciones de secuencias con las bases de datos (GenBank) se han realizado mediante BLASTN (compara la secuencia nucleotídica con bases de datos nucleotídicas) y BLASTX (compara la secuencia nucleotídica traducida con bases de datos proteicas)

La traducción de las secuencias nucleotídicas a secuencias aminoacídicas en las diferentes pautas de lectura, así como las predicciones de peso molecular y punto isoeléctrico de las proteínas se han realizado utilizando el programa Expasy (<http://us.expasy.org/>).

La predicción de la secuencia correspondiente al péptido señal de ZmXTH1 se realizó con el programa SignalP 3.0 Server disponible en la dirección <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>

Los alineamientos de secuencias se han realizado con el programa de alineamiento múltiple CLUSTAL W, (versión 1.5; Higgins et al., 1994), disponible en la dirección <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>. La visualización y optimización de los alineamientos nucleotídicos se realizó mediante el programa GENEDOC (versión 2.6.002; Nicholas and Nicholas, 1997).

El árbol filogenético se ha generado con el Phylip package program (Felsenstein, 1993). Los análisis de fiabilidad de las relaciones (*bootstrap*) establecidas por este programa se calcularon para 1000 replicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Akamatsu T, Hanzawa Y, Ohtake Y, Takahashi T, Nishitani K, Komeda Y (1999) Expression of endoxyloglucan transferase genes in acaulis mutants of Arabidopsis. *Plant Physiol* 121: 715–721.
- Albersheim P (1976) The primary cell wall, in *Plant Biochemistry* (Bonner J, Varner JE, eds), pp. 226–277, Academic Press, New York.
- Alonso-Simon A, Garcia-Angulo P, Encina AE, Alvarez JM, Acebes JL, Hayashi T (2007) Increase in XET activity in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cells habituated to dichlobenil. *Planta* [Epub ahead of print]
- Antosiewicz DM, Purugganan MM, Polisensky DH, Braam J (1997) Cellular localization of Arabidopsis xyloglucan endotransglycosylase-related proteins during development and after wind stimulation. *Plant Physiol* 115: 1319–1328.
- Aubert D, Herzog M (1996) A new cDNA encoding a xyloglucan endotransglycosylase-related polypeptide (AtXTR8) preferentially expressed in seedling, root and stem of Arabidopsis thaliana. *Plant Science* 121:120.
- Barrachina C, Lorences EP (1998) Xyloglucan endotransglycosylase activity in pine hypocotyls. Intracellular localization and relationship with endogenous growth. *Physiol Plant* 102: 55-60.
- Baydoun EA-H, Fry SC (1989) In vivo degradation and extracellular polymer-binding of xyloglucan nonasaccharide, a natural anti-auxin. *J Plant Physiol* 134: 453–459.
- Baskin TI (2001) On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. *Protoplasma* 215: 150-71
- Bayer EM, Bottrill AR, Walshaw J, Vigouroux M, Naldrett MJ, Thomas CL, Maule AJ (2006) Arabidopsis cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. *Proteomics* 6: 301-11.
- Becnel J, Natarajan M, Kipp A, Braam J (2006) Developmental expression patterns of Arabidopsis XTH genes reported by transgenes and Genevestigator. *Plant Mol Biol*. 61: 451-67.
- Boevink P, Martin B, Oparka K, Cruz SS, Hawes C (1999) Transport of virally expressed green fluorescent protein through the secretory pathway in tobacco leaves is inhibited by cold shock and brefeldin A. *Planta* 208: 392-400.
- Boevink P, Oparka K, Santa Cruz S, Martin B, Betteridge A, Hawes C (1998) Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J* 15: 441-7.
- Bollok M, Henriksson H, Kallas A, Jahic M, Teeri TT, Enfors SO (2005) Production of poplar xyloglucan endotransglycosylase using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol* 126: 61-77.
- Borris R, Buettner K, Maentselae P (1990) Structure of the [beta]-1,3-1,4-glucanase gene of *Bacillus macerans*: homologies to other [beta]-glucanases. *Mol Gen Genet* 222: 278-283.
- Boudart G, Jamet E, Rossignol M, Lafitte C, Borderies G, Jauneau A, Esquerré-Tugayé MT, Pont-Lezica R (2005) Cell wall proteins in apoplastic fluids of Arabidopsis thaliana rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics* 5: 212-221.
- Boudet AM (2003) Towards an understanding of the supramolecular organization of the lignified wall. In: *The plant cell wall, Annual Plant Reviews Vol.8*. Ed. J.K.C. Rose. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 155-182.

- Bourquin V, Nishikubo N, Abe H, Brumer H, Denman S, Eklund M, Christiernin M, Teeri TT, Sundberg B, Mellerowicz EJ (2002) Xyloglucan endotransglycosylases have a function during the formation of secondary cell walls of vascular tissues. *Plant Cell* 14: 3073–3088.
- Braam J, Davis RW (1990) Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell* 60: 357–364.
- Bradford MM (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.
- Brett CT, Waldron KW (1996) *Biochemistry and physiology of plant cell walls*. London, UK: Chapman & Hall.
- Buckeridge MS, Pessoa dos Santos H, Tiné MAS (2000) Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiol Biochem* 38: 141-156.
- Campbell P, Braam J (1998) Co- and/or post-translational modifications are critical for TCH4 XET activity. *Plant J* 15: 553-61.
- Campbell P, Braam J (1999a) In vitro activities of four xyloglucan endotransglycosylases from *Arabidopsis*. *Plant J* 18: 371-82.
- Campbell P, Braam J (1999b) Xyloglucan-endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. *Trends Plant Sci* 4: 361-366.
- Carpita NC (1996) The structure and biogenesis of the cell wall of grasses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol* 47: 445-476.
- Carpita NC, Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3: 1-30.
- Carpita NC, Defernez M, Findlay K, Wells B, Shoue DA, Catchpole G, Wilson RH, McCann MC (2001) Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiol* 127: 551-65
- Català C, Rose JKC, Bennett AB (1997) Auxin regulation and spatial localization of an endo-1,4-b-D-glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. *Plant J* 12: 417-426.
- Català C, Rose JK, York WS, Albersheim P, Darvill AG, Bennett AB (2001) Characterization of a tomato xyloglucan endotransglycosylase gene that is down-regulated by auxin in etiolated hypocotyls. *Plant Physiol* 127:1180-92.
- Chen F, Nonogaki H, Bradford KJ (2002) A gibberellin-regulated xyloglucan endotransglycosylase gene is expressed in the endosperm cap during tomato seed germination. *J Exp Bot* 53: 215–223.
- Chen AP, Zhong NQ, Qu ZL, Wang F, Liu N, Xia GX (2007) Root and vascular tissue-specific expression of glycine-rich protein AtGRP9 and its interaction with AtCAD5, a cinnamyl alcohol dehydrogenase, in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res* 120:337-43.
- Cho SK, Kim JE, Park JA, Eom TJ, Kim WT (2006) Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper CaXTH3, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *FEBS Lett* 580: 3136-3144.
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743.
- Cosgrove DJ, Sovonick-Dunford SA (1989) Mechanism of gibberellin-dependent stem elongation in peas. *Plant Physiol* 89: 184-191.

- Cosgrove DJ (1993) How do plant cell walls extend? *Plant Physiol* 102: 1–6.
- Cosgrove DJ (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 391–417.
- Cosgrove DJ (2001) Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiol* 125: 131–134.
- Cosgrove DJ (2003) Expansion of the plant cell wall. In: *The plant cell wall, Annual Plant Reviews Vol.8*. Ed. J.K.C. Rose. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 237–263.
- Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 850–61.
- Cregg JM, Russell KA (1998) Transformation. *Methods Mol Biol* 103: 27–39.
- Darley CP, Forrester AM, McQueen-Mason SJ (2001) The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Mol Biol* 47: 179–195.
- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* 13: 4777–4788.
- de Silva J, Jarman CD, Arrowsmith DA, Stronach MS, Chengappa S, Sidebottom C, Reid JSG (1993) Molecular characterization of a xyloglucan-specific endo-(1-4)- β -D-glucanase (xyloglucan endo-transglycosylase) from nasturtium seeds. *Plant J* 3: 701–711.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1: 19–21.
- Dimmer E, Roden L, Cai D, Kingsnorth C, Mutasa-Gottgens E (2004) Transgenic analysis of sugar beet xyloglucan endo-transglucosylase/hydrolase Bv-XTH1 and Bv-XTH2 promoters reveals overlapping tissue-specific and wound-inducible expression profiles. *Plant Biotechnol J* 2: 127–139.
- Divol F, Vilaine F, Thibivilliers S, Kusiak C, Sauge MH, Dinant S (2007) Involvement of the xyloglucan endotransglycosylase/hydrolases encoded by celery XTH1 and *Arabidopsis* XTH33 in the phloem response to aphids. *Plant Cell Environ* 30: 187–201.
- Djerbi S, Lindskog M, Arvestad L, Sterky F, Teeri TT (2005) The genome sequence of black cottonwood (*Populus trichocarpa*) reveals 18 conserved cellulose synthase (CesA) genes. *Planta* 221:739–746.
- Doblin MS, Kurek I, Jacob-Wilk D, Delmer DP (2002) Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol* 43: 1407–1420.
- Doblin MS, Vergara CE, Read SM, Newbigin E, Bacic A (2003) Plant cell wall biosynthesis: making the bricks. In: *The plant cell wall, Annual Plant Reviews Vol.8*. Ed. J.K.C. Rose. Blackwell Publishing, Oxford, 183–222.
- Drew MC (1997) Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 223–250.
- Dumville JC, Fry SC (2003) Solubilisation of tomato fruit pectins by ascorbate: a possible non-enzymic mechanism of fruit softening. *Planta* 217: 951–961.
- Edelmann HG, Fry SC (1992) Effect of Cellulose Synthesis Inhibition on Growth and the Integration of Xyloglucan into Pea Internode Cell Walls. *Plant Physiol* 100: 993–997.
- Edwards M, Dea ICM, Bulpin PV, Reid, JSG (1985) Xyloglucan (amyloid) mobilisation in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. seeds following germination. *Planta* 163:

133–140.

- Edwards M, Dea IC, Bulpin PV, Reid JS (1986) Purification and properties of a novel xyloglucan-specific endo-(1-4)- β -D-glucanase from germinated nasturtium seeds (*Tropaeolum majus* L.), *J Biol Chem* 261: 9489–9494.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19:1349.
- Fanutti C, Gidley MJ, Reid JS (1993) Action of a pure xyloglucan endo-transglycosylase (formerly called xyloglucan-specific endo-(1 \rightarrow 4)-beta-D-glucanase) from the cotyledons of germinated nasturtium seeds. *Plant J* 3: 691–700.
- Fanutti C, Gidley MJ, Reid JS (1996) Substrate subsite recognition of the xyloglucan endo-transglycosylase or xyloglucan-specific endo-(1-4)- β -D-glucanase from the cotyledons of germinated nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seeds. *Planta* 200: 221–228.
- Farkas V, Sulova Z, Stratilova E, Hanna R, Maclachlan G (1992) Cleavage of xyloglucan by nasturtium seed xyloglucanase and transglycosylation to xyloglucan subunit oligosaccharides. *Arch Biochem Biophys* 298: 365–70.
- Felsenstein J (1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Franke R, Schreiber L (2007) Suberin - a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Curr Opin Plant Biol*. [Epub ahead of print]
- Fry SC (1989) The structure and functions of xyloglucan. *J Exp Bot* 40: 1–11.
- Fry SC (1997) Novel 'dot-blot' assays for glycosyltransferases and glycosylhydrolases: optimization for xyloglucan endotransglycosylase (XET) activity. *Plant J* 11: 1141–1150.
- Fry SC (1998) Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem J* 332: 507–515.
- Fry SC (2004) Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytol* 161: 641–675.
- Fry SC, Smith RC, Renwick KF, Martin DJ, Hodge SK, Matthews KJ (1992) Xyloglucan-endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem J* 282: 821–828.
- Fry SC, York WS, Albersheim P, Darvill A, Hayashi T, Joseleau J-P, Kato Y, Lorences EP, Maclachlan GA, McNeil M, Mort AJ, Reid JGS, Seitz HU, Selvendran RR, Voragen AGJ, White AR (1993) An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol Plant* 89: 1–3.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalima T, Oliphant A, Briggs S (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 296: 92–100.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557–580.
- Hayashi T (1989) Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant*

Mol Biol 40: 139-168.

- Hazen SP, Scott-Craig JS, Walton JD (2002) Cellulose synthase-like genes of rice. *Plant Physiol* 128: 336-40.
- Henriksson H, Denman SE, Campuzano ID, Ademark P, Master ER, Teeri TT, Brumer H 3rd. (2003) N-linked glycosylation of native and recombinant cauliflower xyloglucan endotransglycosylase 16A. *Biochem J* 375: 61-73.
- Herbers K, Lorences EP, Barrachina C, Sonnewald U (2001) Functional characterisation of *Nicotiana tabacum* xyloglucan endotransglycosylase (NtXET-1): generation of transgenic tobacco plants and changes in cell wall xyloglucan. *Planta* 212: 279-87.
- Hetherington PR, Fry SC (1993) Xyloglucan endotransglycosylase activity in carrot cell suspensions during cell elongation and somatic embryogenesis. *Plant Physiol* 103: 987-992.
- Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson J.D, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTALW: improving the sensibility of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 22: 4673-4680.
- Hooke R (1665) *Micrographia*. (1961 facsimile reproduction of original, 1st edn published by Dover Inc, NY, USA). London, UK: Royal Society of London.
- Hoson T, Masuda Y (1992) Relationship between polysaccharide synthesis and cell wall loosening in auxin-induced elongation of rice coleoptile segments. *Plant Sci* 83: 149-154.
- Hye SY, Kwon C, Bin GK, June SL, Han T, Soo CC, Kim SK (2005) A xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase1, VrXTH1, is associated with cell elongation in mungbean hypocotyls. *Phys Plant* 125: 106-113.
- Imoto K, Yokoyama R, Nishitani K (2005) Comprehensive approach to genes involved in cell wall modifications in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 58: 177-192.
- Inouhe M, Yamamoto R, Masuda Y (1984) Auxin-induced changes in the molecular weight distribution of cell wall xyloglucans in *Avena* coleoptiles. *Plant Cell Physiol* 25: 1341-1351.
- Jamet E, Canut H, Boudart G, Pont-Lezica RF (2006) Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends Plant Sci* 11: 33-39.
- Jan A, Yang G, Nakamura H, Ichikawa H, Kitano H, Matsuoka M, Matsumoto H, Komatsu S (2004) Characterization of a xyloglucan endotransglucosylase gene that is up-regulated by gibberellin in rice. *Plant Physiol* 136: 3670-3681.
- Jarvis MC, Briggs SPH, Knox JP (2003) Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant Cell Environ* 26: 977-989.
- Jeffree CE (1996) Structure and ontogeny of plant cuticles. In: G. Kerstiens, Editor, *Plant Cuticles*, BIOS Scientific Publishing Ltd., Oxford pp. 33-82.
- Jetter R, Kunst L, Samuels AL (2006) Composition of plant cuticular waxes. In M Riederer, C Mueller, eds, *Biology of the plant cuticle*, Annual Plant Reviews 23, Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp 145-181.
- Johansen JN, Vernhettes S, Hofte H (2006) The ins and outs of plant cell walls. *Curr Opin Plant Biol* 9: 616-20.
- Johansson P, Brumer H 3rd, Baumann MJ, Kallas AM, Henriksson H, Denman SE, Teeri TT, Jones TA (2004) Crystal structures of a poplar xyloglucan endotransglycosylase reveal details of transglycosylation acceptor binding. *Plant Cell*

16: 874-86.

- Josè-Estanyol M, Puigdomènech P (2000) Plant cell wall glycoproteins and their genes. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 97-108.
- Juncosa M, Pons J, Dot T, Querol E, Planas A (1994) Identification of active site carboxylic residues in *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4 beta-D-glucan 4-glucanohydrolase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 269: 14530-14535.
- Kallas AM, Piens K, Denman SE, Henriksson H, Faldt J, Johansson P, Brumer H, Teeri TT (2005) Enzymatic properties of a native and deglycosylated hybrid aspen (*Populus tremula* x *tremuloides*) xyloglucan endotransglycosylase 16A expressed in *Pichia pastoris*. *Biochem J* 390: 105-113.
- Kamijima O (1981) Consideration on the mechanism of expression of dwarf genes in rice plants. II. The actions of dwarf genes on cell division and cell elongation in parenchyma of internode. *Jpn J Breed* 31: 302-315.
- Kato Y, Ito S, Iki K, Matsuda K (1982) Xyloglucan and β -D-glucan in cell walls of rice seedlings. *Plant Cell Physiol* 23: 351-364
- Keegstra K, Talmadge KW, Bauer WD, Albersheim P (1973) The Structure of Plant Cell Walls: III. A Model of the Walls of Suspension-cultured Sycamore Cells Based on the Interconnections of the Macromolecular Components. *Plant Physiol* 51: 188-197.
- Keegstra K, Walton J (2006) Plant science: β -glucans — brewer's bane, dietician's delight. *Science* 311: 1872-1873.
- Kerr EM, Fry SC (2003) Pre-formed xyloglucans and xylans increase in molecular weight in three distinct compartments of a maize cell-suspension culture. *Planta* 217: 327-339.
- Kim J-B, Olek AT, Carpita NC (2000) Plasma membrane and cell wall exo- β -D-glucanases in developing maize coleoptiles. *Plant Physiol* 123: 471-485.
- Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, Ohda T, Ohyama M, Tomomitsu K (2000) Addition of oleic acid increases expression of recombinant human serum albumin by the AOX2 promoter in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng.* 89: 479-484.
- Labavitch JM, Ray PM (1974) Relationship between Promotion of Xyloglucan Metabolism and Induction of Elongation by Indoleacetic Acid. *Plant Physiol* 54: 499-502.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-683.
- Lane DR, Wiedemeier A, Peng L, Hofte H, Vernhettes S, Desprez T, Hocart CH, Birch RJ, Baskin TI, Burn JE, Arioli T, Betzner AS, Williamson RE (2001) Temperature-sensitive alleles of RSW2 link the KORRIGAN endo-1,4-beta-glucanase to cellulose synthesis and cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126: 278-288.
- Lang I, Barton D.A, Overall RL (2004) Membrane-wall attachments in plasmolysed plant cells. *Protoplasma* 224: 231-243.
- Lee SJ, Saravanan RS, Damasceno CM, Yamane H, Kim BD, Rose JK. (2004) Digging deeper into the plant cell wall proteome. *Plant Physiol Biochem* 42: 979-988.
- Lee D, Polisensky DH Braam J (2005) Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated *Arabidopsis* genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. *New Phytol* 165: 429-444.
- Lerouxel O, Cavalier DM, Liepman AH, Keegstra K (2006) Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. *Curr Opin Plant Biol* 9: 621-630.

- Lin Cereghino GP, Sunga AJ, Lin Cereghino J, Cregg JM (2001) Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Genet Eng (N Y)* 23:157-69.
- Liskay A, Kenk B, Schopfer P (2003) Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* 217: 658-667.
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* 163: 16-20.
- Lorences EP, Fry SC (1993) Xyloglucan oligosaccharides with at least two alpha-D-xylose residues act as acceptor substrates for xyloglucan endotransglycosylase and promote the depolymerisation of xyloglucan. *Physiol Plant* 88: 105-112.
- Lynch MA, Staehelin LA (1995) Immunocytochemical localization of cell-wall polysaccharides in the root-tip of *Avena sativa*. *Protoplasma* 188: 115-127.
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre G.R, Blaylock L, Harrison MJ (2005) Expression of a xyloglucan endotransglucosylase/Hydrolase gene, Mt-XTH1, from *Medicago trunculata* is induced systemically in mycorrhizal roots. *Gene* 345: 191-197.
- Matsui A, Yokoyama R, Seki M, Ito T, Shinozaki K, Takahashi T, Komeda Y, Nishitani K (2005) AtXTH27 plays an essential role in cell wall modification during the development of tracheary elements. *Plant J* 42: 525-534.
- McCann MC, Hammouri M, Wilson R, Belton P, Roberts K (1992) Fourier transform infrared microspectroscopy is a new way to look at plant cell walls. *Plant Physiol* 100: 1940-1947.
- McCann MC, Roberts K (1994) Changes in cell wall architecture during cell elongation. *J Exp Bot* 45: 1683-1691.
- McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. *Plant Cell* 4: 1425-1433.
- McQueen-Mason SJ, Fry SC, Durachko DM, Cosgrove DJ (1993) The relationship between xyloglucan endotransglycosylase and in-vitro cell wall extension in cucumber hypocotyls. *Planta* 190: 327-331.
- Medford JI, Elmer JS, Klee HJ (1991) Molecular cloning and characterization of genes expressed in shoot apical meristems. *Plant Cell* 3: 359-370.
- Mergaert P, Nikovics K, Kelemen Z, Maunoury N, Vaubert D, Kondorosi A, Kondorosi E (2003) A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol* 132: 161-173.
- Morris S, Hanna S and Miles MJ (2004) The self-assembly of plant cell wall components by single-molecule force spectroscopy and Monte Carlo modelling. *Nanotechnology* 15: 1296-1301.
- Morrow DL, Jones RL (1986) Localization and partial characterisation of the extracellular proteins centrifuged from pea internodes. *Physiol Plant* 67: 397-407.
- Nakamura T, Yokohama R, Tomita E, Nishitani K (2003) Two azuki bean XTH genes, VaXTH1 and VaXTH2, with similar tissue-specific expression profiles, are differently regulated by auxin. *Plant Cell Physiol* 44: 16-24.
- Nicholas KB, Nicholas HB (1997) GeneDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments.
- Nishitani K, Masuda Y (1983) Auxin induced changes in the cell wall xyloglucans: Effects of auxins on two different subfractions of xyloglucans in the epicotil cell wall

- of *Vigna angularis*. *Plant Cell Physiol* 24: 345-355.
- Nishitani K, Tominaga R (1991) In vitro molecular weight increase in xyloglucans by an apoplastic enzyme preparation from epicotyls of *Vigna angularis*. *Physiol Plant* 82: 490-497.
 - Nishitani K, Tominaga R (1992) Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J Biol Chem* 267: 21058-21064.
 - Nishitani K (1995) Endo-xyloglucan transferase, a new class of transferase involved in cell wall construction. *J Plant Res* 108: 137-148.
 - Nishitani K (1997) The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell wall. *Int Rev Cytol* 173: 157-206.
 - Oh MH, Romanow WG, Smith RC, Zamski E, Sasse J, Clouse SD (1998) Soybean BRU1 encodes a functional xyloglucan endotransglycosylase that is highly expressed in inner epicotyl tissues during brassinosteroid-promoted elongation, *Plant Cell Physiol* 39: 124-130.
 - Ohmiya Y, Samejima M, Shiroishi M, Amano Y, Kanda T, Sakai F, Hayashi T (2000) Evidence that endo-1,4-beta-glucanases act on cellulose in suspension-cultured poplar cells. *Plant J* 24: 147-158.
 - Okazawa K, Sato Y, Nakagawa T, Asada K, Kato I, Tomita E, Nishitani K (1993) Molecular cloning and cDNA sequencing of endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that mediates molecular grafting between matrix polysaccharides in plant cell walls. *J Biol Chem* 268: 25364-25368.
 - O'Neill MA, York WS (2003) The composition and structure of plant primary cell walls. In: *The plant cell wall, Annual Plant Reviews Vol.8*. Ed. J.K.C. Rose. Blackwell Publishing, Oxford, pp.1-54.
 - Oparka KJ (1994) Plasmolysis: new insights into an old process. *New Phytol* 126: 571-591.
 - Palmer SJ, Davies WJ (1996) An analysis of relative elemental growth rate, epidermal cell size and xyloglucan endotransglycosylase activity through the growing region of ageing maize leaves. *J Exp Bot* 47: 339-347.
 - Park A, Cho SK, Kim JE, Chung HS, Hong J-P, Hwang B, Hong CB, Kim WT. (2003) Isolation of cDNAs differentially expressed in response to drought stress and characterization of the Ca-LEAL1 gene encoding a new family of atypical LEA-like protein homologue in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang). *Plant Sci* 165: 471-481.
 - Planas A, Juncosa M, Lloberas J, Querol E (1992) Essential catalytic role of Glu134 in endo-beta-1,3-1,4-D-glucan 4-glucanohydrolase from *B. licheniformis* as determined by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett* 308: 141-145.
 - Popper ZA, Fry SC (2003) Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. *Ann Bot* 91: 1-12.
 - Potter I, Fry SC (1993) Xyloglucan endotransglycosylase activity in pea internodes. Effects of applied gibberellic acid. *Plant Physiol* 103: 235-241.
 - Potter I, Fry SC (1994) Changes in xyloglucan endotransglycosylase (XET) activity during hormones-induced growth in lettuce and cucumber hypocotyls and spinach cell suspension cultures. *J Exp Bot* 45: 1703-1710.
 - Pritchard J, Hetherington PR, Fry SC, Tomos AD (1993) Xyloglucan-endotransglycosylase activity, microfibril orientation and the profiles of cell wall properties along growing regions of maize roots. *J Exp Bot* 44: 1281-1289.

- Reichel C, Mathur J, Eckes P, Langenkemper K, Koncz C, Schell J, Reiss B, Maas C (1996) Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5888-5893.
- Reidy B, Nosberger J, Fleming A (2001) Differential expression of XET-related genes in the leaf elongation zone of *F. pratensis*. *J Exp Bot* 52: 1847-1856.
- Ridge RW, Uozumi Y, Plazinski J, Hurley UA, Williamson RE (1999) Developmental transitions and dynamics of the cortical ER of *Arabidopsis* cells seen with green fluorescent protein. *Plant Cell Physiol* 40: 1253-1261.
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57: 929-967.
- Rochange SF, Wenzel CL, McQueen-Mason SJ (2001) Impaired growth in transgenic plants over-expressing an expansin isoform. *Plant Mol Biol* 46: 581-589.
- Romo S, Jimenez T, Labrador E, Dopico B (2005) The gene for a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase from *Cicer arietinum* is strongly expressed in elongating tissues. *Plant Physiol Biochem* 43: 169-176.
- Rose JKC, Brummell DA, Bennett AB (1996) Two divergent xyloglucan endotransglycosylases exhibit mutually exclusive patterns of expression in *nasturtium*. *Plant Physiol* 110: 493-499.
- Rose JKC, Bennett AB (1999) Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci* 4: 176-183.
- Rose JKC, Braam J, Fry SC, Nishitani K (2002) The XTH family of enzymes involved in Xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol* 43: 1421-1435.
- Rose JKC, Catalá C, Gonzales-Carranza ZH, Roberts JA (2003) Cell wall disassembly. In: *The plant cell wall, Annual Plant Reviews Vol.8*. Ed. J.K.C. Rose. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 264-324.
- Rose JK, Saladie M, Catala C (2004) The plot thickens: New perspectives of primary cell wall modification. *Curr Opin Plant Biol* 7: 296-301.
- Ruel K, Comtat J, Barnoud F (1977) Localisation histologique et ultrastructurale des xylanes dans les parois primaires des tissus d' *Arundo donax*. *C R Acad Sci* 284: 1421-1424.
- Saab IN, Sachs MM (1996) A flooding-induced Xyloglucan endo-transglycosylase homolog in maize is responsive to ethylene and associated with aerenchyma. *Plant Physiol* 112: 385-391.
- Saladié M, Rose JKC, Cosgrove DJ, Catalá C (2006) Characterization of a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) from ripening tomato fruit and implications for the diverse modes of enzymic action. *Plant J* 47: 282-295.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Gel electrophoresis of DNA, in: C Nolan, ed, *Molecular cloning: A laboratory Manual*, Ed 2, Vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y.
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Saxena IM, Brown RM Jr (2005) Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. *Ann Bot (Lond)* 96: 9-21.

- Shcherban TY, Shi J, Durachko DM, Guiltinan MJ, McQueen-Mason SJ, Shieh M, Cosgrove DJ (1995) Molecular cloning and sequence analysis of expansin-A highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9245-9249.
- Schroder R, Wegrzyn TF, Sharma NN, Atkinson RG (2006) LeMAN4 endo-beta-mannanase from ripe tomato fruit can act as a mannan transglycosylase or hydrolase. *Planta* 224: 1091-1102.
- Schünmann PHD, Smith RC, Lang V, Matthews R, Chandler PM (1997) Expression of XET-related genes and its relation to elongation in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) *Plant Cell Environ* 20: 1439-1450.
- Scott A, Wyatt S, Tsou PL, Robertson D, Allen NS (1999) Model system for plant cell biology: GFP imaging in living onion epidermal cells. *BioTechniques* 26: 1125-1132.
- Selvendran RR, O'Neill MA (1987) Isolation and analysis of cell walls from plant material. In: Glick D, ed. *Methods of biochemical analysis*, Vol. 32. Chichester, UK: Wiley, 25-153.
- Sharp RE, Davies WJ (1989) Regulation of growth and development of plant growing with a restricted supply of water. In: H.G. Jones, T.J. Flowers, M.B. Jones, eds, *Plants under stress*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K, pp. 71-93.
- Shimizu Y, Aotsuka S, Hasegawa O, Kawada T, Sakuno T, Sakai F, Hayashi T (1997) Changes in levels of mRNAs for cell wall-related enzymes in growing cotton fiber cells. *Plant Cell Physiol* 38: 375-378.
- Shin YK, Yum H, Kim ES, Cho H, Gothandam KM, Hyun J, Chung YY (2006) BcXTH1, a *Brassica campestris* homologue of *Arabidopsis* XTH9, is associated with cell expansion. *Planta* 224: 32-41.
- Smith RC, Fry SC (1991) Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures. *Biochem J* 279: 529-535.
- Smith RC, Matthews PR, Schünmann PHD, Chandler PM (1996) The regulation of leaf elongation and xyloglucan-endotransglycosylase by gibberellin in Himalay barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Exp Bot* 47: 1395-1404.
- Smith BG, Harris PJ (1999) The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique. *Biochem System Ecol* 27: 33-53.
- Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredes A, Persson S, Raab T, Vorwerk S, Youngs H (2004) Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306:2206-2211.
- Somerville C (2006) Cellulose synthesis in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:53-78.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-17.
- Steele NM, Fry SC (1999) Purification of xyloglucan endotransglycosylases (XETs): a generally applicable and simple method based on reversible formation of an enzyme-substrate complex. *Biochem J* 340: 207-211.
- Steele NM, Sulová Z, Campbell P, Braam J, Farkas V, Fry SC (2001) Ten isoenzymes of xyloglucan endotransglycosylase from plant cell walls select and cleave the donor substrate stochastically. *Biochem J* 355: 671-679.
- Strohmeier M, Hrmova M, Fischer M, Harvey AJ, Fincher G, Pleiss J (2004) Molecular modelling of family GH16 glycoside hydrolases: Potential roles for xyloglucan transglycosylases/hydrolases in cell wall modification in the poaceae. *Protein Sci* 13:

3200-3213.

- Sulová Z, Lednická M, Farkas V (1995) A colorimetric assay for xyloglucan-endotransglycosylase from germinating seeds. *Anal Biochem* 229: 80-85.
- Sulová Z, Takácová M, Steele NM, Fry SC, Farkaš V (1998) Xyloglucan endotransglycosylase: evidence for the existence of a relatively stable glycosyl-enzyme intermediate. *Biochem J* 330: 1475-1480.
- Sulová Z, Farkas V (1999) Purification of xyloglucan endotransglycosylase based on affinity sorption of the active glycosyl-enzyme intermediate complex to cellulose. *Protein Expr Purif* 16: 231-235.
- Tabuchi A, Mori H, Kamisaka S, Hoson T (2001) A new type of endo-xyloglucan transferase devoted to xyloglucan hydrolysis in the cell wall of azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol* 42: 154-161.
- Taiz L (1984) Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 585-657.
- Takeda T, Mitsuishi Y, Sakai F, Hayashi T (1996) Xyloglucan endotransglycosylation in suspension-cultured poplar cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 1950-1955.
- Takeda T, Fry SC (2004) Control of xyloglucan endotransglucosylase activity by salts and anionic polymers. *Planta* 219: 722-732.
- Talbott LD, Ray PM (1992a) Changes in Molecular Size of Previously Deposited and Newly Synthesized Pea Cell Wall Matrix Polysaccharides: Effects of Auxin and Turgor. *Plant Physiol* 98: 369-379.
- Talbott LD, Ray PM (1992b) Molecular Size and Separability Features of Pea Cell Wall Polysaccharides: Implications for Models of Primary Wall Structure. *Plant Physiol*. 98: 357-368.
- Thompson JE, Fry SC (2001) Restructuring of wall-bound xyloglucan by transglycosylation in living plant cells. *Plant J* 26: 23-34.
- Tsabary G, Shani Z, Roiz L, Levy I, Riov J, Shoseyov O (2003) Abnormal 'wrinkled' cell walls and retarded development of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing endo-1,4-beta-glucanase (cell) antisense. *Plant Mol Biol* 51: 213-224.
- Uozu S, Tanaka-Ueguchi M, Kitano H, Hattori K, Matsuoka M (2000) Characterization of XET-related genes of rice. *Plant Physiol* 122: 853-859.
- Van Sandt VS, Guisez Y, Verbelen JP, Vissenberg K (2006) Analysis of a xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) from the lycopodiophyte *Selaginella kraussiana* suggests that XTH sequence characteristics and function are highly conserved during the evolution of vascular plants. *J Exp Bot* 57: 2909-2922.
- Van Sandt VS, Guisez Y, Verbelen JP, Vissenberg K (2007) Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) is encoded by a multi-gene family in the primitive vascular land plant *Selaginella kraussiana*. *Plant Biol (Stuttg)* 9: 142-146.
- Verica JA, Medford JI (1997) Modified MER15 expression alters cell expansion in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Sci* 125: 201-210.
- Verslues PE, Ober ES, Sharp RE (1998) Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. *Plant Physiol* 116: 1403-1412.
- Vignols F, José-Estanyol M, Caparrós-Ruiz D, Rigau J, Puigdomènech P (1999) Involvement of a maize proline-rich protein in secondary cell wall formation as deduced from its specific mRNA localisation. *Plant Mol Biol* 39: 945-952.

- Vincken JP, York WS, Beldman G, Voragen AG (1997) Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG. *Plant Physiol* 114: 9-13.
- Vissenberg K, Martinez-Vilchez IM, Verbelen J-P, Miller JG, Fry SC (2000) In vivo colocalization of xyloglucan endotransglycosylase activity and its donor substrate in the elongation zone of Arabidopsis roots. *Plant Cell* 12: 1229-1238.
- Vissenberg K, van Sandt V, Fry SC, Verbelen J-P (2003) Xyloglucan endotransglucosylase action is high in the root elongation zone and the trichoblasts of all vascular plants from Selaginella to Zea mays. *J Exp Bot* 54: 335-344.
- Vissenberg K, Fry SC, Pauly M, Höfte H, Verbelen J-P (2005) XTH acts at the microfibril-matrix interface during cell elongation. *J Exp Bot* 56: 673-683.
- Vissenberg K, Oyama M, Osato Y, Yokoyama R, Verbelen JP, Nishitani K (2005) Differential expression of AtXTH17, AtXTH18, AtXTH19 and AtXTH20 genes in Arabidopsis roots. Physiological roles in specification in cell wall construction, *Plant Cell Physiol* 46: 192-200.
- Vissenberg K, Fry SC, Verbelen J-P (2001) Root hair initiation is coupled to a highly localized increase of Xyloglucan endotransglycosylase action in Arabidopsis roots. *Plant Physiol* 127: 1125-1135.
- Whitney SE, Brigham JE, Darke AH, Reid JS, Gidley, MJ (1995) In vitro assembly of cellulose/xyloglucan networks: Ultrastructural and molecular aspects. *Plant J* 8: 491-504.
- Wu Y, Spollen WG, Sharp RE, Hetherington PR, Fry SC (1994) Root growth maintenance at low water potentials. Increased activity of Xyloglucan endotransglucosylase and its possible regulation by abscisic acid. *Plant Physiol* 106: 607-615.
- Xu W, Campbell P, Vargheese AK, Braam J (1996) The Arabidopsis XET-related gene family: environmental and hormonal regulation of expression. *Plant J* 9: 879-889.
- Xu W, Purugganan MM, Polisensky DH, Antosiewicz DM, Fry SC, Braam J (1995) Arabidopsis TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan-endotransglycosylase. *Plant Cell* 7: 1555-1567.
- Yokoyama R, Nishitani K (2000) Functional diversity of xyloglucan-related proteins and its implications in the cell wall dynamics in plants. *Plant Biol* 2: 598-604.
- Yokoyama R, Nishitani K (2001a) A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict cis-regulatory regions involved in cell-wall construction in specific organs of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 42: 1025-1033.
- Yokoyama R, Nishitani K (2001b) Endoxyloglucan transferase is localized both in the cell plate and in the secretory pathway destined for the apoplast in tobacco cells. *Plant Cell Physiol* 42: 292-300.
- Yokoyama R, Rose JKC, Nishitani K (2004) A surprising diversity and abundance of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. Classification and expression analysis. *Plant Physiol* 134: 1088-1099.
- Zhu J, Chen S, Alvarez S, Asirvatham VS, Schachtman DP, Wu Y, Sharp RE (2006) Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. I. Extraction and identification of water-soluble and lightly ionically bound proteins. *Plant Physiol* 140: 311-25.
- Zurek DM, Clouse SD (1994) Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max* L.) epicotyls. *Plant Physiol* 104:161-170.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 LA PARED CELULAR	3
1.1.1 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR	4
1.1.2 CONSTITUYENTES DE LA PARED CELULAR PRIMARIA	6
1.1.2.1 CELULOSA	6
1.1.2.2 HEMICELULOSAS	6
1.1.2.3 PECTINAS	9
1.1.2.4 GLICOPROTEÍNAS (PROTEÍNAS ESTRUCTURALES)	9
1.1.3 MODIFICACIONES DE LA PARED CELULAR	10
1.1.4 BIOSÍNTESIS DE LOS POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR	11
1.1.5 ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR PRIMARIA	12
1.1.6 CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DE LA PARED CELULAR DE MAÍZ	15
1.1.7 FUNCIONES DE LA PARED CELULAR	17
1.1.7.1 EXPANSIÓN CELULAR Y <i>WALL LOOSENING</i>	18
1.1.7.2 <i>WALL LOOSENING</i> DURANTE EL DESENSAMBLAJE DE LA PARED	19
1.2 LOS AGENTES DEL <i>WALL LOOSENING</i>	20
1.2.1 LAS EXPANSINAS	20
1.2.2 RADICALES OXIDRILOS	21
1.2.3 ENZIMAS RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DE LOS XILOGLUCANOS: LA FAMILIA DE LAS GLICOSIL HIDROLASAS (GH)	22
1.3 LAS XILOGLUCANO-ENDOTRANSGLUCOSILASAS/HIDROLASAS (XTHs)	24
1.3.1 DESCUBRIMIENTO DE LAS XTHs	24
1.3.2 ACTIVIDAD XET (XILOGLUCANO ENDOTRANGLUCOSILASA)	25
1.3.2.1 ENSAYOS XET	27
1.3.2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA ACTIVIDAD XET	28
1.3.3 ACTIVIDAD XEH (XILOGLUCANO ENDOHIDROLASA)	29
1.3.4 LAS XTHs PERTENECEN A FAMILIAS MULTIGÉNICAS	30
1.3.5 CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA PROTEICA DE LAS XTHs	33
1.3.6 LAS XTHs EN LAS GRAMÍNEAS	34
1.3.7 FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LAS XTHs	36
1.3.7.1 EXPANSIÓN CELULAR Y CRECIMIENTO	36
1.3.7.2 RESPUESTA A ESTRÉS	38
1.3.7.3 FENÓMENOS DE DIFERENCIACIÓN y DESARROLLO	39
1.3.7.4 FUNCIONES NO RELACIONADAS CON LA PARED CELULAR	40
1.3.8 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS XTHs	41
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	43
2. RESULTADOS	45
2.1 CARACTERIZACIÓN DE <i>ZmXTH1</i> EN MAÍZ	47
2.1.1 ESTUDIO DE LA SECUENCIA DEL CLON DE cDNA <i>ZmXTH1</i>	47
2.1.2 ESTUDIO FILOGENÉTICO DE <i>ZmXTH1</i>	49
2.1.3 ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA PROTEÍNA <i>ZmXTH1</i> y COMPARACIÓN CON LAS DEMÁS XTHs DE MAÍZ Y DEL SUBGRUPO 4	51
2.1.5 ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE <i>ZmXTH1</i>	54

2.1.6 LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LA PLANTA AFECTAN LA EXPRESIÓN DE <i>ZmXTH1</i>	57
2.1.7 LA EXPRESIÓN DE <i>ZmXTH1</i> ESTÁ INDUCIDA POR GIBERELINAS	58
2.2. SOBREENPRESIÓN DE <i>ZmXTH1</i> EN DIFERENTES SISTEMAS HETERÓLOGOS	60
2.2.1 SOBREENPRESIÓN DE <i>ZmXTH1</i> EN <i>E. coli</i>	61
2.2.1.2 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA <i>ZmXTH1</i> Int	62
2.2.1.2 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES anti <i>ZmXTH1</i>	63
2.2.2 SOBREENPRESIÓN DE <i>ZmXTH1</i> en <i>P. pastoris</i>	64
2.2.2.1 CLONACIÓN DE <i>ZmXTH1</i> Int EN pPicZ α , TRANSFORMACIÓN DE <i>P. pastoris</i> Y SELECCIÓN DE LOS TRANSFORMANTES	65
2.2.2.2 PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE <i>ZmXTH1</i>	66
2.3 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE <i>ZmXTH1</i>	68
2.3.1 ENSAYOS XET (XILOGLUCANO ENDOTRANGLUCOSILASA)	68
2.3.2 ENSAYOS ET (ENDOTRANGLICOSILASA)	71
2.4 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE <i>ZmXTH1</i>	74
2.4.1 EXPRESIÓN TRANSITORIA DE <i>ZmXTH1</i> EN CEBOLLA	74
2.4.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS APOPLÁSTICAS	79
2.5 ESTUDIO FUNCIONAL DE <i>ZmXTH1</i>	81
2.5.1 OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE ARABIDOSIS QUE SOBREENPRESAN <i>ZmXTH1</i> .	81
2.5.2 ENSAYOS DE ACTIVIDAD XET SOBRE LAS PLANTAS DE ARABIDOPSIS QUE SOBREENPRESAN <i>ZmXTH1</i>	82
2.5.3 FENOTIPO DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS	84
3. DISCUSIÓN	87
3.1 ESTUDIO DE LA SECUENCIA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE <i>ZmXTH1</i>	89
3.1.2 LAS XTHS DE MAÍZ PERTENECEN A FAMILIAS MULTIGÉNICAS	89
3.1.3 <i>ZmXTH1</i> PERTENECE A UN SUBGRUPO DE PROTEÍNAS ÁCIDAS DE GRAMÍNEAS	90
3.1.4 CARACTERÍSTICAS DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE <i>ZmXTH1</i>	91
3.2 CARACTERIZACIÓN DE <i>ZmXTH1</i> EN MAÍZ A TRAVÉS DE SU PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA	92
3.3 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE <i>ZmXTH1</i>	95
3.3.1 <i>ZmXTH1</i> PRESENTA ACTIVIDAD XET	96
3.4 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE <i>ZmXTH1</i>	97
3.4.1 <i>ZmXTH1</i> SE LOCALIZA EN LA PARED CELULAR EN CÉLULAS DE CEBOLLA	97
3.4.2 <i>ZmXTH1</i> SE LOCALIZA EN EL APOPLASTO EN MAÍZ	99

3.5 ESTUDIOS FUNCIONALES	100
3.5.1 ZmXTH1 AFECTA LA PARED CELULAR EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE ARABIDOPSIS	100
CONCLUSIONES	103
4. MATERIAL Y MÉTODOS	105
4.1 MATERIAL VEGETAL	107
4.1.1 MAÍZ	107
4.1.2 ARABIDOPSIS	107
4.1.2.1 Esterilización de las semillas	107
4.1.2.2 Germinación de las semillas	107
4.2 CEPAS DE BACTERIA Y LEVADURA	108
4.2.1 BACTERIAS	108
4.2.2 LEVADURA	108
4.3 VECTORES	108
4.4 MEDIOS	109
4.5 ANTIBIÓTICOS Y REACTIVOS	109
4.6 OLIGONUCLEÓTIDOS	110
4.7 CONSTRUCCIONES	111
4.8 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS Y LEVADURA	111
4.8.1 TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i>	111
4.8.1.1 Preparación de células competentes	111
4.8.1.2 Transformación por choque térmico	112
4.8.2 TRANSFORMACIÓN DE <i>A. tumefaciens</i>	112
4.8.2.1 Preparación de células competentes	112
4.8.2.2 Transformación por choque térmico	113
4.8.3 TRANSFORMACIÓN DE <i>P. pastoris</i>	113
4.8.3.1 Preparación de células competentes	113
4.8.3.2 Transformación por electroporación	114
4.9 ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	115
4.9.1 EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO	115
4.9.2 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	115
4.9.2.1 Método Dellaporta	115
4.9.2.2 Método Edwards	116
4.9.3 EXTRACCIÓN DE RNA	117
4.9.3.1 Método del tampón Z6	117
4.9.3.2 Método del Trizol	117
4.9.4 TRATAMIENTO CON DNasa	118
4.9.5 DIGESTIÓN DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	118
4.9.6 LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA A UN VECTOR DE CLONACIÓN	119
4.9.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	119
4.9.8 RT-PCR (reverse transcriptase PCR)	120
4.9.9 ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE AGAROSA	121
4.9.10 EXTRACCIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA DESDE GEL DE AGAROSA	122
4.9.11 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	122
4.9.12 TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS	122
4.9.12.1 <i>Southern blot</i>	122

4.9.12.2 Northern blot	123
4.9.12.3 Transferencia por capilaridad	123
4.9.13 HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	124
4.9.13.1 Marcaje y purificación de la sonda	124
4.9.13.2 Hibridación	125
4.10 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	126
4.10.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE TEJIDO VEGETAL	126
4.10.1.1 Extractos totales	126
4.10.1.2 Extracción de proteínas apoplásticas.	126
4.10.2 SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	127
4.10.2.1 Sobreexpresión en <i>E. coli</i>	127
4.10.2.2 Sobreexpresión en <i>P.pastoris</i>	130
4.10.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	132
4.10.4 OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES EN GALLINA	132
4.10.4.1 Purificación de las IgYs de gallinas	132
4.10.4.2 Purificación del anticuerpo anti-ZmXTH1 por cromatografía de afinidad	133
4.10.5 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	134
4.10.5.1 Visualización de las proteínas por tinción de Coomassie	135
4.10.6 WESTERN BLOT	135
4.10.6.1 Tinción de membranas de nitrocelulosa con solución Ponceau s	135
4.10.6.2 Inmunodetección	136
4.11 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	136
4.11.1 ENSAYO XILOGLUCANOENDOTRANSGLUCOSILASA (XET)	136
4.11.2 ENSAYOS ENDOTRANSGLICOSILASA (ET)	138
4.11.2.1 Reacción enzimática	138
4.12 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA MEDIANTE BIOLÍSTICA	139
4.12.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA BIOLÓGICA	139
4.12.2 PREPARACIÓN DE LAS PARTÍCULAS DE ORO	139
4.12.3 PRECIPITACIÓN DEL DNA	139
4.12.4 DISPARO DE LOS MICROPROYECTILES: BOMBARDEO CON EL PDS1000/He	140
4.12.5 OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO CONFOCAL	141
4.13 TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE <i>A. thaliana</i> CON <i>A. tumefaciens</i>	141
4.14 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	142
4.14.1 PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS	142
4.14.1.1 Fijación	142
4.14.1.2 Deshidratación	143
4.14.1.3 Inclusión	143
4.14.2 PROCESAMIENTO DEL LOS TEJIDOS INCLUIDOS	144
4.14.2.1 Obtención de cortes ultrafinos	144
4.14.2.2 Tinción PATAg	144
4.14.2.3 Observación al microscopio electrónico	145
4.15 ANÁLISIS DE DATOS	146
BIBLIOGRAFÍA	147