

Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas



*"Estudio de la familia de la enzima málica de semillas de soja
para la selección de blancos metabólicos para alterar el
contenido de aceite"*

Costa, Joaquín

Tesis para optar al título de Licenciado en Biotecnología

Directora: Dra. Mariel Gerrard Wheeler

Rosario 2018

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por el apoyo, comprensión y sustento a lo largo de estos largos años de carrera.

A mis hermanos y compañeros de departamento Victoria, Sofia, y Pablo que me acompañaron en esta aventura llamada convivencia por momentos divertida y en otros no tanto.

A la Universidad Nacional de Rosario, a la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas y su cuerpo docente por formarme y darme las herramientas para poder afrontar lo que viene.

A mi directora de tesina, Mariel Gerrard Wheeler, por los conocimientos que me compartió, las nuevas herramientas que me brindo y la paciencia que me tuvo en este tramo final de la carrera.

A mis compañeros del Lab del subsuelo del CEFOTI, especialmente al grupo de trabajo; Mariana Badia con la que compartí días y horas en la mesada, a Mariana Saigo por su ayuda en el análisis de los resultados y en la corrección del trabajo. A mi compañero de mesada, Juan que siempre tuvo voluntad para enseñarme cosas nuevas y aclararme hasta la más mínima de mis dudas.

A mis compañeros de la facultad y de estudio que a lo largo de estos años se convirtieron en grandes amigos con los que compartimos buenos momentos.

A mis amigos de San Pedro que me bancaron a pesar de la distancia y mi ausencia en ocasiones importantes.

A Agus por el aguante en este último tramo y estar siempre presente.

PRESENTACIÓN A CONGRESO

Los resultados del presente trabajo fueron presentados en forma de poster en la Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias, 13-17/11/2017, Buenos Aires: "Characterization of malate metabolism enzymes induced during soybean seed filling" Costa, Joaquín*; Badia, Mariana B.*; Pavlovic, Tatiana; Andreo, Carlos S.; Drincovich, María F.; Saigo, Mariana and Gerrard Wheeler, Mariel C. *These authors contributed equally to the work. Revista Medicina 77 (Supl. I), 142.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Importancia de la semilla de soja	1
I.2 Desarrollo de la semilla de soja	2
I.3 Metabolismo del carbono y síntesis de lípidos.....	3
I.4 Enzima málica.....	5
I.4.1 EM-NAD.....	6
I.4.2 EM-NADP.....	7
I.4.3 Rol en la síntesis lipídica en soja	9
I.5 Objetivo	10
I.5.1 Objetivo general.....	10
I.5.2 Objetivos específicos	10
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
II.1 Clonado de las isoformas EM-NAD (P) de semillas de soja	11
II.1.1 Material de partida.....	11
II.1.2 Diseño de los cebadores.....	11
II.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	12
II.1.4 Clonado en el vector pBluescript II SK (+).....	13
II.1.5 Transformación de <i>E. coli</i> con la mezcla de ligación.....	13
II.1.6 Extracción de ADN plasmídico	14
II.1.7 Chequeo de los plásmidos	14
II.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.....	15
II.2.1 Clonado en el vector pET-28a (+).....	15
II.2.2 Transformación del huésped de expresión	16
II.2.3 Purificación de las proteínas de fusión	16
II.2.4 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes	17
II.3 Análisis de las propiedades cinéticas y regulatorias de las proteínas	17

II.3.1 Determinación de la actividad EM-NAD (P)	17
II.3.2 Determinación de las constantes cinéticas	18
II.3.3 Estudio de posibles efectores de la actividad enzimática	19
II.4 Cuantificación de proteínas.....	19
III. RESULTADOS.....	21
III.1 Aislamiento de los ADNc de las EM-NAD(P) de soja.....	22
III.2 Subclonado de los ADNc en el vector de expresión	25
III.3 Expresión y purificación de las distintas isoformas EM-NAD(P) de soja .	28
III.4 Caracterización de las distintas isoformas EM-NAD(P) de soja.....	29
IV. DISCUSIÓN	40
V. REFERENCIAS	43

ABREVIATURAS

ACL: ATP-citrato liasa

Asn: Asparagina

Asp: Aspartato

CAT: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

CS: Citrato sintasa

EM-NAD: Enzima málica NAD-dependiente

EM-NADP: Enzima málica NADP-dependiente

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

Gln: Glutamina

Glu: Glutamato

Gly: Glicina

k_{cat}: Constante catalítica

MDH: Malato deshidrogenasa

nH: Índice de Hill

OAA: Oxaloacetato

PDH: Piruvato deshidrogenasa

PEP: Fosfoenolpiruvato

PEPC: Fosfoenolpiruvato carboxilasa

PK: Piruvato quinasa

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

S_{0,5}: Concentración de sustrato para la cual se obtiene la mitad de V_{máx}

V_{máx}: Velocidad máxima de la reacción

RESUMEN

Previos estudios de nuestro grupo indicaron que las enzimas málicas NAD- y NADP-dependientes (EM-NAD(P)) participan en la provisión de poder reductor y citrato o acetil-CoA, respectivamente para las vías de biosíntesis de reservas durante la maduración del embrión de soja. En el presente trabajo de tesina, se analizaron las propiedades cinéticas y regulatorias de enzimas pertenecientes a esta familia. Para ello, diferentes isoformas EM-NAD(P) fueron obtenidas a través del clonado, expresión heteróloga en *Escherichia coli* y posterior purificación por afinidad. Los resultados indicaron una alta actividad catalítica, afinidad por sus sustratos y una regulación positiva por glutamina de la única isoforma EM-NADP plastídica detectada en semillas. Mientras que para las EM-NAD mitocondriales, se observó una fuerte regulación positiva por intermediarios glucolíticos y de las vías de lipogénesis que fue aún más evidente en la isoforma EM-NAD2.4, cuyo transcripto es el más inducido durante el llenado. Así, específicamente estas isoformas podrían ser utilizadas como herramienta biotecnológica en programas de mejoramiento con vista a aumentar la composición lipídica de la semilla de soja.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Importancia de la semilla de soja

Las semillas son esenciales para la reproducción de las plantas con flores ya que protegen, nutren y contienen al embrión en desarrollo, el cual representa a la siguiente generación esporofítica. Adicionalmente, las semillas contienen recursos energéticos que sustentan a la plántula durante la germinación antes de que se efectivice la fotosíntesis. Proveen el 70% de la ingesta calórica humana a nivel mundial (Sreenivasulu, 2017), mientras que los aceites obtenidos a partir de ellas son utilizados cada vez más como fuentes renovables de materias primas industriales y de combustibles (Dyer y col., 2008).

La soja [*Glycine max* (L.) Merr.] es uno de los cultivos agronómicos más importantes y versátiles a nivel mundial, siendo fuente de aceite de alta calidad con aplicación en las industrias alimenticia, textil, de plásticos y biocombustibles (Dyer y col., 2008). Argentina, el mayor exportador de su aceite, tuvo una producción de más de 8 millones de toneladas en la temporada 2016/17 (<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>). La producción mundial de aceite de soja se ha incrementado en forma estable en los últimos años, aunque es todavía insuficiente para satisfacer la demanda, siendo el bajo contenido lipídico de las semillas el principal factor que restringe el rendimiento (Chen y col., 2012).

Típicamente la semilla de soja contiene aproximadamente de 18-21% de lípidos, 40% de proteínas y el resto de la biomasa formada por carbohidratos y polisacáridos de la pared celular, entre otros componentes (Rubel y col., 1972). Este contenido lipídico es un tanto menor que el que presentan otras especies oleaginosas, tales como ricino (60%), girasol (50%) y *Arabidopsis thaliana* (40%) (Baud y Lepiniec, 2010).

Sin embargo, la composición de la semilla es una característica variable. Por ejemplo, se ha visto que el contenido de lípidos puede aumentar dependiendo de los antecedentes genéticos de la planta y de las condiciones de crecimiento (Weselake y col., 2009). Esto nos sugiere que el metabolismo central del carbono que lleva a la acumulación de los compuestos de reserva en la semilla es bastante flexible y que debería poder ser susceptible de modificación, efectivamente la composición de ácidos

grasos del aceite de soja ya ha sido alterada mediante ingeniería metabólica (Haun y col., 2014). No obstante, en esta leguminosa los intentos de modificar la proporción de reservas no han sido completamente exitosos, posiblemente por la complejidad del metabolismo en semilla (Allen y col., 2009). Por ello un mejor entendimiento de las vías que conducen a la biosíntesis lipídica y sus puntos de regulación será fundamental para lograr mejoras biotecnológicas a futuro.

I.2 Desarrollo de la semilla de soja

La escala desarrollada por Fehr y colaboradores (1971), es la más utilizada para la descripción de los estados fenológicos externos del cultivo de soja, donde a su vez se emplean dos escalas, una para los estados vegetativos y la otra para los reproductivos. La clasificación en estados reproductivos R1 y R2 está basada en la floración, R3 y R4 en el desarrollo de las vainas, R5 y R6 en el grado de desarrollo de las semillas y R7 y R8 en su maduración (Fehr y col., 1971).

El desarrollo y la maduración de las semillas están caracterizados por tres grandes fases: embriogénesis, llenado de la semilla y desecación.

Durante la embriogénesis, el cigoto fertilizado sufre múltiples divisiones celulares y diferenciación de tejidos hasta que el embrión se desarrolla por completo. En la etapa de llenado de la semilla, en lo que se conoce como etapas R5 a R7, predomina la elongación celular y las semillas crecen rápidamente, acumulando nutrientes como carbono, y nitrógeno en forma de lípidos de reserva y proteínas (figura I.1). Durante R6, las partes vegetativas de la planta parental comienzan a volverse amarillas y comienza la senescencia de las hojas. La acumulación de reservas en las semillas comienza a desacelerarse y para R7, prácticamente se ha completado la acumulación de peso seco de la semilla. Para la etapa R8, casi todas las vainas y semillas se han secado volviéndose marrones y los embriones están quiescentes. Más adelante, cuando la semilla embebe agua y la germinación comienza, la actividad metabólica puede reiniciarse inmediatamente utilizando enzimas, ribosomas, factores de iniciación y elongación, y otros compuestos que fueron producidos durante el desarrollo y almacenados en la semilla (Jones y Vodkin, 2013).

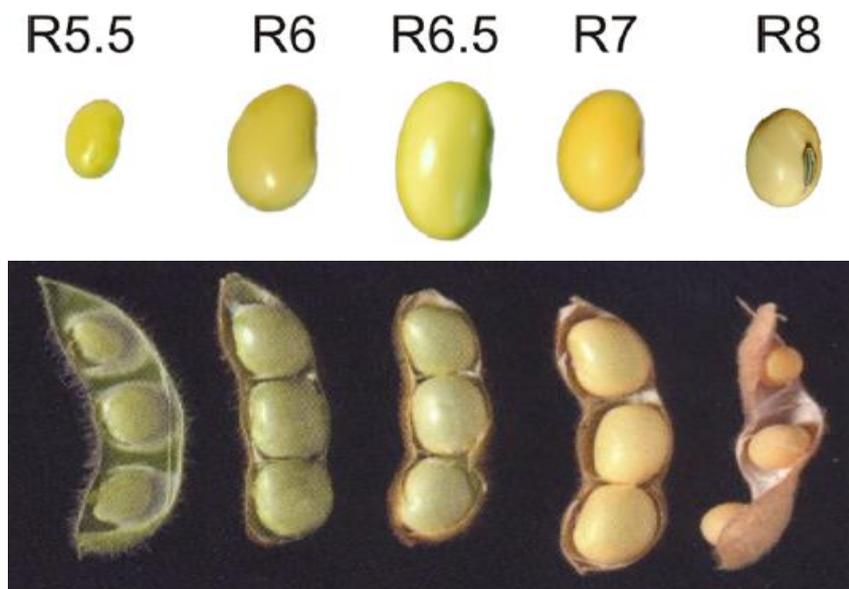


Figura I.1 Etapas de la semilla de soja hasta alcanzar su madurez. Tomada de Gerrard Wheeler y col., 2016 y Pederson y col., 2004.

I.3 Metabolismo del carbono y síntesis de lípidos

En soja las reservas son almacenadas predominantemente en los tejidos embrionarios, por ejemplo, cotiledones que ocupan casi todo el espacio disponible entre los integumentos de la semilla (Goettel y col., 2014).

Los lípidos son principalmente triacilgliceroles y su generación depende del suministro de nutrientes desde los tejidos autotróficos de la planta. La síntesis *de novo* de los ácidos grasos que los componen se da en los plastidios y requiere esqueletos carbonados (acetil-CoA), energía (ATP) y equivalentes de reducción (NAD(P)H). Las vías que generan estos precursores presentan una alta variabilidad entre las diferentes especies vegetales y están siendo objeto de numerosos estudios. Se ha propuesto que el piruvato y el malato importados desde el citosol serían importantes fuentes de carbono (Hajduch y col., 2011).

Los precursores biosintéticos serían generados en embriones de soja de acuerdo al modelo planteado en la figura I.2. La conversión glucolítica de sacarosa en fosfoenolpiruvato (PEP) seguida por la acción de la PEP carboxilasa (PEPC) y la malato deshidrogenasa (MDH) o la piruvato quinasa (PK) resulta en la síntesis de malato o

piruvato citosólicos, respectivamente. Según experimentos de flujo metabólico, ambos metabolitos serían importados al plastidio y una vez allí, transformados en acetil-CoA por acción del complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH), previa conversión del malato en piruvato por una enzima málica NADP-dependiente (EM-NADP) (figura I.2; Allen y col., 2009). Así, el malato aportaría dos equivalentes de reducción necesarios para el proceso anabólico dentro del plastidio, mientras que el piruvato sólo uno. En paralelo, los azúcares pueden ser metabolizados mediante la glucólisis plastídica (figura I.2). La utilización del carbono derivado de la glucólisis sería similar a la postulada para ricino (Smith y col., 1992; Shearer y col., 2004; Gerrard Wheeler y col., 2016). Además de los azúcares, en soja se ha observado una alta contribución del importe de aminoácidos a la semilla para sustentar la síntesis de reservas durante el llenado (Allen y col., 2009; Allen y Young, 2013), relacionada a la capacidad de esta especie de formar nódulos fijadores de nitrógeno. Éstos son degradados principalmente en las mitocondrias aportando cantidades significativas de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT). Según experimentos llevados a cabo en embriones de soja (Allen y Young, 2013) el citrato sintetizado en la mitocondria sería incorporado por los plastidios proveyendo así esqueletos carbonados para la síntesis de ácidos grasos. En este contexto, se vuelve importante la contribución de la enzima málica NAD-dependiente (EM-NAD), la cual permitiría la relocalización de carbono mitocondrial al plastidio mediante el transporte de citrato (figura I.2; Gerrard Wheeler y col., 2016). EM-NAD cataliza la conversión de malato a piruvato y PDH produce acetil-CoA, el cual es utilizado para producir el citrato que migra al plastidio para proporcionar acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos (figura I.2; Allen y Young, 2013).

Mientras que en etapas tempranas los intermediarios glucolíticos serían la principal fuente de carbono para la síntesis de ácidos grasos, en etapas más tardías de la maduración éstos serían reemplazados por intermediarios del CAT (figura I.2). Esto se debería en parte a que cerca de R6.5, los carbohidratos comienzan a sustentar otros metabolismos, tal como la síntesis de compuestos protectores que asisten en el proceso de desecación (Gerrard Wheeler y col., 2016).

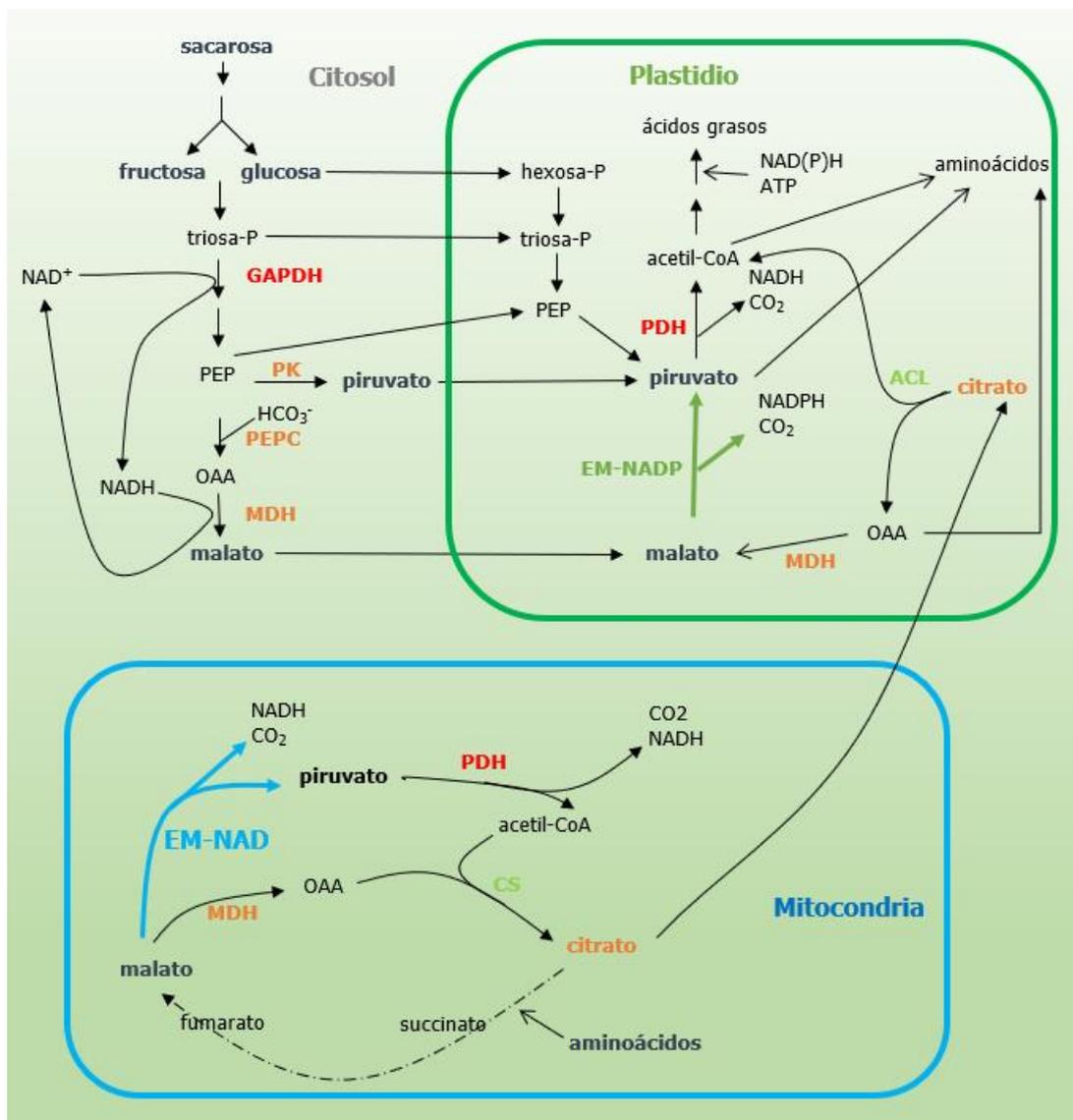


Figura I.2 Modelo propuesto de generación de precursores para la biosíntesis lipídica en semillas de soja. GAPDH, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; PEP, Fosfoenolpiruvato; OAA, Oxaloacetato; PEPC, PEP carboxilasa; MDH, Malato deshidrogenasa; PK, Piruvato quinasa; PDH, Piruvato deshidrogenasa; EM-NADP, Enzima málica NADP-dependiente; EM-NAD, Enzima málica NAD-dependiente; CS, Citrato sintasa; ACL, ATP-citrato liasa. Adaptado de Gerrard Wheeler y col., 2016.

I.4 Enzima málica

La enzima málica (EM) cataliza la descarboxilación oxidativa reversible del malato generando CO_2 y dos precursores fundamentales para la síntesis de lípidos: piruvato y un cofactor reducido, NADH o NADPH dependiendo de la enzima (figura I.3). La presencia de un catión divalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}) es esencial para su actividad (Chang y Tong, 2003).

La EM es una proteína ampliamente distribuida en tejidos animales y vegetales, presente también en microorganismos eucariotas y procariotas (Chang y Tong, 2003). Juega un rol clave en la división del flujo de carbono regulando los niveles de CO₂, ácidos orgánicos y cofactores reducidos. En plantas, se han encontrado varias isoformas de cada tipo, NAD- y NADP-dependientes. Aparte de estar involucradas en la fijación fotosintética de CO₂ en plantas C₄ y CAM (Drincovich y col., 2011), se han propuesto diversos roles incluyendo respiración del malato (Tronconi y col., 2008), respuestas de defensa (Maurino y col., 2001; Müller y col., 2008; Voll y col., 2012), tolerancia a estrés osmótico (Liu y col., 2007), biosíntesis de lípidos (Smith y col., 1992; Gerrard Wheeler y col., 2016) y control del pH citosólico (Martinoia y Rentsch, 1994).

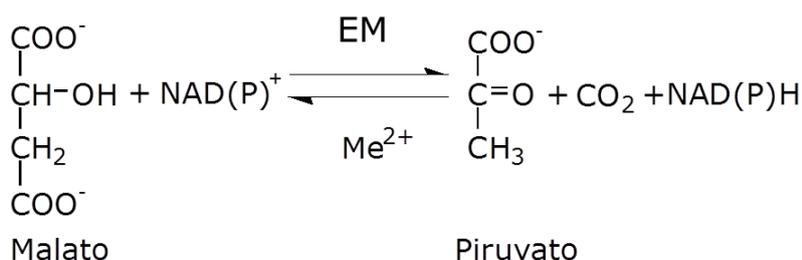


Figura I.3 Reacción catalizada por la enzima málica (EM). Me²⁺ corresponde a un catión divalente, esencial para su actividad.

I.4.1 EM-NAD

Las enzimas NAD-dependientes se han encontrado exclusivamente en la matriz mitocondrial de células eucariotas (Drincovich y col., 2010), en donde participan en la alimentación del CAT. A diferencia de lo que ocurre en organismos no vegetales en donde muestran ser homo-oligómeros, en plantas están compuestas de dos subunidades diferentes (α y β), las cuales agrupan separadamente en dos linajes (figura I.4). *A. thaliana* presenta dos genes *EM-NAD*, cuyos productos, denominados EM-NAD1 y EM-NAD2, han sido caracterizados (Tronconi y col., 2008). Ambos forman homo-dímeros activos, pero además tienen la capacidad de asociarse generando el hetero-dímero. Además, los diferentes tipos de enzimas son reguladas en forma diferencial por diversos efectores, sugiriendo una contribución metabólica particular

para cada una de ellas y una regulación de la actividad total dependiente de la asociación entre subunidades (Tronconi y col., 2010a; 2010b; 2012; 2015).

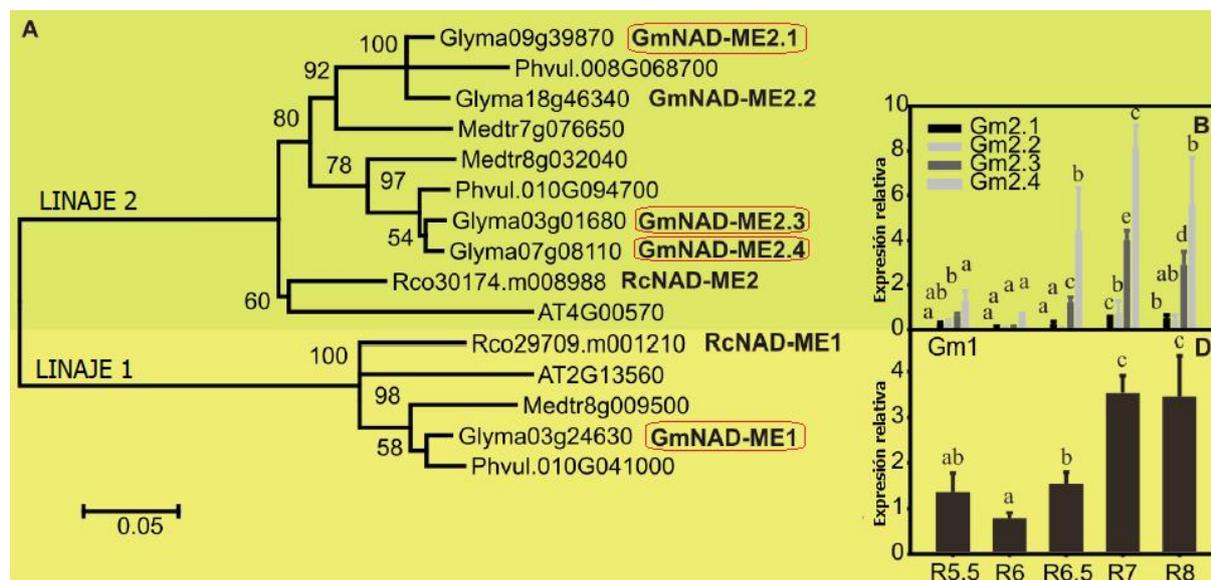


Figura I.4 Expresión de los genes *EM-NAD* en embriones de soja a lo largo de la maduración. Árbol filogenético *EM-NAD* construido utilizando las secuencias de las enzimas de soja (*Glyma*), poroto (*Phvul*), *Medicago truncatula* (*Medtr*), ricino (*Rco*) y *Arabidopsis* (*AT*; *AT2G13560* y *AT4G00570* corresponden a *EM-NAD1* y *EM-NAD2*, respectivamente). Los números indican la significancia estadística de cada rama. Las isoformas estudiadas en este trabajo de tesina se muestran en recuadros rojos (izquierda). Niveles de transcritos de las isoformas de soja en diferentes etapas de la maduración. El gen de actina *Glyma04g39380* se usó como referencia. Para cada transcritto, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) (derecha). Adaptado de Gerrard Wheeler y col., 2016.

En embriones de soja, la actividad *EM-NAD* total sufre un significativo aumento a medida que progresa la maduración (Gerrard Wheeler y col., 20016). De los cinco genes *EM-NAD* presente en el genoma de soja, este aumento en la actividad se correlaciona fundamentalmente con la expresión de los genes *EM-NAD1*, *EM-NAD2.3* y *EM-NAD2.4*.

I.4.2 *EM-NADP*

En plantas, se han encontrado isoformas *NADP*-dependientes tanto en el citosol como en plastidios (Drincovich y col., 2001). La topología de árbol *EM-NADP* muestra tres linajes principales (figura I.5). La línea 1 contiene proteínas localizadas en plastidios y los linajes 2 y 3 contienen enzimas citosólicas. En el mismo sentido, en el

genoma de la planta modelo *Arabidopsis* se encuentran cuatro genes *EM-NADP*, tres de los cuales codifican productos citosólicos (*EM-NADP1*, *EM-NADP2* y *EM-NADP3*) mientras que sólo uno (*EM-NADP4*) codifica una enzima localizada en el plastidio. Estas isoformas han sido estudiadas en detalle (Gerrard Wheeler y col., 2005; 2008; 2009; Maurino y col., 2009; Arias y col., 2013; Badia y col., 2015; 2017), observándose diferencias en el estado nativo, parámetros cinéticos y regulatorios y patrón de expresión, aun cuando comparten un alto grado de identidad (75-90%). Todas estas propiedades distintivas podrían permitir a cada isoforma cumplir con funciones metabólicas específicas *in vivo*. Similarmente, se ha observado esta misma multiplicidad de propiedades para la familia de EM-NADP de maíz (Saigo y col., 2004; Alvarez y col., 2013).

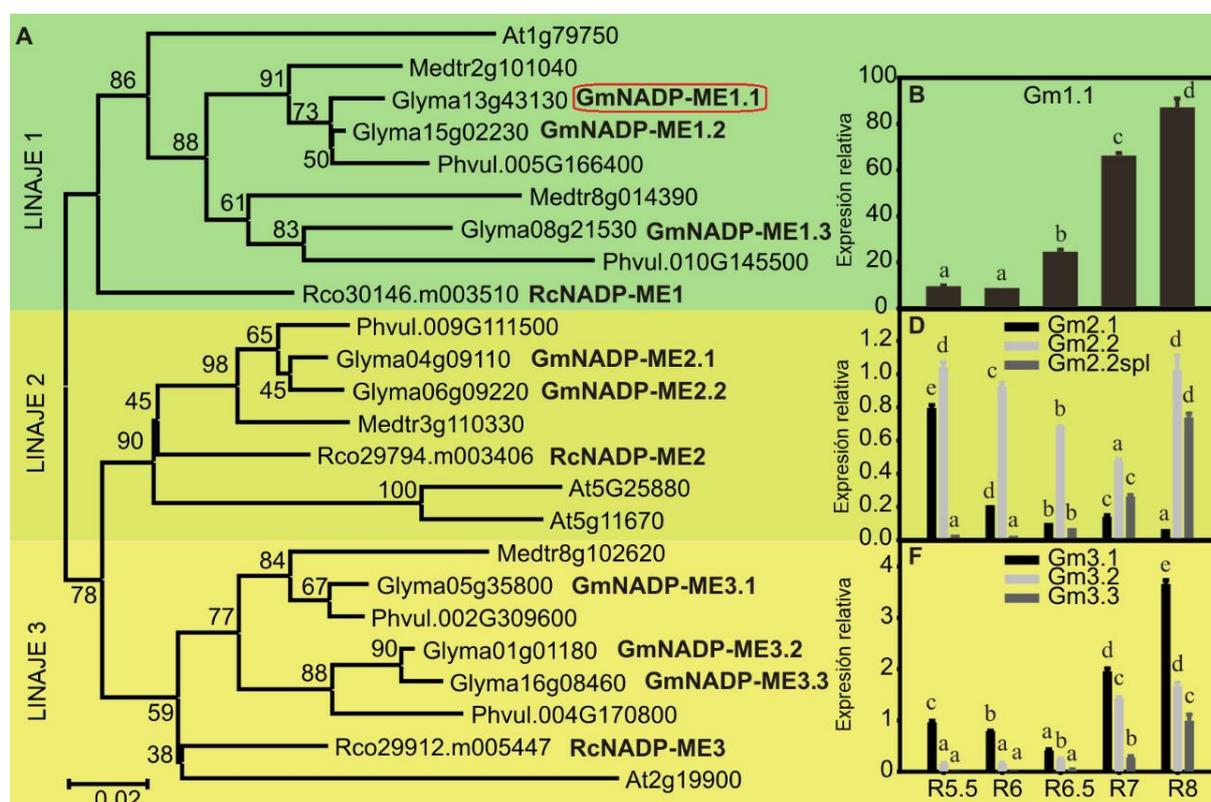


Figura 1.5 Expresión de los genes EM-NADP en embriones de soja a lo largo de la maduración. Árbol filogenético EM-NADP construido utilizando las secuencias de las enzimas de soja (*Glyma*), poroto (*Phvul*), *Medicago truncatula* (*Medtr*), ricino (*Rco*) y *Arabidopsis*. Las isoformas estudiadas en este trabajo de tesina se muestran en recuadros rojos (izquierda). Niveles de transcritos de las isoformas de soja en diferentes etapas de la maduración. El gen de actina *Glyma04g39380* se utilizó como referencia. Para cada transcripto, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) (derecha). Adaptado de Gerrard Wheeler y col., 2016.

Un único transcripto codificante para una EM-NADP plastídica fue detectado en embriones de soja (figura I.5), y su acumulación coincide con el momento en que la deposición de lípidos es más activa (Gerrard Wheeler y col., 2016).

I.4.3 Rol en la síntesis lipídica en soja

Estudios previos de perfiles de actividad, transcriptos y ácidos orgánicos sugieren un rol central de la EM en la provisión de precursores para la síntesis de reservas en embriones de soja (Gerrard Wheeler y col., 2016). Sin embargo, las distintas isoformas tendrían un aporte diferente de acuerdo a su localización subcelular y probablemente a sus características cinéticas. Así, las isoformas mitocondriales EM-NAD estarían involucradas en la síntesis de citrato, el cual sería incorporado en los plastidios proveyendo así esqueletos carbonados para la síntesis de ácidos grasos, mientras que la EM-NADP plastídica sería responsable de la generación del acetyl-CoA directamente en el compartimento en el cual se produce la biosíntesis.

Considerando la participación de las EM-NAD(P) en el abastecimiento de precursores para la biosíntesis lipídica, éstas podrían representar una importante herramienta biotecnológica. Sin embargo, dado que están presentes como familia multigénica en soja, la exhaustiva caracterización de los productos proteicos codificados es necesaria a la hora de encarar estrategias de mejoramiento.

I.5 Objetivo

I.5.1 Objetivo general

El presente proyecto plantea la caracterización de distintas proteínas que componen la familia EM-NAD(P) en soja a través de su clonado y expresión heteróloga, en orden de determinar su potencial como blanco modificable para la obtención de plantas con mejores rindes en la producción de aceite.

I.5.2 Objetivos específicos

1. Clonar, expresar y purificar las isoformas EM-NAD(P) de semillas de soja.
2. Determinar las propiedades cinéticas y regulatorias de las isoformas EM-NAD(P) de semilla de soja.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Clonado de las isoformas EM-NAD (P) de semillas de soja

Las isoformas para el clonado fueron seleccionadas de acuerdo a estudios previos por su relevancia en el contexto de los procesos de maduración y llenado (Gerrard Wheeler y col., 2016): EM-NAD1 (Glyma03g24630), EM-NAD2.3 (Glyma03g01680), EM-NAD2.4 (Glyma07g08110) y EM-NADP1.1 (Glyma13g43130). Además, se seleccionó una que mantuvo un nivel de expresión bajo y constante entre los distintos estadios: EM-NAD2.1 (Glyma09g39870) (figuras I.4 y I.5).

II.1.1 Material de partida

El clonado de las isoformas EM-NAD(P) de semillas de soja se realizó a partir de preparaciones de ADNc disponibles en el laboratorio (Gerrard Wheeler y col., 2016). Para su obtención, se utilizaron embriones recolectados de plantas Pioneer 94m80 cultivadas a campo (sur de Santa Fe) y de distinto estado reproductivo (figura I.1; Fehr y col., 1971).

II.1.2 Diseño de los cebadores

Se diseñaron cebadores específicos con sitios de restricción para amplificar el ADNc de las proteínas maduras utilizando las herramientas Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) y TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Para EM-NAD1 se diseñaron además otro par de primers (*) que contenía una secuencia adicional en el extremo 5' para permitir el corte con enzimas de restricción directamente sobre el producto de amplificación. Los oligonucleótidos cebadores utilizados fueron los siguientes:

EM-NAD1/*Nhe I*: 5' **GCTAGCCCCTCCATCGTCCACA** 3' (Tm: 60,43°C)

EM-NAD1/*Xho I*: 5' **CTCGAGTCATTCTTTCTTGTAAGTAACTAA** 3' (Tm: 53,66°C)

EM-NAD1/*Nhe I* (*): 5' GAAGGC**GCTAGCCCCTCCATCGTCCACA** 3' (Tm: 67,24°C)

EM-NAD1/*Xho I* (*): 5' GCACA**CTCGAGTCATTCTTTCTTGTAAGTAACTAA** 3' (Tm: 57,52°C)

EM-NAD2.1/*Nde I*: 5' **CATATG**TTATCGACGGCGATTC 3' (Tm: 52,97°C)

EM-NAD2.1/*Xho I*: 5' **CTCGAG**CTATTTTTTCATGAACAAGAGG 3' (Tm: 56,70°C)

EM-NAD2.3/*Nhe I*: 5' **GCTAGC**TGCATTGTTTACAAGCGCGGTGCCGACATACTCCACGAT 3'
(Tm: 72,74°C)

EM-NAD2.3/*Xho I*: 5' **CTCGAG**TTATTTTTTCATGAACGAGAGG 3' (Tm: 56,70°C)

EM-NAD2.4/*Nhe I*: 5' **GCTAGC**TGCATTGTTTACAAGCGCGGTGCCGACATACTCCATGAC 3'
(Tm: 72,74°C)

EM-NAD2.4/*Xho I*: 5' **CTCGAG**TCATTTTTTCATGAACGAGAGG 3' (Tm: 58,22°C)

EM-NADP1.1/*Nhe I*: 5' **GCTAGC**AGTATGACCCCAAGCA 3' (Tm: 56,70°C)

EM-NADP1.1/*Xho I*: 5' **CTCGAG**TCATCGGTAGCTTCTGTAGGC 3' (Tm: 62,77°C)

II.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación se desarrollaron en un volumen final de 50 μ l conteniendo 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM mezcla de desoxirribonucleósidos trifosfato, 0,5 μ M de cada oligonucleótido cebador, 5 μ l de molde de ADNc, buffer de amplificación 1X (suministrado por el proveedor de la enzima) y 1 U de Phusion ADN Polimerasa (Thermo Fischer Scientific), una polimerasa de alta fidelidad.

La amplificación se realizó en un termociclador Thermo PX2 HBPX2220, comenzando con una etapa de 30 s a 98°C seguida de 35 ciclos compuestos por tres etapas: 10 s a 98°C, 30 s a 56-61°C y 1 min a 72°C. Por último, se realizó una etapa de extensión de 10 min a 72°C. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de 1% (p/v) agarosa, sembrando en paralelo ADN λ 0,5 μ g/ μ l cortado con *EcoR I* / *Hind III* (Promega) (Sambrook y col., 1989).

En algunos casos se realizó un protocolo de Touchdown PCR (Korbie y Mattick, 2008) para optimizar la amplificación incrementando la especificidad, la sensibilidad y el rendimiento. Se utilizaron las mismas mezclas de amplificación, aunque disminuyendo la cantidad de oligonucleótidos cebadores a 0,2 μ M. En este caso, se siguió un protocolo de dos fases, comenzando con un calentamiento inicial de 3 min a 95°C antes de agregar la polimerasa y luego 15 ciclos de tres etapas: 30 s a 95°C, 45 s a 70°C y 72 s a 72°C. En cada ciclo, se disminuyó en 1°C la temperatura de

hibridación. En la segunda fase se realizaron 20 nuevos ciclos utilizando como temperatura de hibridación la alcanzada en el último ciclo de la primera fase (56°C) y finalizando con un periodo de extensión de 5 min a 72°C.

II.1.4 Clonado en el vector pBluescript II SK (+)

Los fragmentos obtenidos fueron purificados a partir de geles de agarosa utilizando el kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) y posteriormente ligados con el vector pBluescript II SK (+) mediante un protocolo que combina en un único paso la restricción con enzimas de corte romo y la ligación. La mezcla se desarrolló en un volumen final de 10 μ l conteniendo buffer de ligación 1X (Promega), 3 U de T4 ADN Ligasa (Promega), 0,1 μ g de vector, 3 U de *Sma I* (Promega) y el producto de amplificación purificado. La reacción se incubó durante toda la noche a 20°C. Las mezclas fueron utilizadas para la transformación química de bacterias competentes *Escherichia coli* DH5 α . Cabe aclarar que el producto obtenido con los cebadores designados con (*) fue clonado directamente en el vector de expresión.

II.1.5 Transformación de *E. coli* con la mezcla de ligación

Para realizar la transformación, se inocularon 1,5 ml de medio LB (1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extracto de levaduras y 0,5% (p/v) NaCl) con la cepa de *E. coli* DH5 α , se dejó crecer a 37°C con agitación continua hasta alcanzar una densidad óptica de 0,3-0,5 UA. Luego se centrifugó a 5.000 x *g* durante 3 min y se agregó al pellet conteniendo las células 500 μ l de CaCl₂ 0,1 M estéril y frío. Se centrifugó nuevamente y esta vez se le agregó 100 μ l de la misma solución de CaCl₂ y 5-10 μ l de mezcla de ligación. Se incubó 1h en hielo seguido de 2 min a 42°C y 90 s nuevamente en hielo. Posteriormente, se agregó 1 ml de medio LB y se colocó en baño a 37°C por 1h. Para finalizar, las células se sembraron en placas con medio LB agar (LB y 1,5% (p/v) agar) conteniendo 100 μ g/ml ampicilina, 20 μ g/ml X-Gal y 0,1 mM IPTG. Las bacterias

transformantes que poseían el vector ligado con el inserto se evidenciaron como colonias blancas.

II.1.6 Extracción de ADN plasmídico

La preparación de ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando columnas QIAprep (Qiagen). Se crecieron células de *E. coli* transformadas con el plásmido a purificar en 3 ml de medio LB en presencia del agente de selección durante toda la noche a 37°C y con agitación. Este cultivo se centrifugó a 5000 x *g* por 3 min. El pellet se resuspendió en 100 µl de una solución fría de 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA y 50 mM glucosa y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Luego, se agregaron 200 µl de una solución recién preparada de 0,2 N NaOH y 1% (v/v) SDS y se mezcló por inversión. Posteriormente, se agregaron 150 µl de 5 M acetato de potasio pH 4,8, se agitó vigorosamente, se incubó en hielo durante 5 min y se centrifugó a máxima velocidad por 5 min. El sobrenadante se mezcló con 500 µl de 6 M KI y 40 µl de 3 M acetato de potasio pH 5,5 y se colocó en la columna QIAprep, se centrifugó durante 1 min a velocidad máxima y se descartó el eluido. El ADN adsorbido a la membrana de sílica se lavó con 750 µl de 80% (v/v) etanol. Por último, se adicionaron 100 µl de buffer 10 mM Tris-HCl pH 8, se dejó reposar 3 min y se centrifugó a velocidad máxima por 1 minuto para coleccionar el ADN plasmídico.

II.1.7 Chequeo de los plásmidos

El chequeo de los plásmidos se llevó a cabo mediante cortes con enzimas de restricción, cuyos sitios de reconocimiento fueron introducidos en los oligonucleótidos cebadores, así como también otras que reconocían secuencias internas de los fragmentos. La reacción de corte se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl conteniendo 0,5 µg de ADN plasmídico, 5 U de cada enzima de restricción (Promega o Thermo Fischer Scientific) y 1X del buffer adecuado, incubándose 3 h a 37 °C. Los tamaños moleculares de los fragmentos generados se evaluaron en geles de agarosa.

Los clones que con el patrón de restricción esperado fueron enviados al servicio de secuenciación Macrogen (Corea). Los cebadores utilizados fueron T3 y T7 promoter.

Una variante utilizada para el análisis de bacterias transformantes fue la de PCR sobre colonias. En este caso, las reacciones se desarrollaron en un volumen final de 20 μ l conteniendo 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato, 1 μ M oligonucleótidos cebadores específicos para el fragmento de interés, buffer de amplificación 1X (suministrado por el proveedor de la enzima) y 1 U de Taq ADN Polimerasa (Promega). Se colocó directamente cada colonia bacteriana a analizar dentro del tubo de reacción y se llevó a cabo la amplificación y el análisis de los productos.

II.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

II.2.1 Clonado en el vector pET-28a (+)

Los fragmentos de ADNc correspondientes a las isoformas EM-NAD(P) de semillas de soja fueron subclonados en el vector pET-28a (+) de Novagen. Dicho vector (5.369 pb) permite la expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor y de las señales de iniciación de la traducción del bacteriófago T7. Además, posee una cola de histidinas en el extremo amino terminal para posibilitar una fácil purificación. Las ligaciones se desarrollaron en un volumen final de 20 μ l conteniendo buffer de ligación 1X (Promega), 3 U de T4 ADN Ligasa (Promega) y los fragmentos de ADN purificados en una relación molar vector:inserto de 1:3 (con 0,1-0,2 μ g de vector) y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Tanto el vector pET28a (+) como los plásmidos pBluescript II SK (+) con los insertos de interés (sección II.1) fueron digeridos con las enzimas *Nhe I* o *Nde I* (extremo 5') y *Xho I* (extremo 3'). Luego, se transformaron bacterias *E. coli* DH5a utilizando la técnica de $CaCl_2$ (ver sección II.1.5). En este caso, las células se sembraron en placas con medio LB agar conteniendo 50 μ g/ml kanamicina como agente de selección. Para identificar las colonias transformantes que poseían el vector ligado con el inserto, se extrajo ADN plasmídico

de las mismas (sección II.1.6) y se efectuaron los chequeos mediante corte con enzimas de restricción (sección II.1.7).

II.2.2 Transformación del huésped de expresión

Utilizando 10 ng de cada plásmido con inserto, se transformaron bacterias *E. coli* BL21 (DE3) (ver sección II.1.5), las cuales contienen una copia del gen de la ARN Polimerasa del bacteriófago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*.

II.2.3 Purificación de las proteínas de fusión

Las colonias transformantes fueron crecidas en 200 ml de medio LB conteniendo 50 µg/ml kanamicina a 30°C con agitación hasta que la absorbancia a 600 nm fue de 0,5-1 UA. Luego, se adicionó 0,5% (p/v) lactosa y se continuó la incubación durante toda la noche a 15°C. Los cultivos inducidos fueron centrifugados a 10.000 x *g* durante 10 min a 4°C y las células fueron resuspendidas en 25 ml de una solución conteniendo 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,25 M NaCl, 0,01% (v/v) Tritón X-100 y 1 mM PMSF. Luego de 3 pulsos de ultrasonido de 10 s en sonicador MSE, se centrifugó 10 min a 14.000 x *g* a 4°C y se separó el sobrenadante (fracción soluble) del pellet (fracción insoluble).

La fracción soluble obtenida se sembró en una columna con 2-3 ml de resina Niquel-NTA (Qiagen) diseñada para la purificación de proteínas de fusión con una secuencia de polihistidinas. La columna fue previamente lavada con 10 volúmenes de agua destilada, cargada con 5 volúmenes de 50 mM NiSO₄ y equilibrada con 3 volúmenes de buffer de unión (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl y 5 mM imidazol). Luego de la siembra, la columna se lavó con 10 volúmenes de buffer de unión y 6 volúmenes de buffer de lavado (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl y 49 mM imidazol). La proteína unida a la resina se eluyó con 3 volúmenes de una solución conteniendo 20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl y 200 mM imidazol. El eluido se concentró en Centricom YM-50 (Millipore) con un corte de 50 kDa centrifugando a 2.000 x *g*. Luego, se realizaron dos cambios de buffer agregando 10 volúmenes de buffer conteniendo 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl₂ y 10% (v/v) glicerol en cada cambio. Todo el

procedimiento se llevó a cabo a 4°C. Por último, se agregó un volumen de glicerol a las proteínas purificadas concentradas y se las almacenó a -20°C.

Las distintas fracciones se analizaron por SDS-PAGE (sección II.2.4) y se realizaron medidas de actividad EM-NAD (P) y concentración de proteínas (ver secciones II.3 y II.4).

II.2.4 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes

Las electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se llevaron a cabo utilizando la celda Mini-PROTEAN III de Bio-Rad y el sistema discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970). Las concentraciones finales de acrilamida fueron 10% (p/v) para el gel de separación y 5% (p/v) para el de concentración. Las muestras diluidas 1:5 en buffer de siembra (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 25% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 5% (v/v) 2-mercaptoetanol y 0,1% (p/v) azul de bromofenol) se calentaron a 100°C durante 2 minutos. Los geles fueron analizados por tinción con azul de Coomassie (Smith, 1984).

II.3 Análisis de las propiedades cinéticas y regulatorias de las proteínas

II.3.1 Determinación de la actividad EM-NAD (P)

Las actividades enzimáticas se determinaron en un espectrofotómetro Jasco V-630 a 30 C, siguiendo la producción o consumo de NAD(P)H a 340 nm en cubetas de 0,5 ml. Las reacciones se iniciaron con el agregado de la enzima. Se define una unidad (U) como la cantidad de enzima que cataliza la formación o consumo de 1 μmol de NAD(P)H por minuto en las condiciones especificadas ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

➤ Actividad EM-NAD:

El medio de ensayo estándar contenía 50 mM MES-NaOH pH 6,5, 10 mM MnCl_2 , 10 mM L-malato pH 8 y 2 mM NAD (Tronconi y col., 2008).

➤ Actividad EM-NADP:

El medio de ensayo estándar contenía 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM L-malato pH 8 y 0,5 mM NADP (Gerrard Wheeler y col., 2005).

➤ Carboxilación reductiva:

La actividad EM-NAD(P) en sentido reverso fue determinada en medios conteniendo 50 mM MOPS-KOH pH 7, 10 mM MgCl₂, 30 mM piruvato, 50 mM NaHCO₃ y 0,2 mM NADPH.

➤ Determinación de pH óptimo:

Para la determinación de los valores de pH óptimo de las enzimas purificadas se utilizaron los siguientes buffers: 50 mM Tris-HCl pH 7,5-8,0-8,9, 50 mM MOPS-KOH pH 7,0, 50 mM MES-NaOH pH 6,0-6,5 y 50 mM acetato de sodio-ácido acético pH 5,5-4,5.

II.3.2 Determinación de las constantes cinéticas

Los parámetros cinéticos de las enzimas purificadas se determinaron midiendo la velocidad inicial de la reacción al variar la concentración de uno de los sustratos mientras se mantenía la concentración de los otros sustratos a niveles altos y constantes. Los datos fueron ajustados a la siguiente ecuación:

$$v = V_{\text{máx}} * S^{\text{nH}} / (S_{0,5}^{\text{nH}} + S^{\text{nH}})$$

donde v representa la velocidad inicial a la concentración de sustrato variable (S), $V_{\text{máx}}$ es la velocidad máxima de la reacción, nH es el índice de Hill y $S_{0,5}$ es la concentración de sustrato para la cual se obtiene la mitad de $V_{\text{máx}}$. Cuando nH es igual a la unidad, la ecuación se convierte en la ecuación de Michaelis y Menten y se dice que la enzima posee una respuesta hiperbólica. La constante catalítica (k_{cat}) corresponde a los μmoles de sustrato convertidos en producto por s en condiciones óptimas ($V_{\text{máx}}$) por μmol de sitio activo.

Las soluciones utilizadas fueron preparadas con $MnCl_2$ o $MgCl_2$ de acuerdo a sus constantes de disociación (Mn-malato: 20,0 mM; Mn-NAD: 12,9; Mg-malato: 28,2 mM y Mg-NADP: 19,1 mM; Grover y col., 1981) con el fin de evitar el secuestro del cofactor metálico. Los valores de $S_{0,5}$ fueron calculados en función de las concentraciones de los ligandos libres utilizando el programa Sigma Plot. Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

II.3.3 Estudio de posibles efectores de la actividad enzimática

La búsqueda de posibles activadores o inhibidores de la actividad EM-NAD(P) se realizó ensayando los siguientes metabolitos: succinato, fumarato, aspartato, oxaolacetato, ATP, ADP, AMP, glucosa-6-P, fructosa-1,6-bis-P, fosfoenolpiruvato, glutamato, glicina, glutamina, α -cetoglutarato, CoA y acetil-CoA. Excepto CoA y acetil-CoA, los cuales fueron evaluados a 20 μ M, los demás compuestos se ensayaron a dos concentraciones: 0,5 mM o 2 mM. Las determinaciones se realizaron a niveles subsaturantes de sustratos (iguales a los valores de $S_{0,5}$ determinados para cada sustrato en cada isoforma estudiada).

II.4 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína se determinó utilizando el reactivo de Protein Assay de Bio-Rad en el espectrofotómetro para microplacas Epoch 2 de BioTek. Se utilizó albúmina sérica bovina de Wiener lab para la realización de la curva de calibración correspondiente.

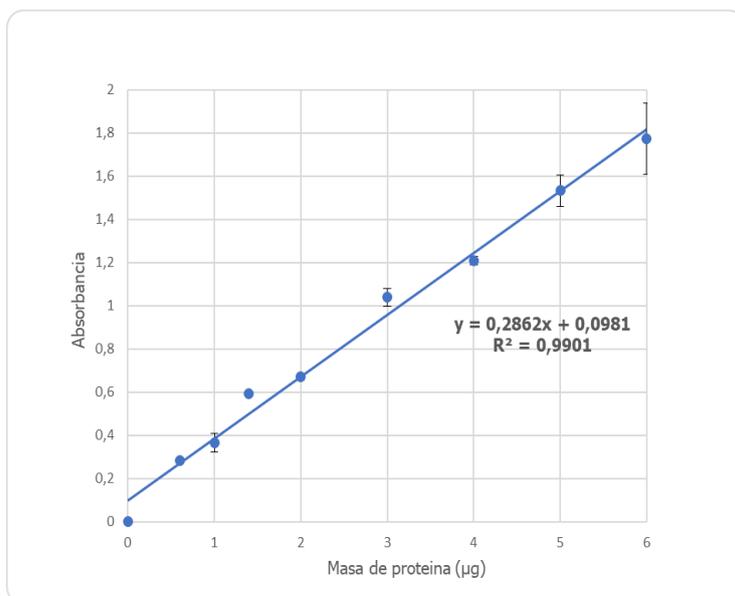


Figura II.1 Curva de calibración para la determinación de concentración de proteínas. Se utilizó como estándar albumina sérica bovina.

III.RESULTADOS

El clonado de un gen de interés en un vector de expresión permite la síntesis de grandes cantidades de proteína para su posterior caracterización. El vector pET-28a (+) usado en este trabajo hace uso de la ARN Polimerasa del bacteriófago T7, una enzima muy activa, procesiva y de alta selectividad. El ADNc de interés es inicialmente clonado usando un huésped (*E. coli* DH5 α) que no contiene el gen de la polimerasa, eliminando así la inestabilidad del plásmido provocada por la producción de proteínas potencialmente tóxicas. Luego, es transferido a un huésped de expresión (*E. coli* BL21 DE3) que contiene una copia del gen de esta enzima bajo el control de un promotor fuerte e inducible por lactosa. La cola de hexahistidina codificada en este vector permite la purificación de la proteína de fusión por cromatografía de afinidad mediante el uso de una matriz cargada con iones Ni²⁺. Así, la proteína recombinante puede ser recuperada casi a homogeneidad del extracto bacteriano en un único paso y en forma separada de enzimas endógenas que posean la misma actividad enzimática. En esta sección se describe el clonado, la expresión y la purificación de distintas isoformas EM-NAD(P) de soja (figura III.1). Se detallan los experimentos realizados con las proteínas purificadas para determinar sus parámetros cinéticos y evaluar su actividad bajo distintas condiciones de reacción.

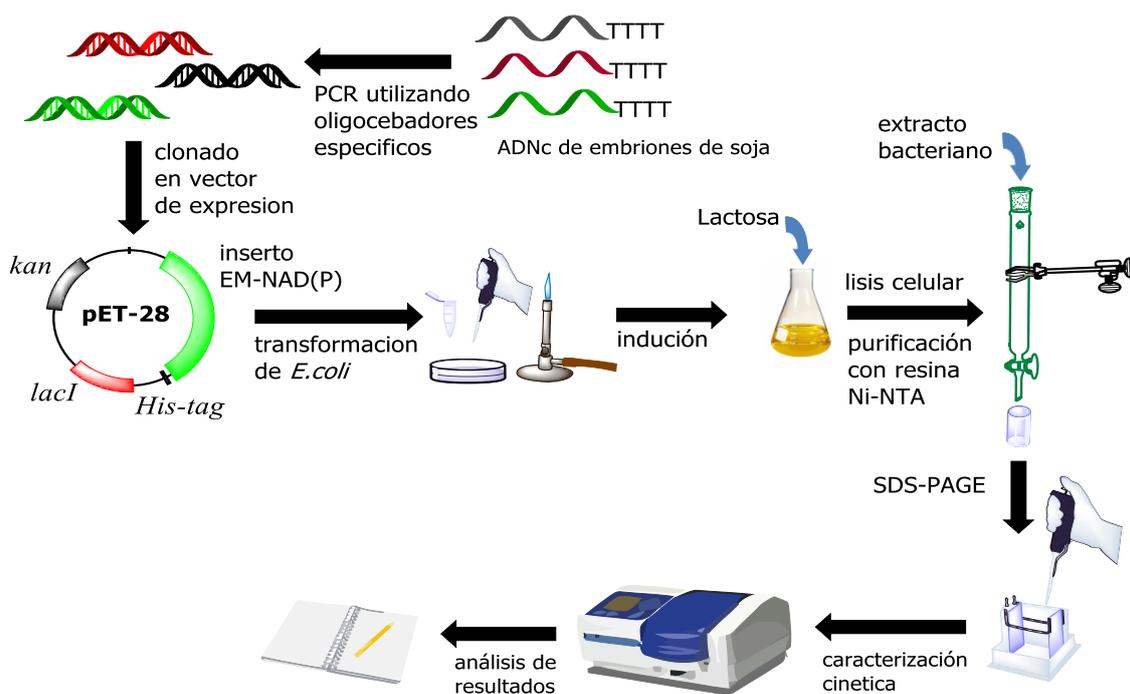


Figura III.1 Esquema representativo de los experimentos realizados en el presente trabajo de tesis. En una primera etapa los ADNc de embriones de soja de las distintas isoformas de EM-NAD(P) se amplificaron por PCR utilizando oligocebadores específicos, los insertos de EM-NAD(P) se clonaron en vectores de la serie pET y se utilizaron para transformar *E. coli*. Posteriormente se indujo la expresión, para proceder a la purificación del extracto bacteriano con resina Ni-NTA y concentración de las proteínas recombinantes. Una vez, comprobada la correcta purificación se realizó la caracterización cinética y análisis de los resultados.

III.1 Aislamiento de los ADNc de las EM-NAD(P) de soja

Las isoformas a caracterizar fueron seleccionadas de acuerdo a estudios previos de su patrón de expresión y a su localización subcelular predicha (Tabla III.1): EM-NAD1 (Glyma03g24630), EM-NAD2.3 (Glyma03g01680), EM-NAD2.4 (Glyma07g08110) y EM-NADP1.1 (Glyma13g43130) aumentaron sus niveles de transcripto a medida que progresa la maduración del embrión de soja (figuras I.4 y I.5), por lo que se postula que podrían participar en el aporte de precursores para la biosíntesis de reservas (figura I.2). Además, se seleccionó una que mantuvo un nivel de expresión bajo y constante entre los distintos estadios: EM-NAD2.1 (Glyma09g39870) (figura I.4).

Enzima	GeneID	Localización predicha (TargetP)	Longitud del transcripto (pb)	Longitud proteína madura (AA)	Masa Molecular (kDa)
EM-NAD1	Glyma03g24630	Mitocondrial	1869	585	67,2
EM-NAD2.1	Glyma09g39870	Mitocondrial	1806	586	66,9
EM-NAD2.3	Glyma03g01680	Mitocondrial	1815	578	66,3
EM-NAD2.4	Glyma07g08110	Mitocondrial	1815	578	66,2
EM-NADP1.1	Glyma13g43130	Plastídica	1944	611	69,9

Tabla III.1 Isoformas seleccionadas para su caracterización en este trabajo de tesina.

A partir de las secuencias EM-NAD(P) de soja (www.phytozome.net) se diseñaron cebadores específicos para amplificar el ADNc de las isoformas maduras seleccionadas, incorporando los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción *Nhe I* (extremo 5´) y *Xho I* (extremo 3´) para EM-NAD1, EM-NAD2.3, EM-NAD2.4 y EM-NADP1.1, o *Nde I* (extremo 5´) y *Xho I* (extremo 3´) para EM-NAD2.1 (sección II.1.2). Para la amplificación se utilizó la enzima Phusion ADN Polimerasa, la cual proporciona alta fidelidad al proceso, y ADNc de embriones de soja en estado R6.5 para EM-NAD1 (figuras I.1 y I.4), en estado R7 (figuras I.1 y I.4) para EM-NAD2.1, EM-NAD2.3 y EM-NAD2.4 y en estado R8 (figuras I.1 y I.5) para EM-NADP1.1.

En una primera etapa se lograron amplificar tres isoformas: EM-NAD2.1, EM-NAD2.4 y EM-NADP1.1, los productos de amplificación fueron ligados en el vector pBluescript II SK (+) (figura III.2), analizados por restricción o PCR y secuenciados (sección II.1.7). Para la construcción EM-NAD2.1 se evaluaron 32 colonias blancas, de las cuales 3 presentaron el patrón de restricción correcto (figura III.3). La secuenciación arrojó que una de estas colonias presentó una delección de 72 nucleótidos, mientras que otra mostró varias mutaciones puntuales que producían cambios de aminoácidos en la región que incluía el codón de terminación del polipéptido. Finalmente, la tercera colonia exhibió la secuencia correcta libre de mutaciones. Para el clonado de EM-NAD2.4 y EM-NADP1.1 se analizaron 6 colonias

blancas, de las cuales 4 y 2 mostraron el patrón de restricción correcto para cada construcción, respectivamente. Dos colonias de cada tipo fueron secuenciadas, de las cuales una de cada tipo presentó la secuencia correcta correspondiente. Las restantes presentaban deleciones de uno o varios nucleótidos. La isoforma EM-NAD2.3 pudo ser amplificada utilizando un protocolo de Touchdown PCR (ver sección II.1.3). Posteriormente, se analizaron por restricción 31 colonias blancas aisladas. Sólo una de las mismas contenía ADN plasmídico con el patrón de restricción correcto, y, afortunadamente, su inserto poseía la secuencia correcta.

Se obtuvieron así los plásmidos pBS::EM-NAD2.1 (proveniente del clon 30); pBS::EM-NAD2.3 (proveniente del clon 18), pBS::EM-NAD2.4 (proveniente del clon 3) y pBS::EM-NADP1.1 (proveniente del clon 8) (figuras III.2 y III.3).

En el caso de EM-NAD1, la reacción de amplificación se efectuó también utilizando un protocolo de Touchdown PCR (sección II.1.3). Se analizaron clones provenientes de tres rondas independientes de PCR-ligación-transformación. Plásmidos con el patrón de restricción correcto provenientes de un total de 12 colonias fueron analizados. Sin embargo, ninguna de estas construcciones contenía la secuencia correspondiente al ADNc de la enzima libre de mutaciones. Las mutaciones encontradas fueron variadas en tipo y región de la secuencia afectada. Debido a este problema, se ensayó otra estrategia consistente en ligar directamente el producto de amplificación obtenido en el vector de expresión. Sin embargo, tampoco se obtuvo la construcción correcta luego de analizar mediante secuenciación 4 clones. Los experimentos tendientes a obtener el ADNc que codifica para esta isoforma siguen en proceso en el laboratorio.

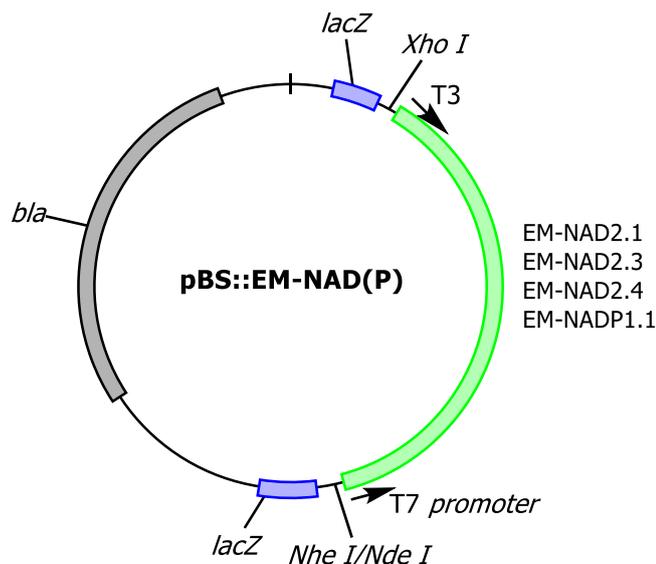


Figura III.2 Esquema de los plásmidos pBluescript II SK (+) conteniendo los insertos correspondientes a distintas isoformas EM-NAD(P) de soja obtenidos en este trabajo. *bla*: gen que confiere resistencia a ampicilina. *lacZ*: gen del péptido α de la enzima β -galactosidasa que permite la selección de bacterias transformantes que poseen el vector ligado con el inserto. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *Nhe I* / *Nde I* y *Xho I* introducidos por los cebadores utilizados en la amplificación y los sitios de hibridación de los oligonucleótidos T3 y T7 promoter utilizados en la secuenciación. Cabe aclarar que el fragmento EM-NAD(P) puede insertarse en cualquiera de las dos orientaciones posibles.

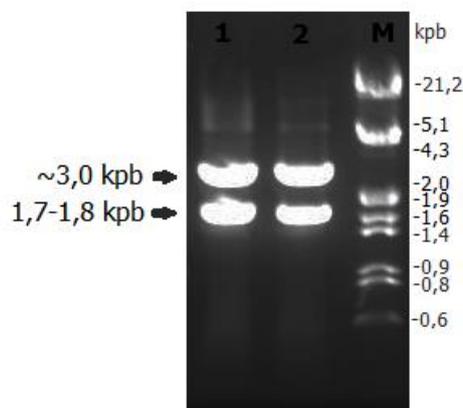


Figura III.3 Análisis de los vectores obtenidos. Se muestran chequeos de cortes con enzimas de restricción de los clonados en pBluescript II SK (+). Se sembraron 10 μ l de corte en cada caso. M: marcador de tamaño molecular (ADN de fago λ digerido con *EcoR I* + *Hind III*, Promega). Calle 1: pBS::EM-NAD2.1 (clon 30) digerido con *Nde I* y *Xho I*; Calle 2: pBS::EM-NAD2.4 (clon 3) con *Nhe I* y *Xho I*.

III.2 Subclonado de los ADNc en el vector de expresión

Para la síntesis y purificación de grandes cantidades de cada isoforma EM-NAD(P) de soja seleccionada, se subclonaron los fragmentos de los plásmidos

pBS::EM-NAD2.1, pBS::EM-NAD2.3, pBS::EM-NAD2.4 y pBS::EM-NADP1.1 en el vector de expresión pET-28a (+), permitiendo así obtener las proteínas recombinantes fusionadas a una cola de hexahistidina. Los plásmidos y el vector pET-28a (+) fueron digeridos con las enzimas de restricción *Nhe I*/*Nde I* (según el caso) y *Xho I*. Luego, los productos de digestión se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa y se purificaron para realizar la ligación que se utilizó para transformar bacterias competentes *E. coli* DH5 α . Las células transformadas fueron seleccionadas en placa de Petri con medio LB agar conteniendo kanamicina (sección II.2.1). El ADN plasmídico obtenido de las colonias (figura III.4) fue analizado por digestión con las mismas enzimas de restricción, generándose el fragmento correspondiente al vector de 5400pb y el fragmento correspondiente a cada inserto de ~1700-1800pb (figura III.5).

De esta manera se obtuvieron los plásmidos pET::EM-NAD2.1 (proveniente de la colonia 6), pET::EM-NAD2.3 (proveniente de la colonia 2), pET::EM-NAD2.4 (proveniente de la colonia 5) y pET::EM-NADP1.1 (proveniente de la colonia 3) (figuras III.4, III.5 y III.6).

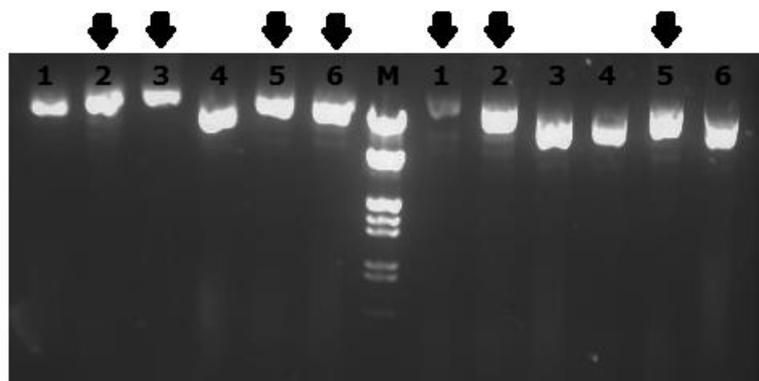


Figura III.4 ADN plasmídico obtenido de colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con las mezclas de ligación. Clonado de EM-NADP1.1 (izquierda) y EM-NAD2.3 (derecha). M: marcador de tamaño molecular (ADN de fago λ digerido con *EcoR I* + *Hind III*, Promega), en orden descendente se pueden apreciar los fragmentos (pb): 21226, 5148, 4268, 2027, 1904, 1584, 1375, 974, 831 y 564. Para el posterior chequeo con enzimas de restricción se eligieron los plásmidos que presentaban mayor tamaño (indicados con flechas). Se indica el número designado a cada colonia.

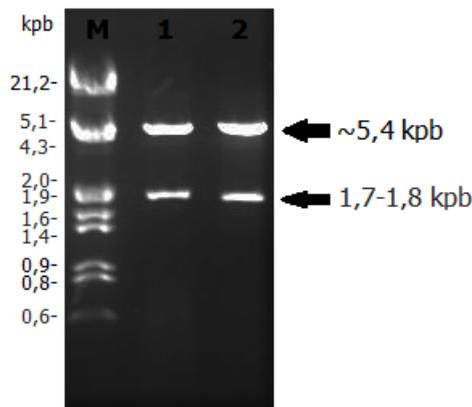


Figura III.5 Análisis de los vectores obtenidos. Se muestran chequeos de cortes con enzimas de restricción de los clonados en pET-28a (+). Se sembraron 5 μ l de cada corte. M: marcador de tamaño molecular (ADN de fago λ digerido con *EcoR I* + *Hind III*, Promega). Calle 1: pET::EM-NADP1.1 (colonia 3) digerido con *Nhe I* y *Xho I*; Calle 2: pET::EM-NAD2.3 (colonia 2) digerido con *Nhe I* y *Xho I*.

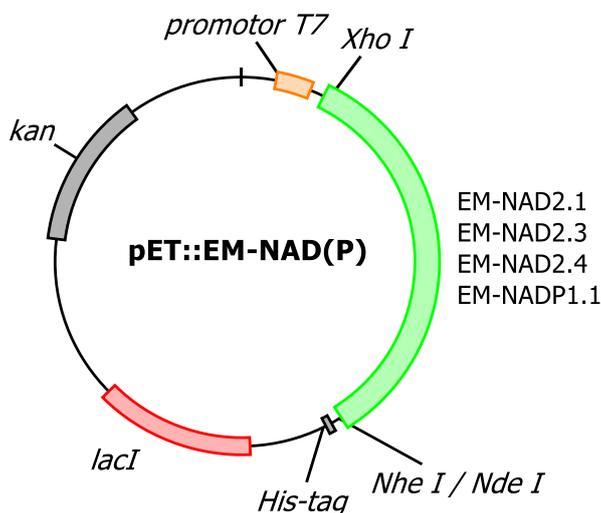


Figura III.6 Esquema de los plásmidos pET-28a (+) conteniendo los insertos correspondientes a distintas isoformas EM-NAD(P) de soja obtenidos en este trabajo. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción. *kan*: gen que confiere resistencia a kanamicina, *lacI*: gen que codifica para el represor del operón *lac*; His-tag: cola de hexahistidinas amino terminal que permite la purificación de afinidad de las proteínas de fusión. Estos vectores permiten expresar el gen de interés bajo el control de un promotor reconocido por la ARN Polimerasa del bacteriófago T7. Las construcciones fueron diseñadas de manera que sólo 21-23 residuos de aminoácidos extra sean introducidos en el extremo amino terminal de las proteínas.

III.3 Expresión y purificación de las distintas isoformas EM-NAD(P) de soja

Los vectores de expresión obtenidos fueron utilizados para transformar bacterias competentes *E. coli* BL21 (DE3). Las células transformadas fueron seleccionadas en placas de Petri con medio LB agar conteniendo kanamicina. La expresión se indujo por agregado de 0,5% (p/v) lactosa a un cultivo de estas bacterias, según se indica en la sección II.2.3.

El vector de expresión utilizado codifica una secuencia de 6 residuos consecutivos de histidina que se une a cationes divalentes (ej. Ni^{+2}) lo que permite la purificación de las proteínas de fusión obtenidas en una matriz de afinidad. Así, todas las proteínas de fusión fueron purificadas sembrando los extractos inducidos en una columna de Ni-NTA (sección II.2.3.). En la figura III.7 se muestra un SDS-PAGE de las distintas fracciones obtenidas durante la purificación de la isoforma EM-NAD2.1. Se puede observar una buena cantidad de proteína concentrada (calle 7), un grado de pureza aceptable y una masa molecular esperada de acuerdo a la secuencia de ADNc. Similares resultados se obtuvieron para las demás isoformas (figura III.8).

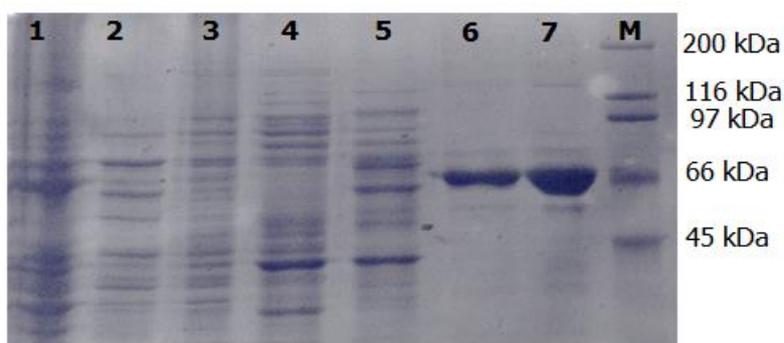


Figura III.7 Purificación de isoforma EM-NAD2.1 de soja. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de las distintas etapas de la purificación de la proteína recombinante. M: marcador de masa molecular (High-Range SDS-PAGE Standards de Bio-Rad). Calle 1: fracción insoluble (10 μl); Calle 2: siembra columna Ni-NTA (15 μl); Calle 3: fracción no retenida en la siembra (15 μl); Calle 4: lavado con buffer de unión (15 μl); Calle 5: buffer de lavado (15 μl); Calle 6: eluido (15 μl); Calle 7: proteína concentrada (5 μl).

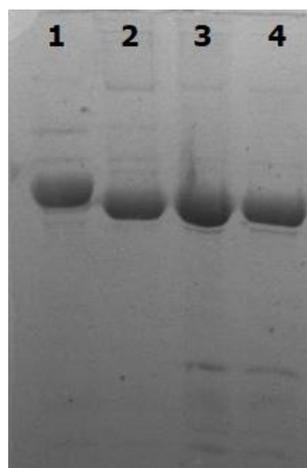


Figura III.8 Proteínas recombinantes purificadas obtenidas en este trabajo. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de las isoformas ya purificadas y concentradas. Calle 1: EM-NADP1.1; Calle 2: EM-NAD2.1; Calle 3: EM-NAD2.3 y Calle 4: EM-NAD2.4. En cada calle se sembraron 4 μ g de proteína concentrada.

III.4 Caracterización de las distintas isoformas EM-NAD(P) de soja

Las distintas isoformas EM-NAD(P) de soja purificadas fueron sometidas a diversos ensayos con el fin de lograr una caracterización cinética de las mismas.

➤ Determinación de pH óptimo

Los valores de pH óptimo de las enzimas fueron determinados midiendo la velocidad inicial de la reacción a distintos pH, en las condiciones estándar indicadas en la sección II.3.1.

Las isoformas NAD-dependientes presentaron un pH óptimo comprendido entre 5,5 y 6,5, mientras que para EM-NADP1.1 el pH óptimo se encontró entre 7 y 8 (figura III.9). Para continuar la caracterización cinética se utilizó un pH = 6,5 para EM-NAD2.1, EM-NAD2.3 y EM-NAD2.4 y un pH = 7,5 para EM-NADP1.1.

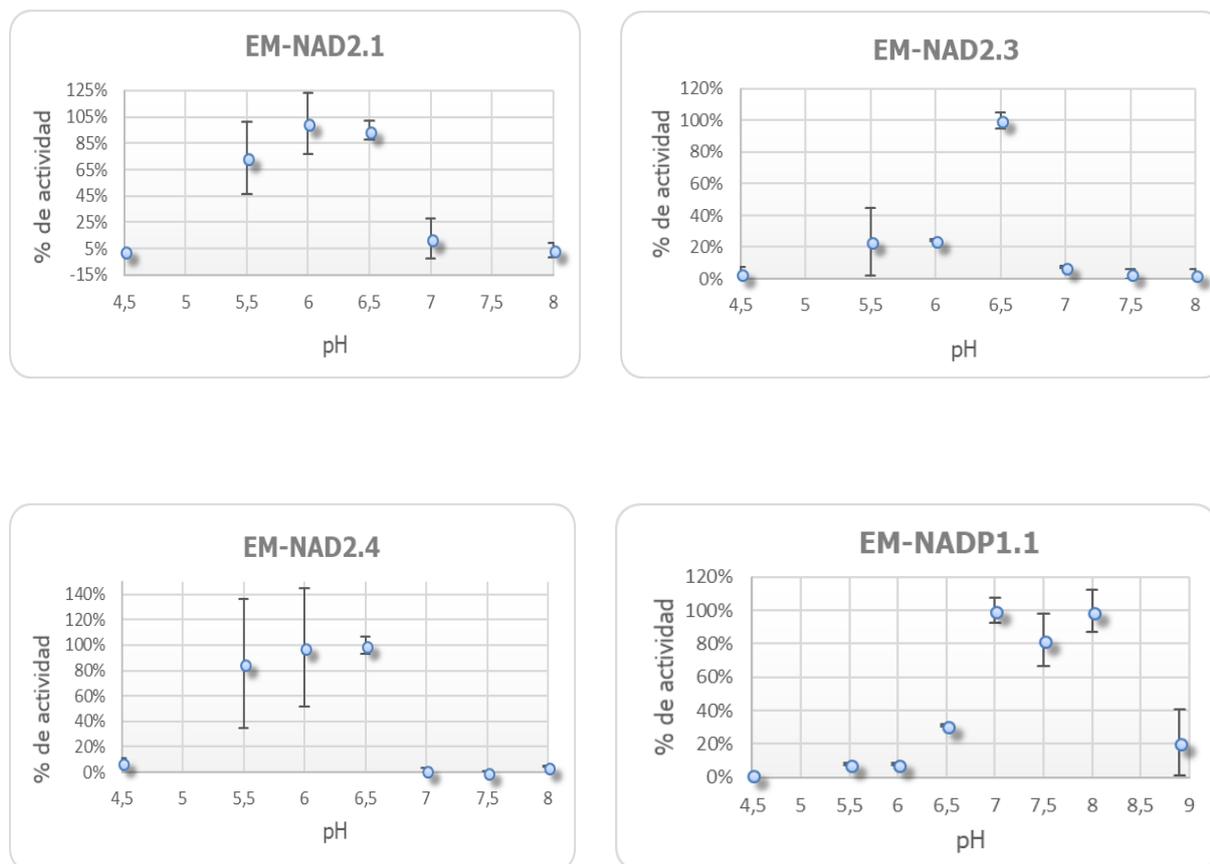


Figura III.9 Curvas de pH óptimo para las distintas isoformas EM-NAD(P) de soja. Los datos son presentados como el porcentaje de la actividad máxima obtenida para cada enzima recombinante. Para cada valor de pH, se muestran el promedio y la desviación estándar entre dos determinaciones.

➤ Preferencia de cofactor metálico

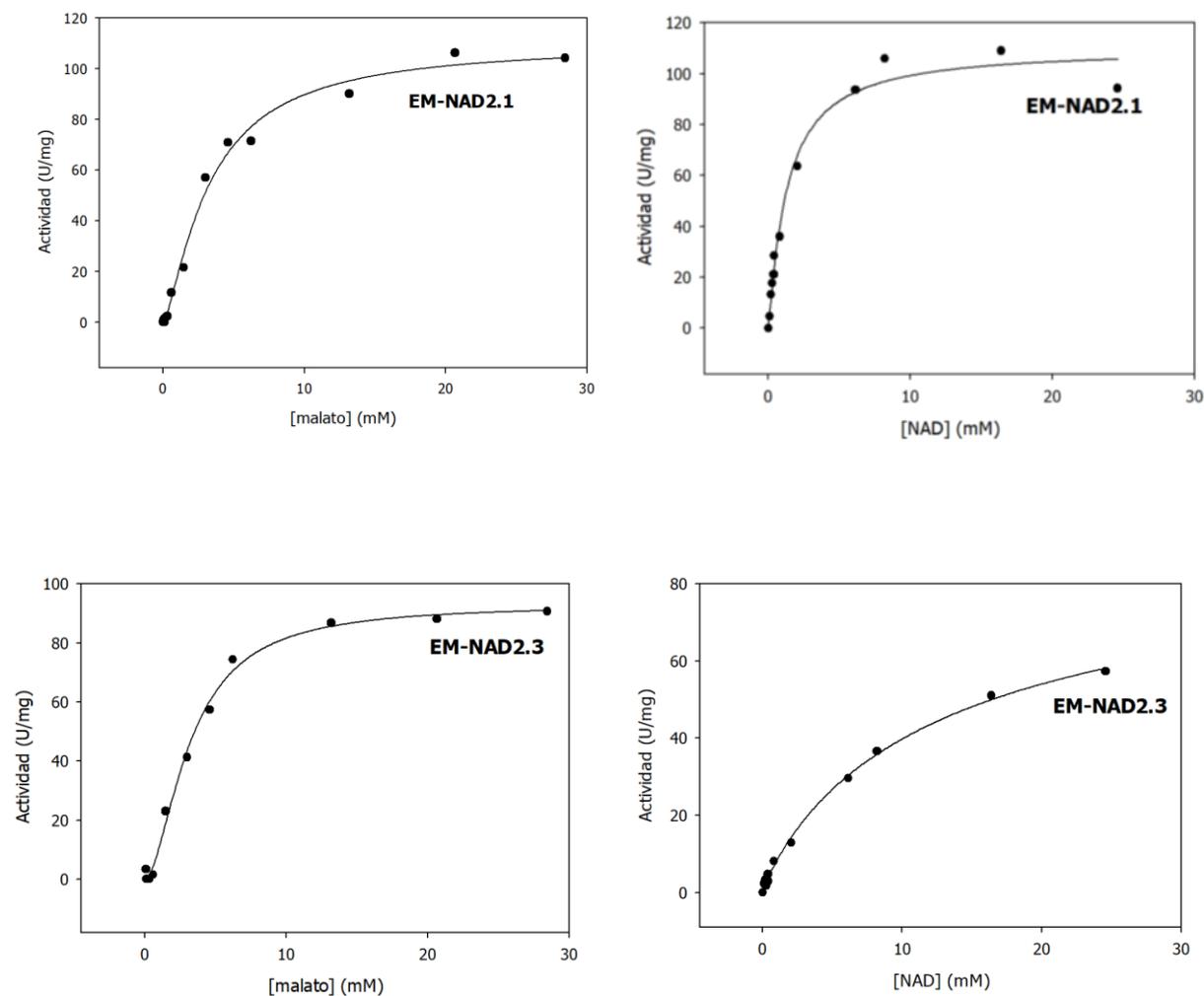
La actividad de las isoformas se midió en presencia de $MnCl_2$ o $MgCl_2$ en una concentración final de 10 mM. Las isoformas dependientes de NAD no presentaron actividad detectable en presencia de $MgCl_2$ (tabla III.2). En cambio, EM-NADP1.1 presentó actividad con ambos iones metálicos, aunque la actividad en presencia de $MnCl_2$ resultó 1,6 veces mayor (tabla III.2).

	Actividad (U/ml) con $MgCl_2$	Actividad (U/ml) con $MnCl_2$
EM-NAD2.1	ND	9,43
EM-NAD2.3	ND	9,99
EM-NAD2.4	ND	0,505
EM-NADP1.1	270	428

Tabla III.2 Actividad en presencia de los cofactores $MgCl_2$ y $MnCl_2$. Las medidas se realizaron por duplicado. Los datos mostrados corresponden a los valores promedios. ND: actividad no detectada.

➤ Constantes cinéticas

Los valores de k_{cat} y $S_{0,5}$ para malato y NAD o NADP de las enzimas purificadas fueron estimados midiendo la velocidad inicial de la reacción en función de la concentración libre de cada sustrato, manteniendo alto y constante el nivel de los otros sustratos en el medio de reacción. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras III.10 y 11 y se compilan en las tablas III.3 y 4.



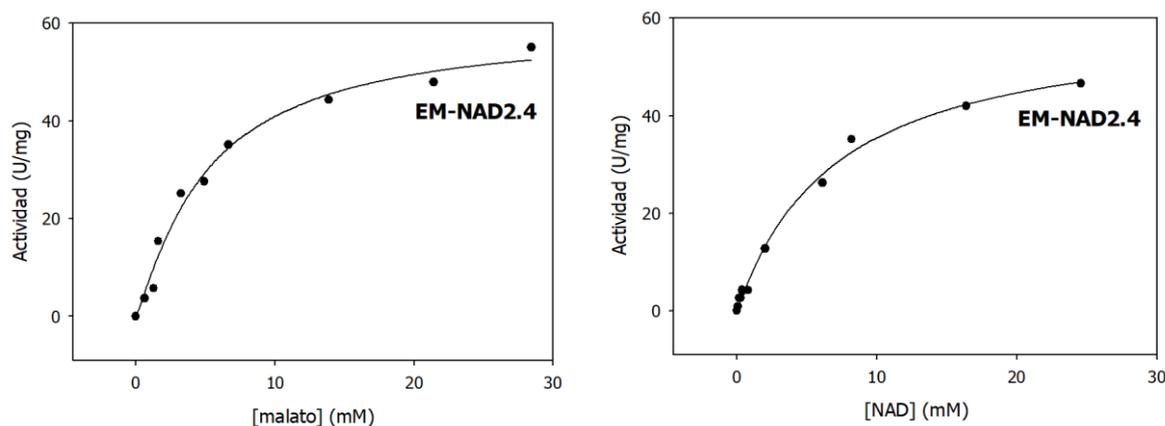


Figura III.10 Actividad de las isoformas EM-NAD2.1, EM-NAD2.3 y EM-NAD2.4 en función de la concentración de malato y NAD. Las medidas se realizaron a pH 6,5 por duplicado (se muestra sólo una de las determinaciones). Las concentraciones usadas del sustrato que se mantuvo constante en cada caso fueron de: 5 mM NAD y 19 mM malato para EM-NAD2.1, 30 mM NAD y 10 mM malato para EM-NAD2.3 y 22 mM NAD y 28 mM malato para EM-NAD2.4.

	EM-NAD2.1	EM-NAD2.3	EM-NAD2.4
k_{cat} (s^{-1})	122,4 ± 6,0	102,8 ± 6,9	65,5 ± 7,3
$S_{0,5L-malato}$ (mM)	3,3 ± 0,3	3,2 ± 0,2	5,1 ± 1,2
n_{Hill} _{L-malato}	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,2 ± 0,2
$S_{0,5NAD}$ (mM)	1,3 ± 0,3	13,8 ± 3,9	6,8 ± 1,5
n_{Hill} _{NAD}	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1

Tabla III.3 Parámetros cinéticos de las isoformas EM-NAD2.1, EM-NAD2.3 y EM-NAD2.4. Los valores son el promedio de dos experimentos diferentes con su correspondiente desviación estándar. Para cada isoforma, los valores de k_{cat} obtenidos de las curvas de saturación de malato y NAD fueron prácticamente idénticos y se determinaron teniendo en cuenta los valores de masa molecular de cada isoforma indicados en la tabla III.1.

Cabe destacar que en principio las medidas para EM-NADP1.1 se llevaron a cabo a pH 7,5 pero debido a que se observó inhibición por el sustrato malato a altas concentraciones del mismo (no mostrado), la determinación de los parámetros cinéticos fue realizada a pH = 8 (figura III.11; tabla III.4).

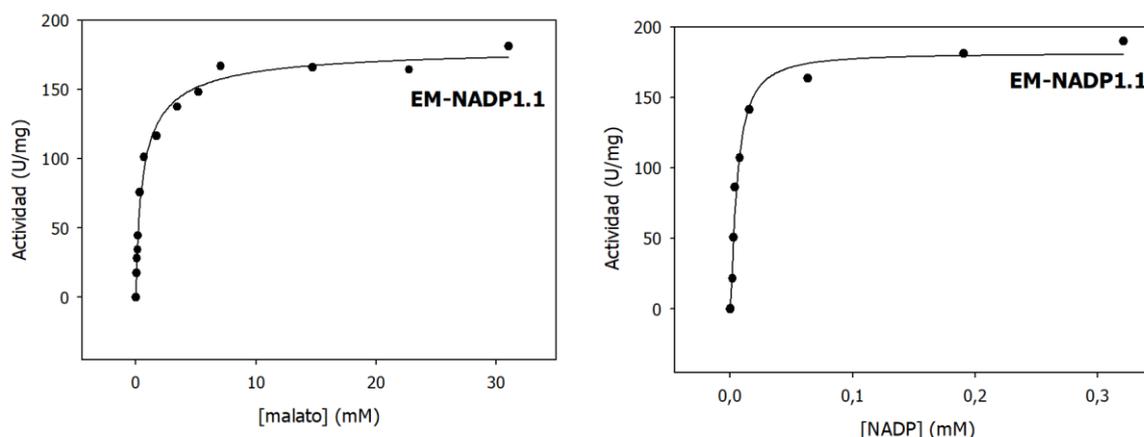


Figura III.11 Actividad de EM-NADP1.1 en función de la concentración de malato y NADP. Las medidas se realizaron a pH 8 por duplicado (se muestra sólo una de las determinaciones). Las concentraciones de NADP y malato usadas fueron de 0,5 mM y 18,1 mM respectivamente.

EM-NADP1.1	
k_{cat} (s^{-1})	211,4 ± 8,6
$S_{0,5L}$-malato (mM)	0,6 ± 0,1
nHill_{L-malato}	0,8 ± 0,1
$S_{0,5NADP}$ (μM)	5,6 ± 0,7
nHill_{NADP}	1,3 ± 0,2
$k_{cat}/ S_{0,5L}$-malato	352,3

Tabla III.4 Parámetros cinéticos de la isoforma EM-NADP1.1. Los valores son el promedio de dos experimentos diferentes con su correspondiente desviación estándar. Los valores de k_{cat} y $S_{0,5}$ fueron determinados a pH 8 y teniendo en cuenta el valor de masa molecular de la isoforma indicado en la tabla III.1.

Los resultados obtenidos indicaron que EM-NADP1.1 presenta mayor k_{cat} que las isoformas que utilizan NAD como cofactor (tablas III.3 y 4). A su vez, también exhibe mayor afinidad por sus sustratos. Los valores de $S_{0,5}$ para malato de EM-NAD2.1, EM-NAD2.3 y EM-NAD2.4 son en promedio 6 veces mayores que el de EM-NADP1.1 (tablas III.3 y 4). Y aún mayores diferencias pudieron observarse para el cofactor dinucleótido, siendo el valor de $S_{0,5NADP}$ del orden de μ M para EM-NADP1.1 (tabla III.4) y los valores de $S_{0,5NAD}$ del orden de mM para EM-NAD2.1, EM-NAD2.3 y EM-NAD2.4 (tabla III.3). Las curvas indicaron un comportamiento hiperbólico para las

enzimas de soja (nH cercano a la unidad; tablas III.3 y 4), excepto en el caso de EM-NAD2.1 y EM-NAD2.3, en las cuales se observó una respuesta sigmoidea para el sustrato malato ($nH = 1,4$ y $nH = 1,7$ respectivamente; figura III.10).

➤ Estudio de posibles efectores metabólicos

Se determinó el efecto de distintos metabolitos sobre la actividad de las isoformas EM-NAD(P) de soja. Los ensayos fueron realizados a pH 6,5 en el caso de las isoformas NAD-dependientes y a pH 8 en el caso de EM-NADP1.1. Las concentraciones de malato y NAD(P) se mantuvieron a los valores de $S_{0,5}$ obtenidos de cada isoforma (tablas III.3 y III.4) y los metabolitos se testearon a dos concentraciones diferentes (0,5 mM o 2 mM), a excepción del CoA y acetyl-CoA, los cuales fueron ensayados a 0,02 mM.

Los resultados indicaron que las distintas isoformas EM-NAD(P) de soja exhibieron un comportamiento diferencial en respuesta a los distintos metabolitos, en especial la respuesta general de las isoformas NAD-dependientes (figura III.12) se diferenció de la respuesta de EM-NADP1.1 (figura III.13). EM-NAD2.1, EM-NAD2.3 y EM-NAD2.4 evidenciaron una regulación positiva por intermediarios producidos en pasos irreversibles de la vía glucolítica, tales como fructosa-1,6-bis-P y PEP (efecto observado en las tres isoenzimas) y glucosa-6-P (en el caso de EM-NAD2.4) (figura III.12). Las isoformas que utilizan NAD también presentaron una fuerte activación por CoA y acetyl-CoA. Todas vieron incrementada su actividad en presencia del ácido orgánico oxaloacetato a alta concentración (figura III.12).

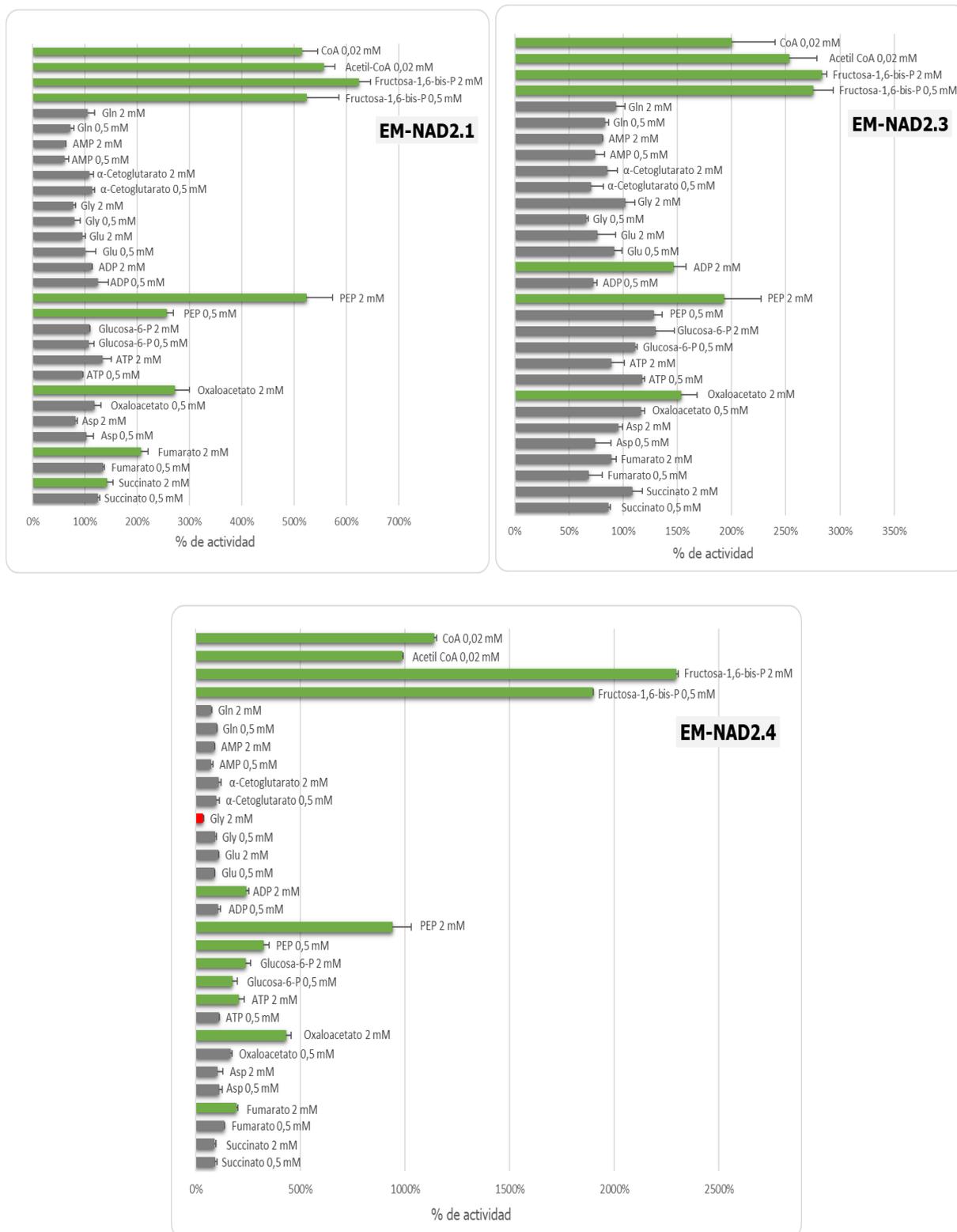


Figura III.12 Actividad de las isoformas EM-NAD2.1, EM-NAD2.3 y EM-NAD2.4 en presencia de distintos metabolitos. Los datos se presentan como una relación (en porcentajes) de la actividad en presencia del metabolito comparada con un control en ausencia del mismo. Los ensayos fueron realizados al menos por triplicado y las barras de error indican la desviación estándar entre las mediciones. Se utilizaron niveles subsaturantes de malato y NAD, y las concentraciones de metabolitos que se detallan en la figura. En rojo y verde se muestran los efectores que producen una significativa reducción o activación, respectivamente, de la actividad enzimática.

Por el contrario, en el caso de la isoforma EM-NADP1.1, se observó inhibición por oxaloacetato (figura III.13), como se ha reportado en todas las EM-NADP de *Arabidopsis thaliana* y otras especies vegetales (Gerrard Wheeler y col., 2008) Por otro lado, se vio una activación específica por glutamina a ambas concentraciones de trabajo.

Así, los resultados obtenidos indican que EM-NAD2.4 es la isoforma más regulada por los compuestos ensayados, tanto teniendo en cuenta el número de metabolitos que producen un efecto sobre su actividad enzimática como en cuanto los porcentajes de activación observados (figura III.12). La actividad de este miembro de la familia fue estimulada por fumarato, oxaloacetato, ATP, glucosa-6-P y ADP. PEP, fructosa-1,6-bis-P, acetil-CoA y CoA fueron los más potentes activadores de la enzima, alcanzando en presencia de los mismos niveles de actividad entre 9 y 22 veces más altos (figura III.12).

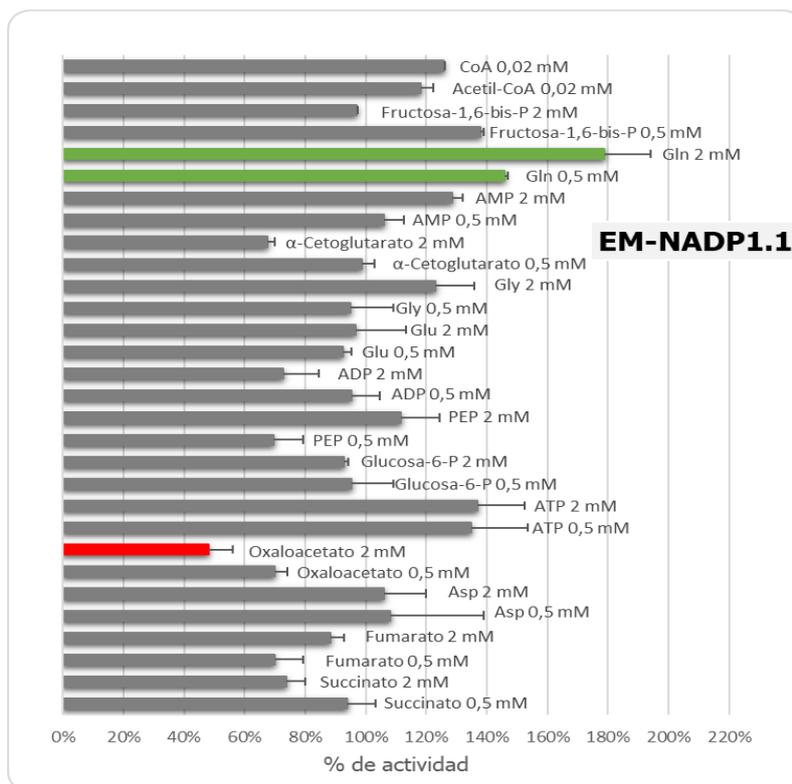


Figura III.13 Actividad de la isoforma EM-NADP1.1 en presencia de distintos metabolitos. Los datos se presentan como una relación (en porcentajes) de la actividad en presencia del metabolito comparada con un control en ausencia del mismo. Los ensayos fueron realizados al menos por triplicado y las barras de error indican la desviación estándar entre las mediciones. Se utilizaron concentraciones subsaturantes de malato y NADP, y las concentraciones de metabolitos que se muestran en la figura expresadas en mM. En rojo y verde se muestran los efectores que producen una significativa reducción o activación, respectivamente, de la actividad enzimática.

➤ Capacidad de las enzimas de catalizar la reacción reversa

Las isoformas obtenidas fueron evaluadas en su capacidad para catalizar el sentido reverso de la reacción, es decir la carboxilación reductiva de piruvato (figura I.3). Inicialmente, se ensayó en un medio estándar a pH 7 conteniendo $MgCl_2$ y NADPH (ver sección II.3.1). Luego, se ensayó en presencia de $MnCl_2$ y NADH y sus combinaciones.

EM-NADP1.1 fue capaz de catalizar la reacción reversa en presencia de NADPH, tanto con $MgCl_2$ (83,7 U/ml) como con $MnCl_2$ (107 U/ml). En cambio, no presentó actividad con ninguno de los dos cationes cuando fue ensayada con NADH. Por otro lado, las isoformas NAD-dependientes no catalizaron la reacción reversa en ninguna de las condiciones analizadas.

Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a determinar los parámetros cinéticos de la actividad reversa de la isoforma EM-NADP1.1.

pH óptimo: Para la actividad carboxilasa reductiva de la se obtuvo un pH óptimo de 6,5 (figura III.14). Este valor fue ligeramente más ácido que el obtenido para el sentido directo de la reacción (figura III.9).

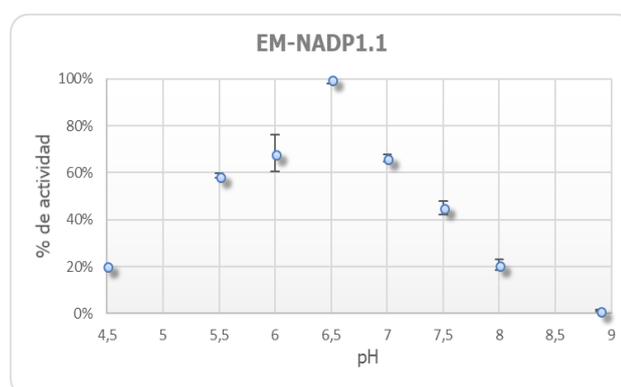


Figura III.14 Curva de pH óptimo para EM-NADP1.1 en el sentido reverso de la reacción. Los datos son presentados como el porcentaje de la actividad máxima obtenida para la enzima. Para cada valor de pH, se muestran el promedio y la desviación estándar entre dos determinaciones. El medio contenía 10 mM $MgCl_2$, 30 mM piruvato, 50 mM $NaHCO_3$ y 0,2 mM NADPH.

Constantes cinéticas: Se determinaron los valores de k_{cat} y $S_{0,5}$ para piruvato de la reacción reversa. Los datos cinéticos fueron ajustados a la ecuación de Hill (figura III.15) obteniéndose las constantes indicadas en la tabla III.5.

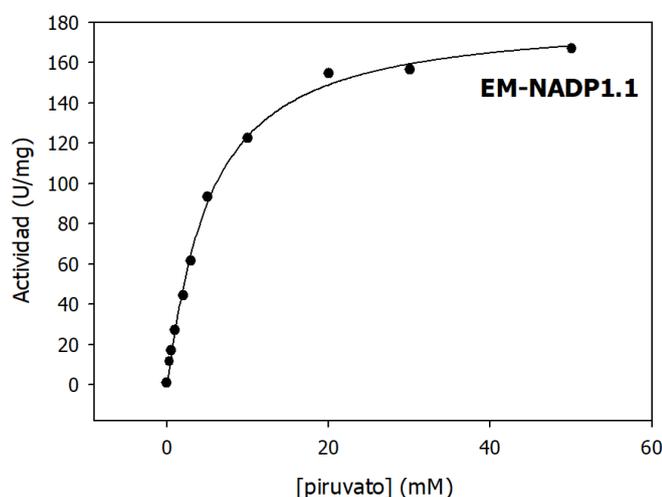


Figura III.15 Actividad reversa de EM-NADP1.1 en función de la concentración de piruvato a pH 6,5. Las medidas se realizaron por duplicado (se muestra sólo una de las determinaciones). Se indica el ajuste de los datos a la ecuación de Hill.

EM-NADP1.1	
k_{cat} (s^{-1})	202,4 ± 6,9
$S_{0,5piruvato}$ (mM)	5,1 ± 0,5
nH	1,1 ± 0,1
$k_{cat}/ S_{0,5piruvato}$	39,7

Tabla III.5 Parámetros cinéticos de la reacción reversa de EM-NADP1.1. Los valores son el promedio de dos experimentos diferentes con su correspondiente desviación estándar.

Los resultados indicaron que las constantes catalíticas obtenidas para EM-NADP1.1 en ambas direcciones de la reacción resultaron muy similares (tablas III.4 y III.5). Sin embargo, la afinidad de la enzima por el sustrato piruvato (reacción reversa) resultó ser menor que la del sustrato malato (reacción directa), por lo que la eficiencia catalítica de la reacción reversa resultó 9 veces menor que la de la reacción directa (tablas III.4 y III.5).

Estudio de posibles efectores: Se llevo a cabo el ensayo de metabolitos como posibles moduladores de la actividad carboxilasa reductiva de EM-NADP1.1. En este caso, no se observó regulación positiva destacable con ningún efector ensayado, solamente se vio inhibición por producto cuando el ensayo se realizó en presencia de malato (figura III.16).

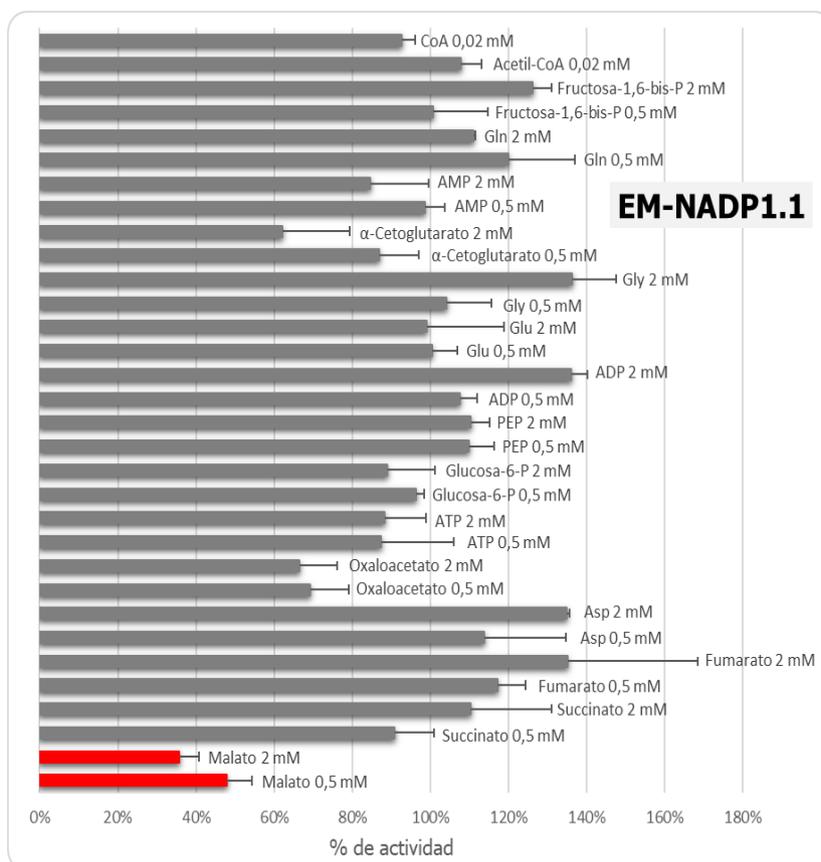


Figura III.16 Actividad reversa de la isoforma EM-NADP1.1 en presencia de distintos metabolitos. Los datos se presentan como una relación (en porcentajes) de la actividad en presencia del metabolito comparada con un control en ausencia del mismo. Los ensayos fueron realizados al menos por triplicado y las barras de error indican la desviación estándar entre las mediciones. Las medidas se realizaron utilizando 50 mM MES-NaOH pH 6,5 (pH óptimo) en presencia de 10 mM $MgCl_2$, 50 mM $NaHCO_3$, 0,2 mM NADPH y una concentración de piruvato equivalente al valor de $S_{0,5}$ de la enzima (tabla III.5) y las concentraciones de metabolitos que se detallan en la figura. En rojo se muestra la inhibición por malato a ambas concentraciones.

IV. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesina se presenta una caracterización cinética de isoformas EM-NAD(P) de semilla de soja inducidas durante el proceso de llenado. A partir de una estrategia de expresión recombinante y purificación puesta a punto en el laboratorio para enzimas málicas de otras especies vegetales (Saigo y col., 2013b), se obtuvieron de forma exitosa las isoformas EM-NAD2.1, EM-NAD2.3, EM-NAD2.4 y EM-NADP 1.1 (tabla III.1; figura III.1).

El sistema de clonado en pET-28 sumado a la purificación de afinidad en columnas de Ni-NTA permitió obtener las cuatro isoformas en forma soluble y en cantidad y pureza aceptables para los posteriores ensayos de actividad (figura III.7 y III.8) llevados a cabo. Todas las isoformas purificadas presentaron actividad enzimática, dato a considerar ya que si bien las isoformas EM-NAD de *Arabidopsis* son activas como homo- o hetero-oligómeros (sección I.4.1; Tronconi y col., 2010a y 2010b), en otros organismos tales como *Crassula argentea* y papa sólo se observó actividad cuando los productos de cada gen individual eran mezclados in vitro (Willeford y Wedding, 1987).

Los valores de pH óptimo (comprendido entre 5,5 y 6,5 para las isoformas EM-NAD y en el rango de 7-8 para EM-NADP1.1; figura III.9) estuvieron en línea con lo reportado para otras isoformas vegetales con la misma especificidad de cofactor (Drincovich y col., 2010). Además, se observó una alta preferencia de las isoformas por $MnCl_2$, llevada al extremo en el caso de las proteínas EM-NAD, las cuales no presentaron actividad en presencia de $MgCl_2$ (tabla III.2).

En cuanto a las constantes cinéticas, los resultados obtenidos indicaron que EM-NADP1.1 presenta mayor k_{cat} que las isoformas que utilizan NAD, así como también mayor afinidad por sus sustratos (tablas III.3 y III.4 y figuras III.10 y III.11). Esta diferencia fue más notoria en el caso del cofactor dinucleótido: el valor de $S_{0.5}$ para NADP de EM-NADP1.1. fue de 5,6 μM mientras que el $S_{0.5}$ para NAD de EM-NAD2.1, EM-NAD2.3 y EM-NAD2.4 estuvo en el orden de magnitud de mM. Tal como se ha reportado en otros organismos (Gerrard Wheeler y col., 2005), la isoforma EM-NADP1.1 presento inhibición a altas concentraciones de malato a pH 7,5. Esta

característica se suponía exclusiva de isoformas EM-NADP que participan del metabolismo fotosintético en plantas C_4 (Detarsio y col., 2007; Saigo y col., 2013a) y resta determinar cuál sería el significado fisiológico de la misma en especies C_3 . La respuesta sigmoidea para el sustrato malato encontrada en algunas isoformas EM-NAD de soja (figura III.10) sugiere que en estos casos el propio sustrato malato podría también estar teniendo un rol como regulador de la actividad enzimática.

Algunas enzimas fueron capaces de catalizar la carboxilación reductiva de piruvato, es decir la reacción en sentido reverso. Las isoformas dependientes de NAD no presentaron actividad reversa en las diferentes condiciones ensayadas, lo que indica a priori que no catalizarían esta reacción *in vivo*. Por el contrario, EM-NADP1.1 si demostró poseer dicha capacidad en presencia de NADPH y con ambos cofactores metálicos (figuras III.14 y III.15). Aunque las constantes catalíticas obtenidas para las reacciones directa y reversa fueron similares, los valores de $S_{0.5}$ determinaron una menor eficiencia catalítica con respecto a la reacción directa (tablas III.4 y III.5), lo que apoyaría la idea de que *in vivo* estaría predominando la actividad en dicho sentido. Consistente con estos resultados, observamos la ausencia de la regulación de la actividad reversa por un gran número de metabolitos presentes en semilla que fueron ensayados (figura III.16).

En cambio, en el sentido directo de la reacción varios compuestos clave involucrados en distintos metabolismos se comportaron como activadores o inhibidores de la actividad enzimática (figuras III.12 y III.13). Los ensayos evidenciaron una fuerte regulación positiva sobre familia EM-NAD, principalmente por intermediarios producidos en pasos irreversibles de la vía glucolítica como fructosa-1,6-bis-P y PEP (figura III.12). Este resultado sugiere que estos intermediarios estarían mediando la activación de las isoformas EM-NAD de soja de manera coordinada con una baja en la glucólisis producida por el uso de las hexosas en la síntesis de compuestos osmoprotectores a medida que la semilla madura (Plaxton y Podestá, 2006; Tronconi y col., 2010a; Hajduch y col., 2011). Esta flexibilidad metabólica garantiza el aporte de piruvato para la síntesis de reservas a partir del catabolismo de aminoácidos y otros ácidos orgánicos a través de la acción de las proteínas EM-NAD, especialmente en las últimas etapas del llenado. Esta ruta sería aún más relevante si se tiene en cuenta que

el aporte de aminoácidos a la síntesis de ácidos grasos es mayor en soja que para otras leguminosas (Allen y col., 2009). También se observó en todas las isoformas EM-NAD una fuerte activación por acetil-CoA y CoA (figura III.12), lo que sugiere la participación de estas proteínas en la biosíntesis de lípidos. Probablemente, ambos metabolitos se estarían uniendo a un mismo sitio alostérico dada su similitud estructural.

La regulación positiva de la actividad EM-NAD por estos metabolitos fue mayor en la isoforma EM-NAD2.4 (figura III.12), lo que resulta particularmente interesante ya que su transcripto es el más abundante durante el llenado de la semilla (figura I.4). Además, experimentos recientes realizados por nuestro grupo de trabajo (Pavlovic y col., 2017) han indicado un aumento de la expresión de este gen en respuesta a señales como relación oscuridad/luz, presencia de la hormona ácido abscísico y a una mayor proporción de aminoácidos respecto de azúcares disponibles como fuente de carbono. Estas condiciones ambientales, hormonales y nutricionales se imponen al avanzar la maduración de la semilla de soja (Borisjuk y col., 2005; North y col., 2010; Alle y Young, 2013). Así, estas cualidades estarían indicando una importante contribución de EM-NAD2.4 a la generación de precursores para las vías biosintéticas que se dan durante el llenado.

Por otra parte, EM-NADP1.1 presentó una particular activación por glutamina (figura III.13), un aminoácido que se sabe es el principal compuesto nitrogenado que se importa a la semilla de soja para sustentar la síntesis de reservas (Allen y col., 2009).

Estos hallazgos proporcionan nuevos conocimientos sobre el metabolismo intermediario en semillas oleaginosas y nominan a las isoformas EM-NAD(P), particularmente a las variantes EM-NAD2.4 y EM-NADP1.1 en virtud de sus propiedades cinéticas y el alto grado de regulación positiva demostrado, como posibles blancos biotecnológicos a la hora de buscar estrategias para mejoramiento vegetal o para la producción de aceites en otros sistemas más sencillos.

V. REFERENCIAS

Allen, D. K., & Young, J. D. (2013). Carbon and nitrogen provisions alter the metabolic flux in developing soybean embryos. *Plant Physiology*, *161*(3), 1458-1475.

Allen, D. K., Ohlrogge, J. B., & Shachar-Hill, Y. (2009). The role of light in soybean seed filling metabolism. *The Plant Journal*, *58*(2), 220-234.

Alvarez, C. E., Saigo, M., Margarit, E., Andreo, C. S., & Drincovich, M. F. (2013). Kinetics and functional diversity among the five members of the NADP-malic enzyme family from *Zea mays*, a C4 species. *Photosynthesis Research*, *115*(1), 65-80.

Arias, C. L., Andreo, C. S., Drincovich, M. F., & Gerrard Wheeler, M. C. (2013). Fumarate and cytosolic pH as modulators of the synthesis or consumption of C4 organic acids through NADP-malic enzyme in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, *81*(3), 297-307.

Badia, M. B., Arias, C. L., Tronconi, M. A., Maurino, V. G., Andreo, C. S., Drincovich, M. F., & Gerrard Wheeler, M. C. (2015). Enhanced cytosolic NADP-ME2 activity in *Arabidopsis thaliana* affects plant development, stress tolerance and specific diurnal and nocturnal cellular processes. *Plant Science*, *240*, 193-203.

Badia, M. B., Mans, R., Lis, A. V., Tronconi, M. A., Arias, C. L., Maurino, V. G., & Gerrard Wheeler, M. C. (2017). Specific *Arabidopsis thaliana* malic enzyme isoforms can provide anaplerotic pyruvate carboxylation function in *Saccharomyces cerevisiae*. *The FEBS Journal*, *284*(4), 654-665.

Baud S, Lepiniec L, (2010). Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Progress in Lipid Research*, *49*(3): 235–249.

Borisjuk, L., Nguyen, T. H., Neuberger, T., Rutten, T., Tschiersch, H., Claus, B., & Wobus, U. (2005). Gradients of lipid storage, photosynthesis and plastid differentiation in developing soybean seeds. *New Phytologist*, *167*(3), 761-776.

Chang, G. G., & Tong, L. (2003). Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases. *Biochemistry*, *42*(44), 12721-12733.

Chen, H., Wang, F. W., Dong, Y. Y., Wang, N., Sun, Y. P., Li, X. Y., & Zhang, X. Y. (2012). Sequence mining and transcript profiling to explore differentially expressed genes associated with lipid biosynthesis during soybean seed development. *BMC Plant Biology*, *12*(1), 122.

Detarsio, E., Alvarez, C. E., Saigo, M., Andreo, C. S., & Drincovich, M. F. (2007). Identification of domains involved in tetramerization and malate inhibition of maize C4-NADP-malic enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(9), 6053-6060.

Detarsio, E., Maurino, V. G., Alvarez, C. E., Müller, G. L., Andreo, C. S., & Drincovich, M. F. (2008). Maize cytosolic NADP-malic enzyme (ZmCytNADP-ME): a phylogenetically

distant isoform specifically expressed in embryo and emerging roots. *Plant Molecular Biology*, 68(4-5), 355.

Drincovich, M. F., Lara, M. V., Andreo, C. S., & Maurino, V. G. (2011). C 4 decarboxylases: Different solutions for the same biochemical problem, the provision of CO₂ to RuBisCO in the bundle sheath cells. In *C4 Photosynthesis and related CO₂ concentrating mechanisms* (pp. 277-300). Springer, Dordrecht.

Dyer, J. M., Stymne, S., Green, A. G., & Carlsson, A. S. (2008). High-value oils from plants. *The Plant Journal*, 54(4), 640-655.

Fehr, W. R., Caviness, C. E., Burmood, D. T., & Pennington, J. S. (1971). Stage of Development Descriptions for Soybeans, *Glycine Max* (L.) Merrill 1. *Crop Science*, 11(6), 929-931.

Gerrard Wheeler, M. C., Arias, C. L., Maurino, V. G., Andreo, C. S., & Drincovich, M. F. (2009). Identification of domains involved in the allosteric regulation of cytosolic *Arabidopsis thaliana* NADP-malic enzymes. *The FEBS Journal*, 276(19), 5665-5677.

Gerrard Wheeler, M. C., Arias, C. L., Righini, S., Badia, M. B., Andreo, C. S., Drincovich, M. F., & Saigo, M. (2016). Differential contribution of malic enzymes during soybean and castor seeds maturation. *PLoS One*, 11(6), e0158040.

Gerrard Wheeler, M. C., Arias, C. L., Tronconi, M. A., Maurino, V. G., Andreo, C. S., & Drincovich, M. F. (2008). *Arabidopsis thaliana* NADP-malic enzyme isoforms: high degree of identity but clearly distinct properties. *Plant Molecular Biology*, 67(3), 231-242.

Gerrard Wheeler, M. C., Tronconi, M. A., Drincovich, M. F., Andreo, C. S., Flügge, U. I. y Maurino, V. G. (2005) A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139(1), 39-51.

Goettel, W., Xia, E., Upchurch, R., Wang, M. L., Chen, P., & An, Y. Q. C. (2014). Identification and characterization of transcript polymorphisms in soybean lines varying in oil composition and content. *BMC genomics*, 15(1), 299.

Grover, S. D., Canellas, P. F., & Wedding, R. T. (1981). Purification of NAD malic enzyme from potato and investigation of some physical and kinetic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 209(2), 396-407.

Hajduch, M., Matusova, R., Houston, N. L., & Thelen, J. J. (2011). Comparative proteomics of seed maturation in oilseeds reveals differences in intermediary metabolism. *Proteomics*, 11(9), 1619-1629.

Haun, W., Coffman, A., Clasen, B. M., Demorest, Z. L., Lowy, A., Ray, E., & Mathis, L. (2014). Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnology Journal*, 12(7), 934-940.

Jones, S. I., & Vodkin, L. O. (2013). Using RNA-Seq to profile soybean seed development from fertilization to maturity. *PLoS One*, *8*(3), e59270.

Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, *3*(9), 1452.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680.

Liu, S., Cheng, Y., Zhang, X., Guan, Q., Nishiuchi, S., Hase, K., & Takano, T. (2007). Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa*. L) is induced by environmental stresses; over-expression of the gene in Arabidopsis confers salt and osmotic stress tolerance. *Plant Molecular Biology*, *64*(1-2), 49.

Martinoia, E., & Rentsch, D. (1994). Malate compartmentation-responses to a complex metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, *45*(1), 447-467.

Maurino, V. G., Saigo, M., Andreo, C. S., & Drincovich, M. F. (2001). Non-photosynthetic malic enzyme from maize: a constitutively expressed enzyme that responds to plant defence inducers. *Plant Molecular Biology*, *45*(4), 409-420.

Müller, G. L., Drincovich, M. F., Andreo, C. S., & Lara, M. V. (2008). *Nicotiana tabacum* NADP-malic enzyme: cloning, characterization and analysis of biological role. *Plant and Cell Physiology*, *49*(3), 469-480.

North, H., Baud, S., Debeaujon, I., Dubos, C., Dubreucq, B., Grappin, P., & Rajjou, L. (2010). Arabidopsis seed secrets unravelled after a decade of genetic and omics-driven research. *The Plant Journal*, *61*(6), 971-981.

Pavlovic, T., Andreo, C. S., Drincovich, M. F., Gerrard Wheeler, M. C. y Saigo, M., (2017). "Regulación de las vías del metabolismo intermediario en granos de soja." III Workshop Internacional de Ecofisiología de Cultivos, 28-29/09/2017, Mar del Plata.

Pedersen, P., Kumudini, S., Board, J., & Conley, S. (2004). *Soybean growth and development*. Ames, IA: Iowa State University, University Extension.

Plaxton, W. C., & Podestá, F. E. (2006). The functional organization and control of plant respiration. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *25*(2), 159-198.

Rubel, A., Rinne, R. W., & Canvin, D. T. (1972). Protein, Oil, and Fatty Acid in Developing Soybean Seeds 1. *Crop Science*, *12*(6), 739-741.

Saigo, M., Alvarez, C. E., Andreo, C. S., & Drincovich, M. F. (2013a). Plastidial NADP-malic enzymes from grasses: unraveling the way to the C4 specific isoforms. *Plant Physiology and Biochemistry*, *63*, 39-48.

Saigo, M., Bologna, F. P., Maurino V. G., Detarsio, E., Andreo, C. S., & Drincovich, M. F. (2004). Maize recombinant non-C 4 NADP-malic enzyme: a novel dimeric malic enzyme with high specific activity. *Plant Molecular Biology*, 55(1), 97-107.

Saigo, M., Tronconi, M. A., Gerrard Wheeler, M. C. G., Alvarez, C. E., Drincovich, M. F., & Andreo, C. S. (2013b). Biochemical approaches to C4 photosynthesis evolution studies: the case of malic enzymes decarboxylases. *Photosynthesis Research*, 117(1-3), 177-187.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (No. Ed. 2). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Shearer, H. L., Turpin, D. H., & Dennis, D. T. (2004). Characterization of NADP-dependent malic enzyme from developing castor oil seed endosperm. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 429(2), 134-144.

Smith, B. J. (1984). SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In *Proteins* (pp. 41-55). Humana Press.

Smith, R. G., Gauthier, D. A., Dennis, D. T., & Turpin, D. H. (1992). Malate-and pyruvate-dependent fatty acid synthesis in leucoplasts from developing castor endosperm. *Plant Physiology*, 98(4), 1233-1238.

Sreenivasulu, N. (2017). Systems biology of seeds: deciphering the molecular mechanisms of seed storage, dormancy and onset of germination. *Plant Cell Reports*, 36(5), 633.

Tronconi, M. A., Fahnenstich, H., Gerrard Wheeler, M. C., Andreo, C. S., Flügge, U. I., Drincovich, M. F., & Maurino, V. G. (2008). Arabidopsis NAD-malic enzyme functions as a homodimer and heterodimer and has a major impact on nocturnal metabolism. *Plant Physiology*, 146(4), 1540-1552.

Tronconi, M. A., Gerrard Wheeler, M. C., Drincovich, M. F. y Andreo, C. S. (2012) Differential fumarate binding to Arabidopsis NAD⁺-malic enzymes 1 and -2 produces an opposite activity modulation. *Biochimie*, 94(6), 1421-1430.

Tronconi, M. A., Gerrard Wheeler, M. C., Martinatto, A., Zubimendi, J. P., Andreo, C. S., & Drincovich, M. F. (2015) Allosteric substrate inhibition of Arabidopsis NAD-dependent malic enzyme 1 is released by fumarate. *Phytochemistry* 111, 37-47.

Tronconi, M. A., Gerrard Wheeler, M. C., Maurino, V. G., Drincovich, M. F., & Andreo, C. S. (2010b) NAD-malic enzymes of *Arabidopsis thaliana* display distinct kinetic mechanisms that support differences in physiological control. *Biochemical Journal*, 430(2), 295-303.

Tronconi, M. A., Maurino, V. G., Andreo, C. S., & Drincovich, M. F. (2010a) Three different and tissue-specific NAD-malic enzymes generated by alternative subunit

association in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(16), 11870-11879.

Voll, L. M., Zell, M. B., Engelsdorf, T., Saur, A., Gerrard Wheeler, M. C., Drincovich, M. F., & Maurino, V. G. (2012). Loss of cytosolic NADP-malic enzyme 2 in *Arabidopsis thaliana* is associated with enhanced susceptibility to *Colletotrichum higginsianum*. *New Phytologist*, 195(1), 189-202.

Weselake, R. J., Taylor, D. C., Rahman, M. H., Shah, S., Laroche, A., McVetty, P. B., & Harwood, J. L. (2009). Increasing the flow of carbon into seed oil. *Biotechnology Advances*, 27(6), 866-878.

Willeford, K. O., & Wedding, R. T. (1987). Evidence for a multiple subunit composition of plant NAD malic enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 262(17), 8423-8429.