



UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSITAT DE BARCELONA

DIVISIÓ DE CIÈNCIES EXPERIMENTALS I MATEMÀTIQUES

FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA VEGETAL

CARACTERITZACIÓ I PROPIETATS DE DUES ENDO- β -(1,4)-GLUCANASES IMPLICADES EN L'ESTOVAMENT DEL FRUIT DE MADUIXA

Memòria presentada per F. Xavier Palomer Tarridas i inscrita en el programa de doctorat "La fisiologia de les plantes i l'ambient" (bienni 1998/99), en el Departament de Biologia Vegetal de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, per optar al grau de Doctor en Biologia per la Universitat de Barcelona.

Directors de la Tesi

Tutora

Autor

Dr. M. Vendrell Melich

Dra. I. Llop Tous

Dra. L. Alegre

F. Xavier Palomer Tarridas



UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSITAT DE BARCELONA

DIVISIÓ DE CIÈNCIES EXPERIMENTALS I MATEMÀTIQUES

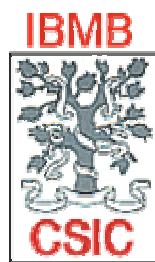
FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA VEGETAL

**CARACTERITZACIÓ I PROPIETATS DE DUES
ENDO- β -(1,4)-GLUCANASES IMPLICADES EN
L'ESTOVAMENT DEL FRUIT DE MADUIXA**

XAVIER PALOMER TARRIDAS

BARCELONA, JUNY DE 2.002



CONSELL SUPERIOR D'INVESTIGACIONS CIENTÍFIQUES
INSTITUT DE BIOLOGIA MOLECULAR DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA I BIODIVERSITAT MOLECULAR

**CARACTERITZACIÓ I PROPIETATS DE DUES
ENDO- β -(1,4)-GLUCANASES IMPLICADES EN
L'ESTOVAMENT DEL FRUIT DE MADUIXA**

XAVIER PALOMER TARRIDAS

BARCELONA, JUNY DE 2.002

ÍNDIX TEMÀTIC

Annex. Índex de figures i taules.....	1
Abreviatures.....	3
1. INTRODUCCIÓ.....	9
1.1. La formació del fruit.....	9
1.2. La maduració dels fruits: aspectes generals.....	10
1.2.1. La maduració en fruits climatèrics i fruits no-climatèrics.....	11
1.2.2. Canvis fisiològics i bioquímics associats a la maduració de fruits.....	12
1.2.2.1 Canvis en la pigmentació.....	12
1.2.2.2 Canvis en l'aroma.....	13
1.2.2.3 Canvis en el gust.....	13
1.2.2.4 Canvis en la textura.....	14
1.2.3. Expressió gènica en la maduració de fruits.....	15
1.3. La paret cel·lular.....	16
1.3.1. El paper de la paret cel·lular en la vida de la planta.....	16
1.3.2. Tipus de paret cel·lular.....	17
1.3.3. Components moleculars de la paret cel·lular.....	18
1.3.3.1. Polisacàrids estructurals.....	20
1.3.3.1.1. Cel·lulosa.....	20
1.3.3.1.2. Hemicel·luloses.....	21
1.3.3.1.3. Polisacàrids pèctics.....	22
1.3.3.2. Proteïnes estructurals.....	23
1.3.3.2.1. Glicoproteïnes riques en hidroxiprolina (HRGPs).....	23
1.3.3.2.2. Proteïnes riques en glicina (GRPs).....	24
1.3.3.2.3. Proteïnes riques en prolina (PRPs).....	24
1.3.3.2.4. Proteïnes conjugades a arabinogalactans (AGPs).....	25
1.3.3.3. Proteïnes enzimàtiques.....	25
1.3.3.3.1. Enzims que actuen sobre les pectines: enzims pectinolítics.....	26
Endo-poligalacturonasa.....	26
Exo-poligalacturonasa.....	28
Pectinmetilesterasa.....	28
Pectat liasa.....	29
β -galactosidasa.....	30
α -galactosidasa.....	31
1.3.3.3.2. Enzims que actuen sobre la cel·lulosa i/o hemicel·lulosa.....	31
β -mananasa.....	31
Xiloglucan endotransglicosilasa.....	31

Expansina.....	33
1.3.3.3.3. Endo- β -(1,4)-glucanasa o cel·lulasa.....	34
1.3.3.4. Compostos fenòlics.....	39
1.3.4. Estructura de la paret cel·lular.....	40
1.3.5. Formació de la paret cel·lular.....	41
1.3.6. Degradació de la paret cel·lular durant la maduració.....	42
1.4. La maduixa.....	43
1.4.1. Origen i posició sistemàtica.....	43
1.4.2. Importància econòmica.....	44
1.4.3. Aparell vegetatiu.....	44
1.4.4. Desenvolupament del fruit.....	45
1.4.5. Composició bioquímica del fruit.....	47
1.4.5.1. Sucres.....	47
1.4.5.2. Àcids.....	47
1.4.5.3. Pigments.....	47
1.4.5.4. Compostos fenòlics.....	48
1.4.5.5. Constituents aromàtics i sabor.....	48
1.4.6. Regulació hormonal del desenvolupament i la maduració.....	48
1.4.6.1. Auxines.....	48
1.4.6.2. Giberelines, citoquinines i àcid abscísic.....	49
1.4.6.3. L'etilè.....	49
1.5. La paret cel·lular de la maduixa.....	50
1.5.1. Components moleculars de la paret cel·lular de la maduixa.....	50
1.5.2. Degradació de la paret cel·lular en la maduixa	51
1.5.3. Les endo- β -(1,4)-glucanases Cel1 i Cel2 de maduixa.....	52
2. OBJECTIUS.....	57
3. MATERIAL I MÈTODES.....	61
3.1. Tampons i solucions generals.....	61
3.2. Medis de cultiu.....	62
3.3. Antibiòtics i inhibidors de proteases.....	64
3.4. Material vegetal.....	64
3.4.1. Plantes de maduixa.....	64
3.4.2. Manipulació de les mostres.....	65
3.4.3. Tractament amb auxines.....	66
3.4.4. Tractament amb etilè.....	66
3.5. Soques bacterianes, llevats i vectors.....	67
3.5.1. Soques bacterianes i llevats.....	67

3.5.2. Vectors.....	68
3.6. Metodologia general.....	68
3.6.1. Purificació de fragments de DNA a partir de gels d'agarosa/TAE.....	69
3.6.2. Quantificació de DNA i RNA.....	69
3.6.3 Transformació de cèl·lules d' <i>Escherichia coli</i> competents.....	70
3.6.4. Preparació de DNA plasmídic.....	70
3.6.5. Seqüenciació de DNA.....	71
3.6.6. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR).....	71
3.7. Obtenció i anàlisi de RNA.....	72
3.7.1. Extracció de RNA total.....	72
3.7.1.1. Extracció de RNA total segons el protocol descrit per Domínguez-Puigjaner (1995).....	73
3.7.1.2. Extracció de RNA total segons el protocol basat en CTAB i 2-β-mercaptoetanol.....	75
3.7.2. Anàlisi de l'expressió gènica per Northern-blot.....	76
3.7.2.1. Marcatge radioactiu de fragments de DNA per <i>random primer</i>	77
3.7.2.2. Hibridació de membranes Northern-blot amb sondes de DNA.....	78
3.7.3. Anàlisi de l'expressió gènica per Real Time Quantitative RT-PCR.....	80
3.8. Sobreexpressió en <i>Escherichia coli</i> i purificació de proteïnes.....	82
3.8.1. Detecció de poli-histidines.....	84
3.9. Obtenció d'anticossos policlonals.....	84
3.10. Obtenció i anàlisi de proteïnes.....	85
3.10.1. Extracció de proteïnes.....	85
3.10.1.1. Mètode dels fenols.....	86
3.10.1.2. Mètode del KCl/CaCl ₂	86
3.10.1.3. Mètode del CTAB.....	87
3.10.2. Quantificació de proteïnes.....	88
3.10.3. Anàlisis electroforètiques de proteïnes.....	88
3.10.3.1. Electroforesi d'una dimensió en gels desnaturalitzants (SDS-PAGE).....	88
3.10.3.2. Electroforesi de dues dimensions (NEPHGE/SDS-PAGE, IEF/SDS-PAGE).....	89
3.10.3.3. Tinció amb Coomassie-Blue.....	90
3.10.4. Anàlisi per Western-blot i immunodetecció.....	90
3.10.5. Detecció de glicoproteïnes (mètode de la concanavalina A).....	91
3.10.6. Traducció <i>in vitro</i>	92
3.10.7. IEF nadiu.....	93
3.11. Sobreexpressió de proteïnes en <i>Pichia pastoris</i>.....	95
3.11.1. Detecció de l'activitat EGasa <i>in vitro</i>	99
3.12. Transformació de plantes de maduixa via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	100
4. RESULTATS.....	105

4.1. Anàlisi de l'expressió de <i>Cel1</i> i <i>Cel2</i> durant la maduració mitjançant Northern-blot.....	105
4.2. Producció d'antisèrum específic per <i>Cel1</i> i <i>Cel2</i>.....	108
4.2.1. Obtenció de sèrum anti- <i>Cel1</i>	108
4.2.1.1. Traducció <i>in vitro</i> de <i>Cel1</i> /ORF i hibridació amb anti- <i>Cel1</i> /3'.....	112
4.2.2. Obtenció de sèrum anti- <i>Cel2</i>	113
4.3. Extracció d'EGases de fruit de maduixa (cv PAJARO).....	117
4.4. Patró d'acumulació de les EGases <i>Cel1</i> i <i>Cel2</i> en maduixa.....	119
4.4.1. Patró d'acumulació de <i>Cel1</i> en maduixa.....	119
4.4.2. Patró d'acumulació de <i>Cel2</i> en maduixa.....	120
4.5. Regulació hormonal de l'expressió de <i>Cel1</i> i <i>Cel2</i> en maduixa.....	121
4.5.1. Efecte de les auxines sobre les EGases <i>Cel1</i> i <i>Cel2</i>	122
4.5.2. Efecte de l'etilè sobre les EGases <i>Cel1</i> i <i>Cel2</i>	124
4.6. Caracterització de <i>Cel1</i> i <i>Cel2</i>: punt isoelèctric (pI) i N-glicosilació.....	125
4.6.1. Determinació del punt isoelèctric (pI)	125
4.6.2. Detecció de llocs de N-glicosilació.....	128
4.7. Caracterització de l'activitat carboximetilcel·lulasa (CMCasa) associada a <i>Cel1</i> i <i>Cel2</i> en fruit de maduixa.....	130
4.7.1. IEF nadiu.....	130
4.7.1.1. Gels <i>overlay</i> d'activitat CMCasa.....	130
4.7.1.2. Correlació de les bandes d'activitat CMCasa amb <i>Cel1</i> i <i>Cel2</i>	131
4.7.2. Sobreexpressió en <i>Pichia pastoris</i>	135
4.7.2.1. Sobreexpressió de <i>Cel1</i> en <i>Pichia pastoris</i>	136
4.7.2.1.1. Determinació del pH òptim d'activitat CMCasa per <i>Cel1</i>	142
4.7.2.1.2. Cinètica d'inducció temporal de <i>Cel1</i> /pPic9.....	143
4.7.2.1.3. Especificitat de substrat de la proteïna <i>Cel1</i> /pPic9.....	144
4.8. Anàlisi de <i>Cel1</i> i <i>Cel2</i> en plantes de maduixa transgèniques.....	145
4.8.1. Construccions utilitzades per a la transformació de maduixeres.....	146
4.8.2. Obtenció de plantes transformades i selecció de transformants primaris.....	147
4.8.2.1. Plantes antisentit per a <i>Cel1</i>	148
4.8.2.2. Plantes antisentit per a <i>Cel2</i>	149
4.8.2.3. Plantes antisentit per a <i>Cel1</i> i <i>Cel2</i>	149
4.8.3. Anàlisi de l'expressió de <i>Cel1</i> i <i>Cel2</i> en plantes antisentit durant la maduració del fruit.....	151
4.8.3.1. Plantes antisentit <i>Cel1</i>	153
4.8.3.2. Plantes antisentit <i>Cel2</i>	153
4.8.3.3. Plantes antisentit <i>Cel1</i> / <i>Cel2</i>	154
4.8.4. Acumulació de les proteïnes <i>Cel1</i> i <i>Cel2</i> i activitat CMCasa en les plantes transgèniques..	155
4.8.4.1. Plantes antisentit <i>Cel1</i>	156

4.8.4.2. Plantes antisentit Cel2.....	157
4.8.4.3. Plantes doble-antisentit Cel1/Cel2.....	158
5. DISCUSSIÓ.....	161
5.1. Caracterització de les EGases Cel1 i Cel2 de maduixa.....	161
5.1.1. Patró d'expressió i acumulació proteica durant la maduració.....	162
5.1.2. Regulació hormonal de les endo- β -(1,4)-glucanases Cel1 i Cel2.....	165
5.1.3. pI i N-glicosilació de Cel1 i Cel2.....	168
5.2. Activitat associada a les EGases Cel1 i Cel2 de maduixa.....	171
5.2.1. IEF nadiu.....	172
5.2.2. Sobreexpressió de Cel1 en <i>Pichia pastoris</i> : caracterització enzimàtica de Cel1.....	175
5.3. Inhibició de l'expressió de Cel1 i Cel2 en plantes transgèniques.....	181
5.3.1. Plantes transgèniques antisentit Cel1.....	182
5.3.2. Plantes transgèniques antisentit Cel2.....	184
5.3.3. Plantes transgèniques doble-antisentit Cel1/Cel2.....	184
6. CONCLUSIONS.....	189
7. BIBLIOGRAFIA.....	195

ÍNDIX DE FIGURES I TAULES

➤ Índex de figures

Figura 1.1.....	20
Figura 1.2.....	21
Figura 1.3.....	26
Figura 1.4.....	35
Figura 1.5.....	41
Figura 1.6.....	46
Figura 3.1.....	65
Figura 4.1.....	106
Figura 4.2.....	107
Figura 4.3.....	109
Figura 4.4.....	110
Figura 4.5.....	112
Figura 4.6.....	113
Figura 4.7.....	114
Figura 4.8.....	115
Figura 4.9.....	116
Figura 4.10.....	118
Figura 4.11.....	120
Figura 4.12.....	121
Figura 4.13.....	123
Figura 4.14.....	124
Figura 4.15.....	125
Figura 4.16.....	126
Figura 4.17.....	127
Figura 4.18.....	129
Figura 4.19.....	131
Figura 4.20.....	132
Figura 4.21.....	133
Figura 4.22.....	134
Figura 4.23.....	138
Figura 4.24.....	139

Figura 4.25	140
Figura 4.26	142
Figura 4.27	143
Figura 4.28	144
Figura 4.29	146
Figura 4.30	150
Figura 4.31	151
Figura 4.32	152
Figura 4.33	154-155
Figura 4.34	156
Figura 4.35	157
Figura 4.36	158
Figura 5.1	171

➤ Índex de taules

Taula 1.1	17
Taula 1.2	19
Taula 1.3	36
Taula 1.4	38
Taula 3.1	64
Taula 4.1	137
Taula 4.2	145
Taula 4.3	148
Taula 5.1	169

ABREVIATURES

ABA	Àcid abscísic
ACC	Àcid 1-aminociclopropà-1-carboxílic
ACO	ACC oxidasa
ACS	ACC sintasa
AGPs	Proteïnes conjugades a arabinogalactans
ALF	<i>Automated Laser Fluorescent</i> (aparell de seqüenciació)
amp	Ampicil·lina
APS	Persulfat d'amoni
BAP	N ⁶ -benziladenina fosfat
BSA	Albúmina de sèrum boví
CAPS	Àcid 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfònic
CBD	Domini d'unió a cel·lulosa
cDNA	Àcid desoxiribonucleic complementari
CDTA	Àcid trans-1,2-diaminociclohexà-N,N,N',N'-tetraacètic
CMC	Carboximetilcel·lulosa
CMCasa	Carboximetilcel·lulasa (activitat enzimàtica)
cpm	Comptes radioactius per minut
CTAB	Cetilmetilamoni de bromidi
cv	Cultivar, varietat
cw	Paret cel·lular
dATP	Trifosfat de desoxiadenosina
dCTP	Trifosfat de desoxicitosina
dGTP	Trifosfat de desoxiguanosina
DMSO	Dimetil sulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
dNTP	Mescla equimolar de dATP, dCTP, dGTP i dTTP o dUTP
2D-PAGE	IEF nadiu primera dimensió; SDS-PAGE segona dimensió
DO	Densitat òptica
DTT	Ditiotreitòl
dTTP	Trifosfat de desoxitimidina
dUTP	Trifosfat de desoxiuracil
ECL	<i>Enhanced ChemiLuminescence</i>
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
EGasa	Endo-β-(1,4)-glucanasa

endo/exo-PG	Endo i exo-poligalacturonasa
Exp	Expansina
α i β-gal	α - i β -galactosidasa
GRPs	Proteïnes riques en glicina
HRGPs	Glicoproteïnes riques en hidroxiprolina
IAA	Àcid indolacètic
IBA	Àcid indolbutíric
IBMB	Institut de Biologia Molecular de Barcelona
IEF	Isoelectroenfoc
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranòsid
kan	Kanamicina
kb	Kilobase
kD	KiloDalton
<i>kor</i>	Mutant <i>korrikan</i> d' <i>Arabidopsis</i>
β-man	β -mananasa
MOPS	Àcid 3-(N-morfolino)-propanosulfònic
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
NAA	Àcid 1-nafatalenacètic
NC	Nitrocel·lulosa
NEPHGE	Electroforesi en gel amb pH no equilibrat
nm	Nanòmetres
<i>nor</i>	Mutant de tomàquet <i>non ripening</i>
<i>Nr</i>	Mutant de tomàquet <i>never ripening</i>
o/n	Durant tota la nit (<i>overnight</i>)
ORF	Pauta oberta de lectura
PAL	Fenilalanina amoniliasa
pb	Parells de bases
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEL	Pectat liasa
PG	Poligalacturonasa
PGA	Àcid poligalacturònic
pl	Punt isoelèctric
P.M.	Pes molecular
PME	Pectinmetilesterasa
PMSF	Fenilmetilsulfonil de fluor
PNGasa	N-Glicosidasa F

p:p	Pes:pes
ppm	Parts per milió
PRI	Plant Research International (Wageningen, The Netherlands)
PRPs	Proteïnes riques en prolina
p:v	Pes:volum
PVDF	Polivinilidè difluor
PVP	Polivinilpirrolidona
RGI i RGII	Ramnogalacturonans I i II
rif	Rifampicina
RNA	Àcid ribonucleic
RNAsa	Ribonucleasa
RNAsin	Inhibidor de ribonucleases
<i>rin</i>	Mutant de tomàquet <i>ripening inhibited</i>
rpm	Revolucions per minut
RT	Temperatura ambient
RT-PCR	Transcriptasa reversa acoblada a una reacció de PCR
SAM	S-adenosil metionina
SBNT	Sobrenedant
SDS	Dodecil sulfat de sodi
SDS-PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida/SDS
<i>sol</i>	Soluble
TCA	Àcid tricloracètic
T-DNA	DNA de transferència
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometà
UV	Radiació ultraviolada
v:v	Volum:volum
wt	<i>Wild type</i>
XET	Xiloglucan endotransglicosilasa
YNB	Yeast Nitrogen Base

AGRAÏMENTS

Voldria expressar el meu agraïment a totes aquelles persones i institucions que han fet possible la realització d'aquest treball.

En primer lloc al Dr. Miquel Vendrell per donar-me l'oportunitat de realitzar aquesta tesi, i per la confiança que m'ha mostrat en tot moment, que m'han permès entrar en aquest -a vegades injust món-, de la investigació. Voldria agrair molt especialment a la Dra. Imma Llop la seva direcció en aquesta tesi: sense tu probablement això no hauria estat possible. Un dia em vas deixar la teva "herència" i em vas reptar a continuar el treball. Espero no haver-te decebut!

A Carburos Metálicos, especialment al Dr. F. Javier Sánchez Molino i al Sr. Llibre, per la seva bona disposició per ajudar-me en tot moment, i per la no menys important col·laboració econòmica i logística, imprescindible en tot treball científic. A Frespol i els pagesos del Maresme, per proporcionar-me les maduixes, i fins i tot un hivernacle sencer, de forma desinteressada.

A la Dra. Elma Salentijn i el Dr. Frans Krens per acollir-me al seu laboratori del PRI. De tu Elma en guardaré un gran record sempre, doncs a part d'amistat, em vas saber brindar ajut en tot moment i entre tots em vas ensenyar "l'altra manera" de treballar en ciència.

També voldria agrair a la Dra. Dolors Ludevid, a la Dra. Salomé Prat, al Dr. Jordi Bernués, al Dr. Jaume Martínez i la Dra. Dolors Piulachs, la multitud de consells científics que m'han donat, així com la bona predisposició en compartir infraestructura. Al Dr. Pere Puigdomènech i al Dr. Xavier Bellés els voldria agrair els papers que m'han hagut de signar.

A la Dra. Alegre per haver acceptat ser tutora d'aquesta tesi.

Han sigut molts dies i mesos els que he passat a IBMB. Durant aquest temps he conegut molta gent que m'ha ajudat, d'una manera o una altra, en la realització d'aquest projecte. És per això que us dedicaré a tots vosaltres les primeres planes d'aquest treball. M'agradaria no descuidar-me ningú, però suposo que això és impossible.

Vull expressar el meu agraïment als meus companys i amics que han passat, o encara hi són, pel Fruitis-lab, especialment a la Imma Llop, la Irma Roig i la Montse Saladié. A l'Imma (i "l'Antòniu") perquè a part de ser la meva "jefa" és una bona amiga, cosa sovint difícil de consensuar. Tu m'has ensenyat a pensar científicament i a veure les coses de forma més optimista. A l'Irmix perquè ha demostrat ser una gran persona i millor amiga. Gràcies per les teves correccions i totes les bones estones passades al lab, inclosa la nostra estada a les "magnífiques" Illes Canàries. No t'agraeixo que em mantinguis en la ignorància. La nostra amistat espero que duri més enllà de l'IBMB. I a la Montse per la seva amistat i bon humor permanent, per ensenyar-me a caminar en la biologia molecular, per animar-me quan feia falta i per acompanyar-me en els bons moments.

També a l'Andrea Trejo, amb qui les circumstàncies externes no em van permetre sintonitzar com ens mereixíem. Finalment voldria agrair a la resta de persones amb qui he compartit estones al laboratori, a l'Eva, al Pablo, el Pere, i a la infinitat d'ajudants que hem tingut: Elena Sánchez, Esther López, Roman i Esther Russo, entre molts d'altres.

A la resta de personal del laboratori del PRI també els voldria donar les gràcies perquè em van fer sentir com a casa i em van ajudar moltíssim. Gràcies al Jan i família, al Koen i al Vagner, i molt especialment a la Marjan "Sweet Dreamer": quanta energia concentrada alliberes!

A l'Ariadna i al Xavi, perquè vam compartir molts esmorzars reconfortants, que molts cops eren el millor que passava en tot el dia. Espero fer moltes més escapades a Calella (o a la masia?) amb vosaltres. A la Marta Boter i al Jaume, per la multitud de xerrades serioses i no tan serioses que em compartit dinant i esmorzant. Marta, gràcies també per portar-me a casa tants divendres. A l'Eli, per ser també una bona amiga i perquè tens un bon humor que fins i tot fa ràbia! Al Jordi Bou i família, per fer-me més amena la meva estada a Holanda. Us en dec una. A la Mina, per el seu suport i amistat en tot moment. A tots vosaltres us desitjo molta sort.

A la Carme i a la Maite, per ajudar-me sempre que ho he necessitat, així com també els diferents Serveis de l'IBMB: seqüenciació (Mercè i Ana), informàtica (Antonio, Àngel), estabulari (Pepita), magatzem (Ramon), consergeria i la Pilar, que em van permetre fer la "mill" al centre.

A la resta de gent del departament de Biologia Molecular amb qui he compartit penes i alegries, i que un moment o altre m'han ajudat: als blaus (Vicki, Judit, Anna C., Ana Paula, Clàudia, Toni), als liles (Virgi, Mariana), als negres (Pep, Fathi), als roses (Mar R.), als taronges (Carles-Air Jordan, Xavi Miró, Mónica Suelves), als verds-grisos (Torben, Miriam, Blanca), als vermells (Pau, Sabine, Marga), etc.

Als "cucaratxos" per l'ajut i bon humor que hem compartit tantes vegades. A la Lluïsa, per la seva amistat i el seu magnífic "tour" per Londres. Tinc ganes de veure't per aquí un altre cop. Al Jose al Rafa, la Pepi i al Dani, per la seva simpatia i amistat, i els ànims donats a totes hores.

Als meus amics de tota la vida, per fer-me oblidar la feina quan no hi era, i per fer-me passar tants bons moments. Sé que puc comptar amb vosaltres. Gràcies a tots, però especialment a en Lluís, Eva, Lali, Roger, Eli i Purri-mustafà. Quantes coses ens queden encara per fer plegats!

Als meus pares els voldria agrair tot el seu amor i suport que m'han donat i em donaran sempre, tot i els mals de cap i angoixes que sovint m'emportava cap a casa. Sense el seu esforç res de tot això no hauria estat possible. Al meu germà, que tot i que ens veiem poc, sé que puc comptar amb ell. A en Niko, el millor gos-humà que hi ha sobre la capa de la terra.

I finalment, ara sí, a la Rosa Maria, el factor més decisiu en la realització d'aquest treball, i el més important de la meva vida. Gràcies per creure sempre en mi, per la teva paciència i l'ajuda incondicional que sempre m'has donat. Gràcies per suportar tots els sacrificis que la meva feina t'ha suposat. Jo també t'estimo.

A la Rosa Maria.
Als meus pares i germà.
Als meus amics.

ARA ÉS DEMÀ

*Ara és demà. No escalfa el foc d'ahir
ni el foc d'avui i haurem de fer foc nou.
Del gran silenci ençà, tot el que es mou
es mou amb voluntat d'esdevenir.*

*I esdevindrà. Les pedres i el camí
seran el pa i la mar, i el fosc renou
d'ara mateix, el càntic que commou,
l'àmfora nova plena de bon vi.*

*Ara és demà. Que ploquin noves veus
pel vespre tèrbol, que revinguin deus
desficients d'amarar l'eixut.*

*Tot serà poc, i l'heura i la paret
proclamaran conjuntament el dret
de vulnerar la nova plenitud.*

1. INTRODUCCIÓ

1.1. La formació del fruit

Típicament es considera que el fruit és l'ovari transformat que conté els primordis seminals fecundats i convertits en llavors. Després de la pol·linització i fecundació dels primordis seminals, les flors sofreixen diferents transformacions. Concretament, l'ovari inicia una nova etapa de desenvolupament que pot afectar la seva dimensió, forma, consistència, pigmentació i composició química. Aquests processos condueixen a la formació del fruit, que consta d'una coberta anomenada pericarp, a l'interior de la qual s'hi troben les llavors. Tanmateix, en alguns casos la formació del fruit pot produir-se sense requerir una fecundació prèvia, donant lloc a fruits partenocàrpics que no tenen llavors (plàtan, taronja, etc.).

Els teixits carpel·lars, en transformar-se en pericarp, es desenvolupen de manera molt variada i engendren una gran diversitat de fruits. En la formació del fruit però, hi poden participar altres teixits florals a més de l'ovari, com per exemple el receptacle floral en la maduixa* o les bràctees en la pinya (Coombe, 1976).

No sempre la definició botànica de fruit coincideix amb el sentit popular del mot. Cal distingir els fruits pròpiament dits, procedents d'una sola flor, de les

*NOTA: En aquesta memòria utilitzarem el terme "maduixa" per referir-nos a les formes cultivades, més grans que les silvestres. Tot i que els mots maduixó, maduixot o fraga són en realitat més correctes, rarament són emprats a nivell popular.

infructescències, originades per un conjunt de flors agrupades en inflorescència (figues, pinya, etc.). Dins dels fruits formats a partir d'una sola flor diferenciarem els fruits simples dels fruits compostos o agregats. Els primers, que són la majoria en la nostra flora, s'originen a partir d'una flor amb un sol pistil. Destaquen entre els fruits simples la poma, la pera i el préssec. Els fruits compostos o agregats provenen de flors amb més d'un pistil. Com a exemples típics destacarem la móra i la maduixa.

Independentment de l'origen del fruit, diferenciarem els fruits carnosos o parenquimàtics, en els quals és el propi teixit del fruit l'objecte d'interès comercial, dels fruits esclerenquimatosos o dehiscent, on és la llavor individual l'objecte d'importància comercial. La majoria de fruits carnosos presenten un patró de creixement que segueix una corba sigmoïdal simple, on es distingeixen tres fases: en la fase inicial es produeix una activa divisió cel·lular, que es tradueix en un augment lent del pes sec del fruit; seguidament té lloc l'expansió cel·lular, amb un conseqüent augment ràpid del pes sec; i en la fase final la intensitat de creixement s'alenteix i s'inicia el procés de maduració. Molts fruits assoleixen la seva grandària definitiva abans de madurar, però hi ha excepcions, com és el cas de la maduixa i l'alvocat, en què el fruit continua creixent durant la maduració.

1.2. La maduració dels fruits: aspectes generals

La maduració s'ha definit com el conjunt de canvis que es succeeixen en el fruit des de les darreres etapes del creixement, fins les primeres etapes de la senescència (Watada *et al.*, 1984). Aquest període de diferenciació tissular és un procés controlat genèticament que implica un ampli espectre de canvis bioquímics i fisiològics en el fruit, que el condueixen a l'adquisició de les propietats organolèptiques que el fan adequat pel consum (Brady, 1987). Entre les modificacions més significatives que es produeixen destaquen els canvis de textura i coloració, el desenvolupament de substàncies volàtils aromàtiques, i els canvis en el contingut de sucres i àcids orgànics.

La maduració precedeix una fase de senescència en la qual s'incrementen les reaccions catabòliques, amb la conseqüent desestructuració cel·lular. En aquesta fase final, els fruits esdevenen més susceptibles a contaminacions per patògens i a alteracions fisiològiques.

1.2.1. La maduració en fruits climatèrics i fruits no-climatèrics

Els fruits es classifiquen en dos grans grups en funció del seu patró respiratori i de la capacitat per a sintetitzar etilè a l'inici de la maduració.

Els fruits climatèrics, com la poma, la pera, el plàtan i el tomàquet entre d'altres, es caracteritzen per presentar un pic d'activitat respiratòria al començament de la maduració, acompanyat d'un important augment de la biosíntesi d'etilè. Aquest augment en la síntesi d'etilè respon a un mecanisme de regulació autocatalític. Aquesta hormona indueix i coordina l'expressió de diferents gens implicats en el procés de maduració (Theologis, 1992; Grierson i Schuch, 1993). La magnitud i sincronització amb què apareixen els pics de respiració i etilè són característics de cada fruit, donant un patró de maduració diferent en cada cas.

En els fruits no-climatèrics, com els cítrics, la pinya, la cirera, el raïm i la maduixa, la producció d'etilè no augmenta durant la maduració del fruit (Givannoni, 2001), encara que alguns d'aquests fruits poden respondre a aplicacions exògenes d'aquesta hormona. En aquests fruits, la maduració tampoc va acompanyada d'un augment de la taxa respiratòria (Biale i Young, 1971).

El paper que té l'increment de l'activitat respiratòria en fruits climatèrics no està completament dilucidat, tot i que es creu que podria ser necessari per a subministrar l'energia requerida per aconseguir els canvis associats a la maduració (Richmond i Biale, 1966). No obstant això, la demanda d'energia en la majoria de fruits durant la maduració és molt menor que la produïda durant el climateri (Solomos, 1983), i a més, els fruits no-climatèrics maduren sense cap pujada en la respiració. És possible que l'increment respiratori sigui simplement una resposta a l'etilè produït. Aquesta idea es veu confirmada pel fet que alguns fruits no-climatèrics, els quals produeixen nivells molt baixos d'etilè, també responen a l'aplicació exògena d'etilè amb un augment en la seva respiració (Tucker, 1993).

La regulació del procés de maduració en els fruits no-climatèrics ha estat poc estudiada i per tant, el mecanisme que condueix a la maduració en aquests fruits és encara desconegut. Quan aquests fruits són tractats amb etilè exogen, presenten una resposta respiratòria diferent a la dels fruits climatèrics. Així, l'activitat respiratòria augmenta proporcionalment a la concentració d'etilè aplicada i,

a diferència dels fruits climatèrics, aquesta taxa respiratòria retorna als nivells basals quan s'elimina l'hormona (Biale i Young, 1971). Tot i que es desconeix el factor que substitueix l'etilè durant la maduració en fruits no-climatèrics, hi ha evidències que indiquen que les auxines i l'àcid abscísic (ABA) hi poden tenir un paper important (Kano i Asahira, 1981; Given *et al.*, 1988a; Goldschmidt, 1997). En l'apartat 1.4.6 s'exposen els possibles mecanismes de regulació hormonal durant la maduració de la maduixa, el fruit no-climatèric més estudiat i que ha estat l'objecte d'aquesta tesi.

1.2.2. Canvis fisiològics i bioquímics associats a la maduració de fruits

1.2.2.1 Canvis en la pigmentació

El color del fruit està íntimament relacionat amb l'estadi de maduració i representa un aspecte molt valorat pel consumidor. Els canvis de color que tenen lloc durant la maduració dels fruits són deguts a dos processos que no sempre estan sincronitzats en el temps. Per una banda s'esdevé una degradació de la clorofil·la, que emmascara pigments ja presents abans de madurar en fruits com la llimona, la taronja i el plàtan (Jacob-Wilk *et al.*, 1999). Per altra banda es produeix una síntesi de pigments específics, normalment antocians i carotenoids, responsables de la coloració de cada fruit en concret (Tucker, 1993).

Els carotenoids són els responsables de les coloracions vermelles, taronges o grogues en fruits com els cítrics i el tomàquet. Aquests pigments, que es localitzen en els cromoplasts, són terpens derivats de l'acetil CoA per la via de l'àcid mevalònic (Bartley *et al.*, 1994). El primer carotenoide produït en aquesta via és el fitoè, a partir del qual deriven altres carotenoids com el licopè i el β -carotè. Normalment els carotenoids es sintetitzen en el fruit immadur, essent el β -carotè el més freqüent, tot i que en molts fruits hi ha una síntesi addicional de β -carotè i licopè durant la maduració (Tucker, 1993). El control de la biosíntesi de carotenoids és poc clar, malgrat que s'han realitzat molts estudis sobre els diferents aspectes bioquímics i moleculars relacionats amb la síntesi d'aquests pigments (Bird *et al.*, 1991; Bartley *et al.*, 1995; Bartley i Scolnik, 1995).

Els antocians, derivats dels flavonoides i localitzats al vacúol, comprenen un ampli espectre de pigments que poden donar una coloració des del blau fins al

vermell (Timberlake, 1981). El color de molts fruits, com la poma, la cirera, el raïm i la maduixa, és degut a la producció de diversos antocians durant la maduració. La ruta biosintètica d'aquests pigments ha estat àmpliament estudiada (Holton i Cornish, 1995). Es considera que els enzims clau en la seva biosíntesi són la fenilalanina amoniliasa (PAL), calcona sintasa i flavona sintasa.

1.2.2.2 Canvis en l'aroma

La majoria de tecnologies dirigides a la conservació de fruits abans de la seva comercialització, com són l'emmagatzematge en fred o en atmosferes controlades, tenen com a efectes secundaris la pèrdua del gust i de l'aroma característics del fruit. L'aroma dels fruits és el resultat d'una gran varietat de compostos volàtils que se sintetitzen durant la maduració a partir de diferents constituents de la planta; carbohidrats, lípids i proteïnes. La naturalesa dels compostos volàtils involucrats en l'aroma dels fruits és molt diversa i inclou alcohols, aldehids, ésters i cetones, entre d'altres (Nursten, 1970). L'anàlisi dels volàtils que es produeixen durant la maduració de la poma indica que almenys hi ha 330 compostos diferents (Van Straten, 2001). Mentre que molts dels volàtils són comuns en diferents fruits, d'altres presenten una distribució molt més restringida.

1.2.2.3 Canvis en el gust

La nostra percepció del sabor recau sobre dos sentits, el gust i l'olfacte. En fruits, el gust està principalment determinat pel seu contingut en sucres i àcids orgànics, si bé també hi juga un paper significatiu el grau d'astringència, que ve determinat pel contingut en fenols i tanins, i els compostos volàtils responsables de l'aroma. Tant els sucres com els àcids orgànics són sintetitzats a les fulles a partir d'assimilats fotosintètics, i transportats als fruits via floema.

El contingut de sucres en el fruit tendeix a augmentar durant la maduració (Whiting, 1970), ja sigui a conseqüència d'una major aportació per part de la planta, o d'una mobilització de les reserves de midó. Alguns fruits com el plàtan, la poma i el tomàquet, contenen gran part dels sucres abans de madurar, en forma de reserva, raó per la qual poden ser recol·lectats en estat immadur sense que es vegi afectat significativament el seu gust final. En altres fruits, com la maduixa i el raïm, l'acumulació de sucres té lloc principalment durant la maduració del fruit, i per tant

cal collir-los en un estadi avançat de la maduració a fi que puguin desenvolupar el seu gust característic (Tucker, 1993).

Els principals àcids orgànics presents en els fruits són el cítric, el màlic i el tartàric. En general, el contingut en àcids orgànics del fruit augmenta durant el desenvolupament i disminueix en la maduració, presumiblement degut a la seva utilització com a substrat respiratori (Ulrich, 1970).

Encara que els sucres i els àcids orgànics constitueixen els principals components en el gust del fruit, el contingut en compostos fenòlics és també molt important degut al seu efecte astringent al interaccionar amb les proteïnes i mucopolisacàrids de la saliva (Ozawa *et al.*, 1987). S'han aïllat diferents compostos fenòlics en fruits, molts dels quals es formen a partir de la fenilalanina, via àcid cumàric o àcid cianímic. Les seves estructures deriven dels àcids gàl·lic, cafeic, ferúlic o clorogènic.

1.2.2.4 Canvis en la textura

L'estovament dels fruits durant la seva maduració és un factor molt important que limita la seva vida post-collita. La pèrdua de textura derivada d'aquest estovament és una de les transformacions més significatives associades als fruits carnosos. Una vegada iniciat el procés d'estovament, la taxa de canvi de textura dependrà del tipus de fruit i de les condicions ambientals.

En la pèrdua de textura hi poden intervenir diferents processos, com la pèrdua de turgència cel·lular i la degradació de midó, si bé són els canvis bioquímics i en l'estructura de la paret cel·lular els que contribueixen de forma més significativa a l'estovament del fruit. Aquests canvis són deguts principalment a l'acció d'hidrolases de la paret cel·lular del fruit. Amb l'excepció d'algunes alteracions texturals produïdes per la pèrdua de turgència, l'estovament en la majoria de fruits representa un procés irreversible un cop s'ha iniciat. L'estovament no implica necessàriament la inhibició dels mecanismes de síntesi i manteniment de la paret cel·lular, sinó un acceleració dels processos catabòlics. El procés de degradació de la paret cel·lular associat a la maduració s'estudiarà amb més detall a l'apartat 1.3.6.

1.2.3. Expressió gènica en la maduració de fruits

Com ja s'ha esmentat anteriorment en l'apartat 1.2, la maduració es considera un procés especialitzat previ a la senescència. Al principi es pensava que la maduració era un procés fonamentalment catabòlic en el qual es perdia el control i l'organització cel·lular. En els darrers anys però, s'ha pogut demostrar que la maduració està sota un estricte control genètic. El fet que l'ús d'inhibidors de la síntesi de proteïnes i àcids nucleics evités la maduració normal ja va fer pensar que existien fenòmens de transcripció i/o traducció en la maduració (Sacher, 1973). Posteriorment, mitjançant el marcatge radioactiu *in vivo*, es demostrà l'existència de processos anabòlics durant la maduració dels fruits. En concret, destaquen els primers experiments que provaren la síntesi de proteïnes (Richmond i Biale, 1966; Brady i O'Connell, 1976), la síntesi d'àcids nucleics (Richmond i Biale, 1967) i la síntesi de polímers de la paret cel·lular (Mitcham *et al.*, 1989), durant la maduració.

Un dels objectius principals en l'estudi de la maduració dels fruits és la prevenció o retràs d'aquest procés. Fins ara s'han emprat diverses estratègies per aconseguir-ho, com són la conservació del fruit a baixes temperatures, l'aplicació d'atmosferes controlades, la ventilació de les àrees de conservació o l'ús de segrestadors o inhibidors de l'etilè. Totes aquestes tecnologies però, suposen costoses inversions i presenten problemes secundaris degut a què poden produir alteracions organolèptiques del fruit.

L'ús de diferents mutants naturals de maduració, com per exemple els mutants *rin*, *nor* i *Nr* de tomàquet (DellaPenna *et al.*, 1987; Gross, 1994; Lanahan *et al.*, 1994) ha permès ampliar el coneixement dels mecanismes de regulació de la maduració. La identificació de gens induïts durant la maduració, així com dels gens que intervenen en la biosíntesi d'etilè, també ha fet possible l'obtenció de mutants utilitzant la genètica reversa. Així, és possible inhibir l'expressió d'aquests gens en plantes transgèniques, introduint-los en el genoma en orientació antisentit. La tecnologia del RNA antisentit aplicada als fruits es mostra com una possibilitat tant per l'estudi de la regulació de la maduració, com per la seva possible aplicació comercial en el control de la maduració.

El clonatge de gens implicats en la biosíntesi d'etilè ha proporcionat un gran nombre de dades en l'estudi de la maduració. L'aproximació amb més èxit en el

control de l'inici de la maduració s'ha aconseguit per inhibició antisentit de l'expressió de l'enzim ACC sintasa (ACS), implicat en la biosíntesi de l'etilè, en plantes de tomàquet (Oeller *et al.*, 1991). En aquestes plantes no hi ha producció d'etilè, els fruits no maduren i no s'estoven ni varien en la pigmentació. Aquest fenotip pot revertir-se mitjançant l'aplicació d'etilè exogen (Theologis, 1992).

Malgrat tots els estudis realitzats fins ara, poc es coneix sobre la maduració i la seva regulació en fruits no-climatèrics. Per això és necessari encara identificar i clonar nous gens implicats en el procés de maduració i esbrinar mitjançant les tècniques de la genètica reversa el paper funcional de cadascun d'ells.

1.3. La paret cel·lular

1.3.1. El paper de la paret cel·lular en la vida de la planta

Les cèl·lules vegetals es caracteritzen per presentar la paret cel·lular, una estructura que envolta el protoplast i es troba a l'exterior de la membrana plasmàtica. La seva composició, forma i propietats, estan subjectes a processos dinàmics que canvien en resposta al creixement de la planta i les etapes de diferenciació i desenvolupament cel·lular. La paret actua de barrera entre el medi i el contingut protoplasmàtic cel·lular, intervenint en diferents processos cel·lulars. És permeable a l'aigua i als metabolits, però resistent als canvis de pressió osmòtica interna, assegurant la turgència necessària pel manteniment de l'estructura cel·lular.

Les primeres funcions atribuïdes a la paret cel·lular foren aquelles relacionades amb la seva rigidesa estructural, concretament les que conferien estructura i força a la cèl·lula. No obstant això, la paret cel·lular fa molt més que proveir la cèl·lula d'estructura i força (taula 1.1). Per exemple, la presència d'una paret rígida o semi-rígida obstaculitza el moviment de macromolècules dins i fora de la cèl·lula. A més, al tenir una càrrega neta negativa, retarda el moviment de molècules carregades positivament. Això ha condicionat el fet que la majoria de molècules senyal vegetals, a diferència dels sistemes animals, siguin petites i sense càrrega o carregades negativament (Brett i Waldron, 1996).

La paret cel·lular facilita el transport i la comunicació intracel·lular proveint una estructura de contacte entre cèl·lules adjacents: l'apoplast. També protegeix la cèl·lula de la gran majoria d'organismes potencialment patògens, ja que fins i tot els més petits no la poden traspasar. Aquest paper defensiu no és només passiu, doncs aquests microorganismes patògens, al secretar enzims hidrolítics de paret, provoquen un increment de la deposició de lignina i cal·losa com a resposta defensiva per part de la paret cel·lular. Aquesta resposta es produeix com a conseqüència de l'alliberació d'oligosacàrids derivats de la hidròlisi de la paret pels enzims d'origen patogènic. La degradació de polímers de paret també es produeix durant el creixement i desenvolupament normal de la planta, doncs la paret cel·lular està sotmesa a un procés de síntesi-degradació simultani. La degradació de la paret cel·lular s'incrementa en processos com la germinació de la llavor, la maduració del fruit, l'abscisió i la senescència.

Taula 1.1: Funcions de la paret cel·lular (Brett i Waldron, 1996).

- Provisió de força mecànica
- Manteniment de la forma cel·lular
- Control de l'expansió cel·lular
- Control del transport intracel·lular
- Protecció enfront altres organismes
- Senyalització cel·lular

1.3.2. Tipus de paret cel·lular

En general, la paret cel·lular està formada per dues fases ben diferenciades: una fase microfibril·lar i una fase matricial (apartat 1.3.3, taula 1.2). La fase microfibril·lar es caracteritza per tenir una composició química homogènia i una estructura cristal·lina, doncs està formada per cel·lulosa. La fase matricial, no cristal·lina, és químicament més complexa. Consta d'una gran varietat de polisacàrids, proteïnes, compostos fenòlics i elements minerals (Kohorn, 2000).

En la paret cel·lular es poden diferenciar tres capes principals: la làmina mitja, la paret cel·lular primària i la paret cel·lular secundària. La làmina mitja, de

naturalesa pèctica, té una funció d'adherència entre cèl·lules, i és la primera estructura que es forma en la paret cel·lular després de la divisió cel·lular. La làmina mitja i la paret primària es troben a totes les cèl·lules i teixits vegetals, en canvi la paret cel·lular secundària només està present en cèl·lules de determinats teixits, com poden ser les zones lignificades. Les cèl·lules que formen la polpa del fruit contenen només la paret primària, i és en aquesta paret on es produeixen les desestructuracions més evidents durant la maduració. La composició de la paret cel·lular primària i secundària varia segons l'espècie i el tipus cel·lular, especialment pel que fa als polisacàrids matricials.

S'han descrit dos tipus de paret cel·lular primària. La paret cel·lular primària de gimnospermes, dicotiledònies i monocotiledònies no gramínies forma un grup homogeni en la composició de la fase matricial, essent la pectina i els xiloglucans els principals polisacàrids. Aquest tipus de paret es coneix com a paret primària de Tipus 1. Les gramínies i altres famílies menors d'angiospermes monocotiledònies es caracteritzen per tenir poca pectina, i arabinoxilans i β -(1,3)- β -(1,4)-glucans com a hemicel·luloses principals. Aquesta és la paret cel·lular primària de Tipus 2.

En la paret cel·lular secundària, la fase matricial és molt variable. Així, en gimnospermes trobem glucomanans com a polisacàrids principals, mentre que en angiospermes dicotiledònies aquest polisacàrid és substituït pel 4-O-metilglucuronoxilà. La composició de la paret cel·lular secundària dins de les monocotiledònies també és molt variable.

A més d'aquestes diferències generals, algunes cèl·lules especialitzades tenen una composició de la paret molt característica. Aquest és el cas de les cèl·lules de reserva, cèl·lules reproductores i cèl·lules floemàtiques, entre d'altres.

1.3.3. Components moleculars de la paret cel·lular

Els constituents de la paret primària es poden classificar en diferents tipus de molècules polimèriques (Brownleader *et al.*, 1999): polisacàrids pèctics (~35% en pes sec), cel·lulosa (~30%), hemicel·luloses (~25%) i proteïnes (~10%). El contingut i les característiques estructurals dels polímers de la paret cel·lular varien segons l'espècie, l'estadi de desenvolupament i el grau de diferenciació cel·lular o

tissular. Segons la seva naturalesa química i funció, els diferents components que formen la paret cel·lular els dividirem en:

- Polisacàrids estructurals: cel·lulosa, hemicel·luloses i substàncies pèctiques.
- Proteïnes estructurals.
- Proteïnes enzimàtiques.
- Compostos fenòlics.
- Elements minerals, principalment ions Ca^{2+} .
- Aigua.

Taula 1.2: Components principals de la paret cel·lular (Brett i Waldron, 1996).

Fase	Component	Exemple
Microfibril·lar	Cel·lulosa (β -(1,4)-glucà)	
Matricial*	Pectines	Ramnogalacturonans I Arabinans Galactans Arabinogalactans I Homogalacturonans Ramnogalacturonans II
	Hemicel·luloses	Xilans Glucomanans Manans Galactomanans Glucuronomanans Xiloglucans Cal·losa (β -(1,3)-glucà) β -(1,3)- β -(1,4)-glucans Arabinogalactans II
	Proteïnes	Extensina Proteïnes conjugades a arabinogalactans Altres, incloent-hi enzims
	Compostos fenòlics	Lignina Àcid ferúlic Altres; àcid cumàric, àcid truxílic

* No tots els components de la fase matricial es troben a totes les parets cel·lulars.

1.3.3.1. Polisacàrids estructurals

1.3.3.1.1. Cel·lulosa

La **cel·lulosa** és un homopolímer polisacàridic no ramificat de molècules de D-glucosa unides mitjançant enllaços β -(1,4). En cada glucosa, l'hidrogen del grup hidroxil (-OH) de l'àtom de carboni número tres (posició C_3) forma un pont d'hidrogen amb l'oxigen de l'anell de la molècula anterior, estabilitzant el complex intermolecularment (figura 1.1). El grau de polimerització de la cadena de cel·lulosa és de 3.000 a 5.000 residus de D-glucosa en la paret cel·lular primària, i de fins a 15.000 residus en la paret secundària.

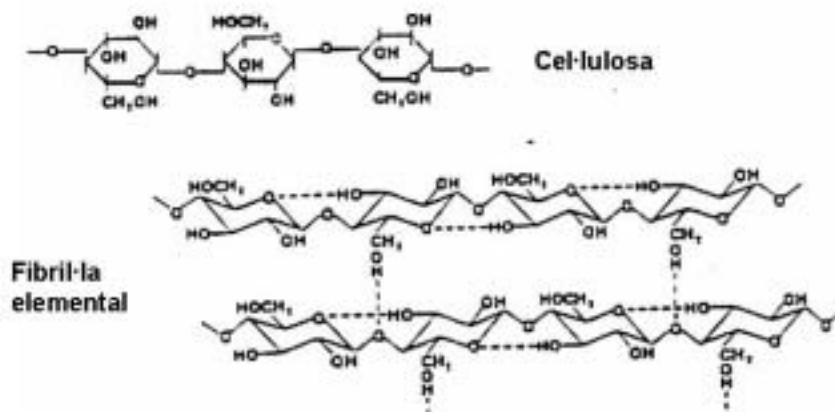


Figura 1.1: Estructura de la cel·lulosa amb els punts d'hidrogen intra i intermoleculars.

També es formen punts d'hidrogen entre alguns grups hidroxil de diferents cadenes de cel·lulosa, formant les fibril·les elementals. Aquestes fibril·les elementals consten de fins a 32 cadenes de cel·lulosa. L'agrupació de 20 fibril·les elementals origina les microfibril·les, de 5 a 30 nanòmetres de diàmetre (Varner i Lin, 1989), que són l'estructura més complexa trobada a la paret cel·lular primària.

La formació de punts d'hidrogen intramoleculars determina el grau de cristal·linitat de la cel·lulosa: una elevada presència de punts d'hidrogen originarà una cel·lulosa d'estructura cristal·lina, mentre que un baix nombre de punts d'hidrogen el trobarem en la cel·lulosa anomenada amorfa. Dins de la paret cel·lular

d'un mateix teixit poden coexistir regions de cel·lulosa cristal·lina amb regions de cel·lulosa amorfa.

1.3.3.1.2. Hemicel·luloses

Hemicel·lulosa és un terme que descriu una família de polímers rics en glucosa, manosa, arabinosa i xilosa, i que a diferència de la cel·lulosa, presenten cadenes laterals que sovint inclouen xilosa, galactosa i fucosa (Kohorn, 2000). En plantes dicotiledònies el component hemicel·lulòsic majoritari és el **xiloglucà** (figura 1.2), que pot arribar a constituir el 20% del pes sec total, mentre que en plantes monocotiledònies el component majoritari és el xilà. El xiloglucà està format per un esquelet de residus de D-glucosa, units mitjançant enllaços β -(1,4), que està altament substituït per residus de D-xilosa units per enllaços α -(1,6). Alguns residus de glucosa poden estar substituïts per cadenes de disacàrids o trisacàrids, formades per xilosa, galactosa i fucosa o arabinosa.

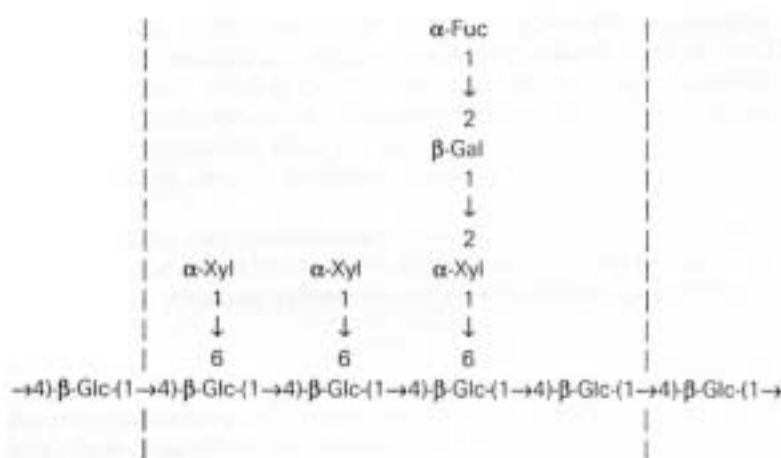


Figura 1.2: Estructura del xiloglucà segons Brett i Waldron (1996).

Les hemicel·luloses formen ponts d'hidrogen amb la cel·lulosa, i com a funcions principals tenen: manteniment de l'estructura de la paret cel·lular, control de l'expansió cel·lular, senyalització cel·lular a través de l'alliberació d'oligosacàrids durant la seva hidròlisi i, emmagatzematge de substàncies de reserva.

1.3.3.1.3. Polisacàrids pèctics

Les pectines inclouen un grup de polisacàrids rics en àcid D-galacturònic, L-ramnosa, L-arabinosa i D-galactosa, en proporcions variables. Altres sucres associats són D-xilosa, 2-O-metil-L-fucosa i àcid D-glucurònic. Són abundants a la làmina mitja i la paret cel·lular primària en plantes dicotiledònies, i en menor grau, en plantes monocotiledònies. Poden estar unides covalentment a fenols, cel·lulosa i proteïnes (Melford i Prakash, 1986). L'anàlisi detallat de la fracció pèctica indica la presència de diferents polímers, que inclouen ramnogalacturonans I (RG I), ramnogalacturonans II (RG II), homogalacturonans, arabinans, galactans i arabinogalactans (Melford i Prakash, 1986; Brett i Waldron, 1996; Brownleader *et al.*, 1999).

L'esquelet dels **RG I** consisteix en residus d'àcid α -(1,4)-D-galacturònic amb residus intercalats de ramnosa units mitjançant enllaços α -(1,2), generant una estructura contorsionada i amb molts residus laterals metil-esterificats. Pot presentar múltiples ramificacions en la posició C₄ de la ramnosa, que solen ser llargues i estructuralment similars a les molècules d'arabinans, galactans i arabinogalactans, que es descriuen més endavant.

Els **RG II** consten d'un esquelet de 25-50 residus d'àcid α -(1,4) D-galacturònic i 2-O-metil-D-xilosa, i són el grup minoritari de la paret cel·lular primària en dicotiledònies. Forma una estructura altament ramificada amb residus de D-galactosa, L-arabinosa, L-ramnosa i 2-O-metil-D-xilosa.

Els **homogalacturonans** estan formats per un esquelet de molècules d'àcid α -(1,4)-D-galacturònic parcialment esterificades, que presenta ramificacions laterals de polisacàrids neutres, formades per galactosa i/o arabinosa. Es poden unir covalentment a la fracció dels RG I o a d'altres polisacàrids. Són molt abundants en fruits i cultius cel·lulars de plantes dicotiledònies.

Els **arabinans** són cadenes de α -(1,5)-arabinosa amb ramificacions monosacàridiques laterals d'arabinosa, unides per enllaços α -(1,2) o α -(1,3).

Els **galactans** són homopolímers de β -(1,4)-galactans amb algunes ramificacions laterals de galactosa, que presenten una distribució reduïda en les plantes superiors.

Els **arabinogalactans** són polímers de β -(1,4)-galactans amb cadenes laterals curtes de α -(1,5)-arabinosa unides a la posició C₃ de la galactosa. Poden trobar-se unides covalentment a RG I o de forma independent. La presència d'algunes molècules d'àcid ferúlic unides a residus de galactosa i arabinosa confereix un paper cohesionador a aquestes molècules.

Les pectines i les hemicel·luloses són secretades per la via del sistema d'endomembranes a l'exterior cel·lular, formant una matriu que s'intercala entre les microfibril·les de cel·lulosa. L'abundància de càrregues negatives dels polisacàrids pèctics permeten la unió de diferents pectines mitjançant cations Ca^{2+} . El grau de polimerització d'aquests polisacàrids pèctics, les esterificacions i les interaccions amb calci condicionen la flexibilitat de la fase matricial, la porositat de la paret cel·lular, la interacció amb l'hemicel·lulosa i la mobilitat de les proteïnes estructurals de la paret (Baron-Epel *et al.*, 1988).

1.3.3.2. Proteïnes estructurals

La naturalesa de les proteïnes de la paret cel·lular és tan variada com les múltiples funcions que porten a terme. Amb l'excepció de les proteïnes riques en glicina (GRPs), totes les proteïnes estructurals estan sempre altament glicosilades, contenen hidroxiprolina i presenten seqüències altament repetitives. La majoria d'aquestes proteïnes estan formant una xarxa a la paret, i probablement tenen una funció estructural, si bé també podrien intervenir en la morfogènesi de la paret cel·lular i en la interacció cèl·lula-cèl·lula durant el desenvolupament.

1.3.3.2.1. Glicoproteïnes riques en hidroxiprolina (HRGPs)

Les HRGPs són les proteïnes estructurals majoritàries de la paret cel·lular (Carpita i Gibeaut, 1993; Cassab, 1998), i tenen com a aminoàcid principal la hidroxiprolina (Hyp). Són importants al llarg de tot el desenvolupament de la planta, però també a l'hora de mantenir la integritat estructural en teixits madurs, així com

en la defensa enfront les adversitats ambientals i l'atac per patògens (Bradley *et al.*, 1992). Entre aquestes proteïnes destaquen les extensines.

Extensines: Són proteïnes particularment abundants en dicotiledònies, i es caracteritzen per ser riques en hidroxiprolina, serina (Ser) i algunes combinacions d'aminoàcids com la valina (Val), la tirosina (Tyr), la lisina (Lys) i la histidina (His). Habitualment presenten el patró aminoacídic del tetrapèptid (Ser-Hyp)⁴ repetit. Sovint els residus d'hidroxiprolina poden estar glicosilats amb una i fins a quatre molècules d'arabinosa, mentre que alguns residus de serina es glicosilen amb una molècula de galactosa. Són proteïnes molt bàsiques, amb punts isoelèctrics (pI) propers a 10, degut a l'elevat contingut en lisina que presenten. S'han descrit nombrosos cDNAs d'extensines en dicotiledònies (Cassab, 1998).

1.3.3.2.2. Proteïnes riques en glicina (GRPs)

Les GRPs fins ara trobades tenen una composició formada principalment per glicina (68-70%) i serina (12%). La glicina (gly) es sol trobar formant part de petites unitats repetides al llarg de la seqüència aminoacídica. El primer gen GRP va ser aïllat en petúnia per Condit i Meagher (1986), si bé actualment ja s'han descrit en moltes altres espècies vegetals, monocotiledònies i dicotiledònies, com tomàquet, *Arabidopsis*, pastanaga i blat de moro. Hi ha almenys dues classes de GRPs. Una classe es troba a la paret cel·lular i la seva abundància és regulada durant el desenvolupament, mentre que la segona classe es troba en el citoplasma cel·lular i està regulada per factors ambientals. Les GRPs semblen tenir un paper important en el desenvolupament de teixits vasculars, nòduls i flors, així com en la resposta a ferida i la tolerància a la congelació (Cassab, 1998).

1.3.3.2.3. Proteïnes riques en prolina (PRPs)

Les PRPs contenen essencialment el motiu Pro-Pro repetit, dins d'una unitat oligopeptídica major: (Pro-(Pro-Hyp)-Val-Tyr-Lys)_n, destacant l'absència de serina i la presència de residus glicosilats (Chen i Varner, 1985). Aquestes proteïnes mostren patrons d'expressió molt específics per a cada teixit i tipus cel·lular. Es troben en el xilema, epidermis, aleurona i nòduls parenquimàtics, mostrant un patró de localització similar al de les GRPs. Sembla que estan implicades en diferents aspectes del desenvolupament de la planta, des de la germinació fins a la

nodulació, així com en el desenvolupament de l'ovari i de l'embrió (Franssen *et al.*, 1987; Averyhart-Fullard, *et al.*, 1998; Cassab, 1998).

1.3.3.2.4. Proteïnes conjugades a arabinogalactans (AGPs)

Són glicoproteïnes amb un baix contingut proteic, inferior al 10% en pes sec, riques en hidroxiprolina, alanina, treonina, glicina i serina, amb cadenes laterals de sucres unides per O-glicosilació a un grup hidroxil de serina o hidroxiprolina. Químicament són molt estables i es pensa que tenen una paper morforegulator via inhibició de la divisió cel·lular, tot i que també intervenen en processos d'embriogènesi somàtica, pol·linització i senyalització cel·lular (Cassab, 1998; Darley *et al.*, 2001).

1.3.3.3. Proteïnes enzimàtiques

La presència d'enzims a la paret dóna suport al fet de que la paret cel·lular primària és un compartiment cel·lular metabòlicament actiu. Ara bé, la simple existència d'aquests enzims no prova que siguin actius, doncs es requereixen evidències de que els components moleculars de la paret cel·lular sofreixen transformacions químiques *in vivo* (Fry, 1995). En aquest sentit, els aparents canvis de mida dels polímers de la paret cel·lular que acompanyen processos com la maduració dels fruits, impliquen l'acció d'enzims amb capacitat de degradació d'aquests components (Fischer i Bennett, 1991).

La comprensió de la bioquímica de la paret cel·lular és important degut als papers crucials que aquesta té en la determinació de cinc factors diferents: (a) la taxa i direcció de l'expansió cel·lular, (b) la intensitat de la unió cèl·lula-cèl·lula, (c) la susceptibilitat del teixit a l'atac enzimàtic per patògens, (d) la capacitat de retenció d'aigua i ions, i (e) la producció d'oligosacarines de senyalització cel·lular.

Els enzims que es relacionen amb la paret cel·lular al llarg de la vida de la planta dependran del tipus cel·lular, del teixit i de l'espècie d'estudi en cada cas. Els enzims capaços d'alterar l'estructura de la paret cel·lular inclouen (Fischer i Bennett, 1991; Brownleader *et al.*, 1999): pectinmetilesterasa (PME), endo-poligalacturonasa (PG o endoPG) i exo-poligalacturonasa (exo-PG), α - i β -galactosidasa (α -gal i β -gal), endo- β -(1,4)-glucanasa o cel·lulasa (EGasa), α -L-arabinosidasa, β -

glucosidasa, β -xilosidasa, α -L-fucosidasa, α -L-ramnosidasa, arabinoxilanas, xiloglucan endotransglicosilasa (XET), pectat liasa (PEL), β -mananasa (β -man), ramnogalacturonasa i expansina (Exp). La majoria d'enzims amb capacitat per actuar sobre la paret cel·lular presenten activitat hidrolasa i actuen sobre enllaços glucosídics, si bé n'hi ha que també hidrolitzen enllaços carboxièsters, com la PME. Aquests enzims els englobarem en dos grups diferents de proteïnes enzimàtiques: les que actuen sobre la cel·lulosa i/o l'hemicel·lulosa i les que actuen sobre les substàncies pèctiques de la paret (figura 1.3).

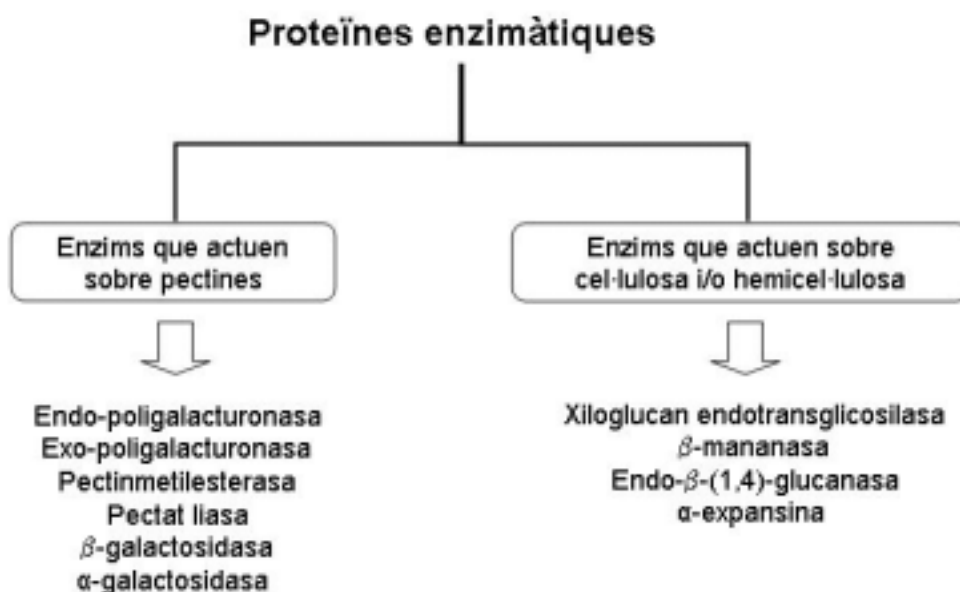


Figura 1.3: Classificació de les principals proteïnes enzimàtiques descrites en fruit.

A continuació es descriuen els principals enzims implicats en el procés de degradació de la paret cel·lular associat a la maduració dels fruits.

1.3.3.3.1. Enzims que actuen sobre les pectines: enzims pectinolítics

La maduració dels fruits normalment està associada a un augment en la solubilització de les pectines. Els enzims pectinolítics més importants que han estat identificats fins ara en fruits són: endo-poligalacturonasa, exo-poligalacturonasa, pectinmetilesterasa, pectat liasa, α -galactosidasa i β -galactosidasa.

Endo-poligalacturonasa: Aquest enzim catalitza la hidròlisi a l'atzar d'enllaços α -(1,4) intermoleculars entre residus no esterificats d'àcid

poligalacturònic del polímer de la pectina. Està implicat en la degradació pèctica que acompanya moltes etapes del desenvolupament de la planta, especialment aquelles que requereixen de separació cel·lular o d'un ràpid creixement. Així per exemple, s'ha associat amb l'abscisió, dehiscència d'anteres, expansió cel·lular i maduració del pol·len. També és el principal responsable de la dissolució de la làmina mitja durant la maduració d'alguns fruits (Hadfield i Bennett, 1998). Ha estat caracteritzat en un gran nombre de fruits i és un dels enzims més estudiats, especialment en tomàquet, per la seva gran importància hidrolítica sobre les pectines de la paret cel·lular. La PG de tomàquet ha sigut la més estudiada, tant a nivell gènic (Grierson *et al.*, 1986; Sheehy *et al.*, 1987; Bird *et al.*, 1988), com a nivell de proteïna (Ali i Brady, 1982; Sheehy *et al.*, 1987; DellaPenna i Bennett, 1988).

Es coneixen tres isoformes diferents de l'endo-PG en fruit de tomàquet (Brummell i Harpster, 2001): PG1, PG2A i PG2B, amb un pes molecular de 115, 45 i 43 kD respectivament. PG2A i PG2B tenen la seqüència aminoacídica idèntica i només es diferencien en els residus glicosilats, i per tant es creu que són un producte del mateix gen. La PG1 és la isoforma dominant de l'enzim en els primers estadis de la maduració del fruit, mentre que PG2A i PG2B augmenten posteriorment. PG2A i PG2B estan formades només per un únic domini catalític, mentre que PG1 consta del mateix domini catalític unit a una subunitat β no catalítica. La subunitat β és una glicoproteïna i s'ha suggerit que la seva funció és la fixació de la PG a la paret cel·lular (Fischer i Bennett, 1991). També en el fruit de plàtan s'han descrit tres isoformes diferents de la PG (Pathak *et al.*, 2000): PG1, PG2 i PG3.

L'activitat endo-PG està clarament correlacionada amb la degradació de les pectines de la paret i el començament de l'estovament del fruit (Brummell i Harpster, 2001). Malgrat això, els experiments que s'han realitzat amb plantes transgèniques antisentit on l'expressió de la PG és reduïda (Sheehy *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1988), mostren que, si bé la PG és responsable de la despolimerització de la pectina durant la maduració, la inhibició d'aquesta despolimerització en els fruits transgènics no és suficient per evitar l'estovament del fruit. No obstant això, aquests fruits sí que presenten una millora en la seva qualitat (Smith *et al.*, 1990) i un increment en la resistència a danys mecànics i a la contaminació per organismes patògens (Schuch *et al.*, 1991). D'altra banda, mitjançant la sobreexpressió del gen

de la PG en mutants *rin*, que presenten una activitat PG menor respecte els fruits wt i que no s'estoven (Brady *et al.*, 1983; DellaPenna *et al.*, 1987), tampoc s'ha pogut induir l'estovament, tot i que sí que s'ha observat un increment en la despolimerització i la solubilització de les pectines (Givannoni *et al.*, 1989). En fruits de tomàquet transgènics amb l'expressió de la subunitat β reduïda s'ha observat una menor solubilització de la pectina, produïda per la disminució de la despolimerització, demostrant-se la importància d'aquesta subunitat per a l'acció de la PG *in vivo* (Zheng *et al.*, 1992; Watson *et al.*, 1994).

Malgrat la forta correlació temporal entre l'acumulació de l'enzim PG i l'estovament de fruits com el tomàquet, els treballs realitzats indiquen que almenys la PG per sí sola no és capaç de provocar l'estovament associat a la maduració, ni tampoc és l'única responsable de la degradació i solubilització de les pectines de la paret cel·lular. Això suggereix la presència d'altres enzims amb funció similar que actuïn sobre aquestes pectines i que col·laborin amb la PG en les modificacions de la paret.

Exo-poligalacturonasa: L'exo-PG catalitza l'eliminació per hidròlisi de petits fragments oligosacàridics dels extrems de les molècules de pectina. Aquest enzim s'ha trobat en pera (Pressey i Avants, 1976), préssec (Pressey i Avants, 1973), poma (Bartley, 1978) i tomàquet (Baldwin i Pressey, 1990). Tot i que hi ha fruits com la poma en què només s'ha descrit activitat exo-PG i no endo-PG, hi ha molt poques evidències en l'actualitat que permetin donar un paper significatiu de les exo-PG en la maduració dels fruits (Hadfield i Bennett, 1998). No obstant això, treballs realitzats en préssec sí que han mostrat una certa correlació entre un augment en la quantitat d'exo-PG i l'inici de l'estovament del fruit (Downs i Brady, 1990).

Pectinmetilesterasa: Els poligalacturonans són dipositats a la paret cel·lular en una forma altament esterificada, i són desesterificats durant el desenvolupament cel·lular (Brummell i Harpster, 2001). Durant la maduració del tomàquet el grau de metil-esterificació de la pectina de paret decreix des d'un 90% a un 35% (Koch i Nevins, 1989). Això és degut a l'acció de la PME, que desesterifica els poliurònids per eliminació del grup metil de la posició C₆ dels residus d'àcid galacturònic, en pectines d'elevat pes molecular (Brummell i Harpster, 2001; Micheli, 2001). L'eliminació dels grups metil de les pectines genera grups carboxil lliure. Això

origina un canvi de pH i de càrrega de la paret cel·lular, permet l'agregació dels poliurònids per formar una matriu gelatinosa amb el calci, i fa que els poliurònids siguin susceptibles a la degradació per la PG (Koch i Nevins, 1989; Brownleader *et al.*, 1999; Brummell i Harpster, 2001).

En tomàquet, la PME forma una petita família multigènica de quatre gens com a mínim, alguns dels quals són altament homòlegs. Aquests gens codifiquen per proteïnes madures de 34-37 kD (Micheli, 2001), que es poden trobar en molts teixits de la planta. La proteïna i activitat corresponents a la PME són presents al fruit durant tot el desenvolupament, si bé augmenten a l'inici de la maduració, per després disminuir lleugerament.

Es desconeixen els mecanismes de regulació de l'expressió de la PME en el desenvolupament del fruit, si bé l'ús de mutants de tomàquet *rin* ha demostrat una clara relació amb l'etilè (Harriman *et al.*, 1991). La reducció de l'activitat PME en plantes transgèniques antisentit provoca un increment en el grau de metil·esterificació de les pectines (Tieman *et al.*, 1992). L'increment en el grau de metil·lació resulta en una menor despolimerització de les pectines per part de la PG, però no redueix l'estovament associat a la maduració. En aquests fruits s'ha vist que la supressió de l'activitat PME té un efecte negatiu en la integritat del fruit durant l'emmagatzematge posterior a la collita (Tieman i Handa, 1994). Per tant, es pot afirmar que la PME juga un paper important en el manteniment de la integritat tissular durant la vida post-collita del fruit (Brummell i Harpster, 2001).

Pectat liasa: Si bé en un principi es pensava que l'únic enzim amb capacitat de degradació dels poligalacturonats desesterificats era la PG, la manca d'un fenotip clar en plantes antisentit amb reducció d'expressió de la PG, així com el descobriment de nous enzims com la PEL, van fer pensar en una acció coordinada d'aquests enzims en el procés d'estovament. A diferència de la resta d'enzims pectinolítics, la PEL es caracteritza per trencar per β -eliminació els enllaços α -(1,4)-glicosídics de l'extrem no reductor dels D-galacturonans desesterificats, alliberant dímers i molècules d'àcid galacturònic insaturades. Cal destacar també el requeriment indispensable d'ions Ca^{2+} per a la seva activitat.

Les primeres pectat liases descrites foren les aïllades en bacteris fitopatògens. Aquestes PEL bacterianes actuen a nivell de la làmina mitja i la paret

cel·lular primària de la planta, solubilitzant pectines i desestabilitzant la paret. En plantes, les primeres PEL es van aïllar de teixit vegetatiu meristemàtic i pol·len (Wing *et al.*, 1989; Budelier *et al.*, 1990). En els darrers anys també s'ha aïllat la PEL en fruits com el plàtan i la maduixa (Domínguez-Puigjaner *et al.*, 1997; Medina-Escobar *et al.*, 1997). L'expressió de la PEL de plàtan es caracteritza per augmentar a l'inici de la maduració, fins arribar al màxim just en el climateri, llavors declina en el post-climateri. Aquesta PEL origina una proteïna madura de 44 kD, amb un senyal consens de N-glicosilació, un residu de cisteïna a l'extrem carboxil terminal que es creu que està implicat en la seva activitat, i tres asparragines conservades necessàries per la unió a calci (Henrissat *et al.*, 1995). En maduixa, l'expressió de la PEL també es relaciona amb la maduració del fruit (Medina-Escobar *et al.*, 1997; Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002).

β -Galactosidasa: Un dels canvis més importants que succeeix en la paret cel·lular durant la maduració és la pèrdua de residus galactosil dels polímers de paret (Gross i Sams, 1984). Com que no s'ha detectat activitat endo-galactanasa en plantes superiors, el més probable és que l'activitat enzimàtica responsable de la degradació dels β -galactans de paret provingui de les exo- β -galactosidases, enzims que eliminen els residus terminals β -D-galactosil no reduïts dels β -galactans (Brummell i Harpster, 2001). S'han descrit proteïnes amb activitat β -galactosidasa en alvocat (De Veau *et al.*, 1993), maduixa (Trainotti *et al.*, 2001b), pera (Yamaki i Kakiuchi, 1977), poma (Ross *et al.*, 1994), i tomàquet (Carey *et al.*, 1995), entre d'altres. En tomàquet s'han descrit fins a set gens que codifiquen per β -galactosidases, si bé només es detecten tres isoformes actives (I, II i III). Tots aquests gens s'expressen durant la maduració del fruit, encara que presenten patrons d'acumulació del mRNA diferents (Smith i Gross, 2000). En tomàquet la disminució de la galactosa polimèrica i l'increment de la galactosa lliure comença amb la maduració, i s'observa principalment en les fraccions pèctiques (Gross, 1984; Seymour *et al.*, 1990).

La supressió en plantes antisentit dels diferents gens que codifiquen per β -galactosidases ha demostrat que l'increment de l'expressió i de l'activitat β -galactosidasa durant la maduració del fruit deriva de la isoforma II (Smith i Gross, no publicat). Els fruits de les plantes antisentit per a la isoforma II han mostrat una menor despolimerització dels β -galactans de la paret cel·lular, que s'ha traduït en un

menor estovament del fruit respecte les plantes control. La sobreexpressió heteròloga d'aquesta isoforma en llevat ha demostrat que el substrat natural per la β -galactosidasa són les cadenes laterals de les pectines, riques en galactans (Carrington i Pressey, 1996; Smith i Gross, 2000).

α -Galactosidasa: El paper de les α -galactosidases en la degradació de la paret cel·lular no està clar, tot i que s'ha demostrat la seva presència a la paret. Actualment es desconeix el substrat *in vivo* de les α -galactosidases, si bé hi ha proves de que la α -galactosidasa d'alvocat purificada pot degradar la pectina de tomàquet *in vitro* (De Veau *et al.*, 1993). Els llocs d'acció per aquest enzim podrien ser els ramnogalacturonans II o les extensines, tot i que aquests substrats presenten pocs enllaços α -galactosídics (Brownleader *et al.*, 1999). En tomàquet l'activitat α -galactosidasa quasi no varia durant la maduració, la qual cosa fa pensar que no té un paper important en l'estovament d'aquest fruit (Pharr *et al.*, 1976; Carrington *et al.*, 1993).

1.3.3.3.2. Enzims que actuen sobre la cel·lulosa i/o hemicel·lulosa

La majoria d'aquests enzims pertanyen al grup de les glicosilases, que comprèn enzims amb activitat endo- i exo-glicosilasa, o al grup de les transglicosilases. Dins dels enzims amb activitat glicosilasa, destaquen l'endo- β -(1,4)-glucanasa i la β -mananasa, mentre que dins de les transglicosilases, destaca la xiloglucan endotransglicosilasa. En aquest apartat es descriuran la XET, l'expansina i la β -mananasa, mentre que les endo- β -(1,4)-glucanases es descriuran en el proper apartat degut a la importància que tenen en aquest treball.

β -Mananasa: Aquest enzim hidrolitza polímers lineals de β -(1,4)-mananosa per l'extrem no reductor i amb activitat endo, donant com a producte residus curts de mananosa. La mananosa és un component important de les parets de fruits com la poma i el tomàquet (Knee, 1978). En tomàquet s'ha vist que aquest enzim s'indueix quan comença la maduració pròpiament dita, suggerint un paper en l'estovament. En aquest fruit, tant l'expressió com l'activitat β -mananasa són màximes just abans de completar-se la maduració (Pressey, 1989).

Xiloglucan endotransglicosilasa: L'hemicel·lulosa principal de la paret cel·lular primària en dicotiledònies és el xiloglucà. Donada la importància d'aquest

polisacàrid en l'estructura de la paret, és fàcil imaginar que els factors que en modifiquin l'estructura jugaran un paper determinant en l'expansió i/o degradació de la paret. Les XETs foren estudiades per primer cop per Fry *et al.* (1992) i Nishitani i Tominaga (1992). Tot i que es desconeix el mecanisme d'acció d'aquest enzim, es sap que les XETs formen un intermediari estable format per la unió covalent enzim-xiloglucà (Darley *et al.*, 2001).

Les XETs mostren principalment activitat transglicosilasa reversible, catalitzant el trencament de l'enllaç β -(1,4) dels D-glucans que formen els xiloglucans, i transferint-los a un altre extrem no reductor d'un altre oligòmer o polímer de xiloglucà. A més però, algunes XETs poden catalitzar la transferència de xiloglucans a una molècula d'aigua, és a dir, actuant com a hidrolases. Algunes XETs poden presentar tant activitat transglicosilasa com hidrolasa, i en aquests casos el factor determinant per l'activitat d'aquest enzim és la disponibilitat de substrat. Si hi ha excés de xiloglucans, la XET probablement tindrà activitat transglicosilasa biogènica, però si en canvi en el medi falten xiloglucans, actuarà degradant els polímers (Darley *et al.*, 2001).

S'han proposat diferents funcions per les XETs, la més remarcable de les quals és la biogènesi de les parets. Durant l'expansió cel·lular es van incorporant nous polímers a la paret, per tal de que aquesta no s'aprimi en excés. Les cadenes de xiloglucans que són sintetitzades *de novo* són secretades a la matriu de la paret, i posteriorment s'uneixen covalentment a les cadenes preexistents, mantenint la integritat estructural. Es creu que les XETs intervenen en aquest procés, tot i que només es tenen evidències indirectes (Thompson *et al.*, 1997). També s'ha proposat un paper de les XETs en la maduració, ja que s'han descrit en fruits com el tomàquet, la poma i el kiwi (Brummell i Harpster, 2001).

Actualment es coneixen múltiples famílies de XETs en plantes, amb una elevada homologia entre elles. Tot i presentar grans divergències en la regió C-terminal, totes elles es caracteritzen per tenir un pes molecular de 31-34 kD, tenir un pèptid senyal de trànsit a l'espai extracel·lular i un domini catalític precedit d'un senyal consens per a la N-glicosilació.

Els patrons d'expressió de les XETs són molt variables durant el desenvolupament i la maduració dels fruits. La inhibició antisentit o sobreexpressió

en plantes transgèniques del gen que codifica per una XET relacionada amb el creixement del fruit de tomàquet, provoca un efecte en la mida final del fruit. Així, els fruits antisentit tenen una grandària menor que els fruits control o que sobreexpressen el mateix gen (Asada *et al.*, 1999). Això demostraria un paper de la XET en l'expansió cel·lular del fruit immadur. Les plantes transgèniques antisentit per una XET relacionada amb la maduració tampoc han mostrat canvis en l'estovament del fruit de tomàquet (De Silva, no publicat). Probablement el paper de les XETs en la maduració del tomàquet sigui el de manteniment de la paret, mitjançant la incorporació de nous xiloglucans, ja que a aquesta XET li manca l'activitat hidrolasa. No obstant això, en fruits com el kiwi on la XET sí presenta activitat hidrolasa, aquest enzim podria contribuir a la despolimerització dels xiloglucans (Schroder *et al.*, 1998).

Expansina: En els darrers anys ha estat descrita una nova classe de proteïnes de la paret cel·lular, anomenades expansines (McQueen-Mason *et al.*, 1992; McQueen-Mason i Cosgrove, 1994). Aquests enzims no semblen tenir activitat hidrolítica, si bé sí que poden trencar enllaços iònics no covalents, com poden ser els ponts d'hidrogen que hi ha entre les microfibril·les de cel·lulosa i les hemicel·luloses, debilitant l'estructura de la paret. S'han identificat en moltes plantes i teixits diferents com fruit de tomàquet (Brummell *et al.*, 1999b), llavors de tomàquet (Chen *et al.*, 1998), pèsol (Michael, 1996) o taronja (Kita *et al.*, 2000). El patró d'expressió que mostren alguns d'aquests gens suggereix que aquestes proteïnes podrien tenir principalment un paper en l'expansió cel·lular, si bé també podrien tenir altres funcions addicionals, com per exemple, en la maduració dels fruits (Rose *et al.*, 1997; Cosgrove *et al.*, 1998).

Fins ara s'han trobat dues famílies d'expansines, conegudes com a α i β expansines (Cosgrove *et al.*, 1997; Cosgrove, 1998). Les α -expansines es troben en fruits i altres teixits de dicotiledònies, mentre que les β expansines s'han trobat en la majoria de monocotiledònies gramínies i en algunes dicotiledònies, però no s'han descrit encara en fruit. Ambdues famílies es caracteritzen per tenir dominis rics en cisteïna, així com regions riques en triptòfan a la regió C-terminal, importants per la interacció proteïna-carbohidrat (Din *et al.*, 1994). Les α -expansines són proteïnes d'uns 30 kD de pes molecular, inclòs el pèptid senyal, i sense llocs per la N-glicosilació, que tenen una elevada afinitat pels complexos cel·lulosa-hemicel·lulosa (McQueen-Mason, 1995), si bé no s'ha pogut demostrar que tinguin

activitat sobre aquests substrats. Les β -expansines formen una família molt més divergent. A diferència de les α -expansines, les β -expansines sí que presenten llocs per la N-glicosilació, i la seva funció és encara desconeguda, tot i que s'han descrit algunes β -expansines amb activitat cistein-proteasa (Grobe *et al.*, 1999).

1.3.3.3.3. Endo- β -(1,4)-glucanasa o cel·lulasa

Els glicans de la fase matricial de la paret cel·lular sofreixen una despolimerització considerable durant la maduració (Huber, 1983; 1984), i es creu que això contribueix substancialment a l'estovament del fruit. Les endo- β -(1,4)-glucanases (EGases), que sovint també són anomenades cel·lulases, podrien intervenir en aquest procés. Les EGases hidrolitzen enllaços β -(1,4) interns de cadenes de D-glucans, adjacents a residus no substituïts. Aquesta reacció es produeix mitjançant una catàlisi àcida i requereix un donador de protons (Glu) i un nucleòfil/base (Asp). Normalment, l'activitat d'aquests enzims es determina segons la seva capacitat d'hidròlisi *in vitro* de derivats solubles de la cel·lulosa, com la carboximetilcel·lulosa o CMC (activitat CMCasa). S'ha detectat activitat CMCasa en extractes de diferents òrgans i teixits vegetals de nombroses espècies. Per exemple, s'han trobat en teixits en creixement com hipocòtils, epicòtils i tiges; en teixits en diferenciació, com floema, aerènquima i conductes laticífers; així com en fulla, flor, zones d'abscisió i fruit.

Aquests enzims es caracteritzen per posseir com a mínim un dels dos dominis catalítics següents (Tomme *et al.*, 1992; Del Campillo, 1999):

- Domini catalític 1:

[STV]-x-[LIVMFY]-[STV]-x(2)-G-x-[NKR]-x(4)-[PLIVM]-H-x-R

- Domini catalític 2:

[FYW]-x-D-x(4)-[FYW]-x(3)-E-x-[STA]-x(3)-N-[STA]

Basant-nos en la seqüència aminoacídica, podem classificar les EGases en dotze famílies (Henrissat, 1991; Davies i Henrissat, 1996). Cadascuna de les dotze famílies s'especifica per una denominació numèrica, de forma que s'han descrit les famílies 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45, 48, 51, 60 i 61. L'única família important en plantes és la família 9, coneguda també com a família E.

S'han aïllat diferents clons de moltes espècies i tots ells mostren motius aminoacídics conservats, presumiblement implicats en l'activitat catalítica o l'estructura secundària (Brummell *et al.*, 1994). Aquests enzims posseeixen estructures primàries de tres tipus diferents (Brummell i Harpster, 2001): (1) proteïnes de 50-55 kD amb pèptid senyal pel trànsit a reticle endoplasmàtic i posterior secreció, que solen posseir seqüències consens per a N-glicosilacions (aquest grup comprèn la majoria d'EGases aïllades de plantes fins ara, i inclou la proteïna Cel1 descrita en aquest treball); (2) proteïnes de 80-90 kD sense pèptid senyal, però amb una llarga extensió amino-terminal que conté un domini transmembrana que fixa la proteïna a la membrana plasmàtica o a membranes internes, i amb un elevat grau de N-glicosilació; (3) proteïnes d'aproximadament 65 kD amb pèptid senyal i una llarga extensió carboxil-terminal que conté un suposat domini d'unió a cel·lulosa o CBD (Trainotti *et al.*, 1999a), similar al trobat en EGases bacterianes i que inclou la proteïna Cel2 descrita en aquesta memòria. A la figura 1.4 es mostra un arbre filogenètic generat per l'alineament de seqüències aminoacídiques deduïdes a partir de diferents EGases aïllades de plantes.

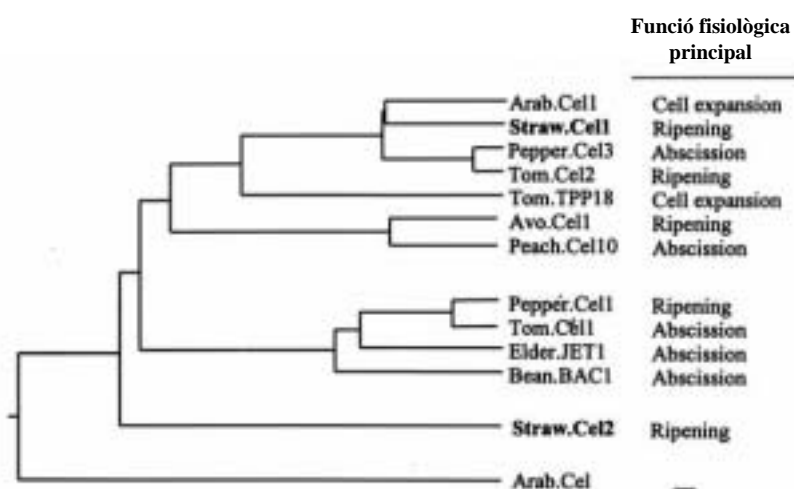


Figura 1.4: Arbre filogenètic de diferents EGases de les quals es disposa de la seqüència aminoacídica completa. Arab, *Arabidopsis*; Avo, alvocat; Bean, mongeta; Pepper, pebrot; Straw, maduixa; Tom, tomàquet (Llop-Tous *et al.*, 1999).

Fins fa poc, s'havia pensat que les EGases no podien degradar la cel·lulosa insoluble o cristal·lina, ja que aquest fet s'havia constatat per diferents EGases. Malgrat això, anàlisis ultraestructurals de la paret cel·lular d'alvocat indiquen que l'EGasa d'alvocat pot trencar l'organització microfibril·lar de la cel·lulosa mitjançant una hidròlisi limitada, afectant així la fortalesa de la paret (O'Donoghue *et al.*, 1994).

Les EGases de suspensions cel·lulars de pollancre són actives vers la cel·lulosa i celo-oligosacàrids, i en menor grau enfront els xiloglucans (Nakamura i Hayashi, 1993; Ohmiya *et al.*, 1995; Ohmiya *et al.*, 2000). També s'ha descrit una EGasa d'epicòtil de pèsol amb capacitat per hidrolitzar formes cristal·lines i amorfes de la cel·lulosa, encara que amb activitat menor que enfront la CMC (Wong *et al.*, 1977).

Ja que moltes EGases són aparentment inactives envers la cel·lulosa nativa, s'havia proposat que el xiloglucà, l'altre component principal de la paret cel·lular amb enllaços β -(1,4), era el substrat principal *in vivo* d'aquests enzims (Brummell *et al.*, 1994). El fet però que recentment s'hagin descrit EGases amb activitat sobre diferents formes de la cel·lulosa, suggereixen que a més dels xiloglucans, aquests enzims també puguin actuar *in vivo* sobre regions perifèriques de la cel·lulosa no cristal·lina (especialment les capes externes de les microfibril·les, on les cadenes de glucans formen xarxes amb els xiloglucans), i possiblement de glucomanans (Brummell i Harpster, 2001).

Per tant, el paper de les EGases en la degradació de la paret cel·lular és encara poc clar, si bé podria ser que l'acció de les EGases dels Tipus 1 i Tipus 3, (descrites a la plana 35) anés dirigida contra les cadenes de cel·lulosa de les microfibril·les, i en menor grau contra els xiloglucans de la interfase microfibril·les/xiloglucà, per causar la distensió de la paret (Brummell i Harpster, 2001).

Taula 1.3: Especificitat de substrat relativa de quatre EGases, assajada mitjançant l'increment en equivalents de sucres reductors, i usant glucosa com a estàndard (Brummell *et al.*, 1994).

SUBSTRAT	Tija de pèsol		Fruit d'alvocat	Tabac
	Fracció Soluble	Fracció Insoluble		
CMC	93	201	33'4	5
Cel·lulosa	22	87	0	-
Xiloglucans	3'3	22'4	2'8	7'6
β -(1,3)(1,4)-Glucans	93	177	68'8	3'2
Liquenans	22	141	28'4	-
Xilans	0	0	0	0

En fruits com l'alvocat, el tomàquet i la maduixa, s'han detectat diferents isoformes d'EGases (Kanellis i Kalaitzis, 1992; Maclachlan i Brady, 1992; Llop-Tous, 1997; Harpster *et al.*, 1998; Llop-Tous *et al.*, 1999; Trainotti *et al.*, 1999a i 1999b). Les EGases estan codificades per una família multigènica molt gran i divergent, que en tomàquet consisteix en vuit membres (Lashbrook *et al.*, 1994; Milligan i Gasser, 1995; Del Campillo i Bennett, 1996; Brummell *et al.*, 1997a; Catalá *et al.*, 1997; Catalá i Bennett, 1998). S'ha detectat activitat CMCasa en fruits de totes les espècies examinades (Brummell *et al.*, 1994), però en quantitats variables. En tomàquet, l'activitat CMCasa està present durant tot el desenvolupament del fruit, assolint els màxims nivells en fruits verds en expansió i durant la maduració, i a diferència de la PG, aquesta activitat decreix en fruits sobremadurs (Hall, 1964; Hobson, 1968). L'activitat mesurada és presumiblement una composició de diferents productes gènics.

Els mRNAs de *LeCel1*, *LeCel2* i *LeCel4* de tomàquet s'acumulen en les primeres etapes de l'expansió cel·lular del fruit (Lashbrook *et al.*, 1994; González-Bosch *et al.*, 1996; Brummell *et al.*, 1997b), mentre que el mRNA de *LeCel7* s'acumula en les darreres etapes de l'expansió cel·lular del fruit verd, i declina al iniciar-se la maduració (Catalá *et al.*, 2000). En canvi, *LeCel1* i *LeCel2* exhibeixen una acumulació de mRNA en el pericarp correlacionada amb la maduració, doncs augmenten considerablement just a l'inici de la maduració (Lashbrook *et al.*, 1994; González-Bosch *et al.*, 1996). *LeCel1* arriba al màxim d'expressió aviat en la maduració i després disminueix progressivament, mentre que *LeCel2* continua augmentant i assoleix valors molt superiors a *LeCel1*. Cap d'aquests gens presenta una expressió específica de fruit. Així, l'expressió de *LeCel7* és clarament detectable en hipocòtils, on a més és activada per auxines (Catalá *et al.*, 1997), suggerint una possible regulació positiva per auxines en fruit verd. En fruit, l'acumulació dels trànscrips corresponents a *LeCel1* i *LeCel2* és promoguda per etilè exogen i inhibida per antagonistes de l'etilè, suggerint una regulació per mitjà d'aquesta hormona (Lashbrook *et al.*, 1994; González-Bosch *et al.*, 1996).

Estudis fets amb el mutant *rin* de tomàquet han demostrat una expressió de regulació no coordinada i diferent pels dos gens (González-Bosch *et al.*, 1996). En mutants *rin*, el mRNA de *LeCel1* hi és present però en nivells mínims, i és estimulat clarament per l'aplicació exògena d'etilè (Lincoln i Fischer, 1988). En canvi, el mRNA de *LeCel2* quasi no es detecta en aquests fruits, i no s'indueix per etilè

(Giovannoni *et al.*, 1989). L'elevada expressió de *LeCel1* en mutants *rin* tractats amb etilè, que no s'estoven, demostra que aquest gen sol no és responsable de l'estovament. En canvi, l'absència d'expressió de *LeCel2* en aquests fruits suggereix que el producte d'aquest gen sí que podria jugar un paper important en l'estovament. Malgrat això, la supressió de l'expressió dels gens *LeCel1* o *LeCel2* en plantes transgèniques antisentit de tomàquet no ocasiona cap reducció de l'estovament, el qual indica que cap dels dos gens és un determinant primari en l'estovament (Lashbrook *et al.*, 1998; Brummell *et al.*, 1999a). Probablement altres gens, com per exemple *LeCel5* (Kalaitzis *et al.*, 1999), que presenten funcions redundants tinguin efectes compensatoris. En aquestes plantes, encara que la supressió de *LeCel1* o *LeCel2* no va resultar en una reducció de l'estovament, sí que va produir una reducció de la separació cel·lular en les zones d'abscisió en flor i fruit respectivament, suggerint que aquests gens podrien estar implicats en processos d'abscisió.

En *Arabidopsis* s'han seqüenciat fins a dotze gens que codifiquen per EGases (taula 1.4). Dins d'aquests gens es poden diferenciar clarament els tres tipus d'EGases descrits a la plana 35, i tots ells pertanyen a la família 9 de les EGases.

Taula 1.4: Llistat dels gens trobats en *Arabidopsis* i que codifiquen per EGases, amb les seves propietats moleculars principals (Del Campillo, 1999). El pes molecular es correspon a la proteïna madura, sense el pèptid senyal.

Locus	Nombre de exons	introns	P.M. (kD)	Domini catalític 1	Domini catalític 2	Pèptid senyal	Altres Motius o dominis
Cel1F19G10.16	5	4	50'5	-	+	+	-
Cel1	7	6	51'2	+	+	+	-
CelT2H3.5	7	6	55'2	+	+	+	-
CelT26J12.2	4	3	51'2	+	+	+	-
Cel2			52'0	+	+	+	-
CelF16B22.6	5	4	50'5	+	-	+	Ancoratge a la cèl·lula
CelF16B22.5	5	4	50'1	+	-	+	Ancoratge a la cèl·lula
CelF4I1.36	4	3	50'4	+	-	+	Ancoratge a la cèl·lula
Cel21L14.7	4	3	55'9	+	-	+	-
CelF4I1.37	4	3	53'4	+	-	-?	Ancoratge a la cèl·lula
CelT17O5	6	5	69'1	+	+	-	Transmembrana
Cel5I14.14	6	5	69'8	+	+	-	Transmembrana

Tots aquests gens presenten una expressió característica i diferent, el qual suggereix que cadascun d'ells porta a terme una funció bioquímica especialitzada. La cerca de mutants d'*Arabidopsis* és imprescindible per entendre la diversitat de gens que codifiquen per a les EGases en aquesta planta. Un mutant molt interessant és el *korrigan* o *kor* (Nicol *et al.*, 1998). *kor* és un gen que codifica per una EGasa similar a *LeCel3* de tomàquet i que genera una mutació recessiva que es caracteritza per produir plantes amb hipocòtils curts en les primeres fases de desenvolupament, tot i que les plantes adultes presenten un fenotip normal. Les característiques fenotípiques d'aquest mutant indueixen a pensar que *kor* intervé en el procés de creixement, i per tant, tindria un paper en l'expansió de la paret cel·lular.

En fruits no-climatèrics també s'han descrit clons corresponents a EGases. En maduixa per exemple, s'han descrit fins ara dues EGases anomenades *Cel1* i *Cel2* (Llop-Tous, 1997; Harpster *et al.*, 1998; Llop-Tous *et al.*, 1999; Trainotti *et al.*, 1999a, 1999b; Woolley *et al.*, 2001). És possible que en maduixa aquests dos gens actuïn de forma sinèrgica, contribuint a la desestructuració de la paret cel·lular que acompanya l'estovament. Recentment s'ha publicat en un treball la supressió de l'expressió de *Cel1* en plantes de maduixa transgèniques antisentit, usant el promotor constitutiu 35S (Woolley *et al.*, 2001). Tot i que en aquestes plantes s'ha aconseguit inhibir l'expressió del transcrit *Cel1*, no s'ha detectat cap efecte significatiu en l'activitat EGasa o la fermesa del fruit.

En pebrot, un fruit no-climatèric especial perquè respon a l'aplicació exògena d'etilè, la inhibició de l'expressió de *CaCel1* per cosupressió es va traduir en una reducció de la quantitat de proteïna immunodetectable, així com de l'activitat CMCasa (Harpster i Dunsmuir, no publicat). Malgrat tot, durant la maduració del pebrot la despolimerització dels glucans de la matriu, inclosos els xiloglucans, era molt similar en fruits control i en fruits amb activitat CMCasa reduïda, deduint-se un paper mínim d'aquesta EGasa en la desestructuració dels xiloglucans.

1.3.3.4. Compostos fenòlics

Els compostos fenòlics de la paret cel·lular primària són principalment l'àcid ferúlic i l'àcid *p*-cumàric, els quals es troben freqüentment esterificats a residus d'arabinosa i galactosa dels polisacàrids pèctics (McNeil *et al.*, 1984). Aquests

compostos fenòlics formarien enllaços per entrecreuament entre pectines, limitant l'extensibilitat de la paret i podrien jugar un paper important en la resistència a l'atac per fongs.

A part d'això, algunes cèl·lules diferenciades contenen lignina, un polímer fenòlic que es diposita sobre la paret quan s'atura el creixement cel·lular. La polimerització de la lignina resulta en una xarxa molt resistent i hidrofòbica que envolta la resta de components de la paret i els immobilitza (Brett i Waldron, 1996).

1.3.4. Estructura de la paret cel·lular

Després de caracteritzar els diferents components polisacàridics i enzimàtics de la paret, es van proposar diferents models per explicar com s'estructuraven aquest polímers, i com s'alteraven per facilitar l'expansió cel·lular. El model de paret cel·lular primària més acceptat actualment per a les plantes dicotiledònies és el de Carpita i Gibeaut (1993), que es mostra a la figura 1.5.

En aquest model es postula que les fibres de cel·lulosa, orientades periclinament respecte la superfície cel·lular, s'entrellacen amb els polímers de xiloglucans, formant una xarxa que està immersa dins d'una matriu amorfa de pectines. Les microfibril·les de cel·lulosa estan separades entre sí per una distància varies vegades superior al seu propi diàmetre, deixant amplis espais on es diposita la matriu pèctica. En les plantes dicotiledònies es considera que les microfibril·les de cel·lulosa estan recobertes per una capa de molècules de xiloglucans, les quals s'uneixen mitjançant la formació de nombrosos ponts d'hidrogen. Aquests xiloglucans serveixen de nexa d'unió entre diferents microfibril·les, estabilitzant d'aquesta manera l'estructura de la paret.

Segons aquest model, els polisacàrids pèctics, les molècules d'extensina i d'altres proteïnes estructurals, formarien alhora un entramat similar al dels xiloglucans, però amb els seus components units covalentment entre sí, i amb les molècules d'extensina orientades anticlinalment respecte la superfície cel·lular. La longitud de les molècules d'extensina és de l'ordre de 80 nm, magnitud similar al gruix de la paret cel·lular primària, que és d'uns 100 nm, la qual cosa dóna una idea de la seva possible funció cohesiva. Tot aquest entrellat conferiria una certa rigidesa però sense alterar la capacitat d'extensió. Les pectines definirien la mida

dels porus de la paret, i aquesta porositat seria funció del grau d'esterificació metílica, que determina la formació de ponts de calci entre elles.

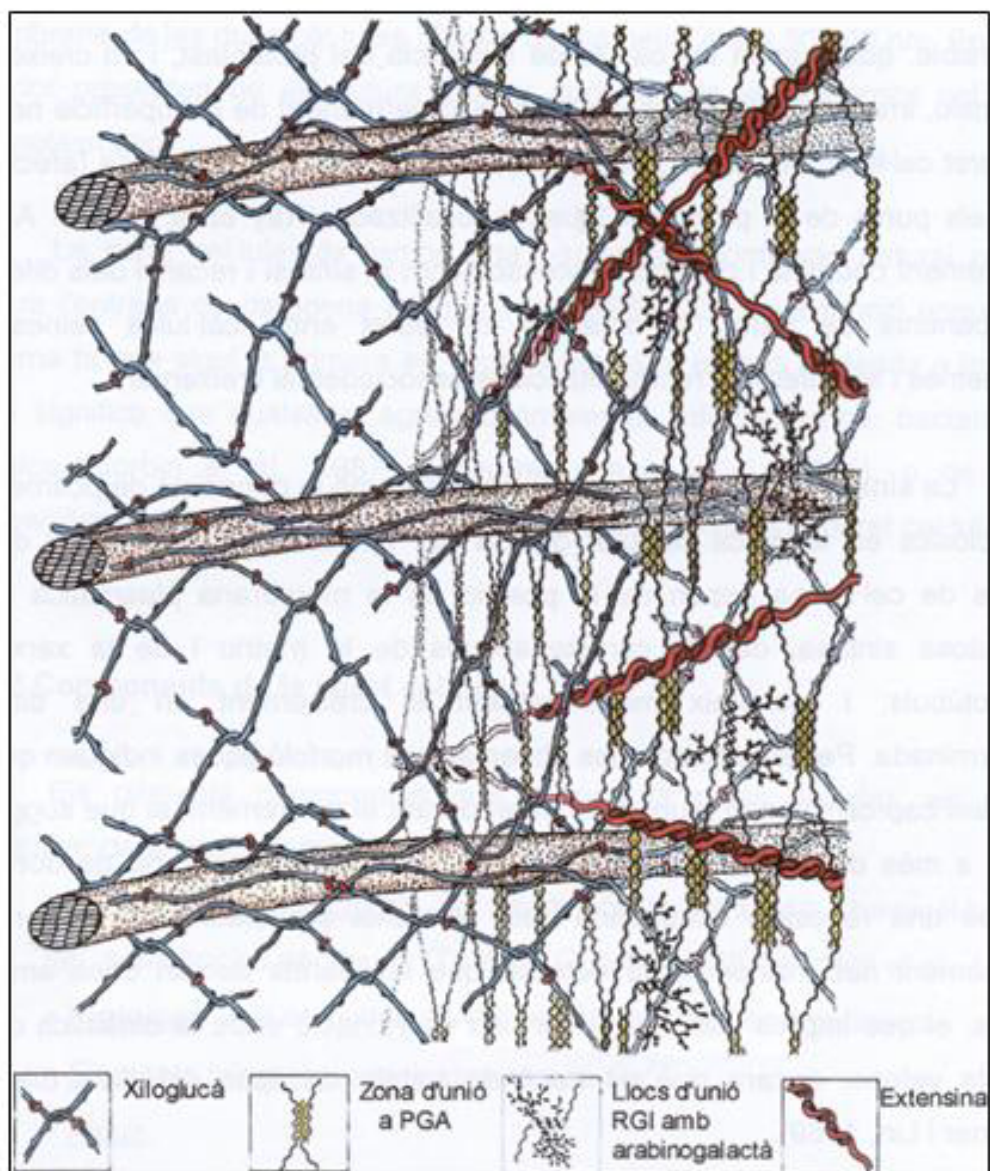


Figura 1.5: Esquema de la paret cel·lular primària present en plantes dicotiledònies. Les fibres de cel·lulosa que recorren la paret de forma paral·lela s'uneixen a les molècules d'hemicel·lulosa, formant una xarxa que s'envolta de la matriu pèctica (Carpita i Gibeaut, 1993).

1.3.5. Formació de la paret cel·lular

La primera etapa en la formació de la paret cel·lular constitueix una part inherent del procés de divisió cel·lular (Brett i Waldron, 1996). Un cop formats els

dos nuclis cel·lulars s'acumulen vesícules en el pla equatorial de la cèl·lula mare que, al fusionar-se, formen la placa cel·lular de separació. Aquesta placa, formada principalment per pectines, es fusionarà amb la paret cel·lular de la cèl·lula mare. Posteriorment es dipositarà material sobre la placa cel·lular, que esdevindrà la làmina mitja, i es formarà la paret cel·lular primària. Els polisacàrids que originen la paret provenen del catabolisme dels nucleòsids. La cel·lulosa és sintetitzada a la membrana plasmàtica, mentre que els altres polisacàrids i les proteïnes són sintetitzades al reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi. Aquests polisacàrids, després de sofrir reaccions de transglicosilació i polimerització, seguiran la via de secreció a través del reticle endoplasmàtic i les vesícules de Golgi. El mateix camí segueixen les proteïnes de paret, tot i que aquestes són sintetitzades als ribosomes del reticle endoplasmàtic rugós.

1.3.6. Degradació de la paret cel·lular durant la maduració

Durant la maduració, l'arquitectura de la paret cel·lular i els seus polímers es van modificant progressivament, sent aquesta modificació de naturalesa variable segons l'espècie estudiada. La paret esdevé més hidratada a mesura que la cohesió de les pectines varia, i aquest és el factor principal que determina la separació de les cèl·lules (Jarvis, 1984). La reducció de l'adhesió cel·lular és causada per la dissolució i trencament de la làmina mitja, i comença en les etapes inicials de la maduració en fruits com el tomàquet (Crookes i Grierson, 1993) o més tard en altres fruits com la poma (Ben-Arie *et al.*, 1979). Durant la maduració, el pH de l'espai extracel·lular disminueix, mentre augmenta la concentració iònica (Almeida i Huber, 1999). La maduració sovint s'acompanya d'una reducció en la turgència cel·lular, degut a l'increment de la concentració de soluts a la paret i a la seva distensió (Shackel *et al.*, 1991). A part de la degradació de la paret, la síntesi i la incorporació de nous components a la paret continua durant la maduració (Mitcham *et al.*, 1989; Greve i Labavitch, 1991).

L'extracció seqüencial dels diferents polímers de la paret ha permès estudiar les modificacions produïdes durant la maduració. En tomàquet s'ha vist que els canvis principals es produeixen en pectines i xiloglucans. Així, les pectines esdevenen més solubles i despolimeritzades (Huber i O'Donoghue, 1993; Brummell i Labavitch, 1997). La despolimerització pèctica i la pèrdua de galactosa i arabinosa de les cadenes laterals dels ramnogalacturonans incrementa la porositat de la

paret, facilitant l'accés de les hidrolases de paret (Baron-Epel *et al.*, 1988). Les pectines metil-esterificades es van desesterificant progressivament per un procés que s'inicia a la làmina mitja i continua per tota la paret (Blumer *et al.*, 2000). Això origina la formació de càrregues a la superfície de la paret, que poden ser importants en la modulació del balanç iònic i del pH, i limiten la mobilitat de proteïnes carregades (Carpita i Gibeaut, 1993). Aquests canvis de pH de l'apoplast també poden afectar l'activitat dels enzims localitzats a la paret (Chun i Huber, 1998; Almeida i Huber, 1999).

La fracció de glicans de la matriu dèbilment unida a cel·lulosa, que són principalment glucomanans i xilans (hemicel·luloses), mostra petites variacions de pes molecular durant la maduració (Tong i Gross, 1988; Brummell *et al.*, 1999c), mentre que els glicans units fortament a la cel·lulosa sí que són despolimeritzats. La fracció de glicans units fortament a la cel·lulosa conté principalment xiloglucans, l'hemicel·lulosa majoritària. Malgrat això, les quantitats relatives dels monòmers característics d'aquests polisacàrids, com la xilosa i la glucosa, no disminueixen en la paret durant la maduració de fruits com la poma, la maduixa, la pera i el tomàquet (Melford i Prakash, 1986).

1.4. La maduixa

1.4.1. Origen i posició sistemàtica

A començaments del segle XVIII uns exploradors francesos van descobrir una maduixa de fruit gran que era cultivada pels natius de Xile. Al retornar aquests exploradors, en 1714, aquesta maduixa xilena (*Fragaria chiloensis*) fou creuada amb una altra maduixa salvatge trobada a la colònia nord-americana de Virgínia (*Fragaria virginiana*). Posteriorment es van desenvolupar molts creuaments entre ambdues espècies, el qual va originar multitud d'híbrids, els quals es van agrupar sota el nom botànic de *Fragaria x ananassa* Duch, nom que prové del llatí "fraga" (fragant).

La maduixera pertany a la família de les Rosàcies, del gènere *Fragaria*. Degut al seu origen híbrid, existeixen diferents espècies adaptades a les condicions ambientals més variables, des dels països amb climes tropicals i subtropicals fins els països escandinaus. El gènere *Fragaria* engloba més de 150 espècies, si bé les

més importants volten la vintena. La maduixa silvestre que creix a Catalunya és la *Fragaria vesca* L., caracteritzada per tenir fruits petits i molt aromàtics. Les maduixes cultivades tenen fruits més grans però menys aromàtics, i totes provenen de successives hibridacions entre les espècies *F. chiloensis* i *F. virginiana*.

1.4.2. Importància econòmica

El consum de la maduixa, com a producte fresc o com a aliment elaborat, ha experimentat un notable desenvolupament en els darrers anys. Aquest fet és degut a la disponibilitat de fruits durant tot l'any i a la industrialització dels processos utilitzats per a l'obtenció dels diferents productes derivats.

La producció mundial de maduixes ha augmentat constantment fins arribar a una producció superior als dos milions de tones l'any 1988, segons dades de la *Food and Agriculture Organisation* (Tucker, 1993). Els principals països productors de maduixa són els Estats Units, Polònia, Japó, Espanya i Itàlia.

A Espanya, la producció es va situar en les 262.000 tones l'any 1997 (Ministerio de Agricultura). La major zona productora està centrada a Huelva, amb més del 90% de la producció total, seguida de Catalunya, País Valencià i Galícia. La producció catalana es concentra sobretot a la comarca del Maresme, amb una superfície cultivada de 400 hectàrees i una producció de 12.000 tones l'any 1995. La forta competència creada per la maduixa de Huelva ha provocat la potenciació del cultiu de varietats de fora de temporada a Catalunya (Irvine, Seascope) i de varietats més exquisides i apreciades pel consumidor (Pajaro). Espanya va exportar més de 180.000 tones de maduixes l'any 1995, amb un valor de 275 milions d'euros (Ministerio de Agricultura, 1997). Els principals receptors de la maduixa espanyola són els països de la Unió Europea, concretament Itàlia, França i Alemanya.

1.4.3. Aparell vegetatiu

La maduixera és una planta herbàcia perenne, amb la tija o corona que és molt curta i que sobresurt només 2-3 centímetres de la superfície del sòl. A partir de la corona neixen arrels adventícies, fulles amb pecíols llargs, flors agrupades en inflorescències i estolons que originen noves plantes. Les fulles tenen nervadura pinnada i es troben dividides en tres folíols. Algunes varietats tenen fulles amb

quatre o cinc pecíols, caràcter que sembla derivar de *Fragaria chiloensis*. El nombre d'estomes és molt elevat en comparació amb d'altres plantes (300-400 estomes per mm²). Això fa que perdin gran quantitat d'aigua per transpiració i que per tant, sigui necessari un control estricte del règim de reg.

Els estolons són brots llargs a partir dels quals neixen noves corones amb fulles. Si es deixen créixer lliurement tots els estolons s'obté una planta mare de la que en parteixen radialment les plantes filles, que si es deixen desenvolupar emeten noves arrels. Els estolons constitueixen el mètode més senzill per a la propagació de la planta i, al produir-se per via vegetativa, permeten conservar els caràcters de la planta mare.

Les flors estan agrupades en inflorescències, en realitat tiges modificades, formades normalment per un eix primari del qual en deriven altres eixos, cadascun amb una flor en el seu extrem. Les flors de la majoria de les maduixes cultivades són hermafrodites. Cada flor està constituïda per un calze de cinc sèpals de forma variable, una corol·la de cinc pètals blancs, i nombrosos estams i pistils. Els estams, localitzats a la perifèria del receptacle floral, es disposen generalment en tres verticils, normalment en un número múltiple de cinc. Els pistils, de forma variable, es troben inserits en el receptacle floral i disposats en espiral.

1.4.4. Desenvolupament del fruit

El fruit comestible de la maduixera és un fals fruit format pel receptacle, en la superfície del qual s'hi insereixen els aquenis o fruits vertaders, els quals estimulen hormonalment l'engruiximent del receptacle fins formar el fruit carnós. Aquests aquenis, que són durs i de color fosc, es formen per la fecundació de l'òvul de cada pistil, i poden ser superficials o semi-superficials. El seu nombre varia entre 20 i 500 depenent de la varietat i les condicions ambientals. L'absència d'aquenis per falta de pol·linització provoca modificacions en la forma típica dels fruits de cada varietat.

En el receptacle s'han descrit cinc zones tissulars (Szczesniak i Smith, 1969). L'epidermis està formada per una o dues capes de cèl·lules poligonals de paret gruixuda, lleugerament cerificada i amb tricomes llargs a l'exterior. La zona cortical consisteix en cèl·lules parenquimàtiques, mentre que la zona vascular comprèn els vasos conductors del xilema i del floema, i s'extén des del peduncle

fins els aquenis de la superfície, travessant la medul·la i la zona cortical. La medul·la és el cilindre central format per cèl·lules de paret fina, que sol obrir-se durant el creixement de la maduixa fins deixar una cavitat central buida (figura 1.6).

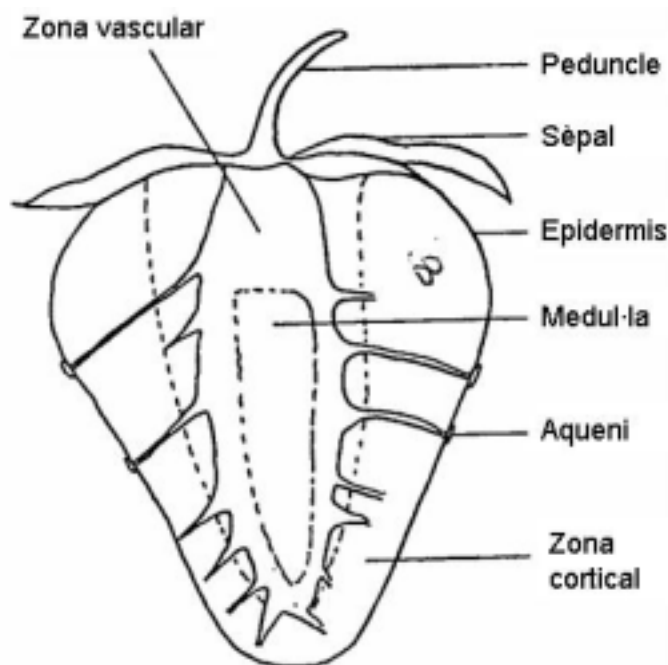


Figura 1.6: Representació esquemàtica de la secció longitudinal del fruit de maduixa. La línia discontinua entre la zona cortical i la zona vascular indica la divisió entre el color vermell i el blanc de la polpa. (Branzanti, 1989).

El desenvolupament de la maduixa és ràpid, doncs assoleix la mida final aproximadament 30 dies després de l'antesi (Perkins-Veazie, 1995). La cinètica de creixement segueix una corba sigmoïdal, que pot ser simple o doble, depenent de la varietat. En la fase inicial del creixement es produeix la divisió cel·lular, amb poc augment del pes sec, i que s'atura quinze dies després de l'antesi. En aquest punt les cèl·lules ja presenten una paret cel·lular densa. Posteriorment es produeix un increment ràpid del volum cel·lular durant deu dies. En la fase final comença el procés de maduració, durant el qual el fruit encara pot créixer (Cheng i Breen, 1992). La paret cel·lular es desestructura a partir del catorzè dia, procés que continua fins arribar als estadis finals de desenvolupament, en què els espais intercel·lulars queden obstruïts. La grandària de les cèl·lules, conjuntament amb les seves fines parets cel·lulars fan que aquest fruit sigui molt susceptible a agressions externes.

Les dimensions del fruit depenen de la varietat d'estudi i de la posició que ocupa aquest en la inflorescència (Moore *et al.*, 1970). S'ha descrit que hi ha un

increment en la divisió cel·lular de fins tres cops durant els set primers dies a partir de la pol·linització, mentre que tot el creixement posterior és degut a l'expansió cel·lular (Knee *et al.*, 1977). L'eliminació dels fruits primaris origina un increment de pes en els fruits secundaris, suggerint que es produeix una competència entre els fruits (Stutte i Darnell, 1987).

1.4.5. Composició bioquímica del fruit

1.4.5.1. Sucre

Els sucres són un dels principals compostos solubles dels fruits tous. A més de proporcionar l'energia necessària pels canvis metabòlics, tenen una gran importància en les propietats organolèptiques. En maduixa, la sacarosa, la glucosa i la fructosa constitueixen un 83% dels sucres totals, si bé també hi ha sorbitol, xilitol i xilosa (Wrolstad i Shallenberg, 1981). Durant la maduració el percentatge de sucres total augmenta en maduixa i, sembla que s'acumulen en l'apoplast de les cèl·lules, tot i que no es disposa de moltes dades al respecte (Woodward, 1972; Ofozu-Anim i Yamaki, 1994).

1.4.5.2. Àcids

Com en el cas dels sucres, els àcids orgànics són molt importants en el sabor, de forma que la relació sucres/àcids s'utilitza sovint com a índex d'acceptació per al consumidor, així com de la qualitat dels fruits. Els àcids també intervenen en la formació d'aromes i en les propietats gelificants de les pectines. A més, regulen el pH cel·lular i poden influir en l'aparició de pigments dins dels teixits. Hi ha pocs estudis fets que relacionin desenvolupament i maduració de la maduixa amb l'acumulació d'àcids, si bé s'ha vist que l'acidesa disminueix durant la maduració, i això és degut principalment al descens del contingut en àcid màlic (Reyes *et al.*, 1992).

1.4.5.3. Pigments

Durant la maduració del fruit de la maduixa s'ha descrit una destrucció de clorofil·les i cloroplasts, una disminució en el contingut en carotenoids i un augment molt important en la quantitat d'antocians (Gross, 1982). Els antocians són pigments

flavonoides derivats de la fenilalanina. El principal enzim implicat en la seva biosíntesi és la fenilalanina amoniliasa (PAL), enzim tetramèric àmpliament estudiat, que consta d'una única isoforma en maduixa i l'activitat de la qual augmenta durant la maduració degut a una síntesi *de novo* de l'enzim (Aoki *et al.*, 1970; Given *et al.*, 1988b).

1.4.5.4. Compostos fenòlics

Els fenols engloben un grup molt divers de substàncies, entre les quals es troben metabolits secundaris de plantes com els polifenols, protoantocianidines, ésters dels àcids hidrobenzoics i ésters dels àcids hidroxicinàmics. En fruits verds de maduixa els compostos fenòlics són abundants, i tot i que la seva concentració no varia durant la maduració, aquests compostos perden la seva astringència (Spayd i Morris, 1981).

1.4.5.5. Constituents aromàtics i sabor

La barreja de components aromàtics en maduixa és molt complexa, doncs s'han identificat més de 200 compostos diferents (Tressl *et al.*, 1969), tot i que només uns quants contribueixen significativament en l'aroma. Entre ells, destaquen els compostos sulfurats, els ésters volàtils, les furanones i els àcids grassos volàtils.

1.4.6. Regulació hormonal del desenvolupament i la maduració

Dins dels fruits no-climatèrics, la maduixa és el fruit més estudiat en relació a la regulació hormonal. La seva estructura única, amb els aquenis a l'exterior del fruit, l'ha feta un sistema molt útil per estudiar el paper d'aquests en el desenvolupament, ja que els aquenis poden eliminar-se de forma relativament senzilla i poc lesiva pel fruit.

1.4.6.1. Auxines

Els estudis fets per Nitsch (1950; 1955) van demostrar que l'expansió del receptacle de la maduixa està regulada pels aquenis. També van demostrar que l'aplicació d'auxines sintètiques de forma exògena podia restaurar el creixement de receptacles als quals se'ls havia eliminat els aquenis, i que els aquenis són una font

d'àcid 3-indolacètic (IAA). D'aquí va sorgir la idea de que en els aquenis es sintetitzen les auxines, i des d'allà s'exporten al receptacle. Nitsch (1950) també va demostrar que l'eliminació dels aquenis dels receptacles *in situ* retardava la maduració, si bé quan aquesta es produïa, la qualitat final del fruit no es veia alterada. Posteriorment, Mudge *et al.* (1981) van veure que la maduració es retardava en fruits partenocàrpics tractats amb àcid 1-naftalenacètic (NAA), i Given *et al.* (1988a) van aportar clares evidències del paper dels aquenis i les auxines en la maduració. En fruits desaquenitzats es produeix una pèrdua de fermesa, una inducció de la PAL i una disminució del contingut en clorofil·les. Aquests processos són reversibles mitjançant l'aplicació d'auxines exògenes. D'altra banda, s'ha descrit que l'expressió d'alguns gens induïts durant la maduració de la maduixa està regulada per les auxines (Manning, 1994; Medina-Escobar, 1997; Harpster, 1998; Trainotti *et al.*, 2001b). Aquests resultats, conjuntament amb l'absència d'un efecte clar de l'etilè, indiquen que les auxines són les principals hormones que regulen la maduració de la maduixa (Abeles i Takeda, 1990).

1.4.6.2. Giberelines, citoquinines i àcid abscísic

El paper principal que duen a terme les auxines no exclou la participació d'altres hormones en el procés de maduració del fruit. Així, s'ha vist que la giberelina GA₃ promou el creixement i la maduració de fruits crescuts *in vitro*, mentre que la citoquinina N⁶-benziladenina els inhibeix (Kano i Asahira, 1978).

L'àcid abscísic (ABA), igual que les citoquinines i les auxines, s'acumula principalment en els aquenis, però sense que els seus nivells augmentin substancialment durant la maduració. Kano i Asahira (1981) van demostrar que l'aplicació d'ABA exogen accelerava la maduració en receptacles cultivats *in vitro*. No obstant això, aquestes dades d'estudis amb reguladors de creixement en cultius *in vitro* han d'interpretar-se amb cautela, ja que els fruits tallats no arriben mai a assolir la mida total, i creixen molt més lentament que els fruits en la planta.

1.4.6.3. L'etilè

En la maduixa, tant la producció d'etilè com l'activitat del principal enzim implicat en la seva síntesi, l'ACC oxidasa (ACO), presenten un pic en l'estadi verd, descendint els seus nivells fins vint dies després de l'antesi, moment en el qual la

producció augmenta lleugerament (Perkins-Veazie *et al.*, 1995). Per tant, aquest fruit està classificada com a fruit no-climatèric, doncs produeix baixos nivells d'etilè i la seva maduració no està afectada per aplicacions exògenes d'aquesta hormona. Malgrat això, alguns estudis realitzats sobre la conservació de maduixes demostren que atmosferes riques en etilè afavoreixen la pèrdua de fermesa del fruit (Wills i Kim, 1995; Tian *et al.*, 2000). Per altra banda, també s'ha publicat que tractaments amb 10-100 ppm d'etilè induïen un augment de RNA total en maduixa (Luo i Liu, 1994). L'aplicació d'inhibidors de la síntesi d'etilè, o l'ús d'ACC, precursor immediat de la síntesi de l'etilè en la ruta biosintètica, han suggerit que el descens de la producció d'etilè durant els primers dies després de l'antesi és degut a una compartimentació de l'ACC o potser, a un descens de les activitats ACO o ACC sintasa (ACS), enzim que forma l'ACC a partir de S-adenosil metionina o SAM (Perkins-Veazie *et al.*, 1995).

1.5. La paret cel·lular de la maduixa

Tot i que un dels principals factors que determina la vida post-collita dels fruits és l'estovament, aquest aspecte ha estat poc estudiat en fruits tous. En la maduixa, la complexa relació entre la composició de carbohidrats, l'estructura cel·lular i les propietats físiques del teixit, així com el fet que el fruit continuï augmentant de volum cel·lular durant la maduració, han complicat encara més l'estudi de la paret cel·lular.

1.5.1. Components moleculars de la paret cel·lular de la maduixa

➤ **Pectines:** Gran part dels treballs realitzats fins ara sobre la composició de la paret cel·lular de la maduixa s'han centrat en les substàncies pèctiques. En aquest fruit, la majoria de les pectines està dèbilment unida a la paret cel·lular en tots els estadis de desenvolupament, a jutjar per la facilitat amb què es poden solubilitzar amb solucions que contenen agents quelants com l'EDTA o el CDTA (Woodward, 1972; Knee *et al.*, 1977). S'ha demostrat que la proporció de poliurònids que es solubilitza durant el procés de maduració augmenta des del 30% en fruits verds fins al 65% en fruits madurs (Huber, 1984 ; Koh i Melton, 2002), si bé la mida molecular mitja d'aquests no varia significativament. Durant la maduració del fruit també

augmenta la solubilització dels sucres neutres associats amb els poliurònids, principalment arabinosa, i en menor grau galactosa (Koh i Melton, 2002).

➤ **Hemicel·luloses:** La presència de xiloglucans en maduixa ha estat demostrada per Huber (1984) i Legentil *et al.* (1995). La xilosa apareix com el sucre neutre predominant en les parets cel·lulars de maduixa i altres fruits tous. En la maduració es produeix un increment dels residus de xilosa, manosa i glucosa en les fraccions solubles de paret (Knee *et al.*, 1977), suggerint-se que els polisacàrids hemicel·lulòsics podrien ser o bé degradats, o bé alliberats de les unions amb altres polímers. Tot i que sí que s'ha descrit una disminució de la grandària molecular mitja de les hemicel·luloses durant la maduració, no s'han vist diferències en les proporcions dels diferents monosacàrids que componen la fracció hemicel·lulòsica (Huber, 1984).

➤ **Cel·lulosa:** En maduixa s'ha observat una reducció del 11% en pes sec del contingut en cel·lulosa al passar de l'estadi M1 a l'estadi M4 (Koh i Melton, 2002), i assaigs citoquímics han mostrat la presència de fibril·les de cel·lulosa desorganitzades en la paret cel·lular de fruits madurs (Trainotti *et al.*, 1999b).

1.5.2. Degradació de la paret cel·lular en la maduixa

El paper que tenen els enzims implicats en la degradació de la paret cel·lular durant el procés de maduració de la maduixa està poc caracteritzat. Gizis (1964) i Al-Jamali (1972) van descriure la presència d'endo-PG en maduixa, tot i que aquest resultat ha estat rebutjat per altres autors (Neal, 1965; Barnes i Patchett, 1976; Abeles i Takeda, 1990). Aquestes diferències podrien ser degudes al mètode d'assaig utilitzat. També s'ha detectat la presència de tres isoformes d'exo-PG (Nogata *et al.*, 1993). Aquestes exo-PG s'han detectat en fruits verds, i es mantenen constants i en baixos nivells durant tota la maduració.

L'enzim PME està present en els fruits de maduixa, i s'ha vist que la seva activitat es duplica al passar de l'estadi verd al madur, tot i que després disminueix de nou (Gizis, 1964; Neal, 1965; Barnes i Patchett, 1976; Archer, 1979). Un increment de la metilació de les pectines en els últims estadis de la maduració dels fruits podria reduir el nombre de ponts de calci entre els polímers de pectina, el qual

resultaria en una major porositat de la paret cel·lular, augmentant la susceptibilitat a l'acció enzimàtica.

Altres enzims trobats en maduixa són la pectat liasa (Medina-Escobar *et al.*, 1997; Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002), l'expansina (Civello *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2001) i la β -galactosidasa (Trainotti *et al.*, 2001b). Anàlisis realitzades per Northern-blot mostren una clara correlació entre la pectat liasa, i la maduració del fruit. Medina-Escobar *et al.* (1997) han postulat que aquesta pectat liasa, conjuntament amb d'altres enzims pectinolítics serien els responsables de la degradació de la làmina mitja i de la paret cel·lular que es produeix durant la maduració. Experiments realitzats recentment amb plantes transgèniques antisentit per la PEL en maduixa, han demostrat que la reducció de l'expressió d'aquest gen es tradueix en una lleugera reducció en l'estovament del fruit. Això suggereix un paper de la PEL en el procés d'estovament associat a la maduració de la maduixa (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002).

En el fruit de la maduixa s'han descrit fins a sis gens que codifiquen per expansines (Harrison *et al.*, 2001), tot i que la seva funció està poc clarificada. Només dues d'elles augmenten d'expressió durant la maduració, i probablement estan implicades en el creixement del fruit, que continua durant tot el seu desenvolupament. A diferència dels altres enzims de paret trobats en maduixa, una d'aquestes expansines no mostra cap resposta a l'eliminació dels aqüenis i/o l'addició d'auxines sintètiques (Civello *et al.*, 1999).

Un altre enzim que podria tenir una acció important en l'estovament de la maduixa és l'endo- β -(1,4)-glucanasa, tot i que encara es desconeix la seva funció *in vivo*. Aquest enzim s'ha detectat mitjançant un sensible assaig d'activitat viscosimètric (Barnes i Patchett, 1976), i s'ha observat un augment de sis cops en l'activitat cel·lulasa entre l'estadi verd i el madur (Abeles i Takeda, 1990). Degut a la importància d'aquest enzim en el present treball, es descriurà més àmpliament en el següent apartat (1.5.3).

1.5.3. Les endo- β -(1,4)-glucanases Cel1 i Cel2 de maduixa

Fins ara s'han aïllat dos clons de cDNA que codifiquen per EGases en maduixa: *Cel1* (AF051346), EGasa de Tipus 1 (Llop-Tous, 1997; Harpster *et al.*,

1998; Llop-Tous *et al.*, 1999; Trainotti *et al.*, 1999a i 1999b; Woolley *et al.*, 2001) i *Cel2* (AF54615), EGasa de Tipus 3 (Llop-Tous, 1997; Llop-Tous *et al.*, 1999; Trainotti *et al.*, 1999a i 1999b). Aquests dos clons foren obtinguts en el nostre laboratori per cribratge d'un banc de cDNA de fruit madur, emprant una sonda realitzada a partir d'un fragment de DNA obtingut per RT-PCR i usant oligonucleòtids degenerats com a encebadors (Llop-Tous, 1997; Llop-Tous *et al.*, 1999).

L'EGasa codificada per *Cel1* mostra un elevat grau d'homologia amb altres EGases descrites en plantes, especialment amb *LeCel2* de tomàquet (Lashbrook *et al.*, 1994), amb qui mostra un 78% d'homologia. Per contra, *Cel2* exhibeix només un 48% d'homologia respecte *LeCel2* i un 46% respecte *Cel1* de maduixa. L'anàlisi filogenètic de les diferents EGases de plantes mostra que *Cel2* forma part d'una branca clarament divergent de la resta. *Cel1* en canvi, està filogenèticament relacionada amb altres EGases implicades principalment en maduració de fruits, elongació cel·lular i abscisió (figura 1.4).

El pes molecular predit per la proteïna madura *Cel1* és de 51'5 kD, i per *Cel2* de 65'2 kD, amb uns punts isoelèctrics (pI) teòrics de 9 i 9'15 respectivament. Ambdues proteïnes presenten un pèptid senyal que els permet seguir la via de secreció extracel·lular a través del reticle endoplasmàtic/aparell de Golgi, però mentre que en *Cel1* aquest és de 24 aminoàcids, en *Cel2* és de 32 aminoàcids. Totes dues proteïnes presenten el motiu N-X-S/T, que constitueix una seqüència consens de senyal per la N-glicosilació (Smith *et al.*, 1985). A més, la presència de diferents residus de cisteïna en posicions no alineades entre els dos clons fa pensar que aquestes proteïnes un cop processades presentaran estructures secundàries i terciàries diferents. Una diferència remarcable és la presència d'un suposat domini d'unió a cel·lulosa (CBD) de 130 aminoàcids a la regió C-terminal de la proteïna *Cel2* (Trainotti *et al.*, 1999a). Aquest CBD, que es pot trobar en alguns enzims cel·lulolítics de plantes i bacteris, només presenta tres residus de triptòfan conservats enlloc dels quatre que sol haver-hi. Fins ara només s'han trobat dominis CBD en EGases de cotó i *Arabidopsis* dins de les plantes superiors. El fet que *Cel2* contingui un CBD suggereix que aquesta peculiar EGasa podria ser activa contra els xiloglucans que envolten les microfibril·les de cel·lulosa, causant una debilitació de l'estructura de la paret per distensió de les microfibril·les.

2. OBJECTIUS

La maduració és una de les etapes més estudiades de la vida del fruit, tant a nivell fisiològic, com bioquímic i molecular, degut a què aquest és el període on es determina la qualitat final del fruit i la seva disponibilitat per a ser comercialitzat. Una de les modificacions més importants que afecten als fruits durant aquest període de maduració és el canvi de textura, que en el cas dels fruits carnosos es reflecteix en un augment de l'estovament dels teixits parenquimàtics, amb una conseqüent pèrdua de la fermesa del fruit. Aquest estovament es produeix bàsicament per canvis en els polímers que formen la paret cel·lular.

Dins dels fruits carnosos, la maduixa és un fruit que presenta una gran problemàtica, ja que s'estova ràpidament i és molt susceptible a la contaminació per patògens. La majoria de treballs realitzats fins ara sobre la degradació de la paret cel·lular de la maduixa durant la maduració s'han centrat en les substàncies pèctiques, ja que s'ha demostrat que la proporció de poliurònids que es solubilitza durant aquest procés augmenta significativament. No obstant això, també s'ha descrit un increment dels residus de xilosa, manosa i glucosa en les fraccions solubles de paret, suggerint-se que altres polisacàrids, com per exemple els polisacàrids hemicel·lulòsics i cel·lulòsics, podrien ser també modificats durant el procés de maduració. D'altra banda, s'ha demostrat una disminució de la grandària molecular mitja de les hemicel·luloses i una reducció del contingut en cel·lulosa al madurar. Això suggereix un efecte important dels enzims que modifiquen aquestes fraccions de la paret cel·lular, entre els quals s'inclouen les endo- β -(1,4)-glucanases.

En experiments previs realitzats al nostre laboratori s'havien clonat dos cDNAs de maduixa, *Cel1* i *Cel2*, corresponents a dues endo- β -(1,4)-glucanases. Donat que les endo- β -(1,4)-glucanases podrien tenir un paper important en la pèrdua de textura associada a la maduració, i que la maduixa és el fruit model per l'estudi de la maduració en fruits no-climatèrics, ens vam plantejar l'objectiu general de caracteritzar la funció biològica de les dues proteïnes derivades de *Cel1* i *Cel2*. Amb aquesta finalitat ens vam proposar els següents objectius particulars:

- 1.- Estudiar l'expressió de les dues endo- β -(1,4)-glucanases (*Cel1* i *Cel2*) durant la maduració del fruit de la maduixa, així com en diferents teixits vegetatius de la planta.
- 2.- Obtenció de l'antisèrum policlonal contra les dues endo- β -(1,4)-glucanases per caracteritzar l'acumulació de les proteïnes *Cel1* i *Cel2* durant el procés de maduració. Caracterització del punt isoelèctric i de la presència de residus glicosilats en les proteïnes *Cel1* i *Cel2* mitjançant gels de dues dimensions i assaigs de glicosilació.
- 3.- Estudiar la regulació hormonal per auxines i etilè de l'acumulació dels transcrits *Cel1* i *Cel2*, i les respectives proteïnes, durant el desenvolupament i la maduració del fruit.
- 4.- Caracterització de l'activitat endoglucanasa associada a *Cel1* i *Cel2* en fruit de maduixa mitjançant gels d'activitat.
- 5.- Sobreexpressió de les dues endo- β -(1,4)-glucanases *Cel1* i *Cel2* de maduixa en *Pichia pastoris* per obtenir abundant proteïna nadiua i caracteritzar-les bioquímicament.
- 6.- Obtenir plantes transgèniques de maduixera amb expressió reduïda del mRNA corresponent a *Cel1* i/o *Cel2* i analitzar-les fenotípicament, amb l'objectiu de determinar si aquestes dues endo- β -(1,4)-glucanases participen en la degradació de la paret cel·lular associada a la maduració de la maduixa.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Tampons i solucions generals

A continuació es descriuen els tampons i solucions emprats rutinàriament per la realització d'aquest treball. Alguns medis i solucions es van esterilitzar mitjançant un cicle d'autoclau (20 minuts, 120°C), mentre que altres foren esterilitzats per filtració, usant membranes de 0'22 µm de diàmetre de porus.

- *Fenol:cloroform:isoamílic* (25:24:1, v:v:v): Mesclar un volum de fenol equilibrat amb TE (fenol/TE) per cada volum de cloroform:alcohol isoamílic (24:1, v:v). Emmagatzemar a 4°C en la foscor.

- *Fenol/TE*: liquar el fenol a 68°C, afegir un volum de TE pH 7'4, remenar i deixar equilibrar 10-20 minuts. Eliminar la fase aquosa superior (TE) i substituir-la per un volum del mateix tampó. Repetir el procés fins que el pH de la fase superior s'estabilitza en 7'4. Afegir 0'1% (p:v) de 8-hidroxiquinoleïna i emmagatzemar a 4°C en la foscor.

- *Fenol/Tris-HCl* pH 8: liquar el fenol a 68°C, afegir un volum de Tris-HCl 1 M pH 8, remenar i deixar equilibrar 10-20 minuts. Eliminar la fase aquosa superior (Tris-HCl) i substituir-la per un volum del mateix tampó. Repetir el procés fins que el pH de la fase superior s'estabilitza en 8. Afegir 0'1% (p:v) de 8-hidroxiquinoleïna i emmagatzemar a 4°C en la foscor.

- *Tampó TAE 50X* (autoclau): Àcid acètic 5'7% (v:v)
Tris-HCl 2 M
EDTA 100 mM

- *TC 1X* (proteïnes): Tris-HCl 62'5 mM, pH 6'8
Glicerol 10% (v:v)
SDS 2% (p:v)
Blau de bromofenol 0'05% (p:v)
2-β-mercaptoetanol 5% (v:v)

- *Tampó fosfat potàssic 1M* (filtrar): Preparar dues solucions 1 M de KH_2PO_4 i K_2HPO_4 , i barrejar fins obtenir el pH desitjat.

- *Tampó fosfat sòdic 1M* (autoclau/ no autoclau): Preparar dues solucions 1 M de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ i $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, i barrejar fins obtenir el pH desitjat.

- *Tampó de lisi* (gels bidimensionals): Urea 9'5 M
Nonidet P-40 2% (v:v)
Amfolines 3% (v:v)
DTT 100 mM

- *Tampó TE pH 7'4* (DNA i RNA): Tris-HCl 10 mM
EDTA 1 mM.

- *Tampó TE pH 7'4* (proteïnes): Tris-HCl 50 mM
EDTA 1 mM.

3.2. Medis de cultiu

- Medi BMGY/BMMY:
Extracte de llevat, 1% (p:v)
Peptona, 2% (p:v)
Tampó fosfat potàssic pH 6, 100 mM
Yeast Nitrogen Base (YNB) 1'34% (p:v)
Biotina $4 \cdot 10^{-5}$ % (p:v)
{ Glicerol 2% (p:v) (BMGY) o,
metanol 0'5% (v:v) (BMMY)

Autoclavar aigua amb l'extracte de llevat i la peptona i després afegir els altres components, prèviament esterilitzats per filtració, i a partir dels estocs següents; YNB 10X, biotina 500X, metanol 10X i glicerol 10X.

- Medi LB pH 7'5 (autoclau): NaCl 1% (p:v)
 Extracte de llevat 0'5% (p:v)
 Bacto-triptona 1% (p:v)
 En medis LB sòlids afegir 1'5% d'agar (p:v).

- Medi MD: YNB 1'34% (p:v)
 Biotina $4 \cdot 10^{-5}$ % (p:v)
 Glucosa 2% (p:v)

Autoclavar aigua sola i després afegir aquests components, prèviament esterilitzats per filtració, i a partir dels estocs següents; YNB 10X, biotina 500X i glucosa 40X. En medis MD sòlids afegir 1'5% d'agar (p:v).

- Medi MM: YNB 1'34% (p:v)
 Biotina $4 \cdot 10^{-5}$ % (p:v)
 Metanol 0'5% (v:v)

Autoclavar aigua sola i afegir aquests components prèviament esterilitzats per filtració, i a partir dels estocs següents; YNB 10X, biotina 500X i metanol 10X. En medis MM sòlids afegir 1'5% d'agar (p:v).

- Medi SOB pH 7 (autoclau): NaCl 10 mM
 Extracte de llevat 0'5 % (p:v)
 Bacto-triptona 2% (p:v)
 KCl 2'5 mM
 MgSO₄ 5 mM } Afegir després d'autoclavar, a partir d'un
 estoc 1 M esterilitzat per filtració.

- Medi SOC pH 7 (autoclau): NaCl 10 mM
 Extracte de llevat 0'5 % (p:v)
 Bacto-triptona 2% (p:v)
 KCl 2'5 mM
 MgSO₄ 10 mM } Afegir després d'autoclavar, a partir d'un
 Glucosa, 20 mM } estoc 1 M esterilitzat per filtració.

- Medi YPD pH 5'8 (autoclau): Extracte de llevat 1 % (p:v)
 Peptona 2% (p:v)

Afegir glucosa a una concentració final del 2% (p:v) a partir d'una solució de glucosa estoc al 40%, esterilitzada prèviament per filtració. En medis YPD sòlids afegir 2% d'agar (p:v).

3.3. Antibiótics i inhibidors de proteases

Els antibiòtics utilitzats en aquest treball es prepararen en solucions estoc concentrades, que s'esterilitzaren per filtració i s'emmagatzemaren en alíquotes a -20°C.

- **Ampicil·lina** (amp), preparada a una concentració de 50 mg/ml en aigua, es va utilitzar a una concentració final de 100 µg/ml.
- **Kanamicina** (kan), preparada a una concentració de 25 mg/ml en aigua, es va utilitzar a una concentració final de 50 µg/ml.
- **Rifampicina** (rif), preparada a una concentració de 50 mg/ml en aigua, es va utilitzar a una concentració final de 50 µg/ml.

Els inhibidors de proteases emprats en aquest treball són els següents: aprotinina, leupeptina, pepstatina i PMSF (taula 3.1).

Taula 3.1: Inhibidors de proteases utilitzats en aquest treball, amb les concentracions utilitzades de la solució estoc i de la solució de treball.

Nom	Concentració estoc	Medi de dissolució	Concentració de treball
Aprotinina	10 mg/ml	Aigua	10 µg/ml
Leupeptina	10 mg/ml	Aigua	20 µg/ml
Pepstatina	1 mg/ml	DMSO o metanol	40 µg/ml
PMSF	17'42 mg/ml	Etanol o isopropanol	174'2 µg/ml

3.4. Material vegetal

3.4.1. Plantes de maduixa

S'han utilitzat maduixes (*Fragaria x ananassa*, Duch.) de dues varietats diferents, Pajaro i Calypso (ambdues dicotiledònies i octaploides). Per als experiments realitzats al Plant Research International (PRI, Wageningen, The

Netherlands) amb plantes de maduixa transgèniques, s'han utilitzat plantes de la varietat Calypso degut a la seva elevada eficiència de transformació i freqüència de regeneració. En aquest cas, les plantes foren cultivades en els hivernacles de la finca experimental del mateix institut de recerca. Per a la resta d'estudis, realitzats a l'IBMB de Barcelona, s'ha utilitzat la varietat Pajaro, cultivada en finques particulars de la comarca del Maresme (Barcelona).

En l'època de producció de fruits es va seleccionar el material vegetal i es va traslladar al laboratori, on arribà abans de les tres hores posteriors a la seva recol·lecció.

3.4.2. Manipulació de les mostres

S'escolliren fruits en perfecte estat, sense indicis d'atac per fongs ni macadures. Es determinà l'estadi de maduració en funció del grau de pigmentació de la superfície del fruit. Els estadis utilitzats foren: M0, fruit verd; M1, fruit blanc; M2, fruit amb menys de la meitat de la superfície vermella; M3, fruit amb més de la meitat de la superfície vermella i M4, fruit completament vermell (figura 3.1).

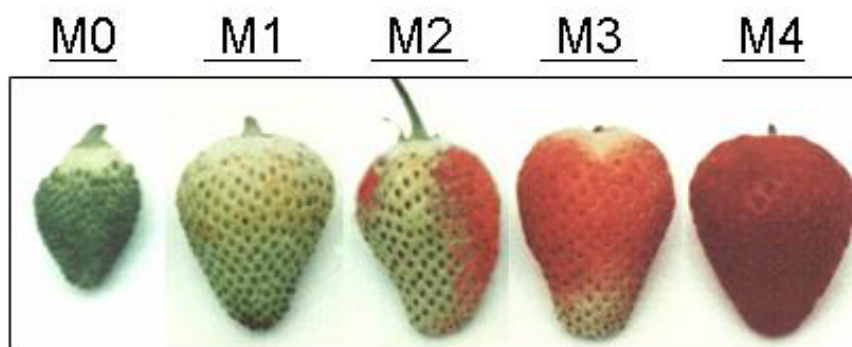


Figura 3.1: Fruits de maduixa corresponents als diferents estadis de maduració utilitzats per aquesta memòria.

Un cop les maduixes arribaren al laboratori s'eliminaren els aquenis i la part central fibrosa del fruit, i posteriorment es congelaren en nitrogen líquid. El material congelat fou mantingut a -80°C fins el moment del seu processament. Els altres teixits de la planta emprats, arrel, estoló, meristem apical, flor, fulla jove i fulla vella,

foren recol·lectats i congelats immediatament en nitrogen líquid, i conservats a -80°C fins la seva utilització.

3.4.3. Tractament amb auxines

Amb l'objectiu de determinar si els gens estudiats estan sota control de les auxines, es va procedir de la següent manera:

Procediment:

1.- Retirada dels aquenis de 80 fruits en la mateixa planta mare, cultivada en hivernacle, mitjançant la punta d'un bisturí i evitant al màxim el provocar danys al fruit.

2.- Aplicar la pasta de lanolina amb un pinzell i a temperatura ambient. A 40 fruits s'aplicà la solució de lanolina amb 2 mM d'àcid naftalenacètic (NAA, fruits tractats), mentre que als altres 40 fruits se'ls aplicà la solució sense NAA (fruits desaquenitzats no tractats). 40 fruits no desaquenitzats s'usaren com a controls.

3.- Recol·lectar els fruits a les 0, 24, 48, 72 i 96 hores després de l'inici del tractament. Congelar en nitrogen líquid i conservar a -80°C fins la seva utilització.

Tampons i solucions:

- *Lanolina* 50% (p:v), en aigua, + Tween 20 0'01% (v:v), ± NAA 2 mM. Escalfar a 65°C en agitació constant per dissoldre bé la lanolina.

- NAA 2 mM, en DMSO 2% (p:v).

3.4.4. Tractament amb etilè

L'efecte de l'etilè sobre els gens *Cel1* i *Cel2* es va analitzar a partir de maduixes recol·lectades en estadi M0 i M4 i tractades amb 100 ppm d'etilè (v:v), durant 48 hores a 20°C. També es disposava de maduixes control, ventilades amb aire. Per fer això es va utilitzar un sistema de canalització de fluxes (Pratt i Goeschl, 1969), que permet fer circular l'atmosfera desitjada per l'interior de recipients tancats, que contenen les maduixes. S'utilitzaren 10 fruits per a cada tractament i estadi. La mescla original d'etilè 10% (v:v, en aire) fou proporcionada per Carbuross Metálicos, S.A. Després del tractament, les mostres es congelaren en nitrogen líquid i es van conservar a -80°C fins la seva utilització.

Tampons i solucions:

- *Etilè* 10% (v:v) en aire.

3.5. Soques bacterianes, llevats i vectors

3.5.1. Soques bacterianes i llevats

Les principals soques bacterianes emprades en la realització d'aquest treball foren XL1-Blue, DH5 α , JM109 i BL21, d'*Escherichia coli*, i Ag10, d'*Agrobacterium tumefaciens*.

- **XL1-Blue:** *supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi, relA1, lac^c*, F' [*proAB⁺ lacI^f lacZ Δ M15 Tn10(*tet*)*]. Soca utilitzada per a la propagació de fags recombinants λ ZAPII, que són inestables en altres soques. La conjugació F' permet el cribratge de colònies per color blanc/blau en X-gal, i permet la infecció del virus bacteriòfag M13.

- **DH5 α :** *supE44, DlacU169, (ϕ 80*lacZ*M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1*. Soca supressora, deficient en la capacitat de recombinació, utilitzada en diferents subclonatsges i transformacions.

- **JM109:** *recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, thi, Δ (*lac-proAB*), relA1*, F' [*traD36 proAB⁺ lacI^f lacZ Δ M15*]. Soca deficient en la capacitat de recombinació, i amb alta eficiència de transformació, utilitzada en transformacions amb construccions de gran format.

- **BL21(DE3)pLysS** (Novagen): F⁻, *ompT, hsdS_B(r_B⁻m_B⁻), gal, dcm*, (DE3), pLysS. Soca utilitzada per a la sobreexpressió de les proteïnes Cel1 i Cel2 en bacteris. Aquesta soca és lisogènica per λ DE3, és a dir, porta incorporat el gen per la T7 RNA polimerasa sota el control del promotor *lacUV5*, i per tant és útil per a l'expressió de proteïnes sota el control del promotor T7. La presència del plasmidi pLysS, compatible amb els vectors pET28 i que produeix lizozima de forma basal, redueix l'expressió no induïda de la proteïna recombinant, reduint així la quantitat de proteïna sintetitzada de forma basal en casos de toxicitat.

- **Ag10:** *auxA⁻, auxB⁻, cyf, lacZ α* . Soca d'*Agrobacterium tumefaciens* utilitzada per a la transformació de maduixa i la producció de plantes transgèniques.

- Les anàlisis de l'activitat associada a Cel1 es realitzaren en llevat, utilitzant la soca **GS115** de *Pichia pastoris* (Invitrogen), que presenta el genotip *his4* i el fenotip Mut⁺. Aquesta soca es pot transformar amb gens que codifiquen les proteïnes desitjades. Els gens, que poden ser clonats en diferents plasmidis, són incorporats al genoma de *Pichia* per recombinació homòloga.

3.5.2. Vectors

Els principals vectors usats foren:

- **pBluescript II/SK (-)**, s'utilitzà en subclonatges i transformacions vàries (Stratagene).

- **pET28_{a,b,c}** (Novagen), que s'utilitzaren per a la sobreexpressió de Cel1 i Cel2 en bacteris, i posterior obtenció d'anticossos.

- **pPic9** (*Pichia pastoris*) emprat per a la sobreexpressió de Cel1 i Cel2 en llevat (Invitrogen).

- **pBINPLUS** (Stratagene), utilitzat per a la transformació de plantes de maduixa.

3.6. Metodologia general

Per al clonatge de *Cel1* i *Cel2* en els diferents plasmidis s'han utilitzat diversos enzims de restricció de DNA i lligases (Promega, Boehringer-Manheim, NewEngland Biolabs, etc.), seguint el protocol general descrit per Sambrook *et al.* (1989) i Ausubel *et al.* (1994), i les condicions aconsellades pel fabricant en cada cas. Els fragments de DNA s'han separat en gels d'agarosa/TAE (Sambrook *et al.*, 1989), amb agarosa 1% (p:v) i bromur d'etidi 0'05% (p:v), en TAE 1X. El DNA separat en aquests gels s'ha purificat seguint diferents mètodes, segons la mida del fragment de DNA a purificar, i el rendiment i la puresa final del DNA necessària.

3.6.1. Purificació de fragments de DNA a partir de gels d'agarosa/TAE

Els fragments de DNA resultats en gels d'agarosa/TAE s'han purificat principalment mitjançant dos kits comercials, *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* (Amersham/Pharmacia) i *Qiaquick Gel Extraction kit* (Qiagen). A partir dels fragments de DNA tallats amb bisturí dels gels d'agarosa i purificats seguint les instruccions del fabricant, s'ha obtingut un DNA que s'ha netejat d'impureses i sals amb una extracció amb fenol:cloroform:isoamílic de la forma següent:

Procediment:

- 1.- Mesclar el DNA purificat amb un volum de fenol:cloroform:isoamílic (25:24:1). Vortejar i centrifugar 5' (minuts) a 14.000 rpm i temperatura ambient (RT).
- 2.- Precipitar la fase aquosa superior amb 0'1 volums d'acetat sòdic 3 M pH 5'2, i 2'5 volums d'etanol 100%. Centrifugar 15' a RT i 14.000 rpm.
- 3.- Eliminar el sobrenedant (SBNT) i rentar el precipitat amb etanol 70%. Centrifugar 5' a RT i 14.000 rpm.
- 4.- Assecar el precipitat a RT i resuspendre'l en un volum adequat d'aigua o tampó TE.

3.6.2. Quantificació de DNA i RNA

La quantitat de DNA o de RNA present en una mostra es va mesurar a l'espectrofotòmetre, llegint la densitat òptica a una λ de 260 nm. Un valor de densitat òptica de 1 a 260 nm, es correspon aproximadament a 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA bicatenari, 40 $\mu\text{g/ml}$ de RNA i 30 $\mu\text{g/ml}$ de DNA monocatenari. La puresa de les mostres d'àcids nucleics es va determinar calculant les relacions entre les absorbàncies a 260 nm, 280 nm i 230 nm. La relació entre l'absorbància a 260 i 280 nm indica la presència de proteïnes si dóna per fora del rang 1'7-2'0. La relació entre l'absorbància a 260 i 230 nm proporciona informació sobre la presència de polifenols a la mostra.

En els casos on va ser necessari concentrar la mostra de DNA o RNA es va optar per una precipitació amb 0'1 volums d'acetat sòdic 3 M pH 5'2 i 2'5 volums d'etanol 100%, si la mostra no estava prou neta. Després d'incubar 30' a -20°C , les mostres es van centrifugar a 14.000 rpm, RT durant 10', i es van resuspendre en un volum d'aigua o TE inferior a l'inicial. En canvi, quan la mostra estava suficientment

lliure de sals i el volum no era gaire gran, es va optar per una concentració per liofilització, per evitar pèrdua de mostra.

3.6.3. Transformació de cèl·lules d'*Escherichia coli* competents

La transformació de cèl·lules d'*Escherichia coli* es va fer per shock tèrmic, a partir de cèl·lules competents prèviament preparades seguint el mètode general descrit per Ausubel *et al.* (1994).

Procediment (transformació):

- 1.- Descongelar una alíquota de cèl·lules competents en gel.
- 2.- Afegir 10-100 ng de DNA plasmídic i agitar suaument.
- 3.- Incubar 30' en gel per facilitar l'accés del DNA plasmídic a prop de la coberta bacteriana.
- 4.- Incubar 90'' a 42°C. El DNA plasmídic s'incorpora a les cèl·lules.
- 5.- Incubar 2-10' en gel, segons la mida del plasmidi.
- 6.- Afegir 800 µl de LB i incubar 1 hora a 37°C en agitació intensa.
- 7.- Plaquejar el medi en plaques LB amb l'antibiòtic adequat segons la resistència conferida pel plasmidi.
- 8.- Incubar a 37°C o/n.

3.6.4. Preparació de DNA plasmídic

Per l'aïllament i purificació rutinaris dels plasmidis vam seguir un mètode de lisi alcalina de les cèl·lules bacterianes (Birnboim i Doly, 1979). Segons si la quantitat de DNA plasmídic requerida era petita o gran, s'utilitzava el mètode de les mini-preparacions (Sambrook *et al.*, 1989) o el mètode comercial de Qiagen®.

Quan es necessitava DNA plasmídic a gran escala s'utilitzà el mètode de Qiagen®, que combina la lisi alcalina amb una purificació mitjançant columnes de bescanvi iònic. El DNA obtingut per aquest mètode és de gran puresa i pot ser utilitzat en tot tipus de reaccions enzimàtiques. Normalment s'han realitzat preparacions de DNA plasmídic mitjançant Qiagen® a partir de 250 ml de cultiu en medi LB, crescut tota la nit (o/n) a 37°C, i seguint el protocol comercial. Per a realitzar mini-preparacions es parteix normalment de 3 ml de cultiu i es segueix el protocol descrit per Sambrook *et al.* (1989).

3.6.5. Seqüenciació de DNA

Es va utilitzar el seqüenciador *Automated Laser Fluorescent* (A.L.F.) de Pharmacia, present al Servei de Seqüenciació de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB). Aquest sistema, que està basat en un mètode enzimàtic, utilitza oligonucleòtids fluorescents i integra electroforesi, lectura i tractament informàtic, permetent el processat automàtic de les mostres. Per a les reaccions de seqüència es va fer servir DNA d'alta puresa, i com a encebadors es van utilitzar oligonucleòtids comercials (T7 o SP6) complementaris a les seqüències adjacents de cadascun dels extrems del lloc de clonatge, així com també oligonucleòtids dissenyats per nosaltres, i que pertanyien al DNA d'estudi. Els oligonucleòtids, un cop dissenyats, es sintetitzaven en empreses especialitzades.

3.6.6. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacció en cadena de la polimerasa (Mullis *et al.*, 1986) permet amplificar enzimàticament un fragment de DNA. La seva base teòrica és relativament simple i es troba àmpliament descrita en els manuals de biologia molecular (Sambrook *et al.* 1989; Ausubel *et al.* 1994). En aquest treball vam usar la tècnica de PCR per a clonar *Cel1* i *Cel2* en el vector pPic9 de llevat, així com per obtenir fragments de DNA per fer les sondes radioactives. També es va utilitzar per fer una quantificació del RNA missatger de *Cel1* i *Cel2* en les plantes transgèniques, mitjançant la tècnica de Real Time Quantitative PCR, que es descriurà més extensament en l'apartat 3.7.3. Per al clonatge de *Cel1* i *Cel2* en el vector pPic9 es va usar l'enzim Taq Polimerasa High Fidelity (Promega) per tal de minimitzar els errors produïts durant el procés d'amplificació:

Procediment:

- 1.- Diluir 50 ng de DNA en 30 µl d'aigua.
- 2.- Desnaturalitzar el DNA 5' a 95°C i posar immediatament en gel.
- 3.- Afegir una mescla amb:
 - 1 µl dNTP 10 mM
 - 1 µl oligonucleòtid A
 - 1 µl oligonucleòtid B
 - 4 µl tampó Taq polimerasa 10X
 - 2'5 µl MgCl₂ 25 mM
 - 0'5 µl Taq polimerasa

4.- Procedir amb el següent programa de PCR:

1 cicle de: 95°C/3', 55°C/30'', 72°C/3'

10 cicles de: 95°C/30'', 55°C/30'', 72°C/3'

20 cicles de: 95°C/30'', 55°C/30'', 72°C/3', augmentant el temps d'extensió en 5'' cada cicle.

1 cicle de: 95°C/30'', 55°C/30'', 72°C/7'

Per a l'obtenció de DNA per fer sonda, es va utilitzar la Taq Polimerasa DNA (GibcoBRL), i el següent protocol:

Procediment:

1.- Diluir 50 ng de DNA en 20'2 µl d'aigua.

2.- Afegir una mescla amb:

- 1 µl dNTP 10 mM
- 1 µl oligonucleòtid A
- 1 µl oligonucleòtid B
- 3 µl tampó Taq polimerasa 10X
- 2'5 µl MgCl₂ 25 mM

3.- Desnaturalitzar el DNA 1' a 94°C.

4.- Afegir 0'3 µl Taq polimerasa.

5.- Procedir amb el següent programa de PCR:

30 cicles de: 95°C/1', 54°C/30'', 72°C/1'

2 cicles de: 95°C/1', 54°C/30'', 72°C/7'

3.7. Obtenció i anàlisi de RNA

3.7.1. Extracció de RNA total

El mètode d'aïllament de RNA total emprat depengué del volum de mostres a analitzar. Inicialment s'utilitzà un mètode basat en un protocol d'extracció de RNA de plàtan descrit prèviament al nostre laboratori (Domínguez-Puigjaner, 1995), i en el qual es realitza l'extracció segons el mètode descrit per Varadarajan i Prakash (1991), seguit d'una purificació en columnes Qiagen®. Posteriorment, degut a l'elevat volum de mostres a analitzar per les plantes transgèniques, es va desenvolupar un altre mètode conjuntament amb el PRI. Aquest mètode era molt ràpid però tenia un rendiment menor que el protocol anterior, i estava basat en l'ús

de CTAB i 2- β -mercaptoetanol. En els dos mètodes el pas més limitant és la quantitat de teixit de partida, ja que quantitats de teixit fresc massa elevades disminueixen dràsticament el rendiment de DNA, inclòs si augmentem els volums dels tampons utilitzats durant l'extracció. La quantificació de RNA es va fer segons es descriu a l'apartat 3.6.2.

3.7.1.1. Extracció de RNA total segons el protocol descrit per Domínguez-Puigjaner (1995)

Procediment:

Homogeneització:

- 1.- Homogeneitzar 1 gram de teixit en un morter en presència de nitrogen líquid.
- 2.- Transferir tota la pols obtinguda a un tub Corex 30 que conté 10 ml de tampó IB (*Isolation Buffer*) fred. Agitar i afegir ràpidament 1 ml de SDS 20% (p:v) i 140 μ l de 2- β -mercaptoetanol. Agitar de nou.
- 3.- Incubar en un bany a 65°C durant 15'.

Eliminació de proteïnes i polisacàrids:

- 4.- Afegir 3'3 ml d'acetat potàssic 5M i agitar de nou.
- 5.- Incubar 10' a -20°C.
- 6.- Centrifugar 50' a 8.000 rpm i 4°C.

Recuperació i purificació del RNA:

- 7.- Recuperar el SBNT i afegir-hi 7 ml d'isopropanol 100% fred.
- 8.- Mesclar i incubar 1 hora a -20°C.
- 9.- Centrifugar 20' a 8.000 rpm i 4°C.
- 10.- Descartar el SBNT i assecar parcialment el precipitat, col·locant el tub en posició invertida.
- 11.- Redissoldre el precipitat en 0'7 ml de TE-1 i passar-lo a un tub eppendorf.
- 12.- Precipitar amb 0'1 volums d'acetat sòdic 3 M pH 5'2 i 0'7 volums d'isopropanol.
- 13.- Centrifugar 10' a 14.000 rpm i 4°C.
- 14.- Rentar el precipitat amb etanol 70% (v:v).
- 15.- Assecar i resuspendre en aigua.

Tampons i solucions:

- *Tampó IB* (autoclau): Tris-HCl 100 mM, pH 7'4
EDTA 50 mM pH 8
NaCl 500 mM

- *TE-1 pH 8* (autoclau): Tris-HCl 50 mM
EDTA 10 mM.

Els rendiments de RNA obtinguts per aquest mètode són alts, però no deixen la mostra lliure de contaminació per polisacàrids, per la qual cosa es va utilitzar una segona purificació mitjançant columnes Qiagen®, que permet l'obtenció d'extractes purs.

Procediment:

- 1.- Resuspendre completament el RNA obtingut en el protocol anterior en 16 ml de tampó R5 fred.
- 2.- Afegir 4 ml de tampó R6 fred i vortejar.
- 3.- Equilibrar una columna Qiagen® Tip 500 amb 10 ml de 0'1% (p:v) Triton X-100 / H₂O.
- 4.- Rentar la reïna de la columna amb 10 ml de QAT.
- 5.- Afegir la mostra de RNA (punt 2) a la columna.
- 6.- Rentar la columna amb 30 ml de QA.
- 7.- Eluir el RNA amb 20 ml de tampó QRU.
- 8.- Precipitar l'eluit amb un volum d'isopropanol 100% fred.
- 9.- Centrifugar 30' a 4°C i 8.000 rpm.
- 10.- Descartar el SBNT i rentar el precipitat amb 5 ml d'etanol 70% (v:v). Centrifugar 10' a 4°C i 8.000 rpm.
- 11.- Assecar el precipitat a RT i resuspendre'l en aigua.

Tampons i solucions:

- | | |
|---|---|
| - <i>Tampó QA:</i> NaCl 400 mM
MOPS àcid 50 mM, pH 7
Etanol 15% (v:v) | - <i>Tampó QAT:</i> NaCl 400 mM
MOPS àcid 50 mM, pH 7
Etanol 15% (v:v)
Triton X-100, 0'15% (v:v) |
| - <i>Tampó QBT:</i> NaCl 750 mM
MOPS 50 mM, pH 7
Isopropanol 15% (v:v)
Triton X-100, 0'15% (v:v) | - <i>Tampó QC:</i> NaCl 1 M
MOPS 50 mM, pH 7
Isopropanol 15% (v:v) |
| - <i>Tampó QF:</i> NaCl 1'25 M
Tris-HCl 50 mM, pH 8'5
Isopropanol 15% (v:v) | - <i>Tampó QR:</i> NaCl 1'2 M
MOPS àcid 67 mM pH 6'7
Etanol 20% (v:v) |

- *Tampó QRU*: NaCl 900 mM
MOPS àcid 50 mM, pH 7
Etanol 15% (v:v)
Urea 6 M. La urea s'ha d'afegir al tampó QRU just abans d'usarlo.
- *Tampó R5*: Tris-HCl 20 mM, pH 8
EDTA 1 mM
- *Tampó R6*: NaCl 2 M
MOPS àcid 250 mM, pH 7

El RNA obtingut per aquest mètode presenta un espectre normal, és intacte, hibrida bé en membranes de transferència, és òptim per a traduccions *in vitro*, i permet la purificació de RNA poli-(A⁺) de gran qualitat per a la síntesi de cDNA.

3.7.1.2. Extracció de RNA total segons el protocol basat en CTAB i 2-β-mercaptoetanol

Procediment:

- 1.- Homogeneïtzar 1 gram de teixit en un morter en presència de nitrogen líquid.
- 2.- Transferir tota la pols obtinguda a un tub de polipropilè que conté 4 ml de tampó CTAB a RT. Vortejar.
- 3.- Afegir 4 ml de cloroform i vortejar de nou.
- 4.- Centrifugar 5' a 4.000 rpm, RT.
- 5.- Transferir la fase superior a un tub nou i afegir 1 volum de cloroform. Vortejar.
- 6.- Centrifugar 5' a 4.000 rpm, RT.
- 7.- Transferir la fase superior a un tub nou i afegir 1 volum d'isopropanol per precipitar el DNA i el RNA. Agitar suaument.
- 8.- Centrifugar 15' a 4.000 rpm, RT.
- 9.- Eliminar el SBNT.
- 10.- Rentar el precipitat amb 2-3 ml d'etanol 70% (v:v), centrifugant 5' a 4.000 rpm i RT.
- 11.- Assecar el precipitat (RT o liofilitzador).
- 12.- Dissoldre el precipitat sec en 200 µl d'aigua i incubar 10' en un bany a 65°C. Transferir-ho a tubs eppendorf.
- 13.- Afegir 67'6 µl de LiCl 8 M per precipitar el RNA i no el DNA.
- 14.- Precipitar 20' a -20°C.
- 15.- Centrifugar 30' a 14.000 rpm i 4°C.
- 16.- Rentar el precipitat amb 150 µl d'etanol 70% (v:v).
- 17.- Centrifugar 5' a 14.000 rpm i 4°C.
- 18.- Assecar i resuspendre en 20 µl d'aigua.

Tampons i solucions:

- *Tampó CTAB*: Tris-HCl 100 mM, pH 8
EDTA 20 mM, pH 8
NaCl 1'4 M
CTAB 2%
PVP-40 2%
2- β -mercaptoetanol 1%

3.7.2. Anàlisi de l'expressió gènica per Northern-blot

Les anàlisis d'expressió de mRNA es van fer principalment mitjançant la tècnica del Northern-blot. S'utilitzaren dos mètodes diferents. El primer mètode s'emprà rutinàriament en el laboratori de l'IBMB, mentre que el segon mètode s'aplicà als estudis d'expressió de les plantes transgèniques en el PRI.

Procediment 1 (IBMB):

1.- Preparació de les mostres de RNA:	RNA + H ₂ O	20 μ l
	Formamida desionitzada	20 μ l
	Formaldehid 37%	6 μ l
	MOPS 10X	5 μ l
	Bromur d'etidi 10 mg/ml	1 μ l

2.- Desnaturalitzar les mostres 15' a 65°C i llavors afegir 10 μ l de TC 6X (Promega).

3.- Fraccionar els RNAs en gels desnaturalitzants d'agarosa/formaldehid (1'5% p:v / 2'2 M), segons el mètode descrit per Lehrach *et al.* (1977). La quantitat de RNA utilitzada va ser de 10-11 μ g per pou. Els RNAs fraccionats en el gel es van transferir per capil·laritat a membranes de niló (Hybond-N, Amersham-Pharmacia) usant com a solució de transferència SSC 20X. Es deixà transferint tota la nit i posteriorment es fixà el RNA durant 2 hores a 80°C.

Tampons i solucions:

- *Formamida desionitzada*: Afegir 5 g de resina AG 501-X8 (BioRad) a 50 ml de N-N-dimetilformamida i barrejar durant 30' a RT. Filtrar a través de dues capes de paper Whatmann, repartir en alíquotes i guardar a -20°C.

- 3.- Eliminar la solució de prehibridació i afegir 8-16 ml de la solució d'hibridació amb la sonda prèviament desnaturalitzada 5' a 95°C i refredada en gel.
- 4.- Incubar o/n a 42°C en agitació constant.
- 5.- Rentar les membranes amb SSC 1-3X + SDS 0'1-0'5% (p:v) a 65°C fins eliminar el marcatge inespecífic.
- 6.- Segellar les membranes i posar-les a exposar.
- 7.- Revelar.

Tampons i solucions:

- *Solució de prehibridació:*

Solució A (200 ml): Tampó fosfat sòdic 250 mM, pH 7'2
NaCl 250 mM
SDS 7% (p:v)
EDTA 1 mM, pH 8
Escalfar a 60°C.

Solució B (100 ml): Polietilenglicol PEG-6000, 20 % (p:v)
Escalfar a 60°C.

Mesclar la Solució A + la Solució B, mantenint la barreja a 60°C fins una completa dissolució. Afegir 80 ml de formamida desionitzada i 2 ml de DNA d'esperma de salmó (concentració final 100 µg/ml) prèviament desnaturalitzat 10' a 95°C. Aliquotar i guardar a -20°C.

- *Solució d'hibridació:* Agafar el volum corresponent de solució de prehibridació i afegir-hi la sonda prèviament desnaturalitzada, a una concentració final de $2 \cdot 10^6$ cpm/ml.

Procediment 2 (PRI):

- 1.- Prehibridació: deixar la membrana de niló ≥ 2 hores a 65°C en 10-20 ml de solució de prehibridació amb DNA d'esperma de salmó (concentració final 100 µg/ml), i en agitació constant.
- 2.- Mentrestant, preparar la sonda segons l'apartat 3.7.2.1.
- 3.- Afegir la sonda, prèviament desnaturalitzada 5' a 95°C, a la mateixa solució de prehibridació i a una concentració final de $2 \cdot 10^6$ cpm/ml.
- 4.- Incubar o/n a 65°C en agitació constant.
- 5.- Rentar les membranes amb SSC 1-3X + SDS 0'1-0'5% (p:v) a 65°C fins eliminar el marcatge inespecífic.
- 6.- Segellar les membranes i posar-les a exposar.
- 7.- Revelar.

Tampons i solucions:

- Solució de prehibridació: Dextransulfat 10% (p:v)
NaCl 1 M
SDS 1% (p:v)

Afegir DNA d'esperma de salmó (10 mg/ml) prèviament desnaturalitzat 10' a 95°C.
Aliquotar i guardar a -20°C.

3.7.3. Anàlisi de l'expressió gènica per Real Time Quantitative RT-PCR

Aquesta tècnica permet la quantificació de l'expressió d'un gen a partir de cDNA convertit des d'un mRNA, en relació a un calibrador extern (que en el nostre cas fou RNA ribosomal d'expressió constitutiva) i a una referència passiva. La referència passiva usada fou el colorant SYBR® Green, que emet fluorescència al unir-se al DNA de doble cadena que s'està sintetitzant en cada cicle de la PCR. La fluorescència augmentarà proporcionalment a la quantitat de cDNA present a la mostra, fins a saturar-se.

Procediment:

Extracció de RNA total:

- 1.- Obtenció de RNA amb qualsevol dels mètodes descrits en l'apartat 3.7.1.

Tractament amb DNAses:

Utilitzarem el kit *Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* (Gibco-BRL).

- 2.- Diluir 1 µg de RNA en 8 µl d'aigua.
- 3.- Afegir 1 µl de Tampó de reacció 10X i 1 µl de DNasa I (1U/µl).
- 4.- Incubar 15' a RT.
- 5.- Desactivar la DNasa I afegint 1 µl d'EDTA 25 mM. Agitar suaument.
- 6.- Incubar 10' a 65°C i guardar en gel o a -20°C fins la seva utilització.

Transcripció reversa:

Utilitzarem el kit TAQMAN® *Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems-Roche).

- 7.- Afegir a cada tub del punt 6:

Tampó TAQMAN 10X	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	11 µl
dNTP 10 mM	10 µl
(dTTP, dATP, dGTP, dCTP, 2'5 mM cadascun)	

<i>Random Primer Hexamers</i> 50 μ M	2'5 μ l
Inhibidor de RNAses 2.000 U (20 U/ μ l)	1 μ l
Aigua fins a	37'75 μ l.

8.- Afegir 1'25 μ l de transcriptasa reversa 50 U/ μ l o d'aigua pels controls de reacció de transcripció.

9.- Mesclar i fer un cop de centrífuga.

10.- Incubar: 10' a 25°C (temperatura d'incubació)

30' a 48°C (reacció de transcripció)

5' a 95°C (desactivació de l'enzim)

11.- Guardar a 4°C o a -20°C fins la seva utilització.

Reacció de PCR i quantificació:

Utilitzarem el kit SYBR®Green *PCR Core Reagents* (Perkin Elmer Biosystems). Cada reacció es fa per triplicat. Com a controls de quantificació s'usaren oligonucleòtids que amplificaven un DNA corresponent a un RNA ribosomal d'expressió constitutiva (calibrador extern), i com a control negatiu s'emprà el DNA a quantificar sense els oligonucleòtids.

12.- Preparar un *mix* amb:

Tampó PCR SYBR®Green 10X	6'5 μ l
MgCl ₂ 25 mM	7'8 μ l
dNTP (dUTP, 12'5 mM, dATP, dGTP, dCTP, 2'5 mM cadascun)	5'2 μ l
Oligonucleòtid 1 (o aigua)	3'25 μ l
Oligonucleòtid 2 (o aigua)	3'25 μ l
Amperasa® UNG	0'65 μ l
AmpliTaq Gold® DNA polimerasa	0'325 μ l
Aigua fins a	56'25 μ l.

L'enzim Amperase® UNG evita contaminacions de l'aparell, ja que degrada tot el DNA amb dUTP per sota de 50°C, és a dir, quan l'aparell està aturat. Per això hem afegit dUTP i no dTTP en aquest pas.

13.- Repartir el *mix* en alíquotes de 17'5 μ l en tres tubs eppendorf de 0'5 ml. Es necessiten 6 tubs per cada mostra, perquè tres s'utilitzaran pels oligonucleòtids corresponents al gen a quantificar, i els altres tres pels oligonucleòtids corresponents al gen d'expressió constitutiva (calibrador extern).

14.- Afegir 2'5 μ l de DNA procedent de la transcripció reversa (punt 11). Això equival aproximadament a 50 ng de DNA.

15.- Posar les mostres a l'aparell (ABIPRISM 7700 *Sequence Detection System*, Perkin Elmer Biosystems) i amplificar segons les condicions següents:

1 cicle de 50°C / 2', 95°C / 10'

40 cicles de 95°C / 15'', 60°C / 1'

3.8. Sobreexpressió en *Escherichia coli* i purificació de proteïnes

Es va utilitzar el vector pET28 (Novagen) per clonar i sobreexpressar Cel1 i Cel2 en *Escherichia coli*. Aquest vector es caracteritza per tenir el gen de la polimerasa T7 i el gen a sobreexpressar sota el control del gen *lacUV5*, i per tant, ambdós gens es poden induir amb IPTG. La presència de dues seqüències de sis histidines als extrems 5' i 3' terminals del lloc de clonatge del gen faciliten la posterior purificació de la proteïna recombinant mitjançant columnes d'afinitat. El plasmidi pET28 es presenta en tres formes diferents; a, b i c, per poder optar a les tres pautes obertes de lectura possibles en la traducció de qualsevol proteïna.

Per comprovar la presència de l'insert es van transformar cèl·lules competents DH5 α i es van seleccionar per resistència en un medi amb kanamicina. Posteriorment es van seqüenciar els clons seleccionats i els clons positius es van transformar en la soca BL21(DE3)pLysS, seguint les recomanacions del fabricant. Llavors es va començar la sobreexpressió proteica, primer a petita escala per ajustar les condicions d'inducció, i després usant volums de cultiu més grans. Per a més detalls, veure el "pET System Manual" (7^a Edició i posteriors, Novagen).

Procediment (sobreexpressió a gran escala):

Sobreexpressió de les proteïnes recombinants:

1.- Inocular, per duplicat, una colònia de cèl·lules BL21(DE3)pLysS transformants per pET28 \pm insert (*Cel1* o *Cel2*) en 5 ml de medi de cultiu SOB amb kanamicina (kan). Incubar en agitació (250 rpm) a 37°C, o/n.

2.- Inocular 10 ml dels dos cultius anteriors en un matrau amb 500 ml de SOB/Kan. Incubar a 30°C i 250 rpm fins assolir una DO_{600nm}= 0'4-0'6. En aquest punt prenem alíquotes de 1 ml corresponents al temps t= 0h.

3.- Induïm amb 1 mM IPTG durant 3-12 hores a 30°C i 250 rpm. Prendre alíquotes de 1 ml en diferents intervals de temps per determinar el temps d'inducció òptim i la solubilitat proteica.

4.- Un cop acabada la inducció refredar el cultiu 15' en gel, i després centrifugar-lo 10' a 5.000 g i 4°C. Eliminar el SBNT (medi de cultiu) i guardar el precipitat amb les cèl·lules a -80°C, o prosseguir amb el punt 5.

Solubilització de les proteïnes recombinants:

5.- Resuspendre el precipitat cel·lular del punt anterior en 20 ml de *Binding Buffer* + inhibidors de proteases (taula 3.1).

6.- Deixar 30' en gel i després sonicar de 8 a 10 cicles de 30" (6 *Output* / 90% potènciòmetre), intercalant amb incubacions de 30" en gel, per tal de no escalfar la mostra en excés.

7.- Centrifugar 30' a 8.000 rpm i guardar el SBNT (proteïnes solubles) i el precipitat (proteïnes insolubles + material cel·lular) a -80°C o prosseguir amb el punt 8. Si la proteïna és soluble caldrà guardar el SBNT i purificar-lo en columnes d'afinitat. En el nostre cas, com que les proteïnes recombinants formaven cossos d'inclusió, la proteïna es quedava al precipitat, i per tant es necessitava un pas addicional de solubilització.

8.- Resuspendre el precipitat en 15 ml de *Binding Buffer*/ *Guanidina-HCl* 6 M per agitació magnètica suau, de 3-5 hores a RT. Mentrestant preparar la columna (punt 10).

9.- Centrifugar 20' a 8.500 rpm i RT. Eliminar el precipitat.

Purificació de les proteïnes recombinants:

10.- Carregar la resina His-Bind® (Novagen) a la columna i rentar-la amb 2 ml d'aigua.

11.- Afegir 3 ml de NiSO₄·6H₂O 100 mM per activar la resina i rentar-la amb 3 ml de *Binding Buffer*/ *Guanidina-HCl* pH 7'9 o 9'0. Afegir la mostra (SBNT del punt 9) a la columna.

12.- (Només per la proteïna Cel1 recombinant). Rentar amb 5 ml de *Binding Buffer*/ *Guanidina-HCl* pH 7'9 i 5 ml de *Wash Buffer*/ *Guanidina-HCl* pH 7'9.

13.- Eluir amb concentracions creixents d'imidazol: 100, 200 i 400 mM (*Elute Buffer* 100, 200 i 400 mM, Guanidina-HCl 6M) a pH 7'9 (Cel1) o pH 9'0 (Cel2). Recollir tres alíquotes de 1 ml per a cada concentració d'imidazol.

14.- Després de comprovar mitjançant gels SDS-PAGE que les nostres proteïnes s'elueïen amb 100 mM d'imidazol, vam dialitzar les alíquotes corresponents contra 500 ml de NaCl 500 mM i Tris-HCl pH 7'9 20 mM. El procés es va realitzar a 4°C durant 24 hores, fent diferents canvis del medi de diàlisi.

15.- Purificar la proteïna per escissió de banda a partir de gels SDS-PAGE preparatius (veure apartat 3.10.3.1). Aquests gels tenen només un pou gran on carreguem la mostra en tampó de càrrega, i el gel es tenyeix suaument 10' amb 0'05% (p:v) Coomassie/H₂O per tal de no fixar les proteïnes al gel. Destenyim amb aigua i tallem la banda, que fragmentem amb una xeringa i la diluïm en 500-1000 µl de PBS 1X (veure apartat 3.10.4).

16.- Quantificar la proteïna per Lowry (apartat 3.10.2).

17.- Guardar a -20°C fins la immunització.

Es van prendre alíquotes de 15 µl per fer gels SDS-PAGE en tots els passos de purificació de la proteïna, per determinar la solubilitat proteica i el grau de purificació de la proteïna mitjançant Western-blot, i usant l'anticòs monoclonal anti-T7-tag.

Tampons i solucions:

- *Binding Buffer* pH 7'9: Imidazol 5 mM

NaCl 500 mM

Tris-HCl 20 mM, pH 7'9

Lisozima 0'5 mg/ml (estoc 10 mg/ml)

Nonidet P-40 0'1% (v:v)

- *Binding Buffer/ Guanidina-HCl* 6 M, pH 7'9 (Cel1) o 9'0 (Cel2): Afegir guanidina-HCl 6 M al *Binding Buffer*.

- *Wash Buffer/ Guanidina-HCl* 6 M, pH 7'9: Com el *Binding Buffer* però amb una concentració d'imidazol de 20 mM. Afegir guanidina-HCl 6 M.

- *Elute Buffer 100, 200 i 400 mM / Guanidina-HCl* 6 M, pH 7'9 (Cel1) o pH 9'0 (Cel2): Com el *Binding Buffer* però amb una concentració d'imidazol de 100, 200 i 400 mM, respectivament. Afegir guanidina-HCl 6 M.

3.8.1. Detecció de polihistidines

Per a la detecció de les poli-histidines en la proteïna recombinant Cel2 es va utilitzar el kit *INDIATM HisProbe-HRP* de PIERCE. Aquest kit es basa en l'ús d'una peroxidasa de rave, conjugada a níquel, que permet la detecció de proteïnes fusionades a histidines mitjançant la unió d'un àtom de níquel amb dos residus consecutius d'histidina. Aquest enzim hibrida amb la proteïna que conté aquestes poli-histidines, transferida a membranes de nitrocel·lulosa, i en permet el revelat per quimioluminiscència. El procediment utilitzat és semblant a l'emprat en els Western-blots, excepte que no usa anticòs primari ni secundari, doncs es basa en l'afinitat de l'enzim níquelat per les histidines. Per més detalls veure el protocol comercial, així com l'apartat 3.10.4 referent als Western-blots.

3.9. Obtenció d' anticossos policlonals

Es varen immunitzar, per a cada proteïna recombinant, 2 conills mascle *New Zealand* d'aproximadament 1 kg cadascun. Aquest procés es va realitzar a l'estabulari de l'IBMB.

Procediment:

- 1.- Deixar 15 dies els animals en quarantena.
- 2.- Extreure la sang preimmune d'una vena auricular de cada conill. La sang es posa en tubs que contenen heparina. Processar la mostra (veure punt 6).
- 3.- Primera immunització: inocular ≥ 150 μg de proteïna mitjançant diferents injeccions subcutànies dorsals. La proteïna utilitzada és la procedent del punt 17 de l'apartat 3.8, a la qual s'ha afegit un volum d'adjuvant de Freund complet per tal d'incrementar la immunogenicitat de la proteïna injectada.
- 4.- La resta d'immunitzacions (tres per Cel1 i cinc per Cel2) es feren igual que la primera, en intervals de 20-21 dies després de la immunització anterior. En aquest cas la mostra s'injectà amb adjuvant incomplet de Freund, que té propietats similars a l'adjuvant complet, tot i que no és tant potent, però és menys tòxic pel conill.
- 5.- Una setmana després de l'última immunització es procedeix amb el sagnat final.

Per a la recuperació del sèrum amb els anticossos, es va procedir de la següent manera:

- 6.- Centrifugar els tubs amb la sang i l'heparina a 5.000 rpm durant 10' i a 4°C.
- 7.- Aliquotar el SBNT o sèrum en tubs eppendorf i incubar 1 hora a 56°C per tal d'inactivar el complement.
- 8.- Guardar el sèrum a -80°C fins a la seva utilització.

3.10. Obtenció i anàlisi de proteïnes

3.10.1. Extracció de proteïnes

Per tal d'obtenir extractes proteics de maduixa que continguessin les proteïnes Cel1 i Cel2 es van provar diferents mètodes desenvolupats al nostre laboratori o descrits prèviament a la bibliografia (Domínguez-Puigjaner *et al.*, 1992; Ferrarese *et al.*, 1995; Harpster *et al.*, 1998 i Woolley *et al.*, 2001). El primer sistema utilitzat fou el descrit per Domínguez-Puigjaner *et al.* (1992). Degut a què el mètode

es basa principalment en una extracció fenòlica, l'anomenarem mètode dels **fenols**. El segon mètode seleccionat, i desenvolupat al nostre laboratori, consisteix en una extracció amb una elevada concentració de sals (1 M KCl i 100 mM de CaCl₂). És per això que l'anomenarem mètode del **KCl/CaCl₂**. El tercer i últim protocol escollit (**CTAB** o **CTAB/Triton**) és el descrit per Woolley *et al.* (2001).

Quan fou necessari concentrar una mostra de proteïnes es va fer amb àcid tricloracètic (TCA) 10% (30' en gel) o amb 3-4 volums d'acetona 100% (25' en gel), segons el volum de la mostra i utilització posterior de la proteïna. Així, l'acetona manté l'estructura nadiua de la proteïna, mentre que el TCA no.

3.10.1.1. Mètode dels fenols

Procediment:

- 1.- Homogeneïtzar el teixit en un morter amb nitrogen líquid fins obtenir una farina el més fina possible.
- 2.- Deslipiditzar la pols obtinguda amb acetona 100% (~24 ml per cada 4 grams de teixit fresc). Agitar exhaustivament i eliminar el SBNT després de centrifugar 20' a 6.000 rpm i 4°C. Repetir l'operació 3-4 cops fins que obtenim una farina molt fina i totalment disgregada.
- 3.- Assecar la farina al buit i guardar-la a -20°C, o procedir amb l'extracció de proteïnes.
- 4.- Posar 50-60 mg de farina deslipiditzada en un tub eppendorf i afegir-hi 900 µl de tampó TE-SDS. Vortejar 10'.
- 5.- Centrifugar 15' a RT i 14.000 rpm.
- 6.- Recuperar el SBNT i afegir un volum de fenol/Tris-HCl, pH 8. Centrifugar 5' a 14.000 rpm i RT.
- 7.- Eliminar la fase aquosa superior. Rentar la fase fenòlica inferior i la interfase amb un volum de TE pH 7'4 (proteïnes): centrifugar 5' a 14.000 rpm, RT, i eliminar la fase aquosa. Repetir el procés 3-4 cops.
- 8.- Precipitar les proteïnes amb 4 volums de Metanol/Acetata d'amoni fred, deixant o/n a -20°C.
- 9.- Centrifugar 20' a 14.000 rpm i 4°C.
- 10.- Recuperar i assecar el precipitat, i resuspendre'l en tampó de càrrega (TC 1X) per SDS-PAGE o tampó de lisi per electroforesis bidimensionals (apartat 3.1). Quantificar, si cal, les proteïnes segons l'apartat 3.10.2.

Tampons i solucions:

- | | |
|-----------------------------------|------------------------------|
| - <i>Metanol/ Acetat d'amoni:</i> | - <i>Tampó TE-SDS:</i> |
| Acetat d'amoni 0'1 M | Tris-HCl 250 mM, pH 8'4 |
| Metanol 100% | Glicina 200 mM |
| | SDS 0'4% (p:v) |
| | 2-β-mercaptoetanol 10% (v:v) |

3.10.1.2. Mètode del KCl/CaCl₂

Procediment:

- 1.- Posar 20-25 mg de farina deslipiditzada (veure protocol 3.10.1.1, punt 3) en un tub eppendorf i afegir-hi 1 ml d'aigua amb inhibidors de proteases (taula 3.1). Vortejar 1'.
- 2.- Centrifugar 5' a RT i 14.000 rpm.
- 3.- Recuperar el SBNT en un tub Corex 30 i posar-ho immediatament en gel. Afegir 1 ml més d'aigua al precipitat. Vortejar 1' i repetir els passos 2-3 fins a 4 vegades en total. Ajuntar els SBNTs (fracció soluble) i afegir-hi 1 volum de tampó d'extracció 2X fred amb inhibidors de proteases. Recollir igualment el precipitat final (fracció de paret cel·lular) en un Corex 30 amb 8 ml de tampó d'extracció 1X fred, amb inhibidors de proteases (taula 3.1).
- 4.- Deixar o/n en agitació magnètica suau a 4°C.
- 5.- Centrifugar 30' a 8.000 rpm i 4°C i descartar el precipitat.
- 6.- Dialitzar els SBNTs envers 500 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7'5 a 4°C i durant 24 hores, fent diferents canvis de tot el volum del tampó de diàlisi.
- 7.- Precipitar amb 4 volums d'acetona 100% freda, 1 hora a -20°C.
- 8.- Centrifugar 1 hora a 8.000 rpm i 4°C, i descartar el SBNT.
- 9.- Recollir els precipitats i passar-los a un tub eppendorf per cada fracció, amb ajuda d'acetona 100% freda. Assecar al buit i resuspendre en tampó de càrrega (TC 1X, apartat 3.1) per SDS-PAGE o glicerol 10% (v:v) per IEF nadiu. Quantificar, si cal, les proteïnes segons l'apartat 3.10.2.

Tampons i solucions:

- | | |
|--------------------------------|--------------------------|
| - <i>Tampó d'extracció 2X:</i> | Tris-HCl 100 mM, pH 7'5 |
| | KCl 2 M |
| | CaCl ₂ 200 mM |

3.10.1.3. Mètode del CTAB

Procediment:

- 1.- Posar 60 mg de farina deslipiditzada (veure protocol 3.10.1.1, punt 3) en un morter amb nitrogen líquid, i afegir-hi 12 ml de tampó CTAB o CTAB/Triton amb inhibidors de proteases (taula 3.1). Homogeneïtzar fins que la mostra arriba a RT. Opcionalment es pot deixar en agitació magnètica suau a RT (1 hora).

- 2.- Passar la mostra a un Corex 15 i centrifugar 20' a RT i 8.000 rpm.
- 3.- Recuperar el SBNT i filtrar-lo a través de Miracloth. Posar el filtrat en tubs Corex 30 i precipitar amb 3 volums d'acetona 100% freda, 25' en gel.
- 4.- Centrifugar 10' a 5.500 rpm i 4°C, i descartar el SBNT.
- 5.- Fer un rentat del precipitat amb 5 ml d'acetona freda 100% i centrifugar 5' a 5.500 rpm i 4°C.
- 6.- Recollir el precipitat en un tub eppendorf amb ajuda d'acetona 100% freda.
- 7.- Assecar al buit o a RT i guardar a -20°C fins la seva utilització, o resuspendre en tampó de càrrega (TC 1X, apartat 3.1) per SDS-PAGE o solució substrat per fer activitat (apartat 3.11). Quantificar, si cal, les proteïnes segons l'apartat 3.10.2.

Tampons i solucions:

- *Tampó CTAB (Cel1):*

MOPS/NaOH 10 mM, pH 7

CTAB 0'5% (p:v)

Glicerol 30% (p:v)

- *Tampó CTAB/ Triton 1% (Cel2):*

MOPS/NaOH 10 mM, pH 7

CTAB 0'5% (p:v)

Glicerol 30% (p:v)

Triton X-100 1% (v:v)

3.10.2. Quantificació de proteïnes

Per a la quantificació de proteïnes es van usar dos mètodes diferents: el mètode de Bradford (1976) s'utilitzà per a la quantificació rutinària de proteïnes, degut a la seva fàcil i ràpida aplicació, mentre que el mètode de Lowry *et al.* (1951) s'utilitzà en aquells casos en què la presència de certs components en el tampó en què estava resuspesa la proteïna podia interferir amb el mètode de Bradford.

3.10.3. Anàlisis electroforètiques de proteïnes

3.10.3.1. Electroforesi d'una dimensió en gels desnaturalitzants (SDS-PAGE)

Es va realitzar segons el mètode de Laemmli (1970), utilitzant un sistema Miniprotean TM II de BioRad amb espaiadors de 1'5 mm. Es realitzaren gels del 12'5% d'acrilamida en condicions reductores. Els extractes proteics, resuspesos en TC 1X (apartat 3.1), es bulliren durant 5' en presència de 2-β-mercaptoetanol abans de carregar l'electroforesi. L'electroforesi es feia normalment a 120 V durant 120' en tampó d'electroforesi. La composició dels gels es detalla a la següent taula:

Composició del gel de correment (12'5%) (2 gels)		Composició del <i>stacking</i> gel (3%) (2 gels)	
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0'8)	8'3 ml	Acrilamida:Bisacrilamida (30:0'8)	0'4 ml
<i>Lower Buffer</i>	5 ml	<i>Upper Buffer</i>	1 ml
Aigua	6'5 ml	Aigua	2'6 ml
Temed	10'3 µl	Temed	4 µl
APS 15% (p:v)	80'6 µl	APS 15% (p:v)	40 µl

Tampons i solucions:

- *Lower Buffer*: Tris-HCl 1'5 M, pH 8'8
SDS 0'4% (p:v)

- *Upper Buffer*: Tris-HCl 500 mM, pH 6'8
SDS 0'4% (p:v)

- *Tampó d'electroforesi* pH ≤8'7: Tris-HCl 250 mM
Glicina 1'92 M
SDS 1% (p:v)

3.10.3.2. Electroforesi de dues dimensions (NEPHGE/SDS-PAGE, IEF/SDS-PAGE)

Per a les electroforesis bidimensionals es va seguir el mètode descrit per O'Farrell *et al.* (1977), si bé es van utilitzar dues variants en la primera dimensió: NEPHGE i IEF. L'única diferència entre els dos sistemes és la direcció amb què corren les proteïnes en el gel, que en el primer cas (NEPHGE) és d'àcid a bàsic, mentre que en el segon cas (IEF) és a l'inrevés. Això s'aconsegueix carregant les proteïnes en medi àcid o bàsic i variant la polaritat del gel. Així, en el NEPHGE es carreguen les proteïnes en medi àcid i no s'enfoquen mai, per tant, les proteïnes altament bàsiques poden escapar-se del gel. En canvi en el IEF, les proteïnes es carreguen en medi bàsic, i s'enfoquen segons els seu pI. El principal problema que presenta el sistema és que les proteïnes més bàsiques no entren en el gel.

Les proteïnes resuspeses en tampó de lisi (apartat 3.1) es carregaven en el gel de la primera dimensió en un aparell Hoefer, i es feia l'electroforesi en les següents condicions:

- NEPHGE: 100 V – 30', 200 V – 45', 300 V – 75', 500 V – 45'
- IEF: 500 V – 10', 750 V – 180'

Tampons, gels i solucions:

- Gel d'electroenfoc (1 ^a dim.):	Acrilamida:Bisacrilamida (28'3%:1'6% p:v)	0'78 ml
	Urea,	3'3 g
	Nonidet P-40 10% (v:v),	1'2 ml
	Amfolines de rang de pH X,	240 µl
	TEMED,	8'4 µl
	APS 15% (p:v),	6 µl

- *Tampó overlay*: Urea 8 M
Nonidet P-40 5% (v:v)
2-β-mercaptoetanol 5% (v:v)
Amfolines de rang de pH X, 0'8% (v:v)

- *Solució anòdica*: H₃PO₄ 10 mM - *Solució catòdica*: NaOH 20 mM

Al finalitzar la primera dimensió els gels s'equilibraren amb el tampó de càrrega (TC 1X, apartat 3.1) durant 20', i es carregaren en gels SDS-PAGE per a la segona dimensió, tal com es descriu en l'apartat 3.10.3.1.

3.10.3.3. Tinció amb Coomassie-Blue

Aquesta va ser la tinció escollida per tenyir i visualitzar les proteïnes en els gels SDS-PAGE després de l'electroforesi. Per això es deixava el gel tenyint 15' a RT en Coomassie-Blue 1% (p:v) preparat en TCA 50% (v:v), i després es destenyia amb successius rentats amb metanol:àcid acètic (35:10, v:v, en aigua). Els gels tenyits es conservaven en àcid acètic 7% (v:v) a RT.

3.10.4. Anàlisi per Western-blot i immunodetecció

Les anàlisis per Western-blot de les proteïnes separades en gels SDS-PAGE es realitzaren per hibridació dels anticossos amb les proteïnes prèviament transferides a membranes de nitrocel·lulosa (Schleicher & Schuell) mitjançant el sistema *semi-dry* de BioRad. La transferència es va fer en tampó CAPS, que és més bàsic que el tampó de Towbin utilitzat comunament, facilitant així la transferència de proteïnes altament bàsiques. Les condicions de transferència foren 45' a 14 V i, tant els gels com les membranes de NC, es van equilibrar prèviament 20' en el mateix tampó. Després de la transferència, la membrana es tenyeix amb

Ponceau S al 0'1% (p:v) en 0'1% (v:v) d'àcid acètic, per tal de visualitzar les proteïnes i localitzar els marcadors de pes molecular. El Ponceau S s'eliminava rentant amb PBS 1X 10' a RT.

En el cas de la transferència dels gels IEF nadius, la membrana (de PVDF en aquest cas) i les condicions de transferència foren molt diferents, i per això es descriuran en un capítol apart (3.10.7).

Tampons i solucions:

- *Tampó CAPS, pH 11*: CAPS 10 mM en metanol 10% (v:v)

Per a la immunodetecció de proteïnes s'utilitzaren els anticossos de maduixa obtinguts segons es descriu als apartats 3.8 i 3.9. La detecció es va fer per quimioluminiscència, usant el sistema *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) d'Amersham-Pharmacia, i seguint les instruccions del proveïdor. Aquest sistema fou utilitzat tant per a membranes de NC procedents dels gels SDS-PAGE desnaturalitzants com per a membranes de PVDF procedents dels gels IEF nadius.

Procediment:

- 1.- Bloquejar la membrana de NC o PVDF amb PBST 0'1% (PBS 1X + 0'1% (v:v) Tween-20) amb un 7% (p:v) de llet en pols, 1 hora a RT en agitació suau.
- 2.- Rentar la membrana 3 cops amb PBST 0'1%, cada rentat durant 5' a RT.
- 3.- Incubar la membrana amb l'anticòs primari (anti-Cel1 o anti-Cel2 a una dilució 1:300, o anti-T7-tag a una dilució 1:10.000) en PBST 0'1% durant 1 hora a RT.
- 4.- Rentar la membrana 3 cops amb PBST 0'1%, cada rentat durant 5' a RT.
- 5.- Incubar la membrana amb l'anticòs secundari (antirabbit o antimouse conjugats a peroxidases a una dilució 1:15.000) en PBST 0'1% durant 1 hora a RT.
- 6.- Rentar la membrana 3 cops amb PBST 0'3% i 2 cops amb PBST 0'1%, cada rentat durant 5' a RT.
- 7.- Revelar per incubació amb els reactius de l'ECL (0'125 ml/cm²), exposant la membrana a un film hipersensible (X-OmatTM AR, Kodak Scientific) durant temps variables.

Tampons i solucions:

- *Tampó PBS 20X pH 7'4*:
Na₂HPO₄·2H₂O 168 mM
NaH₂PO₄·H₂O 32 mM
NaCl 3 M

3.10.5. Detecció de glicoproteïnes (mètode de la concanavalina A)

Procediment (segons Clegg, 1982):

Cal tenir duplicats d'una mateixa mostra, és a dir, dues alíquotes d'un mateix extracte proteic són sotmesos a les mateixes condicions electroforètiques, per tal de descartar possibles variacions degudes a un correment diferent. Un duplicat es processà tal com està descrit a l'apartat 3.10.4, i l'altre s'hibridà de la següent manera:

- 1.- Rentar la membrana transferida, 2 cops durant 15' en PBS 1X.
- 2.- Bloquejar la membrana de NC amb PBST 0'1% (PBS 1X + 0'1% (v:v) Tween-20) amb un 7% (p:v) de llet en pols, 1 hora a RT en agitació suau.
- 3.- Rentar la membrana 3 cops amb PBST 0'1%, cada rentat durant 5' a RT.
- 4.- Incubar la membrana amb concanavalina A (10 µg/ml en PBS 1X*) durant 1 hora a RT.
- 5.- Rentar la membrana 5 cops amb PBS 1X*, cada rentat durant 5' a RT.
- 6.- Incubar la membrana amb peroxidasa de rave (50 µg/ml en PBS 1X*, Sigma) durant 1 hora a RT.
- 7.- Rentar la membrana 5 cops amb PBS 1X*, cada rentat durant 5' a RT.
- 8.- Revelar per incubació amb els reactius de l'ECL (0'125 ml/cm²), exposant la membrana a un film hipersensible (X-OmatTM AR, Kodak Scientific) durant temps variables.

Tampons i solucions:

- *Tampó PBS 1X**:
- Na₂HPO₄·2H₂O 8'4 mM
 - NaH₂PO₄·H₂O 1'6 mM
 - NaCl 150 mM
 - MnCl₂·4H₂O 10 µM
 - MgCl₂·6H₂O 10 µM
 - CaCl₂·2H₂O 10 µM
 - Triton X-100 0'5% (v:v)

3.10.6. Traducció *in vitro*

Per assajar l'anticòs anti-Cel1 produït en *Escherichia coli* es van fer estudis de traducció *in vitro* utilitzant el kit *TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems* de Promega. Es van fer en paral·lel dues reaccions de traducció; una usant metionina no marcada com a precursor proteic per fer-ne un Western-blot del SDS-PAGE, i l'altra usant ³⁵S-Metionina com a control de reacció, per detectar la proteïna mitjançant fluorografia. Com a control de traducció es va usar la proteïna luciferasa.

Procediment:

1.- Preparar les reaccions amb:

<u>Reaccions no radioactives</u>		<u>Reaccions radioactives</u>	
TNT Rabbit Reticulocyte Lysate	25 µl	TNT Rabbit Reticulocyte Lysate	12'5 µl
TNT Reaction Buffer	2 µl	TNT Reaction Buffer	1 µl
T7 TNT RNA polimerasa	1 µl	T7 TNT RNA polimerasa	0'5 µl
Aminoacide mixture (minus Leu) 1 mM	0'5 µl	Aminoacide mixture (minus Met) 1 mM	0'5 µl
Aminoacide mixture (minus Met) 1 mM	0'5 µl	³⁵ S-Metionina (37 MBq/ 1 mCi) 1 mM	1 µl
RNAsin 40 U/µl	1 µl	RNAsin 40 U/µl	1 µl
DNA (plasmidi + insert), ~1 µg DNA	2 µl	DNA (plasmidi + insert), ~1 µg DNA	2 µl
Aigua fins 50 µl		Aigua fins 25 µl	

2.- Incubar 90' a 30°C i després guardar a -80°C fins el seu processament.

3.- Per a les mostres radioactives, carreguem 2 µl en un gel SDS-PAGE i, després de l'electroforesi a 120 V durant 1 hora, tenim el gel amb Coomassie, assequem el gel en un secador de gels i després de segellar-lo el posem a exposar amb un film hipersensible o/n a RT.

4.- Per a les mostres no radioactives, vam carregar 25 µl del producte de traducció en un gel SDS-PAGE i vam procedir com es descriu als protocols 3.10.3 i 3.10.4.

3.10.7. IEF nadiu

Aquesta tècnica es va realitzar segons el mètode publicat per Kanellis *et al.* (1991; 1992) amb lleugeres modificacions. Els extractes proteics utilitzats eren extractes nadius (protocols 3.10.1.2 i 3.10.1.3) resuspesos en glicerol 10% (v:v) i amfolines 2% (v:v). L'electroforesi, utilitzant el sistema Miniprotean TM II de BioRad amb espaiadors de 1 mm, es feia normalment a 180 V durant 75' + 300 V durant 30', i es carregà en l'extrem àcid. La composició dels gels es detalla a la següent taula:

Composició dels gels IEF nadius (1 gel)	
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0'8)	1'8 ml
Glicerol 50% (v:v)	1'8 ml
Aigua	5'05 ml
Amfolines de rang de pH X	450 µl
Temed	10 µl
APS 10% (p:v)	40 µl

Tampons i solucions:

- *Tampons d'electroforesi:* Àcid: Àcid acètic 20 mM (superior)
Bàsic: NaOH 25 mM (inferior)

Es carregaven alíquotes de la mateixa mostra, aproximadament 100 µg, en diferents pous per tal de fer posteriorment l'activitat *overlay*, el Western-blot i la determinació del p*H* i del pes molecular en un mateix gel. En un pou es carregaven marcadors comercials de p*I*, que es tenyien amb Coomassie per tal de determinar el p*I* aproximat de la nostra proteïna.

Activitat *Overlay* (Carder, 1986):

Procediment:

- 1.- Preparar el gel *overlay* en un sistema Miniprotean TM II amb espaiadors de 1 mm.
- 2.- Un cop acabada l'electroforesi del gel IEF nadiu, treure el gel IEF i equilibrar-lo 10' en AcONa 50 mM, p*H* 5.
- 3.- Posar el gel IEF en una safata i cobrir-lo amb el gel *overlay* que conté CMC. Incubar o/n a 20°C ben tapat perquè no es deshidratin els gels.
- 4.- Tenyir 30-45' amb Congo Red 1% (p:v).
- 5.- Rentar amb aigua i destenyir amb NaCl 1M.

Tampons i solucions:

- *Gel overlay:* AcONa 50 mM, p*H* 5
CMC d'alta viscositat 0'1% (p:v)
Dissoldre per agitació intensa 2-3 hores, i afegir:
Agarosa 0'8% (p:v)
Dissoldre per escalfament al microones.

Western-blot del gel IEF nadiu:

En aquest cas, a diferència dels Western-blots descrits al punt 3.10.4, el tampó de transferència és àcid acètic 0'7% (v:v) i les proteïnes migren cap el pol negatiu degut a la presència del medi àcid. A més, s'usa una membrana de PVDF que s'ha d'activar prèviament 30'' en metanol 100% i després rentar 2' en aigua. El gel no requereix un equilibrat previ.

Procediment:

- 1.- Tallar el carril o carrils que volem i transferir-los a una membrana de PVDF mitjançant el sistema TransBlot MiniCell (BioRad), deixant o/n en àcid acètic 0'7% (v:v) a 110 mA i 4°C.
- 2.- Treure la transferència i procedir com en l'apartat 3.10.4.

2D-PAGE:Procediment:

- 1.- Tallar el carril que es vol sotmetre a la segona dimensió i posar-lo en un tub amb metanol 50% (v:v) + àcid acètic 15% (v:v) i deixar 20' incubant a RT.
- 2.- Substituir el metanol/acètic per tampó de càrrega TC* (Mattoo *et al.*, 1981) i congelar a -20°C.
- 3.- Carregar en un gel SDS-PAGE i seguir els protocols 3.10.3.1 i 3.10.4.

Tampons i solucions:

- TC*: Tris-HCl 190 mM, pH 6'8
- Glicerol 30% (v:v)
- SDS 9% (p:v)
- Blau de bromofenol 0'02% (p:v)
- 2-β-mercaptoetanol 15% (v:v)

Determinació del pH:Procediment:

- 1.- Tallar el carril en 12 fragments de 5 mm d'alçada i posar-los en un tub eppendorf amb 1.000 µl de KCl 10 mM.
- 2.- Incubar 2 hores a RT.
- 3.- Determinar el pH de la solució amb un microelèctrode.

Tinció amb Coomassie:Procediment:

- 1.- Tallar el carril o carrils que es volen tenyir i posar-los en un tub amb TCA 10% (p:v) i deixar 10' incubant.
- 2.- Substituir el TCA 10% per TCA 1% (p:v) i deixar o/n en agitació suau a RT.
- 3.- Tenyir 30' amb Coomassie 1% (p:v) en metanol/acètic (35:10 v:v en aigua).
- 4.- Destenyir amb metanol/acètic (35:10 v:v en aigua).

3.11. Sobreexpressió de proteïnes en *Pichia pastoris*

Es va utilitzar el vector pPic9 (Invitrogen) per clonar i sobreexpressar Cel1 en el llevat *Pichia pastoris*. Aquest vector es pot multiplicar fàcilment en bacteris, on es pot seleccionar per resistència a ampicil·lina. A més, com que conté un pèptid senyal α endogen procedent del factor de secreció α de *Saccharomyces cerevisiae*, permet la secreció de la proteïna sobreexpressada a l'espai extracel·lular. El llevat *Pichia pastoris* és un organisme eucariota unicel·lular metilotròfic que requereix de

l'enzim alcohol oxidasa (AOX), del qual té dues isoformes en el genoma: AOX1 i AOX2. Donat que AOX1 és més abundant i té un promotor molt més actiu, és aquest promotor el que s'usa per controlar la inducció proteica.

Nosaltres vam clonar *Cel1* en pPic9 usant el pèptid senyal α del llevat. Mitjançant la tècnica de PCR (veure apartat 3.6.6), i usant dos oligonucleòtids descrits a la taula 4.1, vam amplificar la regió compresa entre el pèptid senyal i el codó codificant pel *Stop* de *Cel1*. A més, es van afegir dues dianes de restricció (*EcoRI* i *NotI*) que facilitaven el clonatge en pauta de lectura correcta a pPic9. Com que el vector pPic9 s'integra al genoma de *Pichia pastoris* per recombinació homòloga, la construcció *Cel1/pPic9* es va linealitzar amb l'enzim de restricció *Sall* per facilitar el procés, i es va transformar la soca GS115 de *Pichia pastoris*.

Transformació del llevat *Pichia pastoris*:

Procediment:

- 1.- Créixer o/n a 30°C un cultiu de *Pichia pastoris* wt (soca salvatge) per inoculació d'una colònia individual, crescuda en una placa amb medi YPD, en 5 ml de medi YPD líquid.
- 2.- Inocular 500 ml de cultiu YPD fresc en un matrau de 2 litres, amb 0'1-0'5 ml del cultiu del punt 1. Créixer o/n a 30°C fins que assoleix una $DO_{600\text{ nm}} = 1'3-1'5$.
- 3.- Centrifugar les cèl·lules 5' a 1.500 g i 4°C i resuspendre el precipitat en 500 ml d'aigua estèril freda.
- 4.- Rentar les cèl·lules per centrifugació de 5' a 1.500 g i 4°C, i resuspendre el precipitat en 250 ml d'aigua estèril freda.
- 5.- Centrifugar les cèl·lules 5' a 1.500 g i 4°C i resuspendre-les en 20 ml de sorbitol 1 M fred.
- 6.- Centrifugar les cèl·lules 5' a 1.500g i 4°C i resuspendre-les en 1 ml de sorbitol 1 M fred.
- 7.- Barrejar 80 μl de les cèl·lules del punt 6 amb 5-20 μg de DNA linealitzat i resuspès en TE. Transferir-ho a cubetes d'electroporació de 0'2 cm de gruix.
- 8.- Incubar 5' en gel.
- 9.- Electroporar a 1'5 kV/ 200 Ω / 25 μF durant 5-10'' cada mostra.
- 10.- Afegir immediatament 1 ml de sorbitol 1 M fred i transferir el contingut de la cubeta a un tub eppendorf.
- 11.- Plaquejar 150-600 μl de cultiu en plaques MD (apartat 3.2) i incubar a 30°C fins l'aparició de colònies.

Cribratge $\text{Mut}^+/\text{Mut}^S$ de transformants de *Pichia pastoris*. Colony-blot:

El cribratge del fenotip $\text{Mut}^+/\text{Mut}^S$ es va fer creixent colònies per duplicat en plaques amb medi no inductor (MD) i plaques en medi inductor (MM). El Colony-blot es va realitzar induint

les colònies, prèviament crescudes en plaques YPD, en plaques MM (Ferrarese *et al.*, 1998). Després de 48 h d'inducció es va posar una membrana de NC, activada en metanol 0'5% (v:v), a sobre de la placa, i després de deixar-la transferint o/n a 30°C es va fer un Western-blot amb la membrana (protocol 3.10.4).

Anàlisi per PCR dels transformants de *Pichia pastoris*:

Per tal de determinar la possible presència de múltiples còpies de *Cel1* en el genoma del llevat es van analitzar per PCR tots els transformants que expressaven la proteïna. Això es va fer usant els mateixos oligonucleòtids emprats per clonar *Cel1* en pPic9 (protocol 3.6.6) i a partir de DNA cromosòmic extret segons el següent procediment (Hoffman, 1997):

Procediment:

- 1.- Créixer 10 ml de cultiu en medi YPD o/n a 30°C.
- 2.- Centrifugar les cèl·lules 5' a 1.500 g i 4°C i resuspendre el precipitat en 500 µl d'aigua estèril freda.
- 3.- Transferir-ho a tubs eppendorf i rentar les cèl·lules per centrifugació: 5' a 1.500 g i 4°C.
- 4.- Resuspendre les cèl·lules en 200 µl de Breaking Buffer, afegir un volum de *glass beads* (Sigma) i 200 µl de fenol/cloroform/isoamílic i vortejar intensament durant 3'.
- 5.- Afegir 200 µl de TE i vortejar breument.
- 6.- Centrifugar 5' a 14.000 rpm i RT, i transferir la fase aquosa superior a un tub net. Rentar amb cloroform:isoamílic per centrifugació, 5' a 14.000 rpm i RT.
- 7.- Recuperar un altre cop la fase aquosa i afegir-hi 1 ml d'etanol 100%. Barrejar per inversió.
- 8.- Centrifugar 3' a 14.000 rpm i RT i eliminar el SBNT.
- 9.- Resuspendre el precipitat amb 400 µl de TE i afegir-hi 30 µl de RNAsa DNAsa free (1 mg/ml). Barrejar i incubar 5' a 37°C.
- 10.- Afegir 10 µl d'acetat d'amoni 4 M i 1 ml d'etanol 100%. Barrejar per inversió.
- 11.- Centrifugar 3' a 14.000 rpm i RT i eliminar el SBNT. Rentar el precipitat amb 150 µl d'etanol 100% per centrifugació i eliminar el SBNT de nou.
- 12.- Assecar el precipitat i resuspendre'l en 100 µl de TE.

Tampons i solucions:

- *Breaking Buffer*:
- Tris-HCl 10 mM, pH 8
 - NaCl 100 mM
 - EDTA 1 mM, pH 8
 - Triton X-100 2% (v:v)
 - SDS 1% (p:v)

Sobreexpressió de proteïnes en *Pichia pastoris*:

Procediment:

- 1.- Inocular una colònia de cèl·lules de *Pichia pastoris* transformant per pPic9 ± insert (*Cel1* o control) en 25 ml de medi de cultiu BMGY en un matrau de 250 ml. Deixar en agitació a 28-30°C i 300 rpm fins assolir una $DO_{600\text{ nm}} = 2-6$.
- 2.- Centrifugar les cèl·lules 5' a 1.500 g i RT, i resuspendre el precipitat en un volum adequat de BMMY per obtenir una $DO_{600\text{ nm}} = 1$ (~100 ml).
- 3.- Posar el cultiu en matraus de 1 litre i tapar-lo amb dues capes de Miracloth estèril. Continuar la incubació a 28-30°C i 300 rpm.
- 4.- Afegir metanol estèril a una concentració final de 0'5% cada 24 hores.
- 5.- Prendre alíquotes de 1 ml de cultiu a t= 0, 12, 24, 48, 72 i 96 hores. Centrifugar 3' a 14.000 rpm i RT, i separar el SBNT del precipitat. Guardar a -80°C fins l'extracció proteica.

Extracció de proteïnes de *Pichia pastoris*:

Es van extreure proteïnes del SBNT i del precipitat cel·lular dels cultius obtinguts en el protocol anterior.

Procediment per a l'extracció de proteïnes intracel·lulars i lligades a paret cel·lular:

- 1.- Descongelar les cèl·lules ràpidament i posar-les en gel.
- 2.- Afegir 100 µl de Breaking Buffer i resuspendre les cèl·lules.
- 3.- Afegir un volum de *glass beads*, vortejar 30" i incubar 30" en gel. Repetir el procés 8 cicles.
- 4.- Centrifugar 10' a 14.000 rpm i 4°C, i separar el SBNT en un tub nou. Agafar aquest SBNT (proteïnes intracel·lulars) per carregar en un gel SDS-PAGE.

Tampons i solucions:

- *Breaking Buffer*:
 - Tampó fosfat de sodi 50 mM, pH 7'4
 - PMSF 1 mM
 - EDTA 1 mM, pH 8
 - Glicerol, 5% (v:v)

Les proteïnes lligades a paret cel·lular es van obtenir resuspenent els precipitats cel·lulars (punt 1) en tampó de càrrega TC1X i bullint la mostra 10' a 100°C, amb vórtex intermitent. Després de centrifugar 2' a RT, 14.000 rpm, es van carregar 10-20 µl de SBNT en un SDS-PAGE.

Procediment per a l'extracció de proteïnes del sobrenedant:

- 1.- Descongelar els SBNTs ràpidament i posar-los en gel.

2.- Agafar el SBNT i carregar directament en un gel SDS-PAGE o concentrar per precipitació amb TCA o acetona.

Tractaments de deglicosilació amb PNGasa:

Els tractaments de deglicosilació amb PNGasa es van fer afegint als precipitats cel·lulars procedents de les induccions, 10-100 µl de tampó PNGasa i 2 µl de N-Glicosidasa F (PNGasa, Roche), i incubant de 3 a 16 hores a 37°C. Posteriorment es van carregar els SBNTs de les cèl·lules tractades i centrifugades 3' a 14.000 rpm en gels SDS-PAGE.

Tampons i solucions:

- *Tampó PNGasa:* Tampó fosfat de sodi 50 mM, pH 7'4
Inhibidors de proteases (apartat 3.3)
± EDTA 10 mM, pH 8
± Triton X-100 o Nonidet P-40 o SDS o CAPS, 1%
± 2-β-mercaptoetanol, 10 mM

3.11.1. Detecció de l'activitat EGasa *in vitro*

La determinació de l'activitat EGasa es va fer per mitjà de tres mètodes diferents. El primer és el mètode viscosimètric descrit per Durbin i Lewis (1988), el segon és un mètode de reducció de sucres descrit per Schales i Schales (1945) i el tercer és la tinció amb Congo Red descrita ja a l'apartat 3.10.7.

Quantificació d'activitat EGasa per viscosimetria:

Procediment:

- 1.- Descongelar les cèl·lules (~10 DO_{600 nm}) ràpidament i posar-les en gel.
- 2.- Afegir 0'2 ml de tampó de substrat i 0'4 ml de solució substrat. Vortejar i incubar a 30°C.
- 3.- Mesurar la viscositat a 30°C en una pipeta de 0'1 ml, mesurant el temps d'eflux en el pas de 0'1 a 0'02 ml. Fer això en els temps 0 i 4 hores (després de resuspendre les cèl·lules), i en mostres centrifugades 3' a 14.000 rpm RT, per descartar qualsevol interferència de les cèl·lules.
- 4.- Quantificació de la viscositat en unitats d'activitat molecular específica segons Almin *et al.* (1967), fent-ho en relació als controls corresponents.

Tampons i solucions:

- *Tampó de substrat:* 50 mM de tampó acetat sòdic (pH 5'2) o fosfat sòdic (pH 6, 6'5 i 7) o Tris-HCl (pH 7'5, 8, 8'5, 9 i 9'5).

- *Solució substrat*: Tampó de substrat + CMC viscositat mitja, 1'5% (p:v).

Quantificació d'activitat EGasa per reducció de sucres:

Procediment:

- 1.- Descongelar les cèl·lules (~10 DO_{600 nm}) ràpidament i posar-les en gel.
- 2.- Afegir 430 µl de solució substrat. Vortejar i incubar a 30°C 1 hora.
- 3.- Centrifugar 3' a 14.000 rpm RT, per descartar qualsevol interferència de les cèl·lules.

Agafar 50 µl de SBNT i posar-ho en un tub eppendorf nou.

- 4.- Afegir 50 µl de reactiu de ferricianida i incubar 5' a 100°C. Posar en gel.
- 5.- Diluir amb 1'9 ml d'aigua i llegir l'absorbància a una $\lambda = 237$ nm.
- 6.- Quantificació de l'activitat relativa respecte els controls corresponents.

Tampons i solucions:

- *Solució substrat*: 50 mM de tampó Tris-HCl pH 7'5 + 1% (p:v) de: CMC viscositat baixa, mitja, o alta, cel·lulosa CF-11, xiloglucà de tamarind, midó o àcid poligalacturònic.
- *Reactiu de ferricianida*, per 50 ml: 0'125 g de K₃Fe(CN)₆, 7 g de K₂HPO₄ i 2'1 g de K₃PO₄.

3.12. Transformació de plantes de maduixa via *Agrobacterium tumefaciens*

Transformació d'*Agrobacterium tumefaciens*:

Procediment:

- 1.- Descongelar 40 µl de cèl·lules competents d'*Agrobacterium tumefaciens* (soca Agl0) en gel i afegir-hi 100 ng de DNA, corresponent a la construcció a transformar, en un volum final de 10 µl.
- 2.- Transformar per electroporació: 1 polze de 2'5 kV/ 200 Ω/ 25 µF durant 4-5 msec.
- 3.- Afegir immediatament 0'8 ml de SOC (apartat 3.2) i deixar 1 hora en agitació (250 rpm) a 28°C.
- 4.- Plaquejar 100 µl de cultiu en plaques LB + kanamicina i rifampicina (apartats 3.2 i 3.3), i incubar a 28°C dos dies.
- 5.- Replaquejar les colònies en plaques LB/kan/rif noves i incubar a 28°C dos dies.
- 6.- Inocular diferents colònies en 10 ml de LB/kan/rif i deixar o/n a 28°C. Procedir amb la transformació de maduixera.

Transformació de la maduixera:

Procediment:

- 7.- Obtenir explants de fulla immadura de maduixera cv Calypso. Rentar els explants durant 10 minuts en aigua amb Tween 20 (2 o 3 gotes) per evitar la deshidratació durant la

manipulació, i llavors esterilitzar els explants en una solució d'aigua amb hipoclorit sòdic al 30 % (v/v) durant 30 minuts. Finalment fer tres rentats de 10 minuts en aigua destil·lada estèril.

- 8.- Cultivar en medi MS₃₀/BAP (+ citoquinina) 2-4 setmanes a 25°C.
- 9.- Subcultivar en medi MS₃₀/BAP/IBA (citoquinina + auxina) 2 setmanes a 25°C.
- 10.- A partir d'aquests explants estèrils es van obtenir els explants finals usats per la transformació, que són fragments de 0'5 cm² de fulla.
- 11.- Posar els discs de fulla en plaques amb ZN102 + AS amb el revers cap per amunt.
- 12.- Agafar el cultiu del punt 6 i centrifugar-lo 10' a 2.900 rpm i RT. Resuspendre el precipitat amb 1 ml de medi MS₃₀/AS líquid i després portar a una DO_{600 nm}= 0'2-0'9 en un volum màxim de 20 ml.
- 13.- Plaquejar els 20 ml en les plaques del punt 11 i incubar 20' a RT.
- 14.- Replaquejar les fulles en plaques ZN102/AS noves i incubar 3 dies a 24°C en la foscor.
- 15.- Plaquejar en medi selectiu ZN102/kan i incubar 3-4 setmanes a 24°C en llum. En aquest punt comencen a aparèixer les primeres plàntules.
- 16.- Passar les plàntules a medi ZN102/kan però amb la meitat de concentració d'antibiòtic, i deixar 3-4 setmanes més. Començaran a formar-se les primeres arrels.
- 17.- Un cop ben formades les plàntules, passar-les a medi ZN102 sense kanamicina, per assegurar-nos de l'absència de bacteris resistents a aquest antibiòtic en el medi.

Tampons i solucions:

- *Medi MS₃₀ ± BAP/IBA:* Medi MS (Murashige i Skoog, 1962) 2'2 g
Glucosa 15 g
Ajustar a 500 ml amb aigua.
Afegir 500 µl d'acetosiringona (AS) 100 mM.
Ajustar el pH a 5'2 amb KOH 0'1 M i esterilitzar per filtració.
Afegir BAP o IBA prèviament esterilitzats per filtració a una concentració final de 0'1 mg/l.
- *Medi ZN102 ± AS / ± kan:* Medi MS (Murashige i Skoog, 1962) 2'2 g
Phytigel 2 g
Ajustar a 450 ml amb aigua.
Afegir 100 µl de NAA 1 mg/ml i 2'25 ml de TDZ 1 mg/ml.
Ajustar el pH a 5'8 amb KOH 0'1M i autoclavar.
Afegir 50 ml de glucosa 30% (p:v), estèril per filtració.
Quan sigui necessari, afegir 100 µl d'acetosiringona (AS) 500 mM i 500 µl de kanamicina.

4. RESULTATS

4.1. Anàlisi de l'expressió de *Cel1* i *Cel2* durant la maduració mitjançant Northern-blot

Estudis anteriors realitzats al nostre laboratori havien permès l'aïllament de dos cDNAs de maduixa que codifiquen per dues endo- β -(1,4)-glucanases (EGases), comunament conegudes com a cel·lulases (Llop-Tous, 1997; Llop-Tous *et al.*, 1999). Aquests dos clons foren anomenats *Cel1* (AF051346) i *Cel2* (AF054615).

Tot i que *Cel1* i *Cel2* mostraven una expressió molt elevada en fruit madur, les característiques deduïdes de la seqüència d'ambdues EGases eren molt diferents. Així, mentre que l'EGasa codificada per *Cel1* mostrava una elevada homologia a nivell aminoacídic amb d'altres EGases de plantes, especialment amb *LeCel2* de tomàquet, l'EGasa codificada per *Cel2* presentava homologies significativament menors. La comparació de les seqüències aminoacídiques de les dues EGases de maduixa revelava només un 46% d'identitat entre elles, i permetia deduir algunes diferències importants pel que fa a l'estructura i modificacions postraduccionals.

Donat que disposàvem de dos clons que codificaven per EGases clarament divergents i altament expressades en el procés de maduració del fruit, i sabent que l'estovament de la maduixa és un dels principals factors que contribueixen al deteriorament post-collita del fruit, es va plantejar la necessitat de caracteritzar bioquímica i molecularment els dos enzims, amb l'objectiu final de determinar la

importància relativa de cadascun d'ells en el procés d'estovament associat a la maduració.

Per tal de caracteritzar l'acumulació dels trànscrips de *Cel1* i *Cel2* durant la maduració del fruit, es va fer un assaig per Northern-blot usant els clons sencers per obtenir la sonda. Els estadis utilitzats foren: M0, fruit verd; M1, fruit blanc; M2, fruit amb menys de la meitat de la superfície vermella; M3, fruit amb més de la meitat de la superfície vermella i M4, fruit completament vermell (figura 4.1.C).

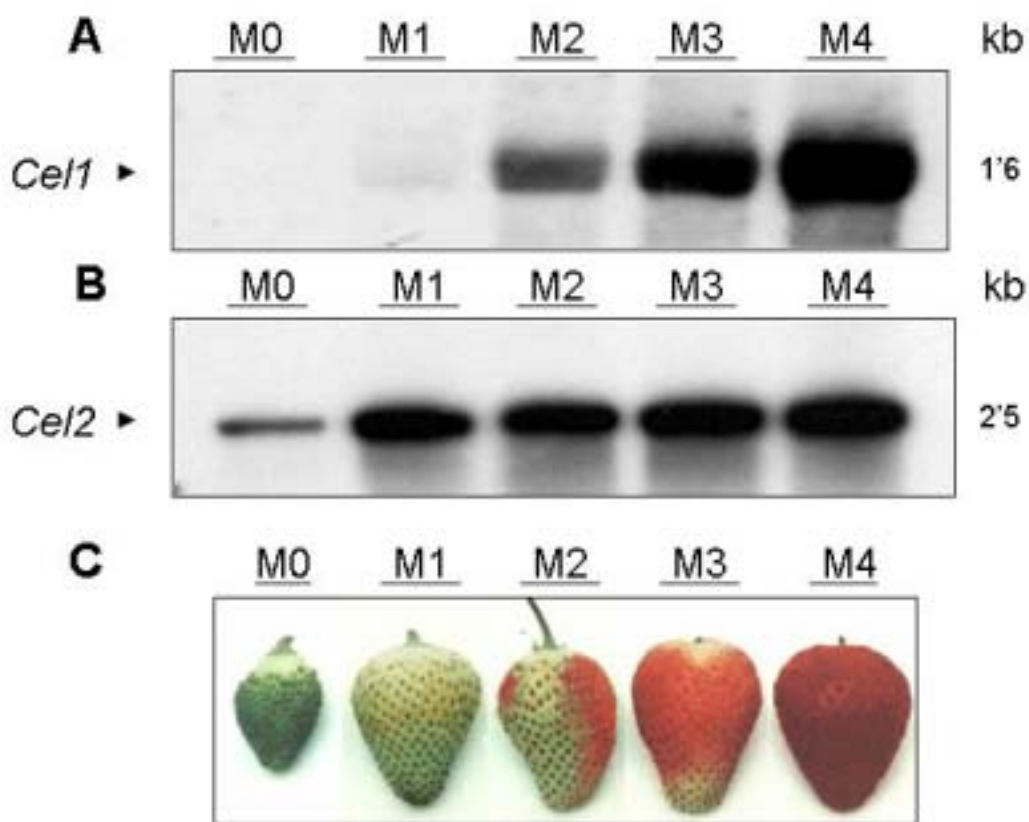


Figura 4.1: Anàlisi per Northern-blot de l'expressió de *Cel1* (A) i *Cel2* (B) en fruit, durant les diferents etapes de la maduració: carril M0, fruit verd; M1, fruit blanc; carril M2, fruit amb menys de la meitat de la superfície vermella; carril M3, fruit amb més de la meitat de la superfície vermella i M4, fruit completament vermell. Cada carril conté 11 µg de RNA total. Els dos Northern-blots es van exposar sis hores a -80°C. C Fruits de maduixa corresponents als diferents estadis de maduració utilitzats per aquesta memòria.

Tal i com es pot veure a la figura 4.1 (A i B), ambdós trànscrips s'expressaven fortament en fruit. No obstant això, el patró d'acumulació temporal

era diferent per a les dues EGases. El mRNA de *Cel2* s'expressava ja en fruit verd i el seu nivell augmentava al canviar a estadi M1, mantenint-se llavors en un nivell alt i constant fins el final del procés de maduració. A diferència de *Cel2*, el transcrit per *Cel1* no s'observava en fruit verd i quasi no es detectava en fruit blanc. L'expressió d'aquesta EGasa (*Cel1*) era detectable just a l'inici de la maduració pròpiament dita, és a dir, quan la síntesi d'antocians es fa evident. Llavors el mRNA s'acumulava gradualment durant el procés de maduració, fins assolir nivells màxims d'expressió en el fruit madur. Cal destacar que el temps d'exposició dels dos Northern-blots va ser de només sis hores, la qual cosa ens indica que aquests transcrits són força abundants.

Posteriorment, i amb la finalitat de determinar si l'expressió d'aquestes EGases era específica de fruit o en canvi, també es donava en altres teixits de la planta, es va analitzar per Northern-blot l'acumulació dels mRNAs corresponents en arrel, estoló, meristem apical, flor, fulla jove i fulla vella (figura 4.2).

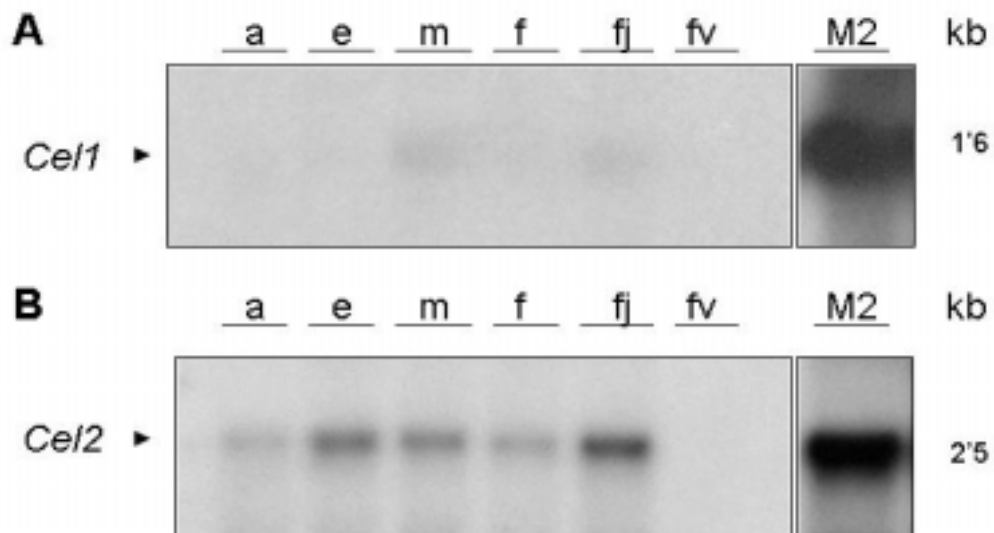


Figura 4.2: Anàlisi per Northern-blot de l'expressió de *Cel1* (A) i *Cel2* (B) en diferents teixits de la maduixera. Carril *a*, arrel; carril *e*, estoló; carril *m*, meristem; carril *f*, flor; carril *fj*, fulla jove; carril *fv*, fulla vella i *M2*, fruit amb menys de la meitat de la superfície vermella. Cada carril conté 11 µg de RNA total. El temps d'exposició de cada Northern-blot fou de 7 dies (A) i 15 hores (B) a -80°C.

Com s'observa a la figura 4.2, *Cel1* no s'expressava en altres teixits, i per tant es pot dir que presenta una expressió específica de fruit. Només l'increment del

temps d'exposició fins a set dies ens va permetre detectar una certa expressió basal en meristem, flor i fulla jove. El transcrit corresponent a *Cel2* en canvi, sí que es detectava clarament en altres teixits, especialment en teixits en creixement com són l'estoló, el meristem i sobretot fulla jove, a part del fruit. No obstant això, els nivells d'acumulació del mRNA en aquests òrgans era significativament inferior en comparació amb el fruit.

4.2. Producció d'antisèrum específic per *Cel1* i *Cel2*

El principal objectiu d'aquest treball consistia en dilucidar la funció de la proteïna EGasa derivada de cada clon, i això requeria d'un sistema pel reconeixement específic de cada enzim. Per tant, es procedí a l'obtenció d'anticossos policlonals per ambdues EGases.

Per produir l'antisèrum específic contra les proteïnes codificades per *Cel1* i *Cel2*, i anomenades *Cel1* i *Cel2* respectivament, es va utilitzar un sistema d'expressió heteròleg. El nostre laboratori disposava de dos sistemes d'expressió diferents. El primer sistema, que està basat en el vector pET28 (Novagen), produeix la proteïna recombinant fusionada a dos oligopèptids de sis histidines, necessaris per a la seva posterior purificació. L'altre sistema es basa en el vector pGEX-4T-3 (Amersham-Pharmacia), i produeix la proteïna recombinant fusionada a la proteïna glutatíon-S-transferasa (GST). Aquesta proteïna GST facilita la transcripció i traducció de la proteïna recombinant, i en permet la posterior purificació. Ambdós sistemes es van testar per valorar el rendiment proteic final obtingut. A continuació es detalla només el mètode que va resultar millor per a cada proteïna.

4.2.1. Obtenció de sèrum anti-*Cel1*

El sistema d'expressió seleccionat en aquest cas fou el basat en el vector d'expressió pET28, que permet induir la biosíntesi de la proteïna amb isopropil- β -D-tiogalactopiranosid (IPTG). Es van assajar dues construccions diferents (figura 4.3, A i B). En una construcció es va clonar tot el cDNA corresponent a la pauta oberta de lectura (ORF) de *Cel1* en el plasmidi pET28a (*Cel1*/ORF-pET28a). En l'altra es va clonar només un fragment del cDNA corresponent al clon *Cel1* al qual se li havien eliminat, mitjançant digestió amb enzims de restricció, 587 nucleòtids de la

regió 5', inclòs el pèptid senyal (Cel1/3'-pET28a). El vector utilitzat en aquest cas també va ser el pET28a. Tant Cel1/ORF-pET28a com Cel1/3'-pET28a es van usar per transformar cèl·lules BL21 d'*Escherichia coli* i se'n va induir l'expressió proteica.

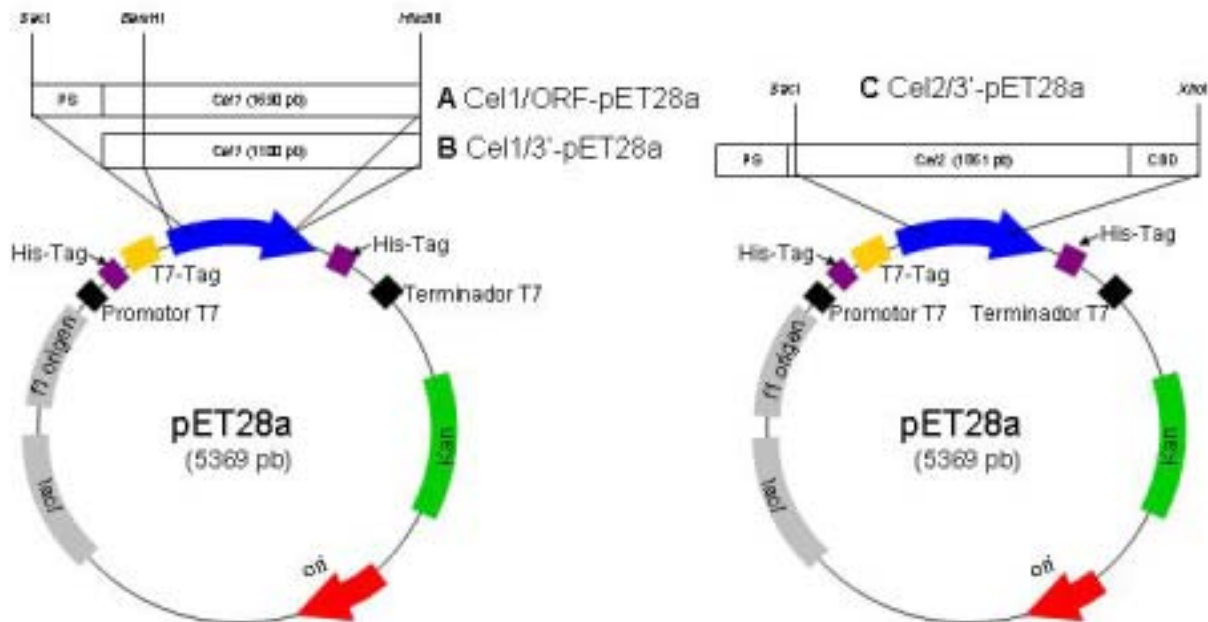


Figura 4.3: Esquema de les construccions emprades per a la sobreexpressió heteròloga de Cel1 i Cel2 en *Escherichia coli*. **A**, Cel1/ORF-pET28a; **B**, Cel1/3'-pET28a; **C**, Cel2/3'-pET28a. Es destaquen en la figura les regions més significatives del plasmidi: regió d'inserció del cDNA, regió promotora (promotor T7), regió de terminació (terminador T7), així com els llocs de reconeixement de l'anticòs monoclonal anti-T7-tag (T7-Tag) i les dues cues d'histidina (His-Tag). També indiquem a la figura l'origen de replicació del plasmidi (f1 origen), l'operó de regulació de la inducció (*lac*) i el gen de la resistència a kanamicina (*kan*). PS, pèptid senyal, CBD, *Cellulose Binding Domain*.

Primer es va fer una inducció a petita escala per tal de determinar la solubilitat, la temperatura i el temps d'inducció òptims. Donat que la proteïna induïda conté un oligopèptid del plasmidi que és reconegut específicament per l'anticòs monoclonal comercial anti-T7-tag, es va realitzar un Western-blot per quantificar els nivells de proteïna produïda. S'observà que ambdues proteïnes recombinants s'expressaven en quantitats suficients a partir de la segona hora d'inducció amb IPTG. Independentment de la temperatura i del temps d'inducció, es veié que les proteïnes es formaven en cossos d'inclusió, doncs coprecipitaven amb la resta del material cel·lular després de lisar i centrifugar els bacteris. Com que la immunització dels conills requereix la proteïna purificada, calia solubilitzar els

cossos d'inclusió. Per això es van provar dos productes diferents, la urea 6M i la guanidina-HCl 6M, i es va veure que ambdós reactius solubilitzaven la proteïna. Es va optar per la guanidina-HCl perquè és un agent solubilitzant més fort i permet disposar de més quantitat de proteïna final. El principal problema que presenta aquest producte és que cal que sigui eliminat prèviament a la immunització, la qual cosa s'aconsegueix mitjançant diàlisi. A més, la guanidina-HCl interfereix en els gels SDS-PAGE usats per quantificar i verificar la proteïna. Per tant, per tal d'eliminar-la completament es va fer una precipitació amb àcid tricloracètic abans de carregar les mostres en el gel.

Un cop solubilitzades, les proteïnes es van purificar mitjançant columnes d'afinitat i es van eluir usant concentracions creixents d'imidazol. Ambdues proteïnes eluïren a una concentració de 100 mM d'imidazol, tot i que en aquesta fracció també s'elüen altres proteïnes, com s'observa a la figura 4.4, A (carril g).

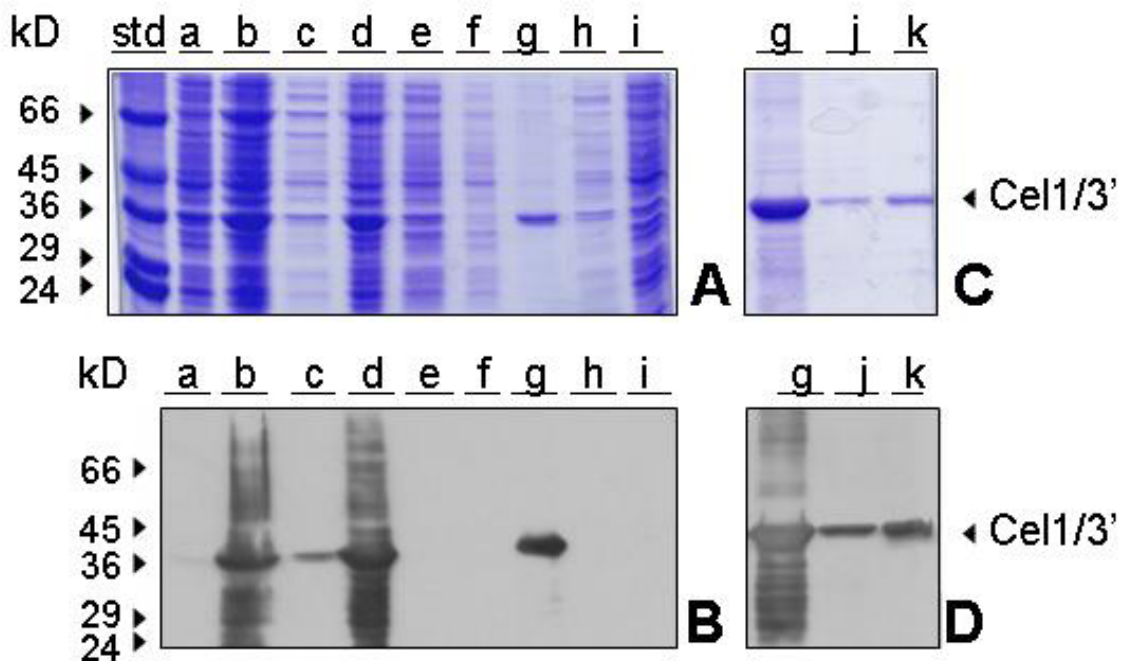


Figura 4.4: Procés de sobreexpressió i purificació de la proteïna derivada de Cel1/3'-pET28a. **A i C**, gels SDS-PAGE tenyits amb Coomassie Blue. *std*, carril dels marcadors de pes molecular de proteïnes. **B i D**, gels SDS-PAGE transferits a nitrocel·lulosa i hibridats amb l'anticòs anti-T7-tag. Carrils *a* i *b*, cultiu bacterià total després de 0 i 3 hores d'inducció amb IPTG respectivament; carril *c*, fracció soluble del cultiu induït; carril *d*, cossos d'inclusió solubilitzats amb guanidina-HCl 6M; carrils *e* i *f*, mostra no unida a la columna i primer rentat amb 20 mM d'imidazol, respectivament; carril *g*, eluït

amb 100 mM d'imidazol; carrils *h* i *i*, controls de sobreexpressió de pET28a sense insert; carril *j*, eluït amb 200 mM d'imidazol i carril *k*, proteïna purificada per escissió de banda.

En la figura 4.4 es mostra el procés de sobreexpressió i posterior purificació de Cel1/3'-pET28a. L'extracte proteic es sotmeté a un gel SDS-PAGE, i es va transferir a nitrocel·lulosa per hibridar-lo amb l'anticòs contra el T7-tag. Aquesta figura mostra la formació dels cossos d'inclusió i posterior solubilització de la proteïna amb guanidina-HCl 6M, així com la presència de proteïnes contaminants en la mostra eluïda amb 100 mM d'imidazol. Per això s'optà per fer un pas afegit de purificació, consistent en córrer un elevat volum de mostra en un gel SDS-PAGE i posteriorment escindir la banda de pes molecular esperat. Aquesta banda es trossejà en fragments molt petits i es va solubilitzar en PBS1X. Després de quantificar-ne la proteïna, es van preparar diferents alíquotes de 300 µg de proteïna total per a les successives immunitzacions. L'antisèrum definitiu es va extreure en el moment en què es va veure una millor resposta immunològica envers la mateixa proteïna recombinant purificada.

Posteriorment es van testar els dos anticossos derivats de Cel1/ORF-pET28a i Cel1/3'-pET28a vers un extracte proteic total de maduixa en estadi M4 per tal de determinar quin anticòs presentava un millor títol. Després de nombrosos assaigs, la dilució d'anticòs escollida pel reconeixement de la proteïna codificada per Cel1 sobre extractes proteics de maduixa crus fou de 1:300. De forma sorprenent però, es va veure que els dos anticossos presentaven una immunoreactivitat diferent sobre un mateix extracte (figura 4.5). Donat que les proteïnes utilitzades per a la immunització només es diferenciaven en la regió 5' i procedien d'un mateix clon, es demostrava que la immunogenecitat depenia de la regió escollida per la construcció.

Encara que tots dos anticossos hibridaven amb una proteïna que presentava el pes molecular aparent (PMA) predit per Cel1 (54 kD), l'anticòs contra Cel1/3'-pET28a reconeixia aquesta proteïna de forma molt més específica que l'anticòs produït contra Cel1/ORF-pET28a. Aquest segon anticòs reconeixia amb la mateixa intensitat altres proteïnes de pes molecular superior.

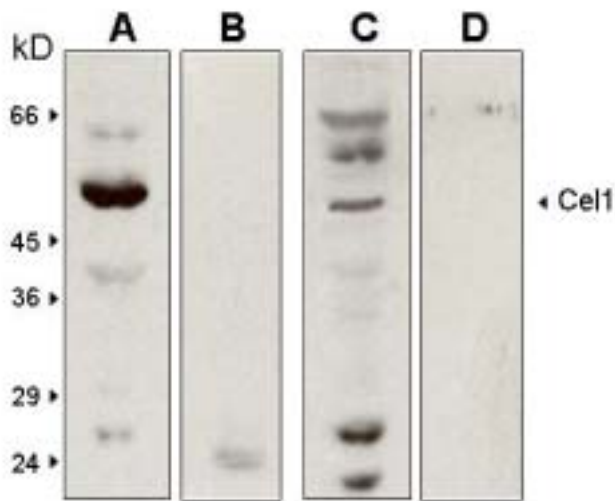


Figura 4.5: Immunoreconeixement de la proteïna Cel1 procedent d'un extracte proteic total de maduixa en estadi M4 mitjançant Western-blot. Es van córrer en paral·lel quatre mostres de 100 µg de proteïna total en un SDS-PAGE, que es va transferir a nitrocel·lulosa. Posteriorment es va hibridar amb l'anticòs anti-Cel1/3' (A) o amb anti-Cel1/ORF (C), amb una dilució de 1:300. B i D, igual que A i C, però hibridant amb el sèrum preimmune corresponent a anti-Cel1/3' o anti-Cel1/ORF respectivament.

4.2.1.1. Traducció *in vitro* de Cel1/ORF i hibridació amb anti-Cel1/3'

Per tal de descartar el fet que els dos anticossos presentessin una immunoreactivitat diferent deguda a un error de construcció o a contaminació, es va procedir amb el següent experiment. Donat que l'anticòs anti-Cel1/3' reconeixia més específicament una proteïna del pes molecular aparent esperat que no pas l'anticòs anti-Cel1/ORF, es va fer una traducció *in vitro* de la proteïna Cel1 a partir de la construcció usada per fer l'anticòs anti-Cel1/ORF. El fet d'usar aquesta construcció i no l'altra com a proteïna a reconèixer es deu a què així evitàvem la lògica hibridació amb la mateixa proteïna utilitzada per fer la immunització amb Cel1/3'. Mitjançant el kit comercial *TNT® LYSATE COUPLED TRANSCRIPTION/TRANSLATION* de PROMEGA, que permet usar el promotor T7 present al plasmidi pET28, es va fer una traducció *in vitro* usant ³⁵S-Metionina per tal de determinar el pes molecular del producte de la traducció proteica. Paral·lelament es va fer una reacció no radioactiva usant metionina no marcada, per tal de fer-ne posteriorment un anàlisi per Western-blot (figura 4.6).

Com que l'anticòs anti-Cel1/3' també reconeixia de forma específica el producte proteic de Cel1/ORF-pET28a, es va descartar que les construccions fossin errònies o poguessin estar contaminades, i es va demostrar que la diferent immunoreactivitat que presentaven ambdós anticossos era conseqüència d'una immunogenecitat diferent de les dues proteïnes recombinants. Probablement la proteïna derivada de Cel1/ORF-pET28a mostrava epítops comuns amb altres

proteïnes abundants presents a l'extracte proteic total. Fou a partir d'aquests resultats que s'escollí l'anticòs anti-Cel1/3' per realitzar els Western-blot posteriors, doncs aquest reconeixia la proteïna Cel1 en un extracte proteic total de forma més específica i amb menys soroll de fons que no pas anti-Cel1/ORF.

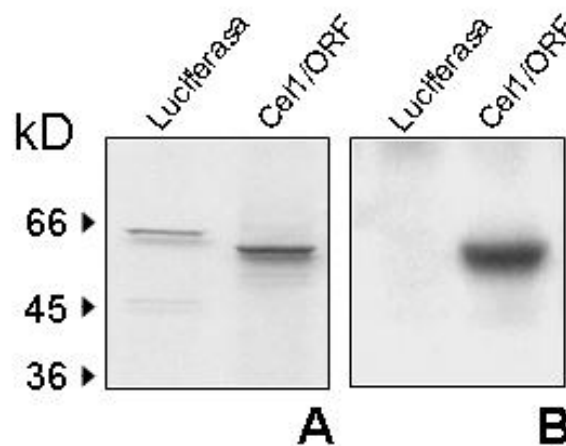


Figura 4.6: Traducció *in vitro* de Cel1 (carril *Cel1/ORF*) a partir de la construcció *Cel1/ORF-pET28a*. En **A** es mostra la fluorografia del SDS-PAGE del producte de la traducció, usant ^{35}S -Metionina com a precursor proteic (2 μl de mostra) i en **B** es mostra el Western-blot corresponent al SDS-PAGE del producte de traducció no radioactiu (25 μl de mostra), hibridat amb l'anticòs produït contra *Cel1/3'* (1:300). En el carril *Luciferasa* hi ha el gen codificant per la proteïna luciferasa, usada com a control positiu en la reacció de traducció.

4.2.2. Obtenció de sèrum anti-Cel2

L'estratègia utilitzada inicialment per Cel2 fou la mateixa que amb Cel1, doncs també es van fer dues construccions diferents. Primer es va intentar sobreexpressar el clon sencer en pET28b (*Cel2/ORF-pET28b*), i posteriorment es va clonar en pET28a un fragment de cDNA de *Cel2* (*Cel2/3'-pET28a*, figura 4.3,C) corresponent al clon *Cel2*, al qual se li havien eliminat, mitjançant digestió amb enzims de restricció, 719 nucleòtids de la regió 5', inclòs el pèptid senyal. A diferència de Cel1 però, la construcció *Cel2/ORF-pET28b* no va donar un producte proteic útil per a la immunització, doncs es sintetitzava una proteïna de pes molecular inferior a l'esperat, i per tant, es tractava probablement d'un producte truncat. Posteriorment es va intentar sobreexpressar Cel2 en el vector pGEX-4T3, però tampoc va reeixir.

Així doncs, per produir l'anticòs contra Cel2 s'utilitzà l'única construcció Ce2/3'-pET28a, amb la que es van transformar cèl·lules BL21 d'*Escherichia coli* i se'n va induir l'expressió. Tal com es va fer amb Cel1, primer es va fer una inducció a petita escala per tal de determinar les condicions òptimes d'inducció. Cel2 presentava un màxim d'inducció a les 12 hores després d'afegir el IPTG i, tal com passava amb Cel1 es formava en cossos d'inclusió, que es solubilitzaren amb guanidina-HCl 6M. Quan es va intentar purificar la proteïna mitjançant columnes d'afinitat es veié que Cel2 s'unia molt dèbilment al substrat (figura 4.7, A).

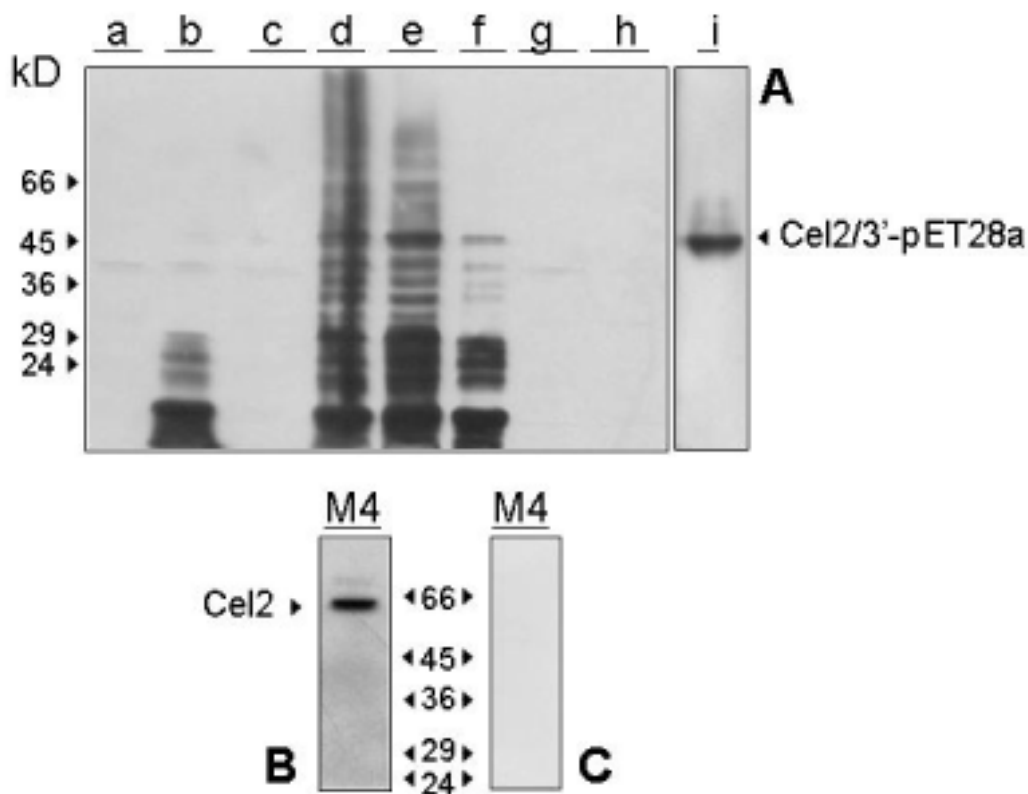


Figura 4.7: **A.** Gel SDS-PAGE del procés de sobreexpressió i purificació de la proteïna Cel2/3'-pET28a, transferit a nitrocel·lulosa i hibridat amb l'anticòs anti-T7-tag. Carrils a i b, cultiu bacterià total després de 0 i 12 hores d'inducció amb IPTG respectivament; carril c, fracció soluble del cultiu induït; carril d, cossos d'inclusió solubilitzats amb guanidina-HCl 6M; carrils e i f, mostra no unida a la columna i eluït amb 100 mM d'imidazol; carrils g i h, controls de sobreexpressió de pET28a sense insert; carril i, proteïna purificada per escissió de banda. **B.** Reconeixement de la proteïna Cel2 procedent d'un extracte proteic total de maduixa en estadi M4 mitjançant Western-blot. Es van córrer 100 µg de proteïna total en un SDS-PAGE que es va transferir a nitrocel·lulosa. Posteriorment es va hibridar la membrana amb l'anticòs anti-Cel2/3' a una dilució de 1:300. **C,** igual que B, però hibridant amb el sèrum preimmune corresponent a anti-Cel2/3'.

Primer es va pensar que el problema residia en l'absència de les poli-histidines en la proteïna resultant, però utilitzant el sistema *INDIATM HisProbe-HRP* (PIERCE) se'n va demostrar la presència (figura 4.8). Aquest sistema permet el reconeixement dels oligopèptids d'histidina mitjançant un substrat níquelat, que al tenir afinitat per les histidines i estar conjugat a peroxidasa de rave (*Horse Radish Peroxidase*), en permet el revelat per quimioluminiscència.

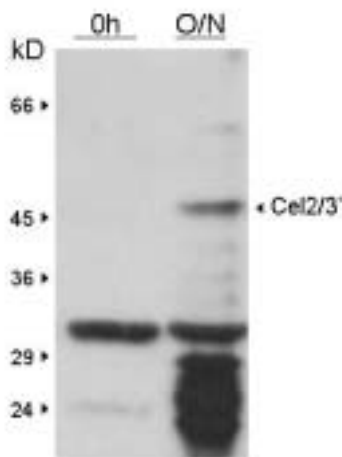


Figura 4.8: Detecció de les poli-histidines per quimioluminiscència en el producte proteic de Cel2/3'. Carril 0h, cultiu bacterià després de 0 hores d'inducció; carril O/N, cultiu bacterià després de 12 hores d'inducció proteica. Després del SDS-PAGE, el gel fou transferit a nitrocel·lulosa i s'incubà amb *INDIATM HRP HisProbe-HRP* (Pierce) seguint el protocol comercial.

Tot i que teníem les histidines presents, com que s'unien dèbilment al sulfat de níquel present a la columna d'afinitat, es va optar per modificar el protocol de purificació respecte a l'utilitzat per Cel1. Així, es va augmentar la quantitat de resina i de cultiu aplicat a la columna, el temps d'incubació substrat-resina es va incrementar, i es van eliminar els passos de rentat de la columna. A més, com que la unió de la cua 6XHis-tag (poli-histidina) a la resina de níquel és *pH*-dependent, es va decidir basificar els tampons fins a *pH* 9. Així, com que el *pH* s'allunyava del *pKa* de les poli-histidines, s'evitava la protonació d'aquestes i la seva conseqüent dissociació del níquel. Finalment es va fer un pas de purificació consistent en l'escissió de la proteïna correguda en un gel SDS-PAGE, tal i com s'havia fet per Cel1. Amb això es va aconseguir obtenir suficient proteïna per immunitzar els conills, tot i que la quantitat produïda en cada sobreexpressió era molt petita i va caldre fer varies sobreexpressions.

Després de quantificar la proteïna, es van preparar diferents alíquotes de 150 µg de proteïna total per a les successives immunitzacions. L'antisèrum definitiu es va extreure en el moment en què es va veure una millor resposta immunològica envers la mateixa proteïna recombinant purificada.

Aquest anticòs anti-Cel2 es testà vers un extracte proteic total de maduixa en estadi M4 per tal de determinar quin títol presentava. Després de nombrosos assaigs, la dilució d'anticòs escollida pel reconeixement de la proteïna codificada per Cel2 sobre extractes proteics de maduixa crus, fou de 1:300. Es va veure que l'especificitat d'aquest anticòs era limitada, doncs requeria treballar amb quantitats de proteïna total petites per reduir el soroll de fons. Probablement això era degut a què la proteïna usada per a les immunitzacions era poc immunogènica o senzillament, insuficient per produir una resposta idònia. Malgrat això, disminuint la quantitat de proteïna total carregada i afegint un agent saturant (3% BSA o 6% de llet en pols) a la solució d'incubació de l'anticòs primari, es podien obtenir uns Western-blots suficientment específics (figura 4.7, B).

Per tal de comprovar si els dos anticòssos anti-Cel1 i anti-Cel2 produïts presentaven reaccions creuades de reconeixement, es va fer un altre Western-blot amb les dues proteïnes sobreexpressades i purificades, i es va hibridar amb els dos anticòssos. Com es pot veure a la figura 4.9, per un mateix temps d'exposició cada anticòs reconeixia la proteïna a partir de la qual havia estat produït, però no l'altra.

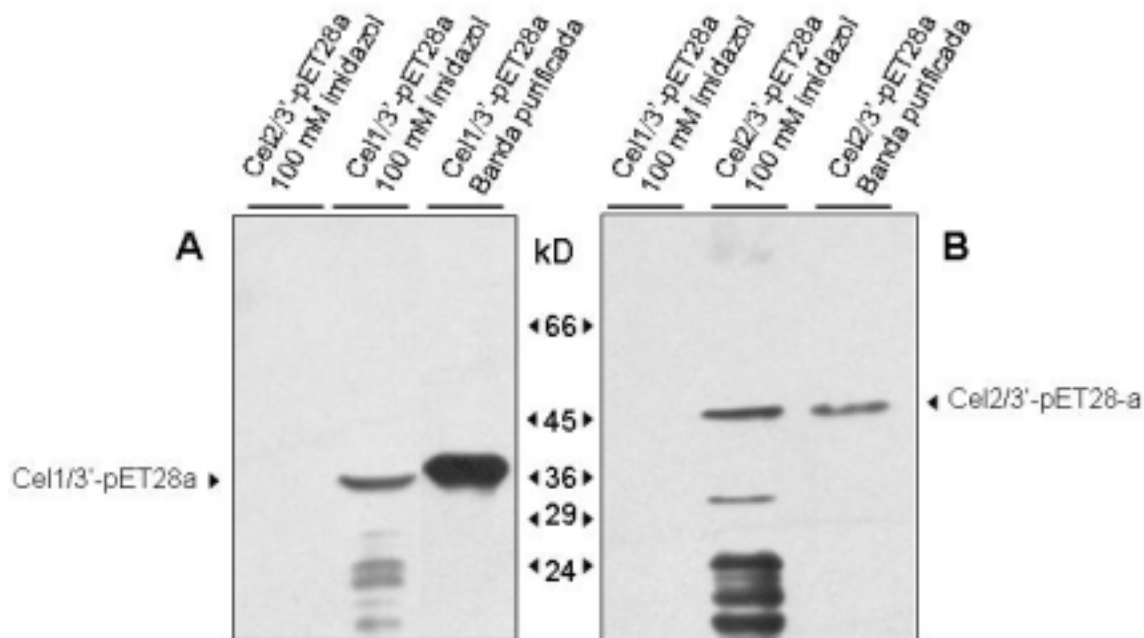


Figura 4.9: Western-blot dels productes de sobreexpressió i purificació proteica de Cel1 i Cel2 hibridats amb anti-Cel1/3' (A) o anti-Cel2/3' (B).

4.3. Extracció d'EGases de fruit de maduixa (cv PAJARO)

Per a la determinació del patró d'acumulació de les proteïnes Cel1 i Cel2 en maduixa es requeria d'un mètode d'extracció que permetés alliberar les dues EGases de la paret cel·lular. Amb aquesta finalitat es van assajar diferents protocols d'extracció desenvolupats al nostre laboratori o descrits a la bibliografia (Domínguez-Puigjaner *et al.*, 1992; Ferrarese *et al.*, 1995; Harpster *et al.*, 1998 i Woolley *et al.*, 2001). El primer sistema vàlid trobat fou el descrit per Domínguez-Puigjaner *et al.* (1992). Aquest mètode utilitza un tampó d'extracció que conté SDS i 2- β -mercaptoetanol, seguit d'un rentat de l'extracte amb fenol/Tris, obtenint per tant proteïnes completament desnaturalitzades. La mateixa presència d'agents desnaturalitzants evita l'acció de proteases i per tant, la degradació proteica. Aquest mètode permetia l'obtenció d'extractes proteics de gran qualitat i que contenien alhora les dues proteïnes, Cel1 i Cel2, i el vam anomenar mètode dels **fenols**.

El segon mètode seleccionat, i desenvolupat al nostre laboratori, consistia en l'extracció de les proteïnes solubles (fracció **soluble**) mitjançant una sèrie de rentats amb aigua, seguit d'una extracció de les proteïnes de la fracció de paret cel·lular (fracció **cw**) mitjançant un tampó d'elevada concentració salina (1 M KCl i 100 mM de CaCl_2). Aquest mètode, que anomenàrem **KCl/CaCl₂**, només extreia la proteïna Cel1, però tenia l'avantatge d'utilitzar un tampó no desnaturalitzant, i per tant, obteníem la proteïna en la seva conformació nadiua i activa enzimàticament.

El tercer i últim protocol escollit (**CTAB**) fou el descrit per Woolley *et al.* (2001). Aquest mètode, publicat en l'última etapa d'aquest treball, es va utilitzar per a l'anàlisi de totes les plantes transgèniques. El principal avantatge que té és la seva rapidesa, doncs permet l'extracció i l'anàlisi de múltiples mostres en poc temps. A més, al estar basat en l'ús d'un detergent no desnaturalitzant, el CTAB, permet aconseguir extractes proteics nadius. No obstant això, el mètode CTAB es mostrà poc eficient en l'extracció de Cel2. Posteriors modificacions del protocol original comportaren una millora en l'extracció per aquesta proteïna.

Per tal d'extreure la proteïna Cel2 en forma conformacionalment activa i soluble, es va procedir a modificar el mètode descrit per Woolley *et al.* (2001), doncs modificacions del mètode del KCl/CaCl₂ no donaren cap resultat. Per això es van fer diferents assaigs usant agents solubilitzants (2 M urea), agents reductors

(0'1% de 2- β -mercaptoetanol) i detergents no iònics (1% Triton X-100) en baixes concentracions. Com a resultat d'això, es veié que només el Triton X-100 alliberava Cel2, i únicament quan s'usava a una concentració igual o superior al 1% (figura 4.10). Donat que concentracions superiors al 2% podien alterar l'activitat enzimàtica, així com pertorbar el corrent electroforètic normal en gels d'acrilamida, es va escollir una concentració de detergent que fos un compromís entre la màxima solubilització proteica i la mínima desnaturalització. Així, fou aquest mètode el que s'usà posteriorment per analitzar l'activitat EGasa de les plantes transgèniques amb una construcció antisentit per Cel2 i també pels gels nadius per Cel2.

A la figura 4.10 es mostra un Western-blot comparatiu dels mètodes principals d'extracció per EGases usats en aquest treball.

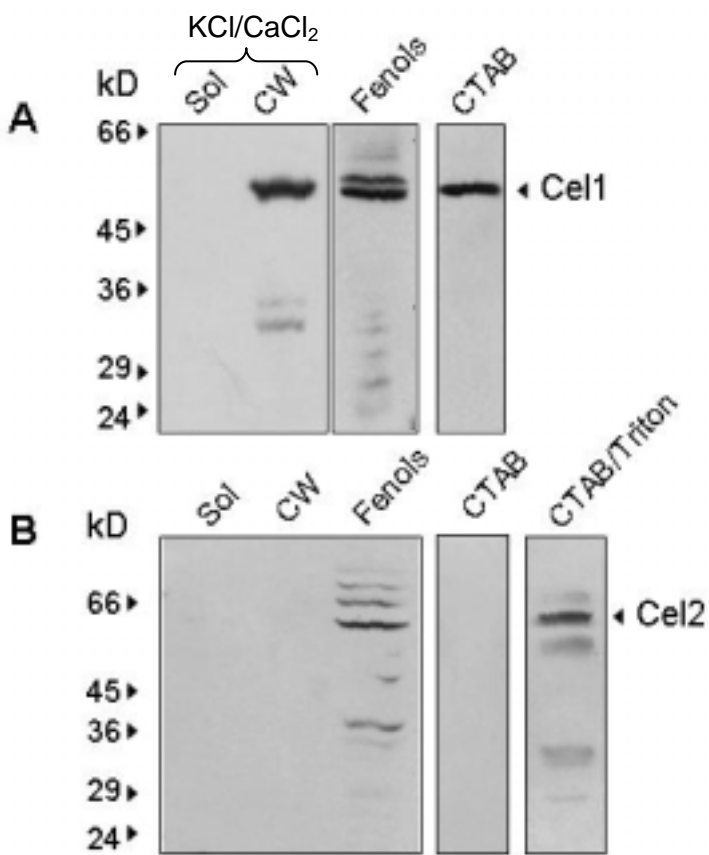


Figura 4.10: Western-blot de diferents extractes proteics totals de maduixa en estadi M4 hibridats amb anti-Cel1 (A) o anti-Cel2 (B). Carril *Sol*, extracció amb KCl/CaCl₂, fracció soluble; carril *CW*, extracció amb KCl/CaCl₂, fracció de paret cel·lular; carril *Fenols*, extracció amb fenols; carril *CTAB*, extracció amb CTAB; i carril *CTAB/Triton*, extracció amb CTAB + 1% Triton X-100. 50 μ g de proteïna es van resoldre en un gel SDS-PAGE 12'5% A+B, que es va transferir a nitrocel·lulosa i hibridar amb l'anticòs corresponent.

Com es pot veure en aquesta figura, les extraccions amb CTAB i KCl/CaCl₂ hibridades amb anti-Cel1, donaven un patró molt semblant i quasi no presentaven soroll de fons. Mentrestant, l'extracte fenòlic presentava un major soroll de fons i, a

més, hi havia reconeixement de dues bandes: una que tenia el pes molecular aparent esperat, mentre que l'altre era de pes molecular lleugerament superior. A més, en l'extracció amb KCl/CaCl₂ es veia com Cel1 només es trobava a la fracció de proteïnes insolubles, associada a paret cel·lular. La hibridació amb anti-Cel2 demostrava que Cel2 només s'extreia per mitjà del mètode dels fenols i el mètode CTAB/Triton. El mètode KCl/CaCl₂ no extreia Cel2, mentre que el mètode CTAB l'extreia molt lleugerament, doncs sobreexposant els Western-blots amb aquests extractes es detectava senyal d'hibridació d'una banda amb el pes molecular corresponent a Cel2.

El criteri de selecció del mètode d'extracció per als experiments que es descriuen a continuació es basà en tres factors principals:

- Disponibilitat cronològica del mètode.
- Utilitat de l'extracte. Segons es volgués la proteïna en estat nadiu o desnaturalitzada.
- Possibilitat d'extracció de només una o dues EGases (Cel1 i/o Cel2).

4.4. Patró d'acumulació de les EGases Cel1 i Cel2 en maduixa

Els anticossos obtinguts contra les EGases Cel1 i Cel2 foren utilitzats per estudiar l'acumulació de cadascuna de les dues proteïnes en el fruit de la maduixa durant el procés de maduració. S'analitzaren extractes proteics obtinguts amb el mètode dels fenols a partir de fruits de maduixa en cinc estadis de maduració diferents: M0, fruit verd; M1, fruit blanc; M2, fruit amb menys de la meitat de la superfície vermella; M3, fruit amb més de la meitat de la superfície vermella i M4, fruit completament vermell. En cada cas es van resoldre 50 µg de proteïna total en gels d'acrilamida al 12'5% i després de ser transferits a membranes de nitrocel·lulosa i hibridar amb l'anticòs corresponent, es van revelar per quimioluminiscència.

4.4.1. Patró d'acumulació de Cel1 en maduixa

Els resultats d'aquestes anàlisis es mostren a la figura 4.11, on es pot veure l'acumulació de dues bandes immunoreactives d'aproximadament 50 i 55 kD.

Aquestes dues bandes es corresponen a les bandes prèviament descrites a la figura 4.10, A (carril Fenols). En els estadis primerencs no es detecta la presència de proteïna. L'acumulació de Cel1 comença a l'estadi M2, coincidint amb l'inici de la síntesi d'antocians i amb el començament de l'estovament del fruit, i continua fins arribar a l'estadi M4, on el fruit ja és completament madur. Aquest pes molecular aparent coincideix amb el pes molecular teòric predit a partir de la seqüència aminoacídica deduïda. Així, el pes molecular teòric per la proteïna Cel1 processada madura és de 51'5 kD, molt similar a la proteïna de baix pes molecular i que presenta una immunoreactivitat més gran. L'altra banda, de pes molecular superior i hibridació menor, podria correspondre a la proteïna no processada, que conserva el pèptid senyal, i que té un pes molecular teòric de 54'9 kD. Cal destacar que aquest patró d'acumulació proteic concorda plenament amb el patró d'acumulació observat pel mRNA mitjançant anàlisi per Northern-blot (veure apartat 4.1).

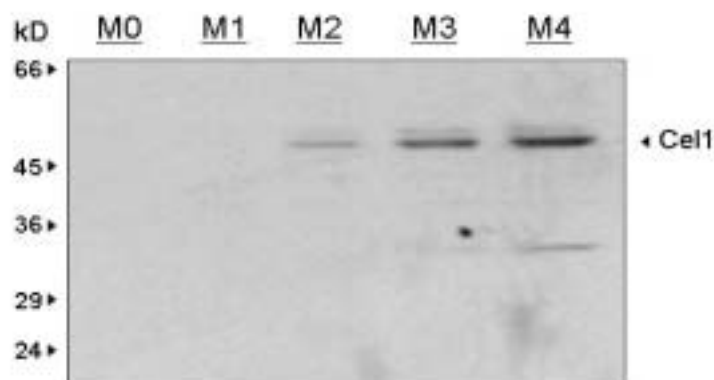


Figura 4.11: Immunodetecció de Cel1 sobre extractes proteics totals de fruit de maduixa en diferents estadis de maduració. Carril *M0*, fruit verd; *M1*, fruit blanc; carril *M2*, fruit amb menys de la meitat de la superfície vermella; carril *M3*, fruit amb més de la meitat de la superfície vermella i *M4*, fruit completament vermell. 50 µg de proteïna es van resoldre en un gel SDS-PAGE 12'5% A+B, que es va transferir a nitrocel·lulosa i finalment es va hibridar amb l'anticòs anti-Cel1.

4.4.2. Patró d'acumulació de Cel2 en maduixa

A la figura 4.12 es mostra el comportament de la proteïna Cel2 al llarg de la maduració, usant els mateixos extractes proteics que per la proteïna Cel1. Es va detectar senyal immunoreactiu ja en l'estadi verd (*M0*), en forma d'una banda de pes molecular estimat de 64 kD. Aquest pes coincideix amb el pes molecular deduït a partir de la seqüència aminoacídica per a la proteïna Cel2 processada (65'2 kD),

és a dir, sense el pèptid senyal de trànsit cap a l'espai extracel·lular. Tal i com passava amb *Cel1*, el patró d'acumulació concorda amb el patró d'expressió de *Cel2* determinat mitjançant Northern-blot (apartat 4.1). Així, hi ha un lleuger increment en l'acumulació de proteïna *Cel2* en el pas de maduixa verda (M0) a maduixa blanca (M1), i posteriorment, la proteïna es manté en nivells més o menys constants i elevats durant tot el procés de maduració. La banda menys immunoreactiva d'alt pes molecular presenta un pes molecular aparent molt proper al que esperaríem per la proteïna *Cel2* sense processar, 67'9 kD.

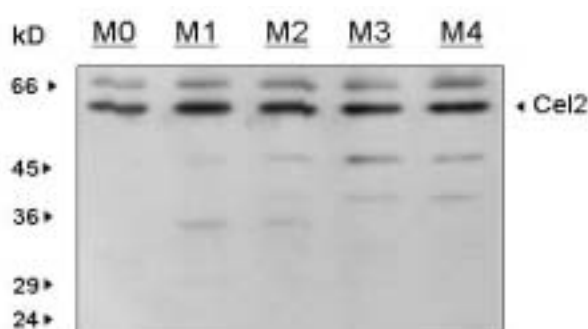


Figura 4.12: Immunodetecció de *Cel2* sobre extractes proteics totals de fruit de maduixa en diferents estadis de maduració. Carril *M0*, fruit verd; *M1*, fruit blanc; carril *M2*, fruit amb menys de la meitat de la superfície vermella; carril *M3*, fruit amb més de la meitat de la superfície vermella i *M4*, fruit completament vermell. 50 µg de proteïna es van resoldre en un gel SDS-PAGE 12'5% A+B, que es va transferir a nitrocel·lulosa i hibridar amb l'anticòs anti-*Cel2*.

4.5. Regulació hormonal de l'expressió de *Cel1* i *Cel2* en maduixa

Els fruits s'han classificat com a climatèrics o no-climatèrics segons el model de respiració que presenten durant el procés de maduració i la capacitat per sintetitzar etilè de forma autocatalítica. Així, els fruits climatèrics es caracteritzen per un increment en la respiració i en la taxa de producció d'etilè just a l'inici de la maduració, fets que no es produeixen en els fruits no-climatèrics. Addicionalment, l'aplicació d'etilè exogen a fruits climatèrics en estat immadur resulta en un avançament de la maduració, mentre que això no succeeix en els fruits no-climatèrics. En el cas dels fruits climatèrics, l'etilè és responsable de la majoria de canvis típics de la maduració, com l'estovament del fruit, la síntesi de pigments o la degradació de clorofil·les. Per això es considera que l'etilè és l'hormona que inicia i coordina aquests esdeveniments.

Dins dels fruits no-climatèrics, la maduixa és el fruit més estudiat en relació amb la regulació hormonal de la maduració. La seva estructura única, és un receptacle floral engruixit amb les vertaderes llavors o aquenis productors d'auxines a l'exterior del fruit, l'han feta un sistema molt útil per estudiar el paper d'aquestes hormones en la maduració, ja que els aquenis poden eliminar-se de forma relativament senzilla i poc lesiva pel fruit. El fet que la concentració d'auxines pugui ser el principal factor hormonal que influeixi en la maduració del fruit, provocà la necessitat de conèixer com afectaven aquestes hormones a *Cel1* i *Cel2*.

4.5.1. Efecte de les auxines sobre les EGases *Cel1* i *Cel2*

Per investigar el paper de les auxines endògenes sobre l'acumulació dels transcrits *Cel1* i *Cel2* i de les respectives proteïnes, els aquenis es van eliminar manualment de fruits verds (M0) en la mateixa planta. Els fruits desaquenitzats varen ser tractats amb una solució aquosa de l'auxina sintètica NAA o amb la mateixa solució sense auxina (control desaquenitzat). Paral·lelament s'utilitzaren fruits no desaquenitzats com a controls no tractats.

Llavors s'analitzà l'expressió 24, 48, 72 i 96 hores després de l'inici del tractament. Com es pot veure en els Northern-blots de la figura 4.13, els gens per les dues EGases estudiades estan sota control negatiu de les auxines. Així, es va detectar un clar increment de l'expressió de *Cel1* i *Cel2* en fruits desaquenitzats, mentre que aquesta expressió no augmentava en fruits del mateix estadi desaquenitzats però suplementats amb l'auxina sintètica NAA. En els fruits control amb aquenis i sense tractar pràcticament no es va apreciar variació de l'expressió.

Com es pot veure a la figura 4.13 (A), en fruits desaquenitzats i no tractats amb auxines es produïa un increment d'expressió de *Cel1*, tot i que aquest només era visible 96 hores després de treure els aquenis. L'aplicació de l'auxina sintètica NAA inhibia aquesta inducció en fruits desaquenitzats, i aquests fruits mostraven nivells d'expressió similars als inicials. En *Cel2* en canvi (figura 4.13.B), la desaquenització provocava un increment més ràpid en l'expressió i, curiosament, l'aplicació exògena de NAA no inhibia totalment aquest augment. Cal tenir present però, que en fruits control no desaquenitzats l'expressió de *Cel2* ja augmenta de forma natural en les 96 hores que dura l'experiment (figura 4.1).

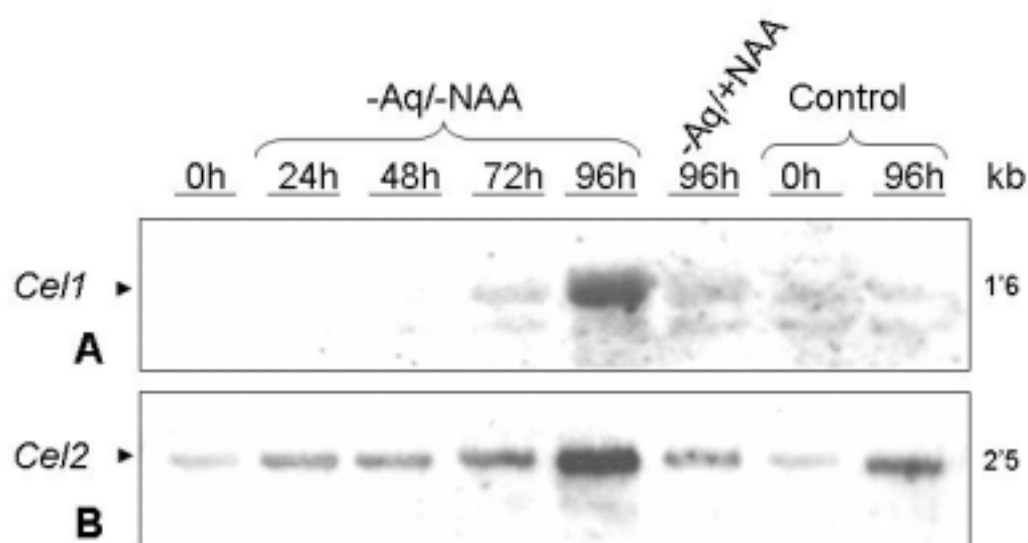


Figura 4.13: Efecte de l'eliminació dels aquenis en l'expressió dels gens *Cel1* (A) i *Cel2* (B) en maduixa. Anàlisi per Northern-blot de 11 μ g de RNA total aïllat de fruits en estadi M0 després d'eliminar els aquenis. Carrils -Aq/-NAA; 0h, 24h, 48h, 72h i 96h; maduixes desaquenitzades i no tractades amb NAA, 0, 24, 48, 72 i 96 hores després de l'eliminació dels aquenis. Carril -Aq/+NAA 96h, fruits en estadi M0 desaquenitzats i suplementats amb 2 mM de NAA i recollits després de 96 h. Carrils Control 0 i 96h, fruits control amb aquenis després de 0 i 96 hores respectivament. El Northern-blot hibridat amb *Cel1* es va exposar 48 hores a -80°C , mentre que el Northern-blot corresponent a *Cel2* es va exposar 24 hores a -80°C .

Es va analitzar per Western-blot l'acumulació de les proteïnes *Cel1* i *Cel2* per tal de veure si l'efecte de les auxines en l'expressió de *Cel1* i *Cel2* es traduïa en un efecte sobre l'acumulació proteica. Per a la determinació de la proteïna *Cel1* es va haver d'incrementar la quantitat de proteïna carregada en el gel, així com el temps d'exposició, respecte el Western-blot de la figura 4.11, doncs el fet de treballar amb fruits verds on l'expressió és quasi nul·la, dificultava molt la immunodetecció. Per *Cel2* en canvi, el problema fou l'expressió basal, doncs en fruits verds ja es detecta aquesta proteïna.

L'augment d'expressió de *Cel1* i *Cel2* observat en la figura 4.13 no es correlacionava amb un augment de l'acumulació de la proteïna de la mateixa magnitud. Malgrat tot, es va detectar una reducció tant de la proteïna *Cel1* com de *Cel2* en fruits desaquenitzats i tractats amb NAA durant 96 hores respecte els fruits desaquenitzats no tractats (figura 4.14).

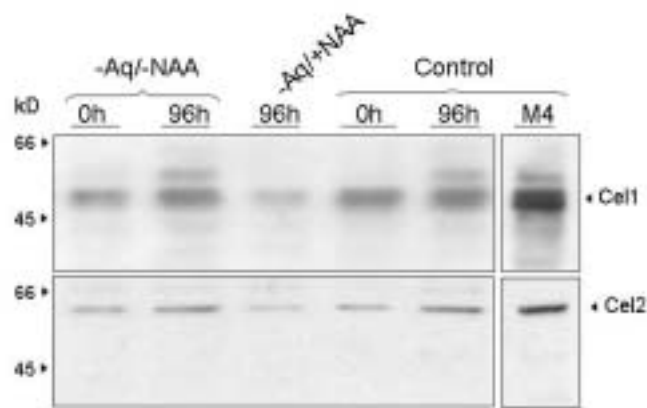


Figura 4.14: Efecte de la desaquenització i/o tractament amb NAA sobre l'acumulació de proteïna Cel1 (A) i Cel2 (B) en maduixa. Anàlisi per Western-blot de 100 µg de proteïna total (extractes fenòlics) de: fruits en estadi M0, 0 i 96 hores després d'eliminar els aquenis (carrils *-Aq/-NAA*, 0h i 96h); fruits en estadi M0 desaquenitzats, suplementats amb 2 mM de NAA i recollits després de 96 h carril (carril *-Aq/+NAA*, 96h); fruits control en estadi M0 després de 0 i 96 hores respectivament (carrils *Control* 0 i 96h) i fruits de maduixa en estadi M4 (carril *M4*, 50 µg de proteïna total). El film corresponent a Cel1 està sobreexposat per tal de poder detectar la proteïna en aquest estadi.

4.5.2. Efecte de l'etilè sobre les EGases Cel1 i Cel2

Tot i que la maduixa és un fruit típicament no-climatèric i per tant, la seva maduració no està visiblement afectada per l'etilè, alguns estudis realitzats sobre la conservació de maduixes demostren que atmosferes riques en etilè afavoreixen la pèrdua de fermesa del fruit (Wills i Kim, 1995; Tian *et al.*, 2000). Per altra banda, també s'ha publicat que tractaments amb 10-100 ppm d'etilè induïen un augment de RNA total en maduixa recol·lectada en estadi M1 i M2 (Luo i Liu, 1994). Així, encara que Abeles i Takeda (1990) van demostrar que l'aplicació d'etilè exògena no afectava l'activitat cel·lulasa total, nosaltres vam decidir aplicar etilè (100 ppm durant 48 hores) a maduixes en estadis M0 i M4 per estudiar l'efecte d'aquesta hormona en l'expressió de cada EGasa. A la figura 4.15 es veu com realment l'etilè no afectava gens l'expressió de *Cel1* i *Cel2* en les condicions i estadis utilitzats.

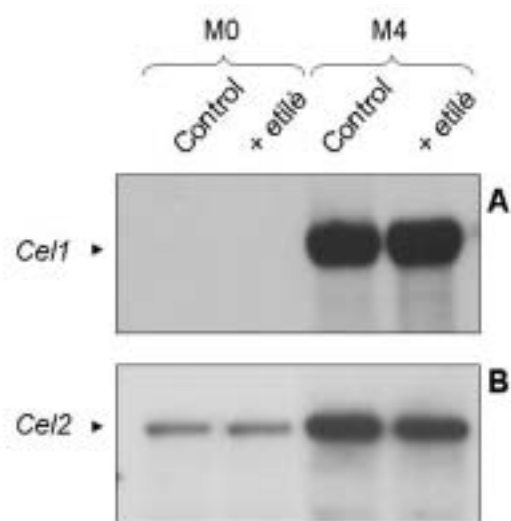


Figura 4.15: Efecte de l'etilè en l'expressió dels gens *Cel1* (A) i *Cel2* (B) en maduixa. Anàlisi per Northern-blot de 11 µg de RNA total aïllat de fruits en estadi M0 o M4. Carrils *M0* i *M4 +etilè*, fruits tractats amb 100 ppm d'etilè (48 hores), i carrils *M0* i *M4 control*, fruits no tractats. Cada Northern-blot es va exposar 12 hores a -80°C.

4.6. Caracterització de *Cel1* i *Cel2*: punt isoelèctric (pI) i N-glicosilació

4.6.1. Determinació del punt isoelèctric (pI)

El primer pas en el coneixement de les propietats de les dues EGases estudiades fou la determinació del pI de la proteïna mitjançant gels d'electroforesi de dues dimensions. En aquest tipus d'electroforesi primer es separen les proteïnes per punt isoelèctric (pI) i després, en la segona dimensió, es separen per pes molecular.

Els gels de dues dimensions presenten dues variants principals, segons la direcció en què migren les proteïnes en la primera dimensió. En la primera variant (IEF/SDS-PAGE) les proteïnes corren de medi bàsic a àcid fins que assoleixen una càrrega neta igual a zero i per tant, s'enfoquen i deixen de migrar. En la segona variant (NEPHGE/SDS-PAGE) les proteïnes, que no arriben a enfocar-se mai, migren en sentit contrari al IEF i de forma proporcional al seu pI. Aquesta segona variant és més adequada per a l'anàlisi de proteïnes bàsiques, i és la que nosaltres vam utilitzar inicialment.

Es va sotmetre un extracte de proteïnes totals de maduixa madura, obtingut pel mètode dels fenols, a una electroforesi NEPHGE/SDS-PAGE, i el Western-blot corresponent es va hibridar amb anti-*Cel1*. Es van detectar uns polipèptids del pes

molecular esperat i que presentaven un pI pròxim a 8'5, similar al pI teòric de 9 (figura 4.16.A). Aquest pI es va deduir a partir d'uns marcadors de pI comercials separats en els mateixes condicions i tenyits amb Coomassie Blue. Per tal de comprovar aquest resultat es va fer posteriorment una electroforesi de dues dimensions tipus IEF/SDS-PAGE amb la mateixa mostra i el Western-blot corresponent es va hibridar amb anti-Cel1, observant-se que Cel1 es quedava a l'extrem bàsic i no entrava al gel (dades no mostrades).

Com que el film presentava soroll de fons en la regió àcida, es provà de fer el mateix amb extractes proteics procedents d'una extracció amb CTAB (figura 4.16.B) o KCl/CaCl₂. Ambdós extractes milloraren el soroll de fons respecte l'extracte fenòlic. El pI resultant a més, era molt semblant en els tres extractes utilitzats. Per tant, podem concloure que Cel1 en forma desnaturalitzada es resol en diferents polipèptids amb un pI proper a 8'5, punt isoelèctric molt semblant al valor teòric.

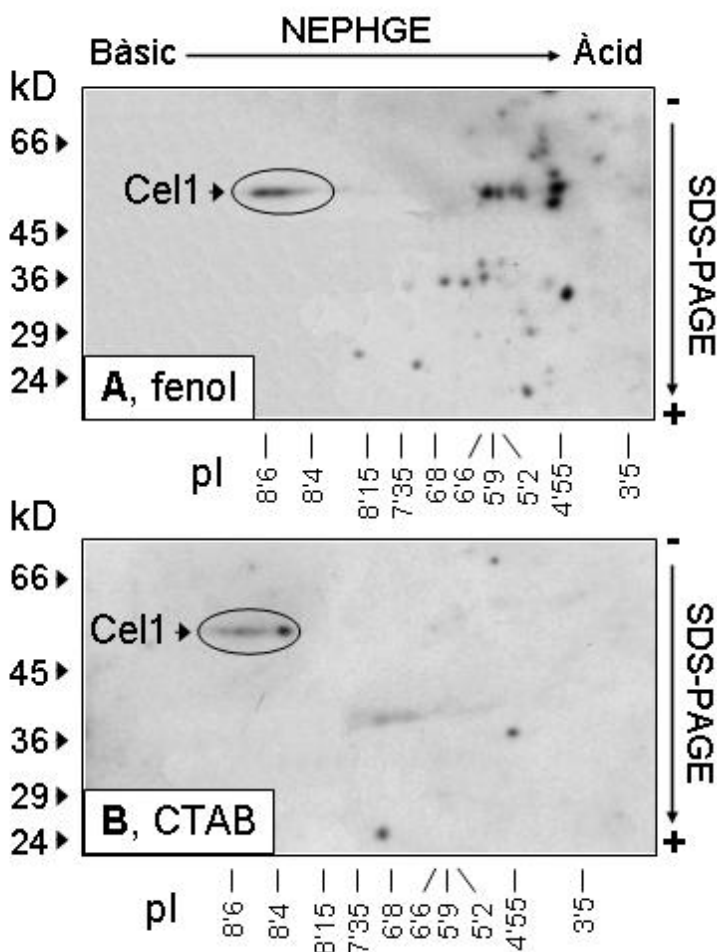


Figura 4.16: Anàlisi per Western-blot de la proteïna Cel1 en maduixa M4 mitjançant gels de dues dimensions tipus NEPHGE/SDS-PAGE, amb amfolines de rang de pH 3-10. **A**, 100 µg d'un extracte fenòlic i **B**, 100 µg d'un extracte CTAB, hibridats amb anti-Cel1.

Per a Cel2 es va realitzar la mateixa aproximació, tot i que en aquest cas només es van utilitzar extractes fenòlics per dos motius principals: el soroll de fons en gels NEPHGE era molt baix i perquè no teníem cap més mètode d'extracció efectiu per Cel2 en aquell moment. Així, en la figura 4.17 es mostra un NEPHGE/SDS-PAGE (A) i un IEF/SDS-PAGE (B) en els quals es veïe que Cel2 presentava un pI real aproximadament de 5, el qual dista molt del valor predit a partir de la seqüència i que és de 9'15. El fet de presentar un pI àcid ens permetia detectar Cel2 en ambdues variants dels gels de dues dimensions.

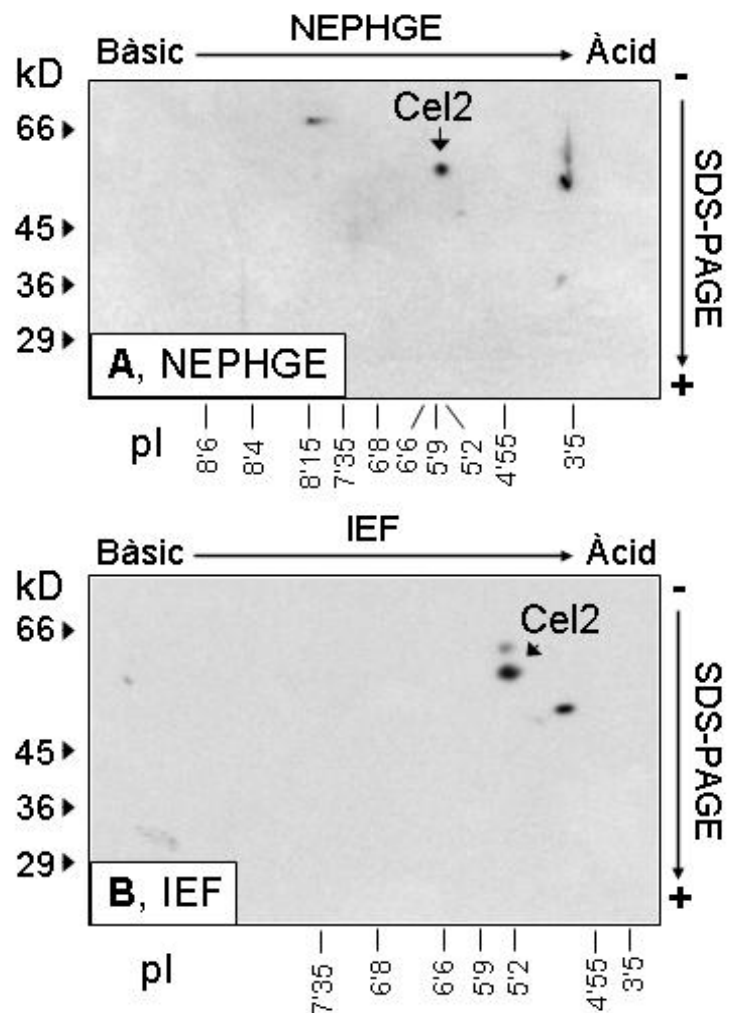


Figura 4.17: Anàlisi per Western-blot de la proteïna Cel2 en maduixa M4 mitjançant gels de dues dimensions, usant amfolines de rang de pH 3-10. **A** NEPHGE i **B**, IEF desnaturalitzant d'aproximadament 100 µg d'extracte fenòlic, hibridats amb anti-Cel2.

4.6.2. Detecció de llocs de N-glicosilació

Una de les característiques deduïdes a partir de les seqüències aminoacídiques de Cel1 i Cel2 és la presència de senyals de N-glicosilació. Sovint les proteïnes extracel·lulars sofreixen modificacions postraduccionalment en la via de secreció, essent la N-glicosilació una de les més freqüents. Així, Cel1 presenta el motiu N-X-S/T, que constitueix una seqüència consens per a senyals de N-glicosilació (Smith *et al.*, 1985), en la posició 460, i Cel2 presenta el mateix motiu en la posició 554. Ara bé, no tots els llocs de N-glicosilació presents en una seqüència han d'estar forçosament glicosilats.

Per tal d'esbrinar si el senyal consens observat a Cel1 i Cel2 estava realment glicosilat *in vivo*, es va realitzar un gel SDS-PAGE on es van separar diferents extractes fenòlics de proteïna total de maduixa en estadis M2 o M4. Després de transferir el gel a una membrana de nitrocel·lulosa, es va hibridar un carril amb anticòs anti-Cel1 o anti-Cel2 i un altre carril es va hibridar amb concanavalina A. Donat que la concanavalina A és una lectina amb afinitat per manosa, glucosa, N-acetilglucosamina i sorbosa (Clegg, 1982), si la banda d'hibridació amb l'anticòs específic coincideix amb una banda d'hibridació amb concanavalina A, això és un indicador de que, probablement, la proteïna està glicosilada.

En el nostre cas, després de realitzar l'assaig de glicosilació en SDS-PAGE, es veié que tant Cel1 com Cel2 presentaven un possible equivalent glicosilat, independentment de l'estadi analitzat (figura 4.18.A). Però com que la resolució d'un gel SDS-PAGE és limitada, perquè les proteïnes només es separen per pes molecular, poden aparèixer diferents proteïnes amb igual pes molecular en una mateixa banda. Per tal de millorar la resolució i sensibilitat del sistema, es va fer un gel d'electroforesi de dues dimensions tipus NEPHGE/SDS-PAGE.

A la figura 4.18.B s'observa com efectivament Cel1 presenta un equivalent glicosilat i per tant es pot afirmar que probablement es troba glicosilada *in vivo*. Cel2 en canvi, es mostra com una proteïna que segurament no es troba glicosilada. Això pot ser degut a que Cel2 no es trobi realment glicosilada *in vivo*, o bé a que presenti un residu glucosídic diferent del detectat amb la concanavalina A.

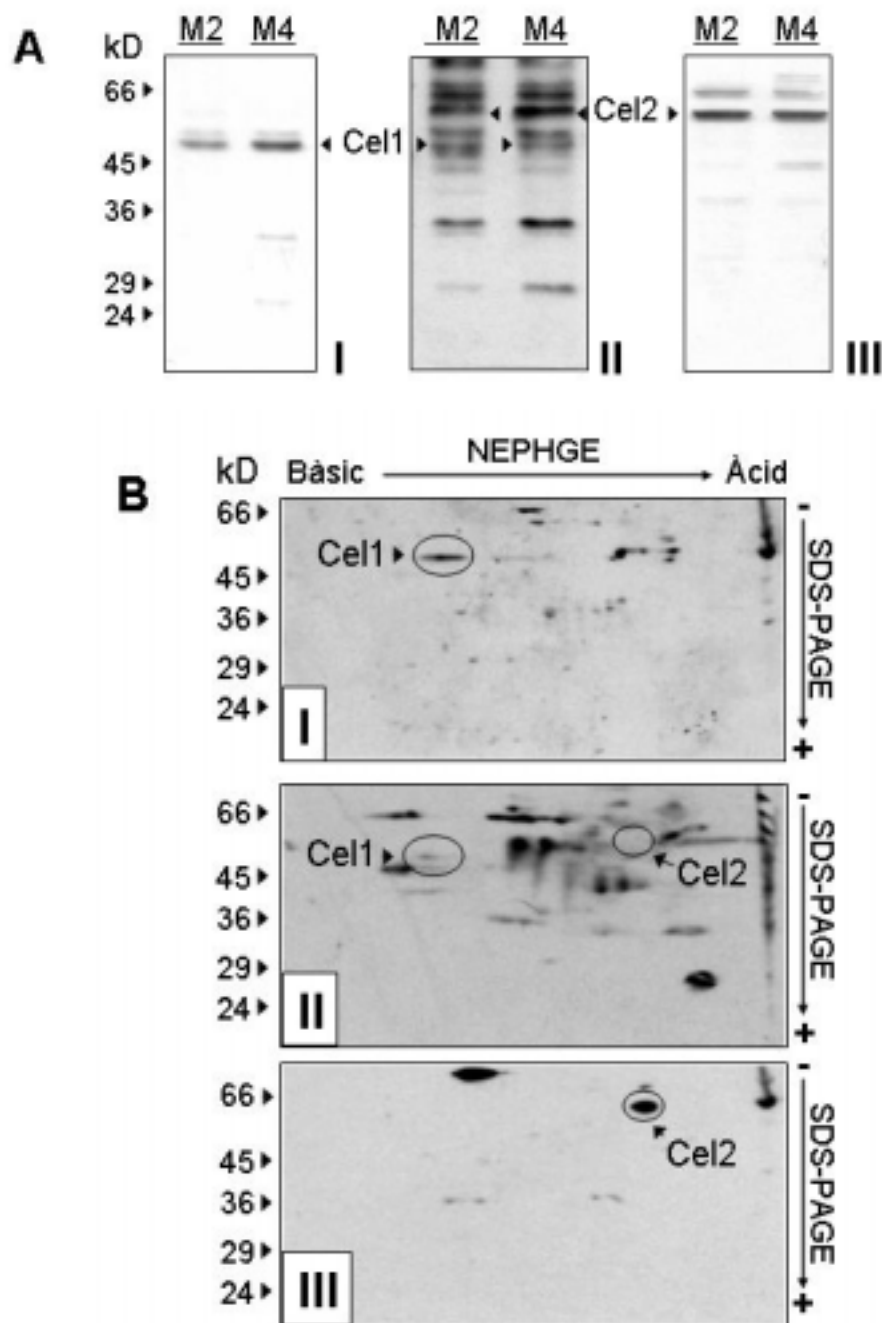


Figura 4.18: Assaig de glicosilació proteica en extractes fenòlics de maduixa en estadi M2 o M4 mitjançant SDS-PAGE (**A**) o NEPHGE/SDS-PAGE (**B**). En A es van separar duplicats de 50 µg de proteïna total (extracte fenòlic) M2 i M4, i es van hibridar amb anti-Cel1 (**I**), concanavalina A (**II**) o anti-Cel2 (**III**). En els gels de dues dimensions, 100 µg d'extracte fenòlic M4 es van separar per duplicat en gels amb amfolines de rang de pH 3-10. Després de transferir a nitrocel·lulosa, una membrana es va hibridar amb concanavalina A (**II**) i l'altra amb anti-Cel1 (**I**). Aquesta mateixa membrana es va deshibridar i finalment es rehibridà amb anti-Cel2 (**III**).

4.7. Caracterització de l'activitat carboximetilcel·lulasa (CMCasa) associada a Cel1 i Cel2 en fruit de maduixa

L'activitat de les EGases de plantes és assajada normalment segons la capacitat de degradar el substrat artificial carboximetilcel·lulosa (CMC). Encara que el substrat natural per aquestes EGases és encara desconegut, s'ha demostrat que aquests enzims hidrolitzen enllaços β -(1,4) de glucans *in vitro*, el qual suggereix que el xiloglucà és un possible substrat per les EGases *in vivo* (Brummell *et al.*, 1994). Per caracteritzar aquesta activitat CMCasa associada a Cel1 i Cel2 es van utilitzar dues tècniques diferents. Per una banda es va fer una aproximació usant extractes proteics de maduixa nadius: després de sotmetre l'extracte a un gel IEF nadiu, s'analitzà l'activitat CMCasa mitjançant la tècnica d'*overlay*. D'altra banda, s'assajà aquesta activitat *in vitro* usant proteïna recombinant produïda en llevat.

4.7.1. IEF nadiu

4.7.1.1. Gels *overlay* d'activitat CMCasa

A partir d'extractes proteics nadius obtinguts mitjançant el mètode KCl/CaCl₂ (veure apartat 4.3) es van realitzar gels IEF nadius i posteriorment s'utilitzà la tècnica d'*overlay* per revelar-ne l'activitat CMCasa. Si bé el protocol que vam utilitzar deriva del mètode original descrit per Robertson *et al.* (1987), es van fer certes modificacions per tal d'adaptar-lo a les nostres EGases, ja que inicialment, tot i que es podia detectar activitat CMCasa en el gel, no hi havia cap banda que hibridés amb l'anticòs anti-Cel1. Per això es va arribar a la conclusió que Cel1 no entrava al gel, i per resoldre això es van córrer les mostres d'àcid a bàsic i es va invertir la polaritat del gel.

En els primers experiments s'usaren amfolines de rang de *pH* 3-10 en el gel IEF. En aquests gels, el patró d'activitat *overlay* mostrava clarament dues zones d'activitat diferents, tant en la fracció soluble com en la fracció cw (figura 4.19.A). Una banda d'activitat es localitzava a la zona bàsica del gel (*pI* superior a 8), i una altra zona d'activitat es trobava a la part àcida del gel (*pI* entre 4'5 i 6). Malgrat això, l'ús de les amfolines de rang de *pH* 3-10 generava un problema en la detecció d'activitat, ja que la part bàsica del gel es tornava opaca, possiblement degut a la precipitació de la CMC o de les amfolines. Després de provar, sense èxit, diferents

tampons en el gel *overlay* per detectar activitat en la regió bàsica, s'optà per reduir el rang de *pH* de les amfolines fins a 5-8, escurçant també el temps de l'electroforesi. A més, es va emprar el mètode CTAB/Triton per a l'extracció de proteïnes per tal d'enriquir la mostra, ja que s'havia vist que aquest mètode era més eficient en l'extracció de les EGases. Aquests extractes proteics CTAB/Triton es mostraren clarament més actius envers el substrat CMC que els extractes KCl/CaCl₂, tot i que el rendiment proteic final era similar. Probablement com que l'ús del CTAB provoca una eliminació més eficient de polifenols, polisacàrids i altres contaminants, s'aconsegueix una puresa més gran de la proteïna i es facilita també la solubilitat. Amb totes aquestes modificacions es va aconseguir que la regió bàsica del gel quedés ben tenyida i es millorava la resolució de les isoformes àcides, que es separaven en quatre bandes diferents (figura 4.19.B).

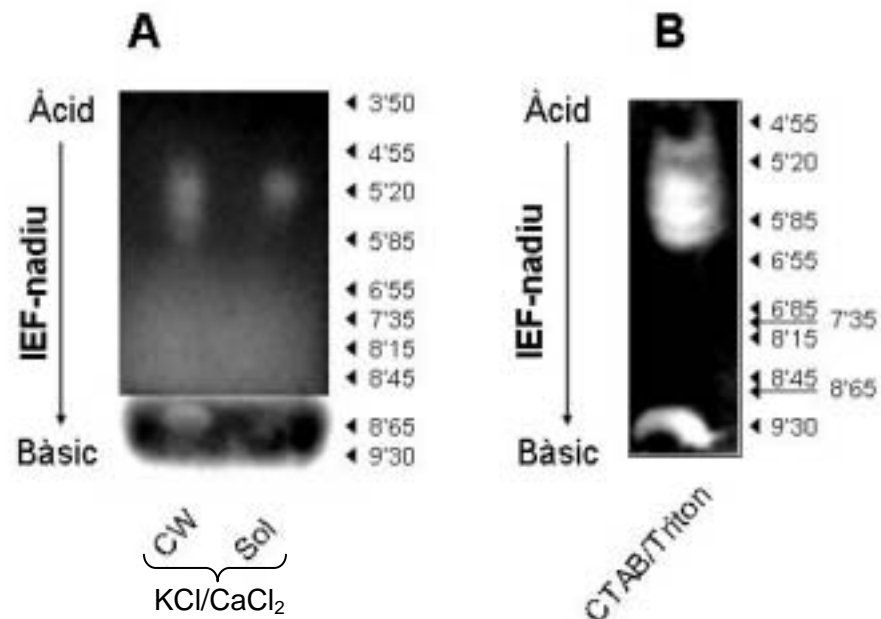


Figura 4.19: IEF nadiu usant amfolines de rang de *pH* 3-10 (A) o 5-8 (B) i extractes proteics nadius KCl/CaCl₂ (A) o CTAB/Triton (B). Aproximadament 100 µg de proteïna es van separar en un gel IEF, essent *sol* la fracció soluble i *cw* la fracció de paret cel·lular. Es mostra el gel d'activitat *overlay* tenyit amb Congo Red. Degut a la precipitació de les amfolines a la regió bàsica, el contrast de la figura A s'ha modificat segons conveniència i de forma diferent en dues regions per separat.

4.7.1.2. Correlació de les bandes d'activitat CMCasa amb Cel1 i Cel2

Per tal de correlacionar les bandes d'activitat CMCasa amb Cel1 i Cel2, es van separar extractes proteics en un IEF nadiu, que posteriorment es va transferir a membranes de PVDF i hibridar amb anti-Cel1.

Quan vam usar amfolines de rang de pH 3-10, l'anticòs anti-Cel1 reconegué diferents proteïnes del gel, però només dues d'elles es corresponien amb bandes actives: una de pI 8'5 i l'altra de pI 5'5-6'0. Per determinar si aquestes diferents bandes eren productes de degradació d'un mateix polipèptid, vam determinar el seu pes molecular. Mitjançant la tècnica del 2D-PAGE (IEF nadiu, primera dimensió; SDS-PAGE, segona dimensió) es va poder determinar que només la isoforma bàsica (pI 8'5) tenia el pes molecular esperat per Cel1 (figura 4.20). A més, aquest pI es corresponia amb el pI determinat en els gels de dues dimensions, realitzats amb extractes fenòlics (apartat 4.6.1). Alguns dels polipèptids immunoreactius es podrien correspondre amb formes degradades de Cel1, doncs presentaven pesos moleculars inferiors, o amb altres enzims amb epítops similars a Cel1. Tampoc es pot descartar una certa heterogeneïtat pròpia de Cel1 causada per variacions en el patró de la composició en carbohidrats, fosforilacions o acetilacions.

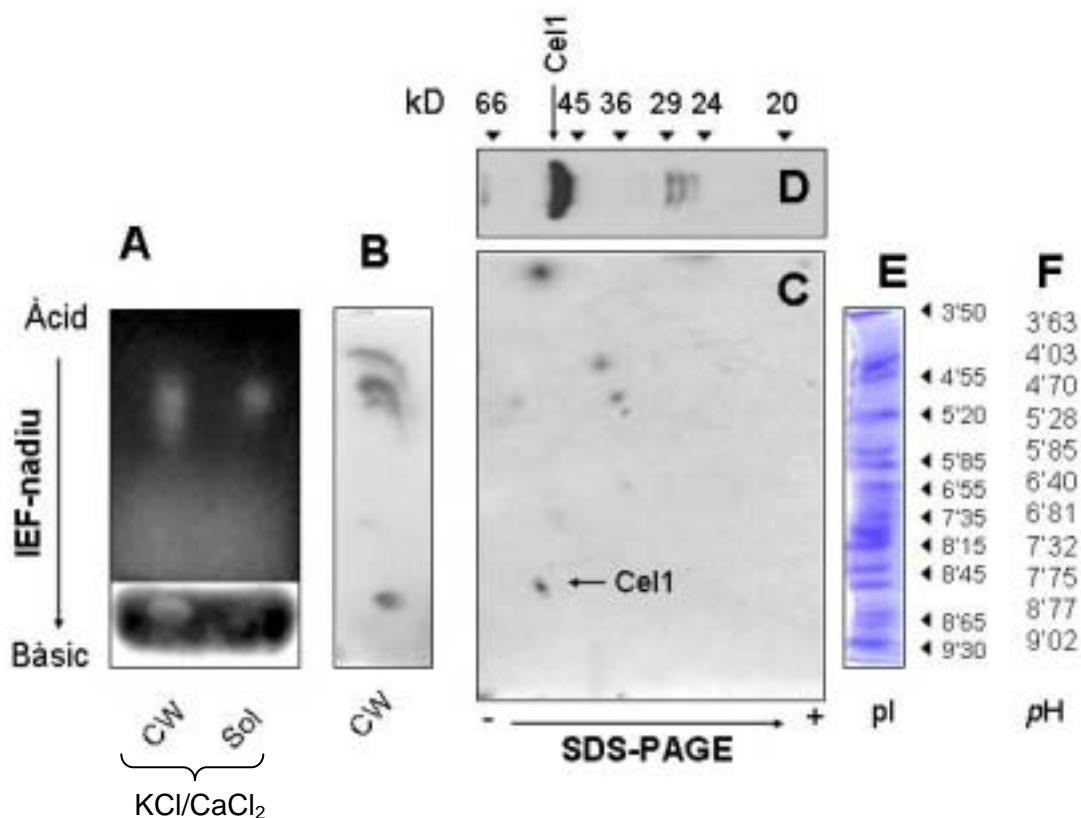


Figura 4.20: IEF nadiu usant amfolines de rang de pH 3-10 i extractes proteics nadius ($KCl/CaCl_2$). 100 μg de proteïna es van separar en un gel IEF per triplicat, essent *sol* la fracció soluble i *cw* la fracció de paret cel·lular. En **A** es mostra el gel d'activitat *overlay* tenyit amb Congo Red. Degut a la precipitació de les amfolines a la regió bàsica, el contrast de la figura s'ha modificat segons conveniència i de forma diferent en les dues regions per separat. En **B** es mostra el mateix gel nadiu que en **A**, però electrotransferit a una membrana de PVDF i hibridat amb anti-Cel1. **C** es correspon a

un carril *cw* del gel nadiu corregut en un gel 2D-PAGE (IEF nadiu, primera dimensió; SDS-PAGE, segona dimensió). En **D**, 50 µg de l'extracte nadiu (fraccions soluble o de paret cel·lular) es van separar en un gel SDS-PAGE i hibridar amb anti-Cel1, mostrant el pes molecular esperat per Cel1. Es mostren també els marcadors de pI tenyits amb Coomassie Blue (**E**), i en **F** es mostra el pH corresponent a cada fragment del gel mesurat amb un pHímetre.

Quan els mateixos extractes es van sotmetre a gels IEF nadius usant amfolines de rang de pH 5-8, mai es va poder detectar clarament la proteïna que es correspondria a Cel1 en un gel 2D-PAGE. Per això es va provar de fer una IEF nadiu amb un extracte CTAB/Triton, que era més eficient en l'obtenció de la proteïna Cel1. Això va permetre detectar Cel1 fàcilment en un gel 2D-PAGE (figura 4.21), i en la fracció de pes molecular esperat (51'4 kD) i pI predit (8'5-9'0).

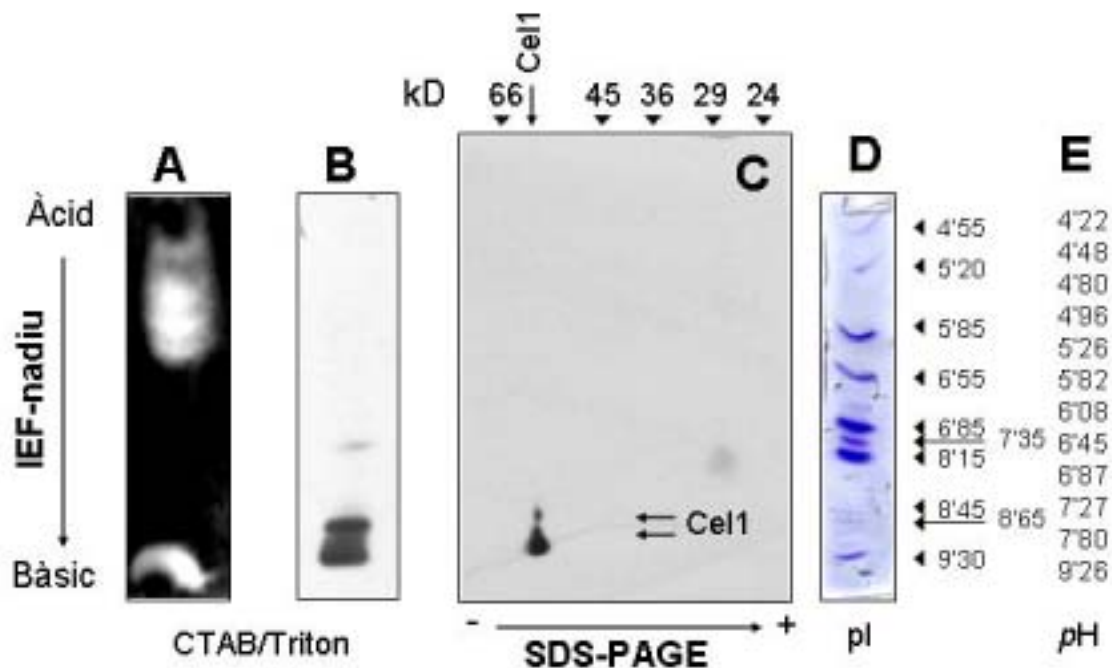


Figura 4.21: IEF nadiu usant amfolines de rang de pH 5-8 i extractes proteics nadius (CTAB/Triton). 100 µg de proteïna es van separar en un gel IEF per triplicat. En **A** es mostra el gel d'activitat *overlay* tenyit amb Congo Red; en **B** es mostra el mateix gel nadiu que en **A**, però electrotransferit a una membrana de PVDF i hibridat amb anti-Cel1. **C** es correspon a un carril del gel nadiu corregut en un 2D-PAGE (IEF nadiu, primera dimensió; SDS-PAGE, segona dimensió). Es mostren també els marcadors de pI tenyits amb Coomassie Blue (**D**), i en **E**, es mostra el pH corresponent a cada fragment del gel mesurat amb un pHímetre.

En el cas de Cel2 l'extracte proteic utilitzat fou també l'obtingut amb CTAB/Triton, doncs fou l'únic que permeté obtenir la proteïna activa i en quantitats suficients. Donat que el pI obtingut per Cel2 mitjançant NEPHGE/SDS-PAGE era àcid, es van usar només gels amb amfolines de rang de pH 5-8. Tot i que amb aquest pI Cel2 no hauria de tenir problemes per entrar al gel, la necessitat de poder comparar els patrons d'activitat CMCasa amb Cel1 va condicionar el fet que utilitzéssim també el IEF nadiu modificat, és a dir, corrent des del pol àcid al bàsic i amb la polaritat invertida.

Es van detectar dues bandes que hibridaven amb anti-Cel2, de pI 7'5 i 5'5 (figura 4.22). Tot i que en aquest cas no es va poder determinar el pes molecular de les bandes immunoreactives en gels 2D-PAGE, l'elevada especificitat d'unió de l'anticòs anti-Cel2 en el Western-blot del gel nadiu, així com el pI trobat de 5'5 fan pensar que realment la banda d'activitat CMCasa de pI 5'5 en el gel *overlay*, es correspondria amb la proteïna Cel2. Com que la proteïna s'extreu amb dificultat, és probable que qualsevol petita pèrdua per difusió o insolubilització de Cel2 limiti el reconeixement en el gel 2D-PAGE.

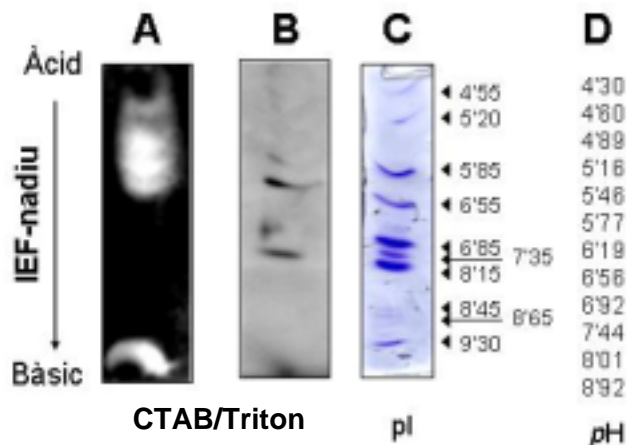


Figura 4.22: IEF nadiu usant amfolines de rang de pH 5-8 i extractes proteics nadius (CTAB/Triton). 100 µg de proteïna es van separar en un gel IEF per triplicat. En **A** es mostra el gel d'activitat *overlay* tenyit amb Congo Red; en **B** es mostra el mateix gel nadiu que en A, però electrotransferit a una membrana de PVDF i hibridat amb anti-Cel2. Es mostren també els marcadors de pI tenyits amb Coomassie Blue (**C**), i en **D**, es mostra el pH corresponent a cada fragment del gel mesurat amb un pHímetre.

L'altra banda detectada en el Western-blot nadiu amb anti-Cel2, i amb un pI de 7'5, coincideix amb una proteïna detectada també per anti-Cel1. Si bé en principi es podria tractar de qualsevol altra EGasa present en el fruit de la maduixa, el fet que per 2D-PAGE es correspongui amb una proteïna de 36 kD (figura 4.20), i tenint en compte la falta de correlació d'aquesta amb cap banda d'activitat, fan pensar que es tracta d'un producte de degradació o a reconeixement inespecífic de l'anticòs secundari.

4.7.2. Sobreexpressió en *Pichia pastoris*

La presència d'altres enzims amb activitat CMCasa en els extractes proteics de maduixa dificultava molt la caracterització enzimàtica de Cel1 i Cel2. Per tal de solucionar aquest problema es podia optar per dues vies principals. La primera consistia en purificar la proteïna, mentre que la segona consistia en aconseguir suficient proteïna mitjançant sistemes d'expressió heteròloga en bacteris o llevats. La purificació es pot aconseguir, per exemple, mitjançant columnes d'afinitat i immunoprecipitació. L'ús de columnes d'afinitat és un bon sistema, però com que es basa en propietats bioquímiques d'un tipus d'enzims, no garanteix l'obtenció de proteïnes totalment pures, i requereix sovint de passos addicionals que poden malmetre la proteïna. Tot i això, mai podem estar segurs de que no hi ha hagut copurificació d'altres proteïnes. La immunoprecipitació, tot i ser més fiable per ser més específica, no permet aïllar la proteïna activa amb facilitat.

Degut a les dificultats trobades per a l'extracció de les EGases de maduixa, fins i tot després de purificar les EGases usant columnes d'afinitat amb cel·lulosa cristal·lina, vam optar per la utilització de sistemes d'expressió heteròloga en bacteris o llevats. Tot i que amb aquests sistemes es poden presentar interferències motivades per proteïnes endògenes, l'obtenció de quantitats elevades de proteïna i l'ús de controls adequats permeten resoldre el problema.

Com que ja teníem proteïna recombinant procedent de sobreexpressió en *Escherichia coli*, el primer que vam fer va ser intentar detectar activitat CMCasa de les proteïnes usades prèviament per a produir anticossos. Per això es va usar la proteïna abans de desnaturalitzar amb guanidina-HCl. Sigui perquè les proteïnes no es processaven correctament o perquè estaven formant cossos d'inclusió, no vam poder detectar activitat en cap cas. Cal recordar que *Escherichia coli* és un

organisme procariota, i per tant li manquen molts dels enzims encarregats del correcte plegament i processament de les proteïnes presents en organismes eucariotes. Donat que evidentment era molt difícil recuperar proteïna activa en *Escherichia coli*, es va sobreexpressar Cel1 i Cel2 en un organisme eucariota com és el llevat *Saccharomyces cerevisiae*. Usant el vector de clonatge pYES-2 (Invitrogen, San Diego, CA) que permet la inducció controlada de la síntesi proteica mitjançant galactosa, es va intentar obtenir Cel1 i Cel2. Cap de les dues construccions usades va resultar en una proteïna recombinant activa.

L'últim sistema utilitzat fou el basat en un altre llevat; *Pichia pastoris* (Invitrogen, San Diego, CA). Després de diferents assaigs es va poder produir Cel1 recombinant en forma activa. No fou possible obtenir la proteïna Cel2, però val la pena esmentar que aquest sistema només garanteix un 50 % d'èxit. Per això, la caracterització enzimàtica que es farà a continuació es centrarà exclusivament en la proteïna Cel1.

4.7.2.1. Sobreexpressió de Cel1 en *Pichia pastoris*

El llevat *Pichia pastoris* és un organisme eucariota unicel·lular metilotròfic, és a dir, que pot metabolitzar metanol com a única font de carboni. Per això requereix de l'enzim alcohol oxidasa (AOX), del qual té dues isoformes en el genoma: AOX1 i AOX2. Donat que AOX1 és més abundant i té un promotor molt més actiu, és aquest promotor el que s'usa per controlar la inducció proteica. Aquest promotor és regulat a nivell transcripcional i activat per metanol. *Pichia pastoris* pot metabolitzar, a part de metanol, glucosa i glicerol, però mentre que la glucosa és un repressor de la transcripció del promotor de AOX1, el glicerol no. El glicerol, tot i no inhibir AOX1, dificulta l'activació del promotor en presència de metanol, perquè el llevat té més afinitat per aquest substrat que no pas pel metanol. És per això que l'ús de diferents combinacions de glicerol i metanol permeten una regulació molt fina de la transcripció del gen AOX1, i també de qualsevol gen posat sota control del promotor AOX1.

Dins de la soca GS115 es coneixen dos genotips principals, el Mut⁺ o soca salvatge, que té capacitat de créixer amb metanol com a única font de carboni, i el genotip Mut^S, que al tenir altres requeriments a part del metanol creix més lentament, i a més indueix el promotor més progressivament, produint la proteïna de

forma més controlada. Això és útil especialment en casos on s'ha detectat toxicitat per al llevat de la proteïna sobreexpressada.

De diferents possibles vectors de clonatge, el vector escollit per raons de disponibilitat fou pPic9. Aquest vector es pot multiplicar fàcilment en bacteris, on es pot seleccionar per resistència a ampicil·lina. A més, com que conté un pèptid senyal α endogen, procedent del factor de secreció α de *Saccharomyces cerevisiae*, permet la secreció a l'espai extracel·lular de la proteïna sobreexpressada. També és possible, mitjançant les modificacions corresponents del plasmidi, usar el pèptid senyal propi de la proteïna recombinant, o fins i tot, induir la proteïna intracel·lularment.

Nosaltres vam clonar *Cel1* en pPic9 usant el pèptid senyal α del llevat, eliminant el pèptid senyal de *Cel1*. Per fer això vam dissenyar dos oligonucleòtids (taula 4.1) que ens permetessin amplificar *Cel1* en la regió compresa entre el pèptid senyal i el codó codificant pel *Stop*.

Taula 4.1: Oligonucleòtids emprats pel clonatge de *Cel1* en pPic9. En vermell es destaca la diana afegida a la seqüència i en negre la regió corresponent al clon. En color blau es mostren les bases afegides per tal de possibilitar la digestió dels enzims de restricció i en verd es destaca el codó corresponent al senyal de terminació.

Nom	Seqüència	Diana afegida	Tamany
EcoXyl5B	5'-ggAATTCggCCACgACTACCACgACgC-3'	<i>EcoRI</i>	27 pb
NotXyl5B	5'-ATAgTTTAgCggCCgCTCAgTAATgggCTgCAAATAC-3'	<i>NotI</i>	38 pb

Usant l'enzim *Taq* Polimerasa *High Fidelity* de Promega per tal de reduir al màxim el nombre d'errors produïts, es va amplificar el fragment de cDNA corresponent per PCR seguint el protocol comercial, si bé es va haver d'afegir un pas addicional de desnaturalització del cDNA. Després de digerir amb *EcoRI/NotI*, la banda amplificada per PCR es va lligar amb el vector pPic9 usant l'enzim T4-DNA lligasa (Boehringer) (figura 4.23), i es van transformar cèl·lules d'*Escherichia coli* XL-10 Gold (Stratagene) amb la construcció. Es va usar aquesta soca perquè

altres cèl·lules competents utilitzades (DH5 α i JM109) es van mostrar incapaces d'incorporar una construcció d'aquesta grandària. Després de seleccionar amb ampicil·lina els transformants d'*Escherichia coli* positius, aquesta construcció es va aïllar del bacteri mitjançant Maxiprep (Qiagen). Finalment, per tal de comprovar que no hi haguessin errors de PCR que poguessin modificar la proteïna resultant, es va seqüenciar la construcció mitjançant el seqüenciador ALF (Pharmacia). La construcció Cel1/pPic9 es va linealitzar amb l'enzim de restricció *Sa*I, que generava recombinants amb el fenotip His⁺/Mut⁺ per inserció al locus *His4* del genoma del llevat. Aquesta construcció linealitzada es va usar per transformar la soca GS115 de *Pichia pastoris*.

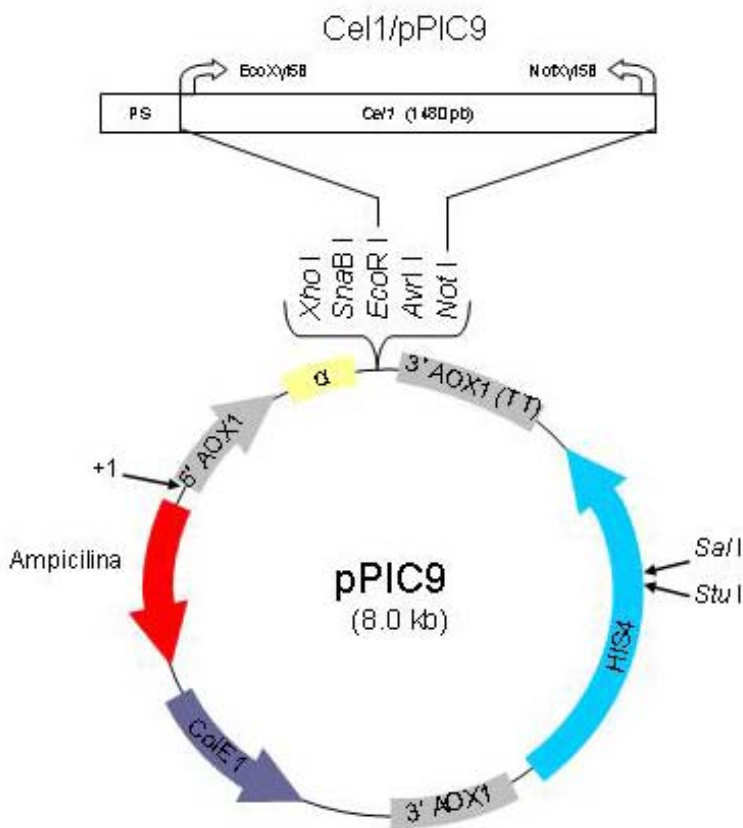


Figura 4.23: Construcció emprada per a la sobreexpressió heteròloga de Cel1 en el llevat *Pichia pastoris*. 3'AOX1, terminador de la transcripció; 5'AOX1, regió promotora; α , pèptid senyal per la via de secreció; ColE1, origen de replicació del plasmidi; His4, histidinol dehidrogenasa.

Si bé inicialment es va utilitzar un mètode de transformació basat en clorur de liti i polietilenglicol, aviat es va veure que l'eficiència de transformació era molt baixa i que necessitàvem cribrar un nombre elevat de transformants, per tant al final es va usar el mètode d'electroporació. Aquest sistema va permetre aconseguir més de dos-cents transformants. Paral·lelament es van transformar cèl·lules GS115 amb el vector sense insert i linealitzat també amb *Sa*I, del qual s'obtingueren uns cinquanta transformants. Aquesta construcció, juntament amb una construcció

comercial que sobreexpressava la proteïna BSA (BSA/pPic9) s'usà sempre com a control negatiu en els assaigs d'activitat i Western-blot. BSA/pPic9 també s'emprà com a control positiu de sobreexpressió.

Creixent els transformants en medi inductor i usant un control Mut^S comercial, es van seleccionar tots aquells transformants que presentaven el fenotip esperat (Mut⁺). Aquests es detecten fàcilment perquè creixen més ràpidament que els mutants Mut^S, en presència de metanol.

Abans de fer una sobreexpressió definitiva, es va mirar quins transformants expressaven millor la proteïna mitjançant un sistema de Colony-blot. Així, es va induir la síntesi proteica de diferents colònies transformades en plaques amb metanol, i després de transferir a membranes de nitrocel·lulosa, aquestes es van hibridar amb anti-Cel1 (Figura 4.24, A). Tots els transformants seleccionats es van analitzar per PCR per mirar si presentaven una o més còpies del gen. Després d'extreure i quantificar el DNA genòmic del llevat, es va amplificar per PCR el gen *Cel1*, usant els oligonucleòtids EcoXyl5B i NotXl5B (taula 4.1). Totes les colònies analitzades mostraven l'insert, però en cap d'elles s'intuïa la presència de més d'una còpia, ja que la intensitat de banda era similar en totes elles (figura 4.24, B). Els transformants escollits finalment per a sobreexpressar *Cel1*/pPic9 foren els números 9 i 10.

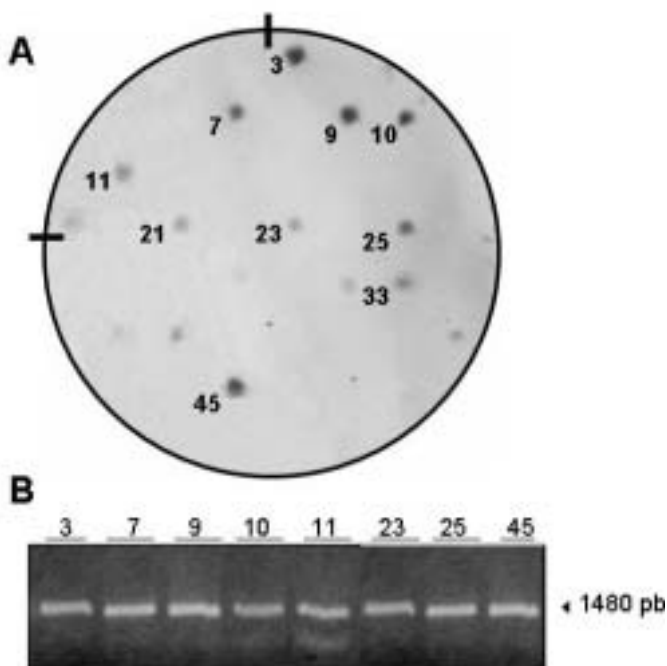


Figura 4.24: A, Colony-blot de diferents transformants de *Pichia pastoris* amb *Cel1*/pPic9 obtinguts per electroporació. Diferents colònies es van induir en plaques MM amb metanol, i després de transferir a nitrocel·lulosa es va detectar la presència de la proteïna Cel1 amb l'anticòs específic. B, Amplificació per PCR del DNA genòmic de diferents transformants de *Pichia pastoris* amb *Cel1* usant els oligonucleòtids EcoXyl5B i NotXyl5B. Les colònies analitzades foren 3, 7, 9, 10, 11, 23, 25 i 45.

Donat que la proteïna recombinant portava el pèptid senyal α de llevat, era d'esperar que la proteïna fos secretada i es trobés en el medi de cultiu. Per comprovar-ho es va fer una inducció de 48 hores i es va centrifugar el cultiu. Llavors es van concentrar les proteïnes del sobrenedant per precipitació, per facilitar l'anàlisi per Western-blot, i es veié que no hi havia proteïna Cel1/pPic9 al sobrenedant del cultiu induït (figura 4.25, A). Tot i que es va veure que l'activitat EGasa del sobrenedant era molt gran, aquesta era similar entre transformants i controls. Com que no hi havia Cel1/pPic9 a la mostra, era probable que l'activitat detectada fos l'endògena del llevat.

Aquests resultats suggerien que la proteïna havia quedat a la fracció cel·lular (sediment), bé en l'espai intracel·lular o bé lligada a la paret cel·lular. Per tant, es va fer una extracció de proteïnes intracel·lulars seguint el protocol comercial. Després d'analitzar per Western-blot la fracció intracel·lular (figura 4.25, B) es va veure que sí hi havia proteïna Cel1/pPic9, però en poca quantitat. Degut a que el protocol comercial només alliberava proteïnes intracel·lulars, es va analitzar també la possibilitat que Cel1/pPic9 estés lligada a paret cel·lular. Això es va fer afegint tampó de càrrega de proteïnes per gels SDS-PAGE directament al sediment cel·lular, ja que aquest tampó té un elevat poder solubilitzant. Com es pot veure a la figura 4.25 (C), la fracció de cultiu que contenia més proteïna Cel1/pPic9 era la que anomenaríem de paret cel·lular o lligada a la paret cel·lular.

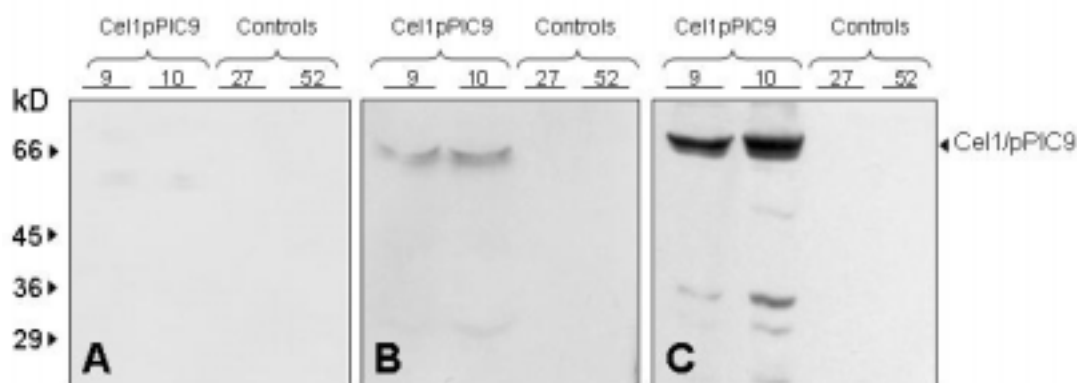


Figura 4.25: Anàlisi per Western-blot de diferents extractes procedents d'una inducció de 48 hores de Cel1 en *Pichia pastoris*. **A**, sobrenedant de 1 ml dels diferents cultius, concentrat 20X amb àcid tricloracètic. **B**, proteïnes intracel·lulars d'un cultiu extretes amb tampó de lisi segons el protocol comercial. **C**, fracció insoluble d'un cultiu, resuspès amb tampó de càrrega i amb les proteïnes intracel·lulars solubles extretes prèviament amb tampó de lisi. Els carrils 9 i 10 provenen de

transformants pPic9 amb Cel1; el carril 27 prové d'una colònia transformada amb pPic9 sol, i el carril 52 es correspon amb un transformant BSA/pPic9 comercial. El temps d'exposició pels tres films és d'un minut.

Per viscosimetria es veié que, efectivament a la fracció cel·lular hi havia activitat CMCasa. Aquesta activitat, quan es mesurava en la fracció de proteïnes intracel·lulars no mostrava cap diferència entre mostres induïdes i les mostres no induïdes, i tampoc respecte els controls negatius. En canvi, l'anàlisi de l'activitat en cèl·lules intactes que contenien la paret cel·lular sí mostrava clares diferències (dades no mostrades). Això ens estava indicant que la proteïna es secretava, però es quedava unida a la paret cel·lular del llevat. Per aquest motiu, en tots els estudis que es realitzaren a continuació es descartà el SBNT del cultiu i s'utilitzaren cèl·lules intactes.

Com es pot veure en l'anàlisi per Western-blot de les figures 4.25, la proteïna recombinant Cel1/pPic9 produïda en *Pichia pastoris* presentava un pes molecular aparent superior a l'esperat per la proteïna nadiua. Un dels principals problemes que té el sistema basat en *Pichia pastoris* és la hiperglicosilació de les proteïnes sobreexpressades, el qual pot originar un augment del pes molecular, així com alterar-ne les propietats bioquímiques. Per això es van fer múltiples assaigs de deglicosilació amb l'enzim N-Glicosidasa F o PNGasa (Roche), que elimina de forma específica els residus d'oligosacàrids units a la proteïna per N-glicosilació, trencant l'enllaç GlcNAc β -Asn.

Tot i que totes les proves fetes amb PNGasa aconseguien rebaixar el pes molecular de la proteïna recombinant en ~5 kD, mai vam obtenir el mateix pes molecular de la proteïna nadiua (figura 4.26), amb el qual vam concloure que la proteïna Cel1 probablement també sofria altres modificacions postraduccionals, tals com O-glicosilació o acetilacions, que en modificaven el pes molecular. L'anàlisi per viscosimetria de l'activitat dels diferents extractes deglicosilats no va revelar cap augment d'activitat CMCasa respecte els extractes no deglicosilats, per la qual cosa en els assaigs posteriors vam utilitzar la proteïna sense deglicosilar.

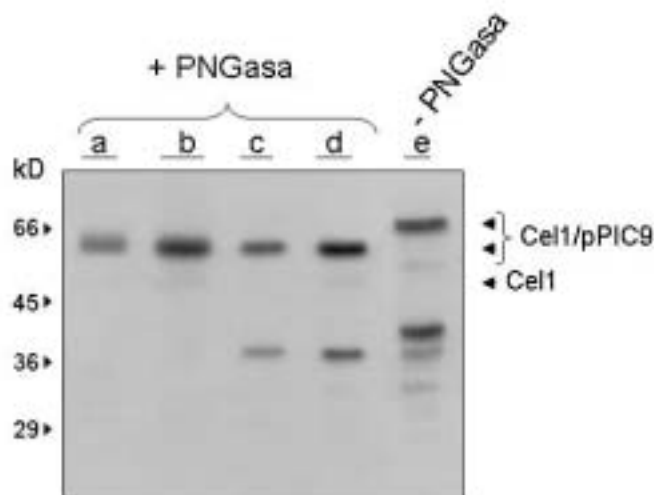


Figura 4.26: Western-blot usant extractes proteics procedents de diferents assaigs de deglicosilació amb PNGasa de cèl·lules intactes de *Pichia pastoris* induïdes amb metanol, hibridats amb anti-Cel1. Els carrils *a*, *b*, *c* i *d* mostren diferents proves de deglicosilació, amb 1% SDS/ 1% Nonidet P40 (*a*); 1% Triton X-100 (*b*); 1% SDS/ 10% 2- β -mercaptoetanol (*c*) i 1'5% CAPS (*d*). El carril *e* mostra el control amb la proteïna recombinant induïda i no deglicosilada. S'indica a la figura el pes molecular que correspon a la proteïna Cel1 nadiua de maduixa.

4.7.2.1.1. Determinació del pH òptim d'activitat CMCasa per Cel1

Com que teníem la proteïna Cel1/pPic9 activa i en quantitats elevades es va procedir a caracteritzar aquesta activitat. Per això, primer es determinà el pH òptim en el qual la proteïna Cel1 recombinant mostrava una activitat màxima. Després d'assajar diferents tampons de pH variable (5'2, 6, 6'5, 7, 7'5, 8, 8'5, 9 i 9'5) es va veure que Cel1 tenia un pH òptim de 7'5, mentre que les EGases endògenes de *Pichia pastoris* detectades en els controls negatius tenien un pH òptim a 7 (figura 4.27). Aquests resultats ens portaren a utilitzar el tampó de 50 mM Tris-HCl pH 7'5, en tots els assaigs d'activitat posteriors realitzats amb Cel1/pPic9.

Es van assajar també diferents temperatures i diferents temps d'incubació amb el substrat i es va veure que la proteïna era activa entre 20 i 37°C, augmentant aquesta activitat de forma proporcional a la temperatura i al temps d'incubació (dades no mostrades). Per tant, les posteriors investigacions de l'especificitat de substrat i cinètica d'activitat es feren a 30°C i incubant l'enzim amb el substrat durant tres hores.

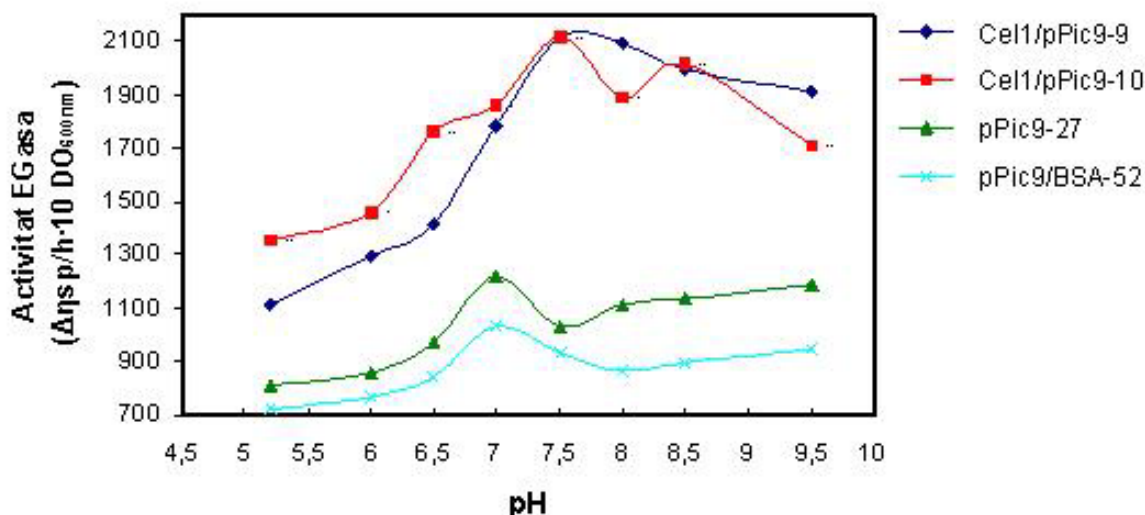


Figura 4.27: Activitat CMCasa específica de cèl·lules de *Pichia pastoris* transformades amb diferents construccions i induïdes 48 hores amb metanol, en funció del pH del tampó. Els transformants Cel1/pPic9-9 i 10 contenen el gen per l'EGasa *Cel1*, mentre que les mostres pPic9-27 i BSA/pPic9-52 es corresponen amb els transformants sense insert o amb BSA, respectivament. Els tampons utilitzats foren 1'5 % CMC de viscositat mitja en 50 mM de: acetat sòdic (pH 5'2), fosfat sòdic (pH 6, 6'5 i 7) o Tris-HCl (pH 7'5, 8, 8'5, 9 i 9'5). Tots els assaigs es van fer per triplicat i usant mostres procedents d'induccions diferents.

4.7.2.1.2. Cinètica d'inducció temporal de Cel1/pPic9

S'assajà l'acumulació en el temps de Cel1/pPic9 en cultius de *Pichia pastoris* induïts, per tal de determinar el màxim d'inducció i minimitzar així l'efecte de les EGases endògenes o la degradació per proteases del llevat. Es realitzaren anàlisis per Western-blot i assaigs d'activitat CMCasa en diferents temps després d'induir l'expressió proteica amb metanol (figura 4.28).

Si bé la inducció de Cel1/pPic9 ja era detectable amb l'anticòs a les vuit hores d'inducció, encara no es detectava activitat específica de Cel1/pPic9 en aquest punt. No obstant això, després de les 24 hores d'inducció, quan la proteïna detectada per anti-Cel1 augmentava significativament, ja es veia un increment d'activitat CMCasa. Tant l'acumulació de proteïna Cel1/pPic9 com l'activitat CMCasa presentaven un màxim a les 72 hores d'inducció, tot i que això és més clar en l'activitat que no pas en el Western-blot, probablement per un efecte de saturació del senyal.

També cal remarcar l'elevada activitat CMCasa en mostres no induïdes (t= 0 hores). Malgrat tot, el fet que aquesta elevada activitat sigui similar en totes les

colònies, amb i sense la construcció Cel1/pPic9, permet atribuir aquest fenomen al propi metabolisme del llevat. Assaigs posteriors d'activitat es realitzaren ja només amb mostres induïdes un mínim de 48 i un màxim de 72 hores.

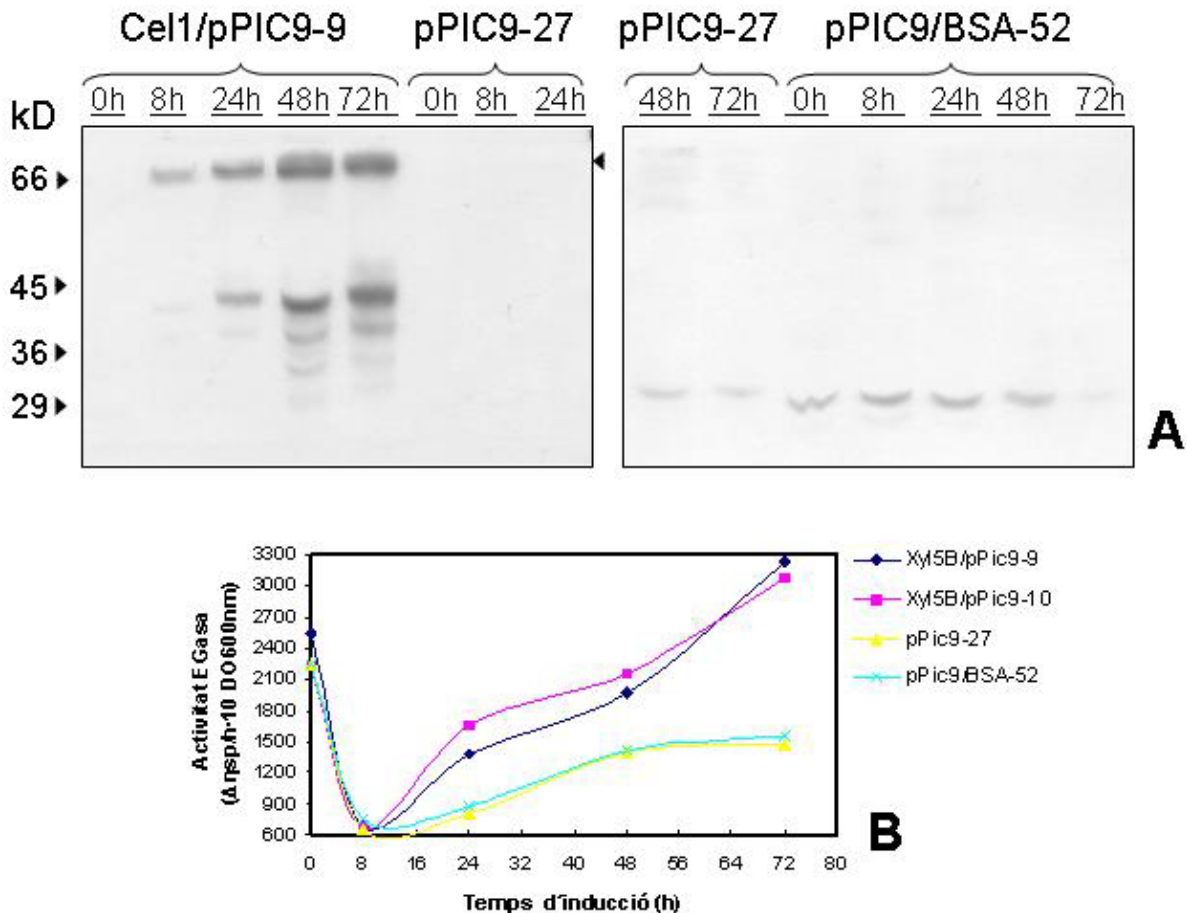


Figura 4.28: Cinètica d'inducció temporal de Cel1/pPic9 en cultius de *Pichia pastoris*. **A**, Western-blot hibridat amb anti-Cel1 d'extractes proteics procedents de cèl·lules intactes de *Pichia pastoris*, induïdes amb metanol i després de 0, 8, 24, 48 i 72 hores d'inducció, corresponents a la mostra Cel1/pPic9-9 i els controls pPic9-27 i pPic9/BSA-52. En **B** es mostra l'activitat CMCasa específica de les mateixes mostres, més Cel1/pPic9-10, en els mateixos temps d'inducció i usant com a solució de substrat, 1'5 % CMC (viscositat mitja) en 50 mM de Tris-HCl pH 7'5.

4.7.2.1.3. Especificitat de substrat de la proteïna Cel1/pPic9

L'activitat de l'enzim Cel1/pPic9 produït en *Pichia pastoris* envers una sèrie de polisacàrids, representatius de diferents polímers trobats en plantes, es mostra a la taula 4.2. Per fer aquest assaig s'utilitzà una tècnica basada en la mesura de la capacitat reductora generada pels sucres alliberats per l'activitat EGasa.

En aquest assaig es va veure que l'enzim recombinant presentava una activitat màxima envers la CMC, un derivat soluble de la cel·lulosa que conté glucoses unides mitjançant enllaços β -(1,4) i parcialment substituït amb grups carboximetil. S'assajaren diferents CMC, que diferien en el grau de ramificació, però no s'observaren diferències d'activitat de Cel1/pPic9 envers aquests substrats. Sorprenentment també es va mesurar una activitat molt elevada envers la cel·lulosa CF11, una forma insoluble i fibrosa de la cel·lulosa. En canvi, l'activitat sobre el xiloglucà, tot i ser apreciable era clarament inferior. Els xiloglucans consisteixen en un esquelet de glucosa unit per enllaços β -(1,4) i amb residus laterals de xilosa units per enllaços β -(1,6). Cel1/pPic9 va mostrar una activitat molt reduïda o inexistent sobre polisacàrids amb enllaços α -(1,4), com són l'àcid poligalacturònic (PGA), principal component de les pectines, i el midó.

Taula 4.2: Especificitat de substrat de la proteïna Cel1/pPic9 sobreexpressada en *Pichia pastoris*, després de 48 hores d'inducció amb metanol. L'activitat EGasa de Cel1 es considera com el promig de l'activitat de les mostres Cel1/pPic9-9 i 10, menys el promig de l'activitat dels controls negatius (pPIC9-27 i pPic9/BSA-52). Es van realitzar 2 rèpliques de cada mostra en 4 assaigs independents, utilitzant proteïna procedent d'induccions diferents.

Substrat	Sucre principal	Enllaç	Activitat EGasa (nmols de sucre alliberat/ hora·10 DO _{600nm})	Activitat relativa (%)
CMC viscositat baixa	Glucosa	β -(1,4)	4'94	84'4
CMC viscositat mitja	Glucosa	β -(1,4)	5'85	100
CMC viscositat alta	Glucosa	β -(1,4)	5'60	95'7
Cel·lulosa CF11	Glucosa	β -(1,4)	4'62	78'9
Xiloglucà (tamarind)	Glucosa, xilosa	β -(1,4)	3'23	55'2
Midó	Glucosa	α -(1,4)	0	0
Àcid poligalacturònic	Àcid galacturònic	α -(1,4)	0'89	15'2

4.8. Anàlisi de *Cel1* i *Cel2* en plantes de maduixa transgèniques

El següent pas en l'anàlisi de la funció específica de *Cel1* i *Cel2* en la maduració de la maduixa, fou l'obtenció de plantes transgèniques que ens

permetessin delimitar la funció relativa de cada EGasa en l'estovament del fruit. Per això, en col·laboració amb l'institut Plant Research International (PRI) de Wageningen (Holanda) es va plantejar la possibilitat de fer plantes transgèniques de maduixa amb l'expressió de les EGases reduïda. Com que el PRI disposava de la tecnologia necessària per transformar maduixeres, es van fer allà les construccions necessàries i també la transformació de maduixera.

4.8.1. Construccions utilitzades per a la transformació de maduixeres

L'estratègia plantejada fou la d'inhibir l'expressió de *Cel1* i *Cel2* per separat en plantes antisentit utilitzant tota la regió codificant de cada clon. D'altra banda es va intentar inhibir ambdós gens alhora utilitzant les regions conservades dels dos gens, i col·locant els dos fragments en tàndem en una construcció doble-antisentit, *Cel1/Cel2* (figura 4.29).

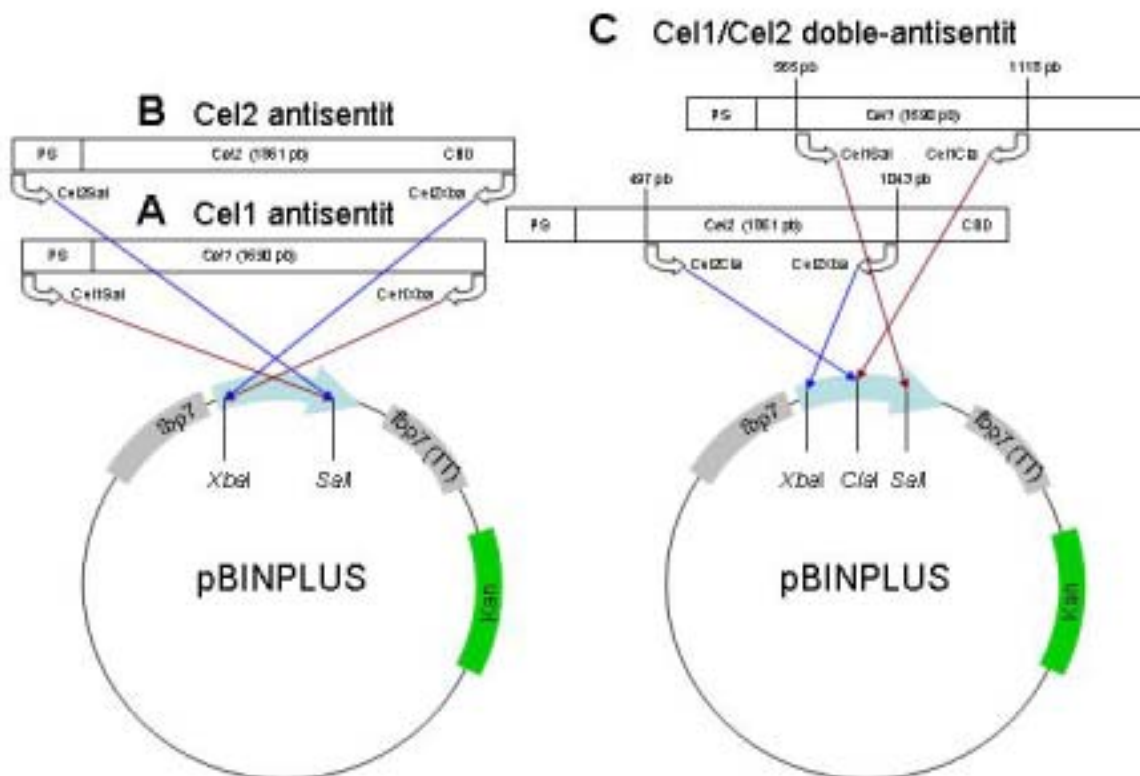


Figura 4.29: Construccions emprades per a la transformació de maduixera en l'obtenció de plantes antisentit amb expressió reduïda. **A**, Construcció antisentit Cel1; **B**, construcció antisentit Cel2 i **C**, construcció doble-antisentit Cel1 i Cel2. Els fragments obtinguts per PCR foren clonats en orientació antisentit en el cassette de transformació mitjançant les dianes de restricció corresponents. *fbp7*, promotor específic de fruit, *fbp7* (TT), terminador de la transcripció. *kan* gen de resistència a kanamicina.

Cada construcció (Cel1, Cel2 i Cel1/Cel2) fou lligada en orientació antisentit amb el promotor i les seqüències de terminació de la transcripció derivades del gen *fbp7* de petúnia. El promotor *fbp7* en maduixa, és específic de fruit i presenta una expressió constant durant el desenvolupament i la maduració del fruit. Les construccions foren clonades en el vector binari de transformació pBINPLUS, que conté el gen *nptII* de resistència a kanamicina com a marcador de selecció.

4.8.2. Obtenció de plantes transformades i selecció de transformants primaris

Un cop obtingudes les construccions, es van transformar per electroporació cèl·lules de la soca Agl0 d'*Agrobacterium tumefaciens* i es van infectar fulles de maduixa cv Calypso. Es va utilitzar aquest cultivar per la seva elevada eficiència de transformació i freqüència de regeneració. Les cèl·lules infectades que van integrar el T-DNA en el seu genoma van ser les úniques capaces de desenvolupar calls en el medi selectiu amb kanamicina. Els calls formats es van regenerar a plàntules mitjançant regulació hormonal, variant la relació auxines/citoquinines. D'aquestes plàntules, vint línies de cada construcció foren seleccionades per a ser traslladades a un hivernacle i créixer-les en condicions normals.

Per tal de monitoritzar els nivells dels trànscrips de *Cel1* i *Cel2* en les tres construccions i així poder seleccionar les plantes amb expressió reduïda, es va fer un anàlisi per Northern-blot del RNA total de fruits de maduixa en estadi M2. Es va provar un mètode nou d'extracció de RNA total, que fos ràpid i permetés analitzar totes les mostres en poc temps.

S'escollí l'estadi M2 perquè les anàlisis per Northern-blot realitzades anteriorment (apartat 4.1) mostraven expressió ja detectable per ambdós gens en aquest estadi, i per tant, es podien analitzar els dos trànscrips en una mateixa mostra. Com a controls es van usar fruits de plantes no transformades. Cada Northern-blot es va hibridar amb la sonda corresponent a *Cel1* o *Cel2* i, després de deshibridar la membrana, es va rehibridar amb una sonda ribosomal d'expressió constitutiva per tal de poder quantificar per densitometria els nivells de cada trànscrip en relació a la quantitat de RNA total.

Per a la hibridació dels Northern-blots es va fer servir una sonda obtinguda per PCR, específica de cada clon i corresponent a la regió 3' no codificant anterior a la cua poli-A (taula 4.3). Això es va fer així per tal de detectar l'expressió del transcrit endogen de la planta i no el transcrit transgènic, ja que cal recordar que per fer les construccions de les plantes Cel1 i Cel2 es va fer servir tota el cDNA codificant.

Taula 4.3: Oligonucleòtids emprats per a la detecció del mRNA endogen de *Cel1* i *Cel2* en plantes transgèniques antisentit. M*Cel1XP1* i P*Cel1XP1* es van usar per obtenir la sonda per fer el Northern-blot i pel Real Time Quantitative RT-PCR. M*Cel2XP2* i P*Cel2XP2*, es van fer servir pel Northern-blot i Cel2TMF i Cel2TMR es van utilitzar pel Real Time Quantitative RT-PCR.

Nom	Sonda	Seqüència	Tamany	Regió amplificada
M <i>Cel1XP1</i>	<i>Cel1</i>	5'-AgCCCATTACTgATTCTCg-3'	19 pb	153 pb
P <i>Cel1XP1</i>		5'-AAgCTTgggCCATTTTATTCT-3'	22 pb	
M <i>Cel2XP2</i>	<i>Cel2</i>	5'-CTTACTgAAgTggAggTg-3'	18 pb	258 pb
P <i>Cel2XP2</i>		5'-AAggAgAgAggTTCACAC-3'	18 pb	
Cel2TMF	<i>Cel2</i>	5'-CCAAgCTggCTCAACTCT-3'	18 pb	149 pb
Cel2TMR		5'-CTgTgTgAACCTCTCTCCT-3'	19 pb	

A continuació es descriuen els resultats obtinguts amb les diferents construccions.

4.8.2.1. Plantes antisentit per a *Cel1*

És en aquesta construcció on obtinguérem els transformants amb una expressió de *Cel1* més reduïda (figura 4.30, A). De totes les plantes analitzades, una mostrà un nivell d'expressió *Cel1* de l'ordre del 8'3% respecte el control. De la resta de plantes antisentit *Cel1*, un 41% mostrava valors d'expressió inferiors al 40% respecte el control, i en un 12% l'expressió era inferior al 20%. Analitzant l'expressió de *Cel2* en aquestes plantes es va veure que, tot i tenir expressions lleugerament menors que en els controls, els nivells d'expressió de *Cel2* no eren tan baixos com els de *Cel1*. A més, la variabilitat en l'expressió de *Cel2* era inferior, i

per tant es pot dir que en les plantes antisentit *Cel1* no queda afectada significativament l'expressió de *Cel2* (dades no mostrades).

Tenint en compte l'anàlisi d'expressió pels dos trànscrips, es van seleccionar tres plantes per a futures mesures. Aquestes plantes foren *Cel1-10* i *Cel1-15* com a transformants amb expressió de *Cel1* reduïda, i *Cel1-19* com a control transformat amb expressió no alterada.

4.8.2.2. Plantes antisentit per a *Cel2*

En aquesta construcció, només una planta (el 5% del total de plantes analitzades) mostrava uns nivells de trànscrit *Cel2* inferiors al 20% del nivell d'expressió control, mentre que eren un 30% les plantes amb expressió inferior al 40% (figura 4.30, B). La variabilitat trobada en l'expressió de *Cel1* en aquestes plantes era molt gran (dades no mostrades). Per això es van escollir dues plantes on l'expressió de *Cel2* era mínima, però que mostraven una expressió de *Cel1* semblant a les plantes no transformades. Les dues plantes seleccionades foren *Cel2-2* i *Cel2-12*, amb nivells d'expressió de *Cel2* respecte el control del 16 i el 27% respectivament. Com a control transformat amb expressió no reduïda es va seleccionar la planta *Cel2-10*, que presentava una expressió de *Cel2* similar al control no transformat.

4.8.2.3. Plantes antisentit per a *Cel1* i *Cel2*

Cap de les plantes obtingudes tenia una reducció simultània per als dos mRNAs *Cel1* i *Cel2*, doncs presentaven valors per *Cel2* que oscil·laven entre un 71 i un 145% d'expressió respecte les plantes control (figura 4.30, C i D). Malgrat tot, ja que tres d'aquestes plantes (19% del total de plantes) presentaven els nivells del trànscrit *Cel1* reduïts respecte el control, es van seleccionar per a assaigs posteriors. Aquestes plantes eren; *Cel1/Cel2-2*, amb un 16'5% d'expressió respecte el control, *Cel1/Cel2-6*, amb un 23% d'expressió i *Cel1/Cel2-19*, amb un 14'5% d'expressió. Es va escollir la planta *Cel1/Cel2-15* com a control transformat amb expressió no alterada.

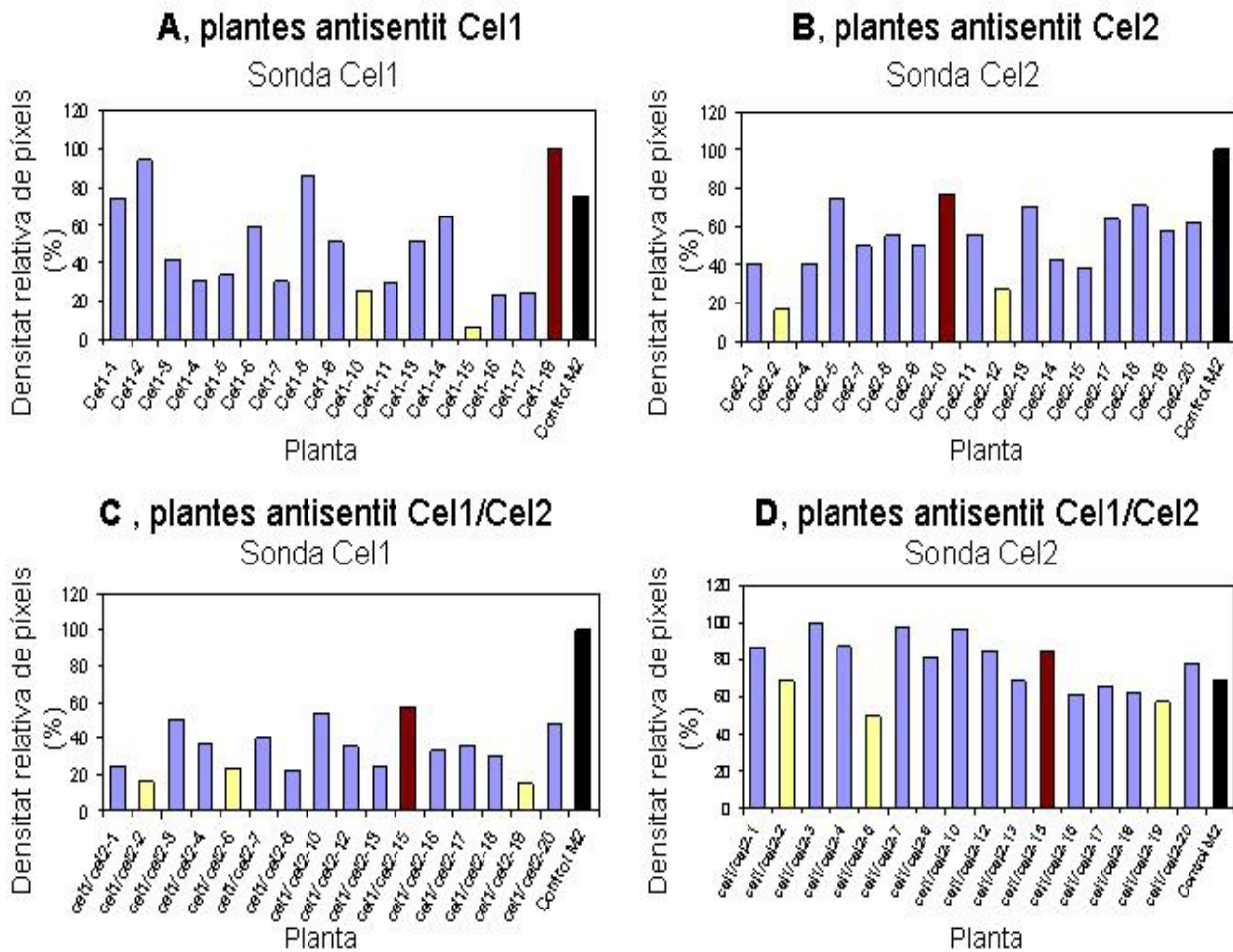


Figura 4.30: Mesura densitomètrica dels Northern-blots de *Cel1* i *Cel2* en les plantes antisentit. **A**, plantes amb la construcció *Cel1* antisentit hibridades amb la sonda per *Cel1* i **B**, plantes de la construcció *Cel2* antisentit hibridades amb la sonda per *Cel2*. Les plantes amb el doble-antisentit (*Cel1/Cel2*) s'hibridaren amb les dues sondes *Cel1* (**C**) i *Cel2* (**D**). Cada carril conté 5 µg de RNA total de maduixa en estadi M2. El senyal capturat pel film de raigs X es va quantificar usant un densitòmetre FUJI BAS 2000 amb l'ajut del programa TINA 2.10. Les dades s'expressen com a percentatge d'expressió respecte el control no transformat, del quocient (sonda *Cel1* o *Cel2*)/(sonda ribosomal constitutiva), per tal de corregir les petites diferències de càrrega de RNA total que poguessin alterar el resultat final. En groc es mostren les plantes amb expressió reduïda, en negre les plantes control no transformades, i en marró les plantes transformades amb expressió no reduïda.

4.8.3. Anàlisi de l'expressió de *Cel1* i *Cel2* en plantes antisentit durant la maduració del fruit

Totes les línies escollides en l'apartat 4.8.2 eren fenotípicament similars, i no s'observaven diferències en les diferents parts vegetatives de la planta respecte les plantes control (figura 4.31). Les diferents línies presentaven un aspecte normal i només algunes plantes, especialment les que havien estat transformades amb la construcció *Cel2*, mostraven dificultats de floració i fructificació.

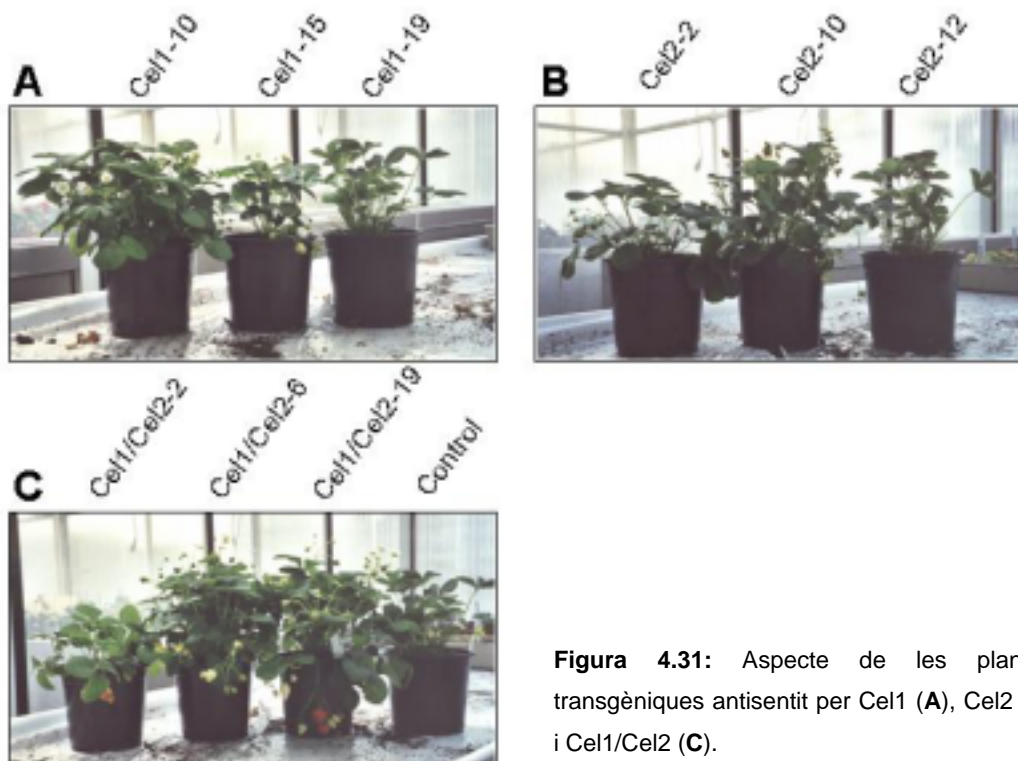


Figura 4.31: Aspecte de les plantes transgèniques antisentit per *Cel1* (A), *Cel2* (B) i *Cel1/Cel2* (C).

Aquestes plantes s'analitzaren per Northern-blot per tal d'esbrinar si l'expressió de *Cel1* i *Cel2* era reduïda en tots els estadis de la maduració. Degut però a la baixa producció de fruits en algunes línies, i a la limitació temporal que teníem, al final es va optar per analitzar només les maduixes en tres estadis de maduració: M1, M2 i M4.

A més d'analitzar l'expressió de *Cel1* i *Cel2* mitjançant Northern-blot, també s'usà el mètode del Real Time Quantitative RT-PCR (Applied Biosystems). Aquesta tècnica permet la quantificació de l'expressió d'un gen a partir de cDNA obtingut a

partir del mRNA, en relació a un calibrador extern (RNA ribosomal d'expressió constitutiva) i a una referència passiva. En el nostre cas, la referència passiva fou el colorant SYBR® Green, que emet fluorescència al unir-se al DNA de doble cadena que s'està sintetitzant en cada cicle de la PCR. Segons la quantitat de cDNA present a la mostra, la fluorescència augmentarà proporcionalment fins a saturar-se. Si fixem un nivell llindar imaginari previ al nivell de saturació mitjançant un control, la nostra mostra assolirà aquest llindar en un cicle concret abans o després respecte el control segons tingui més o menys mRNA inicial, respectivament, per al gen concret (figura 4.32). L'ús d'un calibrador extern evita les possibles diferències que hi pugui haver degudes a errors de quantificació de la mostra. A més, l'ús de múltiples rèpliques i controls fa que aquesta tècnica sigui molt sensible i fiable.

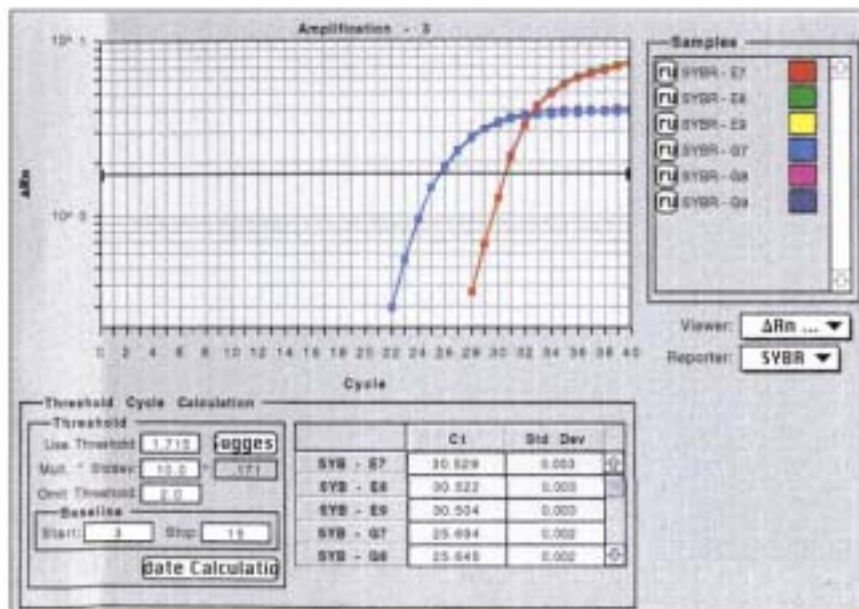


Figura 4.32: Exemple del gràfic obtingut en la reacció de quantificació de mostres de cDNA mitjançant Real Time Quantitative RT-PCR. E7, E8 i E9 són rèpliques d'una mateixa mostra, i G7, G8 i G9 d'una altra mostra. La línia horitzontal negra mostra el nivell llindar predeterminat en el qual es determina el cicle. Els valors indicats a C_T es corresponen al número del cicle en el qual s'ha assolit el nivell llindar.

Com que aquest sistema no permet l'ús d'oligonucleòtids que amplifiquin regions més grans de 150 pb, es van dissenyar dos nous oligonucleòtids per amplificar *Cel2* (taula 4.3): Cel2TMF i Cel2TMR, que amplifiquen un fragment de 149 pb en la regió 3' no codificant. Per *Cel1* s'utilitzaren els mateixos oligonucleòtids usats per fer la sonda radioactiva (taula 4.3). Abans de fer la reacció de quantificació es va comprovar per PCR que no hi hagués cap mena de reacció

de reconeixement creuada entre els oligonucleòtids corresponents a *Cel1* amb el gen *Cel2*, i viceversa.

4.8.3.1. Plantes antisentit *Cel1*

Tant les anàlisis realitzades mitjançant Northern-blot com les realitzades per Real Time Quantitative RT-PCR mostraren resultats d'expressió similars. Per això, a la figura 4.33 (A) només es mostren les dades obtingudes per Northern-blot. Cal esmentar que les mostres de l'estadi M1, analitzades només per Northern-blot, presenten valors d'expressió elevats, però això probablement és una conseqüència del baix nivell de transcrit *Cel1* present en aquest estadi, que es situaria per sota del nivell de sensibilitat del sistema de detecció. Aquest sistema es basa en la mesura per densitometria de la intensitat del senyal de regions de mida predeterminada. En els estadis M2 i M4, els resultats obtinguts per mitjà de les dues tècniques són concordants, i mostren que la planta *Cel1-10*, tot i tenir una expressió reduïda de *Cel1* en l'estadi M2, a l'estadi M4 l'expressió era fins i tot superior al control. Això ens fa pensar que o bé la inhibició de l'expressió no es mantenia durant la maduració del fruit, o bé que aquesta reducció a l'estadi M2 era purament artefactual. L'altra planta seleccionada, *Cel1-15*, sí que demostrava tenir inhibida l'expressió de *Cel1* en tots dos estadis, amb nivells molt inferiors respecte les plantes control. Tant la planta *Cel1-10* com la planta *Cel1-15* tenien nivells de mRNA *Cel2* similars als fruits control en tots els estadis analitzats (dades no mostrades).

4.8.3.2. Plantes antisentit *Cel2*

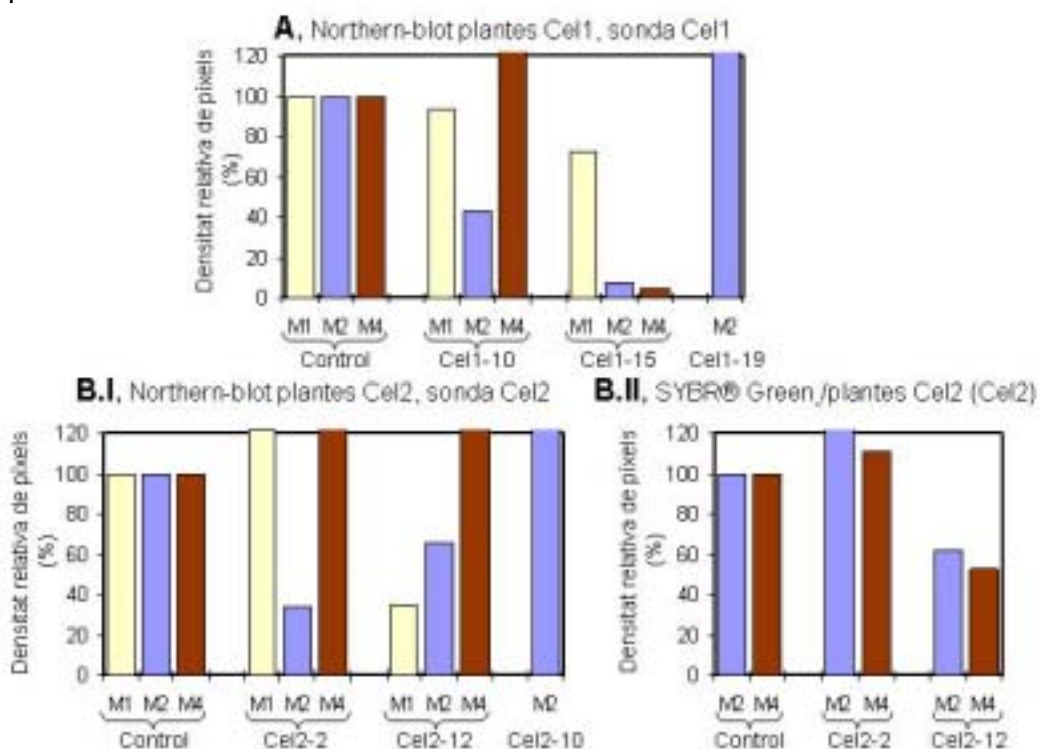
En aquestes plantes, a diferència del que passava en la construcció *Cel1*, els resultats obtinguts per Northern-blot eren diferents dels obtinguts per Real Time Quantitative RT-PCR (figura 4.33, B). Per Northern-blot es veia que l'expressió de *Cel2* era baixa en l'estadi M2 de les plantes *Cel2-2* i *Cel2-12*, però molt alta en l'estadi M4. En canvi, mitjançant el Real Time Quantitative RT-PCR es va veure que, si bé la línia *Cel2-2* no tenia expressió reduïda en cap estadi, *Cel2-12* mostrava una expressió del 62 i 52% respecte les plantes control, en els estadis M2 i M4 respectivament. Totes aquestes plantes presentaven una petita reducció en l'expressió de *Cel1* respecte els controls no transformats (dades no mostrades). Les diferències trobades entre les dues tècniques respecte l'expressió de *Cel2*, així com

els baixos nivells de reducció en l'expressió, fan pensar que realment cap d'elles estava suficientment inhibida com per produir un fenotip detectable.

4.8.3.3. Plantes antisentit *Cel1/Cel2*

En aquestes plantes el resultat obtingut per les dues tècniques era similar. Si bé no es va observar cap línia amb reducció pels dos trànscrius, sí es va obtenir la reducció del mRNA per *Cel1* en almenys una de les plantes. El nivell d'acumulació del trànscriu *Cel2* en aquestes plantes era fins i tot més alt que en les plantes no transformades. Així, la planta *Cel1/Cel2-2* tenia una clara reducció en l'expressió per *Cel1* (reducció de fins un 80% respecte el control), mentre que els nivells de *Cel2* eren similars als controls (figura 4.33,C i D). *Cel1/Cel2-6* va mostrar nivells del mRNA de *Cel1* molt baixos en l'estadi M2, però elevats a l'estadi M4. La línia *Cel1/Cel2-19* en canvi, mostrava un patró d'expressió contradictori segons la tècnica utilitzada.

El fet que varies de les línies seleccionades per les tres construccions (*Cel1-10*, *Cel1/Cel2-6*, *Cel1/Cel2-19*) mostressin una reducció del trànscriu en el primer cribratge (apartat 4.8.2), però no es confirmés el resultat al estudiar en detall l'acumulació del trànscriu durant la maduració, es podria deure a la baixa expressió de *Cel1* en l'estadi M2, i al fet que aquest estadi comprèn una certa variabilitat de fases de desenvolupament que dificulten la recollida del fruit exactament en un mateix punt.



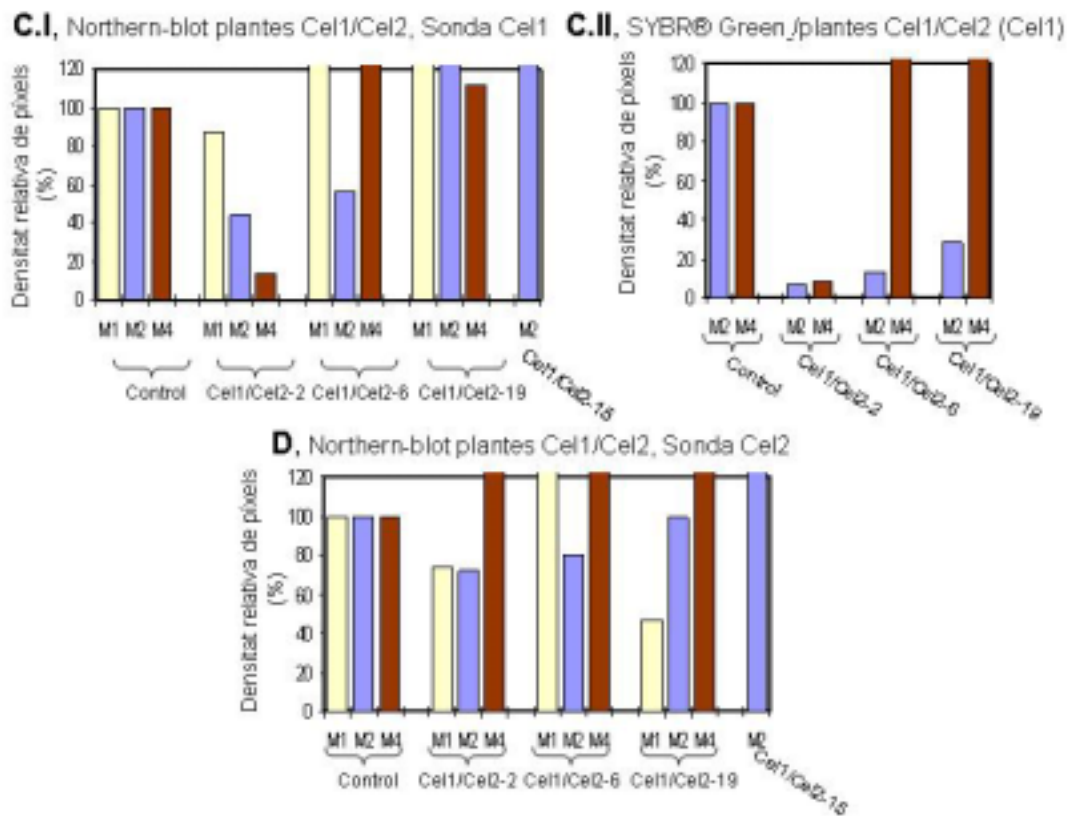


Figura 4.33: Anàlisi de l'expressió per Northern-blot (I) i/o Real Time Quantitative PCR (II) de *Cel1* i *Cel2* en les plantes antisentit seleccionades, i en diferents estadis de maduració. **A**, plantes antisentit *Cel1* analitzades per Northern-blot amb la sonda *Cel1*. **B**, plantes antisentit *Cel2* analitzades per Northern-blot amb la sonda *Cel2* (I) o amb SYBR®Green (II) usant els oligonucleòtids *Cel2TMF* i *Cel2TMR*. **C**, plantes antisentit *Cel1/Cel2* analitzades per Northern-blot amb la sonda *Cel1* (I) o amb SYBR®Green (II) usant els oligonucleòtids *Cel1TMF* i *Cel1TMR*. **D**, plantes antisentit *Cel1/Cel2* analitzades per Northern-blot amb la sonda *Cel2*. Les condicions emprades pel Northern-blot són les mateixes descrites a la figura 4.29.

4.8.4. Acumulació de les proteïnes *Cel1* i *Cel2* i activitat CMCasa en les plantes transgèniques

Totes les mostres seleccionades després del primer cribratge per Northern-blot foren analitzades més tard per Western-blot, hibridant-les amb ambdós anticossos, anti-*Cel1* i anti-*Cel2*. Finalment es va determinar la seva activitat EGasa total per viscosimetria. Per les anàlisis de *Cel1* s'usà el mètode d'extracció de proteïnes CTAB, mentre que per l'anàlisi de *Cel2* s'optà pel mètode CTAB modificat amb Triton X-100. Tots dos mètodes permetien analitzar les proteïnes per Western-blot i l'activitat CMCasa total per viscosimetria a partir d'una mateixa mostra. A més,

donat que de Cel1 es coneixia el pH òptim d'activitat, s'usà aquest pH (pH 7'5) per a la quantificació viscosimètrica en plantes antisentit Cel1 i Cel1/Cel2. En canvi, per Cel2 s'escollí un pH més genèric (pH 5), àmpliament descrit en la bibliografia i utilitzat per Woolley *et al.* (2001).

4.8.4.1. Plantes antisentit Cel1

L'anàlisi per Western-blot demostrà que Cel1-15 tenia, a part d'una reducció en l'expressió de *Cel1*, una quantitat de proteïna Cel1 també molt reduïda (figura 4.34,B). En l'estadi M2 es va detectar la proteïna Cel1 en nivells inferiors respecte les plantes control, i posteriorment, al arribar a l'estadi M4 aquesta proteïna havia augmentat molt poc. Els nivells de la proteïna Cel2 no estaven alterats en aquesta planta, ni en cap altra de les seleccionades (dades no mostrades). Les anàlisis d'activitat CMCasa *in vitro* efectuades per viscosimetria sobre extractes derivats de Cel1-15 mostraven una reducció significativa de l'activitat EGasa total, però també demostraven la presència d'altres enzims amb la mateixa activitat, ja que aquesta reducció d'activitat total era només del 40%, aproximadament. La resta de plantes estudiades presentava nivells de proteïna propers al control, i l'activitat CMCasa era fins i tot lleugerament superior (figura 4.34, A).

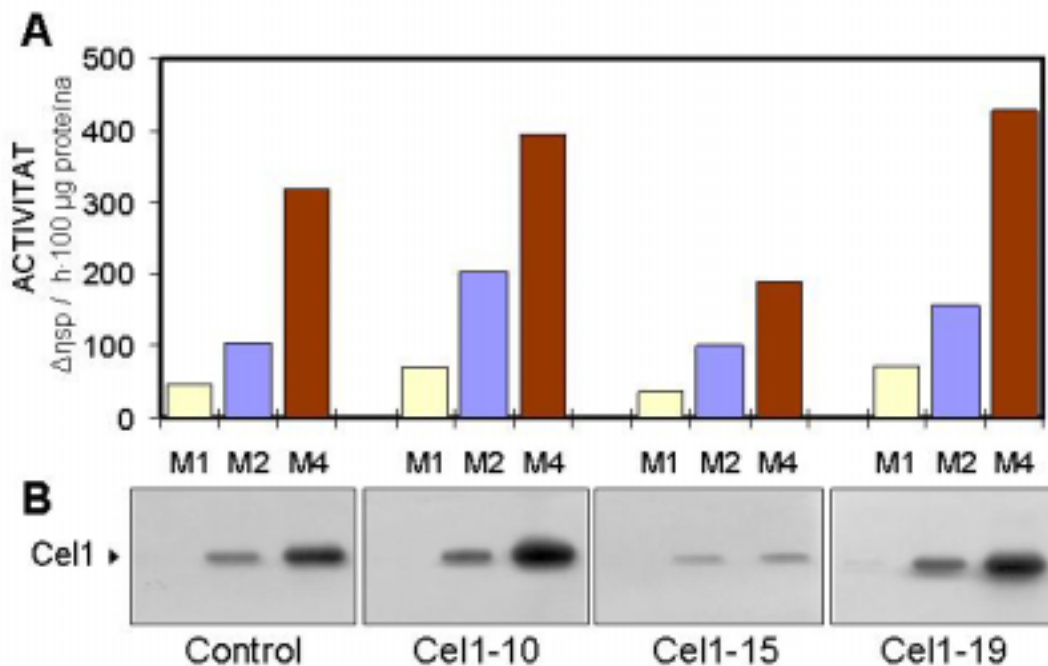


Figura 4.34: A, activitat CMCasa *in vitro* de les plantes antisentit Cel1. Un mínim de tres rèpliques procedents d'extraccions independents es van analitzar per viscosimetria. Les dades, calculades

segons Durbin i Lewis (1988), s'expressen en Unitats d'Activitat Relativa ($\Delta\eta_{sp}$) per hora i per 100 μg de proteïna total. **B**, anàlisi per Western-blot de la proteïna Cel1 en les mateixes plantes, hibridant amb anti-Cel1.

4.8.4.2. Plantes antisentit Cel2

L'activitat CMCasa específica de les EGases en aquests fruits, tot i que variava substancialment, no presentava cap correlació amb la quantitat de proteïna Cel2 (figura 4.35). A més, no s'apreciaven diferències estadísticament significatives entre les línies transgèniques i les línies control. Les diferències d'activitat en valor absolut respecte les plantes Cel1 i les plantes Cel1/Cel2 són degudes a la presència del Triton X-100, usat en el tampó de l'extracció per aquestes mostres, que s'ha demostrat que afecta la viscositat de les mostres. Els nivells de la proteïna Cel2 no estaven alterats en aquestes plantes, així com tampoc els nivells de la proteïna Cel1 (dades no mostrades).

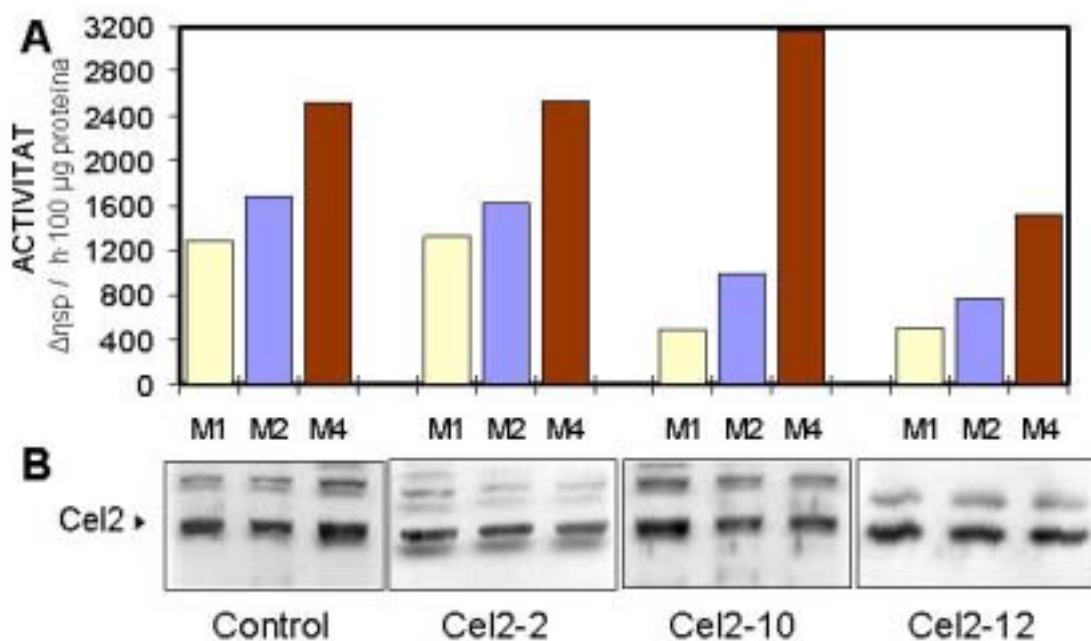


Figura 4.35: **A**, activitat CMCasa *in vitro* de les plantes antisentit Cel2. Un mínim de tres rèpliques procedents d'extraccions independents es van analitzar per viscosimetria. Les dades, calculades segons Durbin i Lewis (1988), s'expressen en Unitats d'Activitat Relativa ($\Delta\eta_{sp}$) per hora i per 100 μg de proteïna total. **B**, anàlisi per Western-blot de la proteïna Cel2 en les mateixes plantes, hibridant amb anti-Cel2.

4.8.4.3. Plantes doble-antisentit Cel1/Cel2

Mitjançant Western-blot es veié que només la línia Cel1/Cel2-2 presentava els nivells de proteïna Cel1 reduïts, tot i que aquesta reducció era menor que en la planta Cel1-15. La planta Cel1/Cel2-2 presentava una acumulació progressiva de la proteïna Cel1 durant tot el procés de maduració, tot i que sempre mostrava nivells inferiors respecte les plantes control (figura 4.36,B). L'anàlisi d'activitat EGasa en aquestes mostres es va fer a pH 7'5, ja que cap d'elles tenia reduïts els nivells de la proteïna Cel2. A la figura 4.36 (A) s'observa com aquesta activitat CMCasa és similar en totes les plantes, incloent Cel1/Cel2-2, i fins i tot, és superior en aquesta respecte les plantes control. No obstant això, totes aquestes plantes tenien una acumulació de proteïna Cel2 similar entre sí i a les plantes usades com a controls. La proteïna Cel1 tampoc es veia alterada en la resta de plantes doble-antisentit.

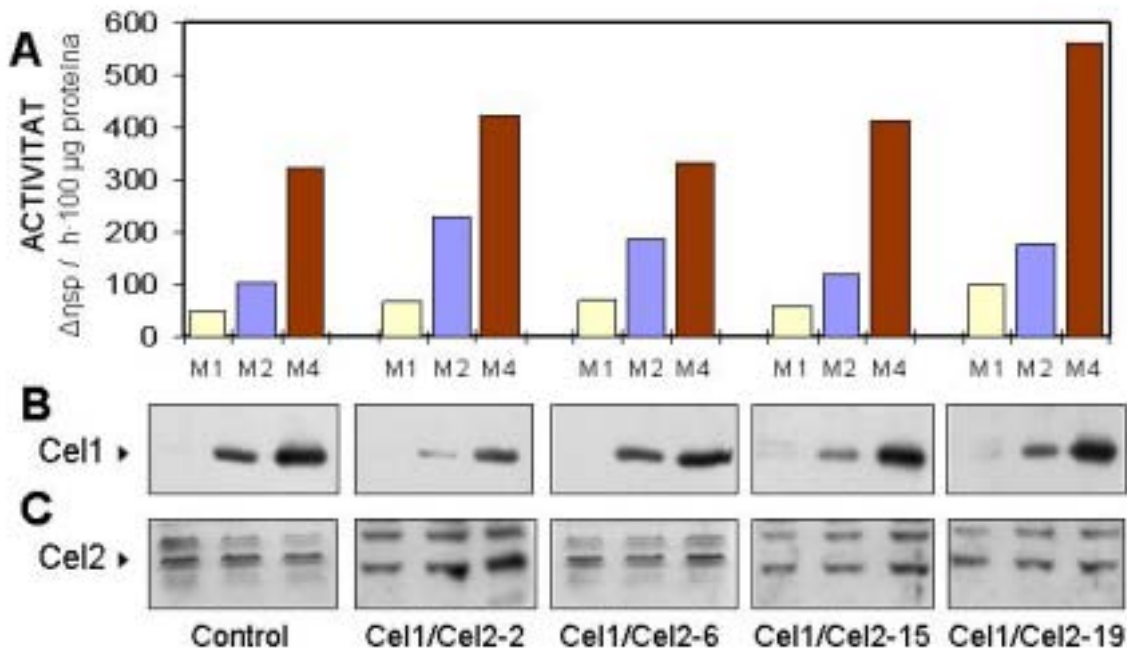


Figura 4.36: A, activitat CMCasa *in vitro* de les plantes doble-antisentit Cel1/Cel2 (veure figura 4.32). Un mínim de tres rèpliques procedents d'extraccions independents es van analitzar per viscosimetria. Les dades, calculades segons Durbin i Lewis (1988), s'expressen en Unitats d'Activitat Relativa ($\Delta\eta_{sp}$) per hora i per 100 μg de proteïna total. Anàlisi per Western-blot de la proteïna Cel1 (B) i Cel2 (C) en les mateixes plantes, hibridant amb anti-Cel1 i anti-Cel2 respectivament.

5. DISCUSSIÓ

5.1. Caracterització de les EGases Cel1 i Cel2 de maduixa

Durant la maduració de la maduixa hi ha un increment de sucres com la glucosa, la xilosa i la manosa en les fraccions solubles de paret, suggerint-se que els polisacàrids hemicel·lulòsics podrien ser o bé degradats, o bé alliberats de les unions amb d'altres polímers (Knee *et al.*, 1977). Aquest procés de degradació no comporta necessàriament una variació en la composició dels polisacàrids de la fracció hemicel·lulòsica, però sí una clara disminució de la mida molecular mitja dels polímers que la formen (Huber, 1984). Si bé el paper que tenen les endo- β -(1,4)-glucanases en aquesta despolimerització encara està poc caracteritzat, la clara correlació de la seva expressió amb l'estovament del fruit suggereix que intervenen de forma important en aquest procés (Abeles i Takeda, 1990). Tot i que fins ara s'havia proposat que les EGases de plantes tenien com a substrat principal els xiloglucans, també s'han descrit EGases sense capacitat o amb una capacitat baixa, per degradar aquests xiloglucans, com per exemple les EGases d'alvocat (O'Donoghue i Huber, 1992). A més, recentment s'ha aïllat una EGasa en *Populus* que allibera oligosacàrids d'origen cel·lulòsic (Ohmiya *et al.*, 2000). Per tant, els substrats potencials en la paret cel·lular per les EGases podrien ser els xiloglucans i/o la cel·lulosa.

S'han aïllat múltiples clons que codifiquen per EGases en plantes superiors. Dos d'aquests clons s'han trobat en maduixa (Llop-Tous, 1997; Harpster *et al.*, 1998; Manning, 1998; Llop-Tous *et al.*, 1999; Trainotti *et al.*, 1999a i 1999b; Woolley *et al.*, 2001) i s'anomenen *Cel1* i *Cel2*, els quals són l'objecte d'aquest treball. Les

EGases *Cel1* i *Cel2* de maduixa formen part de dos subgrups d'EGases filogenèticament divergents; així mentre *Cel1* pertany a les EGases del Tipus 1, *Cel2* pertany a les EGases del Tipus 3. Això suggereix que ambdós enzims tindran possiblement propietats bioquímiques i funcions biològiques diferents, així com mecanismes de regulació independents.

5.1.1. Patró d'expressió i acumulació proteica durant la maduració

S'ha analitzat l'expressió de *Cel1* i *Cel2* en fruits de maduixa en diferents estadis de desenvolupament i en d'altres teixits de la planta (figures 4.1 i 4.2). S'ha vist que l'expressió de *Cel2* ja es detecta clarament en fruit verd (M0), i augmenta substancialment quan el fruit esdevé blanc (M1). Després es manté constant durant tota la maduració fins l'estadi M4. Aquest mateix patró d'expressió per *Cel2* ha estat descrit també per altres autors (Trainotti *et al.*, 1999a i 1999b). L'increment en els nivells de mRNA de *Cel2* no està associat amb cap canvi aparent en la textura del fruit. No obstant això, Huber (1984) va demostrar que el pes molecular de les hemicel·luloses disminuïa en fruits blancs (M1), indicant que la degradació d'aquests polímers s'iniciava ja en fruits verds (M0). L'expressió del transcrit *Cel2* en fruit verd suggereix que el producte d'aquest gen està implicat en els canvis inicials dels polímers d'hemicel·lulosa que condueixen posteriorment a l'estovament del fruit. El mRNA de *Cel1* en canvi, comença a acumular-se gradualment just a l'inici de la maduració (estadi M2) i continua augmentant fins assolir un màxim en fruit madur. Altres autors han descrit el mateix patró d'expressió del mRNA de *Cel1* que nosaltres (Manning, 1998; Harpster *et al.*, 1998; Trainotti *et al.*, 1999a i 1999b).

Encara que aquestes dues EGases presentin un patró d'expressió temporal parcialment superposat en fruits, val a dir que *Cel1* i *Cel2* es diferencien clarament en l'expressió en altres teixits. Així, destaca l'absència d'expressió de *Cel1* en la resta de teixits, indicant que aquest gen és específic de fruit i reforçant la relació d'aquest gen amb l'estovament. *Cel2* en canvi, sí que mostra una expressió detectable en teixits en creixement tals com l'estoló, el meristem i la fulla jove. Tot i que això dona suport a una participació de *Cel2* en les modificacions de la paret cel·lular que acompanyen el creixement i l'expansió cel·lular, com per exemple han proposat Brummell *et al.* (1994) per l'EGasa de pèsol, els nivells remarcables del seu transcrit durant el procés de maduració suggereixen també un paper important en l'estovament dels fruits per aquesta EGasa. En altres espècies en les quals

s'han descrit EGases relacionades amb la maduració, també s'han trobat nivells significatius dels mRNAs corresponents en zones d'abscisió (Lashbrook *et al.*, 1994; Tonutti *et al.*, 1995) i pecíols (Harpster *et al.*, 1997), suggerint altres possibles funcions. Com que els nivells de mRNA de *Cel1* en maduixera estan absents o per sota del límit de detecció en teixits diferents del fruit, es pot afirmar que entre totes les EGases descrites i que s'expressen en fruits, *Cel1* és la que té el patró d'expressió més específic de maduració descrit fins ara (Harpster *et al.*, 1998).

De forma similar a la maduixa, la maduració en tomàquet va acompanyada d'un increment en l'expressió de dues EGases: *LeCel1* i *LeCel2*. No obstant això, en aquest fruit el nivell d'expressió de *LeCel2* és vint cops superior al de *LeCel1*, i el transcrit *LeCel1* s'acumula més en flors en abscisió que no pas en fruits (Lashbrook *et al.*, 1994; Del Campillo i Bennett, 1996). En maduixa en canvi, ambdues EGases mostren uns nivells d'expressió semblant en fruit, a jutjar pel curt temps d'exposició requerit per obtenir un senyal clar en el Northern-blot (figura 4.1). Això suggereix que tant *Cel1* com *Cel2* juguen un paper important en l'estovament del fruit.

Els fruits que sofreixen un estovament important durant la maduració, com el tomàquet i el préssec, produeixen normalment una mescla d'enzims de degradació de la paret entre els quals es troben les EGases i la PG (Abeles *et al.*, 1992). Malgrat això, en maduixa es troben quantitats mínimes de PG durant el desenvolupament i maduració (Nogata *et al.*, 1993). D'acord amb les observacions de Neal (1965), que va veure que els canvis principals ocorreguts durant la maduració de les maduixes es produïen en les cèl·lules parenquimàtiques del còrtex, experiments d'hibridació *in situ* realitzats per Trainotti *et al.* (1999a) mostraren com *Cel1* i *Cel2* s'expressaven a còrtex, i presentaven, a part d'una superposició temporal, un patró d'expressió espacial coincident. L'expressió superposada en el temps i l'espai de *Cel1* i *Cel2* podria indicar una certa cooperació en el metabolisme dels polímers de la paret cel·lular que acompanya a la maduració del fruit.

Mitjançant anàlisis per Western-blot d'extractes proteics totals de maduixa, i usant anticossos policlonals contra la proteïna *Cel1* de maduixa, es va reconèixer una banda de 52 kD de pes molecular (figura 4.11), el qual concorda amb el pes de la proteïna *Cel1* madura i processada predit a partir de la seqüència aminoacídica. Alguns autors han trobat el mateix pes molecular per *Cel1* (Woolley *et al.*, 2001;

Trainotti *et al.*, 1999b), tot i que aquest pes difereix dels 62 kD descrits per Harpster *et al.* (1998). Aquestes diferències en el pes molecular aparent podrien ser degudes a un artefacte ocasionat per les condicions electroforètiques, els propis extractes proteics utilitzats, o al reconeixement de proteïnes diferents. A més del polipèptid de 52 kD, els Western-blots mostren una segona banda d'hibridació de 54 kD que es podria correspondre a la forma no processada de la proteïna, amb el pèptid senyal, o bé a d'altres modificacions postraduccionals, com per exemple una glicosilació heterogènia (González-Bosch *et al.*, 1997). Tampoc es pot descartar la presència d'isoformes divergents, immunològicament relacionades amb Cel1, degut a la naturalesa policlonal de l'anticòs (Rose *et al.*, 2000).

L'ús d'anticossos policlonals contra la proteïna Cel2 de maduixa sobre els mateixos extractes utilitzats per Cel1, va resultar en l'immunoreconeixement d'una banda de 64 kD de pes molecular (figura 4.12), pes que és molt proper al pes molecular teòric predit per la proteïna madura. Tal i com succeïa amb Cel1, també es detectava una proteïna de pes molecular lleugerament superior, que es podria correspondre a formes no processades de Cel2 amb el pèptid senyal, o a altres enzims amb epítops comuns. La presència de bandes de pes molecular inferior podria ser simptomàtic d'una degradació de la proteïna com a resultat del procés d'extracció.

El patró d'acumulació de Cel1 durant la maduració del fruit de maduixa indica que hi ha una síntesi *de novo* de l'enzim, el qual concorda amb els resultats obtinguts per Trainotti *et al.* (1999b), i es correlaciona amb l'expressió del mRNA descrit anteriorment. No obstant això, aquest resultat difereix de l'obtingut per Harpster *et al.* (1998), que va veure que l'acumulació proteica i l'expressió de Cel1 es mantien constants durant tot el procés de maduració. D'altra banda, els nostres resultats indiquen que la proteïna Cel2 també és sintetitzada de nou abans de l'inici de la maduració, doncs s'observa un augment clar de proteïna en fruits blancs (M1) respecte els fruits verds (M0). Després la seva abundància es manté en nivells constants fins el final de la maduració. Aquest resultat coincideix amb el patró d'expressió obtingut prèviament, però difereix dels resultats presentats per Trainotti *et al.* (1999), en els quals l'expressió també augmentava lleugerament des de l'estadi blanc (M1) a l'estadi madur (M4).

L'activitat EGasa augmenta fins a sis cops al passar de fruits verds a fruits madurs (Barnes i Patchett, 1976; Abeles i Takeda, 1990), i aquest augment coincideix temporalment amb l'increment d'expressió i acumulació proteica de Cel1 i Cel2. Tenint en compte l'expressió de *Cel1* i *Cel2* alhora, i l'acumulació proteica dels seus productes gènics, podria ser que aquests dos enzims fossin els principals responsables del patró d'activitat EGasa descrit durant la maduració del fruit de la maduixa (Woolley *et al.*, 2001).

5.1.2. Regulació hormonal de les endo- β -(1,4)-glucanases Cel1 i Cel2

En les plantes amb fruits no-climatèrics, els intents per demostrar l'efecte de l'etilè en l'expressió gènica o en processos fisiològics s'han mostrat certament contradictoris. En maduixa per exemple, la producció d'etilè durant la maduració és extremadament baixa (Knee *et al.*, 1977; Abeles i Takeda, 1990), i el tractament amb antagonistes de l'etilè, com per exemple el 2,5-norbornadiè, l'aminoetoxivinilglicina, el diazociclopentadiè, o el tiosulfat de plata, no afecten la maduració (Given *et al.*, 1988b; Perkins-Veazie, 1995; Tian *et al.*, 1997). A més, l'exposició de maduixes a elevades concentracions d'etilè exogen tampoc afecta la maduració global (Iwata *et al.*, 1969). Posteriorment però, s'ha vist que aplicacions exògenes d'etilè sobre maduixes recol·lectades sí que indueixen o acceleren alguns processos concrets, com són la síntesi d'antocians i la pèrdua de fermesa (Wills i Kim, 1995; García, 1999; Tian *et al.*, 2000).

Per determinar el paper de l'etilè sobre l'expressió de *Cel1* i *Cel2*, vam aplicar etilè exogen (100 ppm, 48 hores) sobre maduixes verdes (estadi M0) o madures (estadi M4) recol·lectades (figura 4.15). En les condicions usades en el nostre experiment no vam detectar cap inducció en l'expressió de *Cel1* o *Cel2* en cap dels dos estadis estudiats, tot i que sí s'observà una lleugera disminució de la textura en els mateixos fruits en estadi M4 (García, 1999). Això ens suggereix que aquest lleuger estovament produït per l'aplicació exògena d'etilè no deriva d'una inducció de l'expressió d'aquestes EGases. Tot i que encara no s'ha descrit cap gen en maduixa la transcripció del qual s'activi directament per etilè, alguns autors han demostrat un efecte de l'etilè sobre el metabolisme del RNA en maduixes recol·lectades (Luo i Liu, 1994). Aquests autors han vist que el RNA total i el RNA poli (A)⁺ augmenta en fruits tractats amb 10-50 ppm d'etilè, de forma independent a la concentració aplicada.

Malgrat tot, el fet d'utilitzar maduixes recol·lectades separades de la planta mare en el nostre treball, no ens permet afirmar que l'etilè no afecta les EGases *Cel1* i *Cel2 in vivo*. Així per exemple, s'ha pogut documentar una petita estimulació per etilè aplicat *in vivo* de l'expressió d'una EGasa (Ferrarese *et al.*, 1995; Harpster *et al.*, 1997) en pebrot, que és un fruit no-climatèric. S'ha suggerit que encara que la maduració de la maduixa no estigui afectada pels nivells endògens d'etilè, alguns processos podrien ser sensibilitzats pel poc etilè produït, i posteriorment estimulats per altres hormones (Luo i Liu, 1994; Perkins-Veazie, 1995).

Basant-nos en l'anàlisi d'expressió de diferents gens que codifiquen per EGases en diferents espècies vegetals, es pot afirmar que les EGases implicades en l'abscisió d'òrgans i la maduració de fruits, exhibeixen patrons de regulació per auxines diferents de les EGases implicades en l'expansió cel·lular en teixits vegetatius. Per una banda, les auxines poden suprimir l'expressió d'EGases induïdes per etilè i implicades en la degradació de la paret cel·lular del fruit i en l'abscisió, i per altra banda, poden estimular l'expressió d'EGases en cèl·lules en creixement i expansió. Aquest efecte contradictori es pot il·lustrar amb diferents exemples. Així, les auxines augmenten l'expressió d'EGases com; *Cel1* en suspensions de cultius cel·lulars de pollancre (Nakamura *et al.*, 1995), *EGL1* en epicòtils de pèsol (Wu *et al.*, 1996) i *LeCel7* en hipocòtils de tomàquet (Catalá *et al.*, 1997). En canvi, les auxines redueixen l'expressió d'EGases relacionades amb l'abscisió i induïdes per etilè en mongeta (*BAC1*; Tucker *et al.*, 1988) i tomàquet (*LeCel1* i *LeCel5*; Del Campillo i Bennett, 1996). Aquest efecte de control antagònic de l'expressió de les diferents EGases per part de les auxines s'ha observat en varies espècies vegetals.

En la majoria de fruits no-climatèrics, el paper potencial de l'etilè en la maduració és difícil d'estudiar, doncs es produeixen nivells excepcionalment baixos d'aquesta hormona, i és possible que aquests baixos nivells ja tinguin un efecte saturant, impeding cap efecte al aplicar etilè exogen (Harpster *et al.*, 1998). No obstant això, sigui quin sigui el paper de l'etilè en la maduració de la maduixa, el principal mecanisme regulador del procés és la quantitat d'auxines presents al fruit (Veluthambi i Poovaiah, 1984; Given *et al.*, 1988a; Manning, 1994). Així, en fruit de maduixa immadur, l'expansió del receptacle és controlada per les auxines sintetitzades i alliberades pels aquenis. L'eliminació dels aquenis mimetitzava la reducció d'auxines produïda durant la maduració, provocant una degradació de

clorofil·la, una acumulació d'antocians i una pèrdua de textura. Com que l'aplicació exògena d'auxines prevén el fruit desaquenitzat d'aquests canvis, es pot concloure que la maduració està regulada en gran part, per una disminució en la quantitat d'auxines produïdes als aquenis (Given *et al.*, 1988a; Manning, 1994 i 1998).

Per tal d'estudiar la regulació de *Cel1* i *Cel2* per auxines durant la maduració de la maduixa, es van fer tractaments amb NAA en fruits desaquenitzats i es va analitzar el seu efecte en l'expressió i l'acumulació proteica. En aquests experiments vam veure que l'eliminació dels aquenis provocava un augment de l'expressió dels mRNAs de *Cel1* i *Cel2*. Aquest efecte es podia inhibir mitjançant l'aplicació de l'auxina sintètica NAA, demostrant una correlació negativa entre els nivells d'auxines elevats i l'expressió d'ambdós gens (figura 4.13).

Malgrat que els dos gens estan regulats negativament per auxines, és remarcable el fet que la supressió dels aquenis indueix molt més ràpidament l'expressió del gen *Cel2* que no pas la del gen *Cel1*. Això probablement suggeriria que *Cel2*, a diferència de *Cel1*, és un gen que està sensibilitzat prèviament per altres mecanismes, com per exemple l'etilè, i que petites disminucions d'auxines n'estimulen ràpidament l'expressió.

S'observa també com l'aplicació de NAA en fruits desaquenitzats inhibeix totalment l'expressió de *Cel1*, però no de *Cel2*. Tot i que alguns autors han atribuït aquest fenomen a la pobre penetració de l'hormona en el teixit del receptacle i/o a la degradació de l'hormona (Medina-Escobar, 1997), el fet que en *Cel1* sí es reverteixi completament l'expressió, suggereix que aquest no és el nostre cas. Si el mecanisme regulador és a nivell transcripcional, l'efecte hormonal hauria de ser el mateix pels dos gens. Per tant, aquesta inhibició parcial de l'expressió de *Cel2* en fruits tractats amb auxines s'explicaria per l'augment d'expressió normal associat a la maduració, i que en aquest gen es produeix al passar de l'estadi M0 (utilitzat per la desaquenització) a l'estadi M1. Llavors, la desaquenització només acceleraria el procés d'inducció del gen, mentre que l'addició d'auxines exògenes el frenaria, però no l'inhibiria totalment, doncs estaria competint amb altres mecanismes estimuladors.

La inducció de l'expressió dels dos gens en fruits desaquenitzats, no es tradueix en una gran acumulació de la proteïna, tot que sí és molt clara la inhibició

d'aquesta acumulació proteica al aplicar NAA (figura 4.14). La falta de correlació entre l'augment d'expressió i l'acumulació proteica suggereix la presència de mecanismes postranscripcionals de regulació, o bé una inducció molt lenta, ja que per a la detecció dels mRNAs mitjançant Northern-blot es van requerir temps d'exposició elevats, especialment per *Cel1*. Malgrat tot, els nostres resultats suggereixen que l'expressió dels mRNAs de *Cel1* i *Cel2* i l'acumulació de les respectives proteïnes, és reprimida per auxines i induïda per la disminució de les auxines endògenes, les quals, directa o indirectament, inicien la maduració.

5.1.3. pI i N-glicosilació de *Cel1* i *Cel2*

Les EGases descrites dins d'una mateixa espècie solen formar part de famílies multigèniques grans i divergents, que per exemple en tomàquet consten de vuit membres (Lashbrook *et al.*, 1994; Milligan i Gasser, 1995; Del Campillo i Bennett, 1996; Brummell *et al.*, 1997a; Catalá *et al.*, 1997; Catalá i Bennett, 1998) i en *Arabidopsis* de dotze (Del Campillo, 1999).

La comparació entre les diferents EGases d'una mateixa planta mostra la presència de diferències molt importants. En *Arabidopsis* s'han descrit fins ara EGases de dos tipus diferents. Així, trobem proteïnes del Tipus 1, solubles i amb un pèptid senyal predit per a la secreció extracel·lular, i proteïnes del Tipus 2, sense pèptid senyal, i probablement unides a la membrana plasmàtica. L'absència de proteïnes del Tipus 3 en *Arabidopsis* suggereix la possible existència d'altres EGases que encara no han estat clonades (Del Campillo, 1999).

Dins les EGases secretades de Tipus 1 d'*Arabidopsis*, trobem proteïnes madures amb diferències importants en el seu pI i en la presència de senyals de N-glicosilació: (1) proteïnes altament bàsiques, pI >9'0, o (2) proteïnes àcides, pI <5'5. En les EGases de Tipus 2 predominen les proteïnes de pI bàsic, i amb nombrosos senyals consens de N-glicosilació (taula 5.1). Cal remarcar però, que els valors de pI deduïts a partir de la seqüència primària no tenen en compte l'estructura terciària de la proteïna plegada, i per tant, el pI teòric pot ser força diferent del pI real (Awad i Lewis, 1980; Kanellis i Kalaitzis, 1992).

Taula 5.1: Llistat dels gens trobats en *Arabidopsis* que codifiquen per EGases, amb el pI, el pes molecular i els possibles llocs per la N-glicosilació predits a partir de la seqüència aminoacídica (Del Campillo, 1999). El pes molecular es correspon a la proteïna madura, sense el pèptid senyal.

Locus	pI	P.M. (kD)	N-glicosilació
Cel1F19G10.16	9'4	50'5	1
Cel1	9'2	51'2	1
CelT2H3.5	9'0	55'2	-
CelT26J12.2	8'1	51'2	1
Cel2	7'2	52'0	-
CelF16B22.6	5'5	50'5	-
CelF16B22.5	5'2	50'1	1
CelF411.36	8'5	50'4	-
Cel21L14.7	5'4	55'9	2
CelF411.37	5'9	53'4	-
CelT17O5	9'0	69'1	8
Cel5I14.14	9'3	69'8	10

Mitjançant gels d'electroforesis de dues dimensions (NEPHGE/SDS-PAGE o IEF/SDS-PAGE), i usant extractes proteics totals obtinguts amb diferents mètodes d'extracció, vam caracteritzar el pI de les proteïnes Cel1 i Cel2 (figures 4.16 i 4.17).

Tant en el Western-blot del NEPHGE/SDS-PAGE dels extractes proteics obtinguts mitjançant el mètode dels fenols, com en el Western-blot del NEPHGE/SDS-PAGE dels extractes proteics obtinguts amb els mètodes CTAB o KCl/CaCl₂, l'anticòs anti-Cel1 hibridava amb uns polipèptids de pI aproximat de 8'5, valor molt proper al pI teòric predit per Cel1 (pI 9'0). El reconeixement de diferents polipèptids amb un pes molecular i un pI pròxims a l'esperat podria ser conseqüència d'una certa heterogeneïtat en les modificacions postraduccionals de Cel1, causada per variacions en el patró de la composició en carbohidrats, fosforilacions o acetilacions.

La hibridació de l'anticòs amb una intensitat similar, amb d'altres proteïnes de pes molecular i pI variables en l'extracte fenòlic, podria suggerir-nos la presència en l'extracte de: formes de degradació de Cel1, enzims amb epítops comuns a Cel1, isoformes de Cel1 no processades o simplement, tractar-se d'un artefacte. El fet que els altres extractes utilitzats (CTAB i KCl/CaCl₂) hibridessin de forma molt

més específica amb els polipèptids de pes molecular i pI esperats, ens suggereix que l'excés de soroll de fons dels Western-blots de l'extracte fenòlic és degut probablement a un excés de proteïna total, el qual podria ocasionar una elevada presència d'altres proteïnes amb epítops comuns.

Per altra banda, el pI trobat per la proteïna Cel2 en extractes proteics obtinguts mitjançant el mètode dels fenols va ser de pI 5'0 (figura 4.17), el qual dista molt del valor predit a partir de la seqüència aminoacídica, que és de pI 9'15. Independentment del tipus de gel utilitzat en la primera dimensió (NEPHGE o IEF) s'obtingué el mateix pI. Això, juntament amb l'elevada especificitat d'unió de l'anticòs primari, suggereix que Cel2 presenta un pI real de 5'0. A la literatura s'han descrit altres EGases amb pI real diferent del teòric, com per exemple BAC1 de mongeta, que té un pI teòric de 7'8 i el pI real trobat és de 9'5 (Reid *et al.*, 1974). Tot i que es desconeix el possible origen d'aquesta diferència en el pI, alguns autors ho han atribuït a un efecte del plegament derivat de l'estructura terciària, o a modificacions postraduccionals (Reid *et al.*, 1974). Malgrat això, la diferència de pI trobada per Cel2 és molt més significativa que en BAC1, i no es té coneixement de cap altra proteïna amb un comportament similar. Sí que s'han descrit però, plantes que presenten isoformes d'EGasa amb un pI molt diferent, i que tenen una expressió simultània en el temps. És el cas del préssec, on s'han descrit dues isoformes de pI 6'5 i 9'5, implicades en l'abscisió del fruit (Bonghi *et al.*, 1992), i de la mongeta, on també s'han trobat dues isoformes amb pI molt diferent en les zones d'abscisió de fulles; pI 4'5 i pI 9'5 (Durbin i Lewis, 1988). En ambdós casos, les dues isoformes porten a terme funcions fisiològiques diferents.

L'assaig per a la detecció de N-glicosilació fet amb concanavalina A va mostrar la presència de residus oligosacàridics en Cel1, però no en Cel2, tot i que ambdues proteïnes presenten el motiu N-X-S/T que és un senyal consens per a la N-glicosilació (figura 4.18). Aquest fet podria ser degut a què Cel2 no es troba realment glicosilada *in vivo*, però també podria explicar-se per la conjugació de la proteïna amb residus glucosídics diferents als detectats per la lectina usada en aquest experiment, la concanavalina A (Glass *et al.*, 1981; Clegg, 1982). La concanavalina A té afinitat per residus de manosa, glucosa, sorbosa i N-acetilglucosamina, que tot i ser molt freqüents, no són els únics residus de carbohidrats que es troben en glicoproteïnes vegetals. L'absència d'immunoreconeixement creuat de l'anticòs anti-Cel1 amb la proteïna Cel2 o d'anti-

Cel2 amb la proteïna Cel1, en condicions de baixa astringència, indicaria la conjugació de Cel1 i Cel2 amb estructures polisacàridiques diferents, perquè en la producció d'antisèrum policlonal també es generen anticossos contra epítops d'origen polisacàridic (Inohue *et al.*, 1999).

5.2. Activitat associada a les EGases Cel1 i Cel2 de maduixa

Fins ara s'han fet diferents treballs per caracteritzar l'activitat CMCasa associada a les EGases durant el procés de desenvolupament i maduració de la maduixa, i en tots ells s'han mostrat diferències quantitatives importants entre els diferents estadis analitzats (Abeles i Takeda, 1990; Harpster *et al.*, 1998; Trainotti *et al.*, 1999b). Aquests treballs, tot i presentar un patró d'activitat CMCasa similar, que suposa un increment de l'activitat des de l'estadi M2 fins l'estadi M4 que es correlaciona amb una disminució de la textura (figura 5.1), mostren certes discrepàncies en les quantitats d'activitat relativa descrites per un mateix estadi.

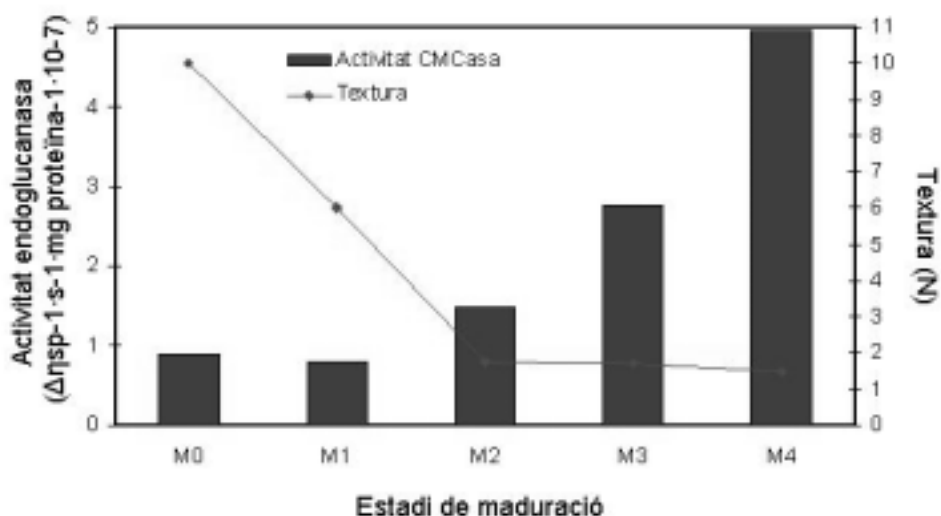


Figura 5.1: Relació entre la textura i l'activitat CMCasa específica durant el desenvolupament i la maduració del fruit de la maduixa (Woolley *et al.*, 2001).

En els experiments realitzats fins ara per a la quantificació d'activitat CMCasa, el principal factor limitant era el mètode d'extracció d'EGases usat. En el nostre treball hem demostrat com molts dels mètodes d'extracció no desnaturalitzants descrits a la bibliografia no alliberen les dues proteïnes Cel1 i Cel2

de la paret cel·lular, el qual implica que molts dels assaigs d'activitat realitzats fins ara no reflexen l'activitat EGasa total present en la maduixa durant la maduració. En general, tots aquests mètodes extreuen la proteïna Cel1 de la paret, però molt pocs aconseguen obtenir suficient proteïna Cel2 per realitzar anàlisis d'activitat, a jutjar pels nostres assaigs de Western-blot (figura 4.10). Així, els mètodes publicats per Trainotti *et al.* (1999b) i Woolley *et al.* (2001), entre d'altres, només ens van permetre l'obtenció de la proteïna Cel1 (dades no presentades). Altres mètodes descrits, com els utilitzats per Abeles i Takeda (1990) i Harpster *et al.* (1998) en maduixa, o Kanellis *et al.* (1991) en alvocat, no han permès aïllar suficient proteïna Cel1 per poder-la detectar mitjançant Western-blot amb el nostre anticòs. El fet que la majoria de mètodes d'extracció que extreuen Cel1 utilitzin elevades concentracions de sals ($\geq 1\text{M NaCl}$, $\geq 1\text{M KCl}$) o detergents (SDS, CTAB, Triton X-100), ens suggereix que aquest enzim està fortament unit a la paret cel·lular mitjançant enllaços iònics.

L'extracció de la proteïna Cel2 en forma no desnaturalitzada és encara més difícil. Fins ara, els únics mètodes d'extracció proteica que s'havien mostrat efectius per Cel2 eren els que utilitzaven tampons altament desnaturalitzants. És el cas del tampó utilitzat en aquest treball pel mètode dels fenols, o del tampó descrit per Trainotti *et al.* (2001a), que inclou 8M d'urea. Segons aquests autors, la utilització d'elevades concentracions de sals, fins a 2M de NaCl, és incapaç d'extreure Cel2, suggerint que aquesta EGasa es troba unida a la paret cel·lular de forma molt efectiva, probablement degut a la seva unió mitjançant el domini d'unió a cel·lulosa (CBD). Nosaltres en aquest treball hem descrit el primer mètode conegut per alliberar aquestes EGases amb domini CBD en forma activa, basant-nos en l'ús simultani de dos detergents, el CTAB i el Triton X-100.

5.2.1. IEF nadiu

Per tal d'establir la presència de diferents isoformes amb activitat EGasa *in vivo* en fruits de maduixa en estadi M4, vam realitzar un assaig d'activitat *overlay*, després de resoldre els extractes proteics nadius per mitjà de gels IEF-PAGE no desnaturalitzants. El fet de no incorporar directament el substrat al gel nadiu es deu al fet que la resolució d'un gel amb el substrat incorporat seria menor. Això és degut a què les diferents EGases presents a la mostra estan actives durant l'electroforesi i

provoquen una degradació progressiva de tot el substrat present al carril, generant bandes poc definides (Kanellis i Kalaitzis, 1991).

Quan vam resoldre les proteïnes en gels IEF nadius amb amfolines de rang de pH 3-10 (figura 4.19), vam obtenir dues zones d'activitat ben diferenciades; una a la regió àcida (pI 4'5-6'0), i l'altra a la regió bàsica del gel (pI >8'0). L'opacitat produïda en la regió bàsica dels gels *overlay*, que dificulta la tinció amb Congo Red i posterior visualització de l'activitat, es produeix probablement per precipitació del substrat de CMC. Segons Righetti (1987), les amfolines tenen propietats quelants degut a la presència de radicals de nitrogen lliures. Per tant, poden segrestar metalls (cations) del medi on es troben. Això és especialment cert en el rang de pH 8'5-10'5, quan la majoria de radicals de nitrogen estan sense protonar. El segrest de cations Na⁺ del substrat de CMC, resulta probablement en una precipitació d'aquest, doncs aquest substrat està precisament en forma de sal sòdica per augmentar-ne la poca solubilitat natural que té.

La disminució del rang de pH de les amfolines fins a pH 5-8, per evitar la precipitació del CMC, va resultar en una millor resolució de les bandes d'activitat (figura 4.19). La regió d'activitat bàsica es va mostrar com una única banda de pI 8'5-9'0, mentre que la regió d'activitat àcida es va separar en quatre bandes de pI: 5'00, 5'40, 5'85 i 6'20, aproximadament. Un altre fruit on també s'han trobat múltiples isoformes amb activitat CMC és l'alvocat, on s'han descrit fins a onze isoformes diferents (Kanellis i Kalaitzis, 1991).

Segons Kanellis i Kalaitzis (1992), si es descarta la possible interferència d'artefactes deguts a la pròpia tècnica del IEF (interaccions entre amfolines i proteïnes), o al mètode d'extracció proteica, l'heterogeneïtat d'isoformes trobades en un mateix teixit pot ser conseqüència de modificacions postraduccional, com diferències en la glicosilació, fosforilació o acetilació (Bennett i Christoffersen, 1986), o bé pot ser deguda a la presència d'una família multigènica d'EGases (De Francesco *et al.*, 1989). La presència d'artefactes deguts a la interacció de les amfolines amb les proteïnes es pot descartar en el nostre cas, perquè es van fer electroforesis carregant en el costat àcid o el costat bàsic del gel, usant amfolines de diferent rang de pH. A més, es va veure que la quantitat de proteïna carregada no afectava el nombre d'isoformes actives.

Els nostres resultats contrasten amb els obtinguts per Trainotti *et al.* (1999b), que van descriure la presència de només dues isoformes amb activitat CMCasa en maduixa, amb un pI de 7'9 i 9'0 respectivament. Aquestes discrepàncies podrien ser degudes al diferent rang d'amfolines usat en el gel IEF o als diferents mètodes d'extracció utilitzats, tot i que els diferents mètodes d'extracció que nosaltres hem utilitzat (KCl/CaCl₂ i CTAB) han mostrat els mateixos patrons d'activitat en el gel IEF.

La hibridació amb anticòs anti-Cel1 dels gels IEF nadiu amb amfolines de rang de pH 5-8 va donar com a resultat el reconeixement de dues bandes de pI 8'5-9'0, una de les quals es corresponia amb la banda bàsica d'activitat. El 2D-PAGE (IEF nadiu, primera dimensió; SDS-PAGE, segona dimensió) d'aquests gels nadius, va mostrar que aquesta doble banda es traduïa en dues proteïnes que tenien el mateix pes molecular esperat per Cel1 (figures 4.20 i 4.21), així com el mateix pI trobat en extractes fenòlics analitzats per NEPHGE/SDS-PAGE. Per tant, les dues proteïnes de pI bàsic detectades per Western-blot en el IEF nadiu, usant amfolines de rang de pH 5-8, podrien tractar-se de formes de Cel1 amb diferent grau de glicosilació i/o processament postraduccionals. La resta d'isoformes no hibridaven amb l'anticòs o hibridaven dèbilment i presentaven un pes molecular inferior. Destaca però, la hibridació de l'anticòs anti-Cel1 amb una proteïna de pI 7'5, que no presentava activitat en el gel *overlay*, i que en el 2D-PAGE es mostrava com una proteïna de baix pes molecular (~36 kD). Això ens suggereix que probablement aquesta proteïna és un subproducte de la degradació de la proteïna Cel1 o d'alguna altra EGasa. També es detecten dèbilment amb anti-Cel1 unes bandes a la regió àcida, algunes de les quals es correlacionen amb bandes actives. Tant aquestes bandes com la banda de pI 7'5 es podrien explicar també per la presència d'EGases amb epítops antigènics similars. Alternativament, podrien ser formes degradades de Cel1 que mantinguessin activitat CMCasa. En aquest sentit, s'ha vist que la digestió mitjançant proteases d'algunes EGases bacterianes resulta en dues isoformes de baix pes molecular, que presenten major activitat que l'enzim nadiu (Zhang *et al.*, 1999).

Per altra banda, l'anticòs anti-Cel2 hibridava amb dues proteïnes de pI 5'5 i 7'5 en el gel IEF nadiu (figura 4.22). La similitud del pI determinat per NEPHGE/SDS-PAGE, a partir d'extractes fenòlics, amb la banda de pI 5'5 ens suggereix que aquesta proteïna es correspon amb Cel2, tot i que això no es va

poder comprovar en gels 2D-PAGE, degut probablement a la poca quantitat de proteïna present al gel. La banda de pI 7'5 es correspon amb la proteïna de baix pes molecular del mateix pI, detectada amb l'anticòs anti-Cel1. Com ja s'ha dit, aquesta proteïna es podria correspondre a formes degradades d'enzims, amb o sense activitat EGasa, o fins i tot a d'altres proteïnes de baix pes molecular amb epítops antigènics comuns, i amb activitat diferent de la CMCasa.

5.2.2. Sobreexpressió de Cel1 en *Pichia pastoris*: caracterització enzimàtica de Cel1

Per tal de caracteritzar millor l'activitat enzimàtica de les EGases de maduixa, es van usar els cDNAs de *Cel1* i *Cel2* per obtenir proteïnes recombinants expressades *in vitro* en el llevat metilotròfic *Pichia pastoris*. Es va utilitzar aquest sistema eucariòtic per tal d'obtenir les proteïnes modificades postraduccionalment amb característiques similars a la proteïna nadiua, ja que ambdues proteïnes, per tal de dur a terme la seva funció a la paret cel·lular de la planta, són secretades a l'espai periplasmàtic (Llop-Tous, 1997). Amb aquest propòsit, la secreció al medi extracel·lular es va dirigir amb el pèptid senyal α de *Saccharomyces cerevisiae*.

El llevat *Pichia pastoris* ja ha estat emprat per a l'expressió recombinant d'altres EGases vegetals (Ferrarese *et al.*, 1998; Mølhøj *et al.*, 2001) o d'altres enzims de paret cel·lular de plantes i fongs, com les β -galactosidases de maduixa (Trainotti *et al.*, 2001b) o les endo- β -(1,4)-xilanasases d'*Aspergillus niger* (Berrin *et al.*, 2000), i s'ha mostrat molt efectiu en l'expressió heteròloga d'aquests gens. L'ús d'altres sistemes d'expressió en el nostre laboratori no havia resultat en l'obtenció de proteïna Cel1 o Cel2 recombinant, és el cas del sistema d'expressió constitutiva pYES-2 del llevat *Saccharomyces cerevisiae*; o en canvi, es produïen proteïnes sense activitat EGasa, com és el cas de l'expressió induïble per IPTG del sistema pET28 d'*Escherichia coli*. El principal inconvenient del sistema basat en *Pichia pastoris* és la presència d'una elevada activitat EGasa endògena secretada (Mølhøj *et al.*, 2001).

En el nostre cas només va ser possible l'obtenció de proteïna recombinant per Cel1 (Cel1/pPic9), tal i com es va confirmar per Western-blot. La proteïna Cel2 no es va poder sobreexpressar en *Pichia pastoris*. La producció final d'una proteïna en *Pichia pastoris* està principalment influenciada per les seves propietats

estructurals inherents (Sreekrishna *et al.*, 1997), i de fet, només un 50% dels gens clonats produeix suficient proteïna recombinant per a poder-hi treballar (Invitrogen, San Diego, CA). Així per exemple, els gens amb una elevada composició nucleotídica A+T no es transcriuen de forma eficient degut a una terminació prematura de la transcripció. Malgrat tot, a part de les propietats intrínseques de la proteïna, hi ha altres factors que afecten la correcta expressió de les proteïnes en aquest llevat (Sreekrishna *et al.*, 1997), com són: (1) el lloc d'integració del gen en el genoma (locus *AOX1* o *HIS4*); (2) la capacitat d'utilització del metanol per part de l'hoste (*Mut⁺/Mut^S*); (3) la dosi gènica o multiplicitat de còpies; (4) el pèptid senyal de secreció utilitzat i (5), l'estabilitat del producte format o susceptibilitat a la degradació proteolítica. De tots aquests factors, el més determinant és el pèptid senyal de secreció emprat, tot i que l'elecció d'aquest és bastant arbitrària: algunes vegades el pèptid senyal ideal és el propi del gen d'estudi, però en d'altres, és millor usar un pèptid senyal específic de llevat. Probablement la variació en algun d'aquests factors podria resultar, en el futur, en l'obtenció de suficient proteïna Cel2 recombinant en *Pichia pastoris*. Alguns autors han sobreexpressat proteïnes en aquest llevat fusionant el gen amb un domini CBD de bacteris (Rotticci-Mulder *et al.*, 2001), per tal de facilitar-ne la posterior purificació mitjançant columnes d'afinitat amb cel·lulosa, suggerint que aquest domini, present de forma natural en Cel2, no afecta a la sobreexpressió proteica en *Pichia pastoris*.

Una de les peculiaritats de la sobreexpressió que vam fer de Cel1/pPic9 en *Pichia pastoris*, fou la recuperació de la proteïna en les cèl·lules intactes del llevat i no en el medi de cultiu (figura 4.25). Això es confirmà tant per anàlisi Western-blot amb anti-Cel1, com mitjançant un assaig d'activitat EGasa de les diferents fraccions del cultiu, i usant cèl·lules de *Pichia pastoris* productores de la proteïna BSA o amb el vector pPic9 sense cap insert, com a controls negatius. Donat que la proteïna recombinant portava el pèptid senyal α de llevat, era d'esperar que la proteïna fos secretada. Malgrat això, es va veure que Cel1/pPic9 no es trobava al medi de cultiu. El fet que la proteïna tampoc no estés al medi intracel·lular va suggerir que Cel1/pPic9 es secretava, però es quedava associada a la paret cel·lular. Això suggereix que Cel1 s'uneix iònicament a la paret cel·lular del *Pichia pastoris*. La unió de Cel1 a la paret cel·lular per enllaços iònics probablement també es produeix *in vivo* en la maduixa, ja que els resultats obtinguts en les extraccions proteiques no desnaturalitzants mostren que aquesta proteïna només s'extreu amb elevades concentracions de sals (figura 4.10). Altres autors han observat el mateix

comportament en proteïnes de paret cel·lular de maduixa, concretament en β -galactosidases sobreexpressades en *Pichia pastoris* (Trainotti *et al.*, 2001b). En aquest cas però, la unió a la paret cel·lular es va explicar per la presència d'un domini en la regió C-terminal de les β -galactosidases amb capacitat d'unió a sucres.

Una altre aspecte important de la sobreexpressió de Cel1/pPic9 en llevat fou la recuperació de proteïnes que presentaven un pes molecular aparent superior, uns 16 kD aproximadament, a l'esperat (figura 4.25). Altres autors han descrit la producció de proteïnes amb un pes molecular superior al predit en proteïnes sobreexpressades en *Pichia pastoris* (Grobe *et al.*, 1999; Mølhøj *et al.*, 2001; Rotticci-Mulder *et al.*, 2001). En tots aquests casos, aquest augment de pes molecular s'ha atribuït a un efecte de la N-glicosilació per part del llevat. Un dels avantatges que presenta el gènere *Pichia* sobre *Saccharomyces* és el tipus de glicosilació que produeix: així, els oligosacàrids units a la proteïna recombinant per part de *Pichia* solen ser més petits que els de *Saccharomyces* (Bretthauer i Castellino, 1999).

No obstant això, en tots els llevats, a diferència de les cèl·lules eucariotes superiors, és freqüent trobar proteïnes recombinants amb residus hiperglicosilats de fins a 50-100 residus de α -(1,6)-manosa en el senyal consens de glicosilació, i amb cadenes laterals curtes de di o trisacàrids de α -(1,2)-manosa. A part d'aquesta N-glicosilació, la presència d'oligosacàrids curts de menys de cinc residus de manosa units per O-glicosilació és també freqüent en llevats, tot i que ha estat menys estudiada (Bretthauer i Castellino, 1999). La disponibilitat d'enzims que reconeixen el nucli dels oligosacàrids units per N-glicosilació i en catalitzen la hidròlisi, ha permès l'estudi d'aquests processos en llevat. És el cas de l'endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (endo H), específica de residus rics en manosa (Bretthauer i Castellino, 1999), i del pèptid:N-glucosidasa F (PNGasa), que trenca els enllaços glucosamina amb una àmplia especificitat de substrat (Tarentino *et al.*, 1985; Bretthauer i Castellino, 1999).

Els tractaments fets amb PNGasa F sobre la proteïna recombinant Cel1/pPic9 reduïen en ~5 kD el pes molecular (figura 4.26), el qual demostrava que aquesta proteïna estava N-glicosilada. Tot i que vam provar diferents temps de reacció per a la deglicosilació, i agents desnaturalitzants (detergents) varis, mai es va poder reduir el pes molecular de Cel1/pPic9 per sota dels 60 kD. El fet que el

pes molecular no fos igual al de la proteïna nadiua ens suggeria un deglicosilació incompleta, o bé la presència d'altres modificacions postraduccionals, com O-glicosilació o fosforilació de cadenes laterals d'oligosacàrids (Bretthauer i Castellino, 1999). El més probable però és que la deglicosilació amb PNGasa fos incompleta, degut a la presència d'enllaços no reconeguts per l'enzim, o a la inaccessibilitat d'aquests, produïda pel propi plegament proteic (Tarentino *et al.*, 1985). Podria ser que, tal com descriuen Bretthauer i Castellino (1999), es produeixi una deglicosilació de les cadenes laterals de l'oligosacàrid proteic, però no de la cadena central.

Per tal de determinar si aquesta hiperglicosilació afectava l'activitat CMCasa de Cel1/pPic9 es van assajar per viscosimetria mostres deglicosilades amb PNGasa. Es va veure que el tractament amb PNGasa no afectava l'activitat de les mostres respecte les mostres no tractades (dades no mostrades). Aquest resultat és diferent de l'obtingut per Mølhøj *et al.* (2001), que van veure que els tractaments de deglicosilació reduïen l'activitat CMCasa d'una EGasa de *Brassica napus* sobreexpressada en *Pichia pastoris*. No obstant això, a diferència de Cel1/pPic9, aquesta EGasa de *Brassica* sí es deglicosilava completament amb el tractament amb PNGasa, la qual cosa suggeria que el residu oligosacàridic era necessari per mantenir la conformació activa de la proteïna. En el nostre cas, la poca relació entre la gran quantitat de proteïna Cel1/pPic9 produïda per *Pichia pastoris*, i la poca activitat CMCasa detectada, ens suggereix que les modificacions postraduccionals produïdes més aviat dificulten l'activitat CMCasa de la proteïna. Tampoc es pot descartar la presència de substàncies inhibidores en el medi del llevat o la presència d'altres enzims que interfereixin en l'activitat de Cel1/pPic9.

Posteriorment, cèl·lules de *Pichia pastoris* transformades amb Cel1/pPic9 es van induir amb metanol durant 72 hores, i es va veure que tant l'activitat CMCasa com l'acumulació proteica de la proteïna recombinant determinada mitjançant Western-blot, eren màximes a les 72 hores després de la inducció (figura 4.28). Conseqüentment, tots els assaigs posteriors es van fer amb mostres induïdes 72 hores.

Abans d'estudiar l'especificitat de substrat de la proteïna Cel1/pPic9 expressada en llevat, es va investigar la influència del pH en la seva activitat enzimàtica (figura 4.27). Usant CMC com a substrat, es va mesurar l'activitat de

Cel1/pPic9 en tampons amb diferents valors de pH , compresos entre 5'2 i 9'5, i es va veure que el pH òptim era de 7'5. Aquest pH òptim d'activitat determinat per a la proteïna Cel1/pPic9 és relativament proper al pI determinat per la proteïna nadiua, i està una mica per fora del rang de pH en el qual la majoria d'EGases presenten la seva activitat màxima (pH 5-7). Aquests valors de pH òptim estan condicionats probablement pel pH de l'espai de la paret cel·lular on es localitzen els substrats de cada enzim (Brummell *et al.*, 1994). Per altra banda, també s'han descrit altres EGases amb pH òptim d'activitat superior a 7. És el cas de *BAC1* de mongeta, que presenta un pH òptim d'activitat CMCasa entre 6'0-8'5 (Durbin i Lewis, 1988). En maduixa, s'ha descrit un pH òptim d'activitat CMCasa a 5'5 (Abeles i Takeda, 1990), tot i que aquesta activitat està mesurada sobre extractes proteics que probablement tenen poca eficiència en l'extracció de la proteïna Cel1 (veure apartat 5.2).

Fins ara, s'havia proposat que les EGases secretades en plantes actuaven principalment sobre els xiloglucans, degut a l'aparent inactivitat contra la cel·lulosa nadiua (Hayashi, 1989; Brummell *et al.*, 1994). Així, s'ha descrit activitat sobre xiloglucans en EGases de tabac (Truelsen i Wyndaele, 1991) i pèsol (Hayashi *et al.*, 1984). No obstant això, també s'han descrit EGases sense capacitat, o amb una capacitat baixa, de degradació de xiloglucans, com les EGases d'alvocat (O'Donoghue i Huber, 1992). A més, recentment s'ha descrit una EGasa secretada en pollancre que allibera oligosacàrids d'origen cel·lulòsic (Ohmiya *et al.*, 2000). Per tant, els substrats potencials en la paret cel·lular per les EGases podrien ser els xiloglucans i/o la cel·lulosa.

Nosaltres vam determinar l'especificitat de substrat de la proteïna Cel1/pPic9 recombinant usant diferents polímers carbohidrats de la paret cel·lular (taula 4.2). La hidròlisi dels polímers es va quantificar mitjançant un assaig de generació de radicals amb capacitat reductora de sucres (Schales i Schales, 1945). De tots els substrats assajats, només els que posseïen enllaços β -(1,4) van mostrar una degradació significativa, sent les diferents formes de CMC les que es mostraven més susceptibles a la degradació. No es va detectar activitat enfront el midó, i es va detectar molt poca activitat envers l'àcid poligalacturònic, ambdós amb enllaços α -(1,4).

A diferència d'algunes EGases de membrana, o de Tipus 2, Cel1/pPic9 mostrà una activitat important enfront dels xiloglucans, suggerint un paper en el

metabolisme d'aquests polímers. Aquesta activitat elevada sobre xiloglucans, podria suggerir que els xiloglucans són un possible substrat *in vivo* per aquest enzim. Sorprenentment però, es detectà una activitat encara més significativa de Cel1/pPic9 vers la cel·lulosa CF-11, el qual ens indueix a pensar que potser la cel·lulosa és també degradada *in vivo* per aquest enzim. Aquest resultat fou inesperat, ja que no hi ha cap evidència de que les microfibril·les de cel·lulosa es degradin, i no s'ha observat cap canvi en els residus de glucosa solubilitzats durant la maduració (Neal, 1965; Koh i Melton, 2002). Malgrat això, l'absència de solubilització de la cel·lulosa durant la maduració no implica que aquest polímer no sigui modificat. Degut a la força dels ponts d'hidrogen entre les cadenes de cel·lulosa, existeix la possibilitat de que una hidròlisi de la cel·lulosa no resulti en una solubilització important dels productes formats per hidròlisi.

En maduixa, s'ha descrit que l'activitat EGasa purificada no té activitat *in vitro* enfront una forma altament ordenada de la cel·lulosa (Barnes i Patchett, 1976), i que la proteïna Cel1 purificada és incapaç de degradar la cel·lulosa fibrosa insoluble o CF11 (Woolley *et al.*, 2001). Per tant, no podem excloure que la degradació de la cel·lulosa i els altres substrats per part de Cel1/pPic9, siguin diferents de l'activitat de la proteïna en el seu ambient nadiu, particularment per la presència de patrons de glicosilació diferents. No obstant això, podria ser que l'enzim requerís estar en contacte amb algun component de la paret cel·lular per ser capaç de degradar la cel·lulosa. Com altres estudis realitzats anteriorment s'han basat en enzims purificats, aquest requeriment no s'acompliria. Dins d'aquest context, s'ha descrit una glucanasa extracel·lular de *Rhizobium leguminosarum* que no és activa a no ser que estigui en presència d'un component exopolisacàridic relacionat amb ella (Zorreguieta *et al.*, 2000).

Per altra banda, encara que fins ara estava àmpliament assumit que les EGases de plantes eren incapaces de degradar extensivament la cel·lulosa cristal·lina insoluble, cal esmentar que recentment s'ha descrit que diferents EGases d'epicòtils de pèsol (Wong *et al.*, 1977) i de cultius cel·lulars en suspensió de pollancre (Nakamura i Hayashi, 1993; Ohmiya *et al.*, 1995; Ohmiya *et al.*, 2000) poden degradar algunes formes de cel·lulosa. A més, estudis ultraestructurals de la paret cel·lular de fruit d'alvocat (O'Donoghue *et al.*, 1994) indiquen que l'EGasa d'alvocat pot trencar l'organització de les microfibril·les de cel·lulosa mitjançant una hidròlisi limitada, afectant així la fortalesa de la paret.

L'estovament de la maduixa podria explicar-se doncs, per una activitat inicial de les EGases (Cel2) sobre els xiloglucans, que facilitaria l'acció d'altres enzims hidrolítics. Llavors es produiria una degradació de la xarxa de cel·lulosa i xiloglucans per part d'altres EGases (Cel1 i Cel2), conjuntament amb altres enzims, com són les expansines. Això provocaria una distensió de la paret cel·lular que facilitaria l'acció final d'altres enzims hidrolítics, inclòs Cel1. Una evidència per això podria ser la progressiva desorganització de les microfibril·les de cel·lulosa en la paret cel·lular de fruits de maduixa que s'ha observat mitjançant estudis ultraestructurals (Trainotti *et al.*, 1999b). Prèviament a aquesta desorganització s'ha vist una reducció de la mida de les molècules d'hemicel·lulosa, abans de la inducció de Cel1, i que podria ser provocada per Cel2.

5.3. Inhibició de l'expressió de *Cel1* i *Cel2* en plantes transgèniques

El principal factor que limita la vida post-collita dels fruits és l'estovament. L'ús de plantes transgèniques amb l'expressió modificada d'enzims implicats en el metabolisme de la paret cel·lular ha permès estudiar el paper de l'activitat individual de cadascun d'ells en l'estovament del fruit. Cal diferenciar però, els intents de reduir l'estovament del fruit en plantes transgèniques, dels intents de controlar totalment el procés de maduració per mitjà de la supressió de la producció d'etilè (Hamilton *et al.*, 1990; Oeller *et al.*, 1991). La reducció exclusiva de la pèrdua de textura permet que la majoria de processos associats a la maduració (com canvis en la pigmentació, sucres, volàtils i àcids orgànics) procedeixi normalment, incrementant a més la vida mitja post-collita del fruit. La reducció de l'estovament és útil també en fruits no-climatèrics, on la supressió de la producció d'etilè no és factible (Brummell i Harpster, 2001).

Per investigar la funció particular de cada enzim en la degradació de la paret cel·lular, es prefereix la supressió o sobreexpressió dels nivells enzimàtics per mitjà de la manipulació transgènica *in vivo*, abans que no pas fer tractaments amb enzims purificats *in vitro* sobre la paret cel·lular, o sobre fraccions aïllades d'aquesta paret cel·lular (Brummell i Harpster, 2001). Això s'explica perquè la penetració dels enzims als llocs d'acció pot estar limitada, o perquè a vegades es requereix l'acció combinada de dos o més enzims per poder realitzar la seva funció, la qual cosa condiona que freqüentment aquests polímers o fraccions de paret aïllats siguin

menys degradats que no pas *in vivo*. La principal limitació que té l'ús de plantes transgèniques dins d'aquest context és que la majoria d'enzims catabòlics de la paret cel·lular estan presents al genoma en forma de famílies multigèniques, i si hi ha una altra isoforma que pot complementar la funció de la isoforma suprimida, llavors no s'observa cap efecte fenotípic. A més, com que el paper concret d'un enzim es sol desconèixer, sovint apareixen efectes inesperats i per tant, cal examinar detingudament el fruit bioquímicament i fenotípicament per tal d'observar i detectar aquests canvis .

En aquest treball hem transformat plantes de maduixa amb les seqüències antisentit de *Cel1* i/o *Cel2* sota el control del promotor específic de fruit *fbp7*, per tal de conèixer el paper individual de cadascun dels dos gens en la maduració del fruit, i en relació a l'estovament. Per això s'han utilitzat tres construccions diferents: *Cel1*, per inhibir l'expressió de *Cel1*; *Cel2*, per inhibir l'expressió de *Cel2*; i *Cel1/Cel2*, per inhibir l'expressió d'ambdós gens alhora.

5.3.1. Plantes transgèniques antisentit *Cel1*

Només una planta de la construcció *Cel1* (*Cel1-15*) va mostrar una reducció quasi total de l'expressió del mRNA *Cel1* en fruit, mentre que la resta de plantes mostraren nivells d'expressió superiors respecte *Cel1-15* (figures 4.33 i 4.34). Aquesta planta presentava a més una reducció molt significativa de l'acumulació de la proteïna *Cel1* en tots els estadis analitzats, i la seva activitat EGasa mesurada per viscosimetria en fruits madurs M4 disminuïa en un 40% respecte les plantes control. Estudis preliminars en què s'ha mesurat la textura d'aquests fruits mitjançant el mètode de "Constant Stress Compression", també han detectat un lleuger, però apreciable, augment de la textura en els fruits madurs de la planta *Cel1-15* (Van DerValk *et al.*, comunicació personal).

Els nostres resultats difereixen dels publicats recentment en un treball en el qual també van suprimir l'expressió de *Cel1* en plantes de maduixa transgèniques antisentit, usant el promotor constitutiu 35S (Woolley *et al.*, 2001). Tot i que es va aconseguir inhibir l'expressió del transcrit *Cel1* en aquestes plantes antisentit amb el promotor 35S, no es va detectar cap efecte significatiu en l'activitat EGasa o la fermesa del fruit. L'absència de disminució de l'activitat EGasa en aquestes plantes amb expressió reduïda, contràriament als nostres resultats, es podria explicar per la

utilització d'un pH diferent en l'anàlisi viscosimètrica. Així, Woolley *et al.* (2001) van usar un pH genèric de 5'0, descrit àmpliament en la bibliografia per a la quantificació de l'activitat EGasa, mentre nosaltres havíem caracteritzat que el pH òptim per la proteïna Cel1/pPic9 recombinant era de 7'5. Encara que és possible que el pH òptim d'activitat determinat *in vitro* per a la proteïna recombinant sigui diferent al pH real, les diferències trobades en la quantificació d'activitat entre ambdós estudis, així com la presència d'altres EGases en els extractes totals, ens suggereixen que el pH emprat en la mesura podria condicionar el resultat final obtingut.

La quantificació de l'activitat EGasa en els fruits de la planta antisentit Cel1-15 mostrava una activitat EGasa a pH 7'5 reduïda, però superior a l'esperada, tenint en compte la gran reducció en l'acumulació proteica respecte les plantes control. Això ens suggereix la presència d'altres EGases actives, com per exemple, Cel2. Si fos aquest el cas, l'activitat de Cel2 o de qualsevol altra EGasa hauria d'incrementar-se per compensar la pèrdua d'activitat procedent de Cel1. Encara que l'activitat específica de Cel2 no es va poder mesurar, sí es va veure que tant l'expressió de *Cel2* com l'acumulació proteica de Cel2 no estaven augmentades en les plantes antisentit Cel1, suggerint que no és Cel2 l'enzim que compensa l'activitat de Cel1. No obstant això, no es pot descartar un efecte sobre l'activitat de Cel2 degut a una regulació a nivell postraducciona. Tot i que es desconeix la contribució relativa dels enzims Cel1 i Cel2 en l'activitat EGasa de fruits madurs control, aquests resultats impliquen un paper complementari, però independent, de Cel1 i Cel2 en l'estovament.

La fermesa de la maduixa depèn de la mida del fruit, estadi de maduració, i dia de collita, i consta de dos factors determinants: duresa de l'epidermis i fermesa del còrtex (Hietaranta i Linna, 1999). El fet que les nostres plantes amb l'expressió de *Cel1* reduïda mostressin un menor estovament del fruit, mentre les plantes antisentit de Woolley *et al.* (2001) no presentaven cap efecte fenotípic, es podria explicar pels diferents mètodes de mesura de la textura utilitzats. Així, Woolley *et al.* (2001) van usar el mètode de "Puncture Stress", mentre nosaltres utilitzàrem el de "Constant Stress Compression", el qual podria comportar diferències de sensibilitat. Els estudis de textura fets mitjançant "Constant Stress Compression" sobre les nostres maduixes transgèniques, es van fer de tal forma que es van eliminar els efectes de la grandària del fruit, estadi de maduració i variació estacional. A més, a

diferència del mètode de “Puncture Stress”, el nostre mètode no està condicionat per la presència de l'epidermis.

Harpster i Dunsmuir (dades no publicades) van reduir l'expressió de *CaCel1* per cossupressió en pebrot, un altre fruit no-climatèric. En aquests fruits amb l'expressió del mRNA *CaCel1* reduïda s'ha observat una disminució fins a nivells indetectables de l'acumulació de la proteïna corresponent, així com de l'activitat CMCasa mesurada. Malgrat això, en aquests fruits transgènics, la despolimerització dels xiloglucans respecte els fruits control era molt similar, suggerint un paper menor de *CaCel1* en la degradació d'aquests polímers durant la maduració. Resultats similars s'han obtingut en fruits que sobreexpressen *CaCel1*. Tot això està correlacionat amb el possible paper que tenen algunes EGases en la degradació de formes derivades de la cel·lulosa, en detriment de l'activitat sobre els xiloglucans, i donaria sentit a l'elevada activitat que mostra l'enzim Cel1/pPic9 sobre la cel·lulosa CF-11 (apartat 4.7.2.1.3).

5.3.2. Plantes transgèniques antisentit Cel2

Les plantes transgèniques antisentit Cel2 no van mostrar cap reducció important en l'expressió del mRNA *Cel2*, i lògicament aquestes plantes presentaven uns nivells de proteïna, una activitat EGasa i un fenotip, molt similars al de les plantes control (figures 4.33 i 4.35). L'absència de cap planta amb fruits que presentessin una expressió reduïda per *Cel2*, tant en la construcció Cel2 com en la construcció Cel1/Cel2, es podria explicar perquè aquest gen juga un paper molt important en el desenvolupament de la planta i/o del fruit. Si *Cel2* és imprescindible per a la planta, creixeran només aquelles plantes amb expressió no reduïda, seleccionant-se per tant les línies no transgèniques.

5.3.3. Plantes transgèniques doble-antisentit Cel1/Cel2

Per tal de conèixer la funció conjunta de les EGases en maduixa es requeria la reducció dels gens *Cel1* i *Cel2* alhora, mitjançant plantes doble-antisentit. No obstant això, tot i que es pogués reduir l'expressió de *Cel1* i *Cel2* de forma simultània, la possible interacció sinèrgica d'aquests enzims amb d'altres proteïnes hidrolítiques de la paret cel·lular, incloses altres isoformes d'EGases no descobertes encara, podrien emascarar el paper específic de les EGases en la textura del fruit.

La transformació de plantes amb la construcció doble-antisentit, realitzades amb el propòsit d'inhibir l'expressió de *Cel1* i *Cel2*, no va aconseguir reduir en cap cas els trànscrip dels dos gens alhora. De fet, només en una d'aquestes plantes, *Cel1/Cel2-2*, es va reduir l'expressió de *Cel1* de forma significativa, i cap d'elles va mostrar reducció del trànscrip *Cel2* (figures 4.33 i 4.36). Tot i que aquestes plantes mostraven nivells d'expressió *Cel2* superiors a les plantes control, els nivells de proteïna *Cel2* en aquestes plantes eren aparentment normals. En l'apartat 5.3.2 es suggereix una possible explicació de les dificultats trobades per obtenir plantes transformants antisentit per *Cel2*.

Els nivells de la proteïna *Cel1* en la planta *Cel1/Cel2 -2* eren reduïts, però aquesta reducció era menor que en la planta *Cel1-15*, la qual cosa suggeria que probablement no era suficient per provocar un efecte fenotípic detectable al quantificar l'activitat o al mesurar la textura. De totes maneres, tal i com passava amb la majoria de les plantes antisentit *Cel1*, la manca de reducció en l'activitat EGasa total, o l'absència de cap fenotip, també es podria explicar per la presència d'altres EGases que compensessin la disminució específica de l'activitat associada a *Cel1*.

El paper de les EGases específiques en la maduració s'ha investigat àmpliament en plantes de tomàquet transgèniques. Mitjançant la tecnologia antisentit s'ha inhibit l'expressió, en fruit de tomàquet, de *LeCel1* i *LeCel2* per separat. Els fruits transgènics en els quals s'havia suprimit l'expressió de *LeCel1* mostraven un comportament normal en l'estovament (Lashbrook *et al.*, 1998). Igualment, la fermesa dels fruits en els quals l'expressió de *LeCel2* s'havia eliminat, era similar als fruits control (Brummell *et al.*, 1999a). En tomàquet, hi ha almenys una altra EGasa que s'expressa de forma sincronitzada amb *LeCel1* i *LeCel2*; *LeCel5*. És possible doncs que hi hagi una redundància en la funció dels productes d'aquests tres gens. Tal i com passa en maduixa, aquest exemple demostra que la supressió de només una EGasa, en fruits que presenten altres EGases o enzims degradadors de paret cel·lular, no revela el seu paper en l'estovament. Això confirma la necessitat de reduir múltiples EGases alhora per tal de poder observar diferències fenotípiques relacionades amb l'acció de les EGases.

S'ha descrit recentment en maduixa que la inhibició de l'expressió del gen de la pectat liasa en plantes transgèniques antisentit, es tradueix en un increment

molt lleuger de la textura del fruit, tot i que sorprenentment no s'han detectat canvis en l'activitat PEL (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002). En aquest fruit, tot i que només s'ha publicat un gen que codifiqui per una PEL, s'ha vist que podria existir una petita família multigènica de pectat liases (Medina-Escobar *et al.*, 1997).

Es requereixen estudis molt més profunds dels canvis produïts en la textura, així com de l'efecte de la reducció de les diferents EGases de maduixa sobre els diferents components estructurals de la paret cel·lular, per poder interpretar les dades que disposem fins ara i esbrinar quins polímers de la paret cel·lular es veuen afectats, i com això afecta la textura. Hi ha encara massa enzims als fruits dels quals es coneix l'activitat bioquímica i/o la seqüència aminoacídica, però se'n desconeix encara la seva funció en la maduració del fruit. Aquests enzims són, principalment: glicosidases, pectat liases, endo- β -(1,4)-glucanases i endomananases (Brummell i Harpster, 2001). El fet que l'estovament sigui conseqüència de l'acció de múltiples enzims no pot ser un fet casual, i això fa que possiblement sigui necessària la supressió d'aquestes múltiples isoformes responsables de cada activitat, o de diferents enzims per tal d'obtenir efectes comercialment interessants.

6. CONCLUSIONS

1. L' endo- β -(1,4)-glucanasa **Cel1** de maduixa presenta un patró d'expressió del mRNA i una acumulació proteica específics de maduració i fruit, refermant el seu paper en l'estovament associat a la maduració.
- 2.- L' endo- β -(1,4)-glucanasa **Cel2** mostra un augment de l'expressió del mRNA i de l'acumulació proteica just abans d'iniciar-se la maduració, quan el fruit encara s'està desenvolupant, i després es manté en nivells elevats i constants durant la maduració. Com que Cel2 s'expressa en teixits en creixement tals com el fruit, l'estoló, el meristem i la fulla jove, això ens fa pensar que aquesta endo- β -(1,4)-glucanasa està implicada en les modificacions de la paret cel·lular que acompanyen el creixement i l'expansió cel·lular, a part de l'estovament associat a la maduració.
3. L'eliminació dels aquenis del fruit inicia el procés de maduració de la maduixa, provocant un augment de l'expressió i de l'acumulació proteica de Cel1 i Cel2. Donat que en els aquenis es produeix la síntesi i alliberació d'**auxines**, es pot afirmar que Cel1 i Cel2 estan sota control negatiu de les auxines.
- 4.- L'aplicació exògena d'**etilè** en fruits de maduixa no modifica l'expressió de *Cel1* i *Cel2*, suggerint que aquesta hormona no intervé en la regulació transcripcional d'aquests gens.

- 5.- La **proteïna Cel1** en forma nadiua només s'extreu del fruit de la maduixa mitjançant l'ús de tampons amb elevades concentracions salines, indicant que aquest enzim està unit a la paret cel·lular mitjançant enllaços iònics. El fet que la **proteïna Cel2** requereixi un detergent per a la seva extracció i no s'extregui amb tampons amb una elevada concentració salina ens suggereix que aquesta endoglucanasa es troba unida a la paret cel·lular de forma molt efectiva, probablement mitjançant el domini d'unió a cel·lulosa.
- 6.- El **punt isoelèctric** trobat per Cel1 és de 8'5, molt proper al valor teòric predit a partir de la seqüència. Cel2 en canvi, presenta un punt isoelèctric de 5'0, molt diferent del valor teòric predit. Ambdues proteïnes presenten un senyal consens per la **N-glicosilació**, però només Cel1 té afinitat per la concanavalina A. Per tant, o bé només Cel1 està realment glicosilada *in vivo*, o més probablement, Cel1 i Cel2 es conjuguen amb residus glucosídics diferents.
- 7.- S'ha detectat cinc **isoformes amb activitat endoglucanasa** en extractes proteics totals de maduixa madura; una isoforma bàsica i quatre isoformes àcides. Mitjançant Western-blot del gel nadiu, s'ha vist que la isoforma de pl bàsic (pl 8'5) es correspon a Cel1, mentre una de les isoformes àcides, de pl 5-5'5, es correspon a la proteïna Cel2. La resta d'isoformes podrien ser altres enzims amb activitat endoglucanasa diferents de Cel1 o Cel2, doncs no hibriden amb els anticossos corresponents.
- 8.- La proteïna Cel1 recombinant (Cel1/pPic9) sobreexpressada en llevat té un **pH** òptim d'activitat endoglucanasa de 7'5. Aquesta mateixa proteïna Cel1/pPic9 es troba glicosilada i probablement unida iònicament a la paret cel·lular del llevat. Cel1/pPic9 ha mostrat afinitat significativa només per **substrats** que posseeixen enllaços β -(1,4), especialment per CMC, cel·lulosa CF-11 i xiloglucans. Per tant, els substrats potencials *in vivo* per la proteïna Cel1 podrien ser els xiloglucans i/o la cel·lulosa amorfa de la paret cel·lular.
- 9.- La inhibició antisentit de l'expressió de *Cel1* en plantes transgèniques de maduixa disminueix clarament l'acumulació de la proteïna i resulta en una reducció parcial de l'activitat endoglucanasa total en fruit madur. Estudis preliminars mostren que això es tradueix només en una lleugera disminució

de la textura del fruit. Aquests resultats suggereixen que hi ha altres enzims implicats en l'estovament del fruit que compensen la inhibició de Cel1, o bé que la contribució de Cel1 a l'activitat endoglucanasa total és petita.

- 10.-** No s'han pogut obtenir plantes de maduixa transgèniques antisentit amb expressió reduïda per *Cel2*. Aquest fet es podria explicar perquè *Cel2* és un gen imprescindible per la planta, i per tant, sense la seva expressió les plantes no es poden desenvolupar.
- 11.-** Tot i que es desconeix la contribució relativa dels enzims Cel1 i Cel2 en l'activitat endoglucanasa en fruits de maduixa madurs, els nostres resultats impliquen un paper complementari de Cel1 i Cel2 en l'estovament que acompanya la maduració.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abeles, F.B. i Takeda, F.** (1990). Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits. *Scientia Horticulturae*, 42: 269-275.
- Abeles, F.B., Morgan, P.W. i Saltveit, M.E.Jr.** (1992). Ethylene in plant biology. Academic Press, 2ª edició. San Diego, USA.
- Al-Jamali, A.F.** (1972). Cell wall enzymes and senescence in strawberry fruits. *PhD Dissertation*, Purdue University.
- Ali, Z.M. i Brady, C.J.** (1982). Purification and characterization of the polygalacturonases of tomato fruit. *Australian Journal of Plant Physiology*, 9: 155-161.
- Almeida, D.P.F. i Huber, D.J.** (1999). Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: a potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening. *Physiologia Plantarum*, 105: 506-512.
- Almin, K.E., Eriksson, K.E. i Jansson, C.** (1967). Enzymatic degradation of polymers. II. Viscometric determination of cellulase activity in absolute terms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 139: 248-253.
- Aoki, S., Araki, C., Kaneko, K. i Katayama, O.** (1970). L-Phenylalanineammonia-lyase activities in Japanese chestnut, strawberry, apple fruit and bracken. *Journal of Food Science and Technology*, 17: 507-511.
- Archer, S.A.** (1979). Pectolytic enzymes and degradation of pectin associated with breakdown of sulphited strawberries. *J. Sci. Food Agric.*, 30: 692-703.
- Asada, K., Ohba, T., Takahashi, S. i Kato, I.** (1999). Alteration of fruit characteristics in transgenic tomatoes with modified gene expression of endoxyloglucan transferase. *HortScience*, 34: 533.

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. i Struhl, K.** (1997). A: Current Protocols in Molecular Biology. John Willey & Sons. USA.
- Averyhart-Fullard, V., Datta, K. i Marcus, A.** (1998). A hydroxiprolin-rich protein in the soybean cell wall. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 1082-1085.
- Awad, M. i Lewis, L.N.** (1980). Avocado cellulase: extraction and purification. *Journal of Food Science*, 45: 1625-1628.
- Baldwin, E. i Pressey, R.** (1990). Exopolygalacturonase elicits ethylene production in tomato fruit. *HortScience*, 7: 779-780.
- Barnes, M.F. i Patchett, B.J.** (1976). Cell wall degrading enzymes and the softening in senescent strawberry fruit. *Journal of Food Science*, 41: 1392-1395.
- Baron-Epel, O., Gharai, P.K., i Schindler, M.** (1988). Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta*, 175: 395-401.
- Bartley, I.M.** (1978). Exopolygalacturonase of apple. *Phytochemistry*, 17: 213-216.
- Bartley, G.E. i Scolnik, P.A.** (1995). Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction and human health. *Plant Cell*, 7: 1027-1038.
- Bartley, G.E., Scolnik, P.A. i Giulliano, G.** (1994). Molecular biology of carotenoid biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45: 287-301.
- Ben-Arie, R., Kislev, N. i Frenkel, C.** (1979). Ultrastructural changes in the cell walls of ripening apple and pear fruit. *Plant Physiology*, 64: 197-202.
- Bennett, A.B. i Christoffersen, R.E.** (1986). Synthesis and processing of cellulase from ripening avocado fruit. *Plant Physiology*, 81: 830-835.
- Berrin, J.G., Williamson, G., Puigserver, A., Chaix, J.C., McLauchlan, W.M. i Juge, N.** (2000). High-level production of recombinant fungal endo- β -1,4-xylanase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 19: 179-187.
- Biale, J.B. i Young, R.E.** (1971). Respiration and ripening in fruits. Retrospect and prospect. A: *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Chapman & Hall.
- Bird, C.R., Smith, C.J.S., Ray, J.A., Moreau, P., Bevan, M.W., Bird, A.S., Hughes, S., Morris, P.C., Grierson, D. i Schuch, W.** (1988). The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 11: 651-662.
- Bird, C.R., Ray, J.A., Fletcher, J.D., Boniwell, J.M., Bird, A.S., Teulieres, C., Blain, L., Bramley, P.M. i Schuch, W.** (1991). Using antisense RNA to study

- gene function: inhibition of carotenoid biosynthesis in transgenic tomatoes. *Biotechnology*, 9: 635-639.
- Birnboim, H.C. i Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research*, 7: 1513-1523.
- Blumer, J.M., Clay, R.P., Bergmann, C.W., Albersheim, P. i Darvill, A.G.** (2000). Characterization of changes in pectinmethylesterase expression and pectin esterification during tomato fruit ripening. *Canadian Journal of Botany*, 78: 607-618.
- Bonghi, C., Rascio, N., Ramina, A. i Casadoro, G.** (1992). Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and explants of peach. *Plant Molecular Biology*, 20: 839-848.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P. i Lamb, C.J.** (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defence response. *Cell*, 70: 21-30.
- Brady, C.J. i O'Connell, P.B.H.** (1976). On the significance of increased protein synthesis in ripening banana fruits. *Aust. J. Plant Physiol.*, 3: 301-310.
- Brady, C.J., Meldrum, S.K. i McGlasson, W.B.** (1983). Differential accumulation of the molecular forms of polygalacturonase in tomato mutants. *Journal of Food Biochemistry*, 7: 7-14.
- Brady, C.J.** (1987). Fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology*, 38: 155-178.
- Branzanti, E.C.** (1989). A: La fresa. Ed. Mundi-prensa. Madrid.
- Brett, C.T. i Waldron, K.W.** (1996). A: Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls. *Topics in Plant Functional Biology: 1*. Eds. M. Black i B. Charlwood. Chapman & Hall. London.
- Bretthauer, R.K. i Castellino, F.J.** (1999). Review: Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30: 193-200.
- Brownleader, M.D., Jackson, P., Mobasheri, A., Pantelides, A.T., Sumar, S., Trevan, M. i Dey, P.M.** (1999). Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32: 149-164.
- Brummell, D.A., Lashbrook, C.C. i Bennett, A.B.** (1994). Plant endo- β -1,4-glucanases: structure, properties and physiological function. A: Enzymatic

- Conversion of Biomass for Fuels Production. Eds. M.E. Himmel, J.O. Baker i R.P. Overend. *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.*, 566: 100-129.
- Brummell, D.A., i Labavitch, J.M.** (1997). Effect of antisense suppression of endopolygalacturonase activity on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and in fruit homogenates. *Plant Physiology*, 115: 717-725.
- Brummell, D.A., Catalá, C., Lashbrook, C.C. i Bennett, A.B.** (1997a). A membrane-anchored E-type endo- β -(1,4)-glucanase is localized in Golgi and plasma membranes of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 4794-4799.
- Brummell, D.A., Bird, C.R., Schuch, W. i Bennett, A.B.** (1997b). An endo- β -(1,4)-glucanase expressed at high levels in rapidly expanding tissues. *Plant Molecular Biology*, 33: 87-95.
- Brummell, D.A., Hall, B.D. i Bennett, A.B.** (1999a). Antisense suppression of tomato endo- β -(1,4)-glucanase Cel2 mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zones but does not affect fruit softening. *Plant Molecular Biology*, 40: 615-622.
- Brummell, D.A., Harpster, M.H. i Dunsmuir, P.** (1999b). Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. *Plant Molecular Biology*, 39: 161-169.
- Brummell, D.A., Harpster, M.H., Civello, P.M., Palys, J.M., Bennett, A.B. i Dunsmuir, P.** (1999c). Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell*, 11: 2203-2216.
- Brummell, D.A., i Harpster, M.H.** (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 47: 311-340.
- Budelier, K.A., Smith, A.G. i Gasser, C.S.** (1990). Regulation of a stylar transmitting tissue-specific gene in wild-type and transgenic tomato and tobacco. *Mol. Gen. Genet.*, 224: 183-198.
- Carder, J.H.** (1986). Detection and quantitation of cellulase by Congo Red staining of substrates in a cup-plate diffusion assay. *Analytical Biochemistry*, 153: 75-79.
- Carey, A.T., Holt, K., Picard, S., Wilde, R., Tucker, G.A., Bird, C.R., Schuch, W. i Seymour, G.B.** (1995). Tomato exo- β -(1,4)-D-galactanase: isolation, changes during ripening in normal and mutant tomato fruit, and characterization of a related cDNA clone. *Plant Physiology*, 108: 1099-1107.

- Carpita, N.C. i Gibeaut, D.M.** (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with physical properties of the wall during growth. *Plant Journal*, 3: 1-30.
- Carrington, C.M.S., Greve, L.C. i Labavitch, J.M.** (1993). Cell wall metabolism in ripening fruit. IV. Effect of the antisense polygalacturonase gene on cell wall changes accompanying ripening in transgenic tomatoes. *Plant Physiology*, 103: 429-434.
- Carrington, C.M.S. i Pressey, R.** (1996). β -galactosidase II activity in relation to changes in cell wall galactosyl composition during tomato ripening. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 121: 132-136.
- Cassab, G.I.** (1998). Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular biology*, 49: 281-309.
- Catalá, C., Rose, J.K.C. i Bennett, A.B.** (1997). Auxin regulation and spatial localization of an endo- β -(1,4)-glucanase and a xyloglucan endo-transglycosylase in expandin tomato hypocotyls. *Plant Journal*, 12: 417-426.
- Catalá, C. i Bennett, A.B.** (1998). Cloning and sequence analysis of Tomcel8, a new plant endo- β -(1,4)-glucanase gene encoding protein with a putative carbohydrate-binding domain. *Plant Physiology*, 118: 1535-1543.
- Catalá, C., Rose, J.K.C. i Bennett, A.B.** (2000). Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato growth. *Plant Physiology*, 122: 527-534.
- Chen, J.A. i Varner, J.E.** (1985). Isolation and characterization of cDNA clones for carrot extensin and a proline-rich 33 kDa protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4399-4403.
- Chen, H.C., Klein, A., Xiang, M.H., Backhaus, R.A. i Kuntz, M.** (1998). Drought- and wound-induced expression in leaves of a gene encoding a chromoplast carotenoid-associated protein. *Plant Journal*, 14: 317-326.
- Cheng, G.W. i Breen, P.J.** (1992). Cell count and size in relation to fruit size among strawberry cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 117: 946-950.
- Chun, J.P. i Huber, D.J.** (1998). Polygalacturonase mediated solubilization and depolymerization of pectic polymers in tomato fruit cell walls. Regulation by pH and ionic conditions. *Plant Physiology*, 117: 1293-1299.
- Civello, P.M., Powell, A.L.T., Sabehat, A. i Bennett, A.B.** (1999). An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology*, 121: 1273-1279.

- Clegg, J.C.S.** (1982). Glycoprotein detection in nitrocellulose transfers of electrophoretically separated protein mixtures using Concanavalin A and peroxidase: Application to Arenavirus and Flavivirus proteins. *Analytical Biochemistry*, 127: 389-394.
- Condit, C.M. i Meagher, R.B.** (1986). A gene encoding a novel glycine-rich structural protein of petunia. *Nature*, 323: 178-181.
- Coombe, B.G.** (1976). The development of fleshy fruits. *Annual Review of Plant Physiology*, 27: 507-528.
- Cosgrove, D.J., Bedinger, P. i Durachko, D.M.** (1997). Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 6559-6664.
- Cosgrove, D.J.**, (1998). Cell wall loosening by expansines. *Plant Physiology*, 118: 333-339.
- Cosgrove, D.J., Durachko, D.M. i Li, L.C.** (1998). Expansins may have cryptic endoglucanase activity and can synergize the breakdown of cellulose by fungal cellulases. *Annu. Meeting Amer. Soc. Plant Physiol.* Vancouver: BC 171.
- Crookes, P.R. i Grierson, D.** (1983). Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isozymes in cell wall degradation. *Plant Physiology*, 72: 1088-1093.
- Darley, C.P., Forrester, A.M. i McQueen-Mason, S.J.** (2001). The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Molecular Biology*, 47: 179-195.
- Davies, G. i Henrissat, B.** (1996). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3: 853-859.
- De Francesco, L., Tucker, M.L. i Laties, G.G.** (1989). Message heterogeneity and selective expression of avocado cellulase. *Physiol. Biochem.*, 27: 325-332.
- De Veau, E.J., Gross, K.C., Huber, D.J. i Watada, A.E.** (1993). Degradation and solubilization of pectin by beta-galactosidases purified from avocado mesocarp. *Plant Physiology*, 87: 279-285.
- Del Campillo, E.** (1999). Multiple endo- β -(1,4)-glucanase (cellulase) genes in *Arabidopsis*. *Current Topics in Developmental Biology*, 46: 39-61.
- Del Campillo, E. i Bennett, A.B.** (1996). Pedicel breakstrength and cellulase gene expression during tomato flower abscission. *Plant Physiology*, 111: 813-820.
- DellaPenna, D., Kates, D.S. i Bennett, A.B.** (1987). Polygalacturonase gene expression in Rutgers, *rin*, *nor* and *Nr* tomato fruits. *Plant Physiology*, 85: 502-507.

- DellaPenna, D., i Bennett, A.B.** (1988). In vitro synthesis and processing of tomato fruit polygalacturonase. *Plant Physiology*, 86: 1057-1063.
- Din, N., Forsythe, I.J., Burtnick, L.D., Gilker, N.R. i Miller, R.C.** (1994). The cellulose binding domain of endoglucanase A (CenA) from *Cellulomonas fimi*: evidence for the involvement of tryptophan residues in binding. *Molecular Microbiology*, 11: 747-755.
- Domínguez-Puigjaner, E., Vendrell, M. i Ludevid, M.D.** (1992). Differential protein accumulation in banana fruit during ripening. *Plant Physiology*, 31: 655-659.
- Domínguez-Puigjaner, E.** (1995). Caracterització i estudi de l'expressió de proteïnes i cDNAs específics de la maduració del plàtan (*Musa acuminata*). Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.
- Domínguez-Puigjaner, E., Llop-Tous, I., Vendrell, M. i Prat, S.** (1997). A cDNA clone highly expressed in ripe banana fruit shows homology to pectate lyases. *Plant Physiology*, 114: 1071-1076.
- Downs, C.G. i Brady, C.J.** (1990). Two forms of exopolygalacturonase increase as peach fruits ripen. *Plant Cell Environ.*, 13: 523-530.
- Durbin, M.L. i Lewis, L.N.** (1988). Cellulases in *Phaseolus vulgaris*. *Methods in Enzymology*, 160: 342-351.
- Feinberg, A.P. i Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, 132: 6-13.
- Ferrarese, L., Trainotti, L., Moretto, P., Polverino de Laureto, P., Rascio, N. i Casadoro, G.** (1995). Differential ethylene-inducible expression of cellulase in pepper plants. *Plant Molecular Biology*, 29: 735-747.
- Ferrarese, L., Trainotti, L., Gattolin, S. i Casadoro, G.** (1998). Secretion, purification and activity of two recombinant pepper endo-1,4- β -glucanases expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *FEBS Letters*, 422: 23-26.
- Fischer, R.L. i Bennett, A.B.** (1991). Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42: 675-703.
- Franssen, H.J., Nap, J.P., Gloudemans, T., Stiekema, W. i Van Dam, H.** (1987). Characterization of a cDNA for nodulin-75 of soybean: a gene product involved in early stages of root nodule development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 4495-4499.
- Fry, S.C., Smith, R.C., Renwick, K.F., Martin, D.J., Hodge, S.K. i Matthews, K.J.** (1992). Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochemical Journal*, 282: 821-828.

- Fry, S.C.** (1995). Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 497-520.
- García, P.** (1999). Efecto del calcio y otros tratamientos no contaminantes en la conservación de frutos. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.
- Giovannoni, J., DellaPenna, D., Bennett, A.B. i Fischer, L.** (1989). Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic rin tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *Plant Cell*, 1: 53-63.
- Giovannoni, J.** (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Plant Molecular Biology*, 52: 725-749.
- Given, N.K., Venis, M.A. i Grierson, D.** (1988a). Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta*, 174: 402-406.
- Given, N.K., Venis, M.A. i Grierson, D.** (1988b). Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from strawberry fruit and its synthesis during ripening. *Journal of Plant Physiology*, 133: 31-37.
- Gizis, E.J.** (1964). The isolation and characterization of the pectic enzymes and the pectic substances of the north west strawberry. *PhD Thesis*, Oregon State University.
- Glass, W.F., Briggs, R.C. i Hnilica, L.S.** (1981). Use of lectins for detections of electrophoretically separated glycoproteins transferred onto Nitrocellulose sheets. *Analytical Biochemistry*, 115: 219-224.
- Goldschmidt, E.E.** (1997). Ripening of citrus and other non-climacteric fruits: a role for ethylene. *Acta Horticulturae*, 463: 335-340.
- González-Bosch, C., Brummell, D.A. i Bennett, A.B.** (1996). Differential expression of two endo- β -(1,4)-glucanase genes in pericarp and nodules of wild-type and mutant tomato fruit. *Plant Physiology*, 111: 1313-1319.
- González-Bosch, C., Del Campillo, E. i Bennett, A.B.** (1997). Immunodetection and characterization of tomato endo- β -(1,4)-glucanase Cel1 protein in flower abscission zones. *Plant Physiology*, 114: 1541-1546.
- Greve, L.C. i Labavitch, J.M.** (1991). Cell wall metabolism in ripening fruit. V. Analysis of cell wall synthesis in ripening tomato pericarp tissue using a D-[U- 13 C]-glucose tracer and gas chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiology*, 97: 1456-1461.
- Grierson, D. i Schuch, W.** (1993). Control of fruit ripening. *Phil. Trans. R. Soc. London B.*, 342: 241-250.

- Grierson, D., Tucker, G.A., Keen, J., Ray, C.R., Bird, C.R. i Schuch, W.** (1986). Sequencing and identification of a cDNA clone for tomato polygalacturonase. *Nucleic Acid Research*, 14: 8595-8603.
- Grobe, K., Becker, W.M., Schlaak, M. i Petersen, A.** (1999). Grass group I allergens (β -expansins) are novel, papain-related proteinases. *European Journal of Biochemistry*, 263: 33-40.
- Gross, J.** (1982). Changes of chlorophylls and carotenoids in developing strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*) cv Tenira. *Gartenbauwissenschaft*, 47: 142-144.
- Gross, K.C.** (1984). Fractionation and partial characterization of cell walls from normal and non-ripening mutant tomato fruit. *Physiologia Plantarum*, 62: 25-32.
- Gross, K.C. i Sams, C.E.** (1984). Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry*, 23: 2457-2461.
- Hadfield, K.A. i Bennett, A.B.** (1998). Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiology*, 117: 337-343.
- Hall, C.B.** (1964). Cellulase activity in tomato fruits according to portion and maturity. *Botanical Gazzete*, 125: 156-157.
- Hamilton, A.J., Lycett, G.W. i Grierson, D.** (1990). Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*, 346: 284-287.
- Harpster, M.H., Lee, K.Y. i Dunsmuir, P.** (1997). Isolation and characterization of a gene encoding endo-1,4- β -glucanase from pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Molecular Biology*, 33: 47-59.
- Harpster, M.H., Brummell, D.A. i Dunsmuir, P.** (1998). Expression analysis of a ripening-specific, auxin-repressed endo-1,4- β -glucanase gene in strawberry. *Plant Physiology*, 118: 1307-1316.
- Harriman, R.W., Tieman, D.M., i Handa, A.K.** (1991). Molecular cloning of tomato pectin methylesterase gene and its expression in Rutgers, ripening inhibitor, nonripening, and NeverRipe tomato fruits. *Plant Physiology*, 97: 80-87.
- Harrison, E.P., McQueen-Mason, S.J. i Manning, K.** (2001). Expression of six genes in relation to extension in developing strawberry fruit. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1437-1446.
- Hatfield, R. i Nevins, D.J..** (1986). Characterization of the hydrolytic activity of avocado cellulase. *Plant Cell Physiology*, 27: 541-552.
- Hayashi, T., Wong, Y.S. i Maclachlan, G.** (1984). Pea xyloglucan and cellulose. II. Hydrolysis by pea endo- β -(1,4)-glucanases. *Plant Physiology*, 75: 605-610.

- Hayashi, T.** (1989). Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40: 139-168.
- Henrissat, B.** (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280: 309-316.
- Henrissat, B., Heffron, S.E., Yoder, M.D., Lietzke, S.E. i Journak, F.** (1995). Functional implications of structure based sequence alignment of proteins in the extracellular Pectate lyase superfamily. *Plant Physiology*, 107: 963-976.
- Hietaranta, T. i Linna, M.M.** (1999). Penetromic measurement of strawberry fruit firmness: Device testing. *HortTechnology*, 9: 103-105.
- Hobson, G.E.** (1968). Cellulase activity during the maturation and ripening of tomato fruit. *Journal of Food Science*, 33: 588-592.
- Hoffman, C.S.** (1997). Rapid isolation of yeast chromosomal DNA. A: Current Protocols in Molecular Biology. Eds. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, i K. Struhl. John Willey & Sons. USA.
- Holton, T.A. i Cornish, E.C.** (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 1071-1083.
- Huber, D.J.** (1983). Polyuronide degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 108: 405-409.
- Huber, D.J.** (1984). Strawberry fruit softening: the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *Journal of Food Science*, 49: 1310-1315.
- Huber, D.J. i O'Donoghue, E.M.** (1993). Polyuronides in avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits exhibit markedly different patterns of molecular weight downshifts during ripening. *Plant Physiology*, 102: 473-480.
- Inohue, M., Hayashi, K. i Nevins, D.J.** (1999). Polypeptide characteristics and immunological properties of exo- and endoglucanases purified from maize coleoptile cell walls. *Journal of Plant Physiology*, 154: 334-340.
- Iwata, T., Omato, I. i Ogata, K.** (1969). Relationship between the ripening of harvested fruits and the respiratory pattern. III. Changes of ethylene concentration in fruits and responses to applied ethylene with relation to respiratory pattern. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, 38: 64-72.
- Jacob-Wilk, D., Holland, D., Goldschmidt, E.E., Riov, J. i Eyal, Y.** (1999). Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the *Chlase1* gene from ethylene-treated citrus fruit and its regulation during development. *Plant Journal*, 20: 653-661.

- Jarvis, M.C.** (1984). Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant Cell Environment*, 7: 153-164.
- Jiménez-Bermúdez, S., Redondo-Nevado, J., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J.L., López-Aranda, J., Valpuesta, V., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M.A. i Mercado, J.A.** (2002). Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase. *Plant Physiology*, 128: 751-759.
- Kalaitzis, P., Hong, S.B., Solomos, T. i Tucker, M.L.** (1999). Molecular characterization of a tomato endo- β -(1,4)-glucanase gene expressed in mature pistils, abscission zones and fruit. *Plant Cell Physiology*, 40: 905-908.
- Kanellis, A.K. i Kalaitzis, P.** (1991). Suppression of cellulase and polygalacturonase and induction of alcohol dehydrogenase isoenzymes in avocado fruit mesocarp subjected to low oxygen stress. *Plant Physiology*, 96: 269-274.
- Kanellis, A.K., Solomos, T., Mehta, M.T. i Mattoo, A.K.** (1991). Decreased cellulase activity in avocado fruit subjected to 2'5% O₂ correlates with lower cellulase protein and gene transcript levels. *Plant and Cell Physiology*, 30: 817-823.
- Kanellis, A.K. i Kalaitzis, P.** (1992). Cellulase occurs in multiple active forms in ripe avocado fruit mesocarp. *Plant Physiology*, 98: 530-534.
- Kano, Y., i Asahira, T.** (1978). Effect of some growth regulators on the development of strawberry fruits *in vitro* culture. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, 47: 195-202.
- Kano, Y., i Asahira, T.** (1981). Roles of cytokinin and abscissic acid in the maturing of strawberry fruits. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, 50: 31-36.
- Kita, M., Hisada, S., Endo-Inagaki, T., Omura, M. i Moriguchi, T.** (2000). Changes in the levels of mRNAs for putative cell growth-related genes in albedo and flavedo during citrus fruit development. *Plant Cell Reports*, 19: 582-587.
- Knee, M., Sargent, J.A. i Osborne, D.J.** (1977). Cell wall metabolism in developing strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany*, 28: 377-396.
- Knee, M.** (1978). Metabolism of polymethylgalacturonate in apple fruit cortical tissue during ripening. *Phytochemistry*, 17: 1257-1260.
- Koch, J.L., i Nevins, D.J.** (1989). Tomato fruit cell wall. 1. Use of purified tomato polygalacturonase and pectinmethylesterase to identify developmental changes in pectins. *Plant Physiology*, 91: 816-822.

- Koh, T.H., Melton, L.D. i Newman, R.H.** (1997). Solid-state ^{13}C NMR characterization of cell walls of ripening strawberry. *Canadian Journal of Botany*, 75: 1957-1864.
- Koh, T.H. i Melton, L.D.** (2002). Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. *Postharvest Biology and Technology*, en premsa.
- Kohorn, B.D.** (2000). Plasma membrane-cell wall contacts. *Plant Physiology*, 124: 31-38.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lanahan, M.B., Yen, H.C., Giovannoni, J.J. i Klee, H.J.** (1994). The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell*, 6: 521-530.
- Lashbrook, C.C., González-Bosch, C. i Bennett, A.B.** (1994). Two divergent endo- β -(1,4)-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscission flowers. *Plant Cell*, 6: 1485-1493.
- Lashbrook, C.C., Giovannoni, J., Hall, B.D., Fischer, R.L. i Bennett, A.B.** (1998). Transgenic analysis of tomato endo- β -(1,4)-glucanase gene function. Role of *Cel1* in floral abscission. *Plant Journal*, 13: 303-310.
- Legentil, A., Guichard, I., Piffaut, B. i Haluk, J.P.** (1995). Characterization of strawberry pectin extracted by chemical means. *Food Sci. Tech. Lebensmittel. Wissenschaft and Technology*, 28: 569-576.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. i Boedtker, H.** (1977). RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry*, 16: 4743-4751.
- Lincoln, J.E. i Fischer, R.L.** (1988). Regulation of gene expression by ethylene in wild-type and *rin* tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *Plant Physiology*, 88: 370-374.
- Llop-Tous, I.** (1997). Aplicació d'atmosferes modificades a la conservació de la maduixa (*Fragaria x ananassa* Duch). Aspectes bioquímics i moleculars relacionats amb la seva maduració i tractament amb atmosferes riques en CO_2 . Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.
- Llop-Tous, I., Domínguez-Puigjaner, E., Palomer, X. i Vendrell, M.** (1999). Characterization of two divergent endo- β -1,4-glucanase cDNA clones highly expressed in the nonclimacteric strawberry fruit. *Plant Physiology*, 119: 1415-1421.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.R. i Randall, R.J.** (1951). Protein measurement with Folin phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Luo, Y. i Liu, X.** (1994). Effects of ethylene on RNA metabolism in strawberry fruit after harvest. *Journal of Horticultural Science*, 69: 137-139.
- Maclachlan, G. i Brady, C.** (1992). Multiple forms of endo- β -(1,4)-glucanase in ripening tomato fruits include a xyloglucanase activatable by xyloglucan oligosaccharides. *Australian Journal of Plant Physiology*, 19: 137-146.
- Manning, K.** (1994). Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta*, 194: 62-68.
- Manning, K.** (1998). Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relation to fruit quality traits. *Planta*, 205: 622-631.
- Mattoo, A.K., Pick, U., Hoffman-Falk, H. i Edelman, M.** (1981). The rapidly metabolized 32,000-D polypeptide of the chloroplast is the "proteinaceous shield" regulating photosystem II electron transport and mediating diuron herbicide sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 1572-1576.
- McNeil, M., Fry, S.C., Darvill, A.G. i Albersheim, P.** (1984). Structure and function of the primary cell wall of plants. *Annu. Rev. Biochem.*, 53: 625-663.
- McQueen-Mason, S.J., Durachko, D.M. i Cosgrove, D.J.** (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell*, 4: 1425-1433.
- McQueen-Mason, S.J. i Cosgrove, D.J.** (1994). Disruption of hydrogen binding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 6574-6578.
- McQueen-Mason, S.J.** (1995). Expansin and cell wall expansion. *Journal of Experimental Botany*, 46: 1639-1650.
- Medina-Escobar, N.** (1997). Clonación y caracterización molecular de genes relacionados con el proceso de maduración de la fresa (*Fragaria x ananassa*). Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Medina-Escobar, N., Cardenas, J., Moyano, E., Caballero, J.L. i Muñoz-Blanco, J.** (1997). Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Molecular Biology*, 34: 867-877.
- Melford, A.J. i Prakash, M.D.** (1986). A: Postharvest Changes in Fruit Cell Wall. Academic Press.

- Michael, A.J.** (1996). A cDNA from pea petals with sequence similarity to pollen allergen, cytokinin-induced and genetic tumour-specific genes: identification of a new family of related sequences. *Plant Molecular Biology*, 30: 219-224.
- Micheli, F.** (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 6: 414-419.
- Milligan, S.B. i Gasser, C.S.** (1995). Nature and regulation of pistil-expressed genes in tomato. *Plant Molecular Biology*, 28: 691-711.
- Mitcham, E.J., Gross, K.C. i Ng, T.J.** (1989). Tomato fruit cell wall synthesis during development and senescence. *Plant Physiology*, 29: 477-481.
- Mølhøj, M., Ulvskov, P. i Dal Degan, F.** (2001). Characterization of a functional soluble form of a *Brassica napus* membrane-anchored endo- β -(1,4)-glucanase heterologously expressed in *Pichia pastoris*. *Plant Physiology*, 127: 674-684.
- Moore, J.N., Brown, G.R. i Brown, E.D.** (1970). Comparison of factors influencing fruit size in large-fruited and small-fruited clones of strawberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 95: 827-831.
- Mudge, K.W., Narayanan, K.R. i Poovaiah, B.W.** (1981). Control of strawberry fruit set and development with auxins. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 106: 80-84.
- Mullis, K.B., Faloona, F., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T. i Erlich, H.A.** (1989). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 263-273.
- Murashige, T. i Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Nakamura, S. i Hayashi, T.** (1993). Purification and properties of an extracellular endo- β -(1,4)-glucanase from suspension-cultured poplar cells. *Plant Cell Physiology*, 34: 1009-1013.
- Nakamura, S., Mori, H., Sakai, F. i Hayashi, T.** (1995). Cloning and sequencing of a cDNA for poplar endo- β -(1,4)-glucanase. *Plant Cell Physiology*, 36: 1229-1235.
- Neal, G.E.** (1965). Changes occurring in the cell wall of strawberries during ripening. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 16: 604-611.
- Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H. i Hofte, H.** (1998). A plasma membrane-bound putative endo- β -(1,4)-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *EMBO Journal*, 17: 5563-5576.

- Nishitani, K. i Tominaga, R.** (1992). Endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 21058-21064.
- Nitsch, J.P.** (1950). Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *American Journal of Botany*, 37: 211-215.
- Nitsch, J.P.** (1955). Free auxins and free tryptophane in the strawberry. *Plant Physiology*, 30: 33-39.
- Nogata, Y, Hideaki, O. i Voragen, J.** (1993). Polygalacturonase in strawberry fruit. *Phytochemistry*, 34: 617-620.
- Nursten, H.E.** (1970). Volatile compounds: The aroma of fruit. A: The Biochemistry of Fruits and Their Products. Ed. A.C. Hulme. Academic Press.
- O'Donoghue, E.M. i Huber, D.J.** (1992). Modification of matrix polysaccharides during avocado (*Persea americana*) fruit ripening: an assessment of the role of C_x-cellulase. *Physiologia Plantarum*, 86: 33-42.
- O'Donoghue, E.M., Huber, D.J., Timpa, J.D., Erdos, G.W. i Brecht, J.K.** (1994). Influence of avocado (*Persea americana*) C_x-cellulase on the structural features of avocado cellulose. *Planta*, 194: 573-584.
- Oeller, P.W., Min-Wong, L., Taylor, L.P., Pike, D.A. i Theologis, A.** (1991). Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science*, 254: 437-439.
- O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M. i O'Farrell, P.H.** (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, 12: 1133-1142.
- Oofosu-Anim, J. i Yamaki,, S.** (1994). Sugar content, compartmentation and efflux in strawberry tissues. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119: 1024-1029.
- Ohmiya, Y., Takeda, T., Nakamura, S., Sakai, F. i Hayashi, T.** (1995). Purification and properties of a wall-bound endo- β -(1,4)-glucanase from suspension-cultured poplar cells. *Plant Cell Physiology*, 36: 607-614.
- Ohmiya, Y., Samejima, M., Shiroishi, M., Amano, Y. Kanda, T., Sakai, F. i Hayashi, T.** (2000). Evidence that endo- β -(1,4)-glucanases act on cellulose in suspension-cultured poplar cells. *Plant Journal*, 24: 147-158.
- Ozawa, T., Lilley, T.H. i Haslam, E.** (1987). Polyphenol interactions: astringency and the lost of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry*, 26: 2397-2942.
- Pathak, N., Mishra, S. i Sanwal, G.** (2000). Purification and characterization of polygalacturonase from banana fruit. *Phytochemistry*, 54: 249-255.

- Perkins-Veazie, P.M.** (1995). Growth and ripening of strawberry fruit. A: *Horticultural Reviews*, 17: 267-297. Ed.: J. Janick. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Perkins-Veazie, P.M., Huber, D.J. i Brecht, J.K.** (1995). Characterization of ethylene production in developing strawberry fruit. *Plant Growth Regulation*, 17:33-39.
- Pharr, D.M., Sox, H. i Nesbit, W.B.** (1976). Cell wall-bound nitrophenylglycosidases of tomato fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 101: 397-400.
- Pratt, H.K. i Goeschl, J.D.** (1969). Physiological roles of ethylene in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 20: 541-584.
- Pressey, R. i Avants, J.K.** (1973). Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches. *Plant Physiology*, 52: 252-256.
- Pressey, R. i Avants, J.K.** (1976). Pear polygalacturonases. *Phytochemistry*, 15: 1349-1351.
- Pressey, R.** (1989). Endo- β -mannanase in tomato fruit. *Phytochemistry*, 28: 3277-3280.
- Reid, P.D., Strong, H.G., Lew, F. i Lewis, L.N.** (1974). Bean abscission cellulase. *Plant Physiology*, 53: 732-737.
- Reyes, F.G.R., Wrolstad, R.E. i Cornwall, C.J.** (1982). Comparison of enzymic, gas-liquid chromatographic, and high performance liquid chromatographic methods for determining sugars and organic acids in strawberries at three stages of maturity. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*, 65: 126-131.
- Richmond, A. i Biale, J.B.** (1966). Protein and nucleic acid metabolism in fruit. I: Studies of aminoacid incorporation during the climacteric rise of the avocado. *Plant Physiology*, 41: 1247-1253.
- Richmond, A. i Biale, J.B.** (1967). Protein and nucleic acid metabolism in fruit. II: RNA synthesis during respiratory rise of the avocado. *Biochimica et Biophysica Acta*, 138: 625-627.
- Righetti, P.G.** (1987). Isoelectric focusing: theory, methodology and applications. A: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Eds. T.S. Work i R.H. Burdon. Elsevier Biomedical Press, 1^a Edició, 5^a impressió.
- Robertson, E.F., Dannelly, H.K., Malloy, P.J. i Reeves, H.C.** (1987). Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrilamide minigel system. *Analytical Biochemistry*, 167: 290-294.

- Rose, J.K.C., Lee, H.H. i Bennett, A.B.** (1997). Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 5955-5960.
- Rose, J.K.C., Cosgrove, D.J., Albersheim, P., Darvill, A.G. i Bennett, A.B.** (2000). Detection of expansin proteins and activity during tomato fruit ontogeny. *Plant Physiology*, 123: 1583-1592.
- Ross, G.S., Wegrzyn, T., MacRae, E.A. i Redgwell, R.J.** (1994). Activity against cell wall polysaccharides and characterization of a related cDNA clone. *Plant Physiology*, 106: 521-528.
- Rotticci-Mulder, J.C., Gustavsson, M., Holmquist, M., Hult, K. i Martinele, M.** (2001). Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* Lipase B and Lipase B fused to a cellulose-binding domain. *Protein Expression and Purification*, 21: 386-392.
- Sacher, J.A.** (1973). Senescence and postharvest physiology. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 24: 197-224.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. i Maniatis, T.** (1989). A: Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press. USA.
- Schales, O. i Schales, S.S.** (1945). A simple method for the determination of glucose in blood. *Archives in Biochemistry*, 8: 285-292.
- Schroder, R., Atkinson, R.G., Langenkamper, G. i Redgwell, R.J.** (1997). Biochemical and molecular characterisation of xyloglucan endotransglycosylase from ripe kiwi fruit. *Planta*, 204: 242-251.
- Schuch, W., Kanczler, J., Robertson, D., Hobson, G., Tucker, G., Grierson, D., Bright, S. i Bird, C.** (1991). Fruit quality characteristics of transgenic tomato fruit with altered polygalacturonase activity. *HortScience*, 26: 1517-1520.
- Seymour, G.B., Colquhoun, I.J., DuPont, M.S., Parsley, K.R. i Selvendran, R.R.** (1990). Composition and structural features of cell wall polysaccharides from tomato fruits. *Phytochemistry*, 29: 725-731.
- Shackel, K.A., Greve, C., Labavitch, J.M. i Ahmadi, H.** (1991). Cell turgor changes associated with ripening in tomato pericarp tissue. *Plant Physiology*, 97: 814-816.
- Sheehy, R.E., Pearson, J., Brady, C.J., i Hiatt, W.R.** (1987). Molecular characterization of tomato fruit polygalacturonase. *Molecular & General Genetics*, 208: 30-36.

- Sheehy, R.E., Krammer, M. i Hiatt, W.R.** (1988). Reduction in polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8805-8809.
- Smith, C.J.S., Watson, C.F. i Morris, P.C.** (1990). Inheritance and effects on ripening antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Molecular Biology*, 14: 369-379.
- Smith, D.L., Starret, D.A. i Gross, K.C.** (1988). A gene coding for tomato fruit β -galactosidase II is expressed during fruit ripening. *Plant Physiology*, 117: 417-423.
- Smith, D.L. i Gross, K.C.** (2000). A family of at least seven β -galactosidase genes is expressed during tomato fruit development. *Plant Physiology*, 123: 1173-1183.
- Solomos, T.** (1983). Respiration and energy metabolism in senescing plant tissues. *NATO Advanced Study Institutes Series*, 46: 61-98.
- Spayd, S.E. i Morris, J.R.** (1981). Physical and chemical characteristics of puree from harvested strawberries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 106: 101-105.
- Sreekrishna, K., Brankamp, R.G., Kropp, K.E., Blankenship, D.T., Tsay, J.T., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A. i Birkenberger, L.A.** (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia Pastoris*. *Gene*, 190: 55-62.
- Stutte, G.W. i Darnell, R.L.** (1987). A non-destructive developmental index for strawberry. *Journal of Textural Studies*, 1: 65-89.
- Szczesniak, A. i Smith, B.J.** (1969). Observations on strawberry texture, a three-pronged approach. *HortScience*, 22: 218-221.
- Tarentino, A.L., Gómez, C.M. i Plummer, T.H. Jr.** (1985). Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry*, 24: 4665-4671.
- Theologis, A.** (1992). One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. *Cell*, 70: 181-184.
- Thompson, J.E., Smith, R.C. i Fry, S.C.** (1997). Xyloglucan undergoes interpolymeric transglycosylation during binding to the plant cell wall *in vivo*: evidence from C-13/H-3 dual labelling and isopycnic centrifugation in caesium trifluoroacetate. *Biochemical Journal*, 327: 699-708.
- Tian, M.S., Gong, Y. i Bauchot, A.D.** (1997). Ethylene biosynthesis and respiration in strawberry fruit treated with diazocyclopentadiene and IAA. *Plant Growth Regulation*, 23: 195-200.

- Tian, M.S., Prakash, S., Elgar, H.J., Young, H., Burmeister, D.M. i Ross, G.S.** (2000). Responses of strawberry fruit to 1-Methylcyclopropene (1-MCP) and ethylene. *Plant Growth Regulation*, 32: 83-90.
- Tieman, D.M., Harriman, R.W., Ramamohan, G. i Handa, A.K.** (1992). An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *Plant Cell*, 4: 667-679.
- Tieman, D.M., i Handa, A.K.** (1994). Reduction in pectin methylesterase activity modifies tissue integrity and cation levels in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits. *Plant Physiology*, 106: 429-426.
- Timberlake, C.F.** (1981). Anthocyanins in fruit and vegetables. A: Recent Advances in Biochemistry of Fruits and Vegetables. Eds. J. Friend i M.J.C. Rhodes. Academic Press, pp. 221-247.
- Tomme, P., van Beeumen, J. i Claeysens, M.** (1992). Modification of catalytically important residues in endoglucanase D from *Clostridium thermocellum*. *Biochemical Journal*, 285: 319-324.
- Tong, C.B.S. i Gross, K.C.** (1988). Glycosyl-linkage composition of tomato fruit cell wall hemicellulosic fractions during ripening. *Physiologia Plantarum*, 74: 365-370.
- Tonutti, P., Cass, L.G. i Christoffersen, R.E.** (1995). The expression of cellulase gene family members during induced avocado fruit abscission and ripening. *Plant Cell Environment*, 18: 709-713.
- Trainotti, L., Spolaore, S., Pavanello, A., Baldan, B. i Casadoro, G.** (1999a). A novel E-type endo- β -(1,4)-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits. *Plant Molecular Biology*, 40: 323-332.
- Trainotti, L., Ferrarese, L., DallaVecchia, F., Rascio, N. i Casadoro, G.** (1999b). Two different endo- β -(1,4)-glucanase contribute to the softening of the strawberry fruits. *Journal of Plant Physiology*, 154: 355-362.
- Trainotti, L., Pavanello, A., Piovan, A. i Casadoro, G.** (2001a). Higher plant endo-1,4- β -glucanases with a putative cellulose binding domain. *9th International Cell Wall Meeting, 2-7 September 2001, Toulouse, France*, 67.
- Trainotti, L., Spinello, R., Piovan, A., Spolaore, S. i Casadoro, G.** (2001b). β -galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1635-1645.

- Tressl, R., Drawert, F. i Heimann, W.** (1969). Gaschromatographischmassenspektrometrische bestandsaufnahme von erdbeer-aromastoffen. *Z. Naturforsch.*, B24: 1201-1202.
- Truelsen, T.A. i Wyndaele, R.** (1991). Cellulase in tobacco callus: regulation and purification. *Journal of Plant Physiology*, 139: 129-134.
- Tucker, G.A., Sexton, R., Del Campillo, E. i Lewis, L.N.** (1988). Bean abscission cellulase. Characterization of a cDNA clone and regulation of gene expression by ethylene and auxin. *Plant Physiology*, 88: 1257-1262.
- Tucker, G.A.** (1993). A: Biochemistry of Fruit Ripening. Eds. G.B. Seymour, J.E. Taylor i Tucker, G.A. Chapman & Hall. London.
- Ulrich, R.** (1970). Organic acids. A: The Biochemistry of Fruits and Their Products. Vol.1. Ed. A.C. Hulme. Academic Press, pp. 89-118.
- Van Straten, S.** (2001). A: Volatile compounds in Food. TNO. Zeist.
- Varadarajan, G.S. i Prakash, C.S.** (1991). A rapid an efficient method fort he extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9: 6-12.
- Varner, J.E. i Lin, L.S.** (1989). Plant cell wall architecture. *Cell*, 56: 231-239.
- Veluthambi, K. i Poovaiah, B.W.** (1984). Auxin-regulated polypeptide changes at different stages of strawberry fruit development. *Plant Physiology*, 75: 349-353.
- Watada, A.E., Herner, R.C., Kader, A.A., Romani, R.J. i Staby, G.L.** (1984). Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. *Hort Science*, 19: 20-21.
- Watson, C.F., Zheng, L. i DellaPenna, D.** (1994). Reduction of polygalacturonase beta subunit expression affects pectin solubilization and degradation during fruit ripening. *Plant Cell*, 6: 1623-1634.
- Wills, R.B.H. i Kim, G.H.** (1995). Effect of ethylene on postharvest life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 6: 249-255.
- Wing, R.A., Yamaguchi, J., Larabell, S.K., Ursin, V.M. i McCormick, S.** (1989). Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *Plant Molecular Biology*, 14: 17-28.
- Wong, Y.S., Fincher, G.B. i Maclachlan, G.A.** (1977). Kinetic properties and substrate specificities of two cellulases from auxin-treated pea epicotyls. *Journal of Biological Chemistry*, 252: 1402-1407.

- Woodward, J.R.** (1972). Physical and chemical changes in developing strawberry fruits. *J. Sci. Food and Agric.*, 23: 465-473.
- Woolley, L.C., James, P.D. i Manning, K.** (2001). Purification and properties of an endo-B-1,4-glucanase from strawberry and down-regulation of the corresponding gene, cel1. *Planta*, 214: 11-21.
- Wrolstad, R.E. i Shallenberg, R.S.** (1981). Free sugars and sorbitol in fruits- a compilation from the literature. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*, 64: 91-103.
- Wu, S.C., Blumer, J.M., Darvill, A.G. i Albersheim, P.** (1996). Characterization of an endo- β -1,4-glucanase gene induced by auxin in elongating pea epicotyls. *Plant Physiology*, 110: 163-170.
- Yamaki, S. i Kakiuchi, N.** (1979). Changes in hemicellulose-degrading enzymes during development and ripening of Japanese pear fruit. *Plant and Cell Physiology*, 20: 301-309.
- Zhang, J.X., Meidinger, R., Forsberg, C.W., Krell, P.J. i Phillips, J.P.** (1999). Expression and processing of a bacterial endoglucanase in transgenic mice. *Arch. Biochem. Biophys.*, 367: 317-321.
- Zheng, L., Heupel, R.C. i DellaPenna, D.** (1992). The β subunit of tomato fruit polygalacturonase isoenzyme 1. Isolation, characterization and identification of unique structural features. *Plant Cell*, 4: 1147-1156.
- Zorreguieta, A., Finnie, C. i Downie, J.A.** (2000). Extracellular glycanases of *Rhizobium leguminosarum* are activated on the cell surface by an exopolysaccharide-related component. *Journal of Bacteriology*, 182: 1304-1312.