

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de
Doctorado en Ciencias Biológicas

SOBRE EL METABOLISMO DEL CARBONO EN CÉLULAS AUTÓTROFAS Y HETERÓTROFAS DE PLANTAS. Caracterización de mecanismos de regulación de enzimas claves para la partición del carbono fotoasimilado

Lic. Danisa María Luján Ferrero

Director de Tesis: Dr. Alberto Álvaro Iglesias
Co-directora de Tesis: Dra. Claudia Vanesa Piattoni

Laboratorio de Enzimología Molecular
– Instituto de Agrobiotecnología del Litoral –

Año 2020

Agradecimientos

Quiero agradecer a las Instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta Tesis Doctoral. A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral y a su directora, Dra. Raquel L. Chan, por brindarme el espacio para llevar a cabo esta etapa de formación. A los organismos que financian el trabajo que se desarrolla en nuestro laboratorio, al CONICET por la beca otorgada que me permitió la dedicación exclusiva a esta tarea.

Quiero agradecer al Dr. Alberto A. Iglesias por darme la oportunidad de realizar esta formación de la cual tanto aprendí. Gracias por transmitirme sus conocimientos, compromiso y entusiasmo.

A la Dra. Claudia V. Piattoni, gracias por haber confiado en mí y haberme acercado a la posibilidad de realizar este trabajo. Gracias por sus consejos, entusiasmo, paciencia, compromiso y apoyo.

Al Dr. Matías D. Asencion Diez, gracias por sus conocimientos, su predisposición, apoyo y consideración. Por estar abierto a toda discusión y ayudarme en mis consultas, por darme la oportunidad de aprender y crecer.

Al Dr. Miguel A. Ballicora, gracias por facilitarnos los genes de las proteínas que permitieron este trabajo de tesis. Por su ayuda, sus aportes y predisposición.

Al Dr. Matías D. Hartman, gracias por su generosidad y capacidad para trabajar en equipo, por su amabilidad y predisposición, por acompañarme en cada uno de mis experimentos y ayudarme tan ricamente. Por la paciencia, la alegría, las charlas y el compañerismo.

Al Dr. Diego G. Arias, gracias por sus conocimientos tan enriquecedores, por su amabilidad, por ayudarme a entender y generar discusiones reflexivas muy provechosas. Por darme la oportunidad de crecer.

A los Dres. Carlos M. Figueroa y Sergio Guerrero, gracias por sus aportes y ayuda.

A la Dra. Ana M. Demonte, gracias por estar, escucharme, sostenerme y ayudarme siempre. Gracias por compartirme tus conocimientos y experiencias, por siempre tener “la teoría” disponible. Por ser como una madre para mí en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, con los cuales compartí cinco buenos años, ¡muchas gracias! Gracias por tenerme paciencia, por los momentos compartidos, por ayudarme con los ensayos y experimentos, por las charlas y los mates compartidos. Gracias por ayudarme a crecer cada día un poco más. Gracias a Anto y a Romi por ser mis confidentes y compañeras de mesada. Gracias por la buena onda, los momentos compartidos y el sostén que han sido para mí. Gracias por las risas, las anécdotas, las juntadas extra laborales, los asaditos, los teres, los tiempos de relax... y

mayormente gracias por ayudarme a crecer, por comprenderme y siempre estar! ...Siempre compartiremos ese “Té para tres”. Gracias Anto, por siempre compartirme tus protocolos, por ayudarme a solucionar mis problemas experimentales, por transmitirme tu excelencia en todo lo que te proponías, por tu confianza, y por ser de compañía cuando había que quedarse hasta tarde. Gracias Romi, por tu diversión, porque juntas siempre le poníamos *lyrics* a cada día y momento; gracias por haberme aguantado en convivencia un par de semanas (y encima en la misma mesada durante todos los años compartidos jeje); gracias por confiar en mí. Gracias Mati (de nuevo jeje) porque sin tu ayuda mucho de lo que está escrito en esta Tesis no se habría hecho; gracias por tu buena predisposición, por enseñarme (no sólo de ciencia y de arte... sino también de compañerismo); gracias por las charlas y los experimentos compartidos; gracias por la alegría de tu corazón. Gracias Vicky F., por tu paz y tu paciencia, por los mates y las charlas compartidas. Gracias a Ceci y a Bruno, por tantos momentos, experimentos y charlas compartidas; por los mates, la alegría, la buena onda y el cariño. Gracias a Anita E., Vicky C., Pili, Tomás, Emi y Martin, por los momentos y mates compartidos, las risas, el apoyo, las charlas científicas y las de la vida, por la buena onda y el cariño que me transmitieron.

Gracias también a los “ridículos de al lado”, por aguantarme siempre, por todo lo compartido, por los mates, la buena onda, las charlas científicas de gran ayuda y por siempre sacarme una sonrisa a pesar de ser el objetivo del “bullying” jaja. Gracias Nati, por ser mi hermanita minion, por confiarme muchas cosas y muchas charlas; gracias por compartir conmigo la “virtud” de hablar en agudo (y la de amar a los animales); gracias por tu calidez, por siempre estar atenta para ayudarme y entenderme; gracias por tu amistad!. Gracias Rober por el compañerismo y siempre estar para solucionar mis problemas; gracias por hacer de chofer más de una vez y compartir buenas charlas cuando los experimentos demoraban hasta tarde; valoro tu bondad, generosidad, compañerismo y buena onda. Gracias a Alem y a Rodri, por el compañerismo, por los chistes ñoños (que no me causaban gracia, pero era lindo verlos reír felices jaja) y por ayudarme a debatir experimentos y/o hacer modelados moleculares jeje; gracias por soportar mis “*pullulanadas*” y “*obtusidades*”, gracias por compartirme muuuuchos mates y perdón por deberles tantos termos de agua caliente. Rodri, gracias por sacarme una sonrisa con tus bromas muy bien planeadas jaja. Gracias a Franco y a Nadia, por la buena onda, las risas, el compartir y la calidez de siempre. Al Diegui (de nuevo) “dos cosas”: 1) sin vos, ¿qué haríamos? y 2) muchas gracias; gracias por siempre escuchar atento las mil consultas que tenía por día; gracias por siempre tratar de levantarme el ánimo e impulsarme a más, a pesar de que seguro me estaba faltando “un detalle” o algún control en mis experimentos. A Ana (de nuevo), ¡gracias por tanto!; por siempre escucharme y darme consejos sabios, por el amor transmitido en cositas ricas para comer y por ayudarme a crecer.

Gracias a todas las personas que forman parte de mi vida, y que siempre estuvieron pendientes de cómo iban mis estudios. Aquellos que me alentaron, me escucharon, me sostuvieron y desearon siempre lo mejor. Gracias a mis amigas incondicionales, a Marly, Dani, Deni, Marian, Soli, Agos, Patri, Moni y Silvia, porque siempre, de alguna u otra manera, estuvieron sosteniéndome en esta etapa de doctorado. Gracias a mi familia. A mis padres, Graciela y Alberto, por el sostén, por estar siempre dispuestos para mí, por amarme, aguantarme y siempre desearme lo mejor. Gracias por preocuparse y apoyarme, aunque a veces no pude compartir momentos con ustedes por estar lejos. ¡Les debo tanto!. Gracias a mis hermanos, Lucas y Facundo, por apoyarme siempre. Gracias Yani por ayudarme a despejarme, mimarme y sentirme acompañada.

Gracias a Dios, porque fielmente me sostuvo en cada instante y fue mi ancla firme en tiempos difíciles. Me enseñó a ser valiente y esforzarme en cada paso. Me enseñó que “*en sus manos están mis tiempos*” y me permitió llegar hasta aquí.

Publicaciones

Este trabajo de Tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Enzimología Molecular de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral bajo la dirección del Dr. Alberto A. Iglesias y la Co-dirección de la Dra. Claudia V. Piattoni.

Parte de los resultados obtenidos durante este trabajo de Tesis fueron publicaciones las siguientes revistas científicas:

CV Piattoni, DML Ferrero, I Dellaferrera, A Vegetti, AA Iglesias (2017) Cytosolic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is Phosphorylated during Seed Development. *Front. Plant Sci.* 8 (522) p. 1–16.

DML Ferrero, MD Asencion Diez, ML Kuhn, CA Falaschetti, CV Piattoni, AA Iglesias, MA Ballicora (2018) On the roles of wheat endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase subunits. *Frontiers in Plant Science*, 9 (1498) p. 1-7.

Índice:

Agradecimientos	iii
Publicaciones	vii
Índice:	ix
Abreviaturas y símbolos	xi
Resumen	1
Abstract	7
1. Introducción	11
1.1 El origen de la atmósfera y la evolución	11
1.2 Organización intracelular de las células vegetales	13
1.3 La fotosíntesis.....	14
1.3.1 Fase luminosa.....	15
1.3.2 Fase sintética	16
1.4 Partición del carbono en células autótrofas y heterótrofas	19
1.4.1 Metabolismo del carbono en células fotosintéticas o autótrofas	20
1.4.2 Metabolismo del carbono en células heterótrofas	23
1.4.3 Vías de síntesis de los principales compuestos de reserva en plantas	26
1.5 Tejidos especializados en la acumulación de compuestos de reserva	34
1.5.1 Las semillas.....	34
2. Objetivo del trabajo	39
2.1 Objetivos específicos:.....	39
3. Materiales y Métodos	41
3.1 Reactivos químicos y materiales.....	41
3.2 Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos	41
3.2.1 Cepas bacterianas:	41
3.2.2 Plásmidos:	41
3.2.3 Medios de cultivo:.....	42
3.2.4 Antibióticos:.....	42
3.3 Métodos bioquímicos básicos:.....	43
3.3.1 Electroforesis en geles de agarosa	43
3.3.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida	43
3.3.3 Cuantificación del contenido proteico	43
3.3.4 Cambio de medios y concentración de proteínas	43
3.3.5 Preparación de antisueros.....	43
3.3.6 Electrotransferencia seguida de inmunodetección	44
3.3.7 Cromatografía de filtración por geles. Determinación de la masa molecular.....	44
3.4 Metodología utilizada en biología molecular.....	44
3.4.1 Minipreparación de ADN plasmídico.....	44
3.4.2 Secuenciación de ADN	45
3.4.3 Digestión de ADN con enzimas de restricción	45
3.4.4 Precipitación de ADN	45
3.4.5 Ligación de fragmentos de ADN.....	46
3.4.6 Transformación de células de <i>E. coli</i> competentes	46
3.4.7 Análisis de las transformaciones	46
3.4.8 Creación de un banco de células.....	47
3.4.9 Clonado molecular de las proteínas recombinantes	47
3.4.10 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes	49
3.4.11 Tratamiento con proteasa TEV y pospurificación IDA-Ni ²⁺	50

3.5 Metodología de análisis enzimático.....	50
3.5.1 Medida de la actividad de la ADPGlcPPasa.....	50
3.5.2 Determinación de los parámetros cinéticos	52
3.5.3 Metodología utilizada en ensayos de óxido-reducción.....	53
3.5.4 Ensayos de estabilidad térmica	53
3.6 Metodología utilizada para el procesamiento de muestras.....	54
3.6.1 Material vegetal	54
3.6.2 Extracción de proteínas totales a partir de extractos crudos	54
3.6.3 Extracción desnaturizante de proteínas totales	55
3.6.4 Extracción y cuantificación de almidón	55
3.6.5 Extracción y cuantificación de TAG.....	56
3.6.6 Purificación de la fracción de proteínas fosforiladas	56
3.7 Metodología utilizada para ensayos de fosforilación.....	57
3.7.1 Reacción de fosforilación utilizando [³² P]- γ -ATP.....	57
3.7.2 Ensayos de retrasos en la movilidad de proteínas fosforiladas utilizando Phos-tag TM SDS-PAGE	58
4. Resultados	61
4.1 Caracterización de la <i>TaeADPGlcPPasa</i> recombinante.....	61
4.1.1 Caracterización cinética, regulatoria y estructural de la <i>TaeADPGlcPPasa</i>	62
4.1.2 Estudios sobre el rol regulatorio de las subunidades de la <i>TaeADPGlcPPasa</i>	72
4.2 Modificación postraduccional por fosforilación de la ADPGlcPPasa.....	87
4.2.1 Estudios <i>in vivo</i> acerca de la fosforilación de proteínas en semillas de trigo y ricino.....	87
4.2.2 Fosforilación <i>in vitro</i> de la <i>TaeADPGlcPPasa</i> recombinante	99
5. Discusión de Resultados y Conclusiones	109
5.1 La ADPGlcPPasa en el contexto global de la regulación del desarrollo de las semillas	109
5.1.1 Análisis de las propiedades cinéticas y regulatorias de la <i>TaeADPGlcPPasa</i> y del rol particular de cada una de las subunidades que la conforman.....	109
5.1.2 Análisis de la fosforilación de la <i>TaeADPGlcPPasa</i> por quinasas de proteínas de las familias SnRK3 (SOS2) y CDPK.....	114
5.2 Discusión general:	129
5.3 Conclusiones:	130
6. Bibliografía.....	133

Abreviaturas y símbolos

1,3bisPGA	1,3-bisfosfo-glicerato
2PGA	2-fosfo-glicerato
3PGA	3-fosfo-glicerato
6PGDHasa	6-fosfo-gluconato deshidrogenasa
6PGlcA	6-fosfo-gluconato
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ADP	adenosina-5'-difosfato
ADPGlc	ADP-glucosa
ADPGlcPPasa	ADPGlc pirofosforilasa
AG	ácido/s graso/s
AMP	adenosina-5'-monofosfato
AMPK	proteínas quinasas de mamíferos dependientes de AMP
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
<i>Ath</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adenosina-5'-trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
β-ME	beta-mercaptoetanol
CAM	metabolismo ácido de las plantas Crasuláceas
CBCB	ciclo de Benson-Calvin-Bassham
CDPK	proteína quinasa dependiente de Ca ²⁺
CKII	caseína quinasa II
CO ₂	dióxido de carbono
DHAP	dihidroxiacetona-P
DPA	días posteriores a la antesis
DPF	días posteriores a la fecundación
DPP	días posteriores a la polinización
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicoltetraacético
Eri4P	eritrosa-4-P
FBPasa	fructosa-1,6-bisfosfatasa
Fru	fructosa
FBP	fructosa-1,6-bisP
Fru6P	fructosa-6-P
Ga3P	gliceraldehído-3-P
Ga3PDHasa (A/B)	Ga3P deshidrogenasa fosforilante dependiente de NADPH
Ga3PDHasa	Ga3P deshidrogenasa fosforilante dependiente de NAD ⁺
Glc	glucosa
Glc1P	glucosa-1-P
Glc6P	glucosa-6-P

Glc6PDHasa	Glc6P deshidrogenasa
Glifosato	N-fosfometilglicina
IMAC	cromatografía de afinidad por metal inmovilizado
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
L	subunidad <i>large</i> o grande de la ADPGlcPPasa
Man6P	manosa-6-P
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos
MDHasa	malato deshidrogenasa
<i>Mdo</i>	<i>Malus domestica</i>
ME	enzima málica
β -ME	β -mercaptoetanol
MMM	marcador de masa molecular
MOPS	ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico
NAD ⁺ /NADH	nicotinamida adenina dinucleótido oxidada/reducida
NADP ⁺ /NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada/reducida
np-Ga3PDHasa	Ga3P deshidrogenasa no-fosforilante dependiente de NADP ⁺
NRasa	nitrito reductasa
O ₂	oxígeno
OAA	ácido oxalacético
OPPP	ciclo oxidativo de las pentosas-P
-P	-éster fosfato
pb	pares de bases
PEP	fosfoenolpiruvato
PEPasa	PEP fosfatasa
PEPCasa	PEP carboxilasa
PEPCKasa	PEP carboxiquinasa
PFKasa	fosfofructoquinasa dependiente de ATP
PFPasa	fosfofructoquinasa dependiente de PPi
PGKasa	fosfoglicerato quinasa
Pi	ortofosfato inorgánico
PMSF	fenilmetilfulfomilfluoruro
PPi	pirofosfato inorgánico
PRKasa	fosforribuloquinasa
Rib5P	ribosa-5-P
RNS	especies reactivas del nitrógeno
ROS	especies reactivas del oxígeno
RuBisCO	Ru1,5bisP carboxilasa/oxigenasa
Ru1,5bisP	ribulosa-1,5-bisP
Ru5P	ribulosa-5-P
S	Subunidad <i>small</i> o pequeña de la ADPGlcPPasa
SucSasa	sacarosa sintasa
SBPasa	sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa
SDS	dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante

-SH	grupo sulfhidrilo o tiol
SNF1	proteínas quinasas <i>Sucrose Non-Fermenting</i> 1 de levaduras
SnRK	proteínas quinasas relacionadas a las SNF1 de levaduras
SOS2	SnRK3 dependiente de Ca ²⁺
SPSasa	sacarosa-P sintasa
-S-S-	puente disulfuro
<i>Stu</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
TAG	triacilglicérido/s
<i>Tae</i>	<i>Triticum aestivum</i>
TBS	solución TRIS salino
TCA	ciclo de los ácidos tricarboxílicos
THP	proteína intercambiadora de hexosas-P/Pi
TPIasa	triosa-P isomerasa
T6P	trehalosa-6-P
TPS	trehalosa-6-fosfato sintasa
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TRX	tiorredoxina
TTP	proteína intercambiadora de triosas-P/Pi
TXP	proteína intercambiadora de Xul5P/Pi
UDPGlc	UDP-glucosa
UDPGlcPPasa	UDPGlc pirofosforilasa
UTP	uridina-5'-trifosfato
Xul5P	xilulosa-5-P

Resumen

En las plantas superiores, el flujo del carbono y la energía metabólica difieren según las características tróficas del tejido y también varían entre las distintas especies y etapas del desarrollo. Algunos tejidos, como las hojas, tienen principalmente un metabolismo fotosintético o autotrófico por el cual se sintetizan *de novo* triosas-P y a partir de ellas el almidón y la sacarosa; siendo este disacárido el principal metabolito transportado para proveer de fuentes de carbono y energía a toda la planta. En tejidos como las semillas, el metabolismo es principalmente no-fotosintético o heterotrófico y depende de la sacarosa que proviene de los tejidos fotosintéticos para suplir sus necesidades metabólicas. Además, el metabolismo en las hojas varía según el ciclo de luz/oscuridad y en las semillas según las etapas de desarrollo y de acuerdo a si el carbono se almacena en forma de almidón (como en las semillas de trigo, maíz o cebada) o lípidos (como en las semillas de ricino, girasol o soja). Frente a las variaciones que ocurren a nivel metabólico en un mismo tejido y una misma célula, la comprensión de la regulación y coordinación del metabolismo es de gran interés para la bioquímica vegetal. En los tejidos fotosintéticos, el estudio de la regulación del metabolismo en relación al ciclo de luz/oscuridad ha permitido dilucidar que las modificaciones postraduccionales por oxidación-reducción y por fosforilación cumplen un rol fundamental. Sin embargo, la regulación del metabolismo vegetal en tejidos heterotróficos ha sido menos estudiada, incluso cuando los mismos son los centros de almacenamiento de compuestos que son de gran importancia para la dieta humana y como materias primas renovables para procesos tecnológicos como la producción de bioplásticos y biocombustibles.

Se ha demostrado que durante el desarrollo de las semillas el flujo del carbono no es igual en cada etapa. Al inicio del desarrollo el metabolismo está principalmente destinado a solventar la formación del nuevo tejido, pero, una vez desarrollado el embrión y las estructuras celulares fundamentales, el metabolismo del carbono y la energía es destinado a la acumulación de compuestos de reserva que permitirán en el futuro la germinación y el establecimiento de una nueva planta. Todo este desarrollo está genéticamente programado, pero numerosas señales metabólicas inducen el cambio de etapa que, a su vez, genera cambios en el metabolismo del carbono y la energía. Dentro de las señales involucradas, se ha observado que las quinasas de proteínas de las familias SnRK1 (relacionadas con las SNF1 de levaduras y las AMPK de mamíferos) y las CDPK, juegan un rol fundamental en la partición de los hidratos de carbono y en la transición hacia la fase de acumulación de reservas, actuando como integradoras globales frente a señales energéticas y del desarrollo. Estas quinasas de proteínas se encargan de regular postraduccionamente por fosforilación diferentes actores de metabolismo. En plantas, se ha informado que la actividad de

varias enzimas, que participan del metabolismo primario del carbono y el nitrógeno, se encuentran reguladas por mecanismos de fosforilación-desfosforilación de residuos de serinas o treoninas. Algunos ejemplos de ello son la sacarosa-P sintasa, la fosfoenolpiruvato carboxilasa, la nitrato reductasa, la trehalosa-6-P sintasa, la sacarosa sintasa, la piruvato quinasa, la gliceraldehído-3-P deshidrogenasa no fosforilante y la gliceraldehído-3-P deshidrogenasa fosforilante.

Con el objetivo de contribuir al conocimiento de la regulación global del metabolismo y la partición intracelular e intercelular del carbono en plantas, particularmente en tejidos heterotróficos, en este trabajo de Tesis nuestros estudios se focalizaron en evaluar la regulación alostérica y la ocurrencia de la modificación postraducciona por fosforilación de enzimas claves en distintos tejidos vegetales en forma global y conjunta, determinando la secuencia temporal, así como las consecuencias funcionales de la misma. Además, se estudiaron las quinasas de proteínas involucradas en la regulación global del metabolismo del carbono por fosforilación en los organismos de interés.

Particularmente, hemos estudiado la regulación alostérica y la modificación postraducciona por fosforilación de la ADP-glucosa pirofosforilasa (ADPGlcPPasa) de endosperma de trigo (*TaeADPGlcPPasa*). Esta enzima cataliza el paso clave y más regulado de la síntesis del almidón en plantas, generando los dadores glucosídicos necesarios para la elongación del polímero de reserva; utilizando como sustratos glucosa-1P y ATP para dar como productos ADP-glucosa y PPi. Estructuralmente, está compuesta de dos subunidades, una pequeña o S y una grande o L, formando un heterotetrámero (S₂L₂). En general, se ha demostrado que las subunidades L funcionan como reguladoras de la actividad enzimática, mientras que las subunidades S tienen un rol catalítico además de regulatorio. Se conoce que esta enzima está altamente regulada, no sólo a nivel transcripcional, sino también alostéricamente por metabolitos (siendo el 3-P-glicerato el principal activador y el Pi su principal inhibidor) y por modulación redox.

Para profundizar los estudios acerca de las propiedades cinéticas y regulatorias de la *TaeADPGlcPPasa* y también evaluar el rol de cada subunidad en el contexto del heterotetrámero, la obtuvimos en forma recombinante, tanto sus subunidades de manera individual (*TaeS* y *TaeL*) como coexpresadas (*TaeS/TaeL*), a partir de la síntesis *de novo* de los genes que la codifican y su expresión heteróloga en células de *Escherichia coli* BL21 (DE3).

Nuestros resultados son novedosos, ya que no había sido estudiada la enzima recombinante. Luego de la caracterización, observamos que tanto *TaeS/TaeL*, como *TaeS* fueron cinéticamente activas, aunque esta última tiene ~15 veces menos actividad que el heterotetrámero. Si bien *TaeL* no tiene actividad enzimática significativa, en este trabajo evidenciamos que esta subunidad

contribuye a la formación del heterotetrámero, aumentando su eficiencia catalítica y, además, generándole propiedades regulatorias particulares. El heterotetrámero *TaeL/TaeS* resultó insensible a 3-P-glicerato, fructosa-6-P y glucosa-6-P, metabolitos que son activadores de distintas ADPGlcPPasas de plantas. Además, la actividad de *TaeS/TaeL* fue inhibida (con baja afinidad) por fructosa-1,6-bisP, fosfoenolpiruvato y Pi. Por otro lado, observamos que el 3-P-glicerato (y la fructosa-6-P) revertían levemente la inhibición por Pi. Aunque el heterotetrámero *TaeL/TaeS* resultó insensible al agregado de agentes oxidantes o reductores, la actividad de *TaeS* está regulada de manera redox y alostérica, activándose por 3PGA sólo en condiciones reductoras e inactivándose en condiciones oxidantes. Demostramos también, que la interacción de las subunidades del heterotetrámero es favorecida en condiciones reductoras. Si bien *TaeL* no tiene actividad enzimática significativa, a partir de la realización de proteínas híbridas con las subunidades (*StuS* y *StuL*) de la enzima de tubérculo de papa (que es altamente sensible a la regulación alostérica por 3-P-glicerato/Pi) evidenciamos su funcionalidad regulatoria. Así, determinamos que *TaeL* es la responsable de la insensibilidad de la enzima de endosperma de trigo a 3-P-glicerato y a fructosa-6-P. Por otro lado, *StuL* confiere a la enzima alta sensibilidad a efectores alostéricos, siendo los principales activadores el 3-P-glicerato, el fosfoenolpiruvato, la ribosa-5-P, la glucosamina-6-P y la fructosa-6-P. Particularmente, observamos que el híbrido *StuS/TaeL* tiene propiedades de mayor estabilidad al calor e insensibilidad a efectores alostéricos, así como elevada eficiencia catalítica (propiedades similares a la enzima *TaeS/TaeL*). La transgénesis con el híbrido *StuS/TaeL* podría producir una planta de trigo estable al calor, con un potencial aumento en su capacidad de acumular almidón. Con respecto a la subunidad S, los resultados sugieren que su rol en el heterotetrámero es el de conferir afinidad a la unión de Pi; hecho que es crítico para la estabilidad térmica de la enzima.

A partir de estos resultados, proponemos que, en condiciones fisiológicas, dentro del endosperma, podrían coexistir tanto la forma homodimérica de *TaeS* como el heterotetrámero *TaeS/TaeL* y regular de diferentes maneras la síntesis de almidón. *TaeS* es sensible a los cambios redox y a la regulación alostérica, siendo activado en condiciones reductoras y en presencia de 3-P-glicerato, e inhibida por Pi y oxidantes. En determinados momentos del desarrollo o cambios en el metabolismo de la semilla (como aumentos en las cantidades de azúcares), el gen de la subunidad L se expresa, traduce e interacciona con la subunidad S. La nueva conformación heterotetramérica, torna insensible a la enzima, dando lugar a una actividad constante, aunque sigue conservando la inhibición por Pi. Favorablemente, este metabolito (en conjunto con el 3-P-glicerato y la fructosa-6-P) le confiere estabilidad a la enzima frente a temperaturas elevadas. En este contexto, gana importancia la fosforilación que ocurre específicamente sobre la subunidad L,

aportando un nivel adicional de regulación de la ADPGlcPPasa. Aún queda por determinar en futuros estudios el efecto de esta modificación sobre los mecanismos de regulación y actividad de la enzima.

Realizamos un análisis comparativo a lo largo del desarrollo de semillas de trigo (*Triticum aestivum*) y de ricino (*Ricinus communis*), ya que ambas acumulan sus compuestos de reserva en el endosperma, pero en forma de almidón o de triacilglicéridos, respectivamente. A partir de estudios *in vivo*, detectamos la ocurrencia de la ADPGlcPPasa en muestras de endosperma de trigo y de ricino a lo largo del desarrollo de las semillas. A pesar de la estar presente en ambas semillas con diferentes patrones de ocurrencia, observamos que esta enzima se recupera en extractos enriquecidos en fosfopéptidos únicamente en semillas de trigo, y no de ricino (cuya principal fuente de reserva no es el almidón sino los triacilglicéridos). Esta modificación postraducciona por fosforilación en trigo, está ausente en las fases tempranas del desarrollo de las semillas, y ocurre desde la etapa de transición hacia la fase de acumulación de reservas, donde justamente la enzima tiene un rol fundamental en la síntesis de almidón. Además, es en las etapas tardías del desarrollo donde se observa un incremento en la actividad ADPGlcPPasa con la consecuente acumulación del polisacárido en las semillas de trigo.

Como consecuencia de estos resultados, y con el fin de conocer la subunidad que se fosforila y la familia de quinasa involucrada en esta modificación postraducciona, realizamos estudios de fosforilación *in vitro*. Observamos que el heterotetrámero *TaeS/TaeL* es fosforilado tanto por quinazas provenientes de extractos crudos de semillas de trigo como por quinazas recombinantes de plantas (*SOS2* y *CDPK1*), específicamente en condiciones que involucran a quinazas independientes de Ca^{2+} . Además, observamos que particularmente la subunidad regulatoria *TaeL* es la que se fosforila. Este trabajo es la primera evidencia *in vivo* e *in vitro* de la modificación por fosforilación de una ADPGlcPPasa. Es por ello que, junto a los antecedentes presentes hasta el momento, podemos plantear la hipótesis de que la fosforilación de la *TaeADPGlcPPasa* ocurriría durante el contexto fisiológico de la etapa de acumulación de reservas en semillas de trigo en desarrollo, período en el cual la degradación de sacarosa se encuentra fundamentalmente asociada a la sacarosa sintasa y el principal destino de las hexosas-P es hacia la síntesis de compuestos de reserva (principalmente almidón). Es en este período donde las quinazas del tipo SnRK/CDPK tienen un rol fundamental y se encargan de regular y coordinar el metabolismo de los hidratos de carbono en respuesta a las disponibilidades del mismo, la demanda de energía y los niveles de oxígeno dentro de la célula.

Aunque los fines de la regulación por fosforilación de la *TaeADPGlcPPasa* no se encuentran completamente dilucidados, la suma de todos los antecedentes permite especular que las SnRK (específicamente las de la familia SnRK3, como la SOS2) y las CDPK podrían estar involucradas en la regulación de la vía glucolítica y la de síntesis de almidón en semillas durante la fase de acumulación de reservas.

A partir de los resultados de este trabajo de Tesis contribuimos al conocimiento de la regulación global del metabolismo y la partición intracelular e intercelular del carbono en plantas, particularmente en tejidos heterotróficos. La información obtenida en este trabajo abre muchas líneas de investigación para alcanzar una mejor comprensión (a nivel molecular) de la síntesis de almidón en el endosperma de trigo y de otros cereales que producen el polisacárido como reserva principal. Estos estudios, en conjunto con los análisis cinéticos y regulatorios de la *ADPGlcPPasa*, serán importantes para el diseño de estrategias y herramientas biotecnológicas para mejorar los rendimientos de cultivos de interés agronómico e incluso considerar la aplicación del almidón en fuentes renovables como los biocombustibles y bioplásticos. Esto lo convierte en un producto natural clave para el desarrollo de futuras bioindustrias y biorefinerías.

Abstract

In higher plants, metabolic flux of carbon and energy differs according to the trophic characteristics of the tissue and also varies between different species and development stages. Some tissues as leaves, mainly have a photosynthetic or autotrophic metabolism where the triose-Ps are synthesized *de novo* and then used to produce starch and sucrose; being the latter disaccharide the metabolite that is mobilized to provide sources of carbon and energy to the entire plant. In seeds, the metabolism is primarily non-photosynthetic or heterotrophic and is fed by the sucrose coming from photosynthetic tissues. In addition, the metabolism varies in the leaves according to the light/dark cycle and in the seeds according to the stages of development as well according to the carbon form it stores: starch (as is the case of wheat, corn or barley seeds) or lipids (as in castor beans, sunflower seeds or soybeans).

Given variations occurring at the metabolic level in the same tissue and even the same cell, the understanding of the regulation and coordination of metabolism is of relevance to plant biochemistry. From the study of the regulation of metabolism in concerning the light/dark cycle in photosynthetic tissues, it was possible to elucidate that posttranslational modifications, such as oxidation-reduction and phosphorylation, play a fundamental role. However, the regulation of plant metabolism in heterotrophic tissues has been poorly studied, even when they are the storage centers for compounds that are of great importance for the human diet and as a renewable source of raw materials for technological production of bioplastics and biofuels.

It has been shown that during the seed development the carbon flux is variable at each stage. At the beginning, the metabolism is mainly destined to solve the formation of new tissue, but once the embryo and the fundamental cellular structures have been developed, the metabolism of carbon and energy is destined to the accumulation of reserve compounds that will allow future germination and generation of a new plant. All this development is genetically programmed, but numerous metabolic signals induce the change of stage that, in turn, generates changes in the metabolism of carbon and energy. Among the signals involved, it has been observed that the protein kinases of the types SnRK1 (SNF1-related of yeast and the AMPK of mammals) and CDPK play a fundamental role in the partition of carbohydrates and the transition to the accumulation of reserves, acting as global integrators at the energy and development signals. These protein kinases are responsible for the posttranslational regulation of different metabolism actors by phosphorylation.

In plants, it has been reported that the activity of several enzymes, which participate in the primary metabolism of carbon and nitrogen, are regulated by phosphorylation-dephosphorylation

mechanisms in Ser or Thr residues. Some examples of this are sucrose-P synthase, phosphoenolpyruvate carboxylase, nitrate reductase, trehalose-6-P synthase, sucrose synthase, pyruvate kinase, as well non-phosphorylating and glyceraldehyde-3-P dehydrogenase.

With the aim of contribute to the knowledge of the global regulation of metabolism and the intracellular and intercellular partition of carbon in plants, particularly in heterotrophic tissues, in this work our studies focused on assessing the occurrence of allosteric regulation and post-translational modification by phosphorylation of enzymes in different plant tissues in a global and joint way, determining the temporal sequence, as well as its functional consequences. Besides, we studied the kinases involved in the global regulation of carbon metabolism by phosphorylation in the organisms of interest.

We studied the post-translational regulation of wheat endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase (*TaeADPGlcPPase*). This enzyme catalyzes the rate-limiting step of starch synthesis in plants, generating the glycosidic donors necessary for the elongation of the polymer. It uses glucose-1-P and ATP as substrates to produce ADP-glucose and P_{Pi}. Structurally, it is composed of two subunits, a small or S and a large or L, forming a heterotetramer (S₂L₂). Mainly the L subunits function as regulators of the enzymatic activity, while the S subunits have a catalytic role as well as a regulatory one. It is known that this enzyme is highly regulated, not only transcriptionally but also allosterically by metabolites (mainly, 3-P-glycerate as activator and Pi as inhibitor), and by redox modulation.

We deepen the studies about the kinetic and regulatory properties of the *TaeADPGlcPPase* by evaluating the regulatory role of each subunit in the context of the heterotetramer. We obtained the recombinant *TaeADPGlcPPase*. Both subunits, individually (*TaeS* and *TaeL*) or coexpressed (*TaeS/TaeL*), were expressed in *Escherichia coli* BL21 cells (DE3) from *de novo* synthesized genes. Our approach represents the first study performed with the wheat enzyme produced recombinantly. After the characterization, we observed that both *TaeS/TaeL* and *TaeS* were kinetically active, although the activity of the latter was ~20-fold lower than that of the heterotetramer. Although *TaeL* exhibited no significant enzymatic activity, we determined that this subunit contributes to the formation of the heterotetramer, which is an enzyme form with increased catalytic efficiency and particular regulatory properties respect to those of *TaeS*. The heterotetramer *TaeL/TaeS* was insensitive to 3P-glycerate, fructose-6P, and glucose-6P, which are activators of different plant ADPGlcPPases. Also, *TaeL/TaeS* was inhibited (with low affinity) by fructose-1,6-bisP, phosphoenolpyruvate, and Pi. We observed that neither 3P-glycerate, nor fructose-6P reversed the enzyme inhibition by Pi. Even when the *TaeL/TaeS* heterotetramer was insensitive to the addition

of oxidizing or reducing agents, the activity of *TaeS* was regulated in a redox and allosteric manner, being activated by 3-P-glycerate only under reducing conditions and inactivated by the opposed situation. Further, we show that the formation of the heterotetramer formation is favored under reducing conditions. Although *TaeL* lacks enzymatic activity, we determined its regulatory functionality by constructing hybrid proteins with the subunits (*StuS* and *StuL*) of the potato tuber enzyme (which is highly sensitive to allosteric regulation by 3-P-glycerate and Pi). Thus, we evidenced that *TaeL* is responsible for the insensitivity to 3-P-glycerate and fructose-6-P. Besides, *StuL* gave to the enzyme high sensitivity to allosteric effectors, mainly to 3-P-glycerate, phosphoenolpyruvate, ribose-5-P, glucosamine-6-P, and fructose-6-P. In particular, we observed that the *StuS/TaeL* hybrid has properties of greater heat stability and insensitivity to allosteric effectors with high catalytic efficiencies (similar to *TaeS/TaeL* enzyme). The biotechnological use of the hybrid *StuS/TaeL* would produce a heat-stable transgenic wheat plant, with potential enhanced capacity to accumulate starch. Concerning the S subunit, our results suggest a role in the heterotetramer by conferring affinity to bind Pi, this being critical for the thermal stability of the enzyme.

From these results, we propose that under physiological conditions both, *TaeS* (homodimeric) and *TaeS/TaeL* (heterotetrameric) forms could coexist and regulate the key step of starch synthesis in different ways. The homodimer is sensitive to redox and allosteric regulation, being activated by 3-P-glycerate under reducing conditions, and inhibited by Pi and oxidants. At a certain level of development, changes in seed metabolism are produced (such as increases in the amounts of sugars) and the L subunit gene is expressed and it interacts with the S subunit. The heterotetrameric form becomes insensitive to allosteric regulation, being pre-activated and conferring a constant catalytic activity, although it still retains inhibition by Pi. Favorably, this metabolite (together with 3-P-glycerate and fructose-6-P) gives the enzyme stability against high temperatures. In this context, it would gain importance the phosphorylation, mainly on the L subunit, to add a new level of regulation of the wheat ADPGlcPPase. The effect of this modification on the mechanisms of regulation and activity of the enzyme remains to be determined in future studies. Although the purposes of the phosphorylation regulation of *TaeADPGlcPPase* are not completely elucidated, all the data accumulated make tempting to speculate that the SnRK and the CDPK could be involved in the regulation of the glycolytic pathway and that of starch synthesis in seeds during the accumulation of reserves phase.

On the other hand, we made a comparative analysis along with the development of wheat (*Triticum aestivum*) and castor bean (*Ricinus communis*) seeds since both accumulate their reserve compounds in the endosperm, but in the form of starch or triacylglycerides, respectively.

From *in vivo* studies, we detected the occurrence of ADPGlcPPase in wheat and castor samples along with the endosperm development of the seeds. Despite being present in both seeds, we observe that this enzyme is recovered in extracts enriched in phosphopeptides only in wheat seeds, and not in castor beans (whose main source of the reserve is not starch but triacylglycerides). In wheat, this phosphorylation in ADPGlcPPase is absent in the early stages of seed development, but it occurs along the further transition stages to the accumulation of carbon reserves, precisely where the enzyme has a fundamental role in the synthesis of starch. Moreover, it is in the late stages of development where was observed an increase in ADPGlcPPase activity with the consequent accumulation of the polysaccharide in wheat seeds. Then, with the aim to know the phosphorylated subunit and the kinase family involved in this post-translational modification, we made *in vitro* phosphorylation assays. We observed that *TaeS/TaeL* heterotetramer is phosphorylated by kinases from wheat seed crude extracts and by recombinant plant kinases (SOS2 and CDPK1), specifically under Ca^{2+} -independent conditions. Interestingly, we observed that *TaeL* regulatory subunit is the one that is phosphorylated. This work is the first *in vivo* and *in vitro* evidence of phosphorylation regulation of ADPGlcPPase. So, together with the antecedents present so far, we can hypothesize that phosphorylation of *TaeADPGlcPPase* would occur during the physiological context of the stage of accumulation of reserves in developing wheat seeds, period in which degradation of sucrose is fundamentally associated with sucrose synthase and the main destination of hexoses-P is towards the synthesis of reserve compounds (mainly starch). It is during this period that SnRK (SnRK3 family, specifically SOS2) and CDPK kinases have a fundamental role and are responsible for regulating and coordinating the metabolism of carbohydrates in response to their availability, energy demand and oxygen levels within the cell.

This work contributes to the knowledge of the global regulation of metabolism and the partition of carbon in plants. The information obtained in this work opens many lines of research to achieve a better understanding of the synthesis of starch in the endosperm of wheat and other cereals. These studies, together with the kinetic and regulatory analyzes of the ADPGlcPPase, will be important for the design of biotechnological strategies and tools to improve yields in crops of agronomic interest and even consider the starch application in renewable sources such as biofuels and bioplastics. In fact, the polysaccharide constitutes a key natural product for the development of future bioindustries and biorefineries.

1. Introducción

1.1 El origen de la atmósfera y la evolución

La evolución puede entenderse como un conjunto de cambios que ocurren a lo largo del tiempo en el perfil genético de algunos organismos; dichas modificaciones permiten mejorar la adaptación de ciertos individuos a distintos ambientes. Desde que se originó la forma de vida más primitiva, los organismos se han enfrentado a situaciones ambientales adversas. En los primeros mil millones de años de la Tierra la vida ocurría estrictamente en un ambiente anaeróbico, en una atmósfera con relativamente alta cantidad de N_2 y CO_2 , pero muy poca cantidad de oxígeno [1]. Es aceptado científicamente que los primeros organismos fueron anaeróbicos, representados por dos reinos Eubacteria y Arqueobacteria [2]. La aparición de algunos organismos en el grupo Eubacteria aseguró la ocurrencia de la principal fuente de oxígeno libre en nuestro planeta [1], siendo la fotosíntesis oxigénica, probablemente, el segundo acontecimiento biológico en importancia de la historia de nuestro planeta luego de la aparición de la vida misma [3]. De hecho, tal evento biológico fue de trascendencia para producir un cambio crítico en la composición de la atmósfera. Las cianobacterias tuvieron la ventaja y capacidad de poder utilizar el CO_2 atmosférico y la energía solar para sintetizar compuestos orgánicos (azúcares), liberando oxígeno al medio ambiente como parte del proceso fotosintético [4]. Inicialmente, la mayoría de ese oxígeno fue consumido en la formación de óxidos metálicos depositados en las rocas. Cuando este proceso fue completado, el oxígeno se fue acumulando en la atmósfera, algo ventajoso en al menos dos maneras: i) llevó a la formación de la capa de ozono en la estratósfera, que protege a los organismos vivos de la radiación UV-C (lo cual pudo haber ayudado a que los organismos vivos ancestrales abandonen el mar y comiencen a expandirse sobre la superficie terrestre); y ii) removió las grandes cantidades de hierro en estado ferroso presentes en el medio ambiente acuático formando complejos férricos insolubles que fueron precipitando hasta dejar, actualmente, sólo trazas de hierro soluble en el mar [1]. La importancia de esto último radica en que la remoción del Fe^{2+} disminuye la ocurrencia de su interacción con H_2O_2 y la consecuente formación de radicales libres tóxicos.

A pesar de las ventajas que presentó el aumento de oxígeno atmosférico, también ocasionó la muerte de muchos organismos anaerobios, ya que actuó como un componente tóxico, especialmente a través de algunos compuestos como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Algunos microorganismos se recluyeron a microambientes adecuados, mientras que otros evolucionaron y comenzaron a seleccionar defensas antioxidantes que los protegieron de la

toxicidad del oxígeno [5]. Los procariotas fueron dotados de organelas intracelulares (mitocondrias y plástidos) gracias a eventos endosimbióticos, generándose de esta manera la aparición de los primeros organismos unicelulares eucariotas [6]. Estas células, tolerantes al oxígeno, lo incluyeron en reacciones metabólicas (catalizadas por oxidasas, oxigenasas e hidrolasas), permitiéndoles utilizar cadenas de transporte de electrones con el oxígeno como aceptor final, facilitando una eficiente producción de energía [1]. A partir de este punto, los organismos continuaron evolucionando para generar no sólo la aparición de otros unicelulares eucariotas sino que, además, la asociación con otras células dio origen a organismos pluricelulares aerobios [5]. Estos últimos lograron desarrollar una elevada complejidad, siendo capaces de especializar diferentes subgrupos de células y generando distintos tipos de tejidos y órganos en estricta comunicación e interacción, dando origen a las plantas y los animales.

Con todo, la ocurrencia del proceso evolutivo desde la aparición de los organismos aeróbicos unicelulares hasta la aparición de las plantas y los animales no hubiera sido posible sin el aumento de la concentración de oxígeno libre en la atmósfera [1]. La evolución hacia una producción de energía eficiente permitió el desarrollo de organismos multicelulares complejos; destacando que la cooperación simbiótica incrementó la eficiencia celular. Todos los compartimentos, incluyendo las organelas, debieron ser estrictamente coordinados por mensajes internos, lo cual representó una ventaja al conocer características del medio ambiente a través de un sistema de mensajes. En este escenario biosintético, las plantas representan componentes con un alto número de compartimentos intracelulares ubicados en tejidos con distintas características tróficas. En los vegetales, los tejidos fotosintéticos (que pueden utilizar el CO₂ y la luz solar para sintetizar compuestos de carbono como fuente de energía) sirven como fuente de esqueletos carbonados para el resto del organismo. Para la distribución de los compuestos de carbono fijados durante el proceso fotosintético, una parte de ellos es convertida en sacarosa y transportada a través de un sistema vascular con el objetivo de ser utilizada como fuente de carbono y energía en el resto de los órganos sin capacidad fotosintética [7, 8]. Es por ello que los organismos vegetales se encuentran ubicados en la base de la cadena alimentaria y que el estudio bioquímico de los mismos sea crítico tanto para la comprensión de los procesos básicos, como así también para plantear alternativas de ingeniería metabólica con fines biotecnológicos.

Las plantas dependen de las bacterias para proveerse de nitrógeno y de los hongos para los minerales, devolviéndoles a estos organismos compuestos carbonados en el establecimiento de una cadena trófica. La vida de los animales superiores depende totalmente de las plantas para su alimentación y de bacterias para su digestión. Los desechos animales, por su parte, alimentan a las

plantas. La cooperación química es la esencia del desarrollo en la organización y la evolución de un ecosistema efectivo [5]. Para que la transferencia de carbono en su forma orgánica pueda realizarse, el mismo tiene que ser generado por alguna clase de organismo, como por ejemplo las plantas. El flujo de las distintas formas moleculares que incluyen este elemento entre los distintos organismos genera un ciclo, denominado del carbono. El carbono atmosférico se encuentra en su forma inorgánica y gaseosa (CO_2) a relativamente bajas concentraciones; a pesar de ello, el mismo es de suma importancia para el desarrollo de los organismos vivos en el planeta. Mediante la fotosíntesis, las plantas (autotróficas) pueden captar el CO_2 e incorporarlo en las moléculas orgánicas que conforman sus células. Cuando los quimioheterótrofos se alimentan de otros, se genera un flujo de carbono que retorna a la atmósfera por el proceso respiratorio de los diferentes organismos. Por otra parte, la actividad humana, principalmente a través de la combustión de restos fósiles, contribuye en la liberación de CO_2 a la atmósfera [9].

1.2 Organización intracelular de las células vegetales

Las células vegetales están formadas por diferentes compartimentos intracelulares y distintos tipos de organelas, tal como se representa en la Figura 1. Dentro de los distintos tipos de organelas presentes sólo en las células vegetales y algas, se encuentran los plástidos.

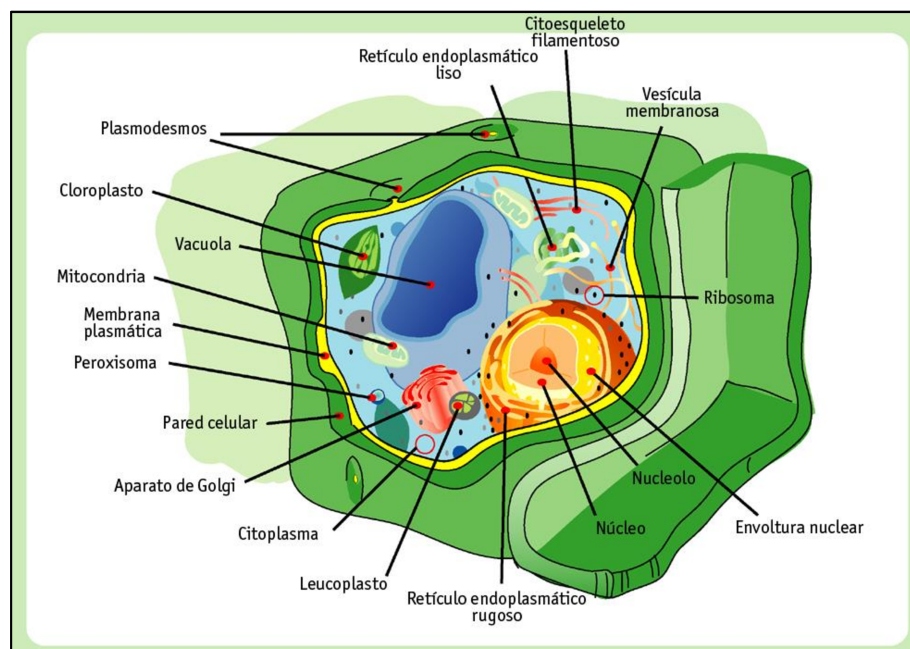


Figura 1: Esquema de la estructura de las células vegetales. Modificado de Taiz y Zeiger, 2010 [10].

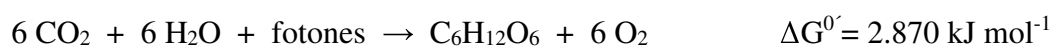
Los plástidos están presentes en todas las células de las plantas superiores, excepto en el polen, y sus variados nombres indican su plasticidad metabólica, estructural y funcional. Dentro de sus

principales funciones se encuentran la de biosíntesis y asimilación de compuestos orgánicos de carbono (fijación del CO₂ y síntesis de almidón), así como también son sitios de síntesis de ácidos grasos, de pigmentos y de aminoácidos a partir de nitrógeno inorgánico; además, pueden ser sitios de almacenamiento de carbono y energía. Todos los plástidos se encuentran rodeados de una doble membrana denominada envoltura, donde la interna funciona como una barrera selectiva al movimiento de las proteínas y otros tipos de moléculas; conteniendo las proteínas transportadoras que permiten el intercambio de solutos con el citosol [11, 12].

Las diferentes clases de plástidos se pueden clasificar, según su capacidad fotosintética, en: i) autotróficos, que son los que están presentes en las células que realizan fotosíntesis, y comúnmente son llamados cloroplastos; o ii) heterotróficos, que se encuentran en las células no fotosintéticas y particularmente en los tejidos de reserva de energía como lo son las semillas; los plástidos encargados de acumular almidón en este tipo de órganos comúnmente se denominan amiloplastos [13].

1.3 La fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso biológico que permite utilizar la luz solar como fuente de energía para la síntesis de enlaces químicos, que se utilizan posteriormente para fijar el CO₂ atmosférico en moléculas de hidratos de carbono, siendo la sacarosa y el almidón sus principales productos finales [8]. La fotosíntesis es un proceso metabólico complejo que ocurre específicamente dentro del cloroplasto. El proceso consta de dos etapas que ocurren de manera coordinada. La primera, comúnmente denominada fase luminosa, involucra la captura de la energía solar mediante los centros de reacción fotosintéticos para generar ATP y NADPH, moléculas de alto contenido energético y poder reductor, respectivamente. La segunda etapa, llamada comúnmente fase sintética, permite fijar el CO₂ atmosférico utilizando las moléculas de alta energía y reductoras sintetizadas en la etapa luminosa, para sintetizar hidratos de carbono. La fase sintética depende de la fase luminosa, ya que sin las moléculas de alto contenido energético y equivalentes de reducción no es posible asimilar el CO₂ para sintetizar azúcares [14]. La siguiente ecuación representa el balance global de las reacciones que ocurren durante la fotosíntesis, donde queda en evidencia que la reacción fotosintética no es espontánea y que necesita de la energía aportada por la luz solar para que la misma ocurra. En la Figura 2 se presenta un esquema simplificado de este proceso.



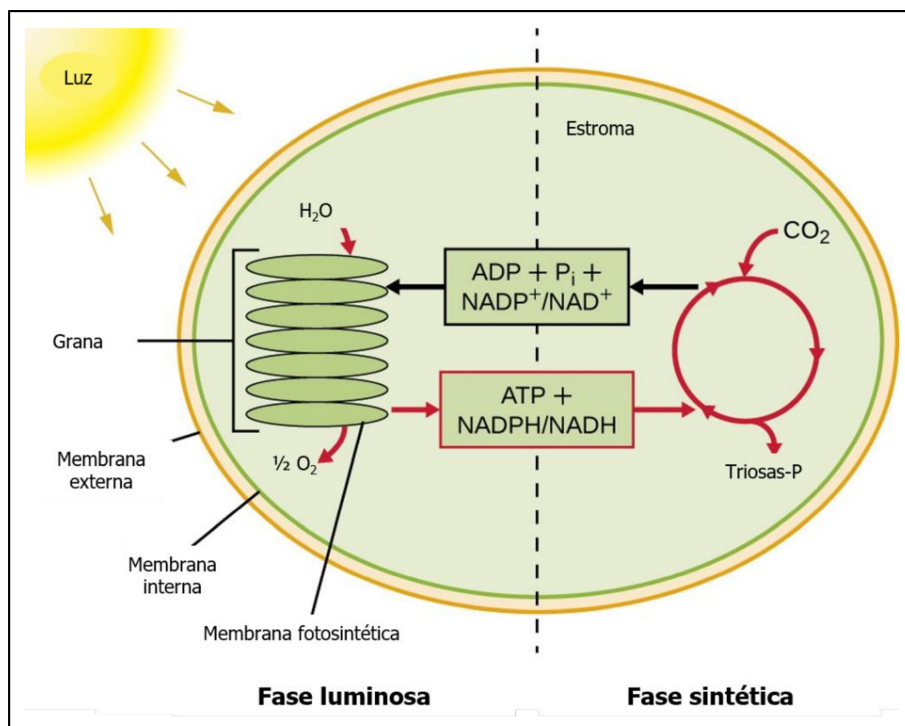


Figura 2: Esquema simplificado de la fotosíntesis. Fase luminosa (izquierda), donde la energía de la luz se convierte en energía química, formando ATP y NADPH. Estos productos son utilizados en la fase sintética (derecha) donde, mediante reacciones independientes de la luz, se fija el CO₂ y se producen moléculas de carbono orgánico. Modificada a partir de: <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/photosynthesis/>.

1.3.1 Fase luminosa

La fase luminosa ocurre en las membranas tilacoidales, donde se encuentran anclados los pigmentos y las proteínas que intervienen en el proceso. En esta etapa, la energía lumínica es transformada en energía química y poder reductor: ATP y NADPH. Para esto, como se describe en la Figura 3, los fotones son capturados por dos centros activos llamados fotosistemas. Cuando la antena de clorofila del fotosistema II (PS II) logra capturar suficiente energía lumínica, se genera una reacción de fotólisis del agua, la que libera dos electrones que son transportados por una serie de pigmentos [principalmente plastoquinona (PQ), citocromo, y plastocianina (Pc) que se ubican asimétricamente en la membrana] hasta llegar al fotosistema I (PS I). Aquí, se produce una nueva captación de energía lumínica que va a permitir transportar los electrones por intermedio del sistema ferredoxina hasta el receptor final de esta cadena, el NADPH. Asociado a todo este transporte de electrones se encuentra un complejo proteico transmembrana denominado bomba de protones asociada a una ATP-sintasa, que permite sintetizar ATP utilizando como fuente de energía la fuerza motriz del transporte de protones desde el lumen tilacoidal hacia el estroma del cloroplasto [14].

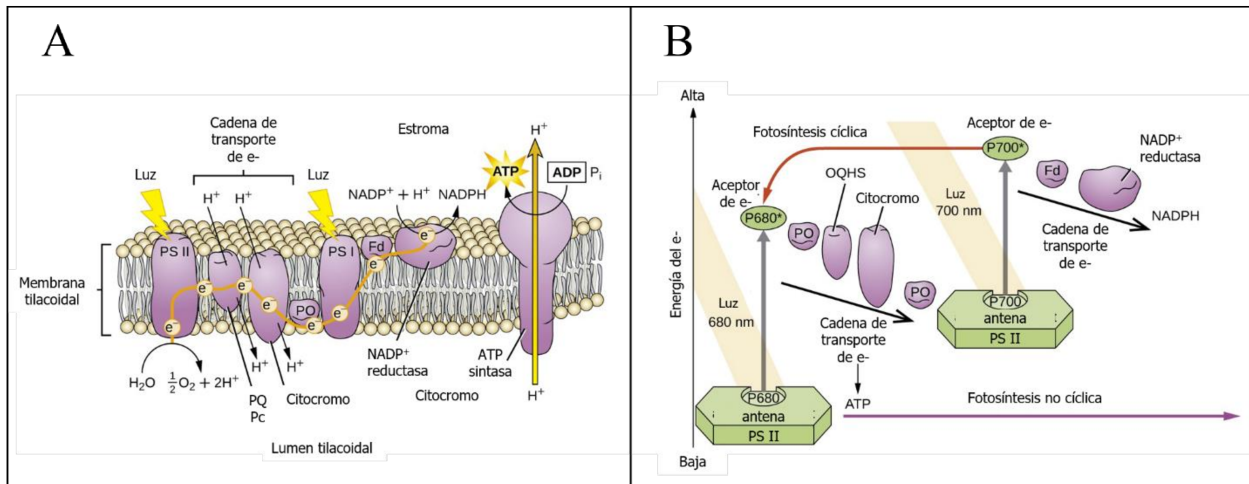


Figura 3: Esquema de los eventos que ocurren durante la fotosíntesis en el cloroplasto. (A) Eventos que ocurren en la membrana tilacoide, en la fase luminosa. Los fotosistemas I y II (PSI y PSII, respectivamente) se encuentran en la membrana tilacoide. El electrón (e^-) de alta energía de PSII se pasa a una cadena de transporte de electrones, que genera una fuerza motriz de protones para la síntesis de ATP por quimio-osmosis, y finalmente reemplaza el electrón perdido por el centro de reacción de PSI. El electrón del centro de reacción PSI se usa para hacer NADPH. (B) Cuando se requieren ATP y NADPH, la fotofosforilación no cíclica (en cianobacterias y plantas) proporciona ambos. El flujo de electrones descrito aquí se denomina esquema Z (se muestra en amarillo en [A]). Cuando las necesidades de ATP de la célula superan a las de NADPH, las cianobacterias y las plantas usarán solo PSI, y su electrón del centro de reacción se pasa a la cadena de transporte para generar una fuerza motriz protónica utilizada para la síntesis de ATP. Modificada a partir de: <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/photosynthesis/>.

1.3.2 Fase sintética

La fase sintética se dilucidó hacia fines de la década de 1940, siendo la primera ruta metabólica establecida íntegramente con el uso del isótopo ^{14}C , que había sido descubierto unos años antes [15]. Melvin Calvin, Andrew Benson y James Bassham, lograron generar un mapa metabólico del ciclo de fijación del carbono utilizando técnicas de cromatografía bidimensional en papel y radioisótopos ($^{14}\text{CO}_2$), en el alga fotosintética *Chlorella pyrenoidosa* [16–18]. Este importante hallazgo, les valió el Premio Nobel en Química en el año 1961. Además, estos estudios fueron los primeros en los que se utilizó el ^{14}C para dilucidar una vía metabólica completa. La fase sintética, común a todos los organismos fotosintéticos, ocurre en el estroma del cloroplasto durante periodos de luz y es llamada también ciclo reductivo de las pentosas fosfato. En el ciclo de Benson-Calvin-Bassham (CBCB) se utilizan el ATP y el NADPH generados en la etapa luminosa para reducir el CO_2 y sintetizar hidratos de carbono complejos en un ciclo de varias reacciones. Las reacciones involucradas en el CBCB pueden subdividirse en tres etapas (Figura 4): carboxilación, reducción y regeneración [15, 19, 20]. La suma de todas las reacciones, se puede representar en una reacción global que da cuenta de la alta cantidad de energía que se utiliza para sintetizar una molécula de Glc:



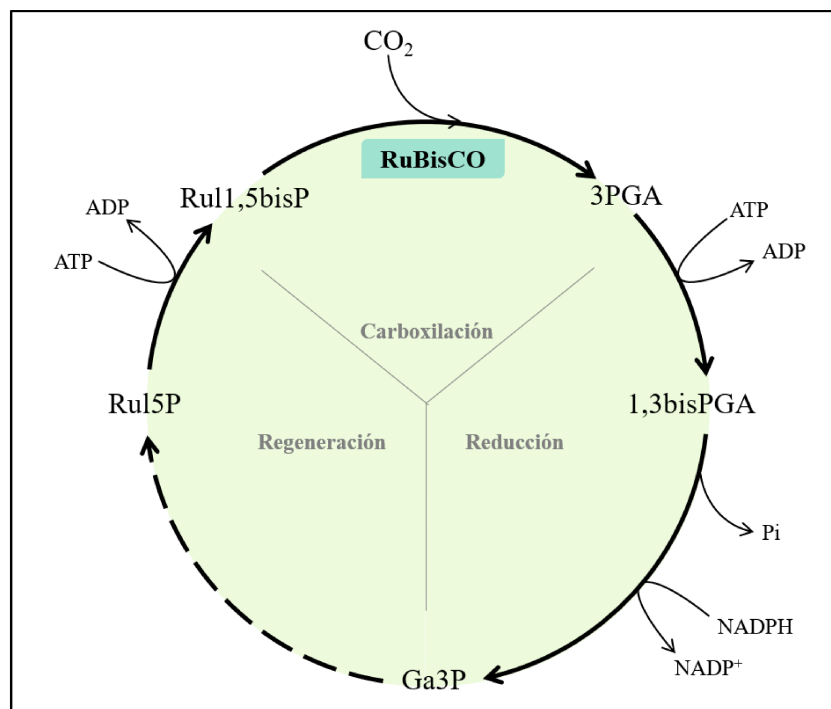


Figura 4: Ciclo de Benson-Calvin-Bassham (fase sintética de la fotosíntesis).

Carboxilación

En esta primera etapa se combina la ribulosa-1,5-bisP (Ru1,5bisP) con el CO_2 para generar 3-P-glicerato (3PGA), mediante una reacción catalizada por la enzima Ru1,5bisP carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO, EC 4.1.1.39), que fue descrita inicialmente por Quayle y col. en 1954 [21]. La RuBisCO es una enzima poco eficiente en la catálisis de la reacción de carboxilación, debido a que tiene una baja actividad específica y a que las concentraciones de CO_2 en la atmósfera son menores a las requeridas para alcanzar la mitad de la velocidad máxima de la enzima. Esta ineficiencia es compensada por las plantas sintetizando grandes cantidades de RuBisCO, siendo ésta más del 50% del total de las proteínas solubles de las hojas [22]. La RuBisCO, como muchas otras enzimas presentes en las células, es objeto de regulación de su actividad enzimática. En este caso, la RuBisCO puede ser activada de forma reversible mediante una reacción de carbamilación entre una molécula de CO_2 (diferente a la involucrada en el proceso de carboxilación) y un residuo de lisina ubicado en el sitio activo de la subunidad grande de la RuBisCO, en presencia de Mg^{2+} [15, 19, 20]. La reacción de activación es catalizada *in vivo* por una enzima llamada RuBisCO activasa [23]. Además de la reacción de carboxilación, la RuBisCO puede catalizar una reacción alternativa, en la cual el oxígeno, reacciona con la Ru1,5bisP generando fosfoglicolato, un compuesto de dos carbonos. Este fosfoglicolato es luego metabolizado mediante un proceso denominado fotorrespiración [24]. En este proceso, que involucra más de 15 enzimas y transportadores de

membrana distribuidos en el cloroplasto, los peroxisomas y las mitocondrias, libera una molécula de CO₂ cada dos moléculas de fosfoglicolato convertidas. De este modo, la reacción de la Ru1,5bisP con oxígeno en lugar de CO₂ reduce la productividad de la fotosíntesis en condiciones atmosféricas normales (21% de O₂ y 0,036% de CO₂) [20, 25].

Reducción

Luego de la etapa de carboxilación, el 3PGA se reduce a triosa-fosfato (triosa-P). Esta etapa de reducción consume el ATP y el NADPH generados durante la fase luminosa mediante dos reacciones. La primera de ellas es catalizada por la enzima fosfoglicerato quinasa (PGKasa, EC 2.7.2.3) que transfiere un grupo fosfato desde el ATP al grupo carboxilo del 3PGA generando una molécula de 1,3-bisfosfoglicerato (1,3bisPGA). La etapa siguiente es catalizada por una gliceraldehído-3-P (Ga3P) deshidrogenasa dependiente de NADPH (Ga3PDHasa A/B, EC 1.2.1.13) que reduce el 1,3bisPGA a Ga3P utilizando una molécula de NADPH y liberando una de ortofosfato inorgánico (Pi) [20]. El término triosas-P se utiliza para llamar colectivamente al Ga3P y la dihidroxiacetona-P (DHAP), moléculas que son rápidamente interconvertidas en una reacción catalizada por la enzima triosa-P isomerasa (TPIasa, EC 4.1.2.13).

Regeneración

Es la última etapa del CBCB, donde se regenera la Ru1,5bisP a través de la acción de siete enzimas en diez pasos, en los cuales se consume otra molécula de ATP. La regeneración comienza con la aldolasa (EC 4.1.2.13) que cataliza la unión de dos moléculas de triosa-P (una de Ga3P y otra de DHAP) para formar fructosa-1,6-bisP (FBP), que es luego hidrolizada irreversiblemente a fructosa-6-P (Fru6P) por la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa, EC 3.1.3.11). La enzima transcetolasa (EC 2.2.1.1) continúa el ciclo transfiriendo un grupo de dos carbonos a partir de la Fru6P a una tercera molécula de triosa-P (Ga3P) para formar eritrosa-4-P (Eri4P) y xilulosa-5-P (Xul5P). Ahora, actúa nuevamente la aldolasa, que cataliza la unión de la Eri4P con la cuarta triosa-P (DHAP) para formar sedoheptulosa-1,7-bisP que es luego hidrolizada de manera irreversible a sedoheptulosa-7-P y Pi por la enzima sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa (SBPasa, EC 3.1.3.37). En el siguiente paso la transcetolasa transfiere un grupo de dos carbonos desde la sedoheptulosa-7-P a la quinta molécula de triosa-P (DHAP) para formar ribosa-5-P (Rib5P) y Xul5P, que son luego convertidas a ribulosa-5-P (Ru5P). Las dos moléculas de Xul5P son convertidas por la enzima Ru5P epimerasa (EC 5.1.30) y la molécula de Rib5P es convertida en una reacción catalizada por la Rib5P isomerasa (EC 5.3.1.6). Finalmente, las tres moléculas iniciales de Ru1,5bisP son regeneradas mediante una reacción de fosforilación irreversible dependiente de ATP catalizada por la enzima fosforribuloquinasa (PRKasa, EC 2.7.1.19) [15, 20].

El análisis global del CBCB indica que por cada 3 moléculas de CO₂ que ingresan al mismo se genera una de triosa-P. El ciclo se esquematiza en la Figura 4. La conversión de CO₂ a triosas-P es llevada a cabo por un ciclo que es autocatalítico, el cual alcanza los niveles apropiados en los compuestos intermediarios en un corto periodo de tiempo, de esta forma las plantas son capaces de lograr un estado estacionario en la velocidad fotosintética, generando más acceptor de CO₂ del que consume. En consecuencia, hay una ganancia neta de carbono, que permite que la triosa-P no utilizada en la fase regenerativa quede disponible para ser convertida en los principales productos finales de la fotosíntesis [15].

1.4 Partición del carbono en células autótrofas y heterótrofas

En las plantas superiores, la fotosíntesis tiene lugar en los tejidos verdes, principalmente las hojas. La maquinaria fotosintética se encuentra dentro de los cloroplastos, lugar de síntesis *de novo* de las triosas-P que son la fuente inmediata de carbono para la síntesis de hidratos de carbono más complejos. El principal destino de los fotosintatos dentro del mismo cloroplasto es la síntesis de almidón, para almacenarlo transitoriamente como molécula de reserva de carbono y energía. Alternativamente, las triosas-P pueden exportarse al citosol y ser utilizadas como fuente de carbono para la síntesis de sacarosa. Con algunas excepciones, el almidón es el principal compuesto de reserva acumulado en tejidos fotosintéticos y no-fotosintéticos de las células de las plantas superiores. La acumulación de almidón en las hojas es una fuente transitoria de carbono que experimenta variaciones a lo largo del día. Por otra parte, el almacenamiento de almidón a largo plazo está confinado a los amiloplastos presentes en células especializadas de órganos heterotróficos. Sin embargo, la sacarosa no es menos importante, ya que es la forma principal en la cual el carbono es transportado desde los tejidos fotosintéticos de la planta a todos los tejidos no-fotosintéticos, como son los de reserva y las raíces [8]. En base a lo dicho anteriormente, vale remarcar que las triosas-P sintetizadas en las células fotosintéticas son particionadas dentro de la misma célula entre una fase relativamente estacionaria (almidón) y otra móvil (sacarosa) [8].

La partición de hidratos de carbono no ocurre sólo a nivel subcelular entre el plástido, el citosol y otros compartimentos intracelulares, sino que ocurre también entre los distintos tipos de tejidos y órganos de la planta, donde son distribuidos a través de la sacarosa. Las plantas, como organismos multicelulares altamente evolucionados, han repartido las diferentes funciones entre órganos especializados. Mientras que las hojas son las responsables de la asimilación del CO₂ y de otros nutrientes, las raíces se han especializado en la toma de sales minerales y agua a partir del suelo. Para permitir el intercambio de nutrientes entre los distintos órganos, las plantas han

desarrollado dos conductos distribuidores: el xilema, encargado del transporte de los nutrientes desde las raíces hacia el tallo y hojas; y el floema, encargado del transporte de nutrientes (por ej. sacarosa) desde las hojas hacia las raíces, brotes y órganos reproductivos [26]. El ingreso de los metabolitos intercambiados entre los distintos órganos y tejidos a las células destino o los compartimentos presentes dentro de la célula está mediado por proteínas transportadoras específicas, que permiten utilizar los compuestos adquiridos y coordinar e interconectar las vías metabólicas presentes en los diferentes compartimentos [8]. Los transportadores presentes en una misma planta son diferentes según el tejido sea especializado en la asimilación de carbono, la toma de agua y sales minerales, la acumulación de compuestos de reserva o la reproducción. Una vez dentro de la célula o compartimento destino los compuestos son metabolizados con un fin específico y determinado, según el tipo de tejido involucrado.

La partición de las vías metabólicas a nivel subcelular en los variados compartimentos de las células vegetales, es una consecuencia del proceso evolutivo que permite coordinar la operación simultánea de vías metabólicas que compiten por los mismos sustratos, evitando la ocurrencia de ciclos fútiles. Es así que las proteínas transportadoras de metabolitos presentes en las membranas de los distintos compartimentos juegan un rol crítico como conectores de vías catabólicas y biosintéticas paralelas e interdependientes, actuando como integradoras de las redes metabólicas [27]. Un ejemplo de esto se da en los cloroplastos, donde los transportadores que intercambian Pi y triosas-P son las proteínas más abundantes de la membrana interna de la envoltura [8]. Las particularidades que le confiere la compartimentación intracelular a las células eucariotas hacen necesario, para entender su funcionamiento, conocer no sólo la distribución de los procesos metabólicos, sino también cómo están interconectados y regulados. Inclusive, comprender cómo funcionan las células vegetales es aún más complejo, dada la presencia de compartimentos adicionales como plástidos, paredes celulares y vacuolas, que no están presentes en otras células eucariotas; lo que está asociado a la gran diversidad de rutas metabólicas que presentan los vegetales [28].

1.4.1 Metabolismo del carbono en células fotosintéticas o autótrofas

Durante los períodos de luz, una vez que la fotosíntesis ha alcanzado la fase estacionaria, las triosas-P no utilizadas en la fase regenerativa del CBCB quedan disponibles para ser convertidas en los principales productos finales de la fotosíntesis, tal como se muestra en la Figura 5 [29]. Aproximadamente un 30% del CO₂ fijado durante los periodos de luz es utilizado para la síntesis de almidón dentro del cloroplasto, el cual es acumulado en forma transitoria [8].

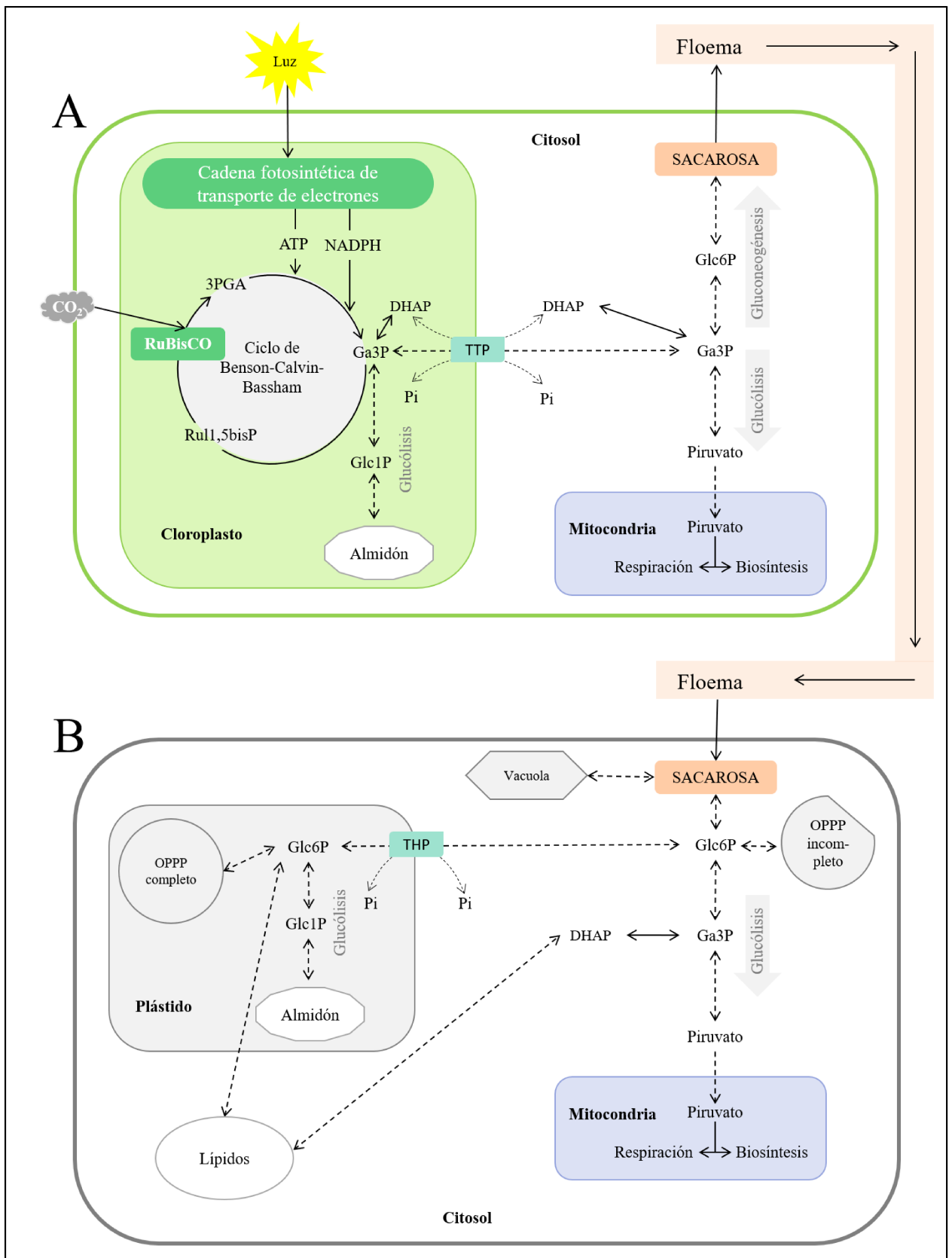


Figura 5: Esquema simplificado de la partición del carbono en distintos tejidos vegetales. (A) Principales destinos metabólicos de las triosas-P generadas en el proceso de fotosíntesis en los tejidos autotróficos durante el período diurno. (B) En los tejidos heterotróficos, la sacarosa transportada desde los tejidos autotróficos es utilizada principalmente para almacenar compuestos de reserva y satisfacer las necesidades metabólicas.

El almidón es sintetizado dentro del cloroplasto a partir de azúcares-P intermediarios, producidos durante la asimilación fotosintética del carbono (Figura 5-A). Un intermediario clave que es utilizado para iniciar la síntesis de almidón en las células fotosintéticas es la Fru6P. Las enzimas cloroplastídicas Glc6P isomerasa (EC 5.3.1.9; Fru6P↔Glc6P) y fosfoglucomutasa (EC 5.4.2.2; Glc6P↔Glc1P) interconvierten la Fru6P, Glc6P y Glc1P, generando un “pool” de hexosas-P que, en células vegetales, está cercano al equilibrio. Posteriormente, la Glc1P es utilizada para la síntesis de almidón a través de una ruta metabólica que involucra a tres enzimas: la ADP-glucosa (ADPGlc) pirofosforilasa (ADPGlcPPasa, EC 2.7.7.27), la almidón sintasa (EC 2.4.1.21) y la enzima ramificante (EC 2.4.1.18) [8, 30]. Las otras vías metabólicas en las que pueden ingresar las triosas-P producidas durante la asimilación fotosintética del carbono, involucran su transporte desde el cloroplasto hacia el citosol mediante una proteína transportadora que la intercambia por Pi (transportador de triosa-P de la membrana cloroplastídica, TTP). El TTP se encuentra fundamentalmente en los tejidos fotosintéticos, es específico para triosas-P y 3PGA, y no puede transportar fosfoenolpiruvato (PEP), pentosas-P o hexosas-P [27, 31]. El intercambio de triosas-P por Pi, mediado por el TTP, es el principal transporte de carbono en las células verdes.

Una vez en el citosol de la célula fotosintética, las triosas-P pueden ser utilizadas para la síntesis del disacárido sacarosa, fuente de carbono y energía transportada desde las hojas hacia los distintos tejidos no-fotosintéticos de la planta (Figura 5-A). La síntesis de sacarosa requiere de una serie de pasos que permiten convertir las triosas-P en Glc6P y luego en el disacárido. En primer lugar, el Ga3P y la DHAP son convertidos en FBP mediante la enzima FBP aldolasa (EC 4.1.2.13); la FBP es luego hidrolizada a Fru6P mediante la enzima FBP fosfatasa citosólica (EC 3.1.3.11) o mediante la conversión reversible catalizada por la fosfofructoquinasa (PFPPasa, EC 2.7.1.90) dependiente de pirofosfato inorgánico ($P_2O_7^{4-}$, P_i). La Fru6P generada de este modo es luego convertida a Glc6P y Glc1P por la secuencia de enzimas citosólicas hexosa-P isomerasa y fosfoglucomutasa. Posteriormente, la UDP-glucosa (UDPGlc) pirofosforilasa (UDPGlcPPasa, EC 2.7.7.9) sintetiza UDPGlc a partir de Glc1P y UTP [8].

Las moléculas de UDPGlc y Fru6P generadas según los pasos recién detallados, son los sustratos necesarios para la síntesis de sacarosa, la cual ocurre a través de dos reacciones. En primer lugar, la sacarosa-fosfato sintasa (SPSasa, EC 2.4.1.14) genera sacarosa-6-P (Suc6P) a partir de UDPGlc y Fru6P; finalmente, la sacarosa se genera por hidrólisis de la Suc6P en una reacción irreversible catalizada por una fosfatasa específica (EC 3.1.3.24). La reacción catalizada por la SPSasa es reversible, pero la rápida remoción por hidrólisis de la Suc6P mantiene los niveles de la misma a concentraciones muy bajas, lo cual convierte a la reacción de la SPSasa en prácticamente irreversible [32]. La sacarosa sintetizada durante el día puede también almacenarse dentro de las

vacuolas y junto al almidón acumulado transitoriamente dentro del cloroplasto permiten alimentar toda la planta, incluso durante la noche, cuando la fotosíntesis no ocurre. Pero las triosas-P generadas durante la fijación fotosintética del carbono no sólo se utilizan para sintetizar sacarosa y almidón, sino que además una gran proporción de las mismas es derivada al metabolismo energético en el citosol, al ser catabolizadas por medio de la glucólisis y el ciclo oxidativo de las pentosas-P. Estas rutas metabólicas sirven como fuente de intermediarios para la síntesis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, ácidos orgánicos y lípidos, suministrando también los metabolitos necesarios para la respiración celular y síntesis de energía (ATP), y para la generación de poder reductor (NADPH) [8].

1.4.2 Metabolismo del carbono en células heterótrofas

En las células no-fotosintéticas la fuente de carbono proviene de la sacarosa sintetizada en los tejidos autótrofos transportada mediante el floema. Una vez que la sacarosa ingresa a la célula puede ser utilizada, tal como muestra el esquema de la Figura 5-B, con diferentes propósitos: i) almacenar energía, como sacarosa en la vacuola o al ser convertida en almidón o fructanos; y ii) ser degradada mediante la glucólisis para proveer energía a través de la respiración celular o para suplir de esqueletos carbonados a distintas reacciones biosintéticas. El grado de partición de la sacarosa hacia cada una de estas vías depende del tipo de tejido heterotrófico implicado y de su estadio de desarrollo [8]. El primer paso involucrado en la degradación de sacarosa es su ruptura química, para generar sus dos componentes monosacáridos o derivados de ellos; tal como se observa en la Figura 6, donde se esquematiza el proceso de la glucólisis (tanto en el citosol como en los plástidos). La ruptura de la sacarosa puede ser llevado a cabo por dos enzimas distintas: i) la invertasa (β -D-fructofuranosidasa, EC 3.2.1.26), que la degrada a Glc y Fru; o ii) la sacarosa sintasa (SucSasa, EC 2.4.1.13), que genera Fru y UDPGlc [8, 32].

Dependiendo del camino por el cual la sacarosa es escindida, los productos son incorporados al metabolismo celular mediante distintas enzimas. Los productos de las invertasas serán convertidos a FBP a través de la vía glucolítica por las enzimas hexoquinasa y fosfofructoquinasa. En cambio, en la hidrólisis de sacarosa mediada por SucSasa, la UDPGlcPPasa utiliza la UDPGlc y PPi para generar UTP y Glc1P. Se ha propuesto que los nucleótidos de uridina juegan un rol importante en el control de la degradación de sacarosa y la síntesis de almidón [8]. La actividad de una u otra enzima puede predominar según el tejido o el estadio de desarrollo del mismo. Se ha informado, por ejemplo, que durante el crecimiento de semillas de leguminosas las invertasas son las principales enzimas encargadas de degradar la sacarosa durante el primer estadio de desarrollo donde hay una alta actividad mitótica y una alta demanda energética. Finalizado el proceso de

división celular hay una etapa de transición luego de la cual se activa la acumulación de compuestos de reserva (fundamentalmente almidón); en este periodo, previo a la disecación, se ha detectado que la degradación de sacarosa ocurre principalmente a través de SucSasa [33].

A pesar de las diferencias iniciales en la degradación de sacarosa, la conversión a Glc6P es el punto común en las dos vías de hidrólisis del disacárido, metabolito que puede ser particionado entre diferentes vías metabólicas. Una de las alternativas para la utilización de la Glc6P, en determinados periodos o etapas del desarrollo celular, involucra su transporte hacia el interior de los plástidos (específicamente amiloplastos en tejidos de reserva) donde es destinada a la síntesis de compuestos de reserva, principalmente almidón y ácidos grasos en algunos casos [8]. El transporte de Glc6P al interior de plástidos heterotróficos está mediado por una proteína transportadora de hexosas-P (THP), presente exclusivamente en plástidos de tejidos no-fotosintéticos. El THP intercambia Glc6P por Pi o triosas-P y también, pero con menor afinidad, pentosas-P, PEP, 3PGA y Eri4P [27, 31]. La otra vía que puede utilizar Glc6P dentro de los plástidos es el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (OPPP, de su nombre en inglés), que está involucrada en la interconversión y re-arreglo de azúcares-P, con la generación neta de poder reductor en forma de NADPH. Esta vía puede dividirse en dos secuencias de reacciones, una fase oxidativa que va de Glc6P a ribulosa-5-fosfato (Rul5P) con la producción de NADPH en la que participan, entre otras enzimas la Glc6P deshidrogenasa (Glc6PDH_{asa}, EC 1.1.1.49) y 6-P-gluconato deshidrogenasa (6PGDH_{asa}, EC 1.1.1.44); y otra fase no-oxidativa que va a convertir la Rul5P en hexosas-P y triosas-P, productos que pueden ingresar a la vía glucolítica o que pueden ser reutilizados para regenerar la Glc6P y reiniciar el ciclo [34].

La Glc6P puede ser también particionada entre vías metabólicas asociadas al citosol, pudiendo ésta ser utilizada para generar NADPH a través del OPPP citosólico (vía metabólica que en plantas ocurre en forma incompleta en este compartimento intracelular), o podría ser utilizada por la vía glucolítica. Si bien aún es discutido, estudios recientes indican que en el citosol de las células vegetales sólo ocurriría la fase oxidativa del ciclo OPPP y el primer paso de la fase no oxidativa [35–37]. De esta forma, se convertiría la Glc6P a Rul5P y esta última a Rib5P y Xul5P, productos que serían transportados dentro de los plástidos por una proteína transportadora específica que las intercambia por Pi, para continuar su ciclo [38, 39]. Alternativamente, la Glc6P puede ser convertida en el citosol a Fru6P, compuesto que la encausa a ser catabolizada mediante la vía glucolítica. La glucólisis, es uno de los metabolismos centrales de los hidratos de carbono, que permite obtener energía y los precursores metabólicos necesarios para la síntesis de aminoácidos y otros componentes celulares, como así también provee los compuestos necesarios para la respiración celular y la síntesis de proteínas [8]. En la Figura 5-B se muestra un esquema simplificado de la partición del carbono intracelular en células no-fotosintéticas de plantas superiores.

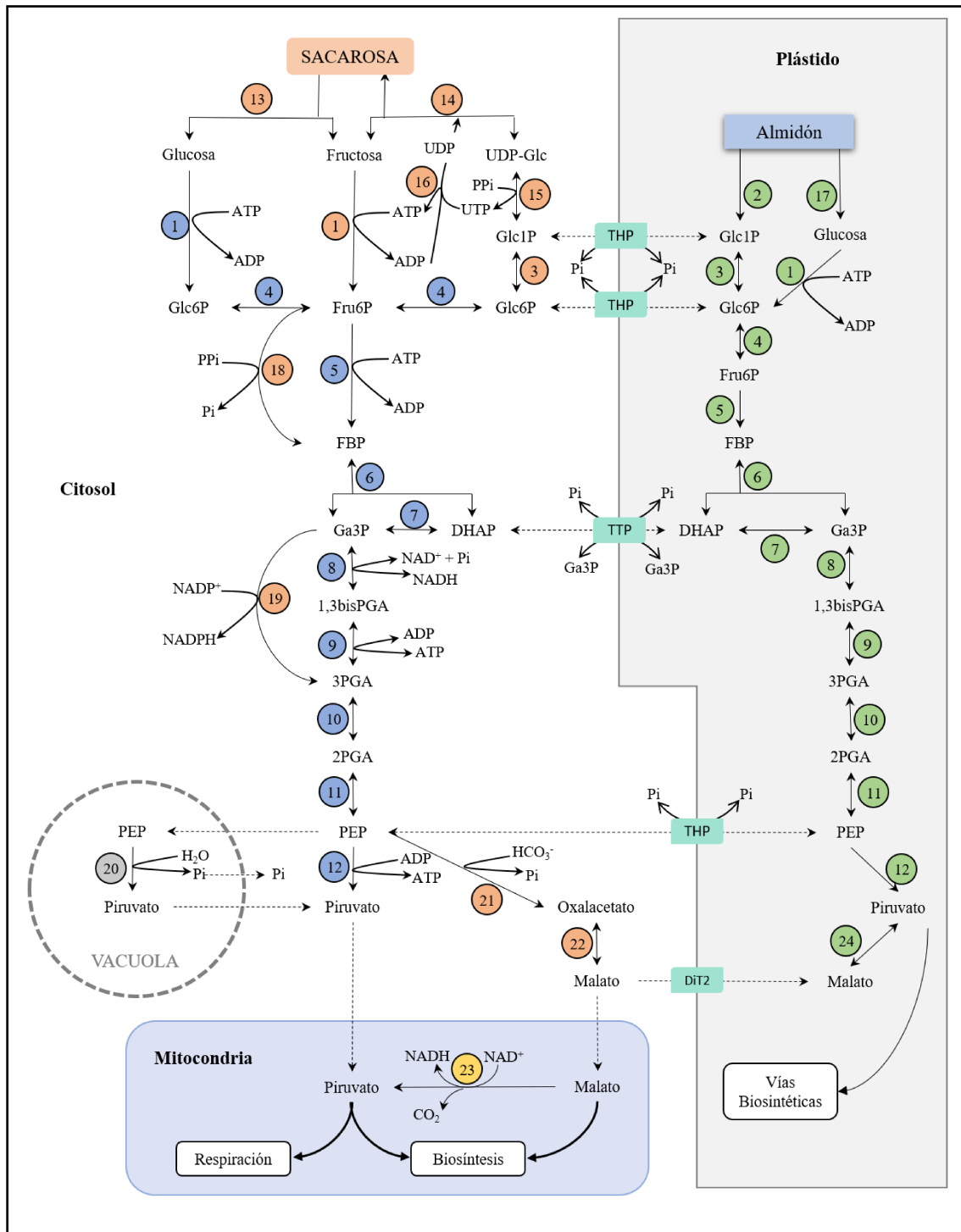


Figura 6: Descripción general de la vía glucolítica en plantas. En la figura se muestran los distintos pasos de la glucólisis tal como ocurren en tejidos no-fotosintéticos de células vegetales. Los círculos en colores indican: (●) Enzimas que participan de la glucólisis clásica; (●) Enzimas que, en plantas, participan de rutas alternativas de la glucólisis clásica o en pasos previos a la vía glucolítica; (●) Isoformas de enzimas que participan en la glucólisis de plantas dentro de los plástidos; (●) Enzimas que utilizan productos de la glucólisis dentro de las mitocondrias. (●) Enzimas que utilizan productos de la glucólisis dentro de las vacuolas. Los números indican: (1) Hexoquinasa; (2) Fosforilasa; (3) Fosfoglucomutasa; (4) Fosfoglucoisomerasa, (5) PFKasa; (6) Aldolasa; (7) TPIasa; (8) Ga3PDHasa dependiente de NAD⁺; (9) PGKasa; (10) Fosfogliceromutasa; (11) Enolasa; (12) Piruvato quinasa; (13) Invertasa; (14) SucSasa; (15) UDPGlcPPasa; (16) Nucleósido difosfato quinasa; (17) α- y β-amilasas; (18) PFPasa; (19) np-Ga3PDHasa; (20) PEPasa; (21) PEPCKasa; (22) MDHasa; (23) ME dependiente de NAD⁺; (24) ME dependiente de NADP⁺; THP: transportador de hexosas-P; TTP: transportador de triosas-P; DiT2: transportador de malato. Las flechas indican que, a nivel fisiológico, las reacciones enzimáticas son: (→) irreversibles o (↔) reversibles. Modificada de Plaxton, 1996 [40].

1.4.3 Vías de síntesis de los principales compuestos de reserva en plantas

1.4.3.1 Síntesis del almidón

El almidón es un polímero insoluble de residuos de Glc sintetizado en los plástidos de las plantas superiores. En la composición del almidón se pueden distinguir dos tipos diferentes de polímeros de Glc unidas por enlaces α -1,4: amilosa y amilopectina (Figura 7). La amilosa es prácticamente lineal, mientras que la amilopectina se encuentra altamente ramificada con enlaces α -1,6 localizados cada cinco o seis moléculas de Glc [41]. En las plantas, el almidón es sintetizado en los plástidos, tanto en las células fotosintéticas (cloroplastos) como no-fotosintéticas (amiloplastos) [30].

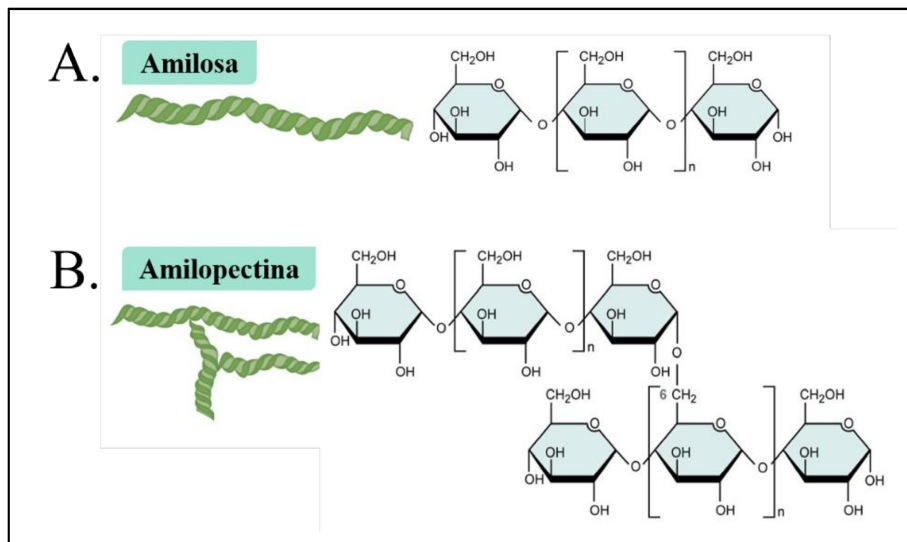


Figura 7: Estructuras polisacáridas que conforman el almidón: (A) amilosa y (B) amilopectina.

El almidón juega un rol fundamental durante el ciclo de vida de la planta, ya que es la forma principal de almacenamiento de carbohidratos. En las hojas, una fracción del carbono asimilado a través de la fotosíntesis se retiene en los cloroplastos como almidón. Este almidón es guardado de forma transitoria y se degrada durante la noche, ya sea generando sustratos para la respiración celular o para la síntesis de sacarosa que luego será exportada al resto de la planta [42]. En los órganos no fotosintéticos (tubérculos y semillas), la sacarosa es metabolizada y, en determinados momentos, destinada a la síntesis de almidón para ser almacenado a largo plazo en los amiloplastos [30]. En la Figura 8 se presenta un esquema de la síntesis de almidón en los distintos tejidos de las plantas.

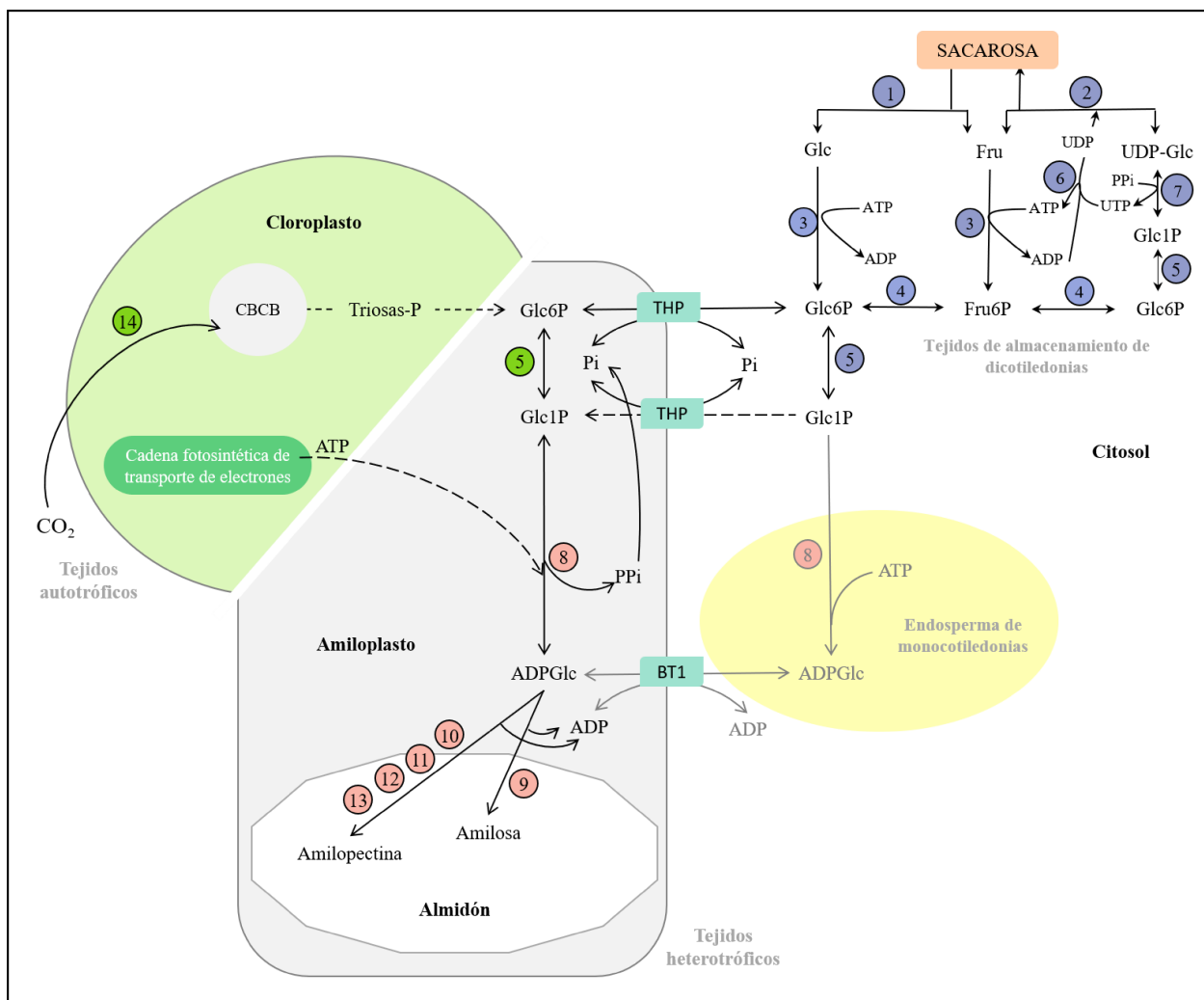


Figura 8: Vía de síntesis de almidón en plantas. Representación de los eventos que ocurren tanto en tejidos autótrofos, heterótrofos de dicotiledóneas como en endosperma de monocotiledóneas. Referencias: (●) Enzimas que participan en la glucólisis; (●) Enzimas que participan dentro de los plástidos; (●) Enzimas que participan en la vía de síntesis de almidón. Los números indican: (1) Invertasa; (2) SucSasa; (3) Hexoquinasa; (4) Fosfoglucoisomerasa, (5) Fosfoglucomutasa; (6) Aldolasa; (7) UDPGlcPPasa; (8) ADPGlcPPasa; (9) Almidón sintasa unida a gránulo, GBSS; (10) Almidón sintasa, SS; (11) Enzima ramificante, SBE; (12) Enzima desramificante, isoamilasa, ISA; (13) Almidón fosforilasa plastídica. PHOI; y (14) RuBisCO. Las flechas indican que, a nivel fisiológico, las reacciones enzimáticas son: (\rightarrow) irreversibles o (\leftrightarrow) reversibles. La ADPGlcPPasa sintetiza ADPGlc a partir de Glc1P y ATP. En tejidos fotosintéticos, éstos son producidos como consecuencia de la fotosíntesis en los cloroplastos. En los tejidos no fotosintéticos de plantas dicotiledóneas, las hexosas fosfato y el ATP (no mostrado) son importados del citosol a través de transportadores específicos (THP). En endosperma en desarrollo de cereales (monocotiledóneas), la ADPGlc es producida principalmente en el citosol e importada al amiloplasto por un transportador de nucleótidos azúcares (BT1). La amilosa es producida por la acción de la GBSS, mientras que la síntesis de amilopectina depende de la acción coordinada de al menos 10 genes que codifican para isoformas de SS, SBE, un tipo de ISA y para la PHO1. Modificada de Tetlow y col, 2015 [43].

Para la síntesis de almidón (Figura 8), la Glc6P (derivada del CBCB en los tejidos fotosintéticos, o generada a partir de la degradación de la sacarosa en tejidos heterótrofos y/o posteriormente transportada al interior del plástido) es convertida a Glc1P mediante la fosfoglucomutasa (EC 5.4.2.2). Luego, la ADPGlc pirofosforilasa (ADPGlcPPasa, EC 2.7.7.27) genera ADPGlc y PPi a partir de la Glc1P y ATP en presencia de un catión divalente (Mg^{2+}). Esta

reacción es reversible *in vitro*, pero el consumo de ADPGlc (debido a la síntesis del poliglucano) y la hidrólisis del PPI (por pirofosfatasa inorgánica) la tornan irreversible *in vivo* [30]. En las algas verdes y en las células fotosintéticas de las plantas, la ADPGlcPPasa está específicamente localizada en los cloroplastos [44]; mientras que en células heterotróficas de plantas superiores la localización de la enzima está discutida [30]. Trabajos de inmunolocalización de la ADPGlcPPasa en tejidos de almacenamiento, tanto en células de tubérculo de papa [45] como de endosperma de maíz [46], junto con trabajos de aislamiento de plástidos intactos de endosperma de trigo [47], embrión de guisante [48], endosperma de maíz [49] y embriones de colza [50], proporcionaron una buena evidencia de que la enzima es exclusivamente plastídica. En trabajos posteriores, usando plástidos aislados de endosperma de maíz y cebada [51–53], se postuló la existencia de dos formas de la ADPGlcPPasa, una plastídica y otra citosólica (Figura 8, círculo amarillo). A partir de esto, se propuso que, en los cereales, hay dos isoenzimas con diferente ubicación intracelular [54]. Esto se basa en gran medida en que las múltiples formas de las subunidades pequeñas y grandes que conforman a la enzima pueden dar lugar a diferentes isoenzimas, que se localizan en diferentes compartimentos intracelulares y poseen propiedades cinéticas y reguladoras distintivas. El problema principal de estos estudios es la baja integridad de los amiloplastos en tales preparaciones (inferiores al 25%), lo que da lugar a que la localización de la enzima fuera del plástido sea altamente especulativa [51, 53].

La ADPGlc generada es el sustrato específico para la síntesis de amilosa y amilopectina. La amilosa es producida por la acción de la almidón sintasa unida al gránulo (GBSS, del inglés *granule-bound starch synthase*, EC 2.4.1.21), mientras que la síntesis de amilopectina depende de la acción coordinada de al menos diez genes que codifican para isoformas de almidón sintasa soluble (SS, del inglés *starch synthase*), enzimas ramificantes (SBE, del inglés *starch branching enzyme*, EC 2.4.1.18), un tipo de enzima desramificante (ISA, del inglés *isoamylase*) y la almidón fosforilasa plastídica (PHO1) [30, 55, 56].

Niveles de regulación en la síntesis de almidón

La regulación a nivel transcripcional proporciona un ajuste a medio y largo plazo del recambio de almidón, mientras que las modificaciones postraduccionales son la forma principal por la cual se regula la actividad de las enzimas del metabolismo del polisacárido. Estos últimos incluyen diversos mecanismos alostéricos, fosforilación dependiente de la formación de complejos proteína-proteínas y modificación de cisteínas mediadas por reacciones del tipo redox [57].

(I) Regulación en la biosíntesis de ADPGlc

En la síntesis de almidón, el paso clave y más regulado ocurre a nivel de la síntesis de ADPGlc y es así que la reacción catalizada por la ADPGlcPPasa se torna el paso limitante [58–61]. Estructuralmente, esta enzima está compuesta de dos subunidades codificadas por dos genes distintos, una pequeña o *small* (S) de ~50-53 kDa y una grande o *large* (L) de ~54-60 kDa, que conforman una estructura cuaternaria de heterotetrámero S₂L₂ [30, 55]. Ambas subunidades son requeridas para la actividad óptima de la enzima pero cumplen roles diferentes en la funcionalidad [30, 62]. La subunidad L tendría un rol preferentemente regulatorio, mientras que la subunidad S uno preferentemente catalítico, conservando algunas propiedades regulatorias [30, 63, 64]. Una comparación entre las secuencias aminoacídicas de las subunidades S y L de la ADPGlcPPasa de plantas, revela un elevado grado de identidad entre las subunidades S entre sí (>70%) y entre las subunidades L entre sí (> 50%), aunque el grado de identidad entre las S y las L es menor (~40%) [65]. La ADPGlcPPasa está altamente regulada en hojas, semillas y tubérculos de dicotiledóneas, y en menor medida en semillas de cereales [43]. Su regulación no sólo se da a nivel transcripcional, sino que también es regulada alostéricamente por metabolitos y experimenta modificación postraduccional. A continuación, se enumeran los distintos niveles de regulación informados para esta enzima.

Regulación transcripcional de la ADPGlcPPasa

Múltiples isoenzimas de la ADPGlcPPasa están presentes a distintos niveles en diferentes tejidos de plantas: i) en *Arabidopsis*, existe un gen para la subunidad S y cuatro genes para la subunidad L, ii) en arroz, dos genes para la subunidad S y cuatro para la L, iii) en tomate y papa, un gen para subunidad S y tres genes para la L, y iv) en cebada y trigo, dos genes para la subunidad S y dos para la L [65, 66]. La expresión de los mismos está controlada tanto temporal como espacialmente [67, 68], no sólo en diferentes órganos de las plantas sino también en diferentes estadios del desarrollo de esos órganos [65].

Los genes de la subunidad L muestran una fuerte especificidad en su expresión, siendo restringida su expresión a ciertos tejidos o inducidos bajo condiciones específicas. La expresión diferencial de las subunidades en diferentes tejidos produce una enzima con distintos grados de sensibilidad a efectores alostéricos, adaptándose a las demandas metabólicas particulares de ese tejido. La expresión de la ADPGlcPPasa es incrementada por azúcares y disminuida por nitrato y fosfato. Esto permite la acumulación de almidón en respuesta al carbono y al estado nutricional y a restricciones del ambiente [30, 67].

Regulación alostérica de la ADPGlcPPasa

La regulación alostérica de la ADPGlcPPasa fue descubierta en el año 1966 [69] y está altamente caracterizada. La actividad de esta enzima está regulada por los metabolitos clave de las principales vías de asimilación del carbono en los organismos, los cuales actúan como activadores o inhibidores [70]. Los activadores representan señales de altos niveles de carbono y energía dentro de la célula (ocurriendo lo contrario para los inhibidores), lo cual lleva a incrementar la síntesis del polisacárido de reserva (o a disminuirla), cuando sus concentraciones celulares aumentan. De acuerdo a la afinidad hacia efectores alostéricos, las ADPGlcPPasas han sido divididas en 9 clases diferentes [30]. En numerosos estudios, la ADPGlcPPasa de plantas se ha encontrado regulada alostéricamente por 3PGA (principal activador) y Pi (principal inhibidor). Las plantas utilizan el CBCB para fotoasimilar el CO₂ atmosférico, produciendo 3PGA como primer producto fotosintético; mientras que bajo condiciones de luz el Pi es el sustrato para la generación del ATP a través de la fotofosforilación [71]. En consecuencia, las ADPGlcPPasas fotosintéticas son típicamente reguladas por la relación 3PGA/Pi bajo condiciones fisiológicas, permitiendo que la enzima sea fuertemente activada durante el día e inhibida durante la noche [30]. Por otro lado, las ADPGlcPPasas de tejidos de reserva de algunos cereales exhiben propiedades regulatorias distintivas [72, 73]. Así, se ha informado que la ADPGlcPPasa purificada de endosperma de trigo es insensible a la activación por 3PGA, siendo inhibida por Pi y ADP. A su vez, la inhibición por estos metabolitos puede ser revertida por 3PGA y por Fru6P [73].

Regulación por óxido-reducción de la ADPGlcPPasa

La ADPGlcPPasa de algunos tejidos vegetales está sujeta a regulación por modificación postraduccional asociada al estado redox del entorno celular, involucrando la participación del sistema de tiorredoxinas. Cuando las Cys12 adyacentes de las subunidades S de la enzima de tubérculo de papa son oxidadas para crear un puente disulfuro (-S-S-), se produce una disminución de la actividad catalítica. Por otra parte, el proceso de reducción por tiorredoxinas reducidas (o DTT *in vitro*) genera el aumento de la actividad de la enzima [74]. La Cys12 está altamente conservada en la mayoría de las subunidades S de las ADPGlcPPasas con la excepción de las isoformas encontradas en monocotiledóneas [30, 43], lo que da lugar a que este mecanismo de regulación redox ocurra sólo en algunas de las enzimas de plantas.

Otros niveles de regulación postraduccional de la ADPGlcPPasa

La modificación redox de la ADPGlcPPasa también está asociada a la regulación de las quinasas de proteínas SnRK (relacionadas con las SNF1 de levaduras) y la trehalosa-6-fosfato (T6P) [75, 76]. Estudios llevados a cabo en plantas transgénicas de *Arabidopsis* indican que la T6P tendría un papel importante en la promoción de la activación redox de la ADPGlcPPasa, lo cual genera una mayor síntesis de almidón en hojas. Además, en esta activación estarían involucradas las SnRK1 [75]. La T6P se ha convertido en una importante molécula señal que se correlaciona estrechamente con el contenido de sacarosa en los tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos y se piensa que regula la actividad de SnRK1, aunque el mecanismo directo de acción en la relación con el control de la ADPGlcPPasa no está claro, y puede ser que T6P y SnRK1 operen a través de vías distintas pero superpuestas [76].

Recientemente, estudios de proteómica han permitido establecer la hipótesis de que las subunidades S y L de la ADPGlcPPasa podrían estar sujetas a fosforilación *in vivo* [77, 78], pero no se ha avanzado en el área experimental para probar la validez y las consecuencias de tal proceso de modificación. Los fosfopéptidos encontrados para a subunidad L no están conservados entre especies, mientras que los identificados para la subunidad S (el cual tiene dos Ser putativas) están en una región altamente conservada [43].

(II) Regulación de la síntesis de amilosa y amilopectina

Las enzimas involucradas en la síntesis de amilosa y amilopectina están reguladas a nivel transcripcional y postranscripcional. Se han detectado isoformas de SS y SBE en los genomas de varias especies que van desde *Ostreococcus tauri* (un alga verde) [79–81] a *Arabidopsis* [82] y arroz [83]. Las diferencias entre ellas incluyen la presencia de dominios de unión al almidón (que afectan críticamente la afinidad por el sustrato y las propiedades cinéticas) [84, 85]. Se conoce que el gen de la GBSS de hojas de batata y de *Arabidopsis* está regulado a nivel transcripcional bajo control circadiano y es modulado por los niveles de sacarosa en la hoja [86, 87]. Además, se encontraron diez isoformas de almidón sintasas (ocho SS y dos GBSS) en arroz. Considerando la homología de secuencia, las SS se han clasificado en cinco grupos (SS I, II, III, IV y V) y, algunas de ellas (por ejemplo, las formas I y II), pueden estar parcialmente asociadas con el gránulo de almidón. Respecto a las SBE, se distinguen dos clases según la longitud de las cadenas de polisacáridos transferidas *in vitro*, donde la SBE-I reubica cadenas más grandes que la SBE-II. Además, las SS y las SBE son objetivos de modificación postraduccional por fosforilación, lo que ejerce cambios en sus propiedades catalíticas [43]. Varias líneas de investigación sugieren que las enzimas que participan en la biosíntesis de amilopectina interaccionan física y funcionalmente, formando complejos

heteroméricos. La formación de estos complejos está regulada por fosforilación y afecta críticamente las características del almidón sintetizado en los diferentes plástidos [43, 88].

La acción de todas estas isoformas de almidón sintetasas, junto con la participación de enzimas que lo degradan (ISA, I y II), determinan la estructura final de los gránulos que forman el polisacárido [58, 61]. Dependiendo de las cantidades relativas de amilosa y amilopectina así como también de otras características estructurales, como el grado de fosforilación del polisacárido [89], los gránulos de almidón varían en forma, tamaño y propiedades físicas en los amiloplastos de diferentes especies de plantas [90, 91].

1.4.3.2 Síntesis de lípidos

Numerosas semillas (incluyendo las especies de gran importancia agronómica como soja y girasol) así como algunas frutas (como aceitunas o el aguacate) acumulan lípidos, en vez de almidón, como principal fuente de carbono [10]. Los lípidos constituyen una base conveniente para almacenar energía biológica, ya que conforman estructuras relativamente compactas (y anhidras) de una de las formas más reducidas del carbono, cuya oxidación genera mayor energía que para el caso de las proteínas o los hidratos de carbono [92, 93]. De los distintos tipos de lípidos que componen una célula, los triacilglicéridos (TAG) son los que se utilizan para ser almacenados [10]. El metabolismo de los lípidos en plantas requiere de la cooperación de diferentes organelas [94]. De esta forma, la síntesis de TAG involucra principalmente a los plástidos (para la síntesis de ácidos grasos) y el retículo endoplasmático (para ensamblar los TAG), mientras que la degradación de los lípidos ocurre principalmente dentro de los glioxisomas y en la mitocondria [92]. Una vez sintetizados, los TAG se acumulan en el citosol y son almacenados (ya sea en cotiledones o en el endosperma) como cuerpos oleosos u oleosomas. Estas estructuras, son organelas esféricas compuestas por una monocapa de fosfolípidos que contiene a los TAG en su interior y que se encuentran estabilizadas por la presencia de proteínas embebidas en la bicapa lipídica denominadas oleosinas [10, 92]. En la Figura 9 se detalla el mapa metabólico en una célula vegetal que acumula lípidos como reserva energética.

Cada molécula de TAG está formada por tres ácidos grasos unidos covalentemente por enlace éster a una molécula de glicerol (Gro) [95]. Los TAG son sintetizados a partir de Gro-3-fosfato (Gro3P) y de los derivados acil-CoA de los AG, y el proceso requiere de la cooperación de diferentes organelas. El ensamblaje de los TAG ocurre en el retículo endoplasmático mediante una serie de reacciones que en su conjunto se denominan como la vía de Kennedy; sin embargo, la síntesis *de novo* de AG en plantas ocurre en el interior del plástido [96]. Para suplir de fuentes de carbono y energía (ATP y NADPH) a la síntesis de los AG, las semillas metabolizan la sacarosa hasta Glc6P,

triosas-P, PEP o malato, compuestos que pueden ingresar al plástido y continuar su metabolismo dentro del mismo [97]. El intermediario transportado al interior del plástido depende de la especie vegetal considerada. Estudios de flujo metabólico han mostrado que en Brassicaceae (*Brassica napus* o *Arabidopsis thaliana*) la sacarosa se metaboliza en el citosol hasta PEP, el que se importa al plástido; mientras que en plantas como el girasol el metabolismo citosólico de la sacarosa produce Glc6P y es este el compuesto importado al interior del plástido [92, 98]. Respecto a la producción de Gro, dos son los intermediarios glucolíticos utilizados como precursores para la síntesis de TAG: la DHAP y el Pyr. La DHAP es convertida en el citosol a Gro3P por la Gro3P deshidrogenasa (Gro3PDHasa, EC 1.1.1.94) y provee del esqueleto de Gro necesario para la síntesis de las moléculas de TAG.

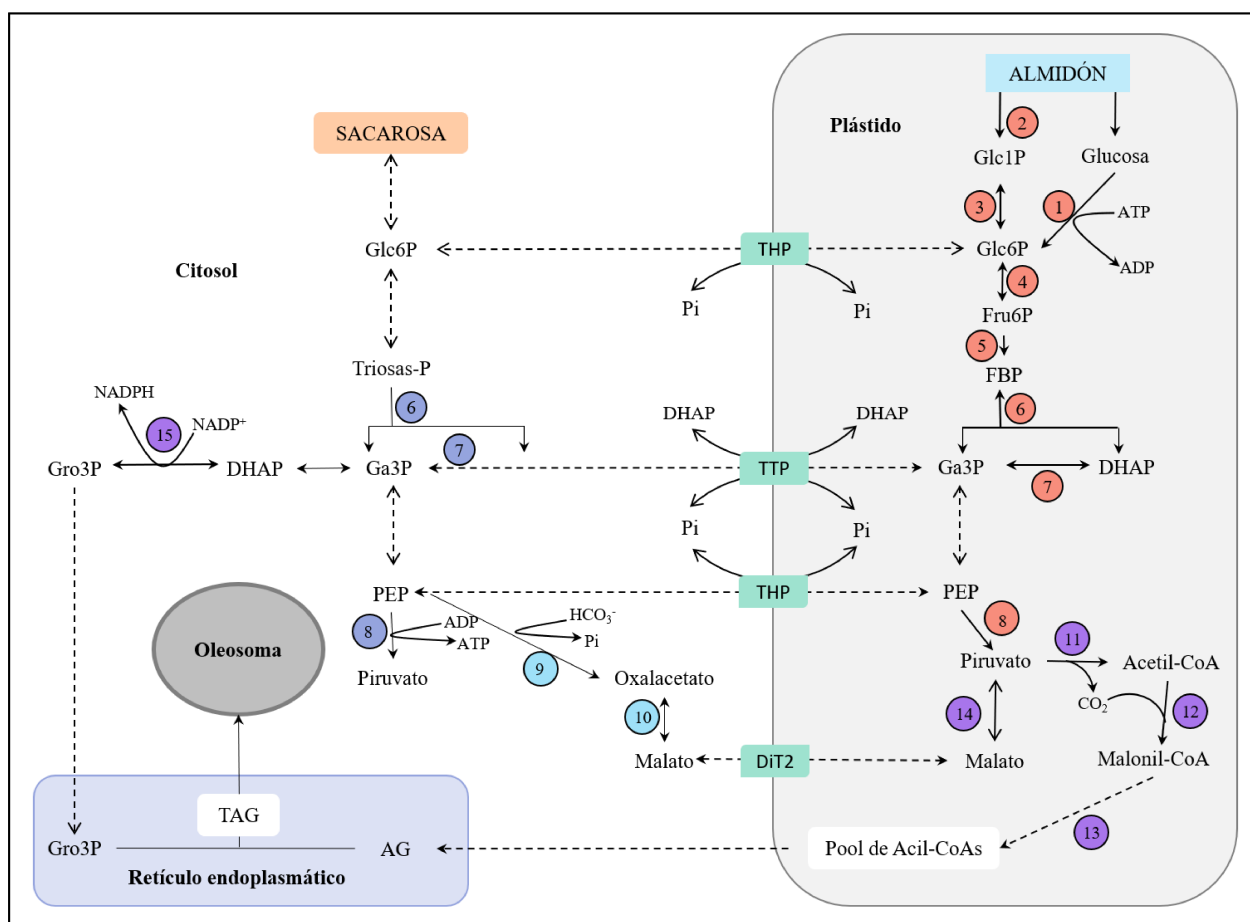


Figura 9: Representación esquemática de la síntesis de TAG en las semillas. Referencias: (●) Enzimas que participan de la glucólisis clásica; (●) Enzimas que, en plantas, participan de rutas alternativas de la glucólisis clásica; (●) Isoformas de enzimas que participan en la glucólisis de plantas dentro de los plástidos; (●) Enzimas que participan en la vía de síntesis de TAG. Los números indican: (1) Hexoquinasa; (2) Fosforilasa; (3) Fosfoglucomutasa; (4) Fosfoglucoisomerasa, (5) ATP-PFKasa; (6) Aldolasa; (7) TPIasa; (8) Piruvato quinasa; (9) PEPCKasa; (10) MDHasa; (11) Complejo Piruvato Deshidrogenasa; (12) Acetil-CoA Carboxilasa; (13) Complejo AG elongasa; (14) ME dependiente de NADP⁺; (15) Gro3PDHasa; TTP: transportador de triosas-P; THP: transportador de hexosas-P; DiT2: transportador de malato. Las flechas indican que, a nivel fisiológico, las reacciones enzimáticas son: (→) irreversibles o (↔) reversibles. Recopilada y modificada a partir de Plaxton, 1996 [40] y de Baud y Lepiniec, 2010 [92].

Para la síntesis *de novo* de AG, el intermediario transportado al interior del plástido continúa su metabolismo mediante la glucólisis plastídica que lo lleva a Pyr, el que luego experimenta una oxidación decarboxilativa llevada a cabo por el complejo de la Pyr deshidrogenasa (EC 1.2.4.1). Esto último produce CO₂ y acetil-CoA, el precursor directo de la síntesis de AG [92, 98]. El primer paso de la vía sintética de los AG es catalizado por la acetil-CoA carboxilasa (ACC, EC 6.4.1.2), que formará malonil-CoA a partir de acetil-CoA y bicarbonato (paso limitante de la vía) [96]. El malonil-CoA constituye el dador de carbono para cada ciclo de condensación que alarga la cadena creciente en dos carbonos cada vez [99]. Una vez sintetizados los AG, son transportados al retículo endoplasmático donde, formando los respectivos acil-derivados de la CoA, son utilizados para ensamblar los TAG a partir del Gro3P [92].

1.5 Tejidos especializados en la acumulación de compuestos de reserva

Entre los tejidos heterotróficos que componen una planta se encuentran las raíces, los tubérculos y las semillas; pero la síntesis y acumulación de compuestos de reserva ocurre específicamente en los dos últimos. La función principal de los tubérculos y las semillas es asegurar el crecimiento y desarrollo de una nueva planta para así perpetuar la especie [100]. Un tubérculo es una estructura modificada y engrosada del tallo o la raíz, donde se acumulan nutrientes que le permitirán a la planta sobrevivir a los meses de invierno o sequía, proporcionándole energía y metabolitos para el crecimiento. Los tubérculos también actúan como una forma de reproducción asexual. Ejemplos de plantas con raíces tuberosas incluyen la papa, la yuca y la dalia [101]. La semilla, por su parte, es una planta embrionaria contenida en una cubierta protectora, que acumula suficiente cantidad de nutrientes para permitir el establecimiento de la nueva planta. Las semillas son fundamentalmente medios de reproducción, pero cumplen funciones como las de contener el alimento necesario para que el embrión pueda desarrollarse, permitir la dispersión de la planta hacia una nueva ubicación, y lograr mantener la latencia de la descendencia para que sobreviva en condiciones desfavorables [100].

1.5.1 Las semillas

Las semillas son características de las plantas espermatofitas (gimnospermas y angiospermas) y son el producto de un óvulo maduro que, luego de la fertilización y crecimiento dentro de la planta madre, puede ser liberado al medioambiente [102]. Las semillas de cereales y leguminosas están compuestas por la cubierta o cutícula, el endosperma y el embrión, tejidos que interactúan físicamente pero que son componentes genética y fisiológicamente heterogéneos [33]. La formación

de la semilla (iniciada con el desarrollo de las flores y la ocurrencia de la polinización) completa el proceso de reproducción en las plantas con el desarrollo del embrión a partir del cigoto y el de la cutícula a partir de los tegumentos del óvulo. En las semillas endospermicas, hay dos regiones distintas dentro de la cubierta, un endosperma superior y más grande y un embrión inferior más pequeño. El embrión es el óvulo fecundado y tiene un cotiledón u hoja en semillas monocotiledóneas, dos cotiledones en las dicotiledóneas y dos o más en gimnospermas. La cubierta de la semilla que se desarrolla a partir del tejido materno que originalmente rodea al óvulo, ayuda a proteger el embrión de una lesión mecánica, los depredadores y la desecación [102].

Dentro de la semilla, por lo general existe un almacén de nutrientes para la nueva planta que crecerá a partir del embrión. El nutriente almacenado varía dependiendo del tipo de planta, al igual que el sitio en el cual se acumula (embrión o endosperma). Por ejemplo, en las angiospermas las reservas se acumulan en el endosperma, el cual se deriva de la planta madre y del polen luego de la doble fertilización que, por lo general, es triploide y rico en aceites o almidón y proteínas [102]. Los azúcares importados a los tejidos heterotróficos de reserva, proporcionan el carbono y la energía para su crecimiento (división celular y expansión), diferenciación y mantenimiento. En determinados momentos del desarrollo el carbono se almacena como: i) mono o disacáridos en las vacuolas, ii) en forma polimérica como el almidón en los plástidos y/o iii) en forma de aceites en vesículas denominadas cuerpos aceitosos presentes en el citosol celular [103]. Entre las plantas que acumulan principalmente almidón se pueden mencionar a la papa, el trigo y el maíz; mientras que dentro de las plantas que producen semillas oleaginosas (que acumulan principalmente TAG) se pueden nombrar el girasol, el lino, la colza y el ricino [104].

Fases del desarrollo de las semillas y metabolismo del carbono

El desarrollo de las semillas está genéticamente programado y comprende tres fases denominadas proliferación celular, transición y maduración/almacenamiento. Se ha demostrado que el flujo del carbono y de la energía metabólica no es igual en cada una de estas etapas [33]. En particular, durante el desarrollo cada una de estas fases tiene demandas metabólicas específicas. Dado que este tejido es del tipo sumidero por excelencia, un aspecto importante de su desarrollo concierne a la partición del metabolismo del carbono, la señalización dentro de la célula, el flujo de nutrientes y la regulación de los estados energéticos [105].

Al inicio del desarrollo, la actividad celular está controlada por los tejidos maternos y está mayoritariamente comprendida por la división celular. Además, el flujo del carbono está destinado principalmente a solventar la síntesis de componentes celulares y la formación del nuevo tejido. Una

vez desarrollado el embrión y las estructuras celulares fundamentales, el metabolismo del carbono y la energía es destinado a la acumulación de compuestos de reserva que permitirán, en el futuro, la germinación de la semilla y el establecimiento de una nueva planta. Los cambios en el estado energético, así como la disponibilidad de oxígeno y de nutrientes actúan como inductores de la fase de transición; mientras que varias señales operan sobre la reprogramación genética [33].

A nivel de metabolitos, algunos azúcares específicos se corresponden con distintas etapas del desarrollo. En este sentido, la Glc se correlaciona con la alta actividad mitótica de las células indiferenciadas, mientras que la sacarosa está presente en células en maduración con activa expansión y acumulación de reservas. Se ha demostrado que las invertasas, principalmente las de la pared celular, intervienen en la iniciación y proliferación de nuevas estructuras sumidero, los cuales mantienen una alta actividad mitótica, degradando la sacarosa en el apoplasto e incrementando notablemente las concentraciones de hexosas que ingresan a la célula por la membrana plasmática a través de transportadores de monosacáridos. Sin embargo, la transición hacia las fases de almacenamiento y maduración es facilitada por cambios en la relación hexosas/sacarosa y por el cambio en el metabolismo de la sacarosa que comienza a ser mediado por la SucSasa en lugar de las invertasas. En particular, los aumentos en las concentraciones de sacarosa tienen una doble función, tanto en la nutrición como en la señalización, lo cual desencadena los procesos asociados al almacenamiento de reservas. Además, la modificación de los flujos metabólicos mediados por la sacarosa ocurre tanto a nivel transcripcional como postraduccional [33, 106]. La sacarosa promueve la acumulación de compuestos de reserva induciendo los genes de las enzimas SucSasa y la ADPGlcPPasa, como así también, actúa sobre los genes de las enzimas SPSasa y PEP carboxilasa (PEPCasa) que son reprimidos e inducidos, respectivamente, en respuesta a sacarosa [33, 107]. Además, se ha informado que en tubérculos de papa la sacarosa interviene en la regulación de enzimas involucradas en la activación redox, mientras que en semillas esto es desconocido [107].

Se ha informado que los niveles endógenos de oxígeno también varían notablemente en tejidos sumideros activos, tales como tubérculo y semillas en desarrollo, y que la relación oxígeno/energía también se encuentra involucrada en la activación de los procesos de maduración de estos tejidos [33, 106]. Tal es así, que los resultados obtenidos en varios estudios indican que la degradación de sacarosa y la síntesis de almidón, se encuentran controladas por señales regulatorias en respuesta a las concentraciones de sacarosa y a la disponibilidad de oxígeno. La etapa de acumulación de reservas tiene niveles bajos de oxígeno, con los cuales la SucSasa puede operar de manera efectiva e inclusive reducir el grado de depleción de oxígeno; mientras que las invertasas típicamente son ineficientes en estas condiciones [33].

Durante muchos años los trabajos se dirigieron a tratar de determinar cuáles son los mecanismos involucrados en la maduración de las semillas. Es así que se pudo demostrar que los cambios de fases durante el desarrollo del endosperma están controlados por una red compleja de señales que involucra no sólo a los azúcares (Glc y sacarosa), sino también a la hormona ácido absícico (ABA) y a las quinasas de proteínas de la familia SnRK1 [33, 105, 107, 108]. Esta red de señalización tiene como objetivo permitir la adaptación metabólica de la semilla en respuesta a la disponibilidad de diferentes fuentes de carbono, de energía y de oxígeno. En este contexto, se ha informado que la expresión de los genes que codifican para las invertasas es inhibida por bajos niveles de oxígeno; así como también responden a la inhibición por proteínas cuya expresión se induce por hormonas tales como el ABA [33, 106]. Por el contrario, los genes que codifican para la SucSasa son inducidos por privación de carbono (Glc) y bajos niveles de oxígeno [106].

Rol de las quinasas de proteínas de las familias SnRK1/CDPK

Se ha informado que las quinasas de proteínas de la familia SnRK [relacionadas con las SNF1 (del inglés *Sucrose Non Fermenting 1*) de levaduras y AMPK de mamíferos (del inglés *AMP dependent Protein Kinase*)] y las CDPK (quinasas de proteínas dependiente de Ca^{2+} -calmodulina) juegan un rol fundamental en la partición de los hidratos de carbono y en la transición hacia la fase de acumulación de reservas [33], actuando como integradoras globales del desarrollo y el metabolismo frente a señales energéticas [109]. También se ha mostrado que estas quinasas de proteína se encargan de regular postraduccionalmente por fosforilación a diferentes actores del metabolismo [110]. Por ejemplo, en arroz, una isoforma de CDPK es requerida para la acumulación de compuestos de reserva, mediante la fosforilación de la SucSasa [111]. En semillas de haba (*Vicia faba*) se demostró que al ser fosforilada la SPSasa es inactivada durante la fase de transición, mientras que la PEPCasa es activada al mismo tiempo [33]. Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de proteínas SnRK1 en papa genera tubérculos con mayor contenido de almidón [112], mientras que la represión de la expresión del gen que codifica para las SnRK1 en arveja genera un defecto en la maduración, inhibiéndose el paso hacia la fase de acumulación de reservas [105].

Algunas enzimas de la glucólisis están reguladas, en tejidos heterotróficos, por proteínas quinasas de la familia SnRK1, tal es el caso de la piruvato quinasa [113], la np-Ga3PDHasa [114] y la Ga3PDHasa [115]. Al presente, se desconoce si otras enzimas de la vía glucolítica, o de otras vías metabólicas del carbono, se encuentran también reguladas por fosforilación en las semillas. Tampoco se conoce si el proceso de regulación postraduccional por fosforilación forma parte de mecanismos de regulación global de la partición intracelular del carbono y no se ha estudiado si la

regulación por fosforilación ocurre de igual manera en semillas que acumulan el carbono bajo la forma de distintos tipos de compuestos.

Existen varios trabajos en los cuales se ha estudiado el proteoma y transcriptoma durante la maduración de las semillas, pero, aunque el desarrollo está genética y temporalmente programado, los resultados obtenidos en estos estudios no explican completamente las diferencias en los rendimientos de los compuestos de reserva [116]. Sin embargo, el metabolismo (consecuente al transcriptoma y proteoma) en semillas es un área que ha sido menos estudiada y que es necesaria explorar para comprender la regulación de las vías metabólicas y cómo influyen en los rendimientos de los productos de reserva. A partir de esto, nos propusimos realizar estudios para disponer de mayor información sobre la regulación postraduccional de las enzimas involucradas en el metabolismo del carbono en distintos tipos de semillas. Dentro de estos mecanismos regulatorios, resulta particularmente relevante el estudio de la modificación por fosforilación de enzimas claves en el metabolismo del carbono de semillas que acumulan el carbono tanto en forma de almidón como de TAG. Los resultados obtenidos a partir de estos estudios podrían contribuir a la comprensión de los factores y mecanismos, además de los genéticos, que participan de la red regulatoria que integra las señales y que influye en la partición del carbono y la composición de la semilla.

2. Objetivo del trabajo

En el presente plan de Tesis el objetivo general busca contribuir al conocimiento de la regulación global del metabolismo y la partición intracelular e intercelular del carbono en plantas, particularmente en tejidos heterotróficos. Los objetivos se alcanzarán mediante el estudio cinético, estructural y regulatorio de enzimas claves del metabolismo del carbono. Principalmente, se estudiará la enzima clave del metabolismo de la síntesis de almidón. Los estudios se focalizarán en evaluar la regulación alostérica de la ADP-glucosa pirofosforilasa y la ocurrencia de la regulación postraduccional por fosforilación de la enzima. Además, se estudiarán las quinasas de proteínas involucradas en la regulación global del metabolismo del carbono por fosforilación en los organismos de interés.

2.1 Objetivos específicos:

- ∞ Caracterizar la funcionalidad de cada una de las subunidades que conforman a las ADP-glucosa pirofosforilasas de plantas.
- ∞ Estudio de la regulación alostérica y la ocurrencia de la modificación postraduccional por fosforilación de la ADP-glucosa pirofosforilasa.
- ∞ Estudio del efecto de la fosforilación (tanto *in vivo* como *in vitro*) de la ADP-glucosa pirofosforilasa.
- ∞ Detección y caracterización de las quinasas de proteínas en distintas fases del desarrollo de semillas de trigo y ricino.
- ∞ Análisis y discusión de los resultados en el contexto metabólico y en forma comparativa.

3. Materiales y Métodos

3.1 Reactivos químicos y materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de la máxima calidad disponible, de grado “pro-análisis” o similar. Los materiales y reactivos químicos empleados en este trabajo se obtuvieron comercialmente de las siguientes compañías:

- Componentes de medios bacteriológicos: Britania, Cicarelli.
- Reactivos de biología molecular: Promega, Invitrogen, Fermentas, Novagen, Stratagene, Pierce, New England BioLabs.
- Materiales utilizados en la purificación de proteínas y otros reactivos relacionados a proteínas: GE Healthcare, Qiagen.
- Filtros y columnas de desalado: Sartorius, Millipore.
- Reactivos químicos: Sigma-Aldrich, Merck, Perkin Elmer, Amersham Bioscience.

3.2 Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos

3.2.1 Cepas bacterianas:

Para el clonado de los diferentes genes y la expresión recombinante de las distintas proteínas caracterizadas en este trabajo, se emplearon las siguientes cepas bacterianas:

- *Escherichia coli* Top10 F' (Invitrogen). Esta cepa fue empleada durante las etapas de biología molecular para generar las construcciones de expresión.
- *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Novagen). Esta cepa fue empleada para la expresión recombinante de todas las enzimas caracterizadas en este trabajo.

3.2.2 Plásmidos:

Durante el desarrollo de este trabajo se emplearon distintos plásmidos, tanto para la realización de las etapas de clonado como aquellos necesarios para las distintas estrategias de expresión. Los mismos se detallan a continuación:

- **pET28c** (Novagen). Vector de expresión para sistemas bacterianos de *E. coli*. La expresión de la proteína de interés es inducida mediante la síntesis de la T7 RNA polimerasa, cuyo gen está presente en la célula huésped bajo el control del promotor *lac*. El vector es inducible con IPTG (análogo a la lactosa) que permite incorporar una etiqueta de poli-histidinas (His-tag) en el extremo N-terminal de la proteína para facilitar la

posterior purificación de la misma. Este plásmido confiere a la célula resistencia al antibiótico kanamicina.

- **pET19TEV.** Vector de expresión para sistemas bacterianos de *E. coli*, derivado del pET19b (Novagen). La expresión de la proteína de interés es inducida mediante la síntesis de la T7 RNA polimerasa, cuyo gen está presente en la célula huésped bajo el control del promotor *lac*. El vector es inducible con IPTG (análogo a la lactosa). Permite incorporar una etiqueta de His-tag en el extremo N-terminal de la proteína para facilitar la posterior purificación de la misma y, además, adiciona un sitio de corte para la enzima TEV entre el His-tag y el sitio de múltiple clonado, que permite retirar la etiqueta de histinas de la proteína madura. Este plásmido confiere a la célula resistencia al antibiótico ampicilina.
- **Sistema de vectores Duet.** Vectores de expresión diseñados para coexpresar dos o más proteínas diana en *E. coli*. Los vectores Duet llevan replicones compatibles y marcadores de resistencia a los antibióticos y se pueden usar juntos en cepas del huésped apropiadas para coexpresar hasta ocho proteínas. Estos sistemas fueron utilizados para la obtención de proteínas heteroméricas. En cada uno de estos vectores se pueden coexpresar de a dos proteínas al mismo tiempo, dado que posee dos sitios de múltiple clonado.
 - **pETDuet:** Los genes se expresan bajo la regulación del promotor T7 y el plásmido confiere resistencia a ampicilina.
 - **pRSFDuet-1:** Los genes se expresan bajo la regulación del promotor T7 y el plásmido confiere resistencia a kanamicina.
 - **pCDFDuet:** Los genes se expresan bajo la regulación del promotor T7 y el plásmido confiere resistencia a spectinomomicina.

3.2.3 Medios de cultivo:

- Luria Bertani (LB) (Extracto de levadura, 5 g/l; triptona, 10 g/l y NaCl, 5 g/l)
- LB-agar. Medio LB suplementado con agar-agar 1,6 % (p/v)

3.2.4 Antibióticos:

- Kanamicina, concentración final 50 µg/ml.
- Ampicilina, concentración final 100 µg/ml.
- Spectinomomicina, concentración final 100 µg/ml.

3.3 Métodos bioquímicos básicos:

3.3.1 Electroforesis en geles de agarosa

Las electroforesis de fragmentos de ADN fueron resueltas en geles de agarosa al 1% (p/v) en solución TAE 1X (TRIS 40 mM pH 8,0; ácido acético 40 mM; EDTA 1 mM) con la adición de GelGreen 1X (Biotium). Las muestras se acondicionaron antes de su corrida con glicerol 3% (v/v) y Azul de Bromofenol 0,05% (p/v). Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador UV a 302 nm (DyNA Light, LabNet Internacional Inc.).

3.3.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en geles discontinuos de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se realizó siguiendo la técnica descrita por Laemmli [117]. La concentración de acrilamida del gel de apilamiento fue de 4%, mientras que la concentración del gel de separación fue variada entre 7.5% y 10% según la masa molecular de las proteínas a analizar. Las muestras fueron desnaturalizadas antes de su siembra mediante el agregado de *buffer* de siembra SDS-PAGE 4X con reductor [SDS 1% (p/v), β -ME 100 mM, en TRIS-HCl 50 mM pH 6,8] y su posterior calentamiento a 100 °C durante 5 min. En caso de realizar SDS-PAGE no reductor, se omite la presencia de β -ME. Finalizada la corrida electroforética a 30 mA por gel, las proteínas en el gel se visualizaron por tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250 en una solución de metanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v); y su posterior decoloración en una solución de metanol 5% (v/v) y ácido acético 7,5% (v/v).

3.3.3 Cuantificación del contenido proteico

Para determinar la concentración de las proteínas totales presentes en las muestras se utilizó la técnica de Bradford [118], utilizando como patrón una solución de Albúmina sérica bovina (BSA, Sigma). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro UV-Vis METROLAB 325 BD.

3.3.4 Cambio de medios y concentración de proteínas

Para cambiar el medio de las soluciones proteicas y/o para concentrar las proteínas se emplearon dispositivos comerciales de ultrafiltración Amicon (Millipore) de MWCO apropiado para cada proteína y se procedió según las indicaciones del fabricante.

3.3.5 Preparación de antisueros

Los sueros inmunes contra las proteínas de interés fueron preparados en el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional

del Litoral, Esperanza, Santa Fe, Argentina; mediante la inmunización de conejos con soluciones de las proteínas purificadas acorde a lo descripto por Vaitukaitis [119].

3.3.6 Electrotransferencia seguida de inmunodetección

Realizada la corrida electroforética de SDS-PAGE, se efectuó la electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa (Sigma), durante 60 min a 180 mA en un equipo Mini Protean II (Bio-Rad) en una solución de TRIS base 0,025 M pH 8,3; glicina 0,192 M, metanol 20% (v/v). Finalizada la electrotransferencia, la membrana se bloqueó incubándola 1 h a 25 °C con una solución de TBS (TRIS-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 150 mM) adicionada de leche descremada en polvo al 5% (p/v). Luego, se lavó con solución de TBS 10 min a 25 °C y se incubó 1 h a 25 °C con una solución de TBS suplementada con leche descremada al 1% (p/v) (TBS-leche 1%) que contenía una dilución adecuada del anticuerpo primario preparado en conejo. Se lavó nuevamente con solución de TBS 10 min a 25 °C, y se procedió a la incubación de la membrana durante 1 h a 25 °C en TBS-leche 1% adicionada de una dilución 1/10.000 del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti-IgG totales de conejo, Sigma). Las bandas proteicas fueron visualizadas usando el método ECL y reactivos de detección (Thermo Scientific).

3.3.7 Cromatografía de filtración por geles. Determinación de la masa molecular.

Este tipo de cromatografía se utilizó con fines analíticos para la determinación de la masa molecular de las distintas proteínas. En el equipo *Äkta purification* (GE Healthcare) se conectó una columna Tricorn 5/200 (GE Healthcare) cargada con resina Superdex G-200 (GE Healthcare). Las cromatografías se realizaron a 0,2 ml/min en *buffer G* [HEPES 50 mM pH8,0; NaCl 100 mM; EDTA 0,1 mM]. Se empleó el *Gel Filtration Calibration Kit – High Molecular Weight* (GE Healthcare) para el calibrado de la columna. Los estándares del *kit* fueron: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), aldolasa (158 kDa), conlabúmina (75 kDa) y ovoalbúmina (44 kDa). El volumen muerto de la columna se determinó empleando una solución de Azul de Dextrano (Promega). Las masas moleculares se determinaron por interpolación de la curva semi-logarítmica, donde se grafica el log de la masa molecular de los marcadores comerciales del *kit* versus el K_{av} . Éste último se obtiene a partir de la siguiente ecuación: $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_c - V_o)$; donde V_e es el volumen de elusión, V_o es el volumen muerto y V_c es el volumen de la columna.

3.4 Metodología utilizada en biología molecular

3.4.1 Minipreparación de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico a partir de células transformadas de *E. coli*, los clones de interés se repicaron en 3 ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente

y se cultivaron toda la noche a 37 °C. Las células se cosecharon por centrifugación a 3000 x g durante 10 min y se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), siguiendo el protocolo establecido en el mismo. La obtención del plásmido se corroboró por electroforesis en geles de agarosa.

3.4.2 Secuenciación de ADN

Los plásmidos que contenían los genes de interés se enviaron a secuenciar para corroborar que la secuencia del gen sea la correcta. Para esto una alícuota de una minipreparación de ADN plasmídico, de una concentración aproximada de 100 µg/µl se envió a la empresa MacroGen (Corea) para ser secuenciada de forma automatizada utilizando oligonucleótidos específicos que hibridan en alguna región del plásmido cercana al sitio de inserción del gen o sobre el propio gen.

3.4.3 Digestión de ADN con enzimas de restricción

Para realizar el subclonado de los genes, los mismos se liberaron a partir del vector de clonado con las enzimas de restricción que permitieran su incorporación de manera adecuada en el vector de expresión seleccionado, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Además, el análisis de restricción es útil para confirmar la presencia del gen de interés en el vector en estudio. Las reacciones de digestión comúnmente contenían: 1 a 2 µg de ADN plasmídico, el *buffer* de reacción correspondiente que provee el fabricante y de 10 a 20 U de la enzima de restricción. Esta mezcla se incubó durante 3 h a 37 °C. Las digestiones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y en el caso de utilizarse para subclonado el inserto liberado se purificó a partir del gel como se indica en la Tabla 1.

3.4.4 Precipitación de ADN

La precipitación de ADN se utiliza para eliminar todos los componentes no deseados de la mezcla de reacción luego de, por ejemplo, una digestión con enzimas de restricción. En este caso se utilizó como paso intermedio de la digestión sucesiva con distintas enzimas de restricción, o en la purificación final de los vectores de expresión digeridos con el objeto de subclonar los genes de interés. Para precipitar una solución de ADN se agregaron dos volúmenes de etanol (absoluto) y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M. La mezcla se incubó a 4 °C toda la noche. Posteriormente, se centrifugó la mezcla de precipitación a 15.000 x g durante 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante, el precipitado de ADN se lavó con etanol 70% (v/v), se dejaron evaporar los restos de etanol 15 min a 25 °C y, por último, se resuspendió el ADN en H₂O₂ Milli-Q esterilizada por calor y presión.

3.4.5 Ligación de fragmentos de ADN

Para ligar el gen de interés y el vector de expresión correspondiente, ambos digeridos con las mismas enzimas de restricción, se utilizó la enzima T4 ADN ligasa (Promega). La mezcla de reacción contenía típicamente una relación molar 3:1 de inserto:vector, que se incubó 5 min a 60 °C y luego se enfrió rápidamente en hielo. Posteriormente, se agregó a ese mismo tubo una cantidad adecuada de *buffer* de reacción 10 X que provee el fabricante y 2 U de T4 ADN ligasa. La mezcla final se incubó durante 16 h a 16 °C. Para obtener los clones de expresión, con la mezcla de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* Top10F', se seleccionaron los clones que poseían el inserto por análisis de restricción y con los clones seleccionados se transformaron las células de *E. coli* escogidas para la expresión de la proteína recombinante.

3.4.6 Transformación de células de *E. coli* competentes

Para permitir la incorporación de ADN plasmídico exógeno, las células de *E. coli* se hicieron competentes utilizando el método de CaCl₂. Los pasos seguidos se indican a continuación. Un cultivo crecido durante toda la noche en medio LB se diluyó 1/50 en medio de cultivo fresco y se creció a 37 °C hasta una DO₆₀₀~0,4; se tomaron alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf de 1,5 ml, se centrifugaron a 5.000 x g por 5 min y las células se resuspendieron en 500 µl de solución ST1 [MOPS-NaOH pH 7,0 100 mM; KCl 10 mM]. Se volvió a centrifugar como anteriormente, para luego resuspender las células en 500 µl de solución ST2 [MOPS-NaOH pH 6,5 100 mM; KCl 10 mM; CaCl₂ 100 mM] e incubarlas durante 15 min en hielo. Las células se centrifugaron nuevamente a 5.000 x g por 5 min y se resuspendieron en 100 µl de ST2. A las células competentes se les agregaron entre 2-5 µl de plásmido o de mezcla de ligación y se incubaron en hielo durante 60 min. Se realizó un choque térmico a 42 °C durante 40 s y luego se recuperaron las células adicionando 1 ml de medio LB-glucosa e incubando durante 60 min a 37 °C. Por último, las células se volvieron a centrifugar a 4.600 x g durante 5 min, se eliminó el ml de medio adicionado, se resuspendieron en los 100 µl remanentes y se sembraron en placas de LB-agar suplementado con el/los antibióticos correspondientes para permitir la selección de las células transformadas. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C y se seleccionaron clones para continuar con el análisis.

3.4.7 Análisis de las transformaciones

Se realizaron cultivos en medio LB líquido de colonias de *E. coli* transformantes manteniendo la condición de selección, a partir de éstas se obtuvieron los ADN plasmídicos, se verificó la presencia del gen insertado mediante el uso de enzimas de restricción y posteriormente se procedió a la secuenciación de las construcciones plasmídicas, realizada en el laboratorio MacroGen Inc

(Seoul, Korea), utilizando como cebadores secuencias de nucleótidos específicas del plásmido utilizado.

3.4.8 Creación de un banco de células

Con el objetivo de normalizar las condiciones de cultivos y expresión de los distintos clones, se construyó un banco central de células para cada cepa de expresión. Las reservas de células se prepararon a partir del cultivo de una única colonia de cada clon de expresión y se almacenaron a -80°C en LB suplementado con glicerol 20% (v/v).

3.4.9 Clonado molecular de las proteínas recombinantes

Los genes que forman las dos subunidades de la ADPGlcPPasa de endosperma de trigo (*TaeADPGlcPPasa*) se sintetizaron a partir de su secuencia de aminoácidos (UniProt P12299 y UniProt P30523, para *TaeL* y *TaeS*, respectivamente) entre los sitios de restricción *NdeI* y *SacI*. El uso de codones nucleotídicos se optimizó para su expresión en *E. coli*. Los genes de las subunidades *TaeS* y *TaeL* se subclonaron en vectores pET28c.

Para los ensayos de fosforilación, cada gen se subclonó desde plásmido pET28c en el vector pET19TEV usando los sitios *NdeI* y *XhoI* (corriente abajo del sitio *SacI* en el sitio de múltiple clonado del vector pET28c). El pET19TEV es un vector modificado que contiene codones que codifican para un sitio diana de la proteasa TEV entre el His-tag y el sitio de múltiple clonado. Las construcciones pET19TEV/*TaeL* y pET19TEV/*TaeS* sobreexpresan individualmente la proteína diana con un His-tag en el N-terminal. Para la co-expresión de ambas subunidades, se subclonó *TaeS* del plásmido pET28c en el vector pCDFDuet usando sitios *NdeI* y *XhoI*. Al combinar las construcciones pCDFDuet/*TaeS* y pET28c/*TaeL*, obtuvimos la *TaeADPGlcPPasa* (*TaeL/TaeS*, con un His-tag solo en la subunidad L) caracterizada en los ensayos de fosforilación *in vitro* de este trabajo.

Para la caracterización cinética y la construcción de híbridos, los genes de la subunidad *TaeS* y *TaeL*, así como los genes que codifican para las subunidades S y L de la ADPGlcPPasa de tubérculo de papa [62], se subclonaron usando sitios de restricción *NdeI* y *SacI* en los vectores pET28c, lo que genera proteínas con un His-tag N-terminal que se sobreexpresan de manera individual. Además, todos los genes que codifican las diferentes subunidades S y L se subclonaron desde plásmido pET28c en el vector pCDFDuet usando los sitios *NdeI* y *XhoI*. Esta construcción sobreexpresa la proteína diana, pero sin una etiqueta. Al combinar las construcciones pCDFDuet y pET28c, obtuvimos las diferentes versiones de la ADPGlcPPasa caracterizadas cinéticamente en este trabajo, con un His-tag en una sola subunidad del heterotetrámero. Aunque obtuvimos el conjunto completo de combinaciones, aquí sólo informamos los datos cinéticos y regulatorios de

aquellas versiones S/L heteroméricas donde el His-tag estaba en la subunidad L (usando pET28c) y con la subunidad S sin etiquetada (usando pCDFDuet).

Además, para los ensayos de fosforilación se utilizaron quinasas de plantas también expresadas de manera recombinante. El gen de la subunidad catalítica α de la SnRK1 de *Arabidopsis thaliana*, AthSnRK1 α 1, se obtuvo de fuente y luego se le realizó la mutación S198D (que se requiere para su actividad) mediante *quickchange mutagenesis*. Se subclonó en el vector pETDuet para su sobreexpresión individual con un His-tag en su N-terminal. El gen de la quinasa SOS2 de *Malus domestica*, MdoSOS2, se sintetizó a partir de su secuencia aminoacídica y se utilizaron codones nucleotídicos optimizados para su expresión en *E. coli*. Se le introdujo la mutación T168D mediante *quickchange mutagenesis* (la cual se requiere para su actividad) y se subclonó en el vector pET28b para sobreexpresar individualmente la quinasa con un His-tag en el N-terminal. Para la expresión de la quinasa CDPK1 de *Solanum tuberosum*, StuCDPK1, se utilizó la construcción pET22⁽⁺⁾/StuCDPK1 para sobreexpresar individualmente la proteína con un His-tag en su N-terminal [120, 121]. Todas las secuencias fueron confirmadas por la Universidad de Chicago DNA Sequencing Facility (Chicago, IL, Estados Unidos).

En las Tablas 1 y 2 se resumen todas las construcciones que permitieron expresar las proteínas recombinantes utilizadas en esta tesis, tanto de las ADPGlcPPasas como de las quinasas de plantas, respectivamente.

Tabla 1: Construcciones de expresión de las proteínas recombinantes de las ADPGlcPPasas

Gen	Vector inicial	Sitios en vector inicial	Vector final	Sitios en vector final	Construcción final	Versión recombinante	Observación
TaeS	Sintetizado de novo	NdeI/SacI	pET28c	NdeI/SacI	pET28c/TaeS	TaeS	His-tag
TaeL	Sintetizado de novo	NdeI/SacI	pET28c	NdeI/SacI	pET28c/TaeS	TaeL	His-tag
TaeS	pET28c/TaeS	NdeI/SacI	pCDFDuet	NdeI/XhoI	pCDFDuet/TaeS	TaeS	Sin tag
TaeS	pET28c/TaeS	NdeI/SacI	pET19TEV	NdeI/XhoI	pET19TEV/TaeS	TaeS	His-tag
TaeL	pET28c/TaeL	NdeI/SacI	pET19TEV	NdeI/XhoI	pET19TEV/TaeL	TaeL	His-tag
StuS	pML10/StuS	NdeI/SacI	pET28c	NdeI/SacI	pET28c/StuS	StuS	His-tag
StuL	pMON17336/StuL	NdeI/SacI	pET28c	NdeI/SacI	pET28c/StuL	StuL	His-tag
StuS	pET28c/StuS	NdeI/SacI	pCDFDuet	NdeI/XhoI	pCDFDuet/StuS	StuS	Sin tag

Tabla 2: Construcciones de expresión de las quinasas recombinantes de plantas.

Gen	Vector inicial	Vector	Construcción	Versión recombinante	Observación
AthSnRK1 α 1	Extraído de fuente	pETDuet	pETDuet/AthSnRK1 α 1	SnRK1 α 1	His-tag y mutación S198D
MdoSOS2	Sintetizado de novo	pET28b	pET28b/MdoSOS2	SOS2	His-tag y mutación T168D
StuCDPK1	Extraído de fuente	pET22 ⁽⁺⁾	pET22 ⁽⁺⁾ /StuCDPK	CDPK1	His-tag

3.4.10 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Para expresar las proteínas recombinantes, se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3), *Codon Plus* o *Shuffle*, con las construcciones correspondientes utilizando el método de transformación por CaCl₂.

Para obtener las versiones recombinantes de *TaeS*, *TaeL* y *TaeS/TaeL*, utilizadas para los ensayos de fosforilación, células de BL21(DE3) fueron transformadas con las construcciones [pET19TEV/*TaeS*], [pET19TEV/*TaeL*] y cotransformadas con [pCDFDuet/*TaeS* + pET19TEV/*TaeL*], respectivamente. Para obtener las versiones recombinantes utilizadas para los ensayos de caracterización cinética y regulatoria, células de BL21(DE3) fueron transformadas con las construcciones [pET28c/*TaeS*], [pET28c/*TaeL*], [pET28c/*StuS*], [pET28c/*StuL*] para obtener las subunidades de *TaeS*, *TaeL*, *StuS* y *StuL*, respectivamente; y co-transformadas con [pCDFDuet/*TaeS* + pET28c/*TaeL*], [pCDFDuet/*StuS* + pET28c/*StuL*], [pCDFDuet/*TaeS* + pET28c/*StuL*] y [pCDFDuet/*StuS* + pET28c/*TaeL*], para obtener los heterotetrámeros *TaeS/TaeL*, *StuS/StuL*; y las combinaciones híbridas *TaeS/StuL* y *StuS/TaeL*, respectivamente. La quinasa *AthSnRK1α1* recombinante fue obtenida a partir de células de *E. coli* BL21 *Shuffle* transformadas con [pETDuet/*AthSnRK1α1*]; la quinasa *MdoSOS2* fue obtenida a partir de células de *E. coli* BL21 *Codon Plus* transformadas con [pET28b/*MdoSOS2*] and la quinasa *StuCDPK* fue obtenida a partir de células de *E. coli* BL21 *Shuffle* transformadas con [pET22⁽⁺⁾/*StuCDPK1*]. Las células transformadas fueron crecidas en 1 l de medio LB suplementado con una cantidad apropiada de antibiótico (100 µg/ml ampicilina para pET19TEV, pET22⁽⁺⁾ y pETDuet; 50 µg/ml kanamicina para pET28b y 100 µg/ml spectinomycin para pCDFDuet) a 37 °C y bajo agitación a 200 rpm hasta que la OD_{600nm} alcance ~1.2. Las células fueron inducidas con 0,5 mM isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 25 °C y 180 rpm durante 16 h. Luego de la inducción, las células fueron cosechadas por centrifugación durante 10 min a 4 °C y 5.000 x g y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Debido a que las proteínas recombinantes se expresaron como proteínas de fusión a un His-tag en el extremo N-terminal de las mismas y que para el caso de co-expresiones heterotéricas, una de las dos proteínas no poseía esta etiqueta (Tabla 1), la purificación de las mismas se realizó por cromatografía de afinidad por metal inmovilizado con Ni²⁺ (IMAC). En cada caso, las células se resuspendieron en una cantidad adecuada de *buffer* de equilibrado (*buffer* A) [TRIS-HCl 25 mM pH 8,0; NaCl 300 mM; Imidazol 10 mM] y se rompieron por sonicado con un procesador ultrasónico de alta intensidad VibraCell™ VCX 130 (Sonics). La suspensión resultante se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min a 4 °C para separar la fracción soluble de los detritos celulares y el resto de los componentes insolubles. La fracción soluble se sembró en una columna de 1 ml His-TRAP

(GE Healthcare) previamente equilibrada con *buffer* A. Finalizada la siembra, la columna se lavó con *buffer* A y luego para la elución de las proteínas retenidas se realizaron lavados con concentraciones crecientes de imidazol (30, 70, y 300 mM) en *buffer* A. A las fracciones que contenían la proteína con mayor grado de pureza se las concentró y cambió el *buffer* para su conservación [MOPS pH 8 50 mM, MgCl₂ 5 mM, sacarosa 10% p/v]. Se fraccionaron pequeñas alícuotas y se conservaron a -80 °C. Las proteínas así conservadas mantuvieron su actividad biológica al menos durante 1 año.

3.4.11 Tratamiento con proteasa TEV y pospurificación IDA-Ni²⁺

Para retirar la etiqueta His-tag de las proteínas expresadas a partir del vector pET19TEV, 400 µg de proteína purificada fueron incubados con 4 µg de la proteasa TEV (expresada y purificada en nuestro grupo de trabajo), en un volumen final de 1 ml de *buffer* [TRIS-HCl 25 mM pH 8,0; NaCl 300 mM; Imidazol 10 mM; DTT 1 mM]. La mezcla se incubó *overnight* a 4 °C en agitación. Posteriormente se le adicionó 100 µl de resina IDA-Ni²⁺, se incubó durante 1 h a 4 °C en agitación y se retiró el sobrenadante. Esta fracción se concentró a 500 µl finales y se conservó a -80 °C. Para corroborar que el corte y que incluso la pospurificación fue efectiva, cada una de las fracciones fueron corridas electroforéticamente mediante SDS-PAGE con reductor.

3.5 Metodología de análisis enzimático

3.5.1 Medida de la actividad de la ADPGlcPPasa

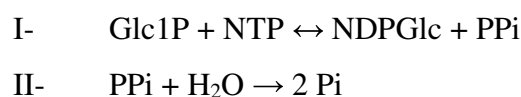
La reacción catalizada por la ADPGlcPPasa es reversible y dependiente del metal Mg²⁺:



La determinación de la actividad enzimática para la ADPGlcPPasa se realizó en el sentido de síntesis de ADPGlc, empleando los métodos que se detallan a continuación. En todos los casos, una unidad (U) de actividad enzimática es definida como la cantidad de enzima que cataliza la síntesis de 1 µmol de producto por min, en las condiciones especificadas.

3.5.1.1 Método colorimétrico.

Este método fue desarrollado en nuestro laboratorio [122]. El método se basa en la cuantificación de Pi mediante una reacción de color con el complejo de Verde de Malaquita-molibdato de amonio. El Pi medido es generado a expensas de la reacción acoplada de la hidrólisis enzimática de PPi, producto de la reacción de síntesis de NDPGlc [122]. Las reacciones acopladas del método son:



La medida de actividad se realizó a 37 °C en un volumen final de 50 µl, donde la mezcla de reacción estándar contiene: MOPS 100 mM pH 8, MgCl₂ 10 mM, BSA 0,2 mg/ml, 0,5 U/ml de pirofosfatasa inorgánica de levadura (pirofosfato:fosfohidrolasa, EC 3.6.1.1, obtenida en nuestro laboratorio [123]), ATP y la muestra en una dilución adecuada. El ensayo se inició con el agregado de Glc1P y se realizó durante el tiempo necesario para obtener una señal adecuada, usualmente 10 min, sin alcanzar el consumo de sustratos mayor al 5%. La reacción se detuvo con la adición de 375 µl del reactivo de color, seguido del agregado de 50 µl de citrato de sodio 34% (p/v). Una alícuota de 250 µl de esta mezcla se dispensó en policubetas de ELISA y se determinó la absorbancia a 630 nm en un lector de ELISA *Microplate photometer Multiskan Ascent* (Thermo Scientific). Paralelamente a la determinación, se estableció una curva de calibrado con testigos de PPI y se obtuvo el factor de conversión de DO a nmoles. El reactivo de color se preparó mezclando 3 volúmenes de Verde de Malaquita (Sigma) al 0,045% (p/v) y 1 volumen de molibdato de amonio 4,2% (p/v) en HCl 5 N. Luego de homogenizar durante 30 min y filtrar, a 5 ml de la solución obtenida se le adicionaron 100 µl de Tween 20 al 2% (v/v).

3.5.1.2 Método radioquímico

La síntesis de ADP-[¹⁴C]Glc a partir de [¹⁴C]Glc1P y ATP fue medida de acuerdo al protocolo previamente establecido [124]. Este método se basa en acoplar la reacción de la glucógeno sintasa de *E. coli* a la reacción de la ADPGlcPPasa en estudio. De este modo, se puede cuantificar la radiactividad incorporada al glucógeno a expensas de la ADP-[¹⁴C]Glc. Posteriormente, el glucógeno puede separarse de la mezcla de reacción por precipitación selectiva. La reacción se realizó en un volumen de 200 µl, con una mezcla compuesta por *buffer* MOPS 50 mM pH 8,0; MgCl₂ 10 mM; [¹⁴C]Glc1P 1 mM (800 a 1.000 cpm/nmol), ATP 2 mM; pirofosfatasa inorgánica 0,5 U/ml y BSA 0,2 mg/ml, además del agregado de una dilución adecuada de la ADPGlcPPasa en estudio. Luego de 10 min de reacción a 37 °C se detuvo la reacción por calentamiento en un baño de agua hirviendo durante 1 min. A continuación, se agregaron 100 µl de una solución conteniendo 0,5 mg de glucógeno de hígado de conejo (Tipo IX, Sigma), *buffer* MOPS 50 mM pH 8,0 y 0,1 U de glucógeno sintasa de *E. coli*, y se incubó a 37 °C durante 1 h. El [¹⁴C]glucógeno formado se precipitó mediante el agregado de 100 µl de una solución de glucógeno de ostra (Tipo III, Sigma) 10 mg/ml como agente de arrastre, seguido de 2 ml de una solución de KCl 1% (p/v) en metanol 75% (v/v). La mezcla se incubó en hielo por 5 min para favorecer la precipitación del polisacárido y se centrifuga a 1.000 x g durante 3 min. Se descarta el sobrenadante y el glucógeno precipitado se redisuelve en 200 µl de agua y se vuelve a precipitar, de igual manera que en el paso anterior. Al último precipitado se lo lava con una mezcla de solución KCl 1% (p/v) en metanol 75% (v/v), se lo

redissuelve con 1 ml de agua y se mide la radioactividad de una alícuota (500 μ l), acondicionada convenientemente con cóctel de centelleo para soluciones líquidas OptiPhase 'HISAFE' 3 (PERKIN-Elmer). La radioactividad de las muestras se midió en un contador de centelleo *WinSpectral-1414* (PERKIN-ElmerTM). La relación nmol/cpm se realizó midiendo testigos de concentraciones establecidas de [¹⁴C]Glc1P y a partir de la radioactividad específica de la solución utilizada como sustrato se calculan los nmoles de ADP-[¹⁴C]Glc producidos en la reacción.

3.5.1.3 Método cinético con enzimas acopladas

Las reacciones acopladas del método son:

- I- $\text{Glc1P} + \text{ADP} \leftrightarrow \text{ADPGlc} + \text{PPi}$
- II- $\text{ADPGlc} + \text{Glucógeno}_{(n)} \rightarrow \text{ADP} + \text{Glucógeno}_{(n+1)}$
- III- $\text{ADP} + \text{PEP} \rightarrow \text{Piruvato} + \text{ATP}$
- IV- $\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Lactato} + \text{NAD}^+$

Este método consiste en acoplar 3 enzimas a la reacción catalizada por la ADGlcPPasa (reacción I). Básicamente, la glucógeno sintasa (reacción II) utiliza el ADPGlc, generado por la ADPGlcPPasa, adicionando Glc a una cadena creciente de glucógeno y liberando ADP. Este nucleótido di-fosfato es utilizado por una segunda enzima, la piruvato quinasa (reacción III), que en presencia de PEP genera ATP y piruvato. Este último es utilizado por la lactato deshidrogenasa (reacción IV) que genera lactato a expensas de NADH, produciendo NAD⁺. El consumo de NADH es detectado espectrofotométricamente a 340 nm. La medida de actividad se realizó a 37 °C en un volumen final de 50 μ l, donde la mezcla de reacción estándar contiene: MOPS 100 mM pH 8; MgCl₂ 10 mM; BSA 0,2 mg/ml, 0,3 mM de PEP, 0,3 mM de NADH, 1 mg/ml de glucógeno de hígado de conejo (Tipo IX, Sigma), 0,8 mU/ml de glucógeno sintasa (GlgA) de *E. coli*, 0,15 U/ μ l de piruvato quinasa, 0,02 U/ μ l de lactato deshidrogenasa, ATP y la muestra en una dilución adecuada. El ensayo se inició con el agregado de Glc1P y se siguió la lectura a 340 nm en espectrofotómetro ELISA *Microplate photometer Multiskan Ascent* (Thermo Scientific) durante 10 min, sin alcanzar el consumo de sustratos mayor al 5%. A partir de la pendiente del cambio de absorbancia en el tiempo se obtuvieron los μ moles de producto obtenido.

3.5.2 Determinación de los parámetros cinéticos

Para determinar los parámetros cinéticos V_{max} y $S_{0,5}$ (siendo este último la concentración de sustrato que produce el 50% de la velocidad máxima, V_{max}) de las enzimas en estudio se realizaron curvas de saturación de actividad enzimática en presencia de una concentración fija de uno de los sustratos y concentraciones variables del sustrato analizado. Para determinar las constantes cinéticas, $A_{0,5}$ e $I_{0,5}$ (concentración de efector que produce el 50% de la máxima activación o

inhibición, respectivamente), se ensayaron distintas concentraciones de efectores en condiciones saturantes para los sustratos. Los datos cinéticos obtenidos se graficaron como velocidad inicial en U/mg, versus la concentración del sustrato variable en mM. Los parámetros cinéticos fueron calculados mediante ajuste por regresión no lineal utilizando la ecuación de Hill y el programa informático Origin™ 7.0. Los valores obtenidos implican un promedio de un mínimo de tres determinaciones independientes que fueran reproducibles dentro de un marco de variación de $\pm 10\%$.

Se evaluó la relación $V_{\max}/S_{0,5}$ que es una medida análoga a V_{\max}/K_m en cinéticas hiperbólicas y que, a su vez, determina la eficiencia catalítica de la enzima que es definida como k_{cat}/K_m [125, 126].

3.5.3 Metodología utilizada en ensayos de óxido-reducción

Los ensayos de oxidación-reducción tienen como finalidad evaluar el efecto de compuestos oxidantes y reductores sobre la actividad de las enzimas, para inferir, de esta forma, su posible regulación postraduccional *in vivo* por mecanismos redox. Para evaluar el efecto de agentes oxidante o reductores sobre la actividad de la enzima, se pre-incubó una alícuota de enzima en presencia de un compuesto oxidante como la diamida o de un compuesto reductor como el ditiotreitól (DTT). El medio de reacción utilizado tenía una concentración de 0,05 mM de enzima, una concentración adecuada de agente redox (de 0 hasta 200 veces más) y *buffer* MOPS 100 mM pH 8,0. Luego de 15 min de pre-incubación a 25 °C se tomó una alícuota de la mezcla, se diluyó apropiadamente con el mismo *buffer* de reacción pero sin agente redox y se midió la actividad remanente de la enzima en sentido de síntesis de ADPGlc tal como se indica en la sección 3.5.1.1.

3.5.4 Ensayos de estabilidad térmica

La estabilidad frente al aumento de temperatura de las proteínas recombinantes purificadas se midió colocando una dilución adecuada de las mismas para dar la misma concentración final de proteína (~ 2 mg / ml). Luego, 50 μ l de cada proteína se colocaron en cinco tubos de microcentrífuga y luego se incubaron a 4, 25, 37, 42 y 55 °C durante 5 min. Luego de este tiempo, las muestras se colocaron inmediatamente en hielo durante 2 min, se centrifugaron a $20.000 \times g$ durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se diluyó con *buffer* adecuado [50 mM de MOPS pH 8,0; 5 mM de MgCl_2 , 0,1 mM de EDTA; 0,5 mg/ml de BSA]. La actividad se determinó por duplicado tal como se detalla en la sección 3.5.1.1.

Para el caso de la evaluación de la estabilidad térmica en presencia de efectores, se realizó la incubación a 4 y 50 °C durante 5 min, de las muestras de proteínas a la misma concentración anteriormente indicada, pero en presencia de 5 mM de cada uno de los efectores evaluados. Luego de este tiempo, las muestras se colocaron inmediatamente en hielo durante 2 min, se centrifugaron

a 20.000 × g durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se diluyó con *buffer* adecuado [50 mM de MOPS pH 8,0; 5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de EDTA; 0,5 mg/ml de BSA]. La actividad se determinó por duplicado tal como se detalla en la sección 3.5.1.3.

3.6 Metodología utilizada para el procesamiento de muestras

3.6.1 Material vegetal

Las plantas de trigo (*Triticum aestivum*) fueron cultivadas en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fe) desde el 11 de octubre hasta el 4 de noviembre de 2013 y 2016. La fecha de la antesis se registró cuando la primera antera aparece por encima de las glumas en la región central de la espiga. Las muestras fueron recolectadas a los 3, 6, 10, 14, 17 y 27 días posteriores a la antesis (DPA). Luego de la recolección, las espigas fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras de semillas consistieron en los granos recolectados de la región central de 120 espigas para cada uno de los DPA, los cuales fueron almacenados a -80°C hasta su posterior utilización.

Las semillas de ricino (*Ricinus communis*) se recolectaron en el predio del Campus Universitario de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina) en 2013 y 2016, y se cosecharon en varias etapas de desarrollo como se describió anteriormente [127]. Las semillas recolectadas se diseccionaron de la cápsula y se separaron en 6 grupos definidos por su etapa en el desarrollo como 5, 10, 20, 25, 35 y 50 días posteriores a la polinización (DPP); y fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

En ambos casos, se utilizaron semillas no congeladas para determinaciones de peso fresco, almidón y triacilglicerol (TAG). Las determinaciones se realizaron para las dos cosechas y los valores representados corresponden al promedio de las dos réplicas biológicas.

3.6.2 Extracción de proteínas totales a partir de extractos crudos

Para la obtención de los extractos de proteínas totales de endosperma, 200 mg de semillas de trigo inmaduras separadas del tegumento (conservados a -80 °C) se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. Luego se adicionó 200 µl de *buffer* de extracción de quinasas [MOPS 50 mM pH 7,5; EDTA 1 mM, EGTA 1 mM; NaF 20 mM; Tritón X-100 0,1% (v/v); glicerol 20% (v/v); MgCl₂ 5 mM; DTT 1 mM; PEG-8000 4% (p/v); PMSF 2 mM; poli(vinil-pipirrolidona) 1% (p/v)] [128] al que también se le adicionó inhibidores de proteasas [Ácido aminocaproico 2 mM; benzamidina 1 mM; Na₂MoO₄ 1 mM; Na₂VO₄ 1 mM y *Protease Inhibitor Cocktail Set III 1X* (Merck)]. Se incubó por 10 min en hielo y se centrifugó durante 15 min a 16.000 x g a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y el mismo se conservó a -80 °C hasta su utilización.

3.6.3 Extracción desnaturalizante de proteínas totales

Para la obtención de los extractos de endosperma en condiciones desnaturalizantes, 20 mg de semillas de trigo inmaduras separadas del tegumento (conservados a -80°C) se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. Luego se adicionó 200 μl de *buffer* de siembra para SDS-PAGE 4X [SDS 1% (p/v), β -ME 100 mM, en TRIS-HCl 50 mM pH 6,8] y las muestras se hirvieron durante 5 min. Éstas se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y posteriormente se realizó una electrotransferencia seguida de inmunodetección tal como se describe en el punto 3.3.6.

3.6.4 Extracción y cuantificación de almidón

La determinación de la cantidad de almidón contenido en las semillas se realizó combinando y adaptando los protocolos descritos por [129] y [130]. Para cada muestra, 100 mg de tejido triturado en un mortero con nitrógeno líquido se extrajeron con 500 μl de etanol 95% a 4°C . Luego se centrifugó a $15.000 \times g$ a 4°C durante 10 min, se descartó el sobrenadante, y se repitió el paso de extracción 3 veces más para eliminar los azúcares solubles presentes en las muestras. La fracción insoluble, fue secada en estufa a 60°C y pesada en un tubo previamente tarado. El extracto seco se resuspendió en 10 μl de H_2O destilada por cada mg de material extraído, luego los tubos se taparon herméticamente y se hirvieron durante 1 h para solubilizar el almidón. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a $15.000 \times g$ durante 10 min y el sobrenadante se utilizó para realizar la digestión enzimática del almidón. A 20 μl de los sobrenadantes diluidos (1/20 para trigo y 1/10 para ricino) se le agregaron 200 μl de *buffer* 100 mM acetato de sodio pH 4,5 y 1U de amiloglucosidasa [1,4 α -D glucan glucohydrolase Exo-1,4 α - glucosidase, (Sigma, 10113)]. Las muestras se incubaron 16 h a 55°C para permitir la degradación del almidón. Luego, los tubos se centrifugaron a $15.000 \times g$ durante 10 min, se recuperó la fracción soluble y se cuantificaron los residuos de azúcares solubles mediante la reacción de la glucosa oxidasa, que genera peróxido de hidrógeno durante la oxidación. Este último fue cuantificado colorimétricamente por acción de la peroxidasa acoplada a un compuesto coloreado (Wiener lab). La mezcla de reacción consistió en una alícuota (30 μl) de muestra diluida convenientemente se adicionó a 70 μl del reactivo comercial (solución de 10 kU/l glucosa oxidasa; 1 kU/l peroxidasa; 0,5 mM 4-aminofenazona; *buffer* 100 mM fosfatos pH 7.0 y 12 mM 4-hidroxibenzoatos). La reacción se incubó 10 min a 37°C y se cuantificó la absorbancia a 492 nm en espectrofotómetro junto al blanco de reactivos correspondiente a la determinación. Para poder correlacionar la cantidad de almidón con la determinación de la concentración de azúcares solubles liberados durante la digestión enzimática del almidón, se construyó una curva de

calibración [glucosa (mg/ml) versus almidón (mg)] con una solución estándar de almidón tratada de la misma manera que la muestra.

3.6.5 Extracción y cuantificación de TAG

La extracción de TAG se realizó según lo descrito por [131]. El tejido vegetal (200 mg) fue triturado en nitrógeno líquido y los lípidos se extrajeron con 0,2 ml de H₂O destilada y 3,8 ml de mezcla de extracción compuesta por cloroformo/metanol: 2/1 (v/v). Los tubos se cerraron herméticamente y se dejaron reposar 2 h a temperatura ambiente, mezclando suavemente cada 30 min. Posteriormente, las muestras se filtraron utilizando papel de filtro libre de grasas previamente lavado con la mezcla de extracción. Las muestras se transfirieron a tubos previamente pesados y se mezclaron vigorosamente con 0,7 ml de solución de CaCl₂ al 0,02% (p/v) en una mezcla de cloroformo/metanol/H₂O: 3/48/47 (v/v) y se centrifugaron durante 5 min a 3.000 x g hasta separación de las fases. La fase superior se desechó y se agregó a cada tubo 0,7 ml de solución cloroformo/metanol/H₂O: 3/48/47 (v/v). Las muestras se mezclaron vigorosamente y centrifugaron durante 5 min a 3.000 x g hasta separación de las fases. La fase superior se desechó. Posteriormente, los tubos se incubaron en baño térmico a 45-50 °C para evaporación total del cloroformo y obtención de los lípidos. Cada tubo fue pesado y por diferencia de peso con los tubos vacíos, se determinó el peso de los lípidos obtenidos. Todas las muestras se disolvieron con isopropanol a una concentración final de 1 mg/μl. Posteriormente, los TAG se cuantificaron mediante un ensayo enzimático colorimétrico. Los TAG se digirieron mediante una lipasa comercial y el glicerol resultante se fosforiló a glicerol-3P mediante una quinasa específica y luego se oxidó con una glicerol-3P oxidasa que produce H₂O₂. Este último producto se cuantificó colorimétricamente por acción de una peroxidasa acoplada a un compuesto coloreado (Wiener Lab). La mezcla de reacción (505 μl) consistió en 500 μl del reactivo comercial [Pipes 50 mM pH 7,5 con 5 mM de 4-clorofenol, en presencia de lipoprotein lipasa (>15 U/ml), Gro quinasa (>1 U/ml), Gro-P oxidasa (>2,5 U/ml), peroxidasa (>0,44 U/ml), 0,7 mmol/l de 4-aminofenazona y 0,18 μmol/ml de ATP] y 5 μl de muestra diluída convenientemente. Además, se realizó un blanco de reactivos y un testigo con una solución patrón (2,00 g/l de trioleína). Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 5 min y posteriormente se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 492 nm.

3.6.6 Purificación de la fracción de proteínas fosforiladas

Para purificar la fracción de proteínas fosforiladas a partir de los extractos crudos se siguió el protocolo descrito por [132]. Para cada una de las muestras se tomaron 1,2 mg de proteína y se llevaron a 0,6 ml finales con el mismo *buffer* de extracción. Luego se diluyó las muestras agregando 1,2 ml de *buffer* 50 mM MES-NaOH pH 6,0; para así acondicionarlas y luego cargarlas en la matriz.

Se agregaron 100 μ l de IDA-Fe⁺³ y se incubaron las muestras durante 40 min a 4 °C con homogenización constante. Las proteínas que no fueron retenidas por la matriz se eliminaron mediante 2 lavados con 5 volúmenes de *buffer* 50 mM MES-NaOH pH 6,0. La elusión de las proteínas retenidas se realizó en tres escalones aumentando el pH en cada uno de ellos. Se realizó una primera elusión con 5 volúmenes de *buffer* 50 mM PIPES pH 7,2; luego una elución con 100 μ l de *buffer* 50 mM Tris-HCl pH 8,0 y una última elución con 100 μ l de *buffer* 50 mM Tris-HCl pH 8,9.

Por otra parte, para evaluar si la interacción de las proteínas con la matriz de IDA-Fe³⁺ se debía específicamente a la fosforilación de las mismas, se realizó un ensayo de desfosforilación de las muestras y posterior purificación por IMAC-Fe⁺³. Se tomaron 600 μ g de proteínas a partir de los extractos proteicos totales y se diluyeron en 300 μ l de una solución de: 5 mM Tris-HCl pH 9,3; 0,1 mM MgCl₂; 0,01 mM ZnCl₂; 1 mM espermidina y 20 U de fosfatasa alcalina (Promega). Las muestras se incubaron a 37 °C durante 5-6 h y posteriormente se purificaron en una columna de IDA-Fe⁺³ tal como se describió anteriormente.

Luego de realizadas las cromatografías, tanto las eluciones a pH 8,0 y 8,9 se acondicionaron con *buffer* de muestra para SDS-PAGE 4X [SDS 1% (p/v), β -ME 100 mM, en TRIS-HCl 50 mM pH 6,8] y se resolvieron electroforéticamente, sembrando en cada calle el mismo volumen de muestra. Las proteínas en el gel de poliacrilamida se visualizaron por tinción con una solución de *Coomasie Blue R-250* o se revelaron específicamente por electrotransferencia seguida de inmunodetección.

La matriz de IDA-Fe⁺³ se preparó mezclando IDA-*fast flow* (GE Healthcare) con 50 mM FeCl₃. Luego de 30 min de incubación, se realizaron sucesivos lavados con H₂O miliQ, luego 1 lavado con 5 volúmenes de *buffer* 50 mM Tris-HCl pH 8,9 y seguidamente 2 lavados con 5 volúmenes de *buffer* 50 mM MES-NaOH pH 6,0. La resina así preparada se conservó al 50% (v/v) en *buffer* 50 mM MES-NaOH pH 6,0.

3.7 Metodología utilizada para ensayos de fosforilación

3.7.1 Reacción de fosforilación utilizando [³²P]- γ -ATP

Para identificar la familia de quinasas que fosforilan a la ADPGlcPPasa y cuál de sus subunidades es la que se fosforila, se evaluaron diferentes condiciones de fosforilación específicas para distintas familias de quinasas presentes en plantas y, además, distintas fuentes de quinasas. Las fuentes de quinasas utilizadas fueron: i) extractos de proteínas de semillas de trigo a los 17 DPA (obtenidos como se indica en la sección 3.6.2), ii) quinasas parcialmente purificadas (Q) a partir de estos mismos extractos (obtenidos siguiendo lo propuesto en la sección 3.7.4) y iii) quinasas de

plantas producidas de manera recombinante (sección 3.4.9 y 3.4.10). Las reacciones se realizaron con 2 µg de proteína, una concentración adecuada de fuentes de quinasas (5 µg de extracto de endosperma, ó 3,5 µg de Q, ó 2 µM de quinasas recombinante), 1 µCi/µl de [³²P]-γ-ATP (Perkin Elmer) y el *buffer* que corresponda según la familia de quinasas ensayada, cuyas composiciones se indican en la Tabla 3. Las reacciones se iniciaron con el agregado de la fuente de quinasas y se incubaron a 30°C durante 30 min. Para frenar la reacción se adicionó *buffer* de siembra para SDS-PAGE 4X en una proporción 1:3 y las muestras se hirvieron durante 5 min. Luego se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), y finalizada la corrida electroforética los geles se tiñeron con Azul de Coomassie. Los geles se secaron sobre papel absorbente en un secador de geles SAVANT Slab Gel SGD 2000 y la radiactividad incorporada fue detectada por exposición a una placa de *Storage Phosphor-Screen* (GE Healthcare) durante 1 hora. Terminado el tiempo de exposición la placa se escaneó con el sistema Typhoon™ (GE Healthcare).

Tabla 3: Condiciones de fosforilación para las distintas familias de quinasas.

Buffer para MdoSOS2 (Condición dependiente de Ca²⁺)	Buffer para StuCDPK	Buffer para AthSnRK1α1 (Condición independiente de Ca²⁺)
TRIS 20 mM pH 7,2 MgCl ₂ 5 mM MnCl ₂ 2,5 mM CaCl ₂ 0,5 mM DTT 2 mM ATP 0,01 mM Ref.: [133]	TRIS 20 mM pH 7,5 MgCl ₂ 10 mM DTT 5 mM CaCl ₂ 1 mM ATP 0,05 mM Ref.: [121]	TRIS 20 mM pH 7,2 DTT 5 mM MgCl ₂ 10 mM ATP 0,05 mM EGTA 0,5 mM Ref.: [134]

3.7.2 Ensayos de retrasos en la movilidad de proteínas fosforiladas utilizando Phos-tag™ SDS-PAGE

Para el ensayo de retraso en la movilidad de proteínas fosforiladas, se añadió Phos-tag™ (Wako Chemicals) al gel de acrilamida SDS-PAGE al 10% (p/v), según lo descrito por el fabricante (n° de cat. AAL-107; Wako Chemicals). La reacción de fosforilación se llevó a cabo según lo descrito en la sección 3.7.1, pero en ausencia de [³²P]-γ-ATP y modificando el tiempo de reacción a 2 h con la adición de la fuente de quinasas (y la cantidad correspondiente de *buffer* según el cambio de volumen final) cada 30 min. Luego de la reacción de fosforilación, las muestras fueron desnaturizadas antes de su siembra mediante el agregado de *buffer* de siembra SDS-PAGE 4X [SDS 1% (p/v), β-ME 100 mM, en TRIS-HCl 50 mM pH 6,8] y su posterior calentamiento a 95 °C durante 5 min. Finalizada la corrida electroforética a 30 mA por gel, el mismo se lavó dos veces en *buffer* de transferencia Tris-glicina que contenía 1 mM de EDTA, durante 10 min cada vez con agitación suave, seguido de 10 min en *buffer* de transferencia sin EDTA. Luego, las proteínas se

electrotransfirieron tal como se describe en la sección 3.3.6 de Materiales y Métodos, y posteriormente se le realizó la detección de la proteína de interés mediante inmunodetección con anticuerpos específicos.

4. Resultados

4.1 Caracterización de la *TaeADPGlcPPasa* recombinante

A partir de la década de 1970 se comenzó a desarrollar lo que conocemos como la “Tecnología del ADN recombinante”. Este desarrollo marcó un punto de inflexión en los estudios bioquímicos realizados con preparaciones enzimáticas. Hasta ese entonces, la única manera de obtener una proteína para su estudio era por purificación a partir de su fuente natural. En el caso de las enzimas, que funcionan como catalizadores biológicos de las reacciones bioquímicas, las concentraciones a las cuales se encuentran dentro de la célula son, en general, muy bajas. De hecho, una célula en su estado normal sólo sintetiza las cantidades que necesita de cada enzima a fin de cumplir con sus necesidades biológicas de manera coordinada y en el momento adecuado. En numerosos de estos casos, obtener preparaciones enzimáticas a partir de sus fuentes naturales implica partir de grandes cantidades de tejido (varios kilogramos) para obtener, por medio de varios pasos de purificación consecutivos, pequeñas cantidades de enzima. Además, a veces es compleja la obtención del tejido u organismo (o incluso pueden ser patógenos) a partir del cual se realiza la purificación. Así, el advenimiento de las técnicas de biología molecular permitió facilitar la obtención y purificación de enzimas (y de todo tipo de proteínas) de una manera metódica sin depender de su fuente natural.

El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante llevó aproximadamente una década y fue impulsada al mismo tiempo por varios grupos de investigación que aportaron información muy valiosa [135]. Esta tecnología tiene sus bases en hallazgos trascendentales merecieron la adjudicación de numerosos Premios Nobel:

- En Fisiología y Medicina: a Kornberg y Ochoa, por la dilucidación del mecanismo de replicación del ADN mediante la enzima ADN polimerasa (1959); a Watson, Crick y Wilkins, por el descubrimiento de la estructura del ADN (1962); a Holley, Khorana y Nirenberg por la interpretación del código genético y su función en la síntesis de proteínas (1968); a Arber, Nathans y Smith por el descubrimiento de enzimas de restricción que cortaban específicamente el ADN (1978).
- En Química: a Berg, Gilbert y Sanger, por el estudio de la bioquímica de los ácidos nucleicos, en especial el estudio del ADN híbrido y la determinación de la secuencia de los ácidos nucleicos (secuenciación) (1980); a Mullis y Smith, por el desarrollo de la técnica “PCR”, mediante la cual una secuencia de ADN determinada podía amplificarse de manera casi exponencial mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (1993).

Todos estos desarrollos nos permiten hoy en día diseñar sistemas de expresión heterólogos casi a medida, para obtener la proteína que nos interesa en el momento que deseamos, sin necesidad de contar (salvo para la obtención del material genético) con el tejido en el que naturalmente se encuentra. Además, el disponer de sistemas de expresión para obtener proteínas en forma recombinante, nos da la posibilidad de realizar cambios en la secuencia de aminoácidos de las enzimas si se realizan mutaciones sobre la secuencia de ADN que las codifica, pudiendo así estudiar la función que cumplen determinados aminoácidos en la actividad o regulación de la enzima. En el presente, la tecnología del ADN recombinante se convirtió en una técnica de rutina, que presenta numerosas variantes y una amplia gama de reactivos comerciales que nos permiten diseñar estratégicamente el clon recombinante productor de una enzima de interés.

Para poder estudiar regulación alostérica y postraducciona de la ADPGlcPPasa de endosperma de trigo (*TaeADPGlcPPasa*), la misma se produjo de manera recombinante a partir de los genes sintetizados *de novo* optimizando el uso de codones para su expresión en *E. coli*. La enzima purificada fue caracterizada cinética y regulatoriamente y a continuación se presentan los resultados obtenidos.

4.1.1 Caracterización cinética, regulatoria y estructural de la *TaeADPGlcPPasa*

En estudios previos, Ainsworth y col, aislaron los ADNc completos de las subunidades de la ADPGlcPPasa a partir de una biblioteca de ADNc de endosperma en desarrollo de trigo [136, 137]. El ADNc para la subunidad S tiene un marco de lectura que codifica para una proteína de 473 aminoácidos (52,1 kDa). La misma exhibe una elevada identidad con otras subunidades S de plantas (85% para la de arroz, 83% para la de Arabidopsis, 87% para la de cebada, 84% para la de maíz, 86% para la de papa y 90% para la de espinaca) y contiene elementos de secuencia conservados que representan los sitios de unión al sustrato y activador alostérico [136]. Por otro lado, el ADNc de la subunidad L, tiene un marco de lectura que codifica para una proteína de 522 aminoácidos (57,8 kDa) e incluye un péptido tránsito putativo de 62 aminoácidos (6,5 kDa) [137]. Ambos genes S y L de la *TaeADPGlcPPasa* fueron depositados en la base de datos UniProt, con los N° de acceso P30523 y P12299, respectivamente. A partir de sus secuencias aminoacídicas se sintetizaron *de novo* los genes que codifican para ambas subunidades, optimizando el uso de codones para su expresión en células de *E. coli*. Ambas subunidades tienen un 43% de identidad y 61% de similitud entre sí, tal como se observa en la Figura 10.

	(1)	1	10	20	30	40	50	62																																																							
TaeL	(1)	MSSMQFSSV	LPLEGKACV	SPVRRREGSACERLKVGDSSSIRHDR	ASR	RM	CN	GGRG	PAATGAQC																																																						
TaeS	(1)	-----MD	VPLASKTFP	SPSP	-----	-----	-----	SKREQCN	-VDG	GKSS	SKHA																																																				
Section 2																																																															
	(63)	63	70	80	90	100	110	124																																																							
TaeL	(63)	VLTSD	ASPADTLVLR	TSFRRNYADPNE	VAV	ILGGG	TGTQLF	PLT	STRAT	PAVPI	GGCYRLI																																																				
TaeS	(34)	DLNPHAN	-----	-----	-----	DSV	LG	ILGGG	AGTR	LYPLT	KKRAK	PAVPI	GGAN	YRLI																																																	
Section 3																																																															
	(125)	125	130	140	150	160	170	186																																																							
TaeL	(125)	DIPMSNCFNS	GIN	KIFVMTQFN	SASLNRH	THRTY	LGGGIN	FT	DGS	VEVLAAT	QMP	GFAAGW																																																			
TaeS	(78)	DIPVSNCLNS	IN	ISKIYVLTQ	FNSASLNRH	LSRAY	G	SNIGGY	KNE	GF	VEVLAAT	QQSE	-DNP	DW																																																	
Section 4																																																															
	(187)	187	200	210	220	230	248																																																								
TaeL	(186)	FRGTADAVR	KFIWVLE	EDYK	NKST	TEHI	LILSGDQ	LYRMDY	MELV	QKH	VD	DNADIT	LS	CA	FPV	G																																															
TaeS	(139)	FQGTADAVR	QYLWLF	EEHN	---	VMEY	LILAGD	HLYRMDY	EKFI	QAH	RE	TDADIT	VA	AL	PM	D																																															
Section 5																																																															
	(249)	249	260	270	280	290	300	310																																																							
TaeL	(248)	ESRASEY	GLVKF	DSS	GRV	QFSEKPKG	DD	LEAM	KV	VDTS	FT	NFAIDDP	PAKY	PYIASMG	VY	FK																																															
TaeS	(197)	ERATAE	AGL	MKI	DEE	GRIIE	FAEKPKGE	Q	L	KAM	M	VD	T	I	IL	GLDDARAKEM	PYIASMG	IYV	IS																																												
Section 6																																																															
	(311)	311	320	330	340	350	360	372																																																							
TaeL	(310)	RDVLLNLL	KSRYAELH	DFGSEIL	PRAL	HDHN	-VQAY	V	FD	YWEDIG	Q	SP	SD	AN	MAI	CEQP																																															
TaeS	(259)	KHVMLQLL	REQFP	GAN	DFGSEV	IP	GAT	ST	GMR	VQAY	LY	DG	YWEDIG	T	IA	F	Y	N	AN	L	G	I	T	K	K	P																																					
Section 7																																																															
	(373)	373	380	390	400	410	420	434																																																							
TaeL	(371)	-PKFE	FYDPKT	PFFTS	PRYL	PP	TK	SDKCR	L	KEAT	I	SH	GC	F	L	RECKI	EHS	I	G	V	RS	L	NSG	SE																																							
TaeS	(321)	IPDFS	FYDRSA	PIYT	QPRH	LP	PSK	VLDAD	V	TSV	I	GE	GC	V	L	N	CKI	H	S	V	V	L	R	S	C	I	S	E	G	A	I																																
Section 8																																																															
	(435)	435	440	450	460	470	480	496																																																							
TaeL	(432)	LKNAM	MMGAD	S	YETE	D	E	I	S	R	L	M	S	E	G	K	V	P	I	G	V	G	E	N	T	K	I	S	N	C	I	D	M	N	A	R	I	G	R	D	V	V	I	S	N	K	E	G	V	Q	E												
TaeS	(383)	I	E	D	T	L	L	M	G	A	D	Y	Y	E	T	E	A	D	K	K	L	L	A	E	K	G	G	I	P	I	G	I	G	K	N	S	H	I	K	R	A	I	I	D	K	N	A	R	I	G	D	N	V	M	I	I	N	V	D	N	V	Q	E
Section 9																																																															
	(497)	497	510	525																																																											
TaeL	(494)	ADRPE	EGY	I	R	S	G	I	V	V	I	Q	K	N	A	T	I	K	D	G	T	V																																									
TaeS	(445)	AARET	DGY	F	I	K	S	G	I	V	T	V	I	K	D	A	L	L	P	S	G	T	V																																								

Figura 10: Secuencia de aminoácidos de las subunidades S (*TaeS*) y L (*TaeL*) de la *TaeADPGlcPPasa* (43% de identidad y 61% de similitud entre ellas).

Para realizar la expresión de las proteínas recombinantes se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) con los plásmidos [pET28c/*TaeL*], [pET28c/*TaeS*] y [pET28c/*TaeL* + pCDFDuet/*TaeS*], que permitieron la expresión de las subunidades de la *TaeADPGlcPPasa* tanto de manera individual (*TaeS* y *TaeL*) como coexpresadas (*TaeL/TaeS*), siguiendo lo descrito en la sección 3.4.9 y 3.4.10 de Materiales y Métodos. En la Figura 11 se observa un esquema de la estrategia utilizada para obtener las diferentes versiones de la proteína.

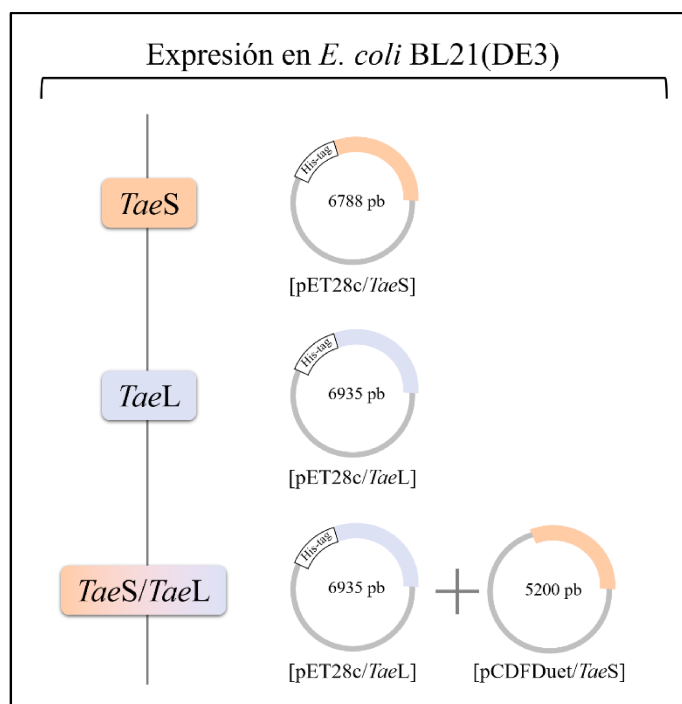


Figura 11: Construcciones utilizadas para la transformación de células de *E. coli* BL21(DE3) y la posterior expresión de las distintas versiones de la *TaeADPGlcPPasa*: de manera individual (*TaeS* y *TaeL*) y coexpresadas (*TaeL/TaeS*).

Habiendo observado que las tres versiones de la ADPGlcPPasa se expresaban en forma soluble, se continuó con el análisis de purificación y actividad biológica. Se realizaron cultivos de 2 l con el objetivo de purificar las enzimas por cromatografía IMAC-Ni²⁺ y obtener una cantidad que nos permita medir la actividad y evaluar su funcionalidad en ensayos de caracterización. Para purificar las proteínas, las células cosechadas fueron resuspendidas en *buffer A* en una proporción aproximada del 5% del volumen inicial y se lisaron por ultrasonido. Luego se separó la fracción soluble de la insoluble por centrifugación. La fracción soluble que contenía la proteína de interés se sembró en una columna His-Trap (GE Healthcare) de 1 ml cargada con Ni²⁺, previamente equilibrada con el mismo *buffer* y se continuó con la purificación según se indica en la sección 3.4.10 de Materiales y Métodos. Finalizada la corrida cromatográfica, se tomaron alícuotas de todas las fracciones recolectadas durante la misma y se visualizaron por electroforesis en un gel SDS-PAGE 10%. Aquellas fracciones donde se observó a la proteína de interés con mayor pureza y/o actividad enzimática se juntaron, se cambió el *buffer* a uno más adecuado para este tipo de enzimas y se concentraron. En la Figura 12-A.I se muestra cada versión proteica purificada convenientemente, con elevado grado de pureza (>90%) y homogeneidad electroforética. Para evaluar la funcionalidad de cada una de las versiones purificadas se les midió la actividad enzimática, detectando 4 U/mg para *TaeS/TaeL*, 0,2 U/mg para *TaeS* y <0,0001 U/mg para *TaeL*.

Las subunidades *TaeS* y *TaeL* recombinantes fueron utilizadas para inocular conejos, con el fin de obtener anticuerpos específicos para cada proteína. Estos se obtuvieron y se utilizaron en este trabajo de tesis (específicamente en la sección 4.2) y en la Figura 12-A.II y III se observa la especificidad de cada uno de ellos por sus subunidades. Cabe destacar que hasta el presente no se había informado sobre la expresión heteróloga tanto de las subunidades como del heterotetrámero de la *TaeADPGlcPPasa* con el propósito de obtener cantidades preparativas y con alto grado de pureza, útil para realizar estudios de caracterización cinética, estructural, regulatoria, y de modificaciones postraduccionales. Se procedió a la caracterización estructural y cinética de las versiones recombinantes, para evaluar si las mismas presentaban un comportamiento análogo al de la enzima purificada a partir de su fuente natural. Se determinó la estructura secundaria mediante cromatografía de filtración por gel (Figura 12-B). La subunidad L es un monómero de 66 kDa, la subunidad S forma homodímeros de 97 kDa y la versión completa *TaeS/TaeL* es heterotetramérica con 260 kDa.

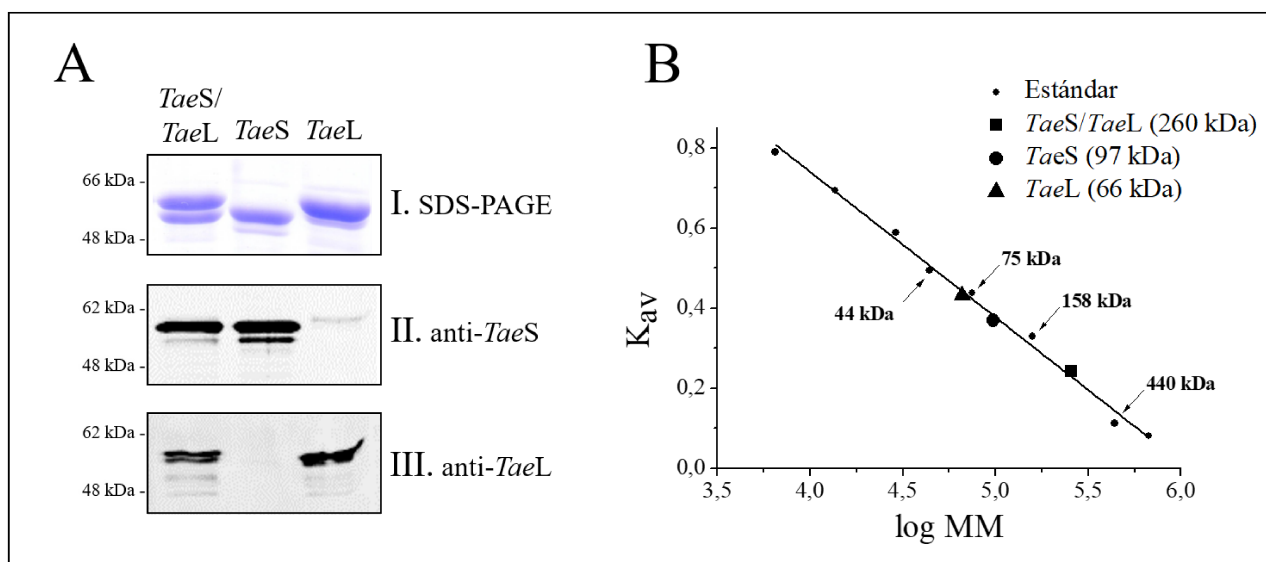


Figura 12: Determinación de la estructura de las diferentes subunidades de la *TaeADPGlcPPasa*: de manera individual (*TaeL* y *TaeS*) y coexpresadas (*TaeL/TaeS*). (A.I) Perfiles electroforéticos SDS-PAGE reductor con posterior electrotransferencia e inmunodetección con anticuerpos (A.II) anti-*TaeS* y (A.III) anti-*TaeL*. (B) Determinación de la masa molecular por cromatografía de filtración por gel.

La ADPGlcPPasa cataliza *in vivo* la síntesis de ADPGlc y PPI a partir de ATP y Glc1P, en una reacción que (si bien *in vitro* es reversible) se ve favorecida en tal sentido por la rápida utilización del nucleótido-azúcar y la actividad de pirofosfatasas que hidrolizan el PPI [30, 70]. De esta forma, la principal función de la enzima es la de generar el dador de restos glucosídicos utilizados en el camino de síntesis de almidón en algas verdes y plantas superiores [30]. Es por ello que los parámetros cinéticos se evaluaron en la dirección de síntesis de ADPGlc. Estas mediciones

fueron realizadas utilizando un método colorimétrico de alta sensibilidad tal como se describe en la sección 3.5.1.1 de Materiales y Métodos. Las medidas de actividad de las distintas formas de la enzima producidas con alto grado de pureza mostraron que *TaeS/TaeL* fue la versión con mayor actividad enzimática específica, siendo la misma de ~6 U/mg, en comparación con la del homodímero *TaeS* que fue 15 veces menor. Por su parte, *TaeL* resultó ser inactivo en las condiciones de ensayo.

Se realizaron curvas de saturación para los sustratos de la enzima, Glc1P y ATP, variando la concentración del sustrato en estudio y fijando el otro en concentraciones saturantes. Estas curvas también fueron evaluadas en presencia del principal activador informado para estas enzimas, el 3PGA [30], las cuales se muestran en la Figura 13. Los valores obtenidos para los parámetros cinéticos de cada versión recombinante se resumen en la Tabla 4. Además, se realizaron curvas de activación para el 3PGA que se representan en la Figura 14.

Los parámetros cinéticos para el heterotetrámero *TaeS/TaeL* son similares (en cuanto al orden de magnitud) a los previamente informados para la *TaeADPGlcPPasa* purificada de fuente [73] y muestra que ésta es la forma con mayor eficiencia catalítica, tanto por los valores de V_{\max} como por mostrar una mayor afinidad por los sustratos (Tabla 4). *TaeS/TaeL* mostró insensibilidad al 3PGA en cuanto a su V_{\max} , lo que también está de acuerdo con lo informado para la enzima purificada a partir del endosperma de trigo. Sin embargo, la presencia de 5 mM 3PGA en el medio de ensayo aumenta al doble la afinidad aparente de la enzima heterotetramérica por la Glc1P, afectando la sigmoidicidad de la curva de saturación para este sustrato y aumentando la eficiencia catalítica (Tabla 4 y Figura 13). Por otra parte, este metabolito resultó un activador de *TaeS*, produciendo un aumento de ~3 veces en la V_{\max} del homodímero. Vale destacar que estos resultados muestran que, aunque *TaeL* es una subunidad que carece de funcionalidad catalítica, la misma contribuye en la formación del heterotetrámero, aumentando la eficiencia catalítica y generando insensibilidad al 3PGA respecto a las propiedades exhibidas por *TaeS*. Más adelante se profundizará sobre el rol de esta subunidad en la formación, funcionalidad y regulación del heterotetrámero (sección 4.1.2).

Tabla 4: Parámetros cinéticos para los sustratos, Glc1P y ATP, de *TaeL/TaeS*, *TaeS* y *TaeL* en presencia y en ausencia de 3PGA (5 mM).

	Sustrato	$S_{0,5}$ (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)	n_H	$V_{m\acute{a}x}/S_{0,5}$ (U.mg ⁻¹ .mM ⁻¹)
<i>TaeS/TaeL</i>	Glc1P	0,16 ± 0,01	4,1 ± 0,2	2,8	25,6
	Glc1P + 3PGA	0,083 ± 0,006	3,6 ± 0,2	1,3	43,4
	ATP	0,32 ± 0,05	5,6 ± 0,5	0,9	17,5
	ATP + 3PGA	0,18 ± 0,04	4,5 ± 0,4	0,9	25
<i>TaeS</i>	Glc1P	> 15	> 0,14	-	-
	Glc1P + 3PGA	> 15	> 0,18	-	-
	ATP	2,6 ± 0,2	0,099 ± 0,005	1,1	0,04
	ATP + 3PGA	2,2 ± 0,2	0,27 ± 0,05	1,7	0,12

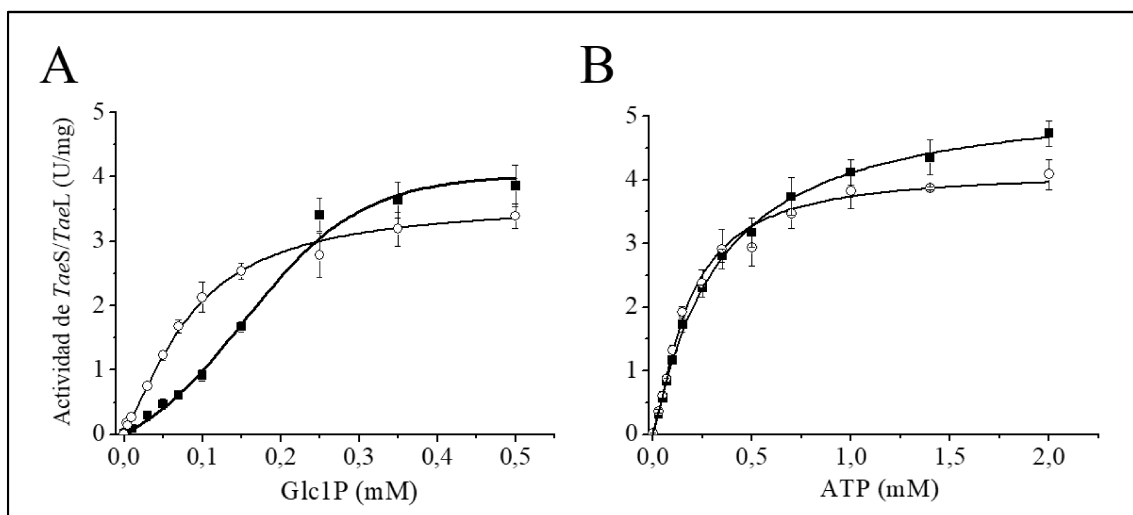


Figura 13: Curvas de saturación de ambos sustratos, Glc1P (A) y ATP (B), para *TaeS/TaeL* en presencia (círculos blancos) y en ausencia (cuadrados negros) de 3PGA (5 mM).

Se realizaron curvas de activación con 3PGA tanto para *TaeS/TaeL* como para *TaeS*. En la Figura 14 se presentan los resultados en actividad relativa y, claramente, se observa que el heterotetrámero resultó insensible, mientras que el homodímero *TaeS* fue activado hasta 3,5 veces en presencia de 3PGA (en condiciones reductoras), siendo su $A_{0,5}$ de 4 mM.

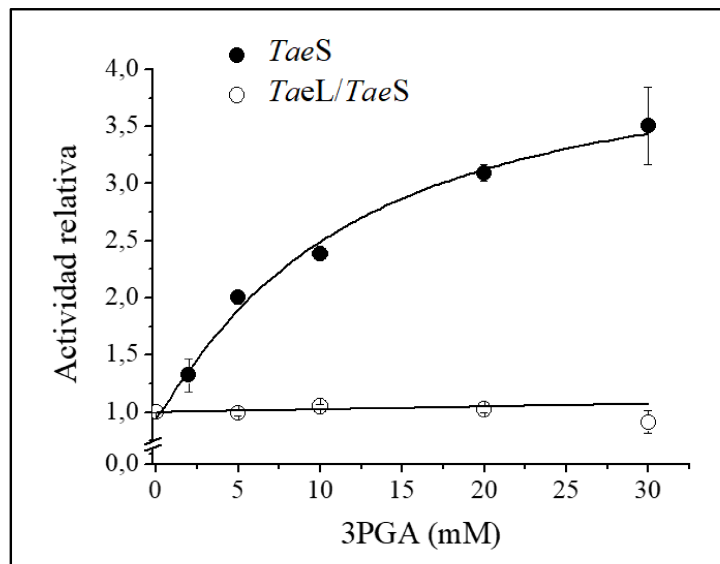


Figura 14: Curvas de activación por 3PGA para las versiones *TaeL/TaeS* (círculos blancos) y *TaeS* (círculos negros) en condiciones reductoras y saturantes para ambos sustratos (2 mM de Glc1P y de ATP).

Para complementar los estudios respecto a las propiedades de regulación de *TaeS/TaeL* (que sumen a su insensibilidad al 3PGA) evaluamos el efecto de otros metabolitos relacionados al escenario metabólico, ensayando específicamente la actividad de la enzima en presencia de concentraciones crecientes de Fru6P, piruvato, Glc6P, FBP o PEP. Como puede observarse en la Figura 15, la actividad de *TaeS/TaeL* no fue modificada por el agregado de Glc6P, Fru6P o piruvato; mientras que efectores como FBP y PEP la inhibieron hasta 8 veces con respecto a su actividad basal. Los $I_{0,5}$ fueron >13 mM tanto para el FBP como para el PEP, lo que sugiere que los mismos no tendrían relevancia como inhibidores en condiciones fisiológicas.

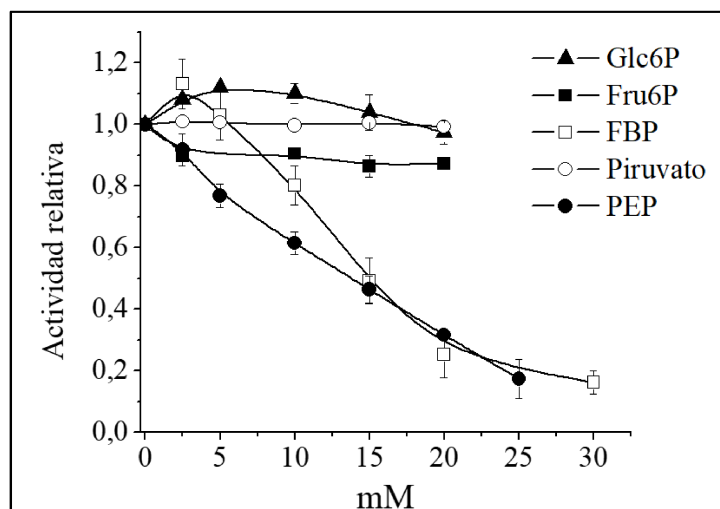


Figura 15: Curvas de actividad de *TaeL/TaeS* en presencia de diferentes efectores: Fru6P; Piruvato; Glc6P; FBP y PEP, en condiciones saturantes para ambos sustratos (2 mM de Glc1P y de ATP).

Además, se evaluó el efecto del Pi tanto sobre la actividad de *TaeS* como del heterotetrámero *TaeS/TaeL*. Cabe destacar que para evaluar el efecto del Pi sobre la actividad de la *TaeADPGlcPPasa* no puede utilizarse el método colorimétrico con Verde de Malaquita (sección 3.5.1.1), ya que este mismo metabolito es el que reacciona con gran sensibilidad dando el producto coloreado. Para sobrellevar esto, un método alternativo es el uso de uno de los sustratos con una marca radioactiva como la $[^{14}\text{C}]\text{Glc1P}$. Brevemente, este sustrato es utilizado por la enzima, generando $\text{ADP}-[^{14}\text{C}]\text{Glc}$, la cual es adicionada al glucógeno por la glucógeno sintasa, siendo este último cuantificado por un contador de centelleo [124] tal como se describe en la sección 3.5.1.3 de Materiales y Métodos. Debido a la complejidad de usar sustancias radioactivas y el tiempo que conlleva este método particular, durante este trabajo de Tesis pusimos a punto un método de enzimas acopladas que consiste en adicionar tres enzimas a la reacción de la *ADPGlcPPasa*. La glucógeno sintasa utiliza el *ADPGlc* adicionando *Glc* a una cadena creciente de glucógeno y liberando *ADP*, el que es utilizado por una segunda enzima, la piruvato quinasa, que en presencia de *PEP* genera *ATP* y piruvato. Este último es utilizado por la lactato deshidrogenasa que genera lactato a expensas de *NADH*. El consumo de este cofactor es detectado espectrofotométricamente a 340 nm. Con este último método pudimos evaluar el efecto del Pi sobre la actividad de la *ADPGlcPPasa*. Tal como se evidencia en la Figura 16, tanto *TaeS* como *TaeS/TaeL* son inhibidas por Pi. *TaeS* es inhibida hasta un 60% (3 veces) con un $I_{0,5}$ de $6,5 \pm 0,3$ mM de Pi, mientras que *TaeS/TaeL* es inhibida hasta un 80% (7 veces) con un $I_{0,5}$ de $9,5 \pm 0,4$ mM de Pi.

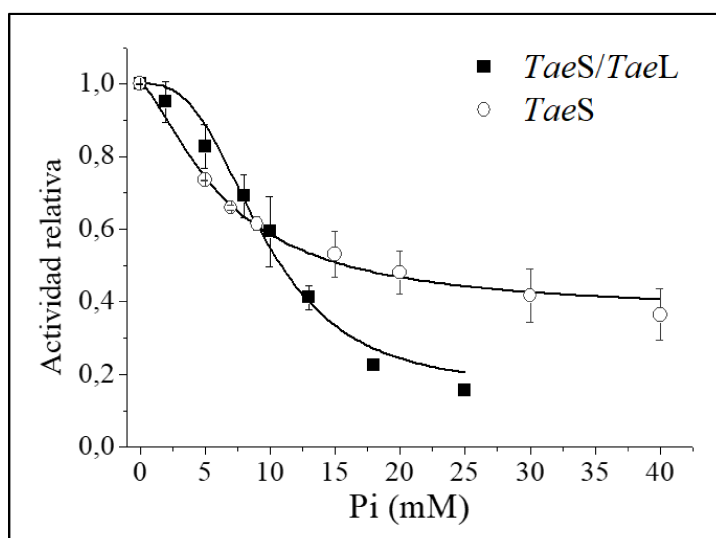


Figura 16: Curvas de inhibición por Pi de *TaeS* y *TaeS/TaeL*.

Estudios realizados en la ADPGlcPPasa de endosperma de trigo purificada de fuente, también detallan la insensibilidad a la activación por 3PGA, pero observaron que el rol principal de este metabolito era revertir la inhibición por Pi de la enzima [73]. Luego de los resultados obtenidos acerca de la inhibición por Pi tanto de *TaeS* como de *TaeS/TaeL*, evaluamos la capacidad del 3PGA y de la Fru6P de revertir este efecto. En la Figura 17, puede observarse que, a diferencia del comportamiento de la enzima purificada de fuente, las inhibiciones de *TaeS/TaeL* o de *TaeS* sólo fueron levemente revertidas por el agregado de los efectores en la misma concentración. El motivo por el cual estos resultados no se condicen con los informados en la bibliografía [73], puede deberse a que la enzima purificada de fuente (a los 28 DPA) haya estado, en parte, modificada postraduccionalmente.

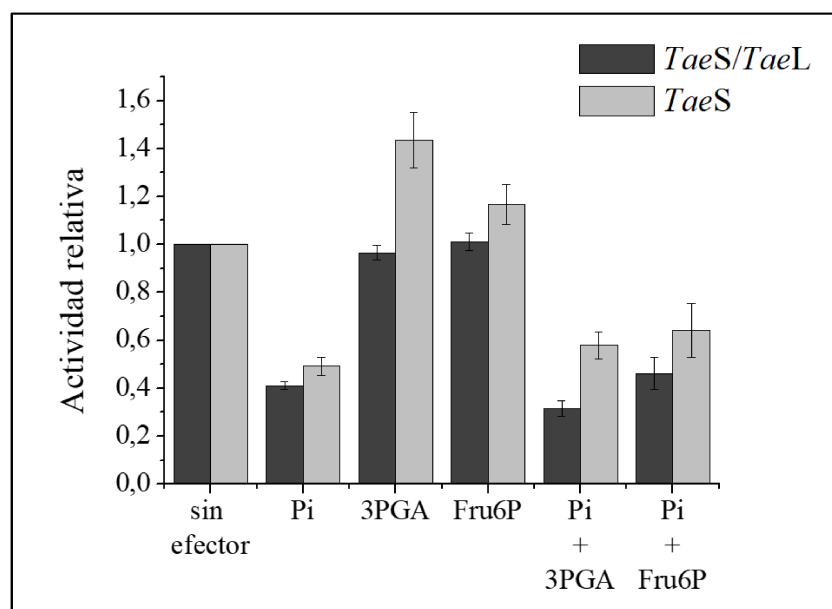


Figura 17: Actividad relativa de *TaeS/TaeL* en presencia de 15 mM de diferentes efectores.

Como se mencionó en el capítulo introductorio, las ADPGlcPPasas de plantas pueden regularse de manera redox. Fue demostrada la activación redox de las enzimas de hojas de arveja, papa y *Arabidopsis*, en respuesta a incrementos de luz y niveles de azúcares [67, 138]. Además, la ADPGlcPPasa de papa que está ampliamente estudiada, forma un -S-S- intersubunidades con los residuos Cys12 de cada subunidad S, y la reducción reversible de este enlace con DTT o tiorredoxinas *m/f* activan la enzima incrementando su afinidad al activador 3PGA [74, 139, 140].

Si bien, las ADPGlcPPasas de cereales y, entre ellas la *TaeADPGlcPPasa*, no conservan estas Cys, se ha visto que la enzima de arroz responde al agregado o ausencia de reductor modificando las afinidades hacia efectores alostéricos, aunque no sería a través de la subunidad S sino que mediante la subunidad L [141]. A partir de las secuencias aminoacídicas de *TaeS* y *TaeL*, se observa

la presencia de residuos Cys que podrían estar involucrados en la formación de -S-S-. Específicamente, *TaeS* tiene 5 residuos y *TaeL* tiene 12 residuos de Cys. Es por ello que, para evaluar si agentes reductores u oxidante modifican la actividad o la estructura de las versiones recombinantes estudiadas en este trabajo, se realizaron ensayos de incubación con DTT, como agente reductor y con diamida, como oxidante, y posteriormente se midió la actividad ADPGlcPPasa, tal como se describen en las secciones 3.5.1.1 y 3.5.3 de Materiales y Métodos.

Se evaluó la actividad del heterotetrámero *TaeS/TaeL* pre-incubado durante 15 min con distintas concentraciones de DTT y diamida, en ausencia y presencia del efector 3PGA. Como se observa en la Figura 18, la actividad de *TaeS/TaeL* no fue modificada por el agregado cantidades significativas de reductor u oxidante, y esto se mantuvo en presencia de una concentración fija de 3PGA (Figura 18-A y B, respectivamente).

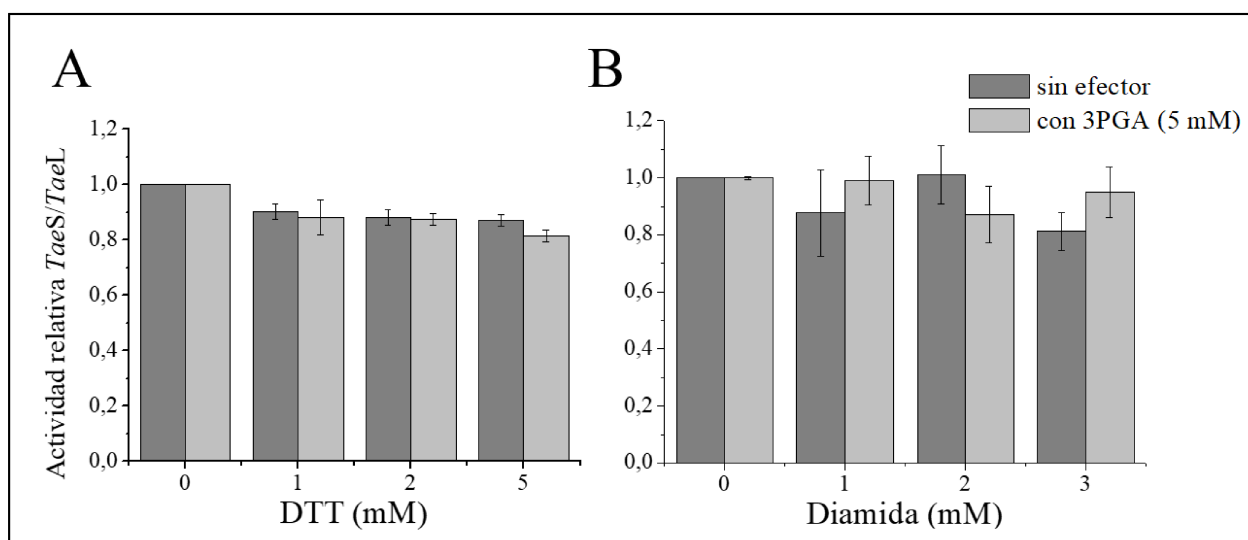


Figura 18: Actividad relativa de *TaeS/TaeL* a distintas concentraciones de (A) DTT y (B) diamida, en ausencia y presencia de 3PGA (5 mM). La concentración de la enzima fue de 0,5 μ M y el tiempo de incubación con el agente oxidante fue de 30 min.

Por otro lado, se evaluó la respuesta redox de la subunidad S de manera individual. Se realizaron curvas de DTT y de 3PGA en ausencia y en presencia de estos mismos efectores, presentándose los resultados en la Figura 19. *TaeS* no es activada por reducción, pero si responde a 3PGA a medida que aumentan las concentraciones de DTT (Figura 19-A), activándola hasta 3 veces. Por otro lado, se evidencia que *TaeS* únicamente es activada por 3PGA en condiciones reductoras (Figura 19-B). A partir de estos resultados, entonces puede sugerirse que para que *TaeS* sea activada por 3PGA necesita estar reducida, a diferencia del heterotetrámero que es insensible. Este comportamiento redox sería a través de un mecanismo diferente al que ocurre con las subunidades

S en el heterotetrámero de tubérculo de papa y más asociado a lo que ocurre con la regulación de la enzima de arroz [74, 142].

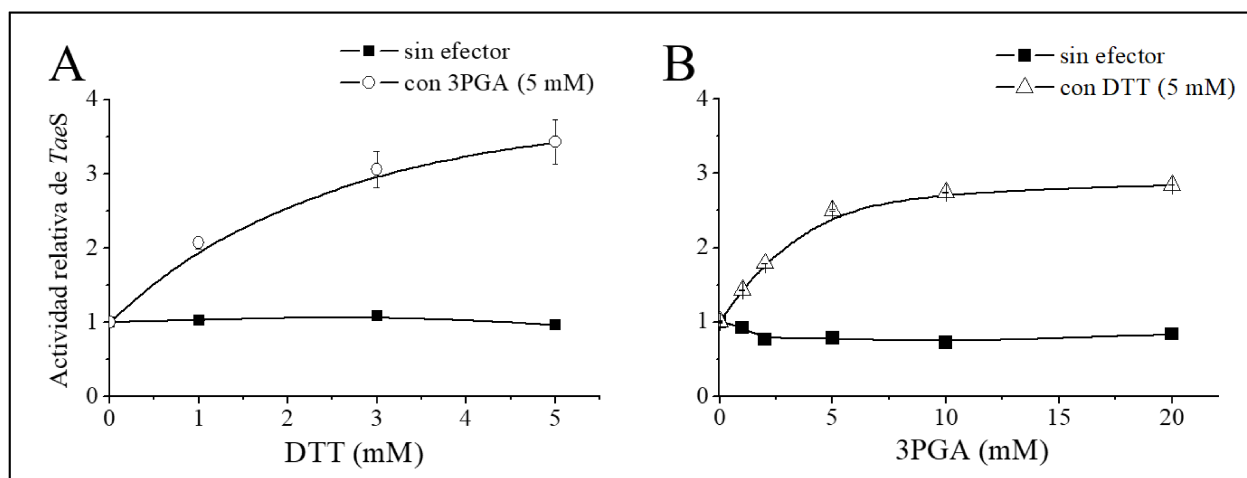


Figura 19: Actividad relativa de *TaeS* a concentraciones crecientes de (A) DTT y (B) 3PGA, en ausencia y en presencia de los mismos efectores a una concentración fija señalada en cada gráfico.

4.1.2 Estudios sobre el rol regulatorio de las subunidades de la *TaeADPGlcPPasa*

Aunque comparten una identidad de secuencia significativa (Figura 10) [143], se ha informado que las subunidades L y S son las subunidades reguladoras y catalíticas, respectivamente [30]. Sin embargo, esta idea fue desafiada al demostrar que ambas subunidades son esenciales para las propiedades catalíticas y alostéricas de la enzima [141, 144–147]. Se sabe que esta enzima en endosperma de cereales tiene propiedades distintivas con respecto a la de otras especies de plantas. Tal como se observa en los resultados anteriores, *TaeS* responde a la activación por 3PGA en condiciones reductoras, mientras que el heterotetrámero *TaeS/TaeL* es insensible al activador y a la modulación redox. A partir de esto, surge el interrogante de cuál es el rol de las subunidades en la regulación de la enzima, y cómo el escenario metabólico interviene en la formación de la estructura heterotetramérica y la activación de la misma.

4.1.2.1 Rol de las subunidades en la modulación redox: interacción de *TaeL* con *TaeS* para la formación del heterotetrámero

Se analizó el comportamiento redox de las subunidades individuales en comparación con el comportamiento del heterotetrámero. Para este último, no sólo se evaluó la versión copurificada (*TaeS/TaeL*), sino que además se realizó una mezcla de las subunidades individuales (en una proporción 1:1 de *TaeS*+*TaeL*) de tal manera de generar *in vitro* la interacción entre ellas para la formación del heterotetrámero. Cada enzima se incubó 15 min con DTT o diamida (tanto en

ausencia como en presencia de 3PGA), con 3PGA y sin efectores. Posteriormente, se midió la actividad enzimática según lo indicado en la sección 3.5.1.1 de Materiales y Métodos. Los resultados se presentan en la Figura 20 y, tal como se observó anteriormente, *TaeS* sólo fue activada por 3PGA en condiciones reductoras, mientras que la subunidad *TaeL* se mantiene inactiva. Curiosamente, el heterotetrámero formado *in vitro* (*TaeS*+*TaeL*) es activo sólo en condiciones reductoras, sin presentar variaciones en presencia de 3PGA, sugiriendo insensibilidad a este metabolito. Por su parte, la presencia de oxidante no permitiría la formación del heterotetrámero funcional evidenciado por la ausencia de actividad. Mientras que el heterotetrámero copurificado (*TaeS*/*TaeL*), tiene su máxima actividad en ausencia de efector siendo insensible no sólo a la presencia de 3PGA, sino también a los oxidantes y reductores ensayados.

Estos resultados sugieren que, para la formación del heterotetrámero, las subunidades S y/o L deben estar reducidas, lo que favorece la interacción de las mismas y aumenta la actividad ADPGlcPPasa significativamente. Una vez conformado el heterotetrámero, el mismo es estable e insensible a los cambios redox y/o a la presencia de efectores. También cabe destacar el rol esencial de la subunidad L en el heterotetrámero, ya que permite la formación de una estructura en combinación con la subunidad S que alcanza un incremento significativo en la actividad catalítica.

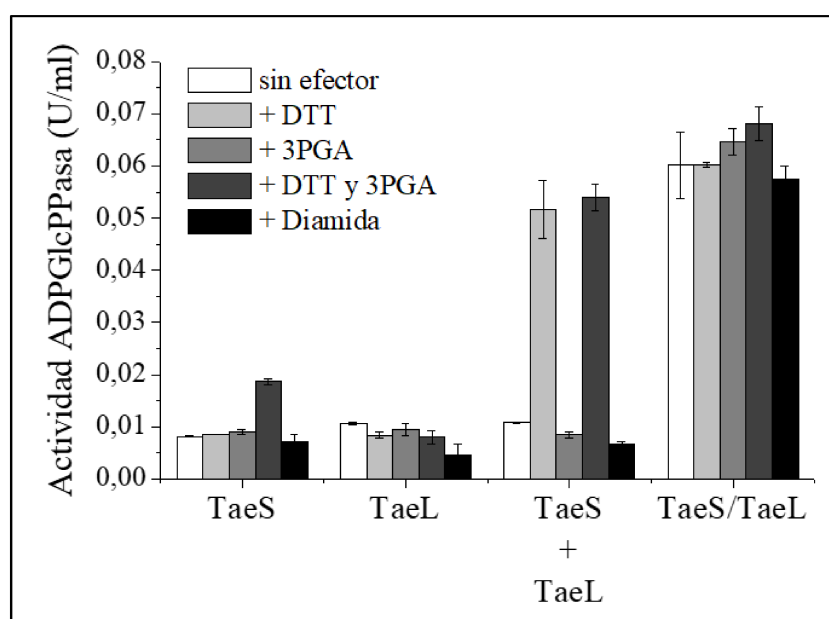


Figura 20: Actividad ADPGlcPPasa para las versiones *TaeS*, *TaeL*, la mezcla de las subunidades (proporción molar 1:1, respectivamente) y *TaeS*/*TaeL*, en diferentes condiciones de pre-incubación sin efector o con 5 mM de DTT, 3PGA o Diamida.

Realizamos una curva de titulación para comprender cómo se produce la formación *in vitro* del heterotetrámero en condiciones reductoras. Para una concentración fija de *TaeS*, se varió la concentración molar de *TaeL*. En la Figura 21 se presentan los resultados y puede observarse que,

la actividad se incrementa a medida que aumenta la cantidad de la subunidad L, alcanzándose la mayor actividad enzimática cuando ambas subunidades se encuentran en una relación 1:1. Esta actividad no aumenta con el agregado de mayores concentraciones de *TaeL*, lo que sugiere que todas las subunidades S están interaccionando con las L y poseen su máxima actividad catalítica. Cabe destacar que la subunidad L por sí misma no tiene actividad significativa, aún en elevadas concentraciones.

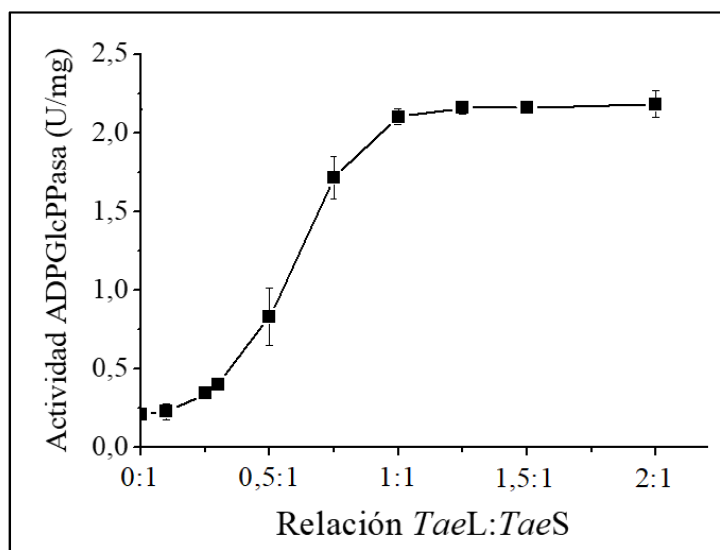


Figura 21: Actividad ADPGlcPPasa de *TaeS* en presencia de diferentes relaciones mol a mol con *TaeL*.

4.1.2.2 Rol de las subunidades en la regulación alostérica y en la estabilidad frente a temperaturas elevadas

La *TaeADPGlcPPasa*, presenta propiedades regulatorias diferenciadas en comparación con las enzimas de otras fuentes. A pesar de la relevancia de esta enzima en particular, su impacto en la importancia agrícola del trigo y sus propiedades peculiares, poco se sabe sobre su relación con la estructura. La mayoría de las ADPGlcPPasas de plantas se activan de forma alostérica con 3PGA y se inhiben con Pi [30, 55, 70]. Aunque el activador principal es 3PGA, las enzimas muestran cierta promiscuidad hacia otros activadores que son metabolitos intermediarios en células vegetales [62, 73, 148].

Se ha establecido que las subunidades L de dicotiledóneas influyen en las diferentes sensibilidades a los efectores alostéricos en función de su localización tisular [66, 149]. Desde la divergencia de monocotiledóneas y dicotiledóneas, las subunidades L de dicotiledóneas se han duplicado y diversificado en tres ramas separadas del árbol filogenético, mientras que las subunidades L de endosperma de monocotiledóneas pertenecen a una cuarta rama distinta [30, 150]. Se sabe que las ADPGlcPPasas de endosperma de cereales muestran respuestas únicas a los

efectores alostéricos [151, 152]. Por ejemplo, la enzima de trigo, tanto purificada de endosperma [73] como la evaluada en este trabajo de Tesis es insensible a la activación de 3PGA en ausencia de Pi.

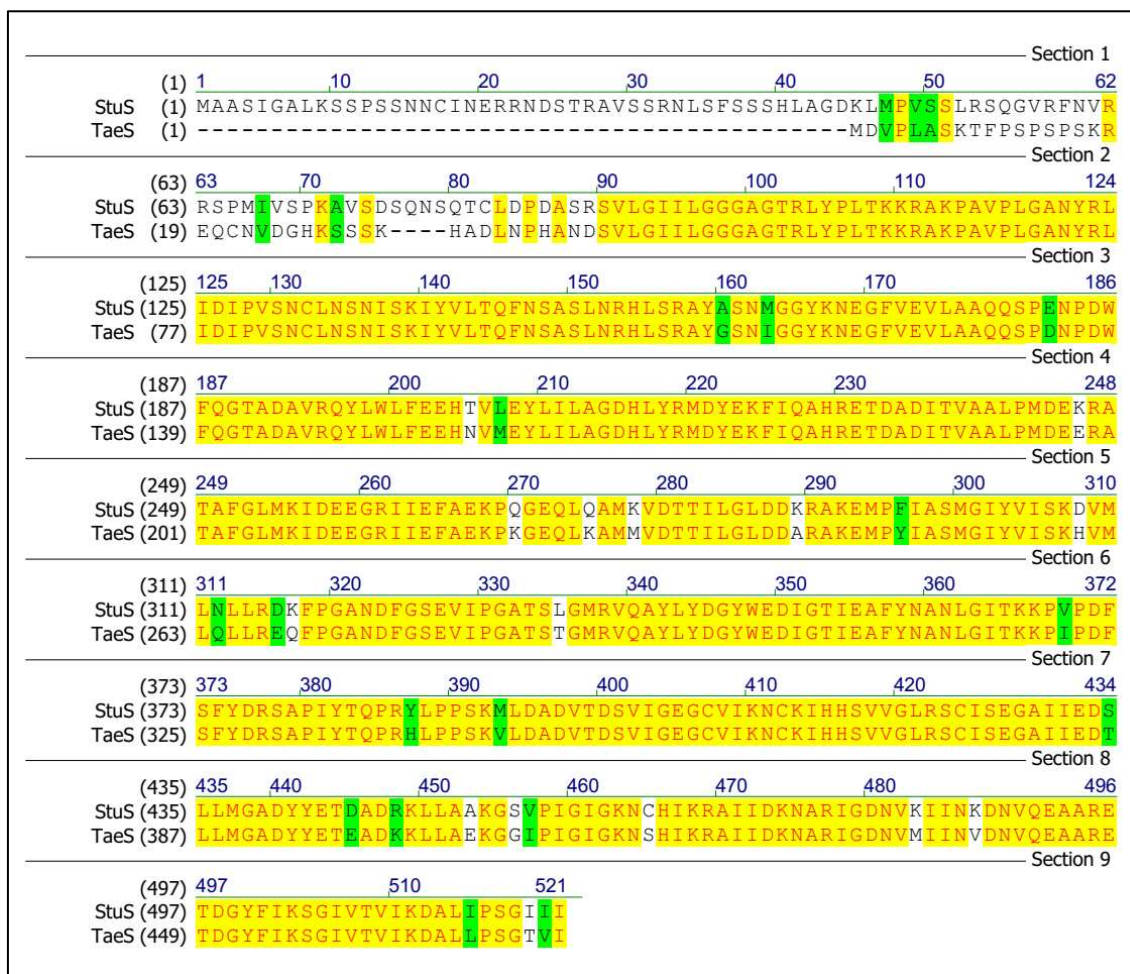


Figura 22: Alineamiento de las secuencias de las subunidades S de tubérculo de papa (*Stu*) y endosperma de trigo (*Tae*), las cuales tienen un 78,5% de identidad; y un 82,5% de similitud.

Para revelar si las propiedades reguladoras únicas de la *TaeADPGlcPPase* están determinadas por una subunidad o la combinación de ambas, construimos proteínas híbridas que intercambian las subunidades S y L. Para estos estudios seleccionamos, aparte de la de trigo estudiada en este trabajo, la enzima de tubérculo de papa (*Solanum tuberosum*). Esta elección se debe a que las respuestas a los efectores alostéricos son marcadamente distintas en ambas proteínas. La ADPGlcPPase de tubérculo de papa es altamente sensible a la activación por 3PGA y también es activada por DTT, a diferencia de la enzima endosperma de trigo [64, 73]. Analizamos las propiedades alostéricas de las enzimas combinando la subunidad S del tubérculo de papa recombinante (*StuS*) con la subunidad L del tubérculo de papa (*StuL*) o de endosperma de trigo (*TaeL*), por expresión heteróloga en *E. coli* de los genes respectivos. Además, estudiamos las combinaciones de la subunidad *TaeS* con *TaeL* o con *StuL*.

Como puede observarse en las Figuras 22 y 23, las secuencias de las subunidades S de tubérculo de papa y endosperma de trigo, tienen una alta identidad (78,5%); mientras que las secuencias de las subunidades L tienen un porcentaje menor (59,8%). A pesar del elevado porcentaje de identidad de secuencias entre ambas especies de plantas, en este trabajo pondremos en evidencia las diferencias cinéticas y regulatorias de las mismas.

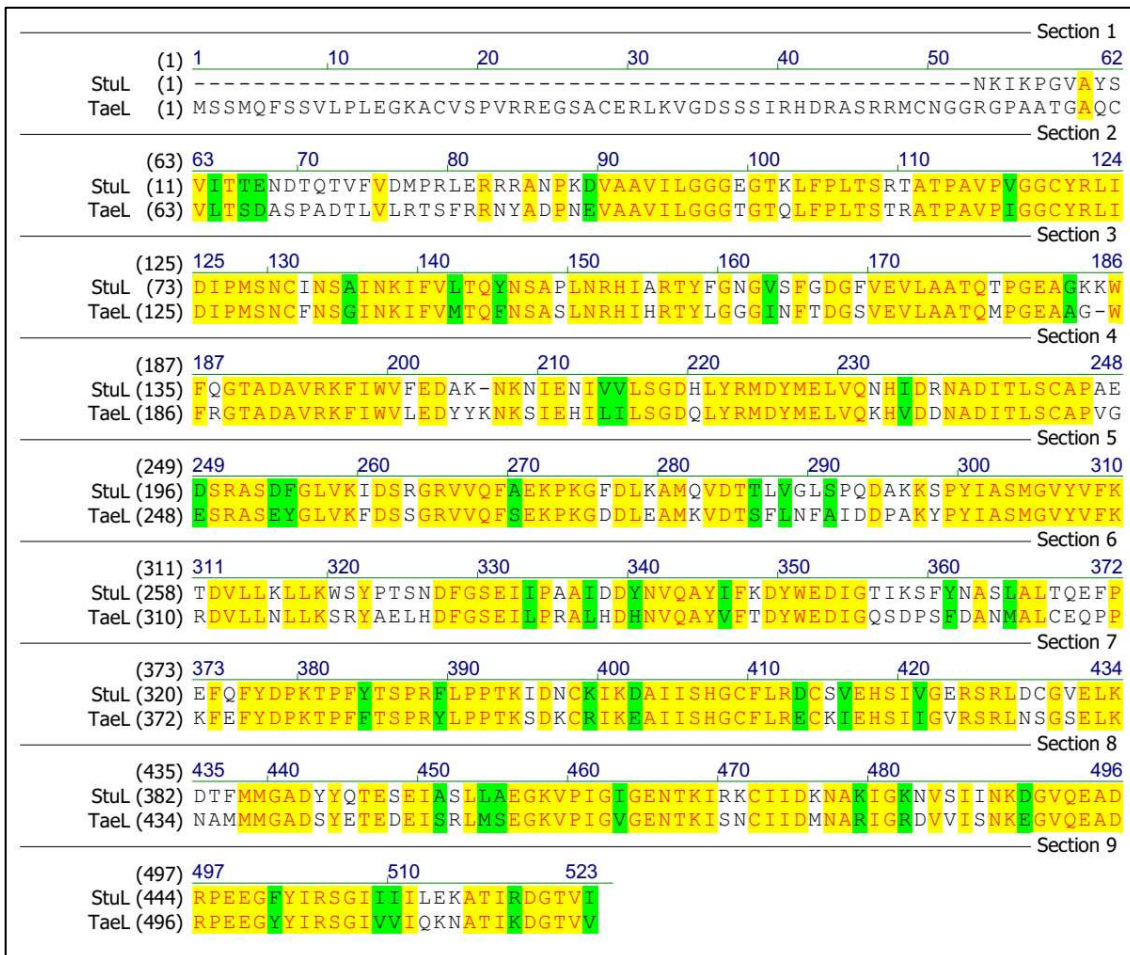


Figura 23: Alineamiento de las secuencias de las subunidades L de tubérculo de papa (*Stu*) y endosperma de trigo (*Tae*), las cuales tienen un 59,8% de identidad; y un 68,5% de similitud.

Construcción de híbridos *Tae/Stu*: expresión y purificación de las versiones híbridas de la ADPGlcPPasa de trigo y papa

Los genes de las subunidades S y L de la ADPGlcPPasa, tanto las de endosperma de trigo como las de tubérculo de papa, se subclonaron en vectores pET28c (que incluye un His-tag en su extremo N-terminal), para su expresión de manera individual en células de *E. coli* BL21(DE3), tal como se indica en la sección 3.4.9 de Materiales y Métodos. Además, todos los genes también se subclonaron en el vector pCDFDuet, de tal manera que sus respectivas expresiones produzcan proteínas sin el agregado de una etiqueta. Las diferentes versiones de las ADPGlcPPasa se

obtuvieron combinando las construcciones en los vectores pCDFDuet y pET28c, todas ellas con un His-tag solo en una subunidad. Aunque obtuvimos el conjunto completo de combinaciones, en este trabajo de tesis solo informamos los datos cinéticos y regulatorios de aquellas versiones heterotetraméricas S/L donde la subunidad L tiene His-tag (usando pET28c) y la subunidad S no (usando pCDFDuet), tal como se esquematiza en la Figura 24. Esto se debió a que en el proceso de obtención de las versiones heterotetraméricas observamos que el His-tag en las subunidades S afectaba su actividad y la ausencia de esta etiqueta en la subunidad L afectaba su estabilidad estructural a lo largo del tiempo.

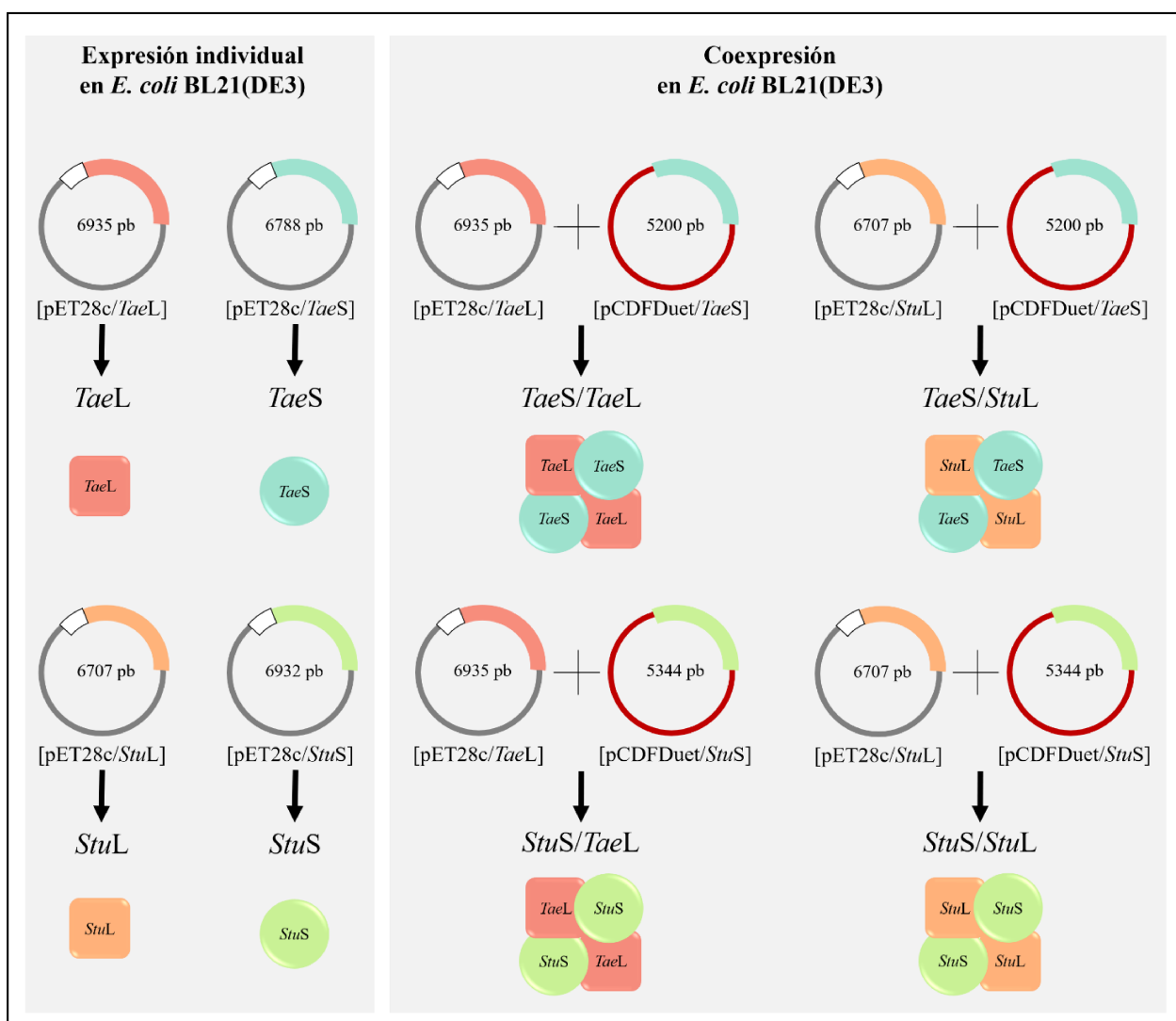


Figura 24: Construcciones utilizadas para la transformación de células de *E. coli* BL21(DE3) y la posterior expresión de las distintas versiones de la ADPGlcPPasa de trigo (*Tae*) y papa (*Stu*): de manera individual (*TaeS*, *TaeL*, *StuS* y *StuL*) o coexpresadas (*TaeL/TaeS*, *TaeL/StuS*, *StuL/TaeS* y *StuL/StuS*).

Caracterización cinética, estructural y regulatoria de las construcciones híbridas

Una vez obtenidas las células que expresan cada versión híbrida, se procedió a la producción y purificación de las mismas, tal como se indica la sección 3.4.10 de Materiales y Métodos. Las versiones heteroméricas *TaeL/TaeS*, *TaeL/StuS*, *StuL/TaeS* y *StuL/StuS*, se obtuvieron con alto grado de pureza y en la Figura 25-A se observan fracciones de las mismas donde se puede notar la homogeneidad electroforética alcanzada. Se determinó la estructura cuaternaria de cada una de las versiones recombinantes purificadas mediante cromatografía de filtración por gel (Figura 25-B). Todas están formadas por una estructura heterotetramérica de alrededor de 200 kDa.

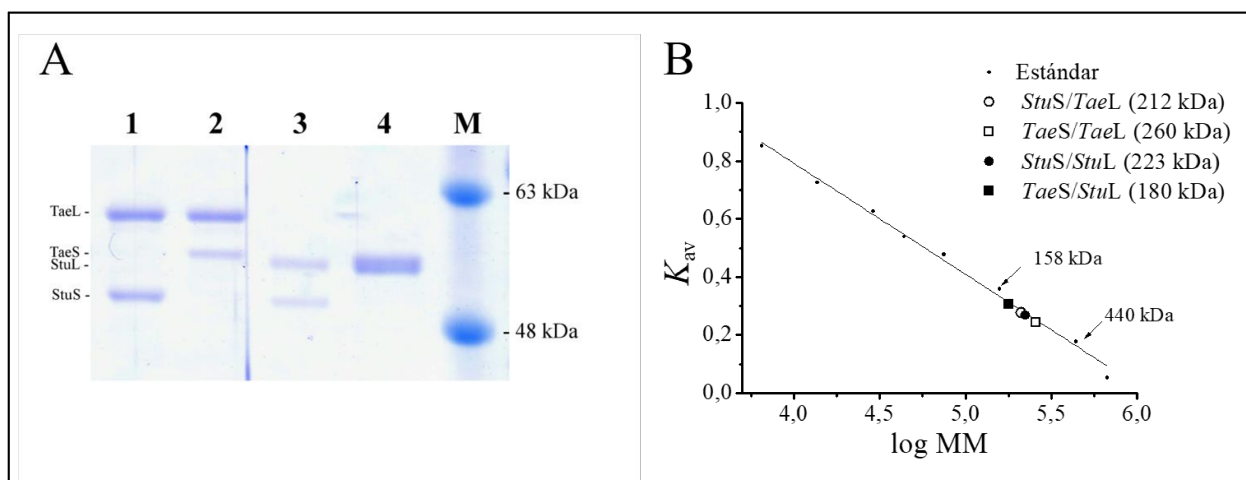


Figura 25: Determinación de la estructura de los híbridos de la ADPGlcPPasa: (1) *TaeL/StuS* (círculos blancos), (2) *TaeL/TaeS* (cuadrados blancos), (3) *StuL/StuS* (círculos negros) y (4) *StuL/TaeS* (cuadrados negros). (A) Perfiles electroforéticos en un SDS-PAGE con reductor. (B) Determinación de la masa molecular por cromatografía de filtración por gel. M: marcador de masa molecular

Se realizó la caracterización cinética de cada una de las versiones recombinantes. Para ello se realizaron curvas de saturación para los sustratos de la enzima, Glc1P y ATP, variando la concentración del sustrato en estudio y fijando el otro sustrato en concentraciones saturantes. Estas curvas también fueron evaluadas en presencia del principal activador informado para estas enzimas, el 3PGA. Los valores obtenidos para los parámetros cinéticos de cada versión recombinante se resumen en la Tabla 5.

Para el caso de la enzima heterotetramérica de endosperma de trigo (*TaeS/TaeL*), se obtuvieron parámetros similares a los informados en la sección 4.1.1 (Tabla 4), con una $V_{m\acute{a}x}$ de $\sim 4,7$ U/mg y, si bien el 3PGA no modifica el valor de actividad enzimática, se observa que incrementa la afinidad por la Glc1P y, consecuentemente, también la eficiencia catalítica de la enzima. Un análisis general indica que los parámetros determinados para esta enzima heterotetramérica producida en forma recombinante son similares a los informados en estudios realizados con la ADPGlcPPasa purificada de fuente natural (endosperma), tanto de trigo [73] como

de cebada [152] y maíz [151]. Por otro lado, para la enzima recombinante de tubérculo de papa (*StuS/StuL*) se observó que, en ausencia de 3PGA, las curvas de sustratos no alcanzan saturación efectiva, estimándose una V_{\max} de ~ 1 U/mg (actividad evaluada hasta 15 mM de los sustratos); mientras que el agregado del activador aumenta la actividad en un orden de magnitud, pudiéndose calcular un valor de V_{\max} de ~ 18 U/mg. Claramente la afinidad de ambos sustratos (Glc1P y ATP) aumenta hasta 25 veces con el agregado de 3PGA (Tabla 5). Estas características determinadas para la enzima de tubérculo de papa son similares a las previamente informadas [62, 63, 153, 154].

Tabla 5: Parámetros cinéticos para las versiones híbridas de la *TaeADPGlcPPasa* (*Tae*) y papa (*Stu*).

Versión	Sustrato	$S_{0,5}$ (mM)	V_{\max} (U.mg ⁻¹)	n_H	$V_{\max}/S_{0,5}$ (U.mg ⁻¹ .mM ⁻¹)
<i>TaeS/TaeL</i>	Glc1P	0,16 ± 0,01	4,1 ± 0,2	2,8	25
	Glc1P + 3PGA*	0,083 ± 0,006	3,6 ± 0,2	1,3	43
	ATP	0,25 ± 0,01	4,7 ± 0,5	1,3	18
	ATP + 3PGA*	0,26 ± 0,01	4,7 ± 0,4	1,0	18
<i>StuS/TaeL</i>	Glc1P	0,093 ± 0,004	36,4 ± 0,6	1,0	390
	Glc1P + 3PGA*	0,072 ± 0,006	30,1 ± 0,8	1,0	418
	ATP	0,14 ± 0,01	48,4 ± 1,2	1,0	346
	ATP + 3PGA*	0,13 ± 0,02	33,6 ± 1,4	1,0	258
<i>StuS/StuL</i>	Glc1P	2,4 ± 0,4	>1,9	1,4	0,8
	Glc1P + 3PGA*	0,10 ± 0,02	18,5 ± 2,1	0,8	185
	ATP	1,6 ± 0,6	> 0,8	1,2	0,5
	ATP + 3PGA*	0,06 ± 0,01	14,3 ± 0,4	1,2	238
<i>TaeS/StuL</i>	Glc1P	2,14 ± 0,18	0,050 ± 0,002	1,1	0,02
	Glc1P + 3PGA*	3,4 ± 0,4	0,20 ± 0,01	1,0	0,06
	ATP	2,11 ± 0,34	0,030 ± 0,003	1,3	0,01
	ATP + 3PGA*	1,7 ± 0,2	0,43 ± 0,03	0,9	0,2
*1 mM de 3PGA					

Respecto a la caracterización de las enzimas oligoméricas híbridas, el heterotetrámero *StuS/TaeL* fue el que mostró mayor actividad, con una V_{\max} de ~ 48 U/mg, que no fue modificada por el 3PGA. Esta proteína híbrida presentó, además, una afinidad relativamente elevada por los sustratos, obteniéndose valores de $S_{0,5}$ que no fueron mayormente afectados por la presencia de 3PGA. Para este heterotetrámero híbrido se determinó la mayor eficiencia catalítica con respecto a las otras tres formas de ADPGlcPPasa analizadas, independientemente de la presencia del 3PGA en el medio (Tabla 5). En comparación, el heterotetrámero híbrido *TaeS/StuL* exhibió una V_{\max} de $\sim 0,05$ U/mg en ausencia de efector, la que se incrementó a $\sim 0,4$ U/mg en presencia de 3PGA. El

activador no afectó significativamente la afinidad aparente de la enzima por los sustratos. De esta forma, el análisis de los resultados en la Tabla 5 muestra que, aunque el incremento en la eficiencia catalítica producida por el 3PGA sobre la enzima *TaeS/TaeL* es un orden de magnitud menor que lo observado para *StuS/StuL*, es clara la funcionalidad de la subunidad L para establecer sensibilidad o insensibilidad al activador a la enzima heterotetramérica de la cual forma parte estructural.

Para una mayor comprensión de las relaciones de estructura a función, se realizaron curvas de activación para cada versión recombinante de la ADPGlcPPasa, no sólo con 3PGA (efector principal de la enzima de plantas [30, 70] sino también con la Fru6P (efector importante de la enzima de endosperma de maíz y de hojas de trigo [30, 73, 151]). Además, se realizaron las curvas de inhibición por Pi. En la Figura 26 se presentan las gráficas obtenidas y en la Tabla 6 se resumen los parámetros cinéticos.

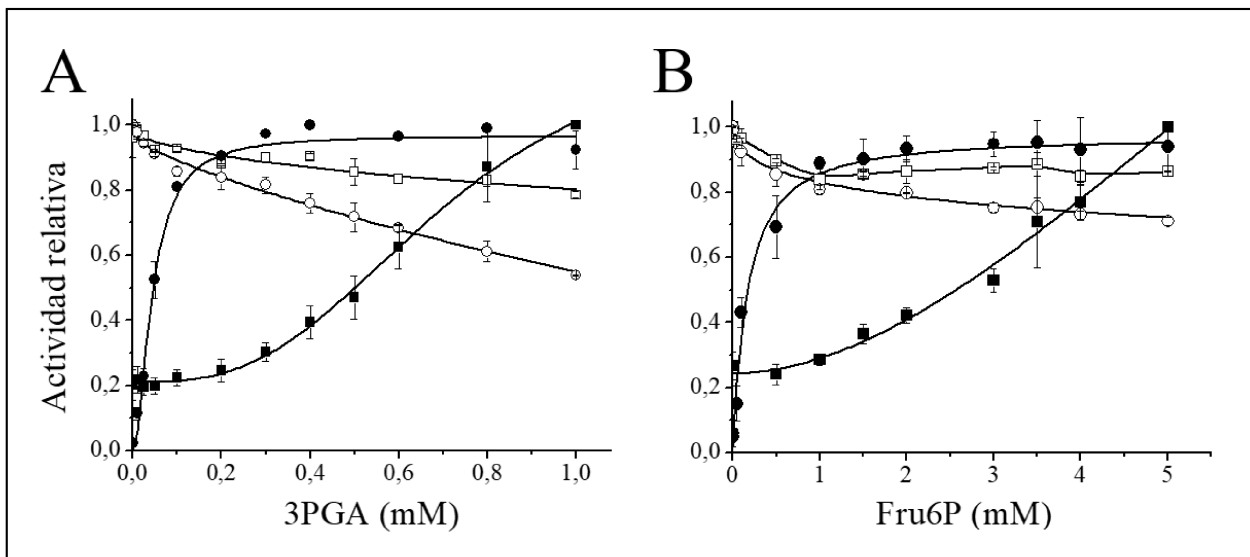


Figura 26: Curvas de activación de los híbridos de la *TaeADPGlcPPasa* (*Tae*) y papa (*Stu*) por 3PGA (A) y Fru6P (B). *TaeS/TaeL* (cuadrados vacíos), *StuS/TaeL* (círculos vacíos), *TaeS/StuL* (cuadrados rellenos), *StuS/StuL* (círculos vacíos). La velocidad máxima alcanzada para las curvas de 3PGA y Fru6P se presentan en la tabla 9.

Como se muestra en la Figura 26, la presencia de la respectiva subunidad L, ya sea *StuL* o *TaeL*, es la que da las propiedades de regulación alostérica específicas a los híbridos heteroméricos. Notoriamente, la presencia de *StuL* otorga sensibilidad tanto a 3PGA como a Fru6P a la enzima híbrida resultante, mientras que la presencia de *TaeL* confiere insensibilidad. Para realizar un análisis comparativo más detallado de las propiedades cinéticas y regulatorias de las ADPGlcPPasa híbridas, se obtuvieron los parámetros cinéticos obtenidos para cada uno de los efectores evaluados, (Tabla 6). Se puede observar que las enzimas *TaeS/TaeL* y *StuS/TaeL* son insensibles a la activación, ya que 3PGA no tuvo efecto sobre los valores de $S_{0,5}$ para sustratos ni sobre las $V_{m\acute{a}x}$. Por el contrario, *TaeS/StuL* y *StuS/StuL* exhibieron valores de $V_{m\acute{a}x}$ 9,7 y 42 veces más altos

(respectivamente) en presencia de 3PGA que en su ausencia; y de 10,7 y 20 veces más altos (respectivamente) en presencia de Fru6P que en su ausencia. Se destaca además que ambas versiones, *TaeS/StuL* y *StuS/StuL*, tienen una mayor afinidad aparente por 3PGA que por Fru6P (aproximadamente cinco y tres veces mayor, respectivamente).

Se realizaron curvas de inhibición por P_i , utilizando el método radioquímico con [^{14}C]Glc1P, tal como se describe en la sección 3.5.1.2 de Materiales y Métodos. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos, pudiendo observarse que las versiones que contienen a *StuS* tienen mayor afinidad por P_i . Así, *StuS/StuL* y *StuS/TaeL* son inhibidas (~4 veces) a bajas concentraciones de P_i , mientras que *TaeS/TaeL* fue inhibida 7,4 veces, en comparación con *TaeS/StuL*, que fue inhibida 1,4 veces. Sin embargo, la afinidad aparente por P_i de *TaeS/TaeL* fue 40 o 14 veces más baja que *StuS/StuL* o *StuS/TaeL*, respectivamente. El $I_{0,5}$ de *TaeS/TaeL* fue en el orden del milimolar, lo cual se condice con resultados obtenidos a partir de la enzima purificada de fuente [60]. Estos resultados sugieren que la subunidad S está relacionada a conferir afinidad aparente a la inhibición por P_i .

Tabla 6: Parámetros de activación e inhibición de las versiones híbridas de la *TaeADPGlcPPasa* (*Tae*) y papa (*Stu*).

Versión recomb.	Activación por 3PGA			Activación por Fru6P			Inhibición por P_i	
	$A_{0,5}$ (mM)	$V_{máx}$ (U.mg ⁻¹)	Veces de activación	$A_{0,5}$ (mM)	$V_{máx}$ (U.mg ⁻¹)	Veces de activación	$I_{0,5}$ (mM)	Veces de inhibición
<i>StuS/StuL</i>	0,040 ± 0,003	13,4 ± 0,3	42	0,12 ± 0,01	13,9 ± 0,3	20	0,17 ± 0,03	4,6
<i>TaeS/StuL</i>	>1,0*	0,39 ± 0,19	9,7	>5,0*	0,43 ± 0,08	10,7	N/D	1,4
<i>StuS/TaeL</i>	N/D	54,3 ± 0,3	-	N/D	54,9 ± 0,5	-	0,50 ± 0,15	4,2
<i>TaeS/TaeL</i>	N/D	6,7 ± 0,2	-	N/D	6,4 ± 0,2	-	6,8 ± 0,3	7,4

N/D: no determinado; *: no alcanzó la saturación.

Se evaluó también el posible efecto sobre la actividad de distintos metabolitos, entre ellos PEP, Rib5P, glucosamina-6-fosfato (GlcN6P), manosa-6-fosfato (Man6P), FBP, Glc6P, ácido 6-fosfo-glucónico (6PGlcA); y un análogo al PEP, la N-fosfonometilglicina (glifosato). Se determinó la actividad de las distintas versiones recombinantes de la ADPGlcPPasa en presencia de 2 mM de cada uno de estos efectores y los resultados se presentan en la Figura 27.

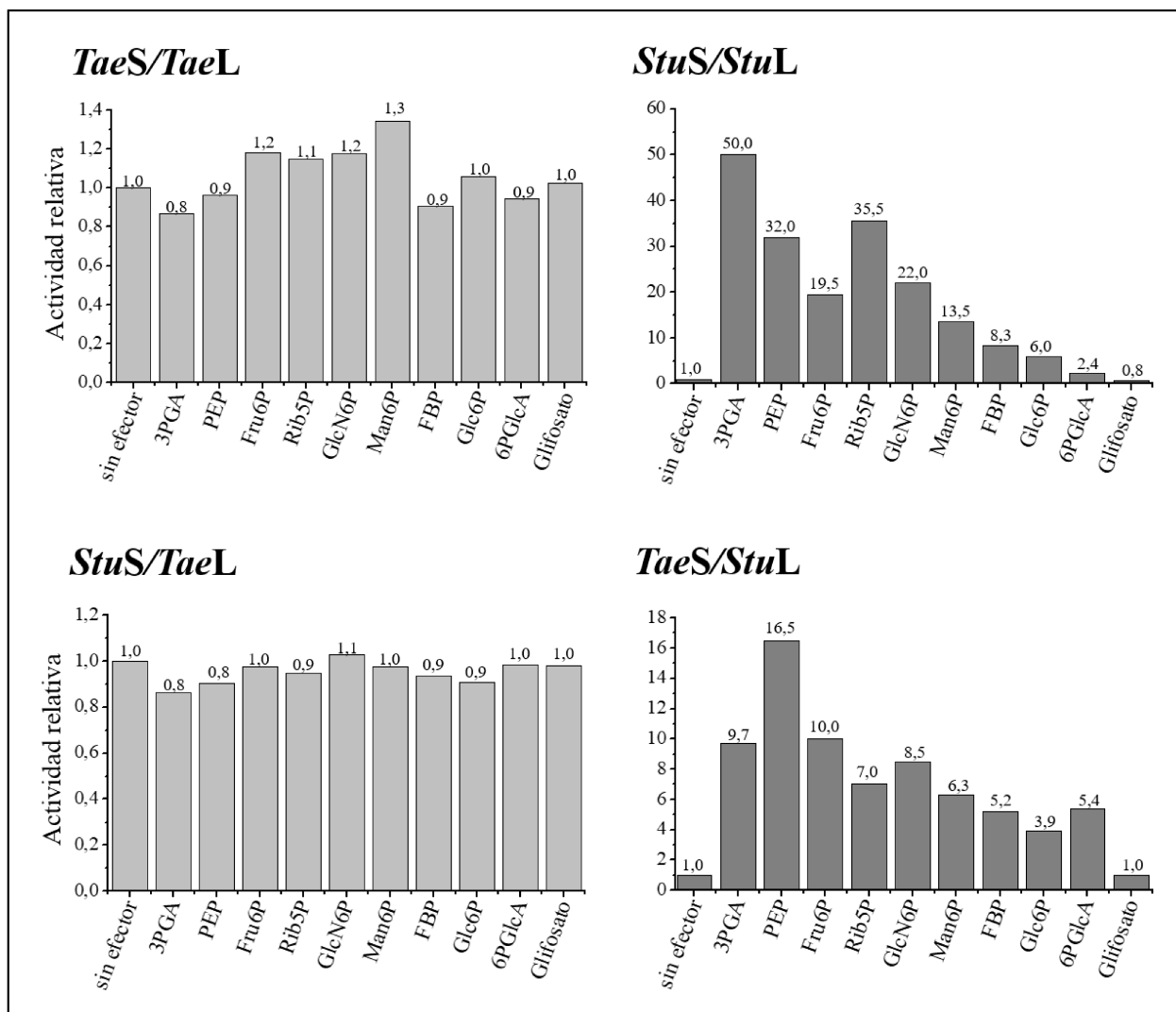


Figura 27: Evaluación de la actividad de los híbridos de la *TaeADPGlcPPasa* (*Tae*) y papa (*Stu*) en presencia de una concentración de 2 mM de diferentes efectores: 3PGA, PEP, Fru6P, Rib5P, GlcN6P, Man6P, FBP, Glc6P, 6PGlcA y Glifosato. Ver referencias en la lista de abreviaturas.

Las actividades de las versiones *TaeS/TaeL* y *StuS/TaeL* no fueron modificadas en presencia de los efectores, mientras que *StuS/StuL* y *TaeS/StuL* fueron activadas por todos los efectores a excepción del glifosato. A partir de estos resultados exploratorios, se realizaron curvas de los efectores estudiados para las versiones sensibles a los mismos, esto es a *StuS/StuL* y a *TaeS/StuL*, obteniéndose los parámetros cinéticos que se presentan en la Tabla 7. *StuS/StuL* es mayormente activada (1 orden de magnitud con respecto al control) por 3PGA, PEP, Rib5P, GlcN6P y Fru6P; siendo el 3PGA el activador más efectivo ya que, no sólo aumenta unas 50 veces su actividad, sino que mostró una mayor afinidad (el $A_{0,5}$ está en el orden del micromolar) con respecto a los demás efectores (con $A_{0,5}$ en el orden del milimolar). Respecto a la estructura heterotetramérica híbrida *TaeS/StuL*, también fue mayormente activada por los mismos metabolitos, cabiendo destacarse que el efector que activó en mayor medida no fue el 3PGA, sino que fue el PEP. Todos los $S_{0,5}$ para esta enzima están en el orden del milimolar, mostrando alta similitud entre ellos (Tabla 7).

Tabla 7: Parámetros de activación e inhibición de las versiones sensibles a efectores: *StuL/StuS* y *StuL/TaeS*. (*: concentración fija indicada).

Efeotor	<i>StuS/StuL</i>		<i>TaeS/StuL</i>	
	$A_{0.5}$ (mM)	Veces de activación	$A_{0.5}$ (mM)	Veces de activación
PEP	0,29 ± 0,02	32	1,12 ± 0,10	16,5
Glifosato	N/A	0,8	N/A	1
PEP + Glifosato (4 mM)*	0,61 ± 0,07	24	1,36 ± 0,21	13,4
Rib5P	1,15 ± 0,02	35,5	1,72 ± 0,18	7
GlcN6P	1,16 ± 0,08	22	3,63 ± 0,18	8,5
6PGlcA	1,84 ± 0,69	2,4	5,23 ± 0,5	5,4
Man6P	1,66 ± 0,32	13,5	0,99 ± 0,18	6,3
FBP	0,53 ± 0,08	8,3	0,75 ± 0,26	5,2
Glc6P	2,98 ± 0,10	6	1,77 ± 0,19	3,9
3PGA	0,044 ± 0,003	50	>1,0	9,7
3PGA + Glifosato (4 mM)*	0,067 ± 0,007	60	>1,0	9
Fru6P	0,15 ± 0,01	19,5	5,76 ± 0,94	10
	$I_{0.5}$ (mM)	Veces de inhibición	$I_{0.5}$ (mM)	Veces de inhibición
Glifosato + PEP (0,5 mM)*	3,37 ± 0,22	3,1	N/A	1,3

Es curioso que siendo el glifosato un análogo estructural del PEP, no modificó la actividad de las enzimas. Esto se debería a la interacción diferencial de estos metabolitos con residuos particulares del sitio alostérico. Se evaluó la posible intervención del glifosato en curvas de PEP y 3PGA, detallándose los resultados en la Tabla 7. La adición de glifosato no cambia la afinidad por 3PGA ni las veces de activación en ambas versiones recombinantes; pero si disminuye levemente la activación por PEP y la afinidad hacia el mismo en el heterotetrámero *StuS/StuL*. Por otra parte, se evaluó el posible efecto competitivo/inhibitorio del glifosato con el PEP, realizando curvas de glifosato en presencia de una concentración fija de PEP. Se observó una inhibición por glifosato de 3 veces para *StuS/StuL*, con un $I_{0.5}$ de 3,37 mM, en presencia de 0,5 mM de PEP, lo que sugiere que la afinidad por este último se ve afectada en presencia de su análogo. Mientras que para la versión híbrida no se observa esta inhibición. Estos resultados son novedosos y aportan para una potencial aplicación en el uso agronómico del glifosato. Para una mayor comprensión, son necesarios futuros estudios estructurales y de interacción de estos metabolitos con los sitios alostéricos de las subunidades de la ADPGlcPPasa.

4.1.2.3 Rol de las subunidades en la estabilidad frente a temperaturas elevadas

La estabilidad al calor es un atributo importante de las ADPGlcPPasas de plantas [155]. El rendimiento de algunos cereales cultivados en climas cálidos está posiblemente determinado por la estabilidad de las enzimas responsables de la síntesis de almidón [156, 157]. Se han realizado estudios que han demostrado que la ADPGlcPPasa del tubérculo de papa es relativamente estable al tratamiento térmico (5 minutos a aproximadamente 50-70 °C). Específicamente, se ha visto que la Cys12 de *StuS* puede formar un -S-S- entre las subunidades S para conferir estabilidad térmica a la enzima vegetal [139]. Por otro lado, a diferencia de la enzima de tubérculo de papa, la enzima de endosperma de cereales, como *TaeS*, carece específicamente de la Cys12. Es por ello que encontramos relevante analizar la estabilidad al calor de las construcciones híbridas estudiadas, para establecer relaciones entre tal característica con la estructura oligomérica de la proteína. Una alícuota de cada versión fue incubada a diferentes temperaturas en un *buffer* mínimo (sin adición de reductores ni efectores) durante 5 min. Posteriormente, se ensayó la actividad remanente, tal como se indica en la sección 3.5.4 de Materiales y Métodos. En la Figura 28 se presentan los resultados obtenidos y, como puede observarse, los híbridos exhibieron una estabilidad térmica similar durante 5 minutos a 25 °C, pero a medida que aumenta la temperatura se observan diferencias marcadas: *StuS/TaeL* retuvo casi el 80% de la actividad original, mientras que *TaeS/StuL* no retuvo más del 10% a 55 °C. *TaeS/TaeL* no retuvo la actividad original por encima de 42 °C. Por otro lado, *StuS/StuL* permaneció activo a temperaturas por encima de los 50°C, lo que está de acuerdo con informes previos mostrando su estabilidad a 60 °C [124].

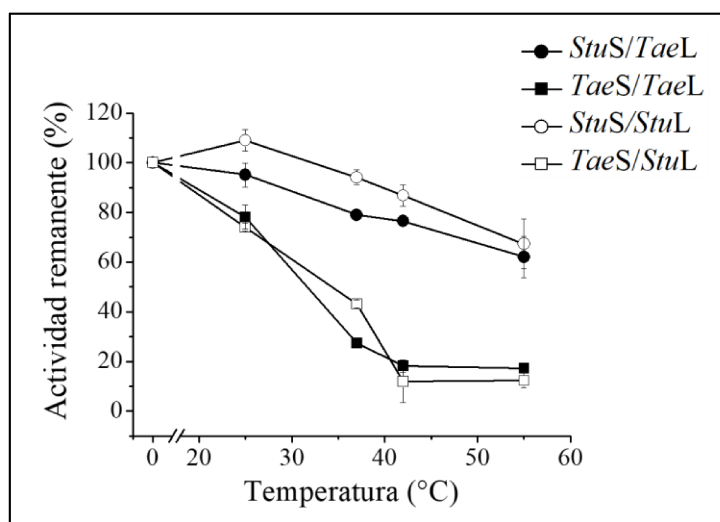


Figura 28: Estabilidad térmica de los híbridos de la ADPGlcPPasa. *TaeL/TaeS* (cuadrados blancos), *TaeL/StuS* (círculos blancos), *StuL/TaeS* (cuadrados negros), and *StuL/StuS* (círculos negros).

A partir de los resultados recién detallados, podemos decir que la presencia de *StuS* es la responsable del aumento de la estabilidad térmica de la construcción híbrida *StuS/TaeL* y en la enzima de tubérculo de papa (*StuS/StuL*). Esto es compatible con la formación del -S-S- intracatenario de subunidades S que confiere estabilidad frente a cambios en la temperatura [139]. Visto que las construcciones que tenían a *StuS* presentaban estabilidad frente a aumentos de temperatura, y que este comportamiento estaba ausente en las estructuras integradas por *TaeS*, decidimos evaluar si los híbridos que tenían a esta última presentaban estabilidad frente a elevada temperatura en presencia de alguno de los efectores comunes a estas enzimas, 3PGA, Pi y Fru6P. Los ensayos se realizaron de la misma manera, con la diferencia de que se evaluaron dos temperaturas: 4 °C (control) y 55 °C, durante 5 min, en presencia de 5 mM de cada uno de los efectores. Posteriormente se evaluó la actividad enzimática remanente. En la Figura 29 se presentan los resultados y, como puede observarse, el agregado de Pi, 3PGA y Fru6P confiere a *TaeS/TaeL* una estabilidad térmica aumentada, manteniéndose niveles de actividad remanente del 80, 50 y 30%, respectivamente, luego del tratamiento. Mientras que para *TaeS/StuL* ninguno de los efectores evaluados le confiere protección o estabilidad frente al aumento de temperatura. Estos resultados indican que la subunidad *TaeL*, en presencia de efectores (particularmente el Pi), estabiliza al heterotetrámero *TaeS/TaeL* incrementándole la estabilidad frente a altas temperaturas. Estos resultados también indican que la protección brindada por la unión de efectores tiene una efectividad diferente a la que tiene lugar por el mecanismo de formación de un -S-S- intercatenario entre subunidades S que se establece en las estructuras proteicas conteniendo *TaeS*.

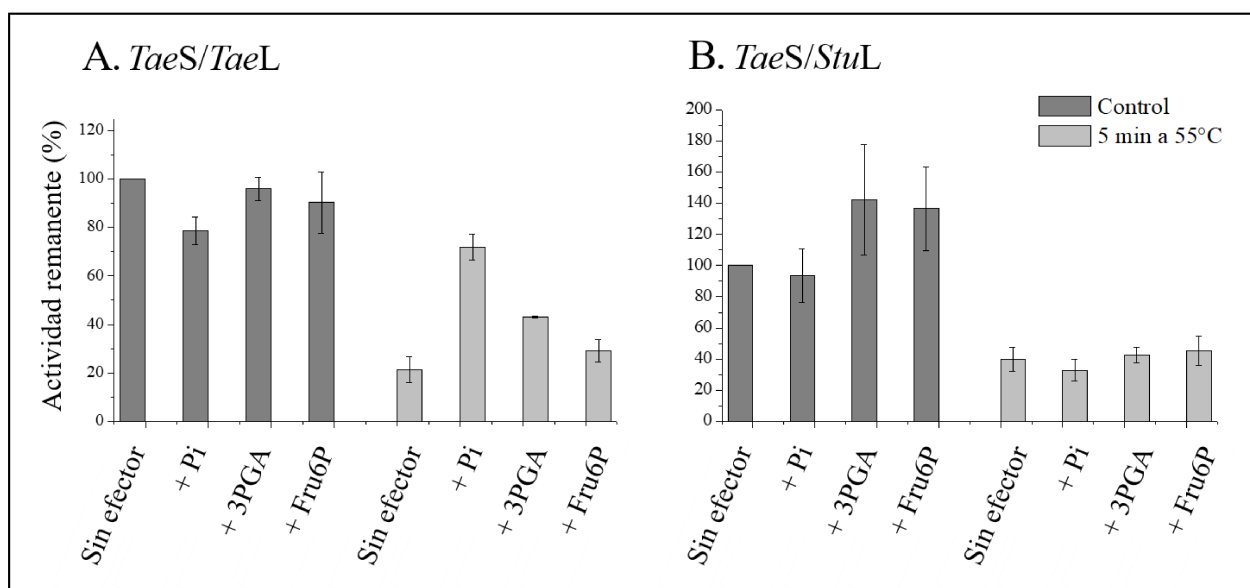


Figura 29: Actividad remanente luego del tratamiento térmico de 5 min a 55 °C en presencia de efectores de (A) *TaeS/TaeL* y (B) *TaeS/StuL*, con sus respectivos controles mantenidos a 4°C.

Los resultados arriba descritos ponen en evidencia que el híbrido *StuS/TaeL* tiene aplicaciones biotecnológicas potenciales. Una forma de aumentar el rendimiento de producción en un clima más cálido sería diseñando una ADPGlcPPasa estable al calor [158]. En este trabajo, el híbrido *StuS/TaeL* exhibió una mayor estabilidad al calor y propiedades alostéricas similares a la enzima de tipo salvaje *TaeS/TaeL*. Así, que esta construcción híbrida podría producir una planta de trigo transgénico estable al calor, sin cambios importantes en la fisiología. Anteriormente, se construyó una planta de trigo transgénica utilizando la subunidad L de la ADPGlcPPasa de maíz genéticamente modificada con una subunidad S mutante de papa/maíz [159]. A través de estos ensayos, los autores observaron un mayor rendimiento, pero sólo en un entorno con condiciones sin estrés. A diferencia de esto último, el híbrido de papa/trigo que proponemos contiene los genes de subunidades S y L de dos cultivos agrícolas importantes que permanecen inalterados.

4.2 Modificación postraduccional por fosforilación de la ADPGlcPPasa

Como se mencionó en el capítulo introductorio, el desarrollo de las semillas está genéticamente programado y comprende una red compleja de señales que involucra no sólo a los azúcares (Glc y sacarosa), sino también a la hormona ABA y a las quinasas de proteínas de la familia SnRK1/CDPK, que llevan a que compuestos de reserva sean acumulados [33, 105, 107, 108]. Estas últimas se encargan de regular postraduccionalmente por fosforilación a diferentes actores del metabolismo [110]. Es bien sabido que la fosforilación de proteínas es una de las modificaciones postraduccionales más comunes e importantes. Un gran número de procesos biológicos están regulados por fosforilación, no sólo los actores del metabolismo, sino también aquellos involucrados con la homeostasis, la señalización y comunicación celular, la transcripción, traducción y degradación de proteínas [160, 161]. Se han llevado a cabo análisis fosfoproteómicos para dilucidar el crecimiento, desarrollo y diversos mecanismos de respuesta de las plantas en diferentes especies como *Arabidopsis thaliana*, maíz, arroz, *Brachypodium distachyon* y trigo [162–164]. Estas investigaciones demostraron que varias proteínas relacionadas con el estrés estaban fosforiladas en distintas condiciones y que esta modificación postraduccional puede activar algunas enzimas involucradas en la síntesis de almidón y aumentar las interacciones físicas entre esas enzimas, lo que sugiere el papel importante de la fosforilación de proteínas en respuesta a diversos cambios.

4.2.1 Estudios *in vivo* acerca de la fosforilación de proteínas en semillas de trigo y ricino

En base a estos antecedentes, resulta relevante el estudio de la fosforilación de proteínas a lo largo del desarrollo de las semillas, para entender cómo esta modificación postraduccional está involucrada en la partición del carbono en diferentes especies de plantas que lleva a que acumulen sus compuestos de reserva. En las semillas, el carbono usualmente se acumula en forma de carbohidratos (almidón) y/o lípidos (TAG). La producción de almidón y la síntesis *de novo* de AG toma lugar dentro del plástido e involucra a distintas enzimas que particionan el carbono hacia una u otra vía. En este trabajo, se utilizaron como modelo semillas de trigo (*Triticum aestivum*) y semillas de ricino (*Ricinus communis*) ya que ambas acumulan sus reservas en el endosperma, pero trigo lo hace principalmente en forma de almidón mientras que en ricino en forma de TAG [92].

4.2.1.1 Clasificación de las semillas y determinaciones de parámetros de desarrollo

En una primera instancia, es necesario definir las distintas etapas del desarrollo de las semillas estudiadas. Tal como se indicó en la Introducción, el crecimiento de las semillas está genéticamente programado y comprende tres fases: de proliferación celular, de transición y de maduración/almacenamiento [33]. En trigo se conoce que el desarrollo de las semillas, hasta su completa maduración y disecación, lleva aproximadamente 45 DPA, siendo la fase de proliferación celular entre los 0-10 DPA, la fase de acumulación de reservas entre los 11-30 DPA y la fase de maduración y disecación entre los 30-45 DPA¹ [165]. El desarrollo de las semillas de ricino también comprende tres períodos: uno donde se desarrolla el embrión y la cutícula (entre los 0-20 DPP), un segundo período en donde se sintetizan y acumulan la mayor porción de proteínas y lípidos (entre los 20-40 DPP) y un tercero donde se produce la maduración y disecación de la semilla (entre los 40-60 DPP) [166]. Teniendo esto presente, y con el objetivo de abarcar los distintos estadios de desarrollo, se recolectaron semillas en 6 oportunidades para abarcar las distintas fases mencionadas. Las muestras recolectadas se corresponden en el caso de trigo con los DPA; mientras que en el de ricino, luego de la clasificación morfológica realizada según lo descrito anteriormente [127], a los DPP según se describe en la Tabla 8.

Tabla 8: Muestras seleccionadas y clasificadas a partir de semillas de trigo y ricino a distintos días posteriores a la antesis (DPA) y posteriores a la polinización (DPP), respectivamente.

Muestra	1	2	3	4	5	6
Trigo (DPA)	3	6	10	14	17	27
Ricino (DPP)	5	10	20	25	35	50

Se determinaron los parámetros de desarrollo de las semillas recolectadas: peso fresco, proteínas totales, concentración de almidón y de TAG (Figura 30). El peso fresco se determinó en las semillas recién cosechadas según lo descrito en el punto 3.6.1 de la sección Materiales y Métodos.

¹ http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/WheatBP/Documents/DOC_WheatBP.php

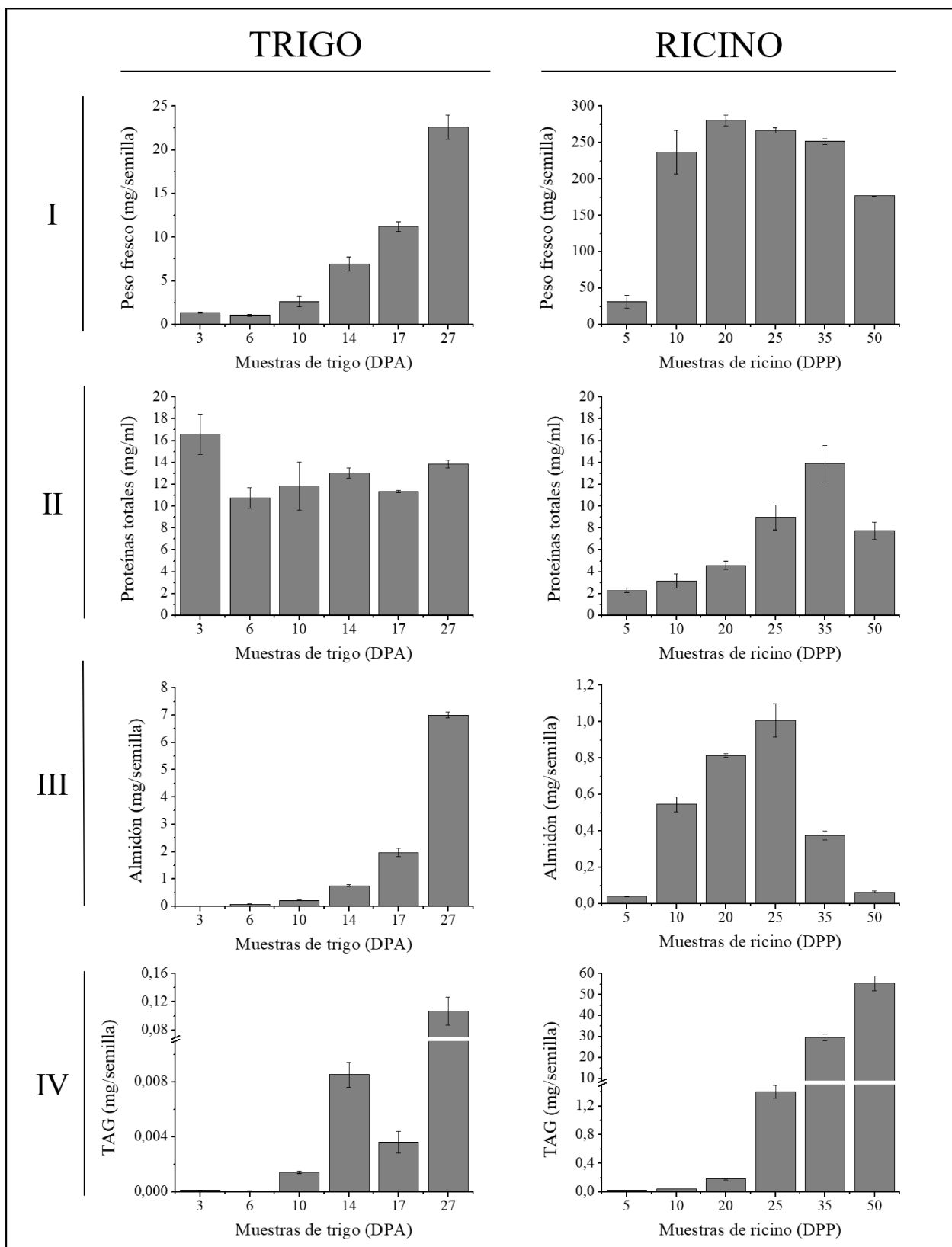


Figura 30: Parámetros de desarrollo para las distintas muestras de semillas de trigo y de ricino: (I) peso fresco, (II) concentración de proteínas totales, (III) almidón y (IV) TAG. DPP: días posteriores a la polinización. DPA: días posteriores a la anthesis.

Los perfiles de peso fresco en función del desarrollo observados en la Figura 30-I coinciden con los determinados anteriormente para semillas de trigo [167] y de ricino [127]. Además, es necesario destacar que estos valores fueron de utilidad para las determinaciones posteriores. En la Figura 30-II se muestra la concentración de proteínas totales obtenidas para cada muestra según lo descrito en las secciones 3.3.3 y 3.6.2 de Materiales y Métodos. Al analizar las distintas muestras de trigo, se observa que el contenido total de proteínas tiene poca variación a lo largo del desarrollo, mientras que en ricino se incrementa de manera significativa llegando a aumentar hasta 6 veces desde la muestra 1 a la 5.

Para cuantificar el contenido de almidón y TAG en las muestras, se utilizaron protocolos de extracción descritos para cada tipo de compuesto, adaptados a estos casos. Luego de extraídos, los compuestos se sometieron a digestión enzimática, y la glucosa o glicerol liberados se determinaron por técnicas colorimétricas (secciones 3.6.4 y 3.6.5 de Materiales y Métodos). Las cantidades obtenidas en cada caso se expresaron en mg por semilla. Como puede observarse en la Figura 30-III y IV, en trigo el carbono se acumula principalmente en forma de almidón, tal como se ha informado para esta especie [167, 168]. A través de un análisis de las cantidades acumuladas puede observarse que entre los 14 y 17 DPA, el almidón aumenta 2 veces, mientras que entre los 17 y 27 DPA, el aumento es de 5 veces. A pesar de que una pequeña proporción del carbono se acumula en forma de TAG entre los 14 y 27 DPA, la proporción de almidón presente es ~70 veces más elevada. Estas proporciones se condicen con lo descrito en otros trabajos [168]. Para el caso de ricino, las determinaciones representadas en función del desarrollo muestran que: i) entre los 5 y 20 DPP las semillas acumulan principalmente almidón, ii) a los 25 DPP el almidón llega a su máxima cantidad y los TAG lo equiparan y iii) entre los 35 y 50 DPP el almidón disminuye hasta ser insignificante y los TAG se acumulan llegando a constituir el 30% (peso/peso fresco) de la semilla. Estos valores concuerdan con lo descrito anteriormente para cantidades de almidón y TAG en semillas de ricino [166].

Las determinaciones realizadas, en conjunto con los antecedentes bibliográficos, nos permitieron considerar para ambas semillas que: i) las muestras 1-3 serían representativas de la fase de proliferación celular, ii) la muestra 4 podría ser considerada como la fase de transición y iii) que las muestras 5-6 se corresponderían con la fase de maduración y acumulación de compuestos de reserva.

4.2.1.2 Purificación de proteínas fosforiladas a partir de extractos crudos de semillas e inmunodetecciones

A partir de los extractos de proteínas totales, una fracción de los mismos se utilizó para purificar las proteínas fosforiladas por cromatografía IMAC-Fe³⁺ según se describe en el punto 3.6.6 de la sección Materiales y Métodos. La IMAC-Fe³⁺ es una cromatografía que adsorbe selectivamente proteínas fosforiladas mediante enlaces de coordinación entre los fosfatos de las proteínas y los iones Fe³⁺ quelados a una matriz de gel de agarosa ácido iminodiacético (IDA) [132]. Las proteínas adsorbidas son luego eluidas por un aumento de pH de manera escalonada. Cabe destacar, que este tipo de cromatografía se realizó en los extractos crudos de semillas en condiciones nativas, por lo que la detección de las proteínas adsorbidas puede deberse no sólo a la fosforilación de las mismas, sino que también a la fosforilación de otras proteínas con las que estén interaccionando.

Tanto las muestras conteniendo el extracto total, como las enriquecidas en proteínas fosforiladas se utilizaron para detectar aquellas macromoléculas de interés con anticuerpos específicos. En la Figura 31 se muestran los perfiles electroforéticos (SDS-PAGE con reductor) de las muestras para las proteínas totales y de la fracción enriquecida en proteínas fosforiladas revelados con *Coomasie Blue*. En el caso de los extractos totales, se utilizó la misma cantidad de proteína para cada muestra. Cuando se trató de las fracciones enriquecidas en proteínas fosforiladas, la cromatografía se realizó con la misma cantidad inicial de proteínas, cada una de las muestras se trató de manera idéntica y se sembró en el SDS-PAGE el mismo volumen.

Al analizar los perfiles electroforéticos para las proteínas totales (Figura 31-A), se observan diferencias en cada caso. En trigo el perfil de proteínas es similar a lo largo del desarrollo, mientras que en ricino varía. Al analizar los perfiles electroforéticos obtenidos para las muestras enriquecidas en proteínas fosforiladas (Figura 31-B) se observa que hay fosfopéptidos en todas las muestras. En trigo el patrón de proteínas fosforiladas es similar a lo largo de todo el desarrollo, aunque la cantidad de proteínas fosforiladas se incrementaría a lo largo del proceso. En cambio, en ricino el patrón de proteínas fosforiladas es variable durante el desarrollo, con diferencias aún más marcadas hacia las etapas tardías.

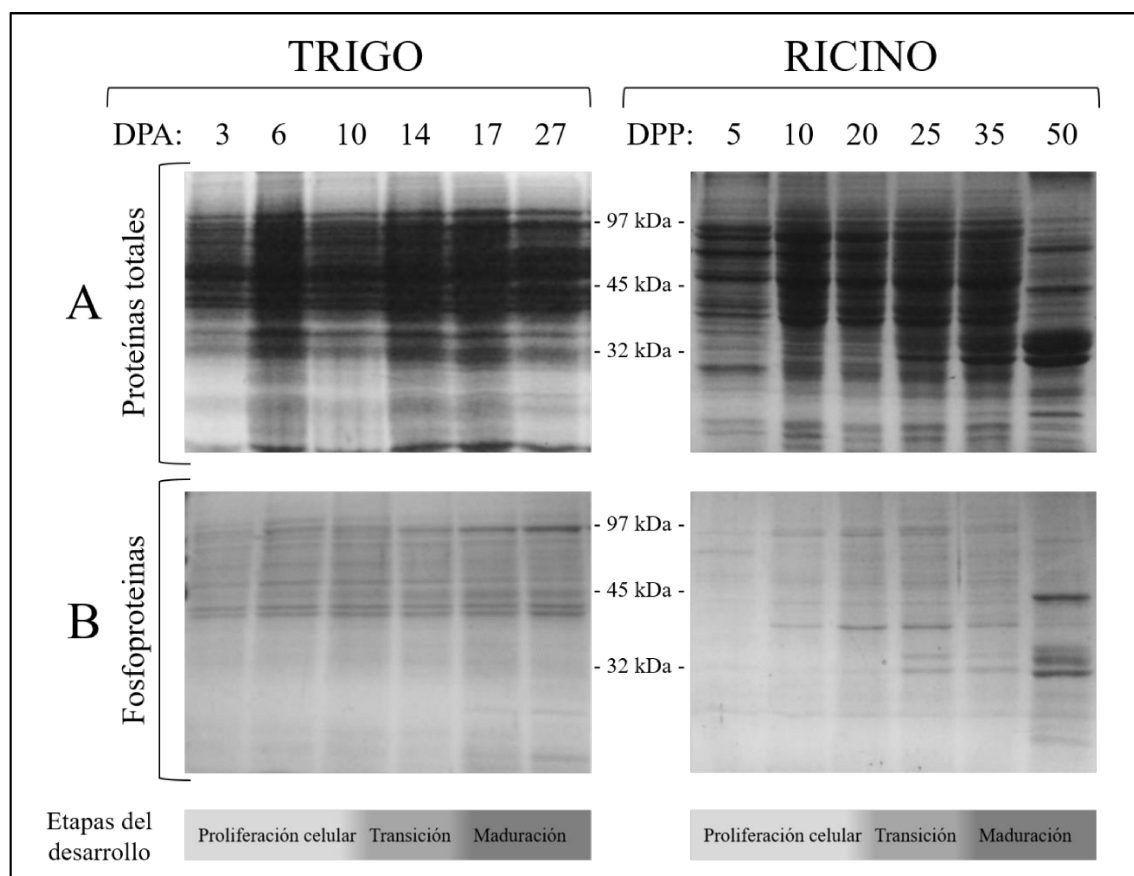


Figura 31: Perfiles electroforéticos (SDS-PAGE con reductor) de (A) las proteínas totales y de (B) las fosfoproteínas purificadas mediante IMAC-Fe³⁺ de las muestras de semillas de trigo y de ricino a lo largo del desarrollo. DPP: días posteriores a la polinización. DPA: días posteriores a la antesis.

Se utilizaron geles idénticos a los mostrados en la Figura 31 para realizar el revelado por electrotransferencia seguida de inmunodetección con anticuerpos específicos, tal como se describe en la sección 3.3.6 de Materiales y Métodos. Realizamos un análisis exploratorio de varias enzimas claves en el metabolismo del carbono, pero en este trabajo de tesis se presentan sólo los obtenidos para la ADPGlcPPasa.

En primer lugar utilizamos anticuerpos policlonales contra la ADPGlcPPasa de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) obtenidos a partir de su fuente natural [73], realizando la inmunodetección de los SDS-PAGE electrotransferidos tanto para los extractos de proteínas totales como de aquellos enriquecidos en proteínas fosforiladas mediante IMAC-Fe³⁺ para ambas semillas estudiadas. Como control de presencia y estabilidad de las proteínas totales se utilizaron anticuerpos específicos contra las actinas. Como se observa en la Figura 32, se detectaron péptidos inmunoreactivos correspondientes a la ADPGlcPPasa entre las muestras de proteínas totales de semillas de ricino y de trigo (Figura 32-A). Para el caso de ricino, se observan principalmente 3 polipéptidos alrededor de 47-73 kDa que se mantienen prácticamente constantes durante la fase de

proliferación celular (5 a 20 DPP) y la de transición (25 DPP); pero hacia la fase de maduración la proteína disminuye abruptamente (35 a 50 DPP) en conjunto con la disminución del control de actinas (Figura 32-C). Para el caso de las muestras de trigo, se observan polipéptidos (entre 47-73 kDa) con mayor intensidad a partir de los 6 DPA, los cuales se mantienen constantes a lo largo del desarrollo al igual que el respectivo control de actinas (Figura 32-C). Cabe destacar, que hasta el presente no se han realizado estudios de cómo varía esta enzima en semillas de trigo y de ricino durante el desarrollo. De hecho, en ricino no se había descrito la ocurrencia de esta enzima en las semillas.

Luego del enriquecimiento en proteínas fosforiladas (Figura 32-B), únicamente se detectó a la ADPGlcPPasa en las muestras de trigo, pero no en las de ricino. Tal como se observa en la Figura 32-B, la fosforilación de la enzima se enriqueció principalmente durante las fases de transición y maduración (14-27 DPA). Este resultado evidencia la modificación postraduccional por fosforilación de la ADPGlcPPasa en semillas de trigo (y posiblemente sea un hecho común en cereales) a lo largo del desarrollo.

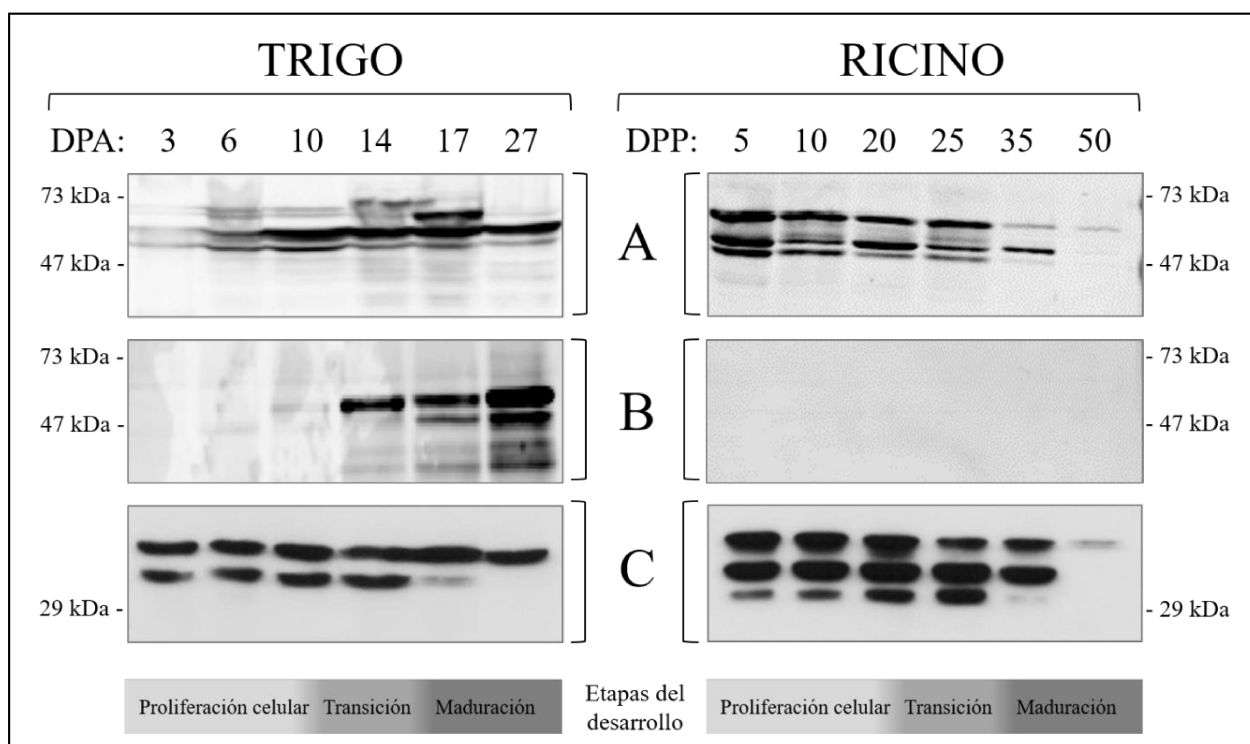


Figura 32: Inmunodetecciones en las muestras de semillas de trigo y de ricino a lo largo del desarrollo: (A) proteínas totales y (B) fosfoproteínas purificadas mediante IMAC-Fe³⁺, evaluadas con anticuerpos anti-*Sol*ADPGlcPPasa obtenidos a partir de la enzima purificada de hojas de *Spinacia oleracea* [73]. Control de carga: (C) proteínas totales evaluadas con anticuerpos anti-actina de plantas. DPP: días posteriores a la polinización. DPA: días posteriores a la antesis.

Tal como se mencionó en el capítulo introductorio, la ADPGlcPPasa de plantas superiores está compuesta por subunidades pequeñas o S (~50-53 kDa) y subunidades grandes o L (~54-60 kDa), que conforman una estructura cuaternaria de heterotetrámero (S₂L₂). A partir de los resultados anteriores y con el objetivo de profundizar acerca de la fosforilación de la ADPGlcPPasa de trigo, evaluamos el perfil de ocurrencia de cada una de las subunidades que componen a la misma en las distintas muestras a lo largo del desarrollo. Para esto utilizamos anticuerpos obtenidos contra las subunidades recombinantes de la ADPGlcPPasa de trigo (producción y purificación en la sección 3.4.10 de Materiales y Métodos). Como puede observarse en la Figura 33, se detectaron péptidos inmunoreactivos entre las proteínas totales tanto para la subunidad S (Figura 33-I.A) como para la subunidad L (Figura 33-I.B), con un patrón de ocurrencia similar en los 3 primeros estadios de desarrollo (3-10 DPA) y que aumentan a partir de la fase de transición hacia la maduración (14-27 DPA), tal como se observó también en la Figura 32. Ambas subunidades, S (Figura 33-II.A) y L (Figura 33-II.B), se recuperaron entre las proteínas fosforiladas sólo a partir de la fase de transición hacia la maduración (14-27 DPA). Específicamente, se observa que los péptidos recuperados son aquellos de mayor masa molecular respecto de los detectados entre las proteínas totales. Este resultado se condice con los obtenidos anteriormente, y sugiere que cualquiera de las dos subunidades estaría fosforilada y que, incluso, habría distintas isoformas de cada una.

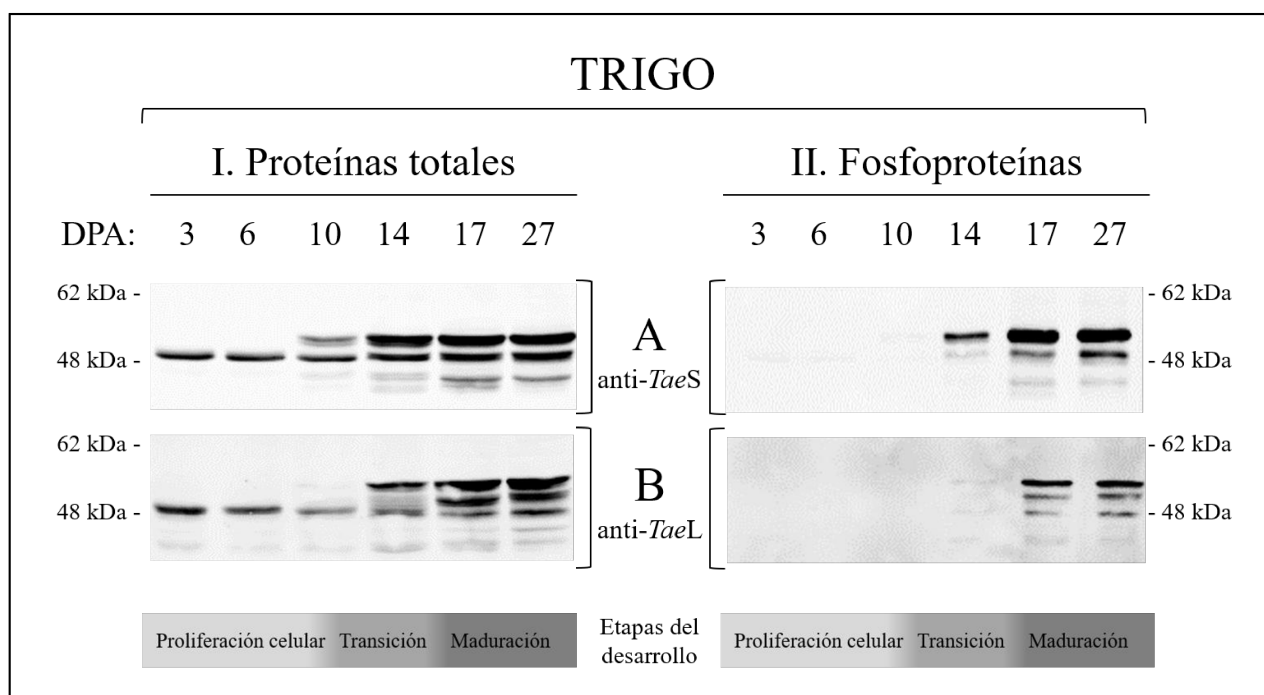


Figura 33: Inmunodetecciones en las muestras de semillas de trigo a lo largo del desarrollo: proteínas totales (I) y fosfoproteínas purificadas mediante IMAC-Fe³⁺ (II) evaluadas con anticuerpos específicos para las subunidades de la *Tae*ADPGlcPPasa: anti-*Tae*S (A) y anti-*Tae*L (B) obtenidos a partir de su producción recombinante. DPA: días posteriores a la antesis.

La presencia de varias bandas peptídicas que inmunoreaccionan a lo largo del desarrollo puede deberse a una inespecificidad de los anticuerpos utilizados, a modificaciones postraduccionales en la enzima, a la degradación/proteólisis o presencia de isoformas. Para el caso específico de semillas de trigo se ha propuesto que existen dos isoformas de cada una de las subunidades de la ADPGlcPPasa, que se expresan de manera diferencial a lo largo del desarrollo [65, 72, 169].

Con el fin de evaluar la presencia de quinasas de la de las familias SnRK y CDPK en los extractos de proteínas totales de las semillas de trigo, realizamos inmunodetecciones para las mismas. Para esto, se realizaron extracciones en condiciones desnaturalizantes, como se describe en la sección 3.6.3 de Materiales y Métodos, ya que, a partir de los extractos en condiciones nativas, estas quinasas no se detectaron. Utilizamos anticuerpos monoclonales contra la subunidad α de la AMPK fosforilada en la Thr172, ya que se demostró que es útil para detectar SnRK en plantas [134]. Esto se debe a que la Thr172 y los aminoácidos circundantes, que constituyen al bucle de activación de las quinasas relacionadas con AMPK, está altamente conservado entre las especies de plantas. Para el caso de las CDPK, se utilizaron anticuerpos policlonales contra diversas isoformas de esta quinasas. En la Figura 34 se presentan los resultados de inmunodetección.

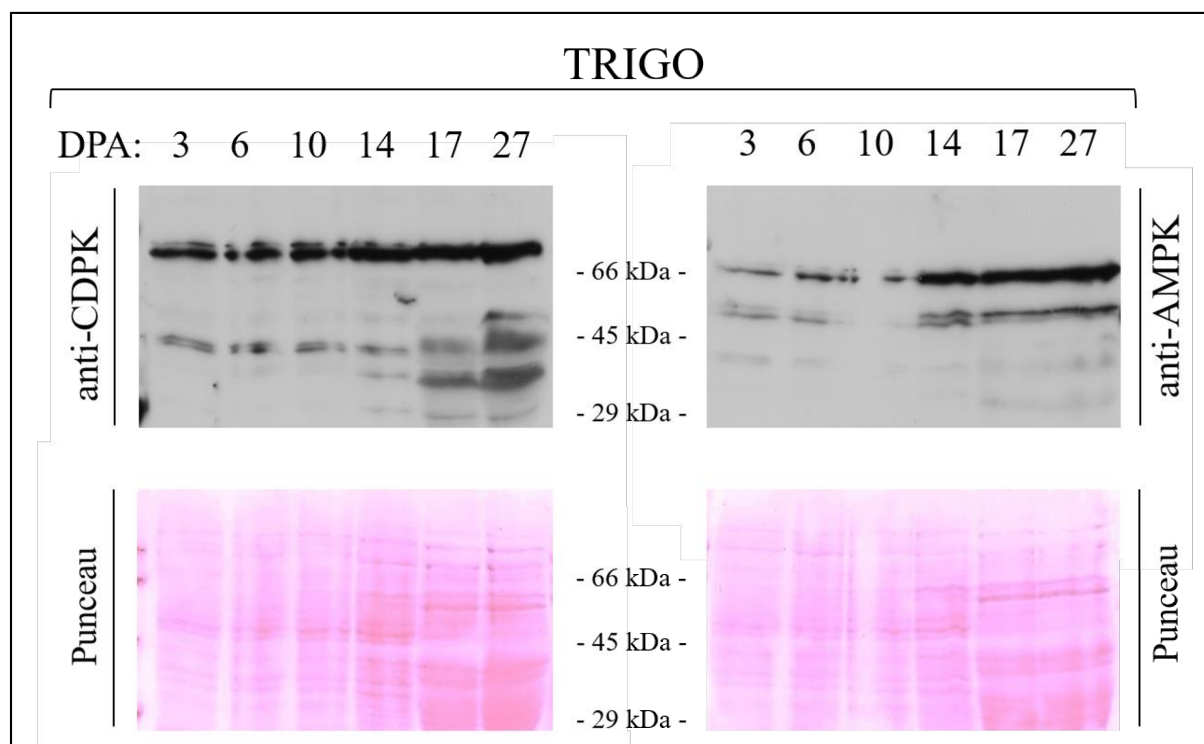


Figura 34: Inmunodetecciones en las muestras de semillas de trigo a lo largo del desarrollo, evaluadas con anticuerpos específicos para las quinasas de proteínas de la familia CDPK y SnRK: anti-CDPK [Agrisera] y anti-AMPK [anti phospho-AMPK α (Thr172) Cell Signaling Technology], respectivamente. DPA: días posteriores a la antesis.

Para las quinasas de la familia CDPK, se detectó un péptido por encima de los 60 kDa y varios péptidos alrededor de los 45 kDa a lo largo de todo el desarrollo de las semillas. Para las quinasas de la familia SnRK, se detectó más de un péptido entre los 45 y 66 kDa y esta señal aumenta hacia los estadios de acumulación de reservas. Las masas moleculares detectadas están en torno a las informadas para estas familias de quinasas (entre los 45-68 kDa) [170, 171]. La presencia de más de un péptido puede deberse a diferentes isoformas o a modificaciones postraduccionales, como lo sugieren estudios previos [170, 172]. A partir de estos resultados se pone en evidencia que la presencia de las quinasas de las familias SnRK y CDPK se condice con los estadios de desarrollo donde la ADPGlcPPasa de trigo se encuentra fosforilada, esto es a partir de la fase de transición hacia la de maduración y acumulación de compuestos de reserva.

4.2.1.3 Ensayos de desfosforilación y posterior purificación por IMAC-Fe³⁺

Aunque se ha demostrado que la purificación por IMAC Fe³⁺ efectivamente puede separar la versión fosforilada de una proteína [132] y que es de gran utilidad para enriquecer muestras complejas en proteínas fosforiladas [173], esta no es una cromatografía específica, ya que la adsorción ocurre principalmente por interacción de cargas. Debido a esto, es deseable tener mayor evidencia experimental que apoye que la purificación de una proteína por IMAC-Fe²⁺ está relacionada a su fosforilación y no una interacción inespecífica debida a una distribución particular de cargas. Una de las estrategias que se puede utilizar en tal sentido es la de tratar a la proteína fosforilada con fosfatasas, para así eliminar la fosforilación y luego realizar la cromatografía por IMAC-Fe³⁺ para evaluar si la proteína desfosforilada sigue interaccionando o no con la matriz. Realizamos esta evaluación para confirmar la fosforilación de la ADPGlcPPasa en las semillas de trigo, según el procedimiento y los resultados se detallan a continuación.

Se seleccionaron semillas de trigo a los 17 DPA debido a que en este estadio la ADPGlcPPasa fue identificada entre las fosfoproteínas aisladas. La desfosforilación de la muestra se realizó según se indica la sección 3.6.6 de Materiales y Métodos, incubando los extractos en presencia o en ausencia de fosfatasa alcalina comercial. Luego las muestras se purificaron mediante cromatografía IMAC-Fe³⁺ y las eluciones se acondicionaron con *buffer* para SDS-PAGE con reductor. Se realizó una corrida electroforética con posterior revelado por electrotransferencia seguida de inmunodetección con anticuerpos específicos. En la Figura 35 se muestra la inmunodetección para las muestras no tratadas (control) como las tratadas antes (carga) y después (elusión) de la IMAC-Fe³⁺. Se puede observar que los péptidos correspondientes a la ADPGlcPPasa dejan de detectarse en las eluciones de la cromatografía IMAC-Fe³⁺ posteriormente a la desfosforilación de la muestra (Figura 35.B-II), aun cuando la proteína se detecta en la muestra sembrada en la cromatografía

(Figura 35.B-I). Estos resultados evidencian que la *TaeADPGlcPPasa* presente en los extractos de semillas es capturada específicamente por la IMAC-Fe³⁺ debido a su fosforilación y no por interacciones inespecíficas con la matriz utilizada.

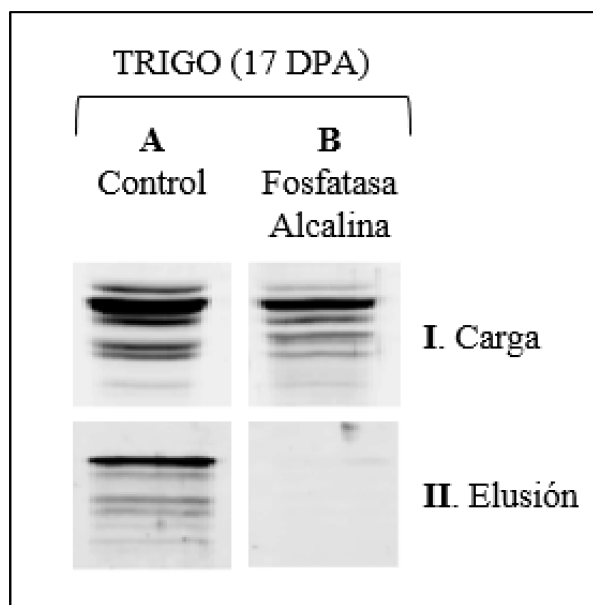


Figura 35: Inmunodetecciones con anticuerpos anti-*SolADPGlcPPasa* para los ensayos de desfosforilación y posterior purificación por IMAC-Fe³⁺ de extractos de proteínas totales de semillas de trigo a los 17 DPA: (A) Muestra control sin tratamiento, (B) muestra tratada con Fosfatasa Alcalina; (I) antes y (II) después de la purificación por IMAC-Fe³⁺.

4.2.1.4 Determinación de la actividad ADPGlcPPasa en extractos de proteínas totales

La ADPGlcPPasa cataliza *in vivo* la síntesis de ADPGlc y PPi a partir de ATP y Glc1P, esta reacción es el paso clave y más regulado de la síntesis de almidón en plantas [30, 55, 56, 62]. Determinamos la actividad ADPGlcPPasa en los extractos de proteínas totales de semillas de trigo y de ricino, en sentido de síntesis de ADPGlc tal como se describe en la sección 3.5.1.1 de Materiales y Métodos. En la Figura 36 se muestran los valores de actividad enzimática expresados en U/mg de proteínas totales para las distintas muestras. Como puede observarse, se detectó actividad de la enzima en ambas semillas. En las muestras de trigo, la actividad aumenta desde el comienzo del desarrollo hacia la maduración y acumulación de compuestos de reserva donde es máxima, llegando a valores cercanos a 0,7 U/mg. Con respecto a las muestras de ricino, la actividad ADPGlcPPasa se mantiene alrededor de 0,25 U/mg en las fases de proliferación celular y transición (5-20 DPP) y luego disminuye ~4 veces hacia la fase de maduración y acumulación de compuestos de reserva. Además, al comparar los perfiles de actividad de la ADPGlcPPasa a lo largo del desarrollo de ambas semillas, se observa que durante la fase de proliferación celular los niveles son comparables en ambos casos (~0,2 U/mg), pero en la etapa de maduración y acumulación de compuestos de reserva, en trigo, esta enzima aumenta su actividad, lo cual se condice con la acumulación de almidón en

esta semilla (Figura 30-III), al contrario de lo que ocurre en ricino que disminuye considerablemente. Para el caso particular de semillas de trigo, nuestros resultados están de acuerdo con estudios realizados de transcriptómica y de detección de niveles de actividad a lo largo del desarrollo de la semilla del cereal [169].

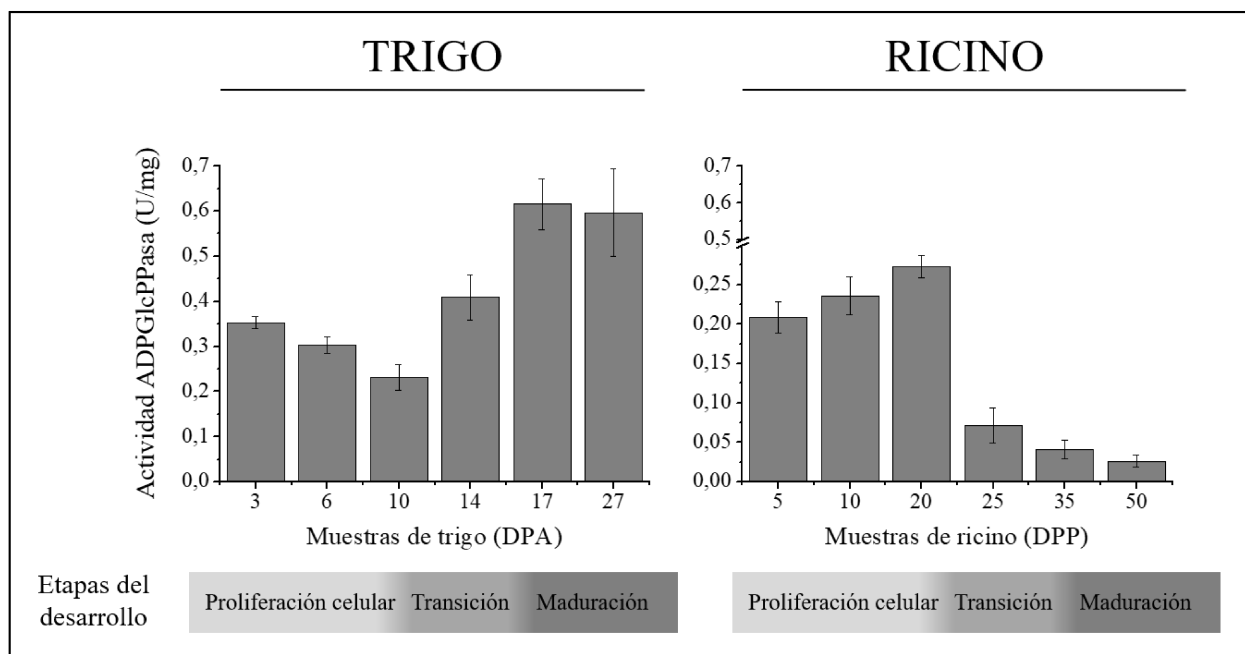


Figura 36: Determinación de la actividad ADPGlcPPasa en las muestras de semillas de trigo (I) y de ricino (II) a lo largo del desarrollo. DPP: días posteriores a la polinización. DPA: días posteriores a la antesis.

A partir de los resultados obtenidos en las inmunodetecciones y determinaciones analíticas, se puede sugerir que alguna de las dos subunidades, o ambas, de la ADPGlcPPasa de endosperma de trigo, está fosforilada en los últimos estadios de desarrollo. Es en esta etapa donde se produce la acumulación de compuestos de reserva en las semillas y donde justamente esta enzima tiene el rol fundamental de proveer de las unidades glucosídicas para la síntesis de almidón. Completando el escenario metabólico, también se detectan quinasas de proteínas de la familia SnRK y CDPK en esta fase. Por el contrario, la ADPGlcPPasa no se observa entre las fosfoproteínas de semillas de ricino, sugiriendo que la misma no sería modificada por fosforilación en el tejido de reserva de este vegetal (lo que probablemente pueda extenderse a lo que ocurre en olegionosas). Asociado a esto, la enzima no tendría un rol crucial en la acumulación de reservas, ya que esta semilla acumula principalmente TAG en lugar de almidón (el que se sintetiza en estadios tempranos como una reserva a corto plazo de carbono).

4.2.2 Fosforilación *in vitro* de la *TaeADPGlcPPasa* recombinante

La fosforilación reversible de proteínas como mecanismo de regulación biológica fue descrita inicialmente por Edmond H. Fischer y Edwin G. Krebs (Premio Nobel en Medicina o Fisiología en el año 1992) hacia fines de la década de 1950. En aquellos años, Fischer y Krebs lograron demostrar que la actividad de la glucógeno fosforilasa (EC 2.4.1.1, la enzima encargada de la degradación del glucógeno en músculo esquelético de animales que podía purificarse en dos estados diferentes) era regulada por un mecanismo de fosforilación reversible [7, 174–177]. A partir de entonces se ha encontrado una gran variedad de proteínas cuyas actividades biológicas se encuentran reguladas *in vivo* por mecanismos de fosforilación-desfosforilación. En las reacciones de fosforilación de proteínas blanco se encuentran involucradas otras proteínas e incluso cascadas de reacciones entre distintas proteínas. Las reacciones de fosforilación involucran a proteínas quinasas que pueden transferir un grupo γ -fosfato del ATP a un residuo de serina (Ser), treonina (Thr) o tirosina (Tyr) de una proteína blanco, generando un grupo fosfo-éster (R-O-PO₃). Las reacciones de desfosforilación, por su parte, involucran a proteínas fosfatasa que son capaces de hidrolizar esos enlaces fosfo-éster, liberando un grupo fosfato y restaurando el residuo aminoácido respectivo a su estado no fosforilado [177, 178].

En los organismos eucariotas está descrito que las proteínas quinasas pueden agruparse en varias superfamilias en base a la homología de sus dominios catalíticos. Así, utilizando análisis filogenéticos basados en el alineamiento de secuencias de tales dominios se clasificaron inicialmente a las proteínas quinasas de eucariotas en 5 superfamilias [179], las cuales posteriormente se ampliaron a 7 [180–184]. Las superfamilias de proteínas quinasas presentes en plantas se muestran en la Tabla 9. Este esquema de clasificación es muy útil debido a que las agrupa en función de sus secuencias catalíticas, así como también en grupos funcionalmente relacionados. En plantas, algunos miembros de las superfamilias están poco representados, lo cual no implica que los mismos no existan, sino que quizás aún no se han puesto en evidencia. Comúnmente, además de la clasificación en diferentes superfamilias, las proteínas quinasas de eucariotas se subdividen en dos grandes grupos: aquellas que fosforilan residuos de Ser o Thr y aquellas que fosforilan residuos de Tyr. En la Tabla9, cuando no se indica el aminoácido que es fosforilado implica que la fosforilación de la proteína blanco ocurre sobre una Ser o Thr.

Tabla 9: Clasificación de las proteínas quinasas de plantas. Tabla construida en base al trabajo de Stone y Walker [181]. Actualizada con datos tomados a partir de revisiones del tema realizadas por otros autores [182–184]. nr: no reportada

Grupo	Familias	Función	Características
AGC	PKA y PKQ (Quinasas dependientes de nucleótidos cíclicos)	nr	Reguladas generalmente por segundos mensajeros (por ej., cAMP, cGMP, diacilglicerol, Ca ²⁺)
	PKC (Quinasas dependientes de Ca ²⁺ y fosfolípidos)	nr	
	S6PVPK (Quinasas ribosomales S6)	Regulan las funciones de las auxinas en partes aéreas de la planta	
CaMK	CDPKs (Quinasas dependientes de calcio/calmodulina)	Quinasas dependientes de Ca ²⁺ , son las más abundantes en plantas. Participan principalmente de mecanismos de señalización desencadenados por estrés	En plantas no requieren de calmodulina, fosfolípidos y diacilglicerol
	SnRK (Proteínas quinasas relacionadas a las SNF1 que en levaduras funcionan en la de-represión del metabolismo del carbono)	Regulan el metabolismo primario central del carbono, el nitrógeno y los lípidos. Hay tres subfamilias: SnRK1, SnRK2 y SnRK3.	Reguladas a nivel transcripcional en respuesta a factores bióticos y abióticos. Activadas por concentraciones elevadas de AMP.
CKI	Relacionadas a quinasas de caseína tipo I	Involucradas en la regulación de vías de reparación, la proliferación celular y la morfogénesis	No se han estudiado bioquímicamente. En Arabidopsis se han identificado 17 genes putativos.
CMGC	CDK (Quinasas dependientes de ciclinas)	Regulan el ciclo celular	No están reguladas por segundos mensajeros. Participan en cascadas de fosforilación
	MAPK (Quinasas activadas por mitógenos)	Regulan la proliferación celular y algunas el ciclo circadiano	
	GSK-3 (Relacionadas a quinasas de glucógeno sintasas)	Involucradas en la respuesta hormonal y el desarrollo de las plantas	

	CKII (Relacionadas a quinasas de caseína tipo II)	Regulan la división celular, el ciclo circadiano, la replicación del ADN, la transcripción y expresión de genes	
STE	Proteínas quinasas que actúan sobre las MAPK	Regulan la actividad de MAPK. Participan en cascadas de regulación	Actúan sólo sobre otras proteínas quinasas
PTK	Quinasas que fosforilan residuos de Tyr	En animales están involucradas en el crecimiento celular, el desarrollo y la oncogénesis	No se han estudiado bioquímicamente. En Arabidopsis se han identificado 57 genes putativos codificantes para estas proteínas quinasas
Otras	RLK (Quinasas similares a receptores)	Reconocen ligandos, autofosforilan su dominio intracelular y propagan la señal	Quinasas extracelulares de membrana. Reconocen señales extracelulares
	CTR1	Involucradas en la respuesta a etileno	Relacionadas a quinasas transmembrana receptoras de citoquinas
	Tsl (<i>TOUSLED</i>)	Regulan el desarrollo de los órganos primordiales (ej., flores)	Se han encontrado sólo en plantas

Las plantas, como otros organismos eucariotas superiores, pueden regular postraduccionalmente su intrincada red metabólica a través de la modificación de proteínas por mecanismos redox y/o por reacciones de fosforilación-desfosforilación, entre otros. Este tipo de regulaciones le permiten a la célula redireccionar su metabolismo según las variaciones del medioambiente extra e intracelular y, además, comunicar por medio de cascadas de transducción de señales las modificaciones celulares necesarias a nivel transcriptómico para adaptarse a estos cambios. La fosforilación de una proteína puede modificar su actividad (activándola o inhibiéndola), su interacción con otras proteínas y/o su localización subcelular. En plantas, se ha informado que la actividad de varias enzimas, que participan del metabolismo primario del carbono y el nitrógeno, se encuentran reguladas por mecanismos de fosforilación-desfosforilación de residuos de Ser o Thr. Algunos ejemplos de ello son la SPSasa [32, 185–187], la PEPCasa [188], la nitrato reductasa

(NRasa) [187, 189, 190], la T6P sintasa (TPSasa) [191], la SucSasa [192–194], la piruvato quinasa [113], la np-Ga3PDHasa [114] y la Ga3PDHasa [115].

Como se mencionó en la sección 4.2.1, la *TaeADPGlcPPasa*, que participa en el paso regulado de la síntesis de almidón en tejidos de reserva, estaría regulada por fosforilación en los últimos estadios de desarrollo de las semillas de trigo. Por otro lado, la ocurrencia de esta enzima en su estado fosforilado está acompañada con un aumento de su actividad específica y de la acumulación de almidón en las semillas. Hasta el presente, no se ha demostrado la fosforilación de la *ADPGlcPPasa*, ni qué familia de quinastas de proteínas estaría involucrada. Estudios en fosfoproteómica y bioinformática realizados en tejidos de plantas sugieren la fosforilación de las subunidades de la *ADPGlcPPasa* mediante identificación de péptidos con espectrometría de masas y análisis *in silico* [43, 77, 78, 195]. Los fosfopéptidos encontrados para la subunidad L no están altamente conservados entre las especies, mientras que aquellos identificados para la subunidad S están en una región altamente conservada. Particularmente, se encontraron péptidos fosforilados de la *ADPGlcPPasa* durante etapas tempranas de la germinación de semillas de arroz, y esto estaba acompañado con la acumulación de almidón en el embrión durante esta fase de desarrollo [196]. En muestras de hojas de *Arabidopsis* y de endosperma de maíz, se encontraron fosforilados péptidos pertenecientes a las subunidades S y L de la *ADPGlcPPasa* [195, 197–199]. En estudios de proteómica y fosfoproteómica, tanto en etapas tempranas de la germinación como en etapas tardías del desarrollo de semillas de trigo, la *ADPGlcPPasa* se encontró fosforilada [162, 200, 201]. Más recientemente [202], se han realizado estudios fosfoproteómicos comparativos en semillas de esta especie que durante el desarrollo fueron fertilizadas con altas concentraciones de nitrógeno, donde se observó que las subunidades L y S de la *ADPGlcPPasa* estarían fosforiladas en mayor medida hacia el final del desarrollo de las semillas (tanto con o sin tratamiento), lo que sugiere que esta modificación regula la actividad de la enzima en respuesta a los cambios nutricionales.

Con los antecedentes arriba detallados, nos planteamos analizar la fosforilación *in vitro* de la *TaeADPGlcPPasa* recombinante, con el propósito de identificar el proceso a nivel molecular, tanto respecto a las subunidades que componen la enzima como identificar qué familia de quinastas de proteínas interviene en esta modificación postraduccional.

4.2.2.1 Fosforilación de la *TaeADPGlcPPasa* y análisis de la familia de quinastas involucrada.

Para realizar los ensayos de fosforilación *in vitro* es indispensable tener a la enzima recombinante y así poder estudiarla de manera aislada. La producción y caracterización de la *TaeADPGlcPPasa* se detalla con precisión en la sección 4.1, pero es necesario destacar que se

procedió al cambio del sistema de expresión recombinante por lo indicado en la Figura 37. Esta modificación se debió a que el sistema empleado para la caracterización cinética (sección 4.1), que utiliza el vector pET28c, adiciona cinco residuos de Ser (entre el His-tag y el sitio de múltiple clonado del vector) que son putativas de ser fosforiladas, tal como se indica en estudios realizados por Du, *et al.* en 2005 [203]. Brevemente, el sistema utilizado se basa en reemplazar el vector pET28c por el vector pET19TEV, el cual no tiene las Ser anteriormente mencionadas y, además, posee un sitio codificante para la secuencia diana de la proteasa TEV (del inglés *tobacco etch virus protease*) entre el His-tag y el sitio de múltiple clonado. Esto permite que, una vez purificada la enzima recombinante, se le pueda retirar el His-tag por tratamiento con la proteasa. Una vez clonados los genes en este nuevo sistema, se expresaron en células de *E. coli* BL21(DE3) y las versiones recombinantes fueron purificadas con alto grado de pureza siguiendo lo descrito en las secciones 3.4.9 y 3.4.10 de Materiales y Métodos, respectivamente.

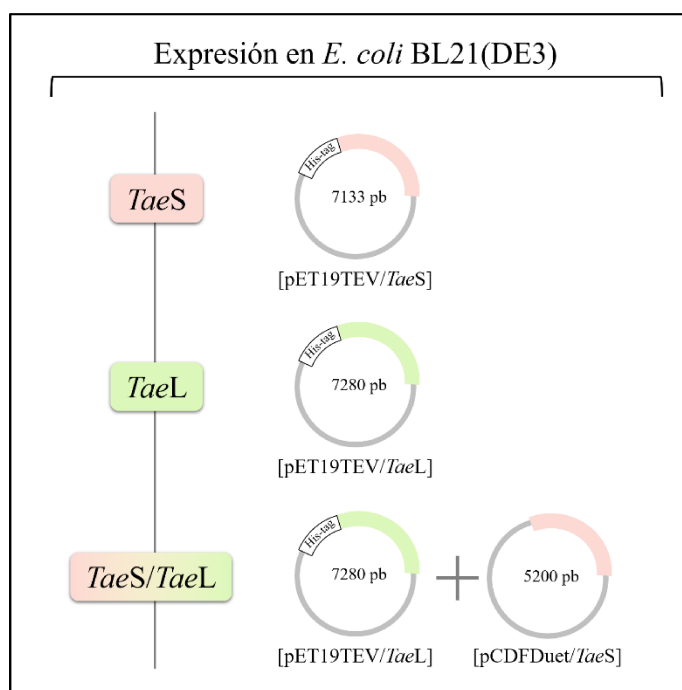


Figura 37: Construcciones utilizadas para la transformación de células de *E. coli* BL21(DE3) y la posterior expresión de las distintas versiones de la *TaeADPGlcPPasa*: de manera individual (*TaeS* y *TaeL*) y coexpresadas (*TaeL/TaeS*).

Para avanzar en la identificación de la familia de quinasas involucrada en la fosforilación de proteínas observadas en los extractos vegetales, realizamos ensayos de fosforilación de la *TaeADPGlcPPasa* recombinante purificada (en sus formas homo- y hétero-oligoméricas) utilizando, como fuente de quinasas, extractos de proteínas de semillas de trigo a los 17 DPA (que es uno de los estadios en donde se recuperaron fosfopéptidos pertenecientes a la *ADPGlcPPasa*). Se utilizaron dos condiciones de fosforilación: para favorecer la actividad de quinasas de proteínas dependientes

o independientes de Ca^{2+} . El ensayo se llevó a cabo según como se describe en la sección 3.7.1 de Materiales y Métodos, utilizando $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}$, lo que permite visualizar la transferencia de la marca radioactiva del ATP a la proteína blanco por exposición a una placa de *Storage Phosphor* luego de separar electroforéticamente la mezcla de reacción por SDS-PAGE. Se utilizó como control positivo de la fosforilación a la *TaeGa3PDHase* recombinante, ya que en estudios previos se puso en evidencia su fosforilación por las quinasas de la familia SnRK1 (independientes de Ca^{2+}) [115]. El extracto de endosperma se obtuvo tal como se indica en la sección 3.6.2 de Materiales y Métodos. La Figura 38 presenta los resultados obtenidos, donde se puede observar el perfil electroforético y la fosforilación debido a la exposición a la placa de *Storage Phosphor*, para las tres versiones recombinantes de las subunidades de la *TaeADPGlcPPasa* y para *TaeGa3PDHase*.

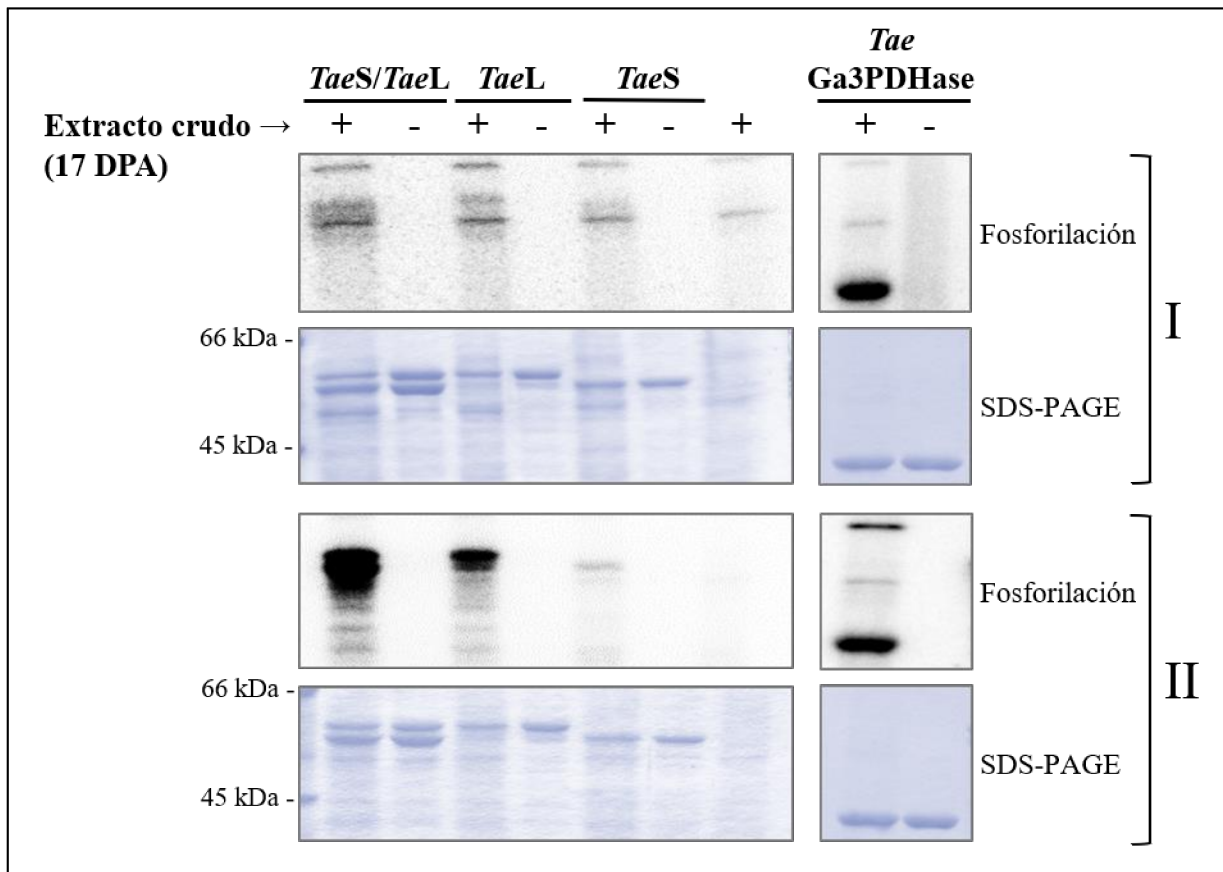


Figura 38: Fosforilación de las subunidades purificadas *TaeL* y *TaeS*, expresadas de manera individual, y coexpresadas *TaeS/TaeL*, con extractos proteicos de semillas de trigo (17 DPA); evaluados en dos condiciones de fosforilación distintas: (I) para quinasas independientes de Ca^{2+} y (II) dependientes de Ca^{2+} . Como control positivo de la fosforilación por estos extractos se utilizó a la *TaeGa3PDHase* recombinante [115]. Luego de la reacción de fosforilación con $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}$, se detectó la presencia de marca radioactiva por exposición del gel SDS-PAGE a una placa de *Storage Phosphor*. Los signos + o - indican adición o ausencia de extracto crudo, respectivamente.

Tal como se observa en la Figura 38, la incorporación de marca radioactiva, que es directamente proporcional a la fosforilación, fue significativamente mayor en la condición

dependiente de Ca^{2+} (Figura 38-II), con respecto a la condición independiente de Ca^{2+} (Figura 38-I), para las versiones de la ADPGlcPPasa. Particularmente, en las versiones *TaeL/TaeS* y *TaeL* se observan bandas proteicas con mayor intensidad radioactiva con respecto a la versión *TaeS* cuya marca está al nivel de la marca basal. El control de *TaeGa3PDH*asa fue fosforilado en ambas condiciones ensayadas, lo cual era esperable debido a que su fosforilación es independiente de Ca^{2+} . Además, este último resultado, pone en evidencia la presencia de los distintos tipos de quinasas específicas en los extractos proteicos de semillas.

4.2.2.2 Fosforilación de la *TaeADPGlcPPasa* con quinasas recombinantes de plantas

Debido a que la fosforilación de la *TaeADPGlcPPasa* con extractos crudos de semillas se produce en condiciones dependientes de Ca^{2+} , decidimos evaluar su fosforilación utilizando quinasas recombinantes de plantas que dependen o no de este catión en particular. Para ello se utilizaron tres quinasas diferentes que fueron producidas de manera recombinante en nuestro grupo de trabajo:

- SnRK1 α 1: subunidad catalítica α 1 de la SnRK1 de *Arabidopsis thaliana*, con la mutación puntual S198D que mimetiza la fosforilación requerida e indispensable para su activación [204]. La actividad de esta quinasa es independiente de Ca^{2+} [205].
- SOS2: Ser/Thr quinasa de *Malus domestica*, estrechamente relacionada a la familia de quinasas de proteínas de las SnRK3. Esta proteína tiene la mutación puntual T168D que mimetiza la fosforilación requerida e indispensable para su activación [206]. Si bien la actividad de esta quinasa no es dependiente de Ca^{2+} , sí lo son las quinasas de la cascada de fosforilación que activa a la misma [206–208].
- CDPK1: quinasa de proteínas Ca^{2+} -dependiente 1 de *Solanum tuberosum* [120].

En nuestro equipo de trabajo, tenemos los sistemas de expresión heteróloga que permite producir cada una de estas quinasas con alto grado de pureza (siguiendo lo descrito en las secciones 3.4.9 y 3.4.10 de Materiales y Métodos). En un primer lugar se evaluó la fosforilación de la versión heterotetramérica, *TaeS/TaeL*, de la *TaeADPGlcPPasa* con las tres quinasas recombinantes, utilizando el método radioactivo con $[^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}$, seguido de una corrida electroforética por SDS-PAGE de las muestras fosforiladas y exposición del gel a una placa de *Storage Phosphor*. La Figura 39 muestra que la *TaeADPGlcPPasa* fue fosforilada marcadamente por las quinasas SOS2 y CDPK1, ambas dependientes de Ca^{2+} , mientras que la señal de fosforilación obtenida por acción de la SnRK1 α 1 (independiente de Ca^{2+}) fue significativamente menor, coincidiendo con los resultados obtenidos cuando esta enzima fue fosforilada con extractos crudos de semillas de trigo (Figura 38).

Cabe destacar que las quinasas de proteínas SnRK1 están compuestas por 3 subunidades, no sólo la subunidad α catalítica, sino que además dos subunidades regulatorias β y γ , que le permiten no sólo interactuar con sus proteínas diana sino también definir su localización subcelular [108, 209]. Esto sugiere que no debe descartarse totalmente la fosforilación por la SnRK1 α 1, sino que deberían hacerse ensayos de fosforilación con el trímero completo junto con sus subunidades regulatorias. De todas formas, los resultados obtenidos con la fosforilación utilizando los extractos de semilla indicarían que este tipo de quinasa no estaría participando en la modificación de la ADPGlcPPasa en el endosperma de trigo.

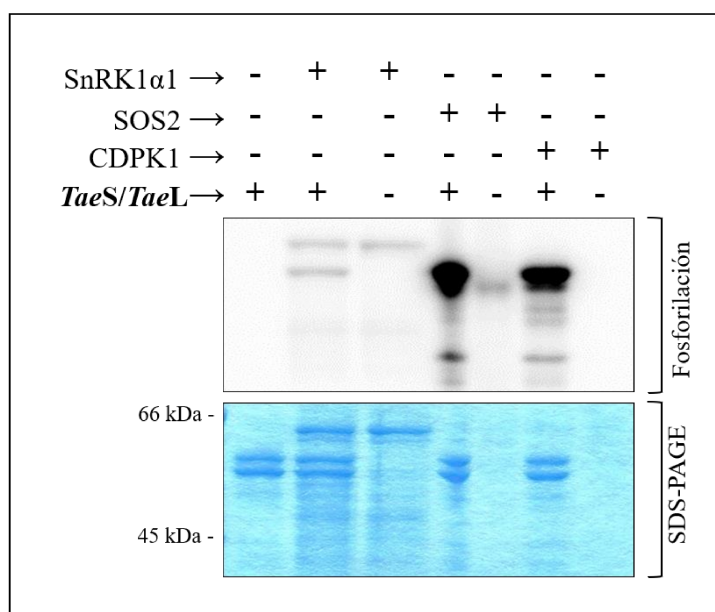


Figura 39: Fosforilación de la *TaeADPGlcPPasa* con quinasas recombinantes: SnRK1 α 1 de *Arabidopsis thaliana*, SOS2 de *Malus domestica* y CDPK1 de *Solanum tuberosum*. Luego de la reacción de fosforilación con [32 P]- γ -ATP, se detectó de la presencia de marca radiactiva por exposición del gel SDS-PAGE a una placa de Storage Phosphor. Los signos + o - indican adición o ausencia de quinasa, respectivamente.

4.2.2.3 Determinación de la subunidad de la *TaeADPGlcPPasa* que es modificada postraduccionalmente por fosforilación

En los ensayos anteriores pusimos en evidencia la fosforilación de la *TaeADPGlcPPasa* tanto con quinasas provenientes de extractos crudos de semillas de trigo como con quinasas recombinantes. Ahora bien, para determinar cuál de las dos subunidades de la *TaeADPGlcPPasa* se fosforila, evaluamos la fosforilación de *TaeS* y *TaeL*, tanto de manera individual como coexpresadas. En este caso utilizamos un método alternativo al uso de radioactivo. Este método se basa en la utilización del reactivo Phos-tag, el cual permite, en un SDS-PAGE, retrasar las bandas polipeptídicas que se encuentren fosforiladas [210]. Las reacciones de fosforilación se realizaron en las mismas condiciones que en ensayos anteriores, pero en ausencia de [32 P]- γ -ATP y con un tiempo

de reacción mayor, tal como se indica en la sección 3.7.2 de Materiales y Métodos. Luego, cada muestra se resolvió electroforéticamente en presencia o en ausencia del reactivo Phos-tag y posteriormente los SDS-PAGE se electrotransferieron a una membrana de nitrocelulosa para inmunodetectar las subunidades con anticuerpos específicos contra cada una. De esta manera, se pueden observar proteínas fosforiladas debido a su retraso en el gel y diferenciar a qué subunidad pertenece por inmunodetección. En la Figura 40 se presentan los resultados para las distintas versiones de la enzima: *TaeS/TaeL*, *TaeL* y *TaeS*, fosforiladas con las quinasas recombinante de plantas.

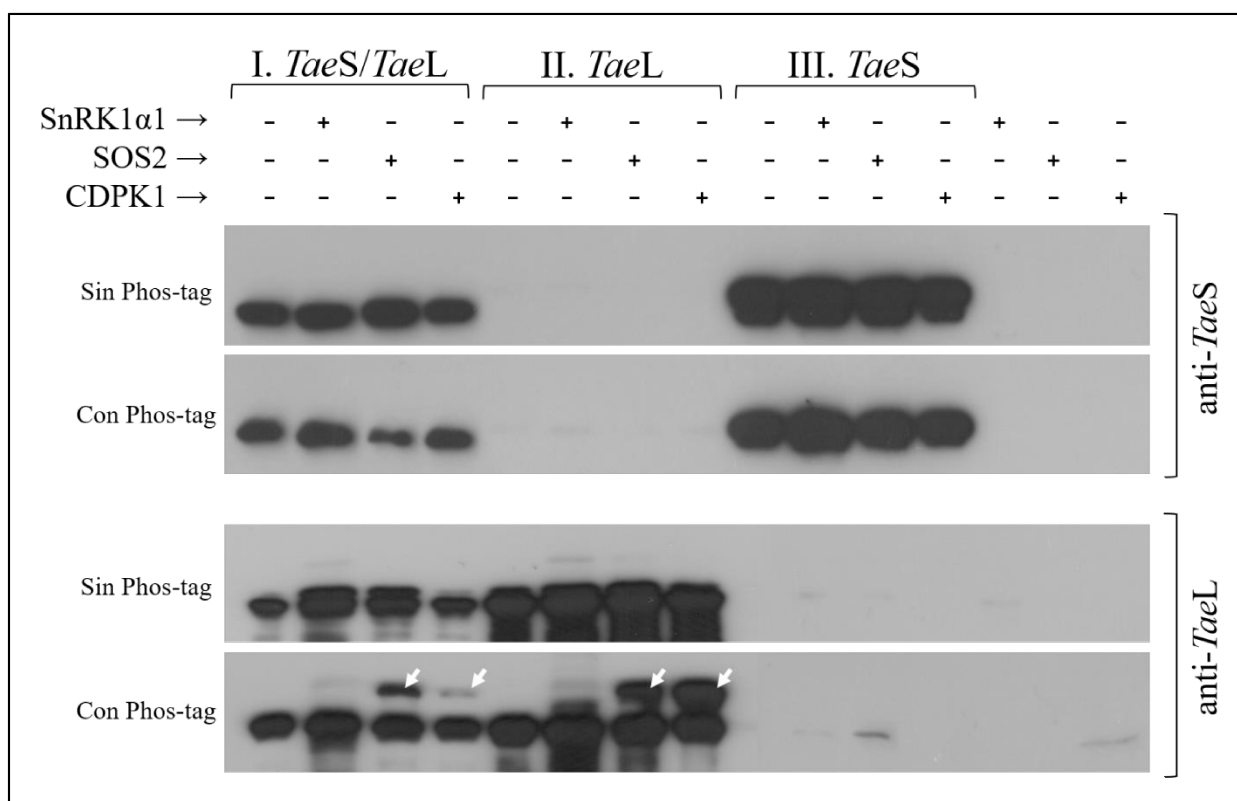


Figura 40: Inmunodetecciones de las versiones (I) *TaeS/TaeL*, (II) *TaeL* y (III) *TaeS* fosforiladas por las quinasas de plantas SnRK1 α 1 de *Arabidopsis thaliana*, SOS2 de *Malus domestica* y CDPK de *Solanum tuberosum*, y posteriormente resueltas mediante SDS-PAGE con y sin Phos-tag (100 μ M) con posterior electrotransferencia e inmunodetección con anticuerpos específicos anti-*TaeL* y anti-*TaeS*. Las flechas blancas señalan los péptidos retrasados que evidencian la fosforilación. Los signos + y – indican la presencia o la ausencia de quinasa en cada ensayo, respectivamente.

Como puede observarse, para el caso particular de la inmunodetección con anticuerpos contra la subunidad S revelan que *TaeS*, tanto en el heterotetrámero (Figura 40-I) como de manera individual (Figura 40-III), no es fosforilada ya que no se observan péptidos retrasados en el gel con Phos-tag. Mientras que en las inmunodetecciones realizadas con anticuerpos contra la subunidad L, sí se observan péptidos retrasados en el gel con Phos-tag con respecto al gel sin este reactivo. Específicamente, se observan péptidos retrasados cuando las versiones recombinantes fueron

fosforiladas con las quinasas SOS2 y CDPK. Esto sugiere que la subunidad *TaeL* es fosforilada tanto en el heterotetrámero (Figura 40-I) como de manera individual (Figura 40-II) por quinasas de familias dependiente de Ca^{2+} . Estos resultados refuerzan a los anteriormente obtenidos con el método de fosforilación con $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}$ (Figura 38), donde se observa una marcada fosforilación de la subunidad L, con una clara preeminencia sobre la subunidad S.

5. Discusión de Resultados y Conclusiones

5.1 La ADPGlcPPasa en el contexto global de la regulación del desarrollo de las semillas

5.1.1 Análisis de las propiedades cinéticas y regulatorias de la *TaeADPGlcPPasa* y del rol particular de cada una de las subunidades que la conforman

La biosíntesis de α -1,4-poliglucanos es una de las principales estrategias desarrolladas por los organismos vivos para almacenar carbono y energía. Los animales, los hongos, las bacterias (incluyendo a cianobacterias) y las arqueobacterias acumulan glucógeno; mientras que, en las algas verdes y las plantas, el almidón es el polímero sintetizado como reserva de carbono y energía [30]. Las rutas metabólicas para la acumulación del poliglucano fueron dilucidadas luego del descubrimiento de los nucleósidos-difosfato-azúcares por Leloir y col. en la década del 1950 [211]. La síntesis de los polisacáridos de reserva, glucógeno en bacterias y almidón en plantas, toma lugar a partir de una molécula de ADPGlc como dador de restos glucósilos para elongar una cadena α -1,4-glucosídica. En estos organismos, la ADPGlc es sintetizada a partir de ATP y Glc1P en una reacción catalizada por la ADPGlcPPasa, constituyendo éste el paso limitante y más regulado de la vía biosintética en estos organismos [30].

Las ADPGlcPPasas de procariotas (a excepción de Firmicutes [55, 212]) tienen una estructura homotetramérica (α_4); mientras que en todos los eucariotas, como las plantas superiores, esta enzima está compuesta de dos subunidades con diferentes funciones [213–215], S (*small*), y L (*large*), que forman una estructura heterotetramérica S_2L_2 [30, 70, 216, 217]. La subunidad S de la ADPGlcPPasa de plantas superiores está altamente conservada (85-95% de identidad), mientras que las subunidades L están menos conservadas (50-60% de identidad) [143]. Se ha establecido una hipótesis que postula que el origen de las ADPGlcPPasas en eucariotas está relacionado con el proceso de endosimbiosis que dio lugar a la formación de los plástidos [30]. Luego de tal endosimbiosis, el gen codificante para la enzima podría haberse transferido al núcleo. De hecho, la ADPGlcPPasa homotetramérica de cianobacterias comparte una elevada similitud con las subunidades S de plantas con respecto a otras bacterias heterotróficas. En eucariotas, la subunidad L aparece más tarde en la evolución, probablemente por la duplicación génica. Posteriormente, estos genes divergieron y se especializaron, lo que permitió obtener polipéptidos con diferencias funcionales: una subunidad mantuvo la actividad catalítica (la S) y la otra se especializó para una función regulatoria (la L). El reemplazo de unos pocos aminoácidos mostró que este proceso podría revertirse *in vitro* [150, 218, 219]. La mayor heterogeneidad observada en la secuencia de las

subunidades L posiblemente refleja requisitos diferentes en la sensibilidad de la subunidad S a la activación e inhibición alostérica planteadas por las diferentes demandas de los tejidos y las especies [143]. Otro paso en la evolución fue que, en ciertos tejidos, la subunidad S de las ADPGlcPPasas de plantas ganó la capacidad de ser regulada por tiorredoxinas [74]. Este modelo evolutivo para establecer la estructura de la ADPGlcPPasa requiere de mayores aportes experimentales, principalmente porque en la enzima de algunas especies vegetales ambas subunidades mantienen propiedades catalíticas y de regulación alostérica.

La mayoría de las ADPGlcPPasas hasta el momento caracterizadas son reguladas alostéricamente por pequeñas moléculas efectoras. En general, los activadores de la enzima son metabolitos claves que indican elevados contenidos de carbono y energía dentro de las células (y lo opuesto para los inhibidores) [220]. Los reguladores alostéricos más destacados de las ADPGlcPPasas de plantas son el 3PGA y el Pi, que actúan principalmente como activador e inhibidor, respectivamente [30]. La regulación alostérica por 3PGA y Pi fue demostrada en las ADPGlcPPasas de hojas de algunas plantas, incluyendo *Arabidopsis*, espinaca, cebada, trigo y arroz, y además en la enzima de tubérculos de papa [66, 73, 152, 221, 222]. La relación 3PGA/Pi en cloroplastos permite la coordinación de la actividad de la enzima con el ciclo diario del metabolismo del almidón [223].

A diferencia de las ADPGlcPPasas de hojas, la regulación alostérica de la enzima en células no fotosintéticas difiere dependiendo del tejido y el tipo de planta. Por ejemplo: i) la enzima de tubérculo de papa es altamente regulada por 3PGA/Pi [62] y ii) la de semillas en desarrollo de garbanzo también requiere de 3PGA para su activación, pero la actividad de la enzima en cotiledones de haba y embriones de arveja muestra menor respuesta al efector [224–226]. Las ADPGlcPPasas de tejidos sumidero de plantas monocotiledóneas como las del endosperma de cereales también muestra variaciones en la respuesta a 3PGA y Pi. La enzima de endosperma de cebada, tanto la purificada de fuente como la producida de manera recombinante, es insensible a efectores alostéricos [152, 227]. Por su parte, la enzima de endosperma de trigo purificada de fuente no es afectada por 3PGA, aunque se observó que éste revertía la inhibición por Pi [73]. En contraste, la actividad de la ADPGlcPPasa de endosperma de maíz es estimulada por 3PGA, al igual que la de endosperma de arroz, siendo esta última también inhibida por Pi [145, 151, 228–230].

Además de la regulación alostérica, algunas ADPGlcPPasas están sujetas a control redox. La primera evidencia *in vivo* fue demostrada en la enzima de tubérculo de papa, donde se observó que su estado redox tenía una correlación significativa con los niveles de azúcares, la dimerización de

la subunidad S, la actividad ADPGlcPPasa y la síntesis de almidón [231]. Ensayos con discos de tubérculos de papa alimentados con sacarosa o Glc tenían niveles aumentados de la subunidad S en su forma monomérica y, a su vez, una elevada actividad ADPGlcPPasa cuyo mecanismo de activación involucra la señalización mediada por la hexoquinasa y las proteínas SnRK1 [232]. La activación redox de las ADPGlcPPasas foliares en respuesta al aumento de los niveles de luz y azúcar también se demostró en arveja, papa y *Arabidopsis* [67, 138]. Otros estudios han mostrado que la T6P está involucrada en la detección de los aumentos en los niveles de sacarosa y la inducción de la activación redox de la ADPGlcPPasa [75, 233]. Las bases bioquímicas del control redox están bien estudiadas en la enzima de tubérculo de papa. Bajo condiciones no reductoras, la ADPGlcPPasa recombinante de tubérculo de papa forma un -S-S- entre las Cys12, que une a ambas subunidades S del heterotetrámero, que hace que la actividad de la enzima sea menor [140, 234]. En contraposición, la reducción reversible de este enlace por el DTT o tiorredoxinas *m/f* activa la enzima por incremento de su afinidad hacia el 3PGA [74, 140]. A diferencia de la enzima de papa o las de hojas, las ADPGlcPPasas de endosperma de cereales carecen de la Cys12 conservada en las subunidades S.

En este contexto, y a partir de los resultados obtenidos, pudimos observar el comportamiento distintivo de la ADPGlcPPasa de endosperma de cereales, particularmente la de trigo, produciéndola de manera recombinante y caracterizando sus parámetros cinéticos y regulatorios. Estos resultados contribuyen al entendimiento de las propiedades de estructura/función de las distintas ADPGlcPPasa de plantas. La producción recombinante de la ADPGlcPPasa de endosperma de trigo se realizó mediante un procedimiento que nos permitió alcanzar un alto nivel de pureza y estabilidad de la enzima. Las subunidades que componen a la enzima se expresaron tanto de manera individual, *TaeS* y *TaeL*, como coexpresadas, *TaeS/TaeL*. Esta última versión recombinante tiene características cinéticas y regulatorias que se condicen con las informadas previamente para la enzima purificada de su fuente natural [72, 73]. Tanto *TaeS/TaeL*, como *TaeS* fueron cinéticamente activas, aunque esta última tiene ~25 veces menos actividad que el heterotetrámero.

En este trabajo identificamos que, si bien *TaeL* no tiene actividad enzimática significativa (de acuerdo con proteínas homólogas de otras especies de plantas [30, 55, 66, 149]), esta subunidad contribuye a la formación del heterotetrámero que es una estructura con mayor capacidad catalítica que el homodímero S. Además, la interacción de *TaeL* con *TaeS* modula las propiedades regulatorias. Este análisis de las relaciones de estructura a función entre las subunidades fue reforzado por la producción de proteínas híbridas entre *TaeS*, *TaeL* y las subunidades de la ADPGlcPPasa de tubérculo de papa (altamente sensible a reguladores alostéricos). La presencia de *TaeL* fue la responsable de generar en el heterotetrámero la "pre-activación" e insensibilidad a los

activadores (ya sea a 3PGA o Fru6P). Por otro lado, la subunidad L de papa confiere a la enzima respuesta a efectores alostéricos, siendo los principales activadores el 3PGA, el PEP, la Rib5P, la GlcN6P y la Fru6P. Estos resultados nos llevan a plantear que, con respecto a las enzimas de los tejidos de almacenamiento (por ejemplo, semillas y tubérculos), la diferencia principal en la regulación entre monocotiledóneas y dicotiledóneas estaría establecida por las diferencias estructurales de las respectivas subunidades L. Las ADPGlcPPasas de dicotiledóneas son sensibles a los efectores alostéricos y se pueden activar a mayores eficiencias catalíticas, mientras que algunas formas de monocotiledóneas están en un estado aparentemente de insensibilidad.

En este trabajo, mostramos que este último comportamiento en la ADPGlcPPasa de endosperma de trigo es causado por la subunidad L, lo que conduce al heterotetrámero a una forma más activa en comparación con la subunidad S sola. Esto unifica la teoría de que la interacción entre las subunidades L y S de las ADPGlcPPasas de plantas determina sus diferentes propiedades reguladoras para la adaptación a las necesidades de los diferentes tejidos [66]. La ADPGlcPPasa de endosperma no es una excepción a tal concepto, sino que es un caso extremo de cómo la subunidad L afecta las propiedades regulatorias de los heterotetrámeros, observándose que en lugar de mejorar la afinidad por 3PGA, la formación del heterotetrámero “*per se*” da lugar a una enzima más activa (sin necesidad del metabolito) y estable a altas temperaturas en presencia de efectores.

Con respecto a la subunidad S, los resultados sugieren que su rol en el heterotetrámero es el de conferir afinidad aparente a la inhibición por Pi; siendo también crítica para la estabilidad térmica de la enzima. Esto es compatible con la idea de que las subunidades L influyen en las propiedades reguladoras de las ADPGlcPPasas. Estudios realizados en híbridos de la ADPGlcPPasa de papa/Arabidopsis mostraron que la afinidad aparente por 3PGA dependía principalmente de la subunidad L, independientemente de la subunidad S involucrada [68]. Tal como se observó en este trabajo de tesis, para la enzima de endosperma de trigo, *TaeL* causa pre-activación/insensibilidad al activador en lugar de alterar la aparente afinidad por el mismo.

Particularmente, la actividad del homodímero *TaeS* está regulada de manera redox y alostérica. Ésta última es activada por 3PGA exclusivamente en su versión reducida. Este comportamiento se ha visto en otras ADPGlcPPasas, como en la de arroz [141]. A pesar de que el heterotetrámero resultó insensible al agregado de agentes oxidantes o reductores, observamos que la formación del mismo es favorecida en condiciones reductoras, generando una estructura estable y cinéticamente más ventajosa, tal como se describe en trabajos previos [235]. En condiciones oxidantes, sólo el heterotetrámero *TaeS/TaeL* es activo, indicando que es insensible a la modulación redox.

A partir de estos resultados, proponemos el esquema de la Figura 41, donde se resume la regulación de la *TaeADPGlcPPasa* de endosperma de trigo. Se conoce que la expresión génica de cada una de las subunidades está controlada tanto temporal como espacialmente [67, 68], no sólo en diferentes órganos de las plantas sino también en diferentes estadios del desarrollo de estos órganos [65]. La expresión diferencial de las subunidades en diferentes tejidos produce una enzima con distintos grados de sensibilidad a efectores alostéricos, adaptándose a las demandas metabólicas particulares de ese tejido [30, 67].

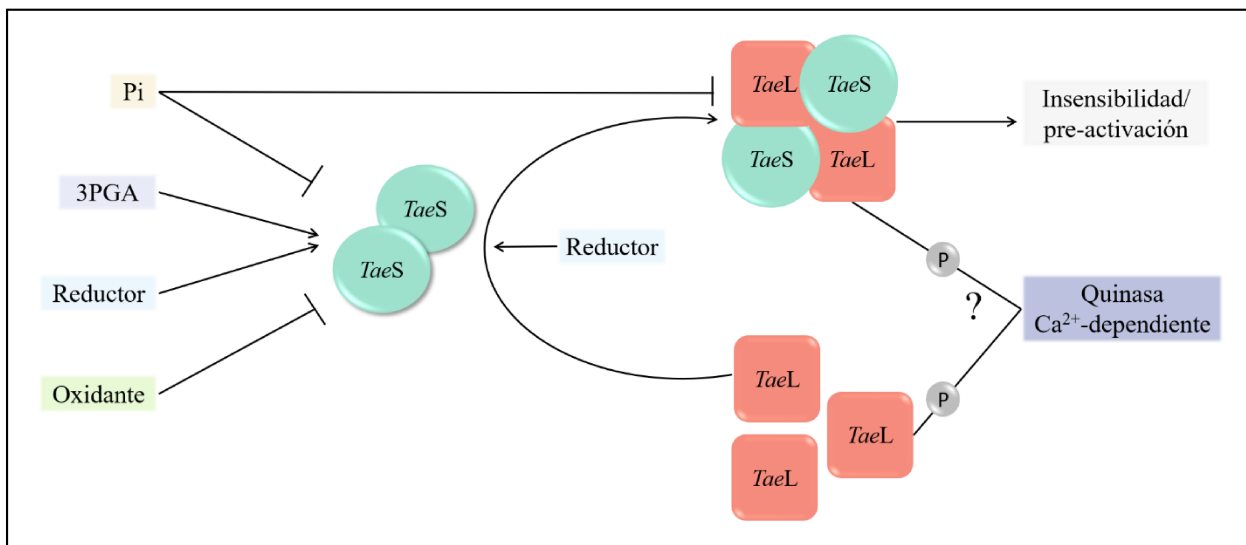


Figura 41: Esquema propuesto sobre la regulación postraduccional de la *TaeADPGlcPPasa*.

En condiciones fisiológicas, dentro del endosperma, podrían coexistir tanto la forma homodimérica de *TaeS*, como el heterotetramero *TaeS/TaeL* que conforma a la enzima completa, tal como se pudo observar en otra especie como lo es *Arabidopsis* [236]. El homodímero es sensible a los cambios redox y a la regulación alostérica, siendo fuertemente activada en condiciones reductoras y en presencia de 3PGA, e inhibida por Pi y oxidantes. En determinados momentos del desarrollo o cambios en el metabolismo de la semilla como el aumento de los niveles de sacarosa/trehalosa intracelular [236], el gen de la subunidad L se expresa, traduce e interacciona con la subunidad S. La nueva conformación heterotetramérica, torna insensible a la enzima, pre-activándola y llevándola a su capacidad catalítica máxima, aunque sigue conservando la inhibición por Pi (Figura 41). Favorablemente, este último metabolito (en conjunto con el 3PGA y la Fru6P, en menor medida) le confiere estabilidad a la enzima frente a temperaturas elevadas, tal como se observó en estudios previos con la enzima de manzano [237].

En este sentido, gana importancia la regulación postraduccional por fosforilación que ocurre específicamente sobre la subunidad L, evidenciada en la sección 4.2 de este trabajo de Tesis, como un nuevo nivel de regulación de la ADPGlcPPasa de endosperma de trigo (Figura 41). Aún queda por determinar el efecto de esta modificación sobre los mecanismos de regulación y actividad de la enzima.

Los estudios realizados son importantes para el diseño de estrategias y herramientas biotecnológicas para mejorar los rendimientos de los cultivos de interés agronómico. Particularmente, en la caracterización de las construcciones trigo/papa para la ADPGlcPPasa, observamos que el híbrido *StuS/TaeL* tiene propiedades de interés: mayor estabilidad al calor y propiedades alostéricas similares a la enzima de tipo salvaje *TaeS/TaeL*, esto es, pre-activación de la enzima con eficiencias catalíticas elevadas. Esta construcción híbrida podría producir una planta de trigo transgénico estable al calor, sin cambios importantes en la fisiología, con grandes porcentajes de almidón acumulado. Siendo este último, relevante en la economía actual como proveedor principal de las demandas calóricas en la dieta humana y también de animales; considerando además su potencial aplicación como fuente de biocombustibles y bioplásticos [238].

5.1.2 Análisis de la fosforilación de la *TaeADPGlcPPasa* por quinzasas de proteínas de las familias SnRK3 (SOS2) y CDPK

Las semillas en desarrollo son un sistema relativamente bien estudiado en el que se puede analizar el transporte y la compartimentación de los fotoasimilados [239]. Resulta importante avanzar en el conocimiento del metabolismo de estos últimos en el tejido sumidero, donde el papel del flujo de carbono es central. El desarrollo está genéticamente programado y se correlaciona íntimamente a los cambios en los niveles de los metabolitos dentro la semilla [33, 239]. La diferenciación ocurre sucesivamente comenzando con el tejido materno y siguiendo por los órganos de la filial, los cuales finalmente comenzarán a ser tejidos de almacenamiento altamente especializados [33]. Una compleja red regulatoria dispara la iniciación de la maduración y acumulación de compuestos de reserva, esto incluye una reprogramación transcripcional y fisiológica mediada por azúcares y vías de respuesta a hormonas [33]. En la Figura 42 se presenta un esquema que resume estos eventos durante el desarrollo de las semillas.

Las semillas de cereales y leguminosas están compuestas por una cutícula (proveniente del tejido materno), el endosperma y el embrión, tejidos que interactúan físicamente pero que son componentes genética y fisiológicamente heterogéneos [33]. La formación de semillas se puede

dividir en diferentes etapas y cada una se caracteriza por secuencias específicas de eventos moleculares y perfiles metabólicos (Figura 42) [239]. En particular, en el desarrollo del endosperma se pueden distinguir: i) el desarrollo temprano (que comprende la doble fertilización y la proliferación celular); ii) la etapa de diferenciación (que incluye la formación de todos los tipos celulares principales) y iii) la etapa de acumulación de reservas y maduración [166, 240, 241]. Cada una de estas fases tiene demandas metabólicas específicas y, debido a que el endosperma es un tejido sumidero por excelencia, un aspecto importante de su desarrollo concierne a la partición del metabolismo del carbono, la señalización dentro de la célula, el flujo de nutrientes y la regulación de los estados energéticos [242].

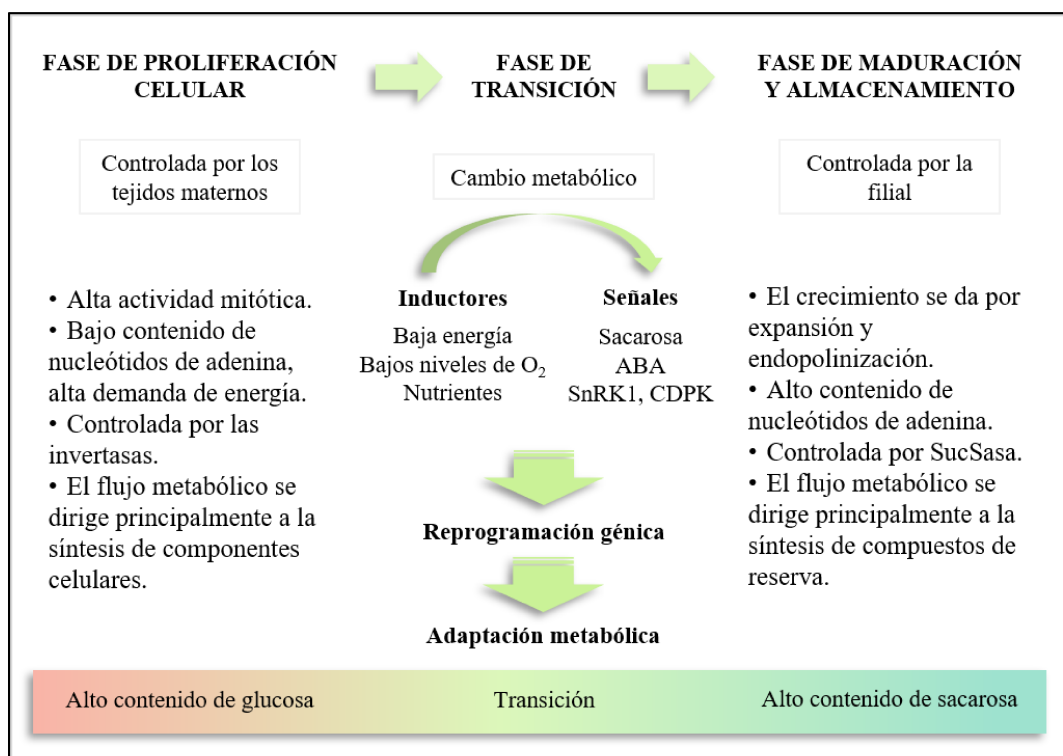


Figura 42: Cuadro que resume las principales características de las distintas fases del desarrollo en semillas. Traducido de [33].

Durante el período de desarrollo, las células de las semillas se diferencian de tejidos similares a un meristema (con alta actividad mitótica indiferenciada y controlados metabólicamente por los tejidos maternos) a tejidos de almacenamiento altamente especializados (repletos de reservas de carbono y energía que van a permitir sustentar el desarrollo del embrión durante la germinación) que pasan durante una fase de transición a ser controlados por tejidos de la filial (Figura 42). En los cereales y leguminosas esto ocurre de manera progresiva generando un gradiente de desarrollo que involucra una disminución en la actividad mitótica y aumentos en el ingreso de sacarosa, la expansión celular y la acumulación de reservas [33, 105].

La sacarosa sintetizada en tejidos fotosintéticamente activos se transporta a través del floema para apoyar el crecimiento y la maduración de los tejidos heterotróficos como las semillas [243]. Por lo tanto, el llenado de semillas depende sobre todo de la tasa de suministro de fotoasimilados y de la regulación metabólica del transporte [33]. La sacarosa es el producto principal de la fotosíntesis, por lo que la capacidad general de los tejidos heterotróficos para importar fotoasimilados depende de la capacidad de sus células individuales para importar, metabolizar y almacenar sacarosa. Las rutas de descarga dependen del contexto metabólico particular y de los requisitos nutricionales específicos en cada etapa de desarrollo de las semillas. Una vez en el citosol, el carbono puede dividirse preferentemente en acumulación de TAG, proteínas o almidón, y estos productos de reserva se sintetizan y almacenan en los cotiledones (como en las semillas de leguminosas) o en el endosperma (como en los granos de cereales y algunas oleaginosas) o en ambos tejidos (como en las semillas de tabaco) [239].

A nivel de metabolitos, algunos azúcares específicos se corresponden con distintas etapas del desarrollo de las semillas. En tal sentido, la Glc se correlaciona con la alta actividad mitótica de las células indiferenciadas, mientras que la sacarosa está presente en células en maduración con activa expansión y acumulación de reservas (Figura 42). En particular, los aumentos en las concentraciones de sacarosa tienen una doble función en la nutrición y señalización, lo cual desencadena los procesos asociados al almacenamiento. La modificación de los flujos metabólicos mediados por la sacarosa ocurre tanto a nivel transcripcional como postranscripcional [242]. La transición de la fase de proliferación celular a la de almacenamiento en el endosperma se encuentra acompañada de una extensa reprogramación de los patrones de expresión de genes, que parecen estar regulados directa o indirectamente por la sacarosa [244]. El metabolismo de este azúcar se encuentra en el centro de los sistemas que regulan el desarrollo de las plantas. Su influencia se encuentra balanceada por la capacidad de detectar sus propios niveles, pero en esta señalización se encuentran involucrados otros sistemas y respuestas. El uso de la sacarosa es vital para los tejidos heterotróficos, no sólo para la crucial distribución del carbono, sino también para la iniciación de la señalización celular mediadas por hexosas-P. La relación entre el metabolismo de la sacarosa y la señalización mediada por azúcares yace en las vías de importación de sacarosa y los sitios de degradación de la misma. La sacarosa puede llegar desde el floema al citoplasma de las células sumidero, pasando o no a través de la membrana plasmática o el espacio de la pared celular (denominado apoplasto). Esta es una diferencia importante, porque los puntos de interfase con la membrana se encuentran implicados en mecanismos específicos de percepción tanto de la Glc como de la sacarosa [106].

La sacarosa en los tejidos heterotróficos, puede ser degradada por dos tipos de enzimas: las invertasas que producen su hidrólisis, generando Glc y fructosa (Fru); y la SucSasa que produce la uridililación con formación de Fru y UDPGlc. La degradación de la sacarosa por cualquiera de estas dos vías no es trivial, ya que como las invertasas producen Glc en lugar de UDPGlc, generan así el doble de hexosas-P que la SucSasa. Estas características les dan a las invertasas una mayor capacidad de estimular los sistemas específicos que regulan los niveles de hexosas en relación a cuando la degradación de sacarosa es mediada por la SucSasa. Cada vía de degradación de sacarosa puede iniciar distintos perfiles de señalización por azúcares, lo cual afectará el desarrollo [106].

En general, las señales mediadas por hexosas favorecen la división celular y la expansión, mientras que las señales mediadas por sacarosa lo hacen sobre la diferenciación celular, la acumulación de reservas y la maduración. Se ha demostrado que los patrones de acumulación de almidón se correlacionan con los de expansión celular, pero son temporalmente distintos a los de la actividad mitótica [242]. Numerosos estudios han permitido plantear que el control de los cambios entre distintos estadios del desarrollo de la semilla es mediado por la relación entre la actividad de las invertasas y la SucSasa. De acuerdo a esta hipótesis se ha demostrado que las invertasas, principalmente las de la pared celular, intervienen en la iniciación y proliferación de nuevas células sumidero que mantienen una alta actividad mitótica indiferenciada, degradando la sacarosa en el apoplasto e incrementando notablemente las concentraciones de hexosas que ingresan a la célula por la membrana plasmática a través de transportadores de monosacáridos [33, 106, 172, 245]. Mientras tanto, los estados de transición posteriores hacia las fases de almacenamiento y maduración es facilitada por cambios en la relación hexosas/sacarosa y por el cambio de vía de metabolización de la sacarosa de las invertasas a la SucSasa [106]. Se ha encontrado, incluso, que durante la fase de transición aumentan notablemente los transportadores de sacarosa de la membrana plasmática, lo que permitiría aumentos en la concentración del disacárido [33].

Se ha establecido que los niveles endógenos de oxígeno también varían notablemente en tejidos sumideros activos (Figura 42), tales como tubérculo y semillas en desarrollo, y que la relación del mismo y el contenido energético celular también se encuentra involucrada en la activación de los procesos de maduración de estos tejidos [33, 106]. Tal es así, que los resultados obtenidos en varios estudios indican que la degradación de la sacarosa y la síntesis de almidón se encuentran controladas por señales regulatorias en respuesta a las concentraciones de sacarosa y a la disponibilidad de oxígeno. La etapa de acumulación de reservas tiene niveles bajos de este último, con los cuales la SucSasa puede operar de manera efectiva e inclusive reducir el grado de depleción de oxígeno; mientras que las invertasas típicamente son ineficientes en estas condiciones [33].

Durante la fase de transición desde la fase proliferativa (que posee niveles elevados de oxígeno) a la fase de almacenamiento las concentraciones endógenas de oxígeno caen a niveles que disparan una restricción de la respiración, habiendo una disminución en los niveles energéticos (ATP/ADP) y de las vías biosintéticas y metabólicas. También, la actividad de las invertasas disminuye y el aumento en la concentración de sacarosa lleva a un incremento coordinado en la expresión de la SucSasa y la ADPGlcPPasa a nivel transcripcional y postranscripcional, modificaciones que permitirán disminuir el consumo de oxígeno y prevenir que el tejido se vuelva anóxico [107]. La importancia funcional de la SucSasa, como opuesta a la de las invertasas, es particularmente importante bajo condiciones de bajos niveles de oxígeno, ya que contribuye a conservar los nucleótidos de adenina generando UDPGlc en lugar de hexosas adicionales que requerirían de ATP para ingresar a la glucólisis [106].

Tal como se mencionó anteriormente, el desarrollo de las semillas se encuentra genéticamente programado y se correlaciona con cambios a nivel de metabolitos [33]. Diferentes estudios, orientados a entender los programas genéticos que subyacen a la embriogénesis de las plantas y la maduración de las semillas, han llevado a proponer diferentes modelos para explicar las redes reguladoras claves y las enzimas involucradas en el control del flujo de carbohidratos en las semillas en desarrollo [239]. Es así que se pudo demostrar que los cambios de fases durante el desarrollo del endosperma están controlados por una red compleja de señales que involucra no sólo a los azúcares (Glc y sacarosa), sino que además a la hormona ABA y a las proteínas quinasas de las familias SnRK1/CDPK [33, 105, 107, 108, 170, 172, 199, 205, 242]. Esta red de señalización tiene como objetivo permitir la adaptación metabólica de la semilla en respuesta a la disponibilidad de diferentes fuentes de carbono, energía y oxígeno. En este contexto, se ha informado que no sólo la expresión de los genes que codifican para las invertasas es inhibida por bajos niveles de oxígeno sino que también responden a la inhibición por proteínas cuya expresión se induce por hormonas tales como el ABA [33, 106]. Por el contrario, los genes que codifican para la SucSasa son inducidos por privación de carbono (Glc) y bajos niveles de oxígeno [106]. Además, se produce una inducción coordinada de la expresión de SucSasa y ADPGlcPPasa en respuesta al aumento en concentraciones de sacarosa, lo que se encuentra relacionado a una inducción de la actividad de las SnRK1 [107].

Numerosos estudios realizados con diferentes tipos de plantas han demostrado que las SnRK1/CDPK coordinan y ajustan las demandas fisiológicas y metabólicas con el crecimiento y desarrollo de los tejidos heterotróficos y que, con este fin, interactúan con el ABA en vías dependientes o independientes [105, 112, 250, 170, 172, 232, 242, 246–249]. Se ha observado que estas quinasas juegan un rol fundamental en la partición del carbono, especialmente en la fase de

acumulación de compuestos de reserva [33], actuando como integradoras globales del desarrollo y el metabolismo frente a señales energéticas [109]. La reducción en las SnRK1 en plantas transgénicas afectó fundamentalmente la utilización de sacarosa en papa [232], mientras que en cebada dañó el desarrollo del polen, posiblemente debido a una falla en la incorporación de sacarosa en almidón [247]. El rol de las SnRK1 en la regulación de genes se demostró primero en papas que expresaban un gen antisentido para las mismas, lo cual causaba una dramática reducción en la expresión del gen que codifica para la SucSasa en tubérculos y una pérdida de la inducción por sacarosa de la expresión del gen que codifica para SucSasa en hojas [246]. En contraposición, se ha demostrado que la sobreexpresión de proteínas SnRK1 en papa genera tubérculos con mayor contenido de almidón [112]. Las SnRK1 controlan también indirectamente el metabolismo de los hidratos de carbono porque modulan la transcripción de genes, tales como los que codifican para la ADPGlcPPasa y la α -amilasa [107, 232, 249].

Estudios llevados a cabo con semillas transgénicas de arveja que expresaban un gen antisentido para las SnRK1, han demostrado que las mismas exhibían una mayor relación carbono/nitrógeno, mayores niveles de sacarosa y defectos en su maduración, inhibiéndose la transición hacia la fase de acumulación de reservas [105]. La disrupción de una SnRK1 en *Physcomitrella patens* conlleva a un defecto en la acumulación de almidón. Las mutantes nulas no pueden crecer a menos que se mantengan constantemente iluminadas [251]. Incluso, se ha encontrado que la represión de las SnRK1 resulta en una reducción de la inducción de la expresión de las α -amilasas en semillas en germinación [249].

Por otra parte, el análisis de la expresión de genes que codifican para las SnRK1 y evaluaciones de la cantidad de proteína por inmunodetección (con anticuerpos específicos para las quinasas) permitieron inferir sobre su rol en la transición metabólica azúcar-a-almidón durante el desarrollo del endosperma de sorgo y maíz [172]. Estos análisis indicaban que, en sorgo, las SnRK1 aumentan gradualmente en el endosperma entre los 6-18 días posteriores a la fecundación (DPF), mientras que los niveles máximos de la proteína se observaron entre los 12-24 DPF (estadio de desarrollo asociado con una rápida biosíntesis de almidón). En maíz, los niveles más altos de las SnRK1 se encuentran durante la fase de almacenamiento de almidón 20-28 DPF. Los resultados son consistentes con el rol específico de las SnRK1 en mediar la regulación de los niveles de azúcares y las vías de utilización de las mismos, lo cual indica que las quinasas se encuentran críticamente involucradas durante la etapa de acumulación de reservas en el endosperma [172]. En papas, los niveles de expresión más altos de la SnRK1 ocurren en estolones, cuando estos están pasando a desarrollarse a tubérculos. La expresión decae notablemente en tubérculos maduros y es aún menor

en hojas [252]. Por otra parte, se observó que las CDPK están involucradas en procesos como la embriogénesis, el desarrollo y la germinación de las semillas [253], y activan genes de respuesta a hormonas, específicamente al ABA [254].

También se ha mostrado que las quinasas de proteínas se encargan de regular postraduccionalmente por fosforilación a diferentes actores del metabolismo [110]. Dos enzimas claves en el metabolismo del carbono son fosforiladas por CDPKs, la SucSasa y la SPS, las cuales intervienen en la degradación y la síntesis de sacarosa, respectivamente. Por ejemplo, en arroz, una isoforma de CDPK es requerida para la acumulación de compuestos de reserva, mediante la fosforilación de la SucSasa [111]. Los resultados de una serie de estudios [194, 255, 256] sugieren que esta quinasa le confiere a la SucSasa distintas características regulatorias, no sólo aumentando su actividad sino que influenciando su localización subcelular y confiriéndole protección frente a la degradación. En semillas de haba (*Vicia faba*), se demostró que al ser fosforilada, la SPS es inactivada durante la fase de transición, mientras que la PEPCasa es activada al mismo tiempo [33]. La SPS también es inactivada por fosforilación en plantas de maíz [32, 192, 257]. Hasta el momento es escaso el conocimiento acerca de la identidad de los mecanismos moleculares de las CDPKs en la regulación del metabolismo y cómo éstas son activadas *in vivo*, aunque se observó que en hojas de tabaco la sacarosa induce la entrada de Ca^{2+} citosólico e incrementa la expresión y autofosforilación de la CDPK [258, 259]. Debido a que la SucSasa tiene un rol importante en los tejidos sumidero para la degradación de la sacarosa, la activación de la misma por las CDPK (inducida por la sacarosa) jugaría un papel fundamental en el desarrollo de las semillas [170].

Se ha puesto en evidencia que algunas enzimas de la glucólisis están reguladas en tejidos heterotróficos por proteínas quinasas de la familia SnRK1, tal es el caso de la piruvato quinasa [113], la np-Ga3PDHasa [114] y la Ga3PDHasa [115]. Particularmente, la fosforilación en la np-Ga3PDHasa permite que la enzima modificada interaccione con proteínas regulatorias del tipo 14-3-3, disminuyendo su actividad y aumentando su sensibilidad a la regulación por nucleótidos y PPi [114, 260, 261]. Además, se ha establecido que algunas de las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de almidón también son fosforiladas [43, 88, 163, 164, 262, 263]. Incluso, una serie de estudios del desarrollo del endosperma de cereales han demostrado que el ensamblaje de proteínas individuales en complejos multienzimáticos, para la síntesis de almidón, depende de la fosforilación de las proteínas [43, 164, 262]. También, se ha informado que isoformas de las enzimas SS y SBE de endosperma de trigo son fosforiladas y esto induce la formación de un complejo enzimático que actúa de manera coordinada en la síntesis de almidón, específicamente incrementando la afinidad por el polímero de Glc [163]. También una SBE de endosperma de maíz,

la SBEIIb, fue encontrada fosforilada en tres residuos de Ser (por quinasas amiloplastídicas dependientes de Ca^{2+}) y se estableció que esta modificación afecta la catálisis y la activación de la misma [263]. Mediante análisis de bioinformática y fosfoproteómica también se ha sugerido que la ADPGlcPPasa, la SS y la GBSS, las SBE y la PHOI estarían reguladas postraduccionalmente por fosforilación [43].

Al presente, se desconoce si otras enzimas de la vía glucolítica o de otras vías metabólicas del carbono se encuentran también reguladas por fosforilación en las semillas, incluso de aquellas de las que se sugiere que estarían siendo reguladas por esta modificación postraduccional no han sido puestas en evidencia. Tampoco se ha establecido si los procesos de fosforilación forma parte de mecanismos de regulación global de la partición intracelular del carbono y no se ha estudiado si esto ocurre de igual manera en semillas que acumulan el carbono en distintas formas moleculares (como por ejemplo polisacáridos o lípidos).

Se ha estudiado el proteoma y el transcriptoma durante la maduración de las semillas pero, aunque el desarrollo está genética y temporalmente programado, los resultados obtenidos en estos estudios no explican completamente las diferencias en los rendimientos de los compuestos de reserva [116]. Sin embargo, el metabolismo (consecuente al transcriptoma y proteoma) en semillas es un área que ha sido menos estudiada y que es necesaria explorar para comprender la regulación de las vías metabólicas y cómo influyen en los rendimientos de los productos de reserva. Durante la historia humana, los cultivos ricos en almidón han formado la base de nuestra nutrición; por lo tanto, desentrañar, a nivel molecular, la biosíntesis de carbohidratos y sus relaciones con la estructura y la funcionalidad es de relevancia y representa un requisito previo para la mejora específica del cultivo de cereales [239].

En trigo, se ha informado que el desarrollo de las semillas hasta su completa maduración y disecación lleva aproximadamente 45 DPA, ocurriendo la fase de proliferación celular entre los 0-10 DPF, la de acumulación de reservas entre los 11-30 DPF y la de maduración y disecación entre los 30-45 DPF [165]. El desarrollo de las semillas de ricino también comprende tres períodos: uno donde se desarrolla el embrión y la cutícula (entre los 0-20 DPP), un segundo período en donde se sintetizan y acumulan la mayor porción de proteínas y lípidos (entre los 20-40 DPP) y un tercero donde se produce la maduración y disecación de la semilla (entre los 40-60 DPP) [166]. Ambas especies de semillas acumulan sus compuestos de reserva en el endosperma, pero mientras que trigo lo hace en forma de almidón, ricino lo hace en forma de TAG.

En base a estos antecedentes y haciendo uso de lo informado por otros autores, podemos analizar los resultados que hemos obtenido específicamente para la ADPGlcPPasa (enzima clave en la síntesis de almidón) tanto de endosperma de trigo como de ricino en el contexto fisiológico en las distintas etapas del desarrollo de estas semillas.

En este trabajo de Tesis, la ADPGlcPPasa fue detectada en muestras de endosperma de trigo y de ricino a lo largo del desarrollo de las semillas. Mientras que la ocurrencia de esta enzima en trigo comienza a ser importante al finalizar la etapa de proliferación celular, en ricino ocurre lo contrario, donde se observa que la enzima está presente en mayor medida en los primeros estadios de desarrollo y luego disminuye considerablemente. Estos datos se correlacionan con el patrón de acumulación de almidón a lo largo del desarrollo para cada tipo de semilla. Cabe destacar, que los resultados obtenidos aportan al conocimiento sobre la ocurrencia de esta enzima en las semillas a lo largo del desarrollo, en especial en ricino. Particularmente, observamos que esta enzima se encuentra fosforilada únicamente en semillas de trigo (no así en ricino). La fosforilación está ausente en la fase de proliferación celular y ocurre desde la etapa de transición hacia la fase de acumulación de reservas, donde la enzima tiene un rol fundamental en la síntesis de almidón. Además, es en las etapas avanzadas del desarrollo donde se observa un incremento en la actividad de la enzima, lo que se relaciona directamente con el aumento de la cantidad del poliglucano en el llenado del grano.

En las inmunodetecciones de las semillas de trigo y de ricino se detectó más de una banda polipeptídica y esto puede deberse a modificaciones postraduccionales, a la degradación o proteólisis de la misma, o bien, a la presencia de más de una isoforma. Se conoce que la expresión génica de cada una de las subunidades está controlada tanto temporal como espacialmente [67, 68], no sólo en diferentes órganos de las plantas sino también en diferentes estadios del desarrollo de éstos órganos [65].

En este trabajo de Tesis, mediante la fosforilación *in vitro* de la *TaeADPGlcPPasa* recombinante determinamos que es fosforilada por quinasas de extractos crudos de semillas en fase de maduración y por las quinasas recombinantes SOS2 (SnRK3) y CDPK1, específicamente todas dependientes de Ca^{2+} . Ambas quinasas fueron detectadas entre los extractos de proteínas totales de las semillas de trigo a lo largo del desarrollo. Además, pudimos determinar que la subunidad L de la *TaeADPGlcPPasa* es la que recibe esta modificación postraducciona. Curiosamente, esta subunidad es la que tiene un papel fundamental en el heterotetrámero, proporcionándole propiedades regulatorias específicas para cada ADPGlcPPasa [30].

Estudios en fosfoproteómica y bioinformática realizados en tejidos de plantas sugieren la fosforilación de la subunidad L de las ADPGlcPPasas de plantas mediante identificación de péptidos con espectrometría de masas y análisis *in silico* [43, 77, 78, 195]. Realizamos una recopilación de la secuencia aminoacídica en torno a la Ser fosforilada de todos estos fosfopéptidos encontrados para las subunidades de las ADPGlcPPasas de plantas, que se muestran y detallan en la Tabla 10.

Hasta la fecha, se han identificado numerosos motivos aminoacídicos de fosforilación específicos de quinasas en plantas y para revelar la existencia de los mismos y determinar así si éstos están asociados a una familia de quinasas en particular, se realizó un alineamiento de las secuencias y a través del servidor Weblogo se generó el gráfico de la Figura 43-A, donde se destaca la frecuencia por repetición de cada aminoácido.

Tabla 10: Recopilación de las secuencias de los fosfopéptidos encontrados para las subunidades L de las ADPGlcPPasas de plantas. (p): fosforilación del residuo que le antecede.

Organismo	Fosfopéptido	Fosfositio	Referencia
<i>A. thaliana</i>	ALKNQPS(p)MFERRA	Ser77	[200]
	GIRSRVGS(p)NVQLKD	Ser428	
	VGS(p)NVQLK	Ser428	[198]
	SST(p)NFS(p)QKR	Ser60	[264]
	VGS(p)NVQLK	Ser428	[265]
	RAS(p)DFGLM(ox)K	Ser252	[266]
	VGS(p)NVQLK	Ser428	
	VIS(p)FSEKPK	Ser267	
	VGS(p)NVQLK	Ser428	[195]
	RLRSSpTNFS(p)QKRIL	Ser60	[199]
	DDRRAS(p)DFGLM	Ser252	
	KGRVIS(p)FSEKPK	Ser267	
	RSRVGS(p)NVQLK	Ser428	
LKNQPS(p)MFERR	Ser77		
<i>T. aestivum</i>	GPAATGAQCVLTSAS(p)PADTLVLR	Ser69	[162]
	IFVMTQFNSAS(p)LN	Ser149	
	ACIS(p)PVR	Ser19	[202]
<i>O. sativa</i>	NVVITNSEGVQES(p)DRPEE GYYIR	Ser491	[196]
<i>M. truncatula</i>	AHRES(p)DADIT	Ser225	[200]

Análisis previos de los sitios de fosforilación de otras proteínas que resultan fosforiladas por las quinasas que pertenecen a las familias SnRK1 y CDPK, han permitido determinar la secuencia del entorno (a una distancia de +/- 5 residuos) donde se encuentran los residuos que son blancos preferidos por estas enzimas [170, 205, 252]. En la Figura 43-B se muestra esta información. Como puede observarse, comparándolo con el resultado de aminoácidos frecuentes para los fosfopéptidos encontrados para la subunidad L (Figura 43-A), éstos podrían ser sitios putativos de

fosforilación por la familia de quinasas SnRK1 y CDPK, ya que en las posiciones -5, -3 y +4 se encuentran preferentemente aminoácidos básicos.

A partir de un análisis *in silico*, utilizando el sitio consenso de la Figura 43-B, y los fosfopéptidos encontrados (Tabla 10), se detectaron seis posibles sitios de fosforilación para *TaeL*: Ser19, Ser26, Ser69, Ser149, Ser428, Ser454. En estudios futuros restaría determinar si alguno de ellos estaría modificado postraduccionalmente por fosforilación, y cómo afecta esto en la regulación o actividad de la enzima completa.

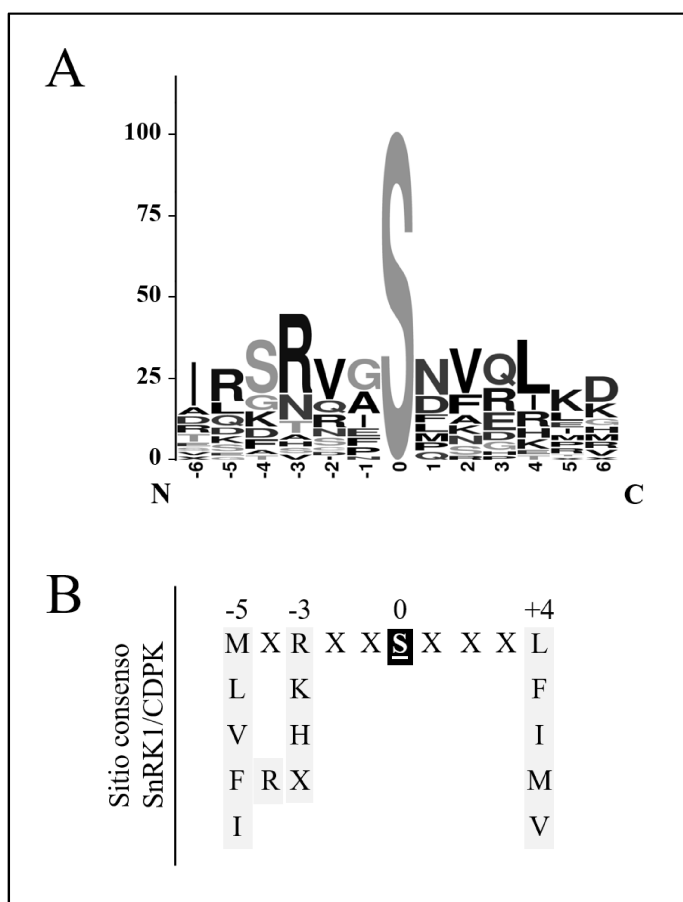


Figura 43: Alineamiento de secuencias de aminoácidos presentes alrededor de distintos sitios de fosforilación a una distancia de +/- 5 residuos. (A) Apilamiento de las secuencias de los fosfopéptidos encontrados para las subunidades L de las ADPGlcPPasas de plantas recopiladas en la Tabla 10. Utilizando el servidor Weblogo (www.weblogo.berkeley.edu/logo.cgi) se construyó el súper-apilamiento mostrado donde la Ser fosforilada se encuentra en la posición 0. La altura de las letras denota su porcentaje de ocurrencia para cada aminoácido en dicha posición. (B) Sitio de fosforilación consenso para las proteínas quinasas de las familias SnRK1 y CDPK, modificado de las siguientes citas [170, 205, 252].

En resumen, y a partir de toda esta información, realizamos los esquemas de la Figura 44, para plantear una hipótesis de cómo sería el metabolismo de los hidratos de carbono durante la proliferación celular en las semillas de trigo, en la cual predominaría la degradación de la sacarosa

por las invertasas; y cómo cambiaría ese metabolismo en la etapa de acumulación de reservas, en la que predominaría la degradación de la sacarosa por la SucSasa.

Aunque la información experimental disponible es incompleta para proponer un esquema de regulación del metabolismo del carbono en semillas de trigo, podemos plantear una hipótesis para la regulación de la ADPGlcPPasa por fosforilación mediada por proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+} , en el contexto fisiológico del desarrollo de la semilla y durante el período de almacenamiento de carbono y energía. Para proponer los esquemas de partición del carbono en células heterotróficas durante los distintos períodos del desarrollo tomamos como base lo descrito en la sección 1.4 del capítulo introductorio y las Figuras 5, 6 y 8. En general, en los tejidos heterotróficos la sacarosa es utilizada con diferentes propósitos: almacenar carbono y energía (guardando sacarosa en la vacuola o al ser convertida en almidón o fructanos) o ser degradada para proveer energía a través de la respiración celular y suplir de esqueletos carbonados a distintas reacciones biosintéticas. El grado de partición de la sacarosa hacia cada una de estas vías (síntesis de almidón, glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos -TCA-, OPPP) depende del tipo de tejido heterotrófico involucrado y de su estadio de desarrollo [8].

En la Figura 44-A se muestra un esquema del metabolismo de los hidratos de carbono durante la fase de proliferación celular. En esta etapa, la fuente de carbono para las células del endosperma de las semillas proviene de la sacarosa sintetizada en los tejidos autótrofos maternos. Cuando la sacarosa llega a la célula es degradada por las invertasas, principalmente las de la pared celular, siendo convertida en Glc y Fru en el apoplasto y transportada a través de la membrana plasmática por transportadores de monosacáridos generando así una concentración elevada de Glc en el citosol. En este periodo, las células utilizan principalmente las hexosas a través de la vía glucolítica (que se representa de manera resumida) y el TCA (incluido en la mitocondria como respiración y biosíntesis) para suplir de esqueletos carbonados y energía a los procesos de proliferación celular que generan una alta actividad mitótica y grandes demandas energéticas. Por simplicidad y escasa información al respecto, no se representa el OPPP incompleto del citosol que también es una vía central de utilización de hexosas-P. Las flechas que pertenecen a la vía de síntesis de almidón se representan en color gris claro porque no es el principal destino de los hidratos de carbono.

En la Figura 44-B se muestra un esquema del metabolismo de los hidratos de carbono en la fase de almacenamiento de carbono y energía en el endosperma. En esta etapa la sacarosa que proviene de los tejidos fotosintéticos ingresa (a través de transportadores específicos de la membrana plasmática) directamente al citosol, donde se genera una concentración elevada del

disacárido. En ese compartimento la sacarosa es degradada por la SucSasa (enzima cuya síntesis se encuentra inducida por las SnRK y las CDPK) y convertida en UDPGlc y Fru.

En este periodo, la UDPGlc y la Fru son convertidas a hexosas-P y estas últimas son transportadas hacia el interior de los plástidos por medio de sus transportadores específicos (THP) [267] para luego, mediante la ADPGlcPPasa, generar los azúcares-nucleótidos utilizados en la síntesis de almidón. Los plástidos normalmente no pueden generar hexosas-P a partir de triosas-P, porque carecen de actividad FBPasa, con lo cual dependen estrictamente del importe de las hexosas-P generadas durante la degradación de la sacarosa en el citosol para la síntesis almidón [268]. Dentro del plástido, la Glc6P podrá ser utilizada para sintetizar almidón (la ADPGlcPPasa se encuentra en altas concentraciones porque su síntesis es inducida por las SnRK1) o podrá ser utilizada por la vía glucolítica plastídica o el OPPP. Durante este periodo las condiciones predominantes serían de gran demanda de hexosas-P dentro del plástido, baja disponibilidad de Glc, bajos niveles de oxígeno y alta disponibilidad de ATP. En este escenario metabólico la vía glucolítica citosólica, el TCA y la respiración celular (representadas con flechas en color gris) no serían las principales vías de utilización del carbono, con lo cual debería activarse algún mecanismo de disminución del flujo de metabolitos a través de estas vías.

En función de los resultados obtenidos podríamos proponer que las quinasas SnRK (específicamente SOS2, que es una SnRK3) y las CDPK cumplirían alguna función en regular las vías que consumen hexosas-P en el citosol. Particularmente, no sólo regularían la glucólisis, sino también la vía de síntesis de almidón, que es donde se presentan algunos indicios. La fosforilación de enzimas involucradas en la degradación de sacarosa, la vía glucolítica y la síntesis de almidón se representa en la Figura 44-B, con una [P] de color celeste las que ya han sido informadas y con una de color amarillo la enzima estudiada en este trabajo. Particularmente la vía glucolítica se vería “detenida” ya que la fosforilación de las enzimas involucradas está afectando la actividad de las mismas. En esta etapa, la np-Ga3PDHase es fosforilada en endosperma de trigo por las SnRK1, lo que permite que la enzima interactúe con proteínas regulatorias del tipo 14-3-3 disminuyendo su actividad [114, 260, 261]. La actividad de la Ga3PDHase de endosperma de trigo es disminuida por fosforilación llevada a cabo también por las SnRK1 [115], y la piruvato quinasa de semillas de soja es fosforilada induciendo su degradación proteolítica [113]. Por el contrario, no sólo la sacarosa y las SnRK promueven la expresión del gen de la SucSasas, sino que además la fosforilación de la misma por proteínas CDPK aumenta su actividad incluso a concentraciones limitantes de sustrato [111, 194, 255, 269] permitiendo la generación de Glc1P, sustrato específico de la ADPGlcPPasa.

Por otra parte, se ha informado que el complejo de la piruvato deshidrogenasa de la matriz mitocondrial se inactiva en plantas por fosforilación [270, 271] y que la ATP sintasa de la membrana

interna de la matriz mitocondrial se inhibe por fosforilación y posterior interacción con proteínas regulatorias del tipo 14-3-3 [271, 272]. Además, se ha establecido que las enzimas que participan en la biosíntesis de amilosa y amilopectina (SS, SBE, GBSS, ISA y PHOI) interaccionan física y funcionalmente, formando complejos heteroméricos. La formación de estos complejos está regulada por fosforilación e induce interacciones proteína-proteína que favorecen la unión a sustrato y la actividad óptima de las enzimas [43]. En este contexto, pudimos determinar también que no sólo la expresión génica de la ADPGlcPPasa de endosperma de trigo está inducida por sacarosa y por las quinasas SnRK1 [107], sino que también está regulada postraduccionalmente por fosforilación, en los estadios de desarrollo en donde se produce la acumulación de almidón en las semillas. En nuestro trabajo pudimos evidenciar la fosforilación de la subunidad *TaeL*, marcadamente por sobre la subunidad *TaeS*, por quinasas dependientes de Ca^{2+} . Al presente no se determinaron las consecuencias que esta modificación implica en la enzima, pero dada la importancia de la subunidad L en el rol regulatorio de las ADPGlcPPasas, es de gran importancia profundizar los estudios; incluso si esta modificación es necesaria para la interacción con los complejos multiméricos formados por las enzimas que sintetizan almidón [270, 271].

Aunque los fines de la regulación por fosforilación de la ADPGlcPPasa no se encuentran completamente dilucidados, la suma de todos los antecedentes permite especular que las SnRK3 (SOS2) y las CDPK estarían involucradas en la regulación de la vía glucolítica y la de síntesis de almidón en semillas durante la fase de acumulación de reservas. Estas quinasas de proteínas estarían coordinando a las enzimas involucradas para un mejor aprovechamiento del carbono, redireccionándolo hacia las necesidades metabólicas propias del estadio de desarrollo del tejido.

A partir de este trabajo, se pone en evidencia un nuevo nivel de regulación de las ADPGlcPPasas de plantas (enzima clave en la síntesis del almidón), siendo modificadas postraduccionalmente por fosforilación. Esta regulación toma gran importancia en las etapas de acumulación de almidón en el endosperma de trigo, un cultivo de elevado interés agronómico [60]. El almidón acumulado en las semillas de cereales es el principal carbohidrato en la dieta humana y también es materia prima para la generación de recursos renovables como bioplásticos y biocombustibles [238]. Por lo tanto, el completo entendimiento de su metabolismo es crucial para el diseño de estrategias que mejoren su acumulación en los cereales.

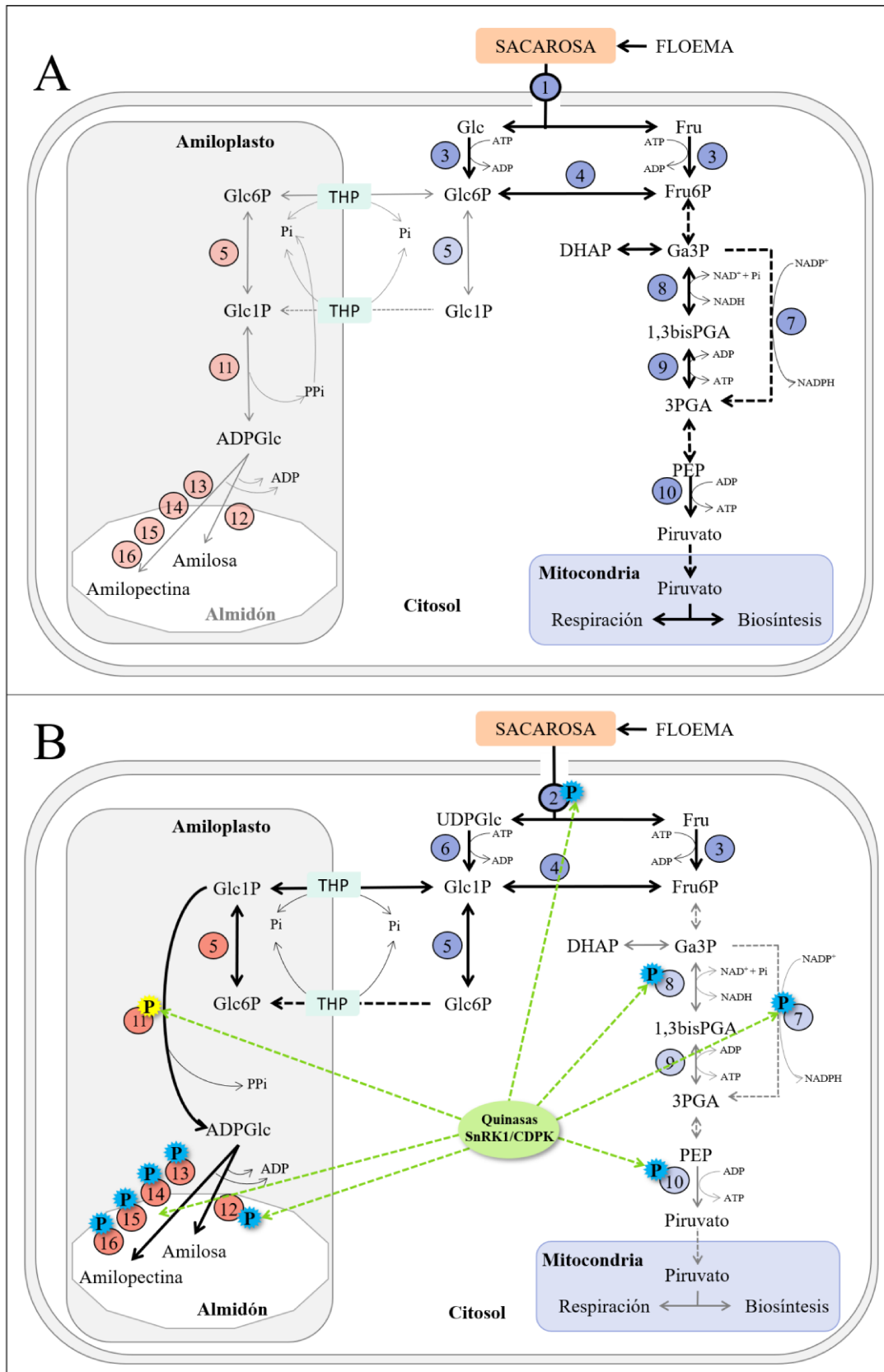


Figura 44: Escenario metabólico para las distintas fases del desarrollo del endosperma de las semillas de trigo. Esquemas para el metabolismo de la sacarosa durante (A) la etapa de proliferación celular, controlado por las invertasas y (B) desde la etapa de transición hacia la de acumulación de reservas, controlado por la SucSasa. Referencias: (●) enzimas plásticas; (●) enzimas citosólicas; (1) Invertasa; (2) SucSasa; (3) Hexoquinasa; (4) Fosfoglucoisomerasa; (5) Fosfoglucomutasa; (6) UDPGlcPPasa; (7) np-Ga3PDHasa; (8) Ga3PDHasa; (9) PGKasa; (10) Piruvato quinasa; (11) ADPGlcPPasa; (12) Almidón sintasa unida a gránulo, GBSS; (13) Almidón sintasa soluble, SS; (14) Enzima ramificante, SBE; (15) Enzima desramificante, isoamilasa, ISA; (16) Almidón fosforilasa plástica, PHOI; (P) fosforilación; THP: transportador de hexosas-fosfato.

5.2 Discusión general:

Este trabajo de Tesis contribuye al conocimiento de la regulación global del metabolismo y la partición intracelular e intercelular del carbono en plantas, particularmente en tejidos heterotróficos. Los estudios se focalizaron específicamente en la ADPGlcPPasa, enzima clave en la vía de síntesis del almidón. Aunque la mayoría de estas enzimas están altamente reguladas, particularmente en endosperma de trigo observamos su insensibilidad a la regulación alostérica y a la modulación redox, tal como se había puesto en evidencia en estudios previos [72, 73]. A pesar de ello, evidenciamos un nuevo punto de regulación postraducciona l de la ADPGlcPPasa mediado por fosforilación, contribuyendo a estudios en fosfoproteómica y bioinformática [43, 77, 78, 195]. Esta modificación involucra a quinasas que se encargan de la regulación global del metabolismo del carbono (las SnRK y las CDPK) [33]. En este contexto, la fosforilación sería importante para orquestar la partición del carbono hacia el metabolismo del almidón en conjunto con la modificación redox y la formación de complejos entre las diferentes enzimas involucradas en la biosíntesis del polisacárido [43]. Los resultados aportados en esta Tesis evidencian que la subunidad L juega un papel crítico para establecer niveles de actividad y de características de regulación en las ADPGlcPPasas de plantas. Incluso, la subunidad L es el blanco de la modificación postraducciona l por fosforilación de la enzima de endosperma de trigo.

Todos los procesos de regulación de la ADPGlcPPasa puestos en evidencia operarían como un mecanismo efectivo para optimizar la acumulación del polímero en semillas de trigo y otros cultivos. La información obtenida en este trabajo abre varias líneas de investigación que requerirían desarrollarse para alcanzar una mejor comprensión de la síntesis de almidón en el endosperma de trigo y de otros cereales que producen el polisacárido como reserva principal. Estos estudios, en conjunto con los análisis cinéticos y regulatorios de la ADPGlcPPasa, serán importantes para el diseño de estrategias y herramientas biotecnológicas para mejorar los rendimientos de cultivos de interés agronómico e incluso considerar la aplicación del almidón en fuentes renovables como los biocombustibles y bioplásticos. Esto lo convierte en un producto natural clave para el desarrollo de futuras bioindustrias y biorefinerías [238].

5.3 Conclusiones:

A partir de los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo de tesis, se pueden enunciar las siguientes conclusiones generales:

a) La metodología del ADN recombinante ha permitido producir la ADPGlcPPasa de endosperma de trigo, hasta el momento no informada. El sistema de expresión logrado nos permitió obtener las subunidades individuales y coexpresadas, fusionadas a una etiqueta de histidinas que permitió purificarlas en un único paso, con altos rendimientos y grado de pureza, superando así lo complicado que resulta la purificación a homogeneidad en cantidades relativamente elevadas de las enzimas a partir de tejidos de trigo.

b) Los estudios de caracterización cinética, regulatoria y estructural permitieron determinar que la *TaeADPGlcPPasa* de endosperma tiene propiedades cinéticas y regulatorias que se condicen con las reportadas previamente para la enzima purificada de su fuente natural. Esta enzima es insensible al principal activador 3PGA, e incluso a posibles activadores secundarios como la Fru6P y la Glc6P. La *TaeADPGlcPPasa* de endosperma también es insensible al efecto de FBP, PEP y Pi a bajas concentraciones, siendo inhibida (con baja afinidad) a altas concentraciones de los mismos. Por otro lado, observamos que el 3PGA (y la Fru6P) no revierten la inhibición por Pi. A pesar de que el heterotetrámero resultó insensible al agregado de agentes oxidantes o reductores, la actividad del homodímero *TaeS* está regulada de manera redox y alostérica, activándose por 3PGA en condiciones reductoras e inhibiéndose en condiciones oxidantes. Además, observamos que la formación del heterotetrámero es favorecida en condiciones reductoras.

Si bien *TaeL* no tiene actividad enzimática significativa, a partir de la realización de híbridos con las subunidades de la enzima de papa (*Stu*, que es altamente sensible a la regulación alostérica por 3PGA/Pi) evidenciamos que es la responsable de la insensibilidad a 3PGA (incluso a Fru6P). Por otro lado, *StuL* confiere a la enzima alta sensibilidad a efectores alostéricos, siendo los principales activadores el 3PGA, el PEP, la Rib5P, la GlcN6P y la Fru6P. Particularmente, observamos que el híbrido *StuS/TaeL* tiene propiedades de interés: mayor estabilidad al calor y propiedades alostéricas similares a la enzima de tipo salvaje *TaeS/TaeL*. Esta construcción híbrida podría producir una planta de trigo transgénico estable al calor, sin cambios importantes en la fisiología. Con respecto a la subunidad S, los resultados sugieren que su rol en el heterotetrámero es el de conferir afinidad aparente a la inhibición por Pi; siendo también crítica para la estabilidad térmica de la enzima. Con los resultados obtenidos, junto a los antecedentes sobre el tema, podemos plantear la hipótesis de que, en condiciones fisiológicas, dentro de la célula del endosperma, podrían

coexistir tanto la forma homodimérica de *TaeS*, como el heterotetrámero *TaeS/TaeL* que conforma a la enzima completa. El homodímero es sensible a los cambios redox y a la regulación alostérica, siendo fuertemente activada en condiciones reductoras y en presencia de 3PGA, e inhibida por Pi y oxidantes. En determinados momentos del desarrollo o cambios en el metabolismo de la semilla, el gen de la subunidad L se expresa, traduce e interacciona con la subunidad S. La nueva conformación heterotetramérica, torna insensible a la enzima, pre-activándola y llevándola a su capacidad catalítica máxima, aunque sigue conservando la inhibición por Pi. Favorablemente, este último metabolito (en conjunto con el 3PGA y la Fru6P, en menor medida) le confiere estabilidad a la enzima frente a temperaturas elevadas. En este sentido, gana importancia la regulación postraduccional por fosforilación que ocurre específicamente sobre la subunidad L.

c) Los estudios de regulación por fosforilación, tanto *in vivo* como *in vitro*, nos permitieron determinar que la *TaeADPGlcPPasa* de endosperma, es fosforilada específicamente en semillas de trigo, y no de ricino, por proteínas quinasas dependiente de Ca^{2+} . Esto ocurre preferentemente acompañando el avance del desarrollo, donde se produce la acumulación de compuestos de reserva, y donde esta enzima tiene un rol fundamental en la síntesis del almidón. La fosforilación ocurre marcadamente en la subunidad L. En esta subunidad, existen seis residuos de Ser que se alinean con fosfopéptidos encontrados en estudios de fosfoproteómica y bioinformática, siendo putativas de ser fosforiladas. Con los resultados obtenidos, junto a los antecedentes sobre el tema, podemos plantear la hipótesis de que la fosforilación de la *TaeADPGlcPPasa* ocurriría durante el contexto fisiológico del periodo de acumulación de reservas en semillas de trigo en desarrollo, periodo en el cual la degradación de sacarosa se encuentra fundamentalmente asociada a la *SucSasa* y el principal destino de las hexosas-P es hacia la síntesis de compuestos de reserva (principalmente almidón). Es en este periodo donde las quinasas del tipo SnRK1/CDPK tienen un rol fundamental y se encargan de regular y coordinar el metabolismo de los hidratos de carbono en respuesta a las disponibilidades del mismo, la demanda de energía y los niveles de oxígeno dentro de la célula.

6. Bibliografía

- [1] B Halliwell (2006) Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* 141 p. 312–322.
- [2] CR Woese (2002) On the evolution of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (13) p. 8742–8747.
- [3] S Mora-Garcia, FG Stolowicz, RA Wolosiuk (2006) Redox signal transduction in plant metabolism, En: *Control of Primary Metabolism in Plants*, (Ed.: WC Plaxton, MT McManus) Blackwell Publishing Ltd, p. 150–186.
- [4] JF Kasting, JL Siefert (2002) Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science* 296 (5570) p. 1066–8.
- [5] RJ. Williams (2007) A system's view of the evolution of life. *J. R. Soc. Interface* 4 (17) p. 1049–1070.
- [6] SD Dyall, MT Brown, PJ Johnson (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304 (5668) p. 253–257.
- [7] EH Fischer, EG Krebs (1955) Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J. Biol. Chem.* 216 (1) p. 121–32.
- [8] AA Iglesias, FE Podestá (2005) Photosynthate formation and partitioning in crop plants, En: *Handbook of Photosynthesis*, (Ed.: M Pessarakli) CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, p. 525–545.
- [9] B Alberts, D Bray, J Lewis, M Raff, K Roberts, JD Watson (1996) *Biología Molecular de la Célula*, 5ta ed. Ediciones Omega.
- [10] L Taiz, E Zeiger (2010) *Plant Physiology*, 3era ed. Sinauer Associates.
- [11] HE Neuhaus, MJ Emes (2000) Nonphotosynthetic metabolism in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51 (1) p. 111–140.
- [12] APM Weber (2004) Solute transporters as connecting elements between cytosol and plastid stroma. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 (3) p. 247–253.
- [13] J Hudák (1997) Photosynthetic apparatus, En: *Handbook of Photosynthesis*, (Ed.: M Pessarakli) Marcel Dekker, p. 27–48.
- [14] JH Bryce, SA Hill (1999) Energy production in plant cells, En: *Plant biochemistry and molecular biology*, (Ed.: RC Lea, P.J. y Leegood) John Wiley, p. 1–28.
- [15] AA Iglesias, FE Podestá, CS Andreo (1996) Structural and regulatory properties of the enzymes involved in C3, C4 and CAM pathways for photosynthetic carbon assimilation., En: *Handbook of photosynthesis*, (Ed.: M Pessarakli) Marcel Dekker, p. 481–503.
- [16] AA Benson, JA Bassham, M Calvin, TC Goodale, VA Haas, W Stepka (1950) The Path of Carbon in Photosynthesis. V. Paper Chromatography and Radioautography of the Products. *J. Am. Chem. Soc.* 72 (4) p. 1710–1718.
- [17] AA Benson, M Calvin (1950) Carbon Dioxide Fixation By Green Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1 (1) p. 25–42.
- [18] AA Benson (1951) The sequence of formation of hexoses during photosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 32 (1) p. 223–224.
- [19] W Martin, R Scheibe, C Schnarrenberger (2004) The Calvin cycle and its regulation, En: *Photosynthesis: Physiology and Metabolism.*, (Ed.: RC Leegood, TD Sharkey, S von Caemmerer) Kluwer Academic Publishers, p. 9–51.

- [20] RC Leegood (1999) Photosynthesis in C3 plants: The Benson-Calvin cycle and photorespiration., En: *Plant biochemistry and molecular biology.*, (Ed.: PJ Lea, RC Leegood) John Wiley, p. 29–50.
- [21] JR Quayle, RC Fuller, AA Benson, M Calvin (1954) Enzymatic carboxylation of ribulose diphosphate. *J. Am. Chem. Soc.* 76 (13) p. 3610–3611.
- [22] RJ Ellis (1979) The most abundant protein in the world. *Trends Biochem. Sci.* 4 (11) p. 241–244.
- [23] SP Robinson, VJ Streusand, JM Chatfield, AR Portis (1988) Purification and Assay of Rubisco Activase from Leaves. *Plant Physiol.* 88 (4) p. 1008–1014.
- [24] NE Tolbert (1997) The C2 oxidative photosynthetic carbon cycle. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48 (1) p. 1–25.
- [25] R Douce, H-W Heldt (2004) Photorespiration, En: *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, (Ed.: RC Leegood, TD Sharkey, S von Caemmerer) Kluwer Academic Publishers, p. 115–136.
- [26] S Lalonde, D Wipf, WB Frommer (2004) Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55 (1) p. 341–372.
- [27] M Tegeder, PM Weber (2006) Metabolite transporters in the control of plant primary metabolism, En: *Control of Primary Metabolism in Plants*, (Ed.: WC Plaxton, MT McManus) Blackwell Publishing Ltd, p. 1–373.
- [28] JE Lunn (2006) Compartmentation in plant metabolism. *J. Exp. Bot.* 58 (1) p. 35–47.
- [29] ARJ Portis (2002) Photosynthetic Carbon Metabolism, *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing group Ltd, 2002.
- [30] MA Ballicora, AA Iglesias, J Preiss (2004) ADP-glucose pyrophosphorylase: A regulatory enzyme for plant starch synthesis. *Photosynth. Res.* 79 (1) p. 1–24.
- [31] K Toyota, M Tamura, T Ohdan, Y Nakamura (2006) Expression profiling of starch metabolism-related plastidic translocator genes in rice. *Planta* 223 (2) p. 248–257.
- [32] SC Huber, JL Huber (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 (1) p. 431–444.
- [33] H Weber, L Borisjuk, U Wobus (2005) Molecular Physiology of Legume Seed Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56 (1) p. 253–279.
- [34] MDH Brownleader, JB Harbone, PM Dey (1997) Carbohydrate Metabolism: Primary Metabolism of Monosaccharides, En: *Plant Biochemistry*, (Ed.: PM Dey, JB Harbone) Elsevier Ltd, p. 111–141.
- [35] C Schnarrenberger, A Flechner, W Martin (1995) Enzymatic Evidence for a Complete Oxidative Pentose Phosphate Pathway in Chloroplasts and an Incomplete Pathway in the Cytosol of Spinach Leaves. *Plant Physiol.* 108 (2) p. 609–614.
- [36] PM Debnam, MJ Emes (1999) Subcellular distribution of enzymes of the oxidative pentose phosphate pathway in root and leaf tissues. *J. Exp. Bot.* 50 (340) p. 1653–1661.
- [37] NJ Kruger, A von Schaewen (2003) The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6 (3) p. 236–46.
- [38] RH Averill, J Bailey-Serres, NJ Kruger (1998) Co-operation between cytosolic and plastidic oxidative pentose phosphate pathways revealed by 6-phosphogluconate dehydrogenase-deficient genotypes of maize. *Plant J.* 14 (4) p. 449–457.
- [39] M Eicks, V Maurino, S Knappe, U-I Flüggé, K Fischer (2002) The Plastidic Pentose Phosphate Translocator Represents a Link between the Cytosolic and the Plastidic Pentose Phosphate Pathways in Plants. *Plant Physiol.* 128 (2) p. 512–522.

- [40] WC Plaxton (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 (1) p. 185–214.
- [41] A Buleon, P Colonna, V Planchot, S Ball (1998) Starch granules : structure and biosynthesis. *Int J Biol Macromol* 23 (2) p. 85–112.
- [42] AM Smith, M Stitt (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell Environ.* 30 (9) p. 1126–1149.
- [43] IJ Tetlow, F Liu, MJ Emes (2015) Protein-Protein Interactions During Starch Biosynthesis, En: *Starch: Metabolism and Structure*, (Ed.: Y Nakamura) Springer India, p. 1–451.
- [44] J Preiss (1982) Regulation of the Biosynthesis and Degradation of Starch. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33 (1) p. 431–454.
- [45] WT Kim, VR Franceschi, TW Okita, NL Robinson, M Morell, J Preiss (1989) Immunocytochemical Localization of ADP-glucose Pyrophosphorylase in Developing Potato Tuber Cells. *Plant Physiol.* 91 p. 217–220.
- [46] ME Miller, PS Chourey (1995) Intracellular immunolocalization of adenosine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase in developing endosperm cells of maize (*Zea mays* L.). *Planta* 197 (3) p. 522–527.
- [47] G Entwistle, TA Rees (1988) Enzymic capacities of amyloplasts from wheat (*Triticum aestivum*) endosperm. *Biochem. J.* 255 p. 391–396.
- [48] K Denyer, AM Smith (1988) The capacity of plastids from developing pea cotyledons to synthesise acetyl CoA. *Planta* 173 (2) p. 172–182.
- [49] E Echeverria, CD Boyer, PA Thomas, K-C Liu, JC Shannon (1988) Enzyme Activities Associated with Maize Kernel Amyloplasts. *Plant Physiol.* 86 (3) p. 786–792.
- [50] F Kang, S Rawsthorne (1994) Starch and fatty acid synthesis in plastids from developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant J.* 6 (6) p. 795–805.
- [51] K Denyer, F Dunlap, T Thorbjørnsen, P Keeling, AM Smith (1996) The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra-plastidial. *Plant Physiol.* 112 (2) p. 779–785.
- [52] T Thorbjørnsen, P Villand, K Denyer, O-A Olsen, AM Smith (1996) Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphorylase occur inside and outside the amyloplasts in barley endosperm. *Plant J.* 10 (2) p. 243–250.
- [53] PE Johnson, NJ Patron, AR Bottrill, JR Dinges, BF Fahy, ML Parker, DN Waite, K Denyer (2003) A Low-Starch Barley Mutant, Risø 16, Lacking the Cytosolic Small Subunit of ADP-Glucose Pyrophosphorylase, Reveals the Importance of the Cytosolic Isoform and the Identity of the Plastidial Small Subunit. *Society* 131 p. 684–696.
- [54] LA Kleczkowski (1996) Back to the drawing board: redefining starch synthesis in cereals. *Trends Plant Sci.* 1 (11) p. 363–364.
- [55] MA Ballicora, AA Iglesias, J Preiss (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (2) p. 213–225.
- [56] S Cortassa, MA Aon, AA Iglesias, JC Aon, D Lloyd (2012) *An Introduction to Metabolic and Cellular Engineering*, Second Edi. World Scientific Publishing Co.
- [57] K Skryhan, L Gurrieri, F Sparla, P Trost, A Blennow (2018) Redox Regulation of Starch Metabolism. *Front. Plant Sci.* 9 (1344) p. 1–8.
- [58] A Goren, D Ashlock, IJ Tetlow (2018) Starch formation inside plastids of higher plants. *Protoplasma* 255 (6) p. 1855–1876.

- [59] JS Jeon, N Ryoo, TR Hahn, H Walia, Y Nakamura (2010) Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiol. Biochem.* 48 (6) p. 383–392.
- [60] A Tuncel, TW Okita (2013) Improving starch yield in cereals by over-expression of ADPglucose pyrophosphorylase: Expectations and unanticipated outcomes. *Plant Sci.* 211 p. 52–60.
- [61] GJ MacNeill, S Mehrpouyan, MAA Minow, JA Patterson, IJ Tetlow, MJ Emes (2017) Starch as a source, starch as a sink: The bifunctional role of starch in carbon allocation. *J. Exp. Bot.* 68 (16) p. 4433–4453.
- [62] A. Iglesias, GF Barry, C Meyer, L Bloksberg, PA Nakata, T Greene, MJ Laughlin, TW Okita, G. Kishoreand, J Preiss (1993) Expression of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem* 268 (15) p. 1081–1086.
- [63] MA Ballicora, MJ Laughlin, Y Fu, TW Okita, CF Barry, J Preiss (1995) Adenosine 5' -Diphosphate-Glucose Pyrophosphorylase from Potato Tuber. *Plant Physiol.* 109 p. 245–251.
- [64] MA Ballicora, Y Fu, NM Nesbitt, J Preiss (1998) ADP-Glucose Pyrophosphorylase from Potato Tubers. Site-Directed Mutagenesis Studies of the Regulatory Sites. *Plant Physiol.* 118 (1) p. 265–274.
- [65] G Saripalli, PK Gupta (2015) AGPase: its role in crop productivity with emphasis on heat tolerance in cereals. *Theor. Appl. Genet.* 128 (10) p. 1893–1916.
- [66] P Crevillén, MA Ballicora, Á Mérida, J Preiss, JM Romero (2003) The different large subunit isoforms of *Arabidopsis thaliana* ADP-glucose pyrophosphorylase confer distinct kinetic and regulatory properties to the heterotetrameric enzyme. *J. Biol. Chem.* 278 (31) p. 28508–28515.
- [67] P Geigenberger (2011) Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiol.* 155 (4) p. 1566–1577.
- [68] T Ventriglia, MA Ballicora, P Crevillén, J Preiss, JM Romero (2007) Regulatory properties of potato-*Arabidopsis* hybrid ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Cell Physiol.* 48 (6) p. 875–880.
- [69] J Ghosh, Hara Prasad; Preiss (1966) Adenosine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase: a regulatory enzyme in the biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 241 (19) p. 4491–4504.
- [70] A Iglesias, J Preiss (1992) Bacterial glycogen and plant starch biosynthesis. *Biochem. Educ.* 20 (4) p. 5–6.
- [71] A Iglesias, F Podestá (1996) Photosynthate formation and partitioning in crop plants, En: *Handbook of Photosynthesis*, (Ed.: M Pessaraki) Marcel Dekker, p. 681–698.
- [72] IJ Tetlow (2003) Subcellular localization of ADPglucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of the properties of a plastidial isoform. *J. Exp. Bot.* 54 (383) p. 715–725.
- [73] DF Gómez-Casati, AA Iglesias (2002) ADP-glucose pyrophosphorylase from wheat endosperm. Purification and characterization of an enzyme with novel regulatory properties. *Planta* 214 (3) p. 428–434.
- [74] MA Ballicora, JB Frueauf, Y Fu, P Schürmann, J Preiss (2000) Activation of the Potato Tuber ADP-glucose Pyrophosphorylase by Thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 275 (2) p. 1–7.
- [75] A Kolbe, A Tiessen, H Schluepmann, M Paul, S Ulrich, P Geigenberger (2005) Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (31) p. 11118–11123.
- [76] JE Lunn, I Delorge, C Mar, P Van Dijck, M Stitt (2014) Trehalose metabolism in plants. 79 (4) p. 544–567.

- [77] JI Heazlewood, P Durek, J Hummel, J Selbig, W Weckwerth, D Walther, WX Schulze (2008) PhosPhAt: A database of phosphorylation sites in *Arabidopsis thaliana* and a plant-specific phosphorylation site predictor. *Nucleic Acids Res.* 36 p. 1015–1021.
- [78] K Lohrig, B Müller, J Davydova, D Leister, DA Wolters (2009) Phosphorylation site mapping of soluble proteins: Bioinformatical filtering reveals potential plastidic phosphoproteins in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 229 (5) p. 1123–1134.
- [79] J Barchiesi, N Hedin, AA Iglesias, DF Gomez-Casati, MA Ballicora, M V. Busi (2017) Identification of a novel starch synthase III from the picoalgae *Ostreococcus tauri*. *Biochimie* 133 p. 37–44.
- [80] N Hedin, J Barchiesi, DF Gomez-Casati, AA Iglesias, MA Ballicora, M V. Busi (2017) Identification and characterization of a novel starch branching enzyme from the picoalgae *Ostreococcus tauri*. *Arch. Biochem. Biophys.* 618 p. 52–61.
- [81] JP Ral, E Derelle, C Ferraz, F Wattedled, B Farinas, F Corellou, A Buléon, MC Slomianny, D Delvalle, C d'Hulst, S Rombauts, H Moreau, S Ball (2004) Starch division and partitioning. A mechanism for granule propagation and maintenance in the picophytoplanktonic green alga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiol.* 136 (2) p. 3333–3340.
- [82] D Delvallé, S Dumez, F Wattedled, I Roldán, V Planchot, P Berbezy, P Colonna, D Vyas, M Chatterjee, S Ball, Á Mérida, C D'Hulst (2005) Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J.* 43 (3) p. 398–412.
- [83] MK Pandey, NS Rani, MS Madhav, RM Sundaram, GS Varaprasad, AKP Sivaranjani, A Bohra, GR Kumar, A Kumar (2012) Different isoforms of starch-synthesizing enzymes controlling amylose and amylopectin content in rice (*Oryza sativa* L.). *Biotechnol. Adv.* 30 (6) p. 1697–1706.
- [84] D Gómez-Casati, M Martín, M Busi (2013) Polysaccharide-synthesizing Glycosyltransferases and Carbohydrate Binding Modules: the case of Starch Synthase III. *Protein Pept. Lett.* 20 (8) p. 856–863.
- [85] C Wilkens, B Svensson, MS Møller (2018) Functional roles of starch binding domains and surface binding sites in enzymes involved in starch biosynthesis. *Front. Plant Sci.* 9 (1652) p. 1–12.
- [86] G Tenorio, A Orea, JM Romero, Á Mérida (2003) Oscillation of mRNA level and activity of granule-bound starch synthase I in *Arabidopsis* leaves during the day/night cycle. *Plant Mol. Biol.* 51 (6) p. 949–958.
- [87] W Pao, L Liu, S Wang (2005) Circadian Expressions of Starch Branching Enzyme Gene in Sweet Potato Leaves. *J. Genet. Mol. Biol.* 16 (3) p. 151–157.
- [88] N Crofts, Y Nakamura, N Fujita (2017) Critical and speculative review of the roles of multi-protein complexes in starch biosynthesis in cereals. *Plant Sci.* 262 p. 1–8.
- [89] A Blennow, SB Engelsen, TH Nielsen, L Baunsgaard, R Mikkelsen (2002) Starch phosphorylation: A new front line in starch research. *Trends Plant Sci.* 7 (10) p. 445–450.
- [90] CM Figueroa, C V Piattoni, KEJ Trípodí, FE Podestá, AA Iglesias (2016) Carbon Photoassimilation and photosynthate partitioning in plants, En: *Handbook of Photosynthesis*, p. 509–536.
- [91] I Malinova, HM Qasim, H Brust, J Fettke (2018) Parameters of starch granule genesis in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 9 (761) p. 1–7.
- [92] S Baud, L Lepiniec (2010) Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Prog. Lipid Res.* 49 (3) p. 235–249.
- [93] FL Theodoulou, PJ Eastmond (2012) Seed storage oil catabolism: A story of give and take. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15 (3) p. 322–328.
- [94] C V Piattoni, CM Figueroa, VE Perotti, FE Podestá, AA Iglesias (2004) Biochemistry and Physiology

- of Carbon Partitioning in Crop Plants. *Handb. Plant Crop Physiol. CRC Press* 1 p. 193–216.
- [95] DL Nelson, MM Cox (2004) *Lehninger, Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman Co.
- [96] JB Ohlrogge, JG Jaworski (1997) Regulation of fatty acid synthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 48 p. 109–136.
- [97] F Ludewig, U-I Flügge (2013) Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation. *Front. Plant Sci.* 4 (231) p. 1–16.
- [98] J Schwender, JB Ohlrogge, Y Shachar-hill (2003) A Flux Model of Glycolysis and the Oxidative Pentosephosphate Pathway in Developing Brassica napus Embryos. 278 (32) p. 29442–29453.
- [99] PD Bates, S Stymne, J Ohlrogge (2013) Biochemical pathways in seed oil synthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16 (3) p. 358–364.
- [100] PH Raven, RF Evert, SE Eichhorn (2005) *Biology of Plants*. Macmillan.
- [101] JD Mauseth (2014) *Botany : an introduction to plant biology*, 5ta ed. Jones & Bartlett Learning.
- [102] JD Bewley, M Black (1994) Seeds: Physiology of Development and Germination., En: *The Language of Science*, 2da ed., Plenum Press.
- [103] JW Patrick, FC Botha, RG Birch (2013) Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants. *Plant Biotechnol. J.* 11 (2) p. 142–156.
- [104] DJ Murphy (1993) Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Prog. Lipid Res.* 32 (3) p. 247–280.
- [105] R Radchuk, V Radchuk, W Weschke, L Borisjuk, H Weber (2006) Repressing the expression of the SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN KINASE gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiol.* 140 (1) p. 263–278.
- [106] K Koch (2004) Sucrose metabolism : regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 (3) p. 235–246.
- [107] P Geigenberger (2003) Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *J. Exp. Bot.* 54 (382) p. 457–465.
- [108] C Polge, M Thomas (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci.* 12 (1) p. 20–28.
- [109] E Baena-González, F Rolland, JM Thevelein, J Sheen (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448 (7156) p. 938–42.
- [110] SC Huber (2007) Exploring the role of protein phosphorylation in plants: from signalling to metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 35 p. 28–32.
- [111] T Asano, N Kunieda, Y Omura, H Ibe, T Kawasaki, M Takano, M Sato, H Furuhashi, T Mujin, F Takaiwa, C Wu Cy, Y Tada, T Satozawa, M Sakamoto, H Shimada, C Wu, Y Tada, T Satozawa, M Sakamoto, H Shimada (2002) Rice SPK, a calmodulin-like domain protein kinase, is required for storage product accumulation during seed development: phosphorylation of sucrose synthase is a possible factor. *Plant Cell* 14 (3) p. 619–628.
- [112] RS McKibbin, N Muttucumaru, MJ Paul, SJ Powers, MM Burrell, S Coates, PC Purcell, A Tiessen, P Geigenberger, NG Halford (2006) Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. *Plant Biotechnol. J.* 4 (4) p. 409–418.
- [113] GQ Tang, SC Hardin, R Dewey, SC Huber (2003) A novel C-terminal proteolytic processing of cytosolic pyruvate kinase, its phosphorylation and degradation by the proteasome in developing soybean seeds. *Plant J.* 34 (1) p. 77–93.

- [114] C Piattoni, D Bustos, S Guerrero, A Iglesias (2011) Nonphosphorylating Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is Phosphorylated in Wheat Endosperm at Serine-404 by an SNF1-Related Protein Kinase Allosterically Inhibited by Ribose-5-Phosphate. *Plant Physiol.* 156 (3) p. 1337–1350.
- [115] C V Piattoni, DML Ferrero, I Dellaferrera, A Vegetti, AA Iglesias (2017) Cytosolic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is Phosphorylated during Seed Development. *Front. Plant Sci.* 8 (522) p. 1–16.
- [116] M Hajduch, R Matusova, NL Houston, JJ Thelen (2011) Comparative proteomics of seed maturation in oilseeds reveals differences in intermediary metabolism. *Proteomics* 11 (9) p. 1619–1629.
- [117] UK Laemmli (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 p. 680–685.
- [118] MM Bradford (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 254 p. 248–254.
- [119] JL Vaitukaitis (1981) Production of Antisera with Small Doses of Immunogen: Multiple Intradermal Injections. *Methods Enzym.* 73 p. 46–52.
- [120] BE Rojas, F Santin, RM Ulloa, AA Iglesias, CM Figueroa (2018) A fluorometric method for the assay of protein kinase activity. *Anal. Biochem.* 557 p. 120–122.
- [121] M Raíces, JM Chico, MT Tellez-Iñón, RM Ulloa (2001) Molecular characterization of StCDPK1 , a calcium-dependent protein kinase from *Solanum tuberosum* that is induced at the onset of tuber development. *Plant Mol. Biol.* 46 (5) p. 591–601.
- [122] C Fusari, AM Demonte, CM Figueroa, M Aleanzi, AA Iglesias (2006) A colorimetric method for the assay of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Anal. Biochem.* 352 (1) p. 145–147.
- [123] MA Meira (2008) La pirofosfatasa inorgánica de *Saccharomyces cerevisiae*: clonado molecular del gen, expresión y purificación de la proteína recombinante, Universidad Nacional del Litoral.
- [124] A Yep, MA Ballicora, MN Sivak, J Preiss, JA Bio- (2004) Identification and Characterization of a Critical Region in the Glycogen Synthase from *Escherichia coli*. 279 (9) p. 8359–8367.
- [125] MA Ballicora, JI Sesma, AA Iglesias, J Preiss (2002) Characterization of chimeric ADPglucose pyrophosphorylases of *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens*. Importance of the C-terminus on the selectivity for allosteric regulators. *Biochemistry* 41 (30) p. 9431–9437.
- [126] AC Ebrecht, L Solamen, BL Hill, AA Iglesias, KW Olsen, MA Ballicora (2017) Allosteric Control of Substrate Specificity of the *Escherichia coli* ADP-Glucose Pyrophosphorylase. *Front. Chem.* 5 p. 1–41.
- [127] JS Greenwood, JD Bewley (1982) Seed development in *Ricinus communis* (castor bean) I. Descriptive morphology. *Can J Bot.* 60 p. 1751–1760.
- [128] WL Turner, VL Knowles, WC Plaxton (2005) Cytosolic pyruvate kinase: Subunit composition, activity, and amount in developing castor and soybean seeds, and biochemical characterization of the purified castor seed enzyme. *Planta* 222 (6) p. 1051–1062.
- [129] PH Reibach, CR Benedict (1982) Biosynthesis of Starch in Proplastids of Germinating *Ricinus communis* Endosperm Tissue. *Plant Physiol.* 70 (1) p. 252–256.
- [130] S Baud, IA Graham (2006) A spatiotemporal analysis of enzymatic activities associated with carbon metabolism in wild-type and mutant embryos of *Arabidopsis* using in situ histochemistry. *Plant J.* 46 (1) p. 155–169.
- [131] J Folch, M Lees, GH Sloane Stanley (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226 p. 497–509.

- [132] G Muszyńska, L Andersson, J Porath (1986) Selective adsorption of phosphoproteins on gel-immobilized ferric chelate. *Biochemistry* 25 (22) p. 6850–6853.
- [133] D Gong, Y Guo, AT Jagendorf, J Zhu (2019) Biochemical Characterization of the Arabidopsis Protein Kinase SOS2 That Functions in Salt Tolerance 1. *Plant Physiol.* 130 p. 256–264.
- [134] P Crozet, F Jammes, B Valot, F Ambard-Bretteville, S Nessler, M Hodges, J Vidal, M Thomas (2010) Cross-phosphorylation between Arabidopsis thaliana sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 1 (AtSnRK1) and its activating kinase (AtSnAK) determines their catalytic activities. *J. Biol. Chem.* 285 (16) p. 12071–12077.
- [135] DA Jackson (1995) DNA: template for an economic revolution. *Ann N Y Acad Sci.* 758 (1) p. 356–65.
- [136] C Ainsworth, M Tarvis, J Clark (1993) Isolation and analysis of a cDNA clone encoding the small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase from wheat. *Plant Mol. Biol.* 23 (1) p. 23–33.
- [137] C Ainsworth, F Hosein, M Tarvis, F Weir, M Burrell, KM Devos, MD Gale (1995) Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase genes in wheat: differential expression and gene mapping. *Planta* 197 (1) p. 1–10.
- [138] JHM Hendriks, A Kolbe, Y Gibon, M Stitt, P Geigenberger (2003) ADP-Glucose Pyrophosphorylase Is Activated by Posttranslational Redox-Modification in Response to Light and to Sugars in Leaves of Arabidopsis and Other Plant Species 1 [w]. *Plant Physiol.* 133 p. 838–849.
- [139] MA Ballicora, Y Fu, JB Frueauf, J Preiss (1999) Heat stability of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase: role of Cys residue 12 in the small subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 257 (3) p. 782–786.
- [140] Y Fu, MA Ballicora, JF Leykam, J Preiss (1998) Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* 273 (39) p. 25045–25052.
- [141] A Tuncel, B Cakir, SK Hwang, TW Okita (2014) The role of the large subunit in redox regulation of the rice endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase. *FEBS J.* 281 (21) p. 4951–4963.
- [142] A Tuncel, J Kawaguchi, Y Ihara, H Matsusaka, A Nishi, T Nakamura, S Kuhara, H Hirakawa, Y Nakamura, B Cakir, A Nagamine, TW Okita, SK Hwang, H Satoh (2014) The rice endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit is essential for optimal catalysis and allosteric regulation of the heterotetrameric enzyme. *Plant Cell Physiol.* 55 (6) p. 1169–1183.
- [143] BJ Smith-White, J Preiss (1992) Comparison of proteins of ADP-glucose pyrophosphorylase from diverse sources. *J. Mol. Evol.* 34 (5) p. 449–464.
- [144] SK Boehlein, JR Shaw, LC Hannah, JD Stewart (2010) Probing allosteric binding sites of the maize endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol* 152 (1) p. 85–95.
- [145] JM Cross, M Clancy, JR Shaw, TW Greene, RR Schmidt, TW Okita, LC Hannah (2004) Both Subunits of ADP-Glucose Pyrophosphorylase Are Regulatory. *Plant Physiol.* 135 (1) p. 137–144.
- [146] SK Hwang, S Hamada, TW Okita (2007) Catalytic implications of the higher plant ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit. *Phytochemistry* 68 (4) p. 464–77.
- [147] N Georgelis, EL Braun, JR Shaw, LC Hannah (2007) The two AGPase subunits evolve at different rates in angiosperms, yet they are equally sensitive to activity-altering amino acid changes when expressed in bacteria. *Plant Cell* 19 (5) p. 1458–72.
- [148] ML Kuhn, CM Figueroa, AA Iglesias, MA Ballicora (2013) The ancestral activation promiscuity of ADP-glucose pyrophosphorylases from oxygenic photosynthetic organisms. *BMC Evol. Biol.* 13 (51) p. 1–8.
- [149] IH Kavakli, C Kato, S-B Choi, K-H Kim, PR Salamone, H Ito, TW Okita (2002) Generation,

- characterization, and heterologous expression of wild-type and up-regulated forms of *Arabidopsis thaliana* leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* 215 p. 430–439.
- [150] MA Ballicora, JR Dubay, CH Devillers, J Preiss (2005) Resurrecting the ancestral enzymatic role of a modulatory subunit. *J. Biol. Chem.* 280 (11) p. 10189–10195.
- [151] W Plaxton, J Preiss (1987) Purification and properties of nonproteolytic degraded ADPglucose pyrophosphorylase from maize endosperm. *Plant Physiol.* 83 (1) p. 105–112.
- [152] LA Kleczkowski, P Villand, E Luthi, OA Olsen, J Preiss (1993) Insensitivity of Barley Endosperm ADP-Glucose Pyrophosphorylase to 3-Phosphoglycerate and Orthophosphate Regulation. *Plant Physiol.* 101 (1) p. 179–186.
- [153] JR Sowokinos (1981) Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*. II Catalytic properties and regulation of adp-glucose and udp-glucose pyrophosphorylase activities in potatoes. *Plant Physiol.* 68 (4) p. 924–929.
- [154] JR Sowokinos, J Preiss (1982) Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*. III. Purification, physical, and catalytic properties of ADP-glucose pyrophosphorylase in potatoes. *Plant Physiol.* 69 (6) p. 1459–1466.
- [155] AA Iglesias, MA Ballicora, JI Sesma, J Preiss (2006) Domain swapping between a cyanobacterial and a plant subunit ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Cell Physiol.* 47 (4) p. 523–530.
- [156] PL Keeling, PJ Bacon, DC Holt (1993) Elevated temperature reduces starch deposition in wheat endosperm by reducing the activity of soluble starch synthase. *Planta* 191 (3) p. 342–348.
- [157] G Singletary, R Banisadr, P Keeling (1994) Heat Stress During Grain Filling in Maize: Effects on Carbohydrate Storage and Metabolism. *Aust. J. Plant Physiol.* 21 (6) p. 829–841.
- [158] MJ Giroux, J Shaw, G Barry, BG Cobb, T Greene, T Okita, LC Hannah (1996) A single mutation that increases maize seed weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (12) p. 5824–5829.
- [159] FD Meyer, LE Talbert, JM Martin, SP Lanning, TW Greene, MJ Giroux (2007) Field evaluation of transgenic wheat expressing a modified ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit. *Crop Sci.* 47 (1) p. 336–342.
- [160] TE Thingholm, ON Jensen, MR Larsen (2009) Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics* 9 (6) p. 1451–1468.
- [161] G Friso, KJ van Wijk (2015) Update: Post-translational protein modifications in plant metabolism. *Plant Physiol.* 169 p. 1469–1487.
- [162] C Ma, J Zhou, G Chen, Y Bian, D Lv, X Li, Z Wang, Y Yan (2014) iTRAQ-based quantitative proteome and phosphoprotein characterization reveals the central metabolism changes involved in wheat grain development. *BMC Genomics* 15 (1) p. 1–20.
- [163] IJ Tetlow, KG Beisel, S Cameron, A Makhmoudova, F Liu, NS Bresolin, R Wait, MK Morell, MJ Emes (2008) Analysis of Protein Complexes in Wheat Amyloplasts Reveals Functional Interactions among Starch Biosynthetic Enzymes. *Plant Physiol.* 146 (4) p. 1878–1891.
- [164] IJ Tetlow, R Wait, Z Lu, R Akkasaeng, CG Bowsher, S Esposito, B Kosar-Hashemi, MK Morell, MJ Emes (2004) Protein Phosphorylation in Amyloplasts Regulates Starch Branching Enzyme Activity and Protein – Protein Interactions. *Plant Cell* 16 p. 694–708.
- [165] H Le, KS Browning, DR Gallie (1998) The phosphorylation state of the wheat translation initiation factors eIF4B, eIF4A, and eIF2 is differentially regulated during seed development and germination. *J. Biol. Chem.* 273 (32) p. 20084–20089.
- [166] DT Canvin (1963) FORMATION OF OIL IN THE SEED OF *RICINUS COMMUNIS* L. *Can. J. Biochem. Physiol.* 41 (75) p. 1879–1885.

- [167] LG Briarty, CE Hughes, AD Evers (1979) The Developing Endosperm of Wheat — A Stereological Analysis. *Ann. Bot.* 44 (6) p. 641–658.
- [168] Z Dai (2010) Activities of enzymes involved in starch synthesis in wheat grains differing in starch content. *Russ. J. Plant Physiol.* 57 (1) p. 74–78.
- [169] RA Burton, PE Johnson, DM Beckles, GB Fincher, HL Jenner, MJ Naldrett, K Denyer (2002) Characterization of the Genes Encoding the Cytosolic and Plastidial Forms of ADP-Glucose Pyrophosphorylase in Wheat Endosperm. *Plant Physiol.* 130 (3) p. 1464–1475.
- [170] S Cheng, MR Willmann, H Chen, J Sheen (2002) Calcium Signaling through Protein Kinases . The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase Gene Family. *Plant Physiol.* 129 p. 469–485.
- [171] G a Rutter, G Da Silva Xavier, I Leclerc (2003) Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem. J.* 375 p. 1–16.
- [172] M Jain, QB Li, PS Chourey (2008) Cloning and expression analyses of sucrose non-fermenting-1-related kinase 1 (SnRK1b) gene during development of sorghum and maize endosperm and its implicated role in sugar-to-starch metabolic transition. *Physiol. Plant.* 134 (1) p. 161–173.
- [173] J Ye, X Zhang, C Young, X Zhao, Q Hao, L Cheng, ON Jensen (2010) Optimized IMAC-IMAC protocol for phosphopeptide recovery from complex biological samples. *J. Proteome Res.* 9 (7) p. 3561–3573.
- [174] EH Fischer, EG Krebs (1958) The isolation and crystallization of rabbit skeletal muscle phosphorylase b. *J. Biol. Chem.* 231 (1) p. 65–71.
- [175] EG Krebs, AB Kent, EH Fischer (1958) The muscle phosphorylase b kinase reaction. *J. Biol. Chem.* 231 (1) p. 73–83.
- [176] EH Fischer, DJ Graves, ERS Crittenden, EG Krebs (1959) Structure of the site phosphorylated in the phosphorylase b to a reaction. *J. Biol. Chem.* 234 (7) p. 1698–704.
- [177] PD Boyer, EG Krebs (1986) *The enzymes. Control by Phosphorylation*, 3era ed. Academic Press.
- [178] A Sickmann, HE Meyer (2001) Phosphoamino acid analysis. *Proteomics* 1 (2) p. 200–206.
- [179] SK Hanks, T Hunter (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9 (8) p. 576–96.
- [180] DG Hardie (1999) Plant Protein Serine/Threonine Kinases: Classification and Functions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 (1) p. 97–131.
- [181] JM Stone, JC Walker (1995) Plant Protein Kinase Families and Signal Transduction'. *Plant Physiol.* 108 p. 451–457.
- [182] A Champion, M Kreis, K Mockaitis, A Picaud, Y Henry (2004) Arabidopsis kinome: after the casting. *Funct. Integr. Genomics* 4 (3) p. 163–87.
- [183] P Rudrabhatla, MM Reddy, R Rajasekharan (2006) Genome-Wide Analysis and Experimentation of Plant Serine/ Threonine/Tyrosine-Specific Protein Kinases. *Plant Mol. Biol.* 60 (2) p. 293–319.
- [184] X Ding, T Richter, M Chen, H Fujii, YS Seo, M Xie, X Zheng, S Kanrar, RA Stevenson, C Dardick, Y Li, H Jiang, Y Zhang, F Yu, LE Bartley, M Chern, R Bart, X Chen, L Zhu, WG Farmerie, M Gribskov, J-K Zhu, ME Fromm, PC Ronald, W-Y Song (2009) A Rice Kinase-Protein Interaction Map. *Plant Physiol.* 149 (3) p. 1478–1492.
- [185] JLA Huber, SC Huber, TH Nielsen (1989) Protein phosphorylation as a mechanism for regulation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 270 (2) p. 681–690.
- [186] JLA Huber, SC Huber (1992) Site-specific serine phosphorylation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase. *Biochem. J.* 283 (3) p. 877–882.

- [187] JL Huber, SC Huber, WH Campbell, MG Redinbaugh (1992) Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 296 (1) p. 58–65.
- [188] KE Tripodi, WL Turner, S Gennidakis, WC Plaxton (2005) *In vivo* regulatory phosphorylation of novel phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in endosperm of developing castor oil seeds. *Plant Physiol.* 139 (2) p. 969–978.
- [189] WM Kaiser, SC Huber (1994) Posttranslational Regulation of Nitrate Reductase in Higher Plants. *Plant Physiol.* 106 (3) p. 817–821.
- [190] WM Kaiser, SC Huber (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J. Exp. Bot.* 52 (363) p. 1981–1989.
- [191] JE Harthill, SEM Meek, N Morrice, MW Pegg, J Borch, BHC Wong, C MacKintosh (2006) Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *Plant J.* 47 (2) p. 211–223.
- [192] SC Huber, JL Huber, PC Liao, DA Gage, RW McMichael Jr, PS Chourey, LC Hannah, K Koch (1996) Phosphorylation of Serine-15 of Maize Leaf Sucrose Synthase (Occurrence in Vivo and Possible Regulatory Significance). *Plant Physiol.* 112 (2) p. 793–802.
- [193] SC Hardin, G-Q Tang, A Scholz, D Holtgraewe, H Winter, SC Huber (2003) Phosphorylation of sucrose synthase at serine 170: occurrence and possible role as a signal for proteolysis. *Plant J.* 35 (5) p. 588–603.
- [194] SC Hardin, H Winter, SC Huber (2004) Phosphorylation of the Amino Terminus of Maize Sucrose Synthase in Relation to Membrane Association and Enzyme Activity. *Plant Physiol.* 134 (4) p. 1427–1438.
- [195] O Kötting, J Kossmann, SC Zeeman, JR Lloyd (2010) Regulation of starch metabolism: The age of enlightenment? *Curr. Opin. Plant Biol.* 13 (3) p. 321–329.
- [196] C Han, K Wang, P Yang (2014) Gel-based comparative phosphoproteomic analysis on rice embryo during germination. *Plant Cell Physiol.* 55 (8) p. 1376–1394.
- [197] F Grimaud, H Rogniaux, MG James, AM Myers, V Planchot (2008) Proteome and phosphoproteome analysis of starch granule-associated proteins from normal maize and mutants affected in starch biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 59 (12) p. 3395–3406.
- [198] S Reiland, G Messerli, K Baerenfaller, B Gerrits, A Endler, J Grossmann, W Gruissem, S Baginsky (2009) Large-Scale Arabidopsis Phosphoproteome Profiling Reveals Novel Chloroplast Kinase Substrates and Phosphorylation Networks. *Plant Physiol.* 150 (2) p. 889–903.
- [199] C White-Gloria, JJ Johnson, K Marritt, A Kataya, A Vahab, GB Moorhead (2018) Protein Kinases and Phosphatases of the Plastid and Their Potential Role in Starch Metabolism. *Front. Plant Sci.* 9 (1032) p. 1–8.
- [200] K Dong, S Zhen, Z Cheng, H Cao, P Ge, Y Yan (2015) Proteomic Analysis Reveals Key Proteins and Phosphoproteins upon Seed Germination of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front. Plant Sci.* 6 (1017) p. 1–14.
- [201] M Zhang, CY Ma, DW Lv, SM Zhen, XH Li, YM Yan (2014) Comparative phosphoproteome analysis of the developing grains in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) under well-watered and water-deficit conditions. *J. Proteome Res.* 13 (10) p. 4281–4297.
- [202] S Zhen, X Deng, M Zhang, G Zhu, D Lv, Y Wang, D Zhu, Y Yan (2017) Comparative Phosphoproteomic Analysis under High-Nitrogen Fertilizer Reveals Central Phosphoproteins Promoting Wheat Grain Starch and Protein Synthesis. *Front. Plant Sci.* 8 (67) p. 1–20.
- [203] P Du, P Loulakis, C Luo, A Mistry, SP Simons, PK Lemotte, F Rajamohan, K Ra, KG Coleman, KF

- Geoghegan, Z Xie (2005) Phosphorylation of serine residues in histidine-tag sequences attached to recombinant protein kinases : A cause of heterogeneity in mass and complications in function. *Protein Expr. Purif.* 44 (2) p. 121–129.
- [204] W Shen, MI Reyes, L Hanley-Bowdoin (2009) Arabidopsis Protein Kinases GRIK1 and GRIK2 Specifically Activate SnRK1 by Phosphorylating Its a Activation Loop. *Plant Physiol.* 150 (2) p. 996–1005.
- [205] EM Hrabak, CWM Chan, M Gribskov, JF Harper, JH Choi, N Halford, S Luan, HG Nimmo, MR Sussman, M Thomas, K Walker-simmons, J Zhu, AC Harmon, J Kudla (2015) The Arabidopsis CDPK-SnRK Superfamily of Protein Kinases. *Plant Physiol.* 132 p. 666–680.
- [206] Y Guo (2001) Molecular Characterization of Functional Domains in the Protein Kinase SOS2 That Is Required for Plant Salt Tolerance. *Plant Cell* 13 (6) p. 1383–1400.
- [207] DH Ming, L Hua, LQ Dong (2012) Molecular cloning and functional characterization of MdSOS2 reveals its involvement in salt tolerance in apple callus and Arabidopsis. *Plant Cell Rep.* 31 (4) p. 713–722.
- [208] D Gong, Z Gong, Y Guo, J-K Zhu (2002) Expression, Activation, and Biochemical Properties of a Novel Arabidopsis Protein Kinase. *Plant Physiol.* 129 (1) p. 225–234.
- [209] E Martínez-Barajas, P Coello (2019) Review: How do SnRK1 protein kinases truly work? *Plant Sci.* p. 1–13.
- [210] E Kinoshita, E Kinoshita-Kikuta, T Koike (2015) Advances in Phos-tag-based methodologies for separation and detection of the phosphoproteome. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)- Proteomics* 1854 (6) p. 601–608.
- [211] LF Leloir (1971) Two Decades of Research on Biosynthesis of Saccharides. *Science* 172 (3990) p. 1299–1303.
- [212] A Cereijo, M Asencion Diez, M Ballicora, A Iglesias (2018) Regulatory properties of the ADP-glucose pyrophosphorylase from the clostridial Firmicutes member Ruminococcus albus. *J. Bacteriol.* 200 (17) p. 1–14.
- [213] MK Morell, M Bloom, V Knowles, J Preiss (1987) Subunit Structure of Spinach Leaf ADPglucose Pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* 85 (1) p. 182–7.
- [214] TW Okita, PA Nakata, JM Anderson, J Sowokinos, M Morell, J Preiss (1990) The Subunit Structure of Potato Tuber ADPglucose Pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* 93 (2) p. 785–90.
- [215] J Preiss, D Cress, J Hutny, M Morell, M Bloom, T Okita, R Larsen (1989) Regulation of starch synthesis. Biochemical and genetic studies, En: *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*, (Ed.: P Somnet, J Whitaker) American Chemical Society, p. 84–92.
- [216] J Preiss (1991) Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation, En: *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, (Ed.: B Mifflin) Oxford University Press, p. 59–114.
- [217] AA Iglesias, YY Charng, S Ball, J Preiss (1994) Characterization of the Kinetic, Regulatory, and Structural-Properties of ADP-Glucose Pyrophosphorylase from Chlamydomonas-Reinhardtii. *Plant Physiol.* 104 (4) p. 1287–1294.
- [218] PR Salamone, IH Kavakli, CJ Slattery, TW Okita (2002) Directed molecular evolution of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2) p. 1070–1075.
- [219] CM Figueroa, ML Kuhn, BL Hill, AA Iglesias, MA Ballicora (2018) Resurrecting the Regulatory Properties of the Ostreococcus tauri ADP-Glucose Pyrophosphorylase Large Subunit. *Front. Plant Sci.* 9 p. 1564.
- [220] J Preiss, MN Sivak (1998) Biochemistry, molecular biology and regulation of starch synthesis., En:

- Genetic engineering*, 20, (Ed.: JK Setlow) Springer, Boston, MA, p. 177–223.
- [221] M Morell, M Bloom, J Preiss (1988) Affinity labeling of the allosteric activator site(s) of spinach leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* 263 (2) p. 633–637.
- [222] SK Lee, SK Hwang, M Han, JS Eom, HG Kang, Y Han, SB Choi, MH Cho, SH Bhoo, G An, TR Hahn, TW Okita, JS Jeon (2007) Identification of the ADP-glucose pyrophosphorylase isoforms essential for starch synthesis in the leaf and seed endosperm of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* 65 (4) p. 531–546.
- [223] SC Zeeman, SM Smith, AM Smith (2007) The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem. J.* 401 (1) p. 13–28.
- [224] S Singh, S-B Choi, MK Modi, TW Okita (2002) Isolation and characterization of cDNA clones encoding ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) large and small subunits from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Phytochemistry* 59 (3) p. 261–268.
- [225] H Weber, U Heim, L Borisjuk, U Wobus (1995) Cell-type specific, coordinate expression of two ADP-glucose pyrophosphorylase genes in relation to starch biosynthesis during seed development of *Vicia faba* L. *Planta* 195 (3) p. 352–361.
- [226] C Hylton, AM Smith (1992) The *rb* Mutation of Peas Causes Structural and Regulatory Changes in ADP Glucose Pyrophosphorylase from Developing Embryos. *Plant Physiol.* 99 (4) p. 1626–1634.
- [227] H Rudi, DNP Doan, OA Olsen (1997) A (His)₆-tagged recombinant barley (*Hordeum vulgare* L.) endosperm ADP- glucose pyrophosphorylase expressed in the baculovirus-insect cell system is insensitive to allosteric regulation by 3-phosphoglycerate and inorganic phosphate. *FEBS Lett.* 419 (1) p. 124–130.
- [228] SK Boehlein, JR Shaw, JD Stewart, LC Hannah (2008) Heat stability and allosteric properties of the maize endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase are intimately intertwined. *Plant Physiol.* 146 (1) p. 289–299.
- [229] C Sakulsingharoj, S-B Choi, S-K Hwang, GE Edwards, J Bork, CR Meyer, J Preiss, TW Okita (2004) Engineering starch biosynthesis for increasing rice seed weight: the role of the cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Sci.* 167 (6) p. 1323–1333.
- [230] VK Sikka, S-B Choi, IH Kavakli, C Sakulsingharoj, S Gupta, H Ito, TW Okita (2001) Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Sci.* 161 (3) p. 461–468.
- [231] A Tiessen, JHM Hendriks, M Stitt, A Branscheid, Y Gibon, EM Farré, P Geigenberger (2002) Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Cell* 14 p. 2191–2213.
- [232] A Tiessen, K Prescha, A Branscheid, N Palacios, R McKibbin, NG Halford, P Geigenberger (2003) Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J.* 35 (4) p. 490–500.
- [233] JE Lunn, R Feil, JHM Hendriks, Y Gibon, R Morcuende, D Osuna, W-R Scheible, P Carillo, M-R Hajirezaei, M Stitt (2006) Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 397 (1) p. 139–48.
- [234] X Jin, M a Ballicora, J Preiss, JH Geiger (2005) Crystal structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *EMBO J.* 24 (4) p. 694–704.
- [235] I Baris, A Tuncel, N Ozber, O Keskin, IH Kavakli (2009) Investigation of the interaction between the large and small subunits of potato ADP-glucose pyrophosphorylase. *PLoS Comput. Biol.* 5 (10) p. 1–

14.

- [236] P Crevillén, T Ventriglia, F Pinto, A Orea, Á Mérida, JM Romero (2005) Differential pattern of expression and sugar regulation of Arabidopsis thaliana ADP-glucose pyrophosphorylase-encoding genes. *J. Biol. Chem.* 280 (9) p. 8143–8149.
- [237] R Zhou, L Cheng (2005) Binding of 3-phosphoglycerate leads to both activation and stabilisation of ADP-glucose pyrophosphorylase from apple leaves. *Funct. Plant Biol.* 32 (9) p. 839–848.
- [238] LJ Falarz, MK Deyholos, G Chen (2018) Plant carbohydrates and production of renewable biofuel from Starch, Sugar, and Cellulose, En: *Plant Bioproducts*, Springer, p. 87–107.
- [239] M Aguirre, E Kiegle, G Leo, I Ezquer (2018) Carbohydrate reserves and seed development: an overview. *Plant Reprod.* 31 (3) p. 263–290.
- [240] PA Sabelli, BA Larkins (2009) The development of endosperm in grasses. *Plant Physiol.* 149 (1) p. 14–26.
- [241] DJ Gifford, JS Greenwood, JD Bewley (1982) Deposition of Matrix and Crystalloid Storage Proteins during Protein Body Development in the Endosperm of *Ricinus communis* L. cv. Hale Seeds. *Plant Physiol.* 69 (6) p. 1471–1478.
- [242] R Radchuk, RJN Emery, D Weier, H Vigeolas, P Geigenberger, JE Lunn, R Feil, W Weschke, H Weber (2009) Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. *Plant J.* 61 (2) p. 324–338.
- [243] WH Zhang, Y Zhou, KE Dibley, SD Tyerman, RT Furbank, JW Patrick (2007) Nutrient loading of developing seeds. *Funct. Plant Biol.* 34 (4) p. 314–331.
- [244] L Borisjuk, H Rolletschek, R Radchuk, W Weschke, U Wobus, H Weber (2004) Seed development and differentiation: A role for metabolic regulation. *Plant Biol.* 6 (4) p. 375–386.
- [245] B Vilhar, A Kladnik, A Blejec, PS Chourey, M Dermastia (2002) Cytometrical Evidence That the Loss of Seed Weight in the miniature1 Seed Mutant of Maize Is Associated with Reduced Mitotic Activity in the Developing Endosperm. *Plant Physiol.* 129 (1) p. 23–30.
- [246] PC Purcell, AM Smith, NG Halford (1998) Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant J.* 14 (2) p. 195–202.
- [247] Y Zhang, PR Shewry, H Jones, P Barcelo, PA Lazzeri, NG Halford (2001) Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. *Plant J.* 28 (4) p. 431–441.
- [248] KJ Bradford, AB Downie, OH Gee, V Alvarado, H Yang, P Dahal (2003) Abscisic Acid and Gibberellin Differentially Regulate Expression of Genes of the SNF1-Related Kinase Complex in Tomato Seeds. *Plant Physiol.* 132 (3) p. 1560–1576.
- [249] S Laurie, RS McKibbin, NG Halford (2003) Antisense SNF1-related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an alpha-amylase (alpha-Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos. *J. Exp. Bot.* 54 (383) p. 739–747.
- [250] A Simeunovic, A Mair, B Wurzinger, M Teige (2016) Know where your clients are : subcellular localization and targets of calcium-dependent protein kinases. *J. Exp. Bot.* 67 (13) p. 3855–3872.
- [251] M Thelander, T Olsson, H Ronne (2004) Snf1-related protein kinase 1 is needed for growth in a normal day–night light cycle. *EMBO J.* 23 (8) p. 1900–1910.
- [252] NG Halford, S Hey, D Jhurreea, S Laurie, RS McKibbin, M Paul, Y Zhang (2003) Metabolic signalling and carbon partitioning: Role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J. Exp. Bot.* 54 (382) p. 467–475.

- [253] VS Anil, AC Harmon, KS Rao (2000) Spatio-Temporal Accumulation and Activity of Calcium-Dependent Protein Kinases during Embryogenesis, Seed Development, and Germination in Sandalwood. *Plant Physiol.* 122 (4) p. 1035–1044.
- [254] J Sheen (1996) Ca²⁺-Dependent Protein Kinases and Stress Signal Transduction in Plants. *Science* 274 (5294) p. 1900–1902.
- [255] H Winter, SC Huber (2000) Regulation of Sucrose Metabolism in Higher Plants: Localization and Regulation of Activity of Key Enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35 (4) p. 253–289.
- [256] ET Fedosejevs, S Ying, J Park, EM Anderson, RT Mullen, Y-M She, WC Plaxton (2014) Biochemical and Molecular Characterization of RcSUS1, a Cytosolic Sucrose Synthase Phosphorylated *in Vivo* at Serine 11 in Developing Castor Oil Seeds. *J. Biol. Chem.* 289 (48) p. 33412–33424.
- [257] SC Huber, RWJ McMichael, JL Huber, M Bachmann, YT Yamamoto, MA Conkling (1995) Light regulation of sucrose synthesis: role of protein phosphorylation and possible involvement of Cytosolic [Ca²⁺]. *Carbon Partitioning Source-Sink Interact. Plants* p. 35–44.
- [258] Y Iwata, M Kuriyama, M Nakakita, H Kojima, M -a. Ohto, K Nakamura (1998) Characterization of a Calcium-Dependent Protein Kinase of Tobacco Leaves That Is Associated with the Plasma Membrane and Is Inducible by Sucrose. *Plant Cell Physiol.* 39 (11) p. 1176–1183.
- [259] T Furuichi, IC Mori, K Takahashi, S Muto (2001) Sugar-induced increase in cytosolic Ca(2+) in Arabidopsis thaliana whole plants. *Plant Cell Physiol.* 42 (10) p. 1149–1155.
- [260] DM Bustos, AA Iglesias (2003) Phosphorylated Non-Phosphorylating Glyceraldehyde-3- Phosphate Dehydrogenase from Heterotrophic Cells of Wheat Interacts with 14-3-3 Proteins. *Plant Physiol.* 133 p. 2081–2088.
- [261] DM Bustos, AA Iglesias (2002) Non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is post-translationally phosphorylated in heterotrophic cells of wheat (*Triticum aestivum*). *FEBS Lett.* 530 p. 169–173.
- [262] TA Hennen-Bierwagen, Q Lin, F Grimaud, V Planchot, PL Keeling, MG James, AM Myers (2009) Proteins from Multiple Metabolic Pathways Associate with Starch Biosynthetic Enzymes in High Molecular Weight Complexes : A Model for Regulation of. *Plant Physiol.* 149 p. 1541–1559.
- [263] A Makhmoudova, D Williams, D Brewer, S Massey, J Patterson, A Silva, KA Vassall, F Liu, S Subedi, G Harauz, KWM Siu, IJ Tetlow, MJ Emes (2014) Identification of Multiple Phosphorylation Sites on Maize Endosperm Starch Branching Enzyme IIb, a Key Enzyme in Amylopectin Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 289 (13) p. 9233–9246.
- [264] XN Wu, CS Rodriguez, H Pertl-Obermeyer, G Obermeyer, WX Schulze (2013) Sucrose-induced receptor kinase S1RK1 regulates a plasma membrane aquaporin in Arabidopsis. *Mol. Cell. Proteomics* 12 (10) p. 2856–2873.
- [265] T Umezawa, N Sugiyama, F Takahashi, JC Anderson, Y Ishihama, SC Peck, K Shinozaki (2013) Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid signaling pathway in Arabidopsis thaliana. *Sci. Signal.* 6 (270) p. rs8.
- [266] E Roitinger, M Hofer, T Köcher, P Pichler, M Novatchkova, J Yang, P Schlögelhofer, K Mechtler (2015) Quantitative phosphoproteomics of the ataxia telangiectasia-mutated (ATM) and ataxia telangiectasia-mutated and rad3-related (ATR) dependent DNA damage response in Arabidopsis thaliana. *Mol. Cell. Proteomics* 14 (3) p. 556–571.
- [267] UI Flüggé (1999) Phosphate translocators in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 (1) p. 27–45.
- [268] G Entwistle, T ap Rees (1990) Lack of fructose-1,6-bisphosphatase in a range of higher plants that store starch. *Biochem. J.* 271 (2) p. 467–472.

- [269] R Anguenot, B Nguyen-Quoc, S Yelle, D Michaud (2006) Protein phosphorylation and membrane association of sucrose synthase in developing tomato fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 44 (5–6) p. 294–300.
- [270] A Tovar-Mendez, JA Miernyk, DD Randall (2003) Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. *Eur. J. Biochem.* 270 (6) p. 1043–1049.
- [271] WC Plaxton, FE Podestá (2006) The Functional Organization and Control of Plant Respiration. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 25 (2) p. 159–198.
- [272] TD Bunney, HS van Walraven, AH de Boer (2001) 14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (7) p. 4249–4254.