

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

**Caracterización funcional, cinética y estructural
de enzimas involucradas en el metabolismo
de azúcares-alcoholes y de rafinosa en plantas.
Obtención de herramientas moleculares
con aplicaciones en procesos biotecnológicos
y de biorrefinerías**

Lic. Romina Inés Minen

Director de Tesis: Dr. Carlos M. Figueroa

Laboratorio de Enzimología Molecular
Instituto de Agrobiotecnología del Litoral
(UNL-CONICET)

-Año 2021-

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la Universidad Nacional del Litoral y, especialmente, a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por la excelente formación académica brindada tanto a nivel de grado como de posgrado.

A las instituciones que hicieron posible el desarrollo de este trabajo de Tesis. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por la Beca Inicial de Doctorado y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la Beca de Finalización de Doctorado. A la ANPCyT, ASaCTeI, CONICET y Universidad Nacional del Litoral, por el financiamiento brindado. A CONICET y a la National Science Foundation (NSF) por el financiamiento que hizo posible la estadía de investigación en Loyola University Chicago (USA).

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral y a su directora, Dra. Raquel Chan, por brindarme el espacio para llevar a cabo esta etapa de formación, y a sus integrantes.

Quiero agradecer al Dr. Carlos M. Figueroa por dirigir mi trabajo de Tesis. Por transmitirme sus conocimientos, por su paciencia y buena predisposición durante mi formación doctoral.

Al Dr. Alberto A. Iglesias por darme la posibilidad de formar parte de su grupo de trabajo. También quiero agradecerle por las oportunidades brindadas y por los comentarios y aportes que nos ayudaron a crecer personal y profesionalmente.

Al Dr. Miguel A. Ballicora y a los integrantes del Department of Chemistry and Biochemistry de la University Loyola Chicago, por recibirme en su Laboratorio, por la ayuda brindada y por hacer amena y productiva mi estadía en Chicago.

Quiero agradecer a todos los integrantes del Laboratorio de Enzimología Molecular quienes me acompañaron durante estos cinco años, demostrando que no solo son profesionales de primera sino también excelentes personas.

A mi familia y amigos, por su apoyo incondicional y estar siempre.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados de esta Tesis fueron publicados en:

Minen, R.I., Martinez, M.P., Iglesias, A.A. and Figueroa, C.M. *Biochemical characterization of recombinant UDP-sugar pyrophosphorylase and galactinol synthase from Brachypodium distachyon*. Plant Physiology and Biochemistry, 2020. Vol. 155: 780-788. doi: 10.1016/j.plaphy.2020.08.030.

ÍNDICE

ÍNDICE	iii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	vi
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Las plantas y la fotosíntesis	1
1.1.1 <i>La fase luminosa de la fotosíntesis</i>	1
1.1.2 <i>La fase sintética de la fotosíntesis</i>	3
1.2 Metabolismo de carbohidratos: la partición de fotoasimilados en plantas	5
1.2.1 <i>Partición del carbono en células autotróficas</i>	6
1.2.2 <i>Partición del carbono desde tejidos fuente hacia tejidos sumidero</i>	10
1.2.3 <i>Partición del carbono en células heterotróficas</i>	12
1.3 Metabolismo de los azúcares-alcoholes	14
1.3.1 <i>Metabolismo del manitol en plantas de apio</i>	16
1.3.2 <i>Sobre la manosa-6-fosfato reductasa</i>	18
1.3.3 <i>Sobre la manitol deshidrogenasa</i>	19
1.3.4 <i>Roles del manitol y tolerancia a estrés</i>	20
1.4 Metabolismo de la rafinosa.....	24
1.4.1 <i>Sobre la UDP-azúcar pirofosforilasa</i>	25
1.4.2 <i>Sobre la galactinol sintasa</i>	26
1.4.3 <i>Sobre la rafinosa sintasa</i>	27
1.4.4 <i>Roles de la rafinosa y el galactinol y tolerancia a estrés</i>	29
1.4.5 <i>Sobre Brachypodium distachyon</i>	32
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivos generales.....	34
2.2 Objetivos específicos	34
2.2.1 <i>Estudio del metabolismo del manitol en plantas de apio</i>	34
2.2.2 <i>Estudio de la ruta de síntesis de la rafinosa en B. distachyon</i>	34
3 MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1 Reactivos químicos y materiales	36
3.2 Vectores	36

3.3 Cepas bacterianas y antibióticos.....	37
3.4 Medios de cultivo	37
3.5 Material vegetal	37
3.6 Obtención de genes sintéticos	37
3.7 Oligonucleótidos.....	38
3.8 Extracción de ARN y RT-PCR para obtención del gen que codifica para la Man6PRasa .	38
3.9 Electroforesis en geles de agarosa	39
3.10 Clonado.....	39
3.11 Mutagénesis sitio-dirigida	39
3.12 Transformación de células de <i>E. coli</i> competentes.....	40
3.13 Minipreparación de ADN plasmídico	41
3.14 Secuenciación de ADN.....	41
3.15 Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	41
3.16 Ligación de fragmentos de ADN.....	42
3.17 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes	42
3.18 Electroforesis en geles de poliacrilamida	43
3.19 Cambio de medios y concentración de proteínas	43
3.20 Cuantificación del contenido proteico	44
3.21 Cromatografía de filtración por geles: determinación de la masa molecular	44
3.22 Ensayos de actividad enzimática	44
3.23 Determinación de los parámetros cinéticos	46
3.24 Estudios de óxido-reducción	46
3.25 Ensayos de desplazamiento térmico	47
3.26 Modelado molecular	47
3.27 Ensayos de cristalización.....	48
3.28 Cromatografía en capa delgada	48
3.29 Ensayos con plantas de apio	49
3.30 Cuantificación de azúcares solubles y almidón.....	50
3.31 Determinación de clorofilas.....	50
3.32 Medida de contenido proteico y niveles de aminoácidos	51
3.33 Medidas de niveles de fotosíntesis y de eficiencia cuántica máxima del PSII.....	51
4 RESULTADOS	52

4.1 Estudio de las enzimas del metabolismo del manitol en planta de apio	52
4.1.1 Caracterización cinética y estructural de la Man6PRasa.....	52
4.1.2 Ensayos de cristalización y obtención de la estructura de la Man6PRasa.....	54
4.1.3 Análisis de la estabilidad de los ligandos utilizados en los ensayos de cristalización de la Man6PRasa	58
4.1.4 Ensayos de desplazamiento térmico	60
4.1.5 Obtención y caracterización cinética y estructural de la mutante K48A.....	61
4.1.6 Caracterización cinética y estructural de la MolDHasa.....	65
4.1.7 Modelado 3D de la MolDHasa	67
4.1.8 Cambio de especificidad por el cofactor de la MolDHasa	70
4.2 Estudio de la vía de síntesis de rafinosa en <i>B. distachyon</i>	74
4.2.1 Caracterización cinética y estructural de la USPPasa	74
4.2.2 Caracterización cinética y estructural de la GolSasa.....	77
4.2.3 Árbol filogenético de la GolSasa.....	81
4.2.4 Modelado 3D de la GolSasa.....	83
4.2.5 Ensayos de óxido-reducción con la GolSasa	84
4.2.6 Caracterización cinética y estructural de la RafSasa	87
4.3 Estudio del metabolismo del manitol en planta de apio	91
4.3.1 Metabolismo del carbono en plantas de apio crecidas bajo diferentes fotoperiodos ..	91
4.3.2 Metabolismo del carbono en plantas de apio sometidas a estrés por frío.....	95
5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	99
5.1 Sobre las enzimas del metabolismo del manitol en planta de apio	99
5.2 Sobre las enzimas de la vía de síntesis de rafinosa en <i>B. distachyon</i>	104
5.3 Sobre el estudio del metabolismo del manitol en plantas de apio	108
6 BIBLIOGRAFÍA	111
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	137
1. Secuencias de enzimas utilizadas en el trabajo de Tesis	137
2. Tablas Suplementarias.....	143

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

1,3bisPGA	1,3-bisfosfoglicerato
3PGA	3-fosfoglicerato
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ADP	adenosina-5'-difosfato
ADP-Glc	ADP-glucosa
ADPGlcPPasa	ADP-Glc pirofosforilasa
AKR	aldo-ceto reductasa
Ald6PRasa	aldosa-6-fosfato reductasa
AMP	adenosina-5'-monofosfato
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	adenosina-5'-trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
CAPS	ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico
CBCB	ciclo de Benson-Calvin-Bassham
CO ₂	dióxido de carbono
DHAP	dihidroxiacetona-fosfato
DTT	ditiotreitól
Ea	energía de activación
EC	<i>Enzyme Comission</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicoltetraacético
FBPasa	fructosa-1,6-bisfosfatasa
Fru	fructosa
Fru1,6bisP	fructosa-1,6-bisfosfato
Fru2,6bisP	fructosa-2,6-bisfosfato
Fru6P	fructosa-6-fosfato
g	fuerza centrífuga relativa
Ga3P	gliceraldehído-3-fosfato

Ga3PDHasa	Ga3P deshidrogenasa fosforilante dependiente de NAD ⁺
Ga3PDHasa (A/B)	Ga3P deshidrogenasa fosforilante dependiente de NADP ⁺
Gal1P	galactosa-1-fosfato
GH	glicosil hidrolasa
Glc	glucosa
Glc1,6bisP	glucosa-1,6-bisfosfato
Glc1P	glucosa-1-fosfato
Glc6P	glucosa-6-fosfato
Glc6PDHasa	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GlcA1P	ácido glucurónico-1-fosfato
GlcN1P	glucosamina-1-fosfato
GlcNAc1P	N-acetil-glucosamina-1-fosfato
Gol	galactinol
GolSasa	galactinol sintasa
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
GT	glicosiltransferasa
IMAC	cromatografía de afinidad por metal inmovilizado
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido
LB	Lysogeny Broth
Mal	maltosa
Man	manosa
Man1P	manosa-1-fosfato
Man6P	manosa-6-fosfato
Man6PRasa	manosa-6-fosfato reductasa
MDR	reductasa/deshidrogenasa de cadena media
Mel	melibiosa
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MM	masa molecular
Mol	manitol
MolDHasa	manitol deshidrogenasa
MOPS	ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico

NAD(P) ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)
NAD(P)H	nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) reducida
npGa3PDHasa	Ga3P deshidrogenasa no fosforilante
-P	-éster fosfato
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PEP	fosfo <i>enol</i> piruvato
PEPCasa	PEP carboxilasa
Pi	ortofosfato inorgánico
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPi	pirofosfato inorgánico
PS	fotosistema
Raf	rafinosa
RafSasa	rafinosa sintasa
RFO	oligosacáridos de la familia de la rafinosa
RuBisCO	Ru1,5bisP carboxilasa/oxigenasa
Rul	ribulosa
Ru1,5bisP	ribulosa-1,5-bisfosfato
SDS	dodecilsulfato de sodio
Sta	estaquiosa
Suc	sacarosa
Suc6Pasa	sacarosa-6-fosfatasa
Suc6PSasa	sacarosa-6-fosfato sintasa
THP	transportador de hexosa-P
Tris	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
Trx	tiorredoxina
TTP	transportador de triosa-P
UDP	uridina-5'-difosfato
UDP-Gal	UDP-galactosa
UDP-Glc	UDP-glucosa
UDPGlcPPasa	UDP-Glc pirofosforilasa
USPPasa	UDP-azúcar pirofosforilasa

UTP	uridina-5'-trifosfato
VOPP	vía oxidativa de las pentosas-fosfato
WT	<i>wild type</i>
β-ME	β-mercaptoetanol

RESUMEN

Este trabajo de Tesis se centra en el estudio de las enzimas que intervienen en el metabolismo del manitol en plantas de apio (*Apium graveolens*) y de la rafinosa en plantas de *Brachypodium distachyon*. De esta forma, se pretende mejorar la comprensión sobre los mecanismos moleculares que regulan dichas rutas metabólicas. Todas las enzimas fueron producidas de forma recombinante en *Escherichia coli*, fusionadas a una etiqueta de His en el extremo N-terminal y purificadas a homogeneidad electroforética por cromatografía de metal inmovilizado.

La manosa-6P reductasa de apio se caracterizó cinéticamente en la dirección de reducción de manosa-6P y se determinó que su conformación cuaternaria se corresponde con un dímero, cuyas subunidades presentan una masa molecular de 35 kDa. Además, se logró cristalizar y resolver la estructura de esta enzima en presencia de ácido manónico y NADP^+ , constituyendo la primera estructura resuelta de una proteína de plantas perteneciente a la familia 2 de las aldo-ceto reductasas. De esta forma, determinamos que la Lys^{48} se encontraría involucrada en la unión del fosfato de la manosa-6P. Entonces, se construyó la mutante K48A, cuya eficiencia catalítica con manosa resultó mayor que para la enzima salvaje, mientras que dicho parámetro fue menor con manosa-6P que para la enzima salvaje. Estos resultados sustentan la importancia de la Lys^{48} en la unión del sustrato manosa-6P y, más específicamente, para la estabilización de su carga negativa.

La manitol deshidrogenasa de apio fue caracterizada cinéticamente en presencia de los sustratos fisiológicos (manitol y NAD^+), obteniéndose resultados similares a los reportados para la enzima purificada de fuente. También se determinó que, a diferencia de la conformación monomérica reportada previamente, la estructura de esta enzima es un homodímero de 80 kDa. Por otro lado, se obtuvo un modelo por homología de la enzima utilizando como molde la estructura resuelta de la sinapil alcohol deshidrogenasa de *Populus tremuloides*. Un análisis detallado del modelo nos permitió seleccionar los aminoácidos que determinan la especificidad por el cofactor NAD^+ . Entonces, se obtuvieron una variedad de mutantes de la enzima para cambiar su especificidad por el cofactor (de NAD^+ a NADP^+). De esta forma logramos obtener una enzima que puede utilizar NAD^+ y NADP^+ con la misma eficiencia catalítica.

La UDP-azúcar pirofosforilasa de *B. distachyon* se caracterizó cinéticamente en el sentido de síntesis del UDP-azúcar y se determinó que su estructura cuaternaria es monomérica (86 kDa). Se observó que la enzima utiliza galactosa-1P y glucosa-1P con la misma eficiencia

catalítica, pero dicho parámetro resultó ser un orden de magnitud menor para ácido glucurónico-1P. Además, la enzima fue capaz de utilizar otros azúcares-1P, pero con menor eficiencia que para los mencionados anteriormente.

La galactinol sintasa de *B. distachyon* se estudió en el sentido de síntesis de galactinol. La enzima presentó una eficiencia catalítica tres órdenes de magnitud mayor con el sustrato fisiológico (UDP-galactosa) que con UDP-glucosa. Se construyó un modelo de la enzima por reconocimiento estructural, el cual permitió determinar los residuos implicados en la unión del metal y de los sustratos. La exposición de la enzima a los agentes oxidantes diamida y H₂O₂ redujo notablemente su actividad, la cual pudo recuperarse mediante la incubación con ditiotreitól o tiorredoxina de *E. coli*, sugiriendo que esta enzima podría ser regulada por mecanismos redox.

Se estableció que la rafinosa sintasa de *B. distachyon* presenta una conformación monomérica de 80 kDa y que exhibe, al igual que las enzimas de otras especies vegetales, actividad glicosiltransferasa e hidrolasa. Hasta el momento no logramos caracterizar cinéticamente la enzima en sentido de síntesis de rafinosa, pero sí en el sentido de hidrólisis. La enzima fue capaz de utilizar como sustratos galactinol, rafinosa y melibiosa (un producto de degradación de la rafinosa), pero no estaquiosa ni maltosa.

Finalmente, se crecieron plantas de apio bajo diferentes fotoperiodos (largo, normal y corto) para estudiar su efecto sobre la partición del carbono. Los niveles de glucosa y fructosa no mostraron patrones definidos en ninguno de los ensayos. Por el contrario, los niveles de sacarosa y almidón mostraron un claro patrón de acumulación durante las horas de luz y de depleción durante la noche en plantas crecidas con fotoperiodos normal y corto. Esto concuerda con resultados obtenidos para *Arabidopsis* y otras especies de plantas, en los cuales se reporta que la tasa de síntesis y degradación de sacarosa y almidón se encuentran finamente regulados por el reloj biológico para adaptarse al ciclo de luz/oscuridad establecido. También se llevó a cabo un ensayo donde las plantas de apio se sometieron a estrés por frío. Los resultados obtenidos sólo mostraron diferencias significativas en los niveles de almidón y de fotosíntesis entre las plantas control (crecidas a 23 °C) y aquellas sometidas a estrés por frío (crecidas a 10 °C). Los resultados plantean que es relevante determinar el contenido de manitol y las actividades de enzimas involucradas en el metabolismo del carbono. De esta forma, se obtendrá un panorama más completo sobre la regulación de las diferentes rutas metabólicas involucradas en la partición del carbono en hojas de apio.

ABSTRACT

This Thesis work focuses on studying of the enzymes involved in mannitol and raffinose metabolism in celery (*Apium graveolens*) and *Brachypodium distachyon*, respectively, to better understand the molecular mechanisms regulating these metabolic pathways. All enzymes were recombinantly produced in *Escherichia coli*, fused to a His-tag at the N-terminus, and purified to electrophoretic homogeneity by immobilized metal affinity chromatography.

Mannose-6P reductase from celery was kinetically characterized in the direction of mannose-6P reduction. We determined that its quaternary conformation is a dimer, with subunits of 37 kDa. We also crystallized and solved this enzyme's structure in the presence of mannonic acid and NADP⁺, resulting in the first solved structure of a plant protein belonging to the family 2 of aldo-keto reductases. We determined that Lys⁴⁸ would be involved in binding the phosphate group of mannose-6P. The catalytic efficiency of the K48A mutant with mannose was higher than for the wild type enzyme, while this parameter was lower with mannose-6P than for the wild type enzyme. Results support the Lys⁴⁸ relevance for binding the substrate mannose-6P and, more specifically, to stabilize its negative charge.

Celery mannitol dehydrogenase was kinetically characterized by the physiological substrates (mannitol and NAD⁺), obtaining similar results to those reported for the enzyme purified from its natural source. We also determined that this enzyme is an 80 kDa homodimer, unlike the previously reported monomeric conformation. A homology model of the enzyme was obtained using the solved structure of sinapyl alcohol dehydrogenase from *Populus tremuloides* as a template. A detailed analysis of the model allowed us to select the amino acids that determine the specificity for the cofactor NAD⁺. Then, various mutant enzymes were obtained to switch the cofactor's specificity (from NAD⁺ to NADP⁺). As a result, we could get an enzyme that uses NAD⁺ and NADP⁺ with the same catalytic efficiency.

UDP-sugar pyrophosphorylase from *B. distachyon* was kinetically characterized in UDP-sugar synthesis, and we determined that its quaternary structure was monomeric (86 kDa). This enzyme used galactose-1P and glucose-1P with the same catalytic efficiency, but this parameter was an order of magnitude lower for glucuronic acid-1P. The enzyme was able to use other sugars-1P but with lower efficiency than those previously mentioned.

Galactinol synthase from *B. distachyon* was studied in the direction of galactinol synthesis. The enzyme presented a catalytic efficiency three orders of magnitude higher with the

physiological substrate (UDP-galactose) than with UDP-glucose. A model of the enzyme was built by protein threading (fold recognition), which allowed us to determine the residues putatively involved in binding the metal ion and the substrates. Exposure of the enzyme to the oxidizing agents diamide and H₂O₂ markedly reduced its activity, which could be recovered by incubation with dithiothreitol or *E. coli* thioredoxin, suggesting this enzyme could be redox-regulated.

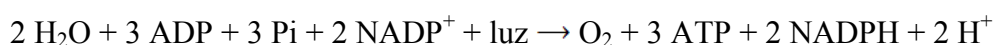
We found that raffinose synthase from *B. distachyon* has a monomeric conformation of 80 kDa and that it exhibits, like enzymes from other plant species, glycosyltransferase and hydrolase activity. So far, we could only characterize it in the hydrolysis direction, but we have not been able to determine kinetic parameters in the direction of raffinose synthesis. The enzyme could use galactinol, raffinose, and melibiose (a raffinose degradation product) as substrates, but not stachyose or maltose.

Finally, celery plants were grown under different photoperiods (long, normal, and short) to study their effect on carbon partition. Glucose and fructose levels did not show definite patterns in any of the experiments. Conversely, sucrose and starch levels showed a straightforward accumulation during light hours and depletion at night in plants grown under normal and short photoperiods. These results agree with those obtained for *Arabidopsis* and other plant species, supporting that the biological clock finely regulate the rates of sucrose and starch synthesis and degradation to adapt them to the regular light/dark cycle. We also did an experiment where celery plants were subjected to cold stress. Our results only showed significant differences in starch and photosynthesis levels between the control plants (grown at 23 °C) and those grown under cold stress (at 10 °C). Mannitol content and activities of enzymes involved in carbon metabolism remain to be evaluated, which will provide us a more complete picture of the regulation of the different metabolic pathways involved in carbon partitioning in celery leaves.

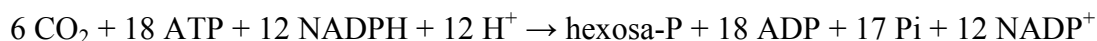
1 INTRODUCCIÓN

1.1 Las plantas y la fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso de suma importancia para la biosfera porque convierte la energía de la radiación solar en energía química que puede ser utilizada por todas las formas de vida. Las plantas realizan la fotosíntesis oxigénica en tejidos verdes (principalmente en hojas) y, más específicamente, en células que tienen cloroplastos. Esta organela está rodeada por una doble membrana (la envoltura) y contiene (i) un complejo sistema de membranas internas, las membranas tilacoides, y (ii) una fracción soluble llamada estroma. El proceso fotosintético se puede dividir en dos partes: la fase luminosa y la fase sintética. La fase luminosa comprende las reacciones que tienen lugar en las membranas tilacoides y que conducen a la conversión de la energía electromagnética de la luz en poder reductor (NADPH) y energía química (ATP), con la consecuente fotólisis del agua, de acuerdo con la siguiente ecuación general:



La fase sintética, ocurre en el estroma y permite fijar el dióxido de carbono (CO_2) atmosférico para sintetizar hidratos de carbono, con la ecuación general para la síntesis de una molécula de hexosa-P:



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 CO_2 para sintetizar azúcares [1].

1.1.1 La fase luminosa de la fotosíntesis

La función general de las reacciones dependientes de la luz es convertir la energía solar en energía química en forma de NADPH y ATP. Dichas moléculas alimentan las reacciones de la fase sintética, permitiendo la generación de hidratos de carbono. Los complejos de proteínas y

las moléculas de pigmento actúan en conjunto para producir NADPH y ATP. La conversión de energía luminosa en energía química tiene lugar en dos complejos multiproteicos llamados fotosistemas, los cuales se encuentran en las membranas tilacoides, denominados fotosistema II (PSII) y fotosistema I (PSI; Figura 1). Dichos complejos se diferencian en función de las moléculas que oxidan (es decir, la fuente de electrones de baja energía) y reducen (el destino de los electrones energizados). Si la célula requiere tanto ATP como NADPH para la biosíntesis, entonces llevará a cabo la fotofosforilación no cíclica. Al pasar el electrón del centro de reacción del PSII al sistema de transporte de electrones que conecta al PSII con el PSI, el electrón perdido del centro de reacción del PSII se reemplaza por uno proveniente de la lisis de una molécula de agua. El electrón del centro de reacción del PSI excitado se usa para reducir NADP^+ a NADPH y es reemplazado por el electrón que proviene del sistema de transporte de electrones. Si la necesidad de ATP es significativamente mayor que la de NADPH, se puede evitar la producción de potencial reductor a través de la fotofosforilación cíclica. En dicho caso, sólo se utiliza el PSI: el electrón de alta energía del centro de reacción del PSI pasa a un portador del sistema de transporte de electrones y, finalmente, regresa al pigmento del centro de reacción del PSI oxidado, reduciéndolo.

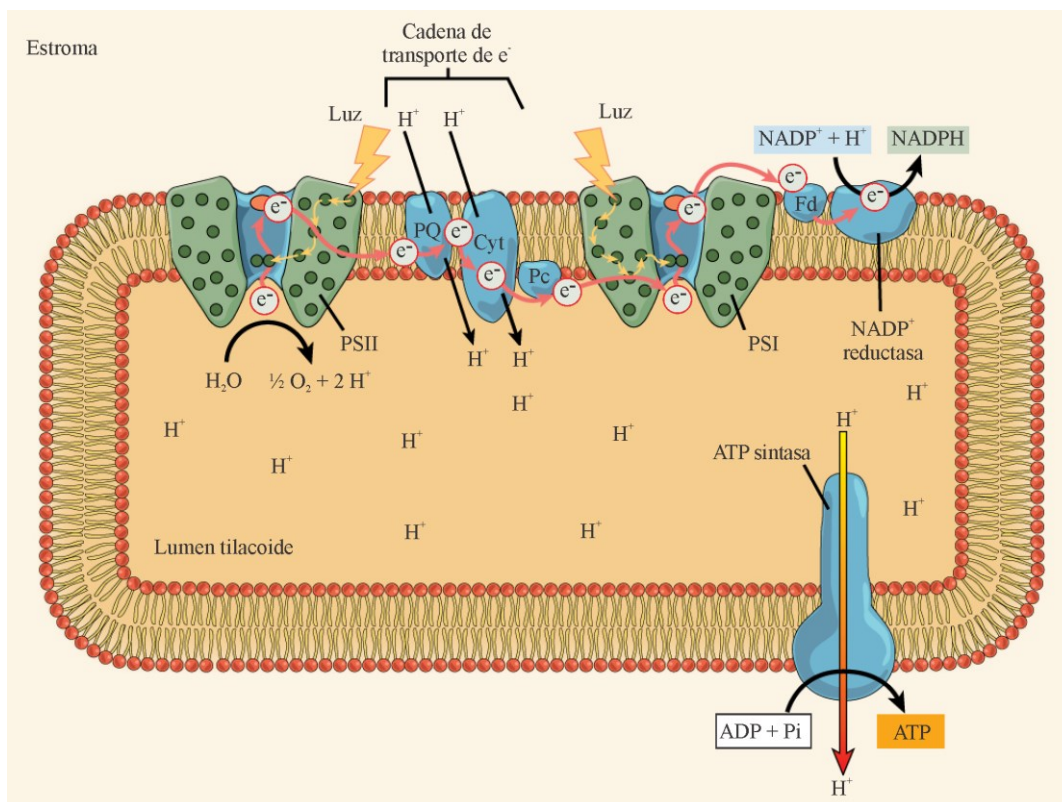


Figura 1: Fase luminosa de la fotosíntesis. En el centro de reacción del PSII, la energía de la luz solar se utiliza para extraer electrones de la molécula de agua. Los electrones viajan a través de la cadena de transporte de electrones del cloroplasto hasta el PSI, que reduce NADP^+ a NADPH . La cadena de transporte de electrones mueve los protones a través de la membrana tilacoide hacia el lumen. Al mismo tiempo, la fotólisis del agua suma protones al lumen y la reducción de NADPH elimina los protones del estroma. El resultado neto es un pH bajo en el lumen de las tilocoides y un pH alto en el estroma. La ATP sintasa utiliza este gradiente electroquímico para producir ATP. PQ, plastoquinona; Cyt, citocromo; Pc, plastocianina; Fd, ferredoxina (Modificado de https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@9.85:-CmzvUct@12/The-Light-Dependent-Reactions-of-Photosynthesis).

1.1.2 La fase sintética de la fotosíntesis

Después de que la energía del sol se convierte en energía química y se almacena temporalmente en moléculas de ATP y NADPH, los organismos fotoautótrofos tienen el combustible necesario para producir moléculas de carbohidratos, las que permiten un almacenamiento de energía a largo plazo. El carbono proviene del CO_2 atmosférico o del generado como subproducto de la respiración celular. El ciclo de Benson-Calvin-Bassham (CBCB), la vía bioquímica utilizada para la fijación de CO_2 , se localiza dentro del citoplasma de las bacterias fotosintéticas y en el estroma de los cloroplastos en las células verdes eucariotas. En su conjunto, puede describirse como la fijación de tres moléculas de CO_2 en un azúcar-P de tres

carbonos, o triosa-P, con la incorporación de una molécula de ortofosfato inorgánico (Pi). El producto principal de la asimilación fotosintética del carbono en el cloroplasto son las triosas-P: dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (Ga3P). Las triosas-P pueden ser exportadas hacia el citosol para producir azúcares solubles, o bien ser retenidas dentro del cloroplasto para sintetizar almidón o para regenerar ribulosa-1,5-bisfosfato (Ru1,5bisP), el aceptor inicial de CO₂ en el CBCB. Las reacciones del CBCB se pueden organizar en tres etapas básicas: carboxilación, reducción y regeneración (Figura 2).

Carboxilación: la Ru1,5bisP carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO, EC 4.1.1.39) cataliza la adición de CO₂ a la Ru1,5bisP, dando como resultado la producción de 2 moléculas de 3-fosfoglicerato (3PGA).

Reducción: se utilizan dos moléculas de ATP y NADPH (provenientes de las reacciones dependientes de la luz) para convertir las dos moléculas de 3PGA primero en 1,3-bisfosfoglicerato (1,3bisPGA) y luego en Ga3P. Estas reacciones son catalizadas por las enzimas 3PGA quinasa (EC 2.7.2.3) y Ga3P deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (Ga3PDHasa (A/B), EC 1.2.1.13), respectivamente.

Regeneración: el aceptor primario de CO₂, la Ru1,5bisP, es regenerada a partir de las triosas-P, por lo cual cinco moléculas de C₃ son interconvertidas en tres moléculas de C₅. Cada molécula de ribosa-5-fosfato debe ser convertida en ribulosa-5-fosfato (Ru5P), la que luego es fosforilada a expensas de una molécula de ATP, produciendo Ru1,5bisP. Entonces, cada molécula de CO₂ fijada en el CBCB requiere de tres moléculas de ATP y dos de NADPH.

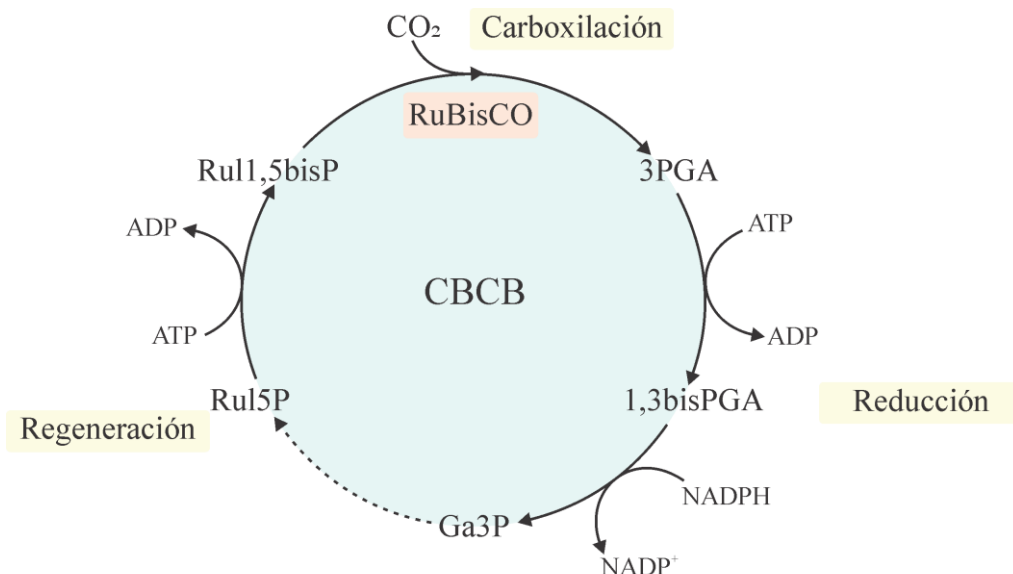


Figura 2: El CBCB tiene tres etapas. En la etapa 1 (carboxilación), la RuBisCO incorpora CO_2 en una molécula orgánica, generando 3PGA. En la etapa 2 (reducción), el 3PGA se reduce utilizando electrones suministrados por el NADPH. En la etapa 3 (regeneración), la molécula que inicia el ciclo (Ru1,5bisP) se regenera para que el ciclo pueda continuar.

El análisis global del ciclo indica que por cada tres moléculas de CO_2 que ingresan al mismo se genera una de triosa-P, la cual puede ser utilizada para sintetizar otros carbohidratos o bien regenerar intermediarios del ciclo. De esta manera, queda demostrado que el ciclo es autocatalítico y puede generar más aceptores de CO_2 del que consume. En consecuencia, hay una ganancia neta de carbono [2].

1.2 Metabolismo de carbohidratos: la partición de fotoasimilados en plantas

Los carbohidratos son los compuestos orgánicos más abundantes en la biosfera. Sin embargo, su importancia no sólo se debe a su abundancia, sino también a las múltiples funciones que cumplen en todas las células y organismos. En las plantas, los carbohidratos (i) son intermediarios claves en muchas rutas metabólicas; (ii) forman parte de numerosas estructuras; y (iii) actúan como transporte de carbono y energía entre tejidos [3]. En cuanto a la participación en el metabolismo energético, los carbohidratos son los principales intermediarios entre la glucólisis y la vía oxidativa de las pentosas-P (VOPP). Además, estas rutas cumplen una tarea importante al proporcionar esqueletos carbonados para la síntesis de una gran cantidad de componentes celulares, incluidos lípidos, ácidos nucleicos, ácidos orgánicos y proteínas. Los

carbohidratos son los componentes principales de moléculas estructurales como la celulosa, la biomolécula más abundante en la Tierra. También, los azúcares pueden encontrarse en combinación con otros compuestos, como en glicolípidos y glicoproteínas, las que determinan decisivamente la estructura y función de las células. Por otra parte, los carbohidratos son importantes para el transporte y almacenamiento de energía. En plantas, el almidón constituye uno de los productos de almacenamiento más importantes, mientras que la sacarosa (Suc) y los polioles son los principales metabolitos involucrados en la movilización de carbono entre tejidos fotosintéticos y heterotróficos [3].

La partición de fotoasimilados en plantas ocurre a dos niveles: intra e intercelular. El primero se da entre los plástidos y el citosol, mientras que el segundo ocurre entre los diferentes tejidos. Durante las horas de luz, el carbono fijado fotosintéticamente es utilizado en los cloroplastos para sintetizar almidón, o bien es exportado al citosol para alimentar la síntesis de Suc. El almidón sintetizado durante las horas de luz es movilizado en horas de oscuridad para mantener un adecuado flujo de carbono. En los tejidos heterotróficos, la Suc es degradada y el carbono es utilizado para suplir las necesidades biosintéticas de la célula, o bien es transportado hacia los plástidos, donde puede ser convertido en almidón [3, 4].

1.2.1 Partición del carbono en células autotróficas

Durante las horas de luz, aproximadamente 30% del excedente de fotoasimilados es derivado desde el CBCB para producir almidón dentro del cloroplasto. El polisacárido así sintetizado es almacenado transitoriamente y sirve principalmente para suministrar metabolitos carbonados durante la noche [3]. El almidón está compuesto por dos tipos diferentes de polímeros de glucosa (Glc) unidas por enlaces α -1,4: amilosa y amilopectina. La amilosa es considerada una molécula lineal, aunque está ligeramente ramificada por enlaces α -1,6; mientras que la amilopectina se encuentra altamente ramificada con enlaces α -1,6 localizados 25-30 moléculas de Glc [5]. La amilosa suele constituir un 20-35 % del almidón y la amilopectina del 65-80 % restante, aunque la proporción de ambos polisacáridos varía según la especie que los produce [6]. La síntesis de almidón se inicia desde la fructosa-6P (Fru6P), un intermediario del CBCB, la cual se convierte en glucosa-6-fosfato (Glc6P) y luego en glucosa-1-fosfato (Glc1P por la acción consecutiva de dos enzimas, la Glc6P isomerasa (EC 5.3.1.9) y la fosfoglucomutasa (EC 5.4.2.2). Luego sigue el paso catalizado por la ADP-Glc pirofosforilasa

(ADPGlcPPasa, EC 2.7.7.27), que produce ADP-Glc y pirofosfato inorgánico (PPi) a partir de Glc1P y ATP, en presencia de Mg^{2+} . La ADP-Glc es el sustrato utilizado por la almidón sintasa (EC 2.4.1.21) para elongar una cadena de α -1,4-poliglucano; luego, la enzima ramificante (EC 2.4.1.18) cataliza la formación de los puntos de ramificación α -1,6 de la fracción amilopectina del almidón [7, 8].

La síntesis de almidón en cloroplasto se modula principalmente en el paso de síntesis de ADP-Glc. En plantas, esta enzima es un heterotetrámero conformado por dos subunidades grandes y dos pequeñas, y es activada por 3PGA (el primer intermediario del CBCB) e inhibida por Pi. Esto hace que la enzima se encuentre activada durante las horas de luz (cuando la relación 3PGA:Pi es elevada, favoreciéndose la acumulación del polisacárido) e inhibida durante la noche (cuando la relación 3PGA:Pi es baja) [8]. Además de la regulación por metabolitos, la actividad de la ADPGlcPPasa de plantas es modulada por mecanismos postraduccionales de óxido-reducción y fosforilación [9, 10]. La regulación asociada al estado redox involucra la participación del sistema ferredoxina–tioredoxina. En los cloroplastos, durante las horas de luz, este sistema produce tioredoxina (Trx) reducida y, por la noche, genera Trx oxidada [8]. Es así que durante la noche, los residuos Cys adyacentes de las subunidades pequeñas de la ADPGlcPPasa son oxidados, lo que lleva a la formación de un puente disulfuro y, consecuentemente, a la disminución de la actividad catalítica de la enzima. El proceso de reducción se da durante el día por Trxs reducidas, las cuales aumentan la actividad de la enzima. Este tipo de regulación se da solo en algunas especies de plantas, ya que las Cys de la subunidades pequeñas no están conservadas en ADPGlcPPasas de monocotiledóneas [9]. Por otro lado, en un estudio reciente en nuestro laboratorio [11] se encontró la ADPGlcPPasa en estado fosforilado en extractos de semillas de trigo. Se determinó que los niveles de proteína fosforilada aumentaron a la par del desarrollo de la semilla, observándose también una correlación con el aumento de la actividad enzimática y el contenido de almidón. Un análisis más detallado mostró que la fosforilación se daba preferencialmente en la subunidad L y los resultados sugieren que la ADPGlcPPasa es blanco de fosforilación en semillas de gramíneas, pero no de plantas oleaginosas [11]. Por otra parte, hay que tener en cuenta que existen diferentes isoformas de la almidón sintasa, una soluble, que elonga cadenas de amilopectina [12] y otra unida al gránulo, que alarga cadenas de amilosa [13]. Las distintas especificidades de estas isoformas de almidón sintasa constituyen mecanismos adicionales que regulan la producción de almidón.

Las triosas-P pueden dirigirse hacia el citosol a través del TTP (transportador de triosa-P de la membrana cloroplastídica), una proteína transportadora que las intercambia por Pi (Figura 3). 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 [14, 15]. El TTP posee un rol crucial en la regulación de la partición del carbono en hojas: el transporte de Pi hacia el cloroplasto representa una señal sobre cuán rápido se utilizan las triosas-P en la síntesis de Suc. Si la velocidad de síntesis de Suc disminuye, la velocidad a la cual el Pi ingresa al cloroplasto se reducirá y su concentración en el mismo disminuirá [16]. En consecuencia, la exportación del carbono hacia el citosol también se reducirá y la baja disponibilidad de Pi limitará la producción de ATP, con la consecuente disminución en la velocidad de acumulación de CO₂. Esto lleva a la disminución en la conversión de 3PGA a triosas-P y, consecuentemente, la proporción 3PGA:Pi aumenta en el cloroplasto. Este escenario estimula la síntesis de almidón por activación alostérica de la ADPGlcPPasa (aumento del activador 3PGA y reducción del inhibidor Pi) [17].

Una vez en el citosol de la célula fotosintética, las triosas-P pueden ser utilizadas para la síntesis del disacárido Suc, fuente de carbono y energía transportada desde las hojas hacia los tejidos heterotróficos de la planta (Figura 3). La síntesis de Suc ocurre exclusivamente en el citosol de las células vegetales, a través de una ruta metabólica que utiliza triosas-P importada desde el plástido. Esta vía comienza con la producción de fructosa-1,6-bisfosfato (Fru1,6bisP) a partir de Ga3P y DHAP, en un paso catalizado por la aldolasa (EC 4.1.2.13), seguido de la hidrólisis del producto a Fru6P por la Fru1,6bisP 1-fosfatasa citosólica (cFBPasa, EC 3.1.3.11). Este es el primer punto de control en la síntesis de Suc: la cFBPasa es inhibida por fructosa-2,6-bisfosfato (Fru2,6bisP), un metabolito que tiene efecto alostérico sobre la enzima, disminuyendo su afinidad por el sustrato [3, 18, 19]. De esta forma, la Fru2,6bisP actúa como una señal de la cantidad de carbono disponible para la síntesis de Suc [20]. La Fru6P producida por la cFBPasa se transforma en Glc6P y Glc1P en dos reacciones sucesivas catalizadas por la Glc6P isomerasa y la fosfoglucomutasa, respectivamente. La Glc1P y el UTP luego son utilizados por la UDP-Glc pirofosforilasa (UDPGlcPPasa, EC 2.7.7.9) para producir UDP-Glc. Tanto la Fru6P como la UDP-Glc son los sustratos de la sacarosa-6-fosfato sintasa (Suc6PSasa, EC 2.4.1.14). La síntesis de Suc también puede regularse a nivel de la Suc6PSasa. La Glc6P es un activador alostérico de la enzima, mientras que el Pi es un inhibidor de la misma. Cuando la fotosíntesis aumenta la relación Glc6P:Pi en el citosol también lo hace, lo que induce la actividad de la Suc6PSasa

permitiendo adecuar el flujo aumentado de fotosintatos [20]. Además, la actividad de la Suc6PSasa puede ser regulada por fosforilación en residuos de Ser que promueven tanto la activación como la inactivación de la enzima [21–23].

Finalmente, la Suc6P es hidrolizada por una fosfatasa específica (EC 3.1.3.24) liberando Suc, la que puede exportarse a otros tejidos o bien almacenarse en la vacuola [24] (Figura 3). La Suc se sintetiza continuamente para proporcionar carbono y energía a tejidos heterotróficos. Sin embargo, los bloques de construcción necesarios para su síntesis varían a lo largo del ciclo diurno. Las células foliares de muchas especies de plantas, tales como *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) y arveja (*Pisum sativum*), almacenan almidón durante el día y lo descomponen durante la noche siguiente. Los productos resultantes (principalmente maltosa) se exportan al citosol, donde se utilizan para la respiración o la síntesis de Suc [4, 25].

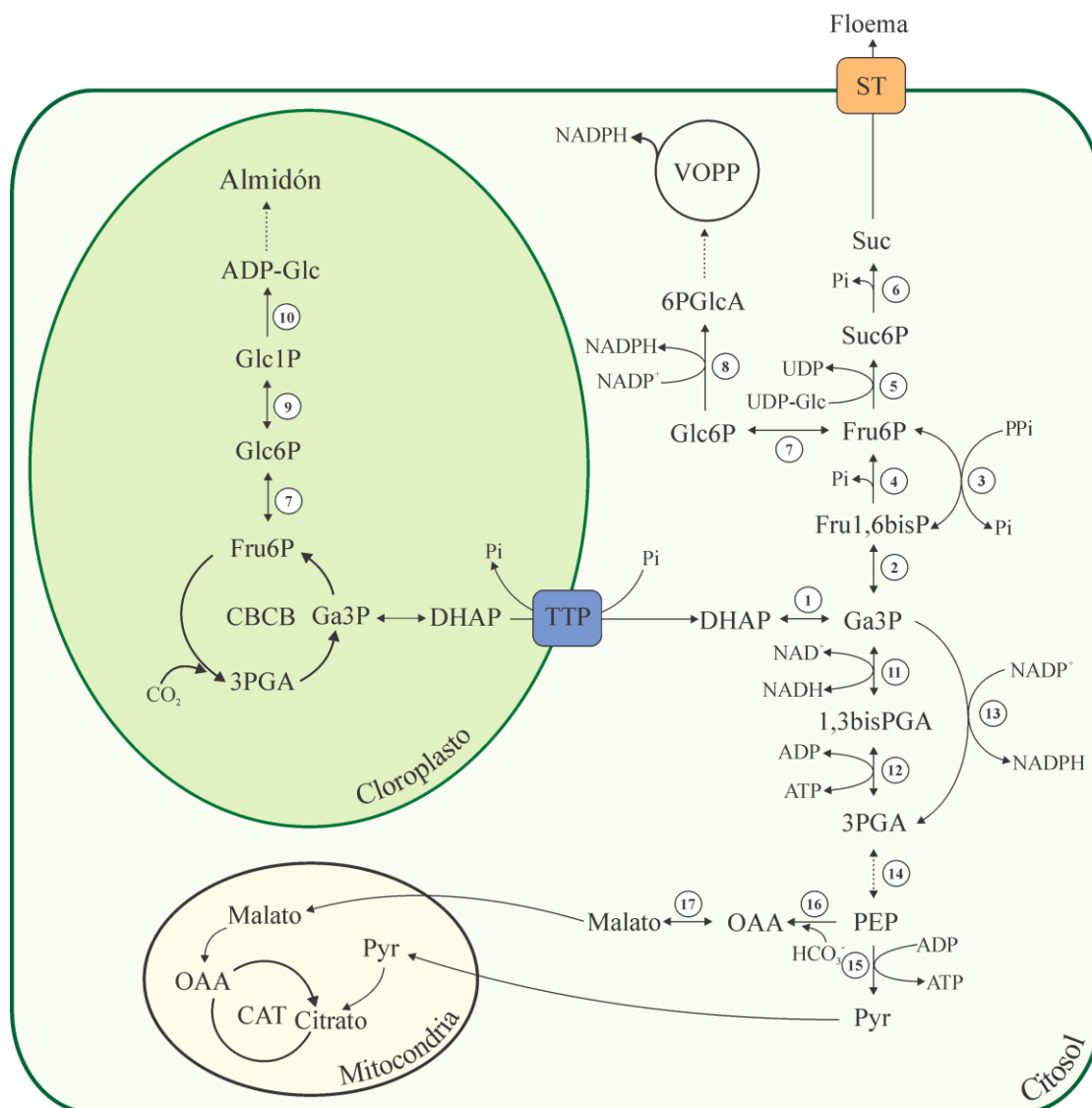


Figura 3: Partición del carbono en células fotosintéticas. Esquema simplificado de las reacciones más importantes de partición del carbono. Las reacciones enzimáticas se enumeran con círculos: (1) triosa-P isomerasa, (2) Fru-1,6-bisP aldolasa, (3) fosfofructoquinasa dependiente de PPi, (4) cFBPasa, (5) Suc6PSasa, (6) Suc6Pasa, (7) Glc6P isomerasa, (8) Glc6PDHasa, (9) fosfoglucomutasa, (10) ADPGlcPPasa, (11) Ga3PDHasa, (12) 3PGA quinasa, (13) npGa3PDHasa, (14) fosfogliceromutasa y enolasa (15) piruvato quinasa, (16) PEP carboxilasa, (17) malato deshidrogenasa. ST: transportador de Suc; TTP: transportador de triosa-P; CBCB: ciclo de Benson-Calvin-Bassham; VOPP: vía oxidativa de las pentosas-P; CAT: ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

1.2.2 Partición del carbono desde tejidos fuente hacia tejidos sumidero

El rendimiento de un cultivo está directamente correlacionado con la capacidad de la planta para transportar carbono desde las hojas hacia el tejido sumidero económicamente relevante. Además, el crecimiento y las necesidades de energía de otros tejidos sumidero también

deben ser convenientemente satisfechos por la planta. Generalmente se acepta que los solutos producidos por la fotosíntesis generan suficiente presión hidrostática (o turgencia) en las células del mesófilo para impulsar el transporte desde la fuente hasta los tejidos heterotróficos, a través de la vía simplástica. De acuerdo a este mecanismo, la carga de Suc en el floema en el tejido fuente aumenta la presión hidrostática e impulsa el flujo subsiguiente [26]. Sin embargo, a la luz de estudios recientes, esta visión ha requerido ajustes adicionales. El camino a través del cual la Suc finalmente se carga en el floema ha sido objeto de cierta controversia, dado que se propusieron tres tipos de mecanismos de carga del floema: apoplástica, por atrapamiento de polímero o por difusión. Los dos primeros son también llamadas estrategias activas, ya que involucran el consumo de alguna forma de energía, mientras que el último tipo de carga de floema es pasivo.

En el mecanismo de carga apoplástica, la Suc sintetizada en la célula del mesófilo se mueve citoplasmáticamente de célula en célula a través de los plasmodesmos hasta que alcanza las células parenquimáticas. Allí es translocada hacia el apoplasto por un transportador de membrana de Suc de la familia SWEET (*Sugars Will Eventually be Exported Transporters*). Estos transportadores fueron recientemente identificados [27], permitiendo este hallazgo ampliar el conocimiento de la dinámica del flujo de la Suc en plantas. Los transportadores SWEET pueden ser secuestrados por patógenos microbianos para obtener Suc para su propio crecimiento [28]. Siguiendo el transporte de Suc, una vez en el apoplasto es transportada por los transportadores SUT hacia el complejo células acompañantes-elemento de la vaina. Este es un co-transportador de H^+ y está acoplado a la función de una H^+ -ATPasa, que provee la energía necesaria para impulsar la Suc contra el gradiente de concentración. La fosforilación del transportador de Suc inhibe el transporte de la misma, añadiendo un nivel de complejidad aún mayor a la regulación de la partición de la Suc [29]. La acumulación de Suc en las células de la vaina produce un gradiente por presión hidrostática que resulta en el flujo del azúcar a través de un conducto de células de la vaina contiguas, hasta que finalmente llega y es descargada en los tejidos sumidero [28].

En el segundo mecanismo de carga activa del floema, menos frecuente, la Suc difunde a través de plasmodesmos a una célula acompañante especializada, la célula intermedia, y posteriormente es convertida en rafinosa (Raf) o un oligosacárido de la familia de la Raf (RFO). En este caso, no se requiere energía para el transporte sino para la biosíntesis del oligosacárido. En el mecanismo de transporte pasivo, la Suc se mueve de manera simplástica hasta la célula del

mesófilo que se encuentra a continuación y llega a los tubos cribosos a través de plasmodesmos. Según este modelo, la concentración de Suc en el citosol de las células del mesófilo es lo suficientemente alta como para impulsar el transporte a largas distancias por flujo de presión. La descarga de Suc en el tejido sumidero y su subsecuente transformación o almacenamiento en la vacuola provee el gradiente necesario para mantener el flujo de carbono [3].

1.2.3 Partición del carbono en células heterotróficas

En las células heterotróficas la fuente de carbono proviene de la Suc sintetizada en los tejidos fotosintéticos, transportada mediante el floema. Una vez que la Suc ingresa a la célula, la misma puede ser utilizada tal como muestra el esquema de la Figura 4, con diferentes propósitos: i) almacenar energía, como Suc en la vacuola, o bien 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 Suc hacia cada una de estas vías depende del tipo de tejido heterotrófico implicado y de su estadio de desarrollo [3]. El primer paso involucrado en la degradación de Suc es su ruptura química generando, en una serie de reacciones, Glc6P y Fru6P, que ingresan a la ruta de la glucólisis.

La ruptura de la Suc puede ser llevada a cabo por dos enzimas distintas: las invertasas (β -D-fructofuranosidasa, EC 3.2.1.26), que producen Glc y Fru; o la Suc sintasa (SucSasa, EC 2.4.1.13), que genera Fru y UDP-Glc [3, 30] (Figura 4). Las invertasas catalizan la hidrólisis directa e irreversible de la Suc en Glc y Fru, con la consecuente pérdida de la energía requerida para producir un enlace glucosídico. Por otro lado, la escisión mediada por la SucSasa rinde UDP-Glc y Fru. Si bien esta reacción es reversible, en general se considera que la reacción se encuentra desplazada hacia la descomposición de la Suc. Mientras que los productos de las invertasas pueden convertirse en Fru1,6bisP por la vía glucolítica clásica, la degradación mediada por SucSasa, en cambio, sigue una vía basada en UDP y P_{Pi}. La actividad de una u otra enzima puede predominar según el tejido o el estadio de desarrollo del mismo [31]. La UDP-Glc junto con el P_{Pi} son utilizados por la UDPGlcPPasa para generar UTP y Glc1P; este último es el metabolito que ingresa en el grupo de las hexosas-P. Cabe destacar que el P_{Pi} es regenerado mediante la acción de la fosfofructoquinasa dependiente de P_{Pi} (EC 2.7.1.90). Se ha propuesto que los nucleótidos de uridina juegan un rol importante en el control de la degradación de Suc y

la síntesis de almidón [3], por lo que su reciclado es de suma importancia; por otra parte, los niveles de adenilatos son más importantes en el control de la respiración y en la actividad de la ADPGlcPPasa [32].

A pesar de las diferencias iniciales en la degradación de Suc, 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 [3] (Figura 4). El transporte de Glc6P hacia el interior de los 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 eritrosa-4-fosfato [14, 15]. La otra ruta que puede utilizar Glc6P dentro de los plástidos es la VOPP, que está involucrada en la interconversión 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 Rul5P con la producción asociada de NADPH, en la que participan, entre otras enzimas, la Glc6P deshidrogenasa (Glc6PDHasa, EC 1.1.1.49) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.44). La otra, una fase no-oxidativa, convierte la Rul5P en hexosas-P y triosas-P, productos que pueden ingresar a la vía glucolítica o que pueden ser utilizados para regenerar la Glc6P y reiniciar el ciclo [33]. Se ha propuesto que en el citosol de las células vegetales sólo ocurriría la fase oxidativa de la VOPP y el primer paso de la fase no-oxidativa [34, 35]. De esta forma, se convertiría la Glc6P a Rul5P y esta última a ribosa-5-fosfato y xilulosa-5-fosfato, productos que serían transportados dentro de los plástidos por una proteína transportadora específica que las intercambia por Pi, para continuar su ciclo [36, 37]. Alternativamente, la Glc6P puede ser convertida en el citosol a Fru6P, compuesto que la encausa hacia 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 [3].

De lo expuesto anteriormente, es claro que en las plantas la partición del carbono ocurre tanto en tejidos fuente como en tejidos sumidero, entre Suc y almidón, y que la síntesis y degradación de dichas moléculas están finamente reguladas.

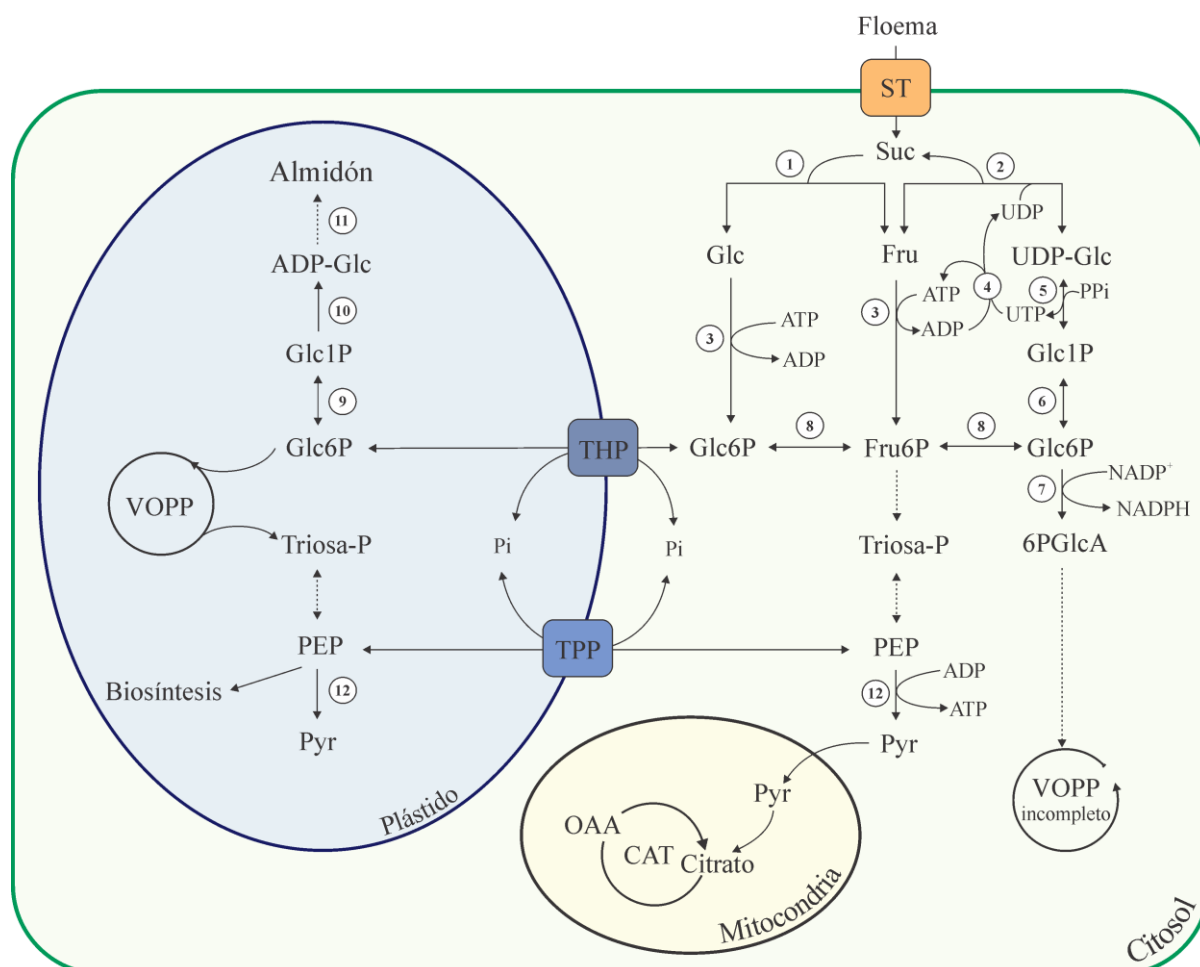


Figura 4: Metabolismo del carbono en células no fotosintéticas. Esquema simplificado de las reacciones más importantes de partición del carbono. Las reacciones enzimáticas se enumeran con círculos: (1) invertasas, (2) SucSasa, (3) hexoquinasa, (4) nucleósido difosfato quinasa, (5) UDPGlcPPasa, (6) fosfoglucomutasa, (7) Glc6PDHasa, (8) Glc6P isomerasa, (9) fosfoglucomutasa, (10) ADPGlcPPasa, (11) almidón sintasa y enzima ramificante, (12) piruvato quinasa. ST: transportador de Suc; TPP: transportador de PEP/Pi; THP: transportador de hexosa-P, VOPP: vía oxidativa de las pentosas-P; CAT: ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

1.3 Metabolismo de los azúcares-alcoholes

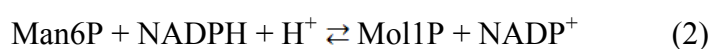
En determinadas especies vegetales el carbono fijado fotosintéticamente puede ser utilizado para la síntesis de azúcares-alcoholes [38]. Los azúcares-alcoholes son polioles acíclicos que desempeñan un papel clave en el metabolismo de algunas plantas. Tres de ellos

están ampliamente distribuidos en las angiospermas: glucitol, manitol (Mol) y galactitol. El tipo de azúcar-alcohol producido depende de cada organismo: por ejemplo, el glucitol (también conocido como sorbitol) es un producto fotosintético mayoritario en especies de las familias Rosaceae (plantas de manzana, durazno y pera, entre otras) y Plantaginaceae [39], mientras que el Mol es sintetizado, acumulado y transportado a tejidos heterotróficos por plantas de las familias Apiaceae (plantas de apio, zanahoria y perejil, entre otras) y Oleaceae [40]. La partición del carbono en estas plantas es más compleja que en otras especies, ya que los fotosintatos primarios son tres: almidón, Suc y el azúcar-alcohol. La capacidad de un tejido de sintetizar y/o degradar azúcares-alcoholes puede variar en forma importante entre los diferentes tejidos de una planta o dentro de un mismo tejido vegetal durante el desarrollo.

Los azúcares-alcoholes son sintetizados en el citosol, mediante la acción combinada de reductasas y fosfatasas y son degradados vía deshidrogenasas u oxidasas. Una característica de este tipo de azúcares es que la capacidad de síntesis y degradación está compartimentada en diferentes tejidos; hecho que tiene consecuencias directas sobre la capacidad de acumulación del azúcar-alcohol. En las especies que producen glucitol y Mol, la síntesis del azúcar-alcohol se da principalmente en el tejido fuente (es decir, hoja madura), y la degradación se produce principalmente en el tejido sumidero (es decir, frutos, ápices, raíces, y hojas no fotosintéticas). En el caso de la planta de apio, la Suc es sintetizada y utilizada en hojas de todas las edades; pero a diferencia de ésta, el Mol es sintetizado principalmente en hojas maduras y su utilización está restringida a tejidos sumidero activos como las hojas jóvenes [41]. De esta forma, el Mol representa una forma de transporte de carbohidratos más rigurosamente controlada, destinada específicamente al suministro de carbono a tejidos heterotróficos [42]. En una escala de tiempo diaria, los azúcares-alcoholes son almacenados temporalmente en los tejidos del mesófilo. Se acumulan durante las horas de luz y se traslocan durante las horas de oscuridad. En cuanto a la variación del contenido de carbohidratos dependiente de la estación, varios trabajos han descrito que el azúcar-alcohol se puede almacenar temporalmente en las partes perennes de algunas especies de árboles [42–44]. Por el contrario, en frutos de especies donde el azúcar-alcohol es el azúcar mayormente traslocado, las formas principales de almacenamiento de carbohidratos son el almidón y las hexosas [42].

1.3.1 Metabolismo del manitol en plantas de apio

La Figura 5 detalla los caminos metabólicos del Mol en una planta de apio (*Apium graveolens*). El Mol se sintetiza en hojas maduras de apio mediante la acción coordinada de tres enzimas. La primera de ellas es la manosa-6-fosfato (Man6P) isomerasa (EC 5.3.1.8, ec. 1), que transforma la Fru6P en Man6P. Esta última es convertida en manitol-1P (Mol1P) por la Man6P reductasa (Man6PRasa, EC 1.1.1.224, ec. 2) en una reacción dependiente de NADPH. Se ha demostrado que el NADPH necesario para la reducción de la Man6P proviene de la reacción catalizada por la Ga3P deshidrogenasa no fosforilante (npGa3PDHasa) [45, 46], la cual presenta una actividad significativamente mayor en plantas donde el Mol es un fotosintato primario, en comparación con plantas donde no lo es. El Mol1P es finalmente hidrolizado a Mol por una fosfatasa específica (EC 3.1.3.22, ec. 3) [40, 45]. Este poliol es luego exportado a los tejidos no fotosintéticos (por ejemplo, hojas en desarrollo) mediante transportadores específicos [47, 48]. Una vez incorporado en el citosol de las células heterotróficas, el Mol es transformado en Man por la Mol deshidrogenasa (MolDHasa, EC 1.1.1.255, ec. 4) dependiente de NAD^+ [49, 50]. Luego, la Man es fosforilada por la hexoquinasa (ec. 5) a Man6P y esta última es convertida en Fru6P por la Man6P isomerasa (ec. 6). Esta enzima es la misma que cataliza la reacción inversa en tejidos fotosintéticos (conversión de Fru6P en Man6P, ec. 1). Si bien se ha demostrado la existencia de esta enzima en tejidos fotosintéticos, su presencia en células heterotróficas es aún especulativa y requiere de trabajos más detallados [38].



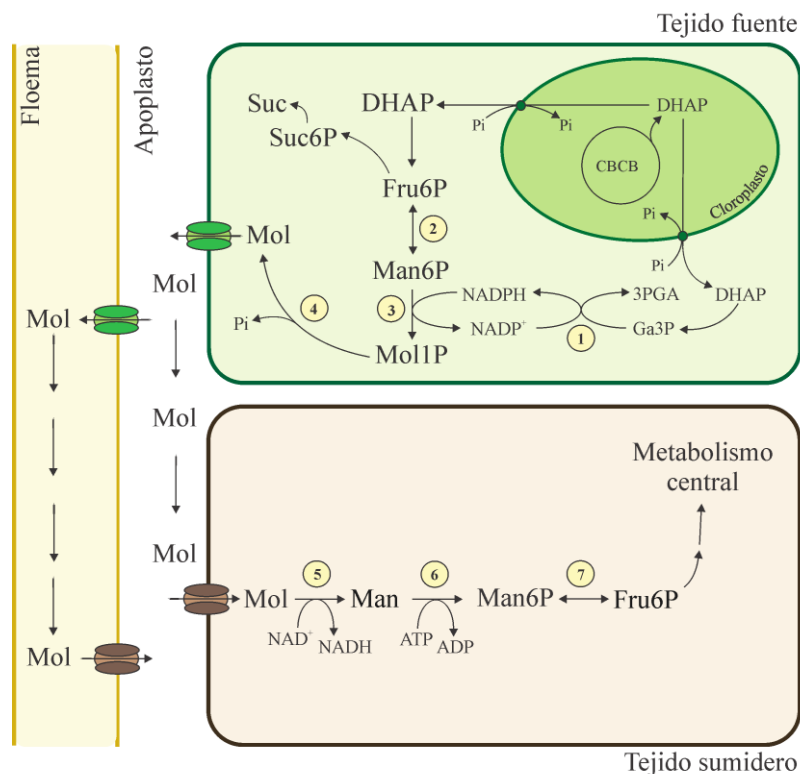


Figura 5: Metabolismo del Mol en plantas de apio. (1) npGa3PDHasa, (2) Man6P isomerasa, (3) Man6PRasa, (4) Mol1Pasa, (5) MolDHasa, (6) HKasa y (7) Man6P isomerasa.

Se ha demostrado que en plantas de apio hasta un 80% del CO₂ fijado fotosintéticamente es utilizado para la síntesis de Suc y Mol, mientras que una parte menor se destina a la síntesis de almidón [40]. Este patrón de acumulación es diferente al de otras especies vegetales, en particular *Arabidopsis*, la cual acumula grandes cantidades de almidón durante las horas de luz para luego degradarlo durante las horas de oscuridad. Las rutas de síntesis y degradación del Mol en plantas de apio se encuentran reguladas por el estadio de desarrollo del tejido. El Mol sintetizado en el mesófilo se acumula temporalmente en el parénquima del pecíolo de hojas maduras, siendo movilizado a los tejidos más jóvenes (sumideros) durante la senescencia [44, 51]. El almacenamiento de Mol en las células del parénquima ocurre predominantemente en la vacuola (81%) y el resto en el citosol, aunque las concentraciones citosólicas pueden ser bastante altas [44]. Estudios realizados en plantas de apio mostraron que el Mol es producido y acumulado durante el día en células fotosintéticas, para ser luego exportado a los tejidos heterotróficos en horas de oscuridad [40, 51, 52]. Esto hace suponer la existencia de mecanismos de regulación en diferentes niveles, incluyendo la síntesis, acumulación, transporte y utilización del Mol en función del ciclo de luz/oscuridad. Por ejemplo, los niveles de transcripción y actividad

de la Man6PRasa son elevados en hojas fotosintéticamente activas, mientras que son bajos o nulos en las hojas en desarrollo. Por el contrario, los niveles de transcritpo y actividad de la MolDHasa son altos en hojas en desarrollo y prácticamente indetectables en hojas maduras [41, 52–54].

1.3.2 Sobre la manosa-6-fosfato reductasa

La Man6PRasa pertenece a la superfamilia de las aldo/ceto reductasas (AKR) [55, 56]. Las AKR son enzimas dependientes de NAD(P)H que reducen una amplia variedad de aldehídos y cetonas, monosacáridos, cetoesteroides y prostaglandinas. También catalizan la oxidación de hidroxiesteroides y trans-dihidrodiol de hidrocarburos aromáticos policíclicos. En humanos, se las ha implicado en complicaciones diabéticas y enfermedades congénitas, mientras que en las plantas juegan un papel clave en la eliminación de compuestos aldehídos reactivos, la producción de osmolitos y en la síntesis de metabolitos secundarios. La superfamilia AKR incluye más de 190 miembros que se clasifican en 16 familias, teniendo en cuenta la identidad de la secuencia de aminoácidos [57] y que se encuentran en todos los reinos y filos biológicos. Todas las proteínas que pertenecen a dicha familia poseen el motivo de barril- $(\alpha/\beta)_8$ característico de la triosa fosfato isomerasa (TIM) y contienen aproximadamente 320 aminoácidos por monómero [55]. La mayoría de las AKR conocidas son monoméricas, a excepción de las que pertenecen a las familias AKR2, AKR6 y AKR7, las cuales presentan conformaciones multiméricas. La subfamilia AKR2 incluye a la Man6PRasa de apio y a la aldosa-6-fosfato reductasa (Ald6PRasa) de manzano (*Malus domestica*), de durazno (*Prunus persica*) y de arroz (*Oryza sativa*) [40, 58–60], las cuales presentan una conformación dimérica.

La Man6PRasa ha sido purificada a partir de hojas maduras de apio, *Striga hermonthica* y *Orobancha ramosa* [40, 53, 61], siendo caracterizada en la dirección de reducción de la Man6P en todos los casos. La enzima de apio mostró una alta especificidad con respecto a los requerimientos de sustrato y cofactor. Sólo se observó una actividad enzimática insignificante cuando el sustrato Man6P se reemplazó con Glc6P, Fru6P o Man1P, mientras que el NADH no sustituyó al NADPH [40]. El primer informe sobre el clonado del gen que codifica para la Man6PRasa a partir de apio (una planta que produce Mol), procede del grupo de Loescher [53], la cual en términos de masa molecular, actividad específica y características cinéticas fue indistinguible de la Man6PRasa obtenida de fuente.

La Man6PRasa se encuentra predominantemente en el parénquima esponjoso y en los tejidos de la empalizada del mesófilo foliar y el haz de la vaina [62], pero no en el parénquima vascular. Estos resultados muestran que la localización de la Man6PRasa y, por lo tanto, la síntesis de Mol, están estrechamente asociados con la distribución del metabolismo del carbono fotosintético en las hojas de apio. Esto sugiere fuertemente que la Man6PRasa tiene un rol clave en la asimilación del carbono que se exporta del cloroplasto. En cuanto a su localización celular, se ha descrito que esta enzima se encuentra principalmente en el citosol [62].

1.3.3 Sobre la manitol deshidrogenasa

La MolDHasa es una metaloproteína que pertenece a la superfamilia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena media (MDR) y, como tal, posee un átomo de Zn^{2+} necesario para que ocurra la catálisis [63]. La masa molecular de la MolDHasa es cercana a los 43 kDa y se ha informado que la forma activa es un monómero [50], a diferencia de la glucitol deshidrogenasa (EC 1.1.1.14, una enzima análoga a la MolDHasa) de plantas de la familia Rosaceae, cuya estructura cuaternaria es un tetrámero [64–66]. Si estas últimas enzimas catalizan reacciones similares (en ambos casos se oxida el poliol en una reacción dependiente de NAD^+), sus secuencias son considerablemente diferentes. Esto sugiere que poseen distinto origen evolutivo y resulta relevante realizar estudios comparativos a nivel cinético, estructural y regulatorio entre las mismas.

La primera evidencia de una MolDHasa en plantas vasculares aparece en el trabajo de Stoop y Pharr [49], quienes purificaron parcialmente y caracterizaron una enzima con actividad Mol:Man-1-P oxidoreductasa de raíces de apio. Esta enzima difiere de la MolDHasa de microorganismos porque oxida el Mol a Man, mientras que la de origen microbiano convierte el Mol en Fru [67]. La MolDHasa de apio oxida los alditoles con un requisito mínimo de quiralidad 2R en el carbono adyacente al carbono primario que experimenta la oxidación. La enzima es específica para NAD^+ y no usa $NADP^+$ y es inhibida por el agente quelante 1,10-fenantrolina, lo cual sugiere que el Zn^{2+} es necesario para la actividad deshidrogenasa [67]. Los agentes reductores ditiotreitól (DTT), ditioeritritol y β -mercaptoetanol (β -ME) inactivaron la MolDHasa reversiblemente, sugiriendo la existencia de puentes disulfuro o de Cys involucradas en el sitio activo que pueden ser modificados por el estado redox del organismo *in vivo*. Aún más, esta enzima es fuertemente inhibida por NADH, por lo que su actividad es sensible a la relación

NADH/NAD⁺ [49, 67]. A pH 7,0 el ADP y, en menor grado, el AMP y el ATP, resultan inhibidores competitivos con respecto al NAD⁺. Otros resultados sugieren que la actividad de la enzima no se ve afectada directamente por NaCl ni por macronutrientes como NO₃⁻, SO₄²⁻, HPO₄²⁻, Mg²⁺, Ca²⁺ o K⁺ [67].

La MolDHasa es una enzima de localización citosólica y se encuentra en varios tejidos sumidero, como por ejemplo el meristema apical de la raíz de apio, hojas jóvenes en expansión, el cambium vascular y el floema, incluyendo el tubo criboso, las células acompañantes, el parénquima y el exudado de savia de los peciolo [68]. La asociación entre MolDHasa y el floema se ha sugerido como un medio por el cual el Mol puede retornar al *pool* de carbohidratos activos y así proporcionar energía para apoyar la función del floema [68]. Esto es análogo al papel propuesto para la SucSasa asociada al floema [38, 69, 70].

Se ha evidenciado que, en tejidos sumidero de planta de apio, el secuestro del Mol o la limitación de su metabolismo se debe, al menos en parte, a la represión mediada por azúcares hexosa de la actividad catabólica de la MolDHasa [54]. También se observó que al crecer cultivos de células de apio con Glc como fuente de carbono, éstos expresaban baja actividad MolDHasa durante el crecimiento activo; pero experimentaban un marcado aumento en la actividad, niveles de proteína y ARNm de esta enzima cuando se los privaba de Glc [71] o cuando el Mol era la fuente primaria de carbono [72]. Esta represión de la MolDHasa parece estar mediada por una hexoquinasa de forma comparable a la represión por diferentes azúcares de genes fotosintéticos [73, 74]. Estas observaciones se relacionan con los efectos múltiples y generales del estado de los niveles de carbohidratos en tejido sobre la regulación de la expresión génica [75, 76].

1.3.4 Roles del manitol y tolerancia a estrés

Además del rol que cumplen como fotosintatos, los azúcares-alcoholes tienen una función relevante frente a diferentes condiciones de estrés abiótico. Se ha demostrado que numerosos organismos son capaces de acumular compuestos de bajo peso molecular, tales como azúcares no reductores, polioles (Mol, glucitol y glicerol), aminos cuaternarios o aminoácidos [77, 78]. Estos compuestos, conocidos generalmente como solutos compatibles, permitirían que dichos organismos toleren ciertos tipos de estrés abiótico (salinidad, sequía y frío). Es bien sabido que diferentes compuestos inorgánicos (K⁺, Na⁺, Cl⁻ y SO₄²⁻) y moléculas orgánicas

(hexosas reductoras) son fundamentales para los ajustes osmóticos en sistemas acuosos. Sin embargo, estos compuestos son diferentes de los solutos compatibles, ya que pueden afectar las propiedades de las soluciones en distintas formas [38, 78]. Los primeros trabajos establecieron que altas concentraciones de solutos compatibles no interfieren con las actividades enzimáticas *in vitro* y que a veces pueden proteger a las proteínas de los efectos nocivos de las sales o el calor [38]. Se ha descrito que la concentración de estas moléculas debe alcanzar valores tan altos como 500 mM para ejercer protección; curiosamente, estos niveles se pueden alcanzar en las células [79, 80].

Se han propuesto diferentes hipótesis para esclarecer el efecto protector de los solutos compatibles sobre las estructuras biológicas. Una hipótesis es que sustituyen a las moléculas de agua en la hidratación de proteínas y membranas, lo que permite que se produzca la actividad enzimática incluso a concentraciones de agua extremadamente bajas [81]. Otra alternativa sugiere que los solutos compatibles podrían estar fuera de la esfera de hidratación de las proteínas, produciendo así un reordenamiento particular de la esfera e induciendo a la estructura biológica a adoptar una hidratación preferencial [82]. Con respecto a las plantas, existen estudios que respaldan en gran medida la posibilidad de derivar carbohidratos citosólicos a diferentes destinos metabólicos que produzcan compuestos del tipo de solutos compatibles. La acumulación de estos metabolitos podría ayudar al vegetal a resistir condiciones extremas de bajas temperaturas, altos niveles de sal y déficit hídrico. El panorama general sostiene que las modificaciones en el equilibrio de la partición de fotosintatos pueden desempeñar un papel fundamental para la productividad y supervivencia de las plantas en condiciones fisiológicas o de estrés.

Los carbohidratos como Suc, fructanos y azúcares-alcoholes pueden ser importantes en la tolerancia y resistencia al daño inducido por el frío [38, 83–86]. El daño por frío se produce por la desecación debido a la demanda de agua del protoplasto, como consecuencia del crecimiento de cristales de hielo [38]. Aunque los resultados no son concluyentes, numerosos estudios han relacionado este tipo de estrés con la acumulación de solutos compatibles. Por ejemplo, se ha observado que durante los meses de invierno, en la corteza de hoja perenne de olivo, los niveles de Mol son más del doble que en el verano [43]. También, informes sobre la aclimatación a baja temperatura en varias especies de cactus (*Opuntia*) mostraron que, dependiendo del tejido, los niveles de azúcares solubles aumentaron de 2 a 9 veces, mientras que el Mol aumento casi 3 veces en la especie más resistente [87].

Son escasos los estudios que se centran específicamente en la relación entre polioles acíclicos y el estrés por sequía, con lo cual las interpretaciones de éste y otros tipos de estreses pueden ser desconcertantes al confundir los efectos primarios y secundarios. En plantas del género *Fraxinus* (familia Oleaceae) el Mol juega un papel crítico en el ajuste osmótico estacional que ocurre en respuesta a la sequía del verano [88]. La comparación entre árboles y plántulas control y sometidos a estrés por sequía, mostraron que estos últimos se aclimataron a los bajos potenciales hídricos foliares antes del amanecer, sin presentar marchitamiento aparente o cese de la fotosíntesis [89]. La sequía resultó en altas concentraciones de Mol y malato, mientras que la Suc se mantuvo relativamente baja. Estudios similares en olivo demostraron que tanto el Mol como la Glc representan en conjunto aproximadamente el 30% del potencial osmótico de la hoja [90].

La correlación entre el estrés salino y la acumulación de azúcares es bastante fuerte y los trabajos que tratan este tema representan los informes más numerosos que relacionan un tipo de estrés con la acumulación de polioles. Un par de estudios, realizados con apio expuesto a estrés inducido por NaCl [91] o exceso de macronutrientes [92], establecieron que los cambios en el metabolismo del Mol eran consecuencia tanto de la distribución como de la utilización del carbono. Por ejemplo, en hojas de apio recién desarrolladas expuestas a NaCl 300 mM, el flujo de carbono hacia el Mol se mantuvo a tasas similares a las de los controles, aunque se encontró una disminución del 70% en la asimilación de carbono. El mantenimiento de la síntesis de Mol se hizo a expensas de la Suc, aumentando así 4 veces la relación entre Mol y Suc marcada. Este cambio se asoció a un aumento en la actividad de la Man6PRasa. Sin embargo, este aumento en la actividad no se relacionó con un aumento en el nivel de proteína de la enzima, lo que sugiere una posible modificación postraducciona de la misma [91].

En un trabajo de Zhifang y Loescher [93], se transformaron plantas de *Arabidopsis*, una especie no productora de Mol, con el gen Man6PRasa de hoja de apio bajo el control del promotor 35S. Las plantas transgénicas acumularon Mol en cantidades que iban desde 0,5 a 6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de peso fresco. En ausencia de NaCl, todas las plantas fueron fenotípicamente iguales al tipo salvaje (WT). Sin embargo, en presencia de NaCl, las plantas transgénicas adultas mostraron un alto nivel de tolerancia a la sal, es decir, crecieron, completaron un desarrollo normal, florecieron y produjeron semillas en suelo regado con una solución nutritiva con 300 mM NaCl. Estos resultados demuestran que la introducción del gen que codifica para la Man6PRasa juega un rol importante en la biosíntesis Mol y que, este último, es clave para el desarrollo de plantas

tolerantes a la sal. En otro trabajo del mismo laboratorio [94], se exploró el efecto del estrés por sal sobre el rendimiento del PSII y de los niveles de CO₂ fijados en las plantas de Arabidopsis WT y transformadas. Después de un tratamiento de 12 días con 100 o 200 mM NaCl, el peso fresco total de los brotes, el número de hojas y el área de las hojas fueron significativamente mayores en las transformantes que en las plantas salvajes. En plantas WT tratadas con 100 mM NaCl, el rendimiento del PSII comienza a disminuir después de 6 días, con un detrimento del 50% del rendimiento después de 12 días, lo que indica una severa pérdida en la eficiencia de PSII; mientras que no se observó efecto alguno sobre las transformantes. Bajo niveles atmosféricos de CO₂, el crecimiento con NaCl 200 mM provocó un aumento en los niveles subestomáticos de CO₂ en plantas salvajes, pero no en plantas transgénicas. También causó una marcada disminución en la eficiencia de carboxilación bajo niveles limitantes de CO₂ en plantas WT en comparación con las transformantes. Estos resultados sugieren que el Mol protege la fotosíntesis contra el daño de la sal a los cloroplastos.

En casos de estrés por sequía o salinidad se puede dar una disminución de la apertura estomática de las hojas, lo que conlleva a la producción de radicales libres y al daño asociado con fotoinhibición. En este contexto, existe evidencia de que en hongos y otros organismos los azúcares-alcoholes (como glucitol y Mol) y los polioles cíclicos (como *myo*-inositol) pueden actuar como reclutadores de radicales libres [95, 96]. Por ejemplo, la transformación de plantas de tabaco con una Mol1P deshidrogenasa bacteriana (EC 1.1.1.17), dirigida a los cloroplastos mediante la introducción de un péptido de tránsito, produjo una línea capaz de acumular Mol en los cloroplastos en concentraciones de hasta 100 mM, sin alteración del fenotipo ni de la actividad fotosintética [97]. La presencia de Mol en los cloroplastos resultó en una mayor tolerancia al metilviológeno, un compuesto que produce estrés oxidativo. Es importante destacar que la presencia del poliol no redujo la abundancia de especies reactivas de oxígeno, pero confirió una protección adicional a las ya presentes en plantas no transformadas.

En contraste con la importancia que los azúcares-alcoholes tienen para el metabolismo de los hidratos de carbono y en la resistencia a distintos tipos de estrés en plantas, los estudios realizados en relación a las enzimas del metabolismo del Mol son relativamente escasos.

1.4 Metabolismo de la rafinosa

La Raf es una extensión α -1,6-galactosil de la Suc. El metabolismo de la Raf parece ser universal en las angiospermas, mientras que los oligosacáridos que derivan de la misma (como la estaquiosa, la verbascosa y la ajugosa) se encuentran sólo en determinadas especies vegetales [98]. La Raf se acumula fundamentalmente en las semillas, donde cumple un rol importante en la estabilización de membranas durante el proceso de desecación [99]. Además, en determinadas especies vegetales (por ejemplo en plantas de la familia Cucurbitaceae, a la cual pertenecen el pepino y el melón) la Raf es utilizada para el transporte de carbono hacia los tejidos heterotróficos [100]. También se ha descrito que se acumula frente a determinadas situaciones de estrés abiótico, tales como calor, frío, salinidad y sequía [98, 101–104].

El primer paso en la ruta de síntesis de la Raf consiste en la producción de UDP-galactosa (UDP-Gal), la cual no es específica de esta ruta, pero aporta uno de los sustratos esenciales para la misma (Figura 6). Las plantas tienen dos formas alternativas de producir este nucleótido azúcar [105]. Una posibilidad es a través de una enzima de la vía de Leloir [106], que implica la conversión reversible de UDP-Glc en UDP-Gal por medio de la UDP-Glc 4-epimerasa (EC 5.1.3.2). Alternativamente, la UDP-Gal se puede sintetizar a partir de galactosa-1-fosfato (Gal1P) y UTP, en una reacción catalizada por la UDP-azúcar pirofosforilasa (USPPasa, EC 2.7.7.64) [107]. Las plantas superiores parecen carecer o tener una actividad limitada de la enzima Gal1P uridililtransferasa, la que es crítica de la vía de Leloir [107, 108], lo que sugiere que la USPPasa puede actuar como un mecanismo alternativo para metabolizar la Gal1P, produciendo UDP-Gal para reacciones de glicosilación [105, 109, 110]. Como se detalla en la Figura 6, la vía de síntesis de Raf continúa con la galactinol sintasa (GolSasa, EC 2.4.1.123), que produce galactinol (Gol) a partir de UDP-Gal y *myo*-inositol. La Raf sintasa (RafSasa, EC 2.4.1.82) luego transfiere el residuo galactosilo del Gol a una molécula de Suc preformada [111–118]. La GolSasa cataliza el primer paso comprometido en la síntesis de Raf; por lo tanto, juega un papel crucial en la partición del carbono entre Suc y Raf [119–122].

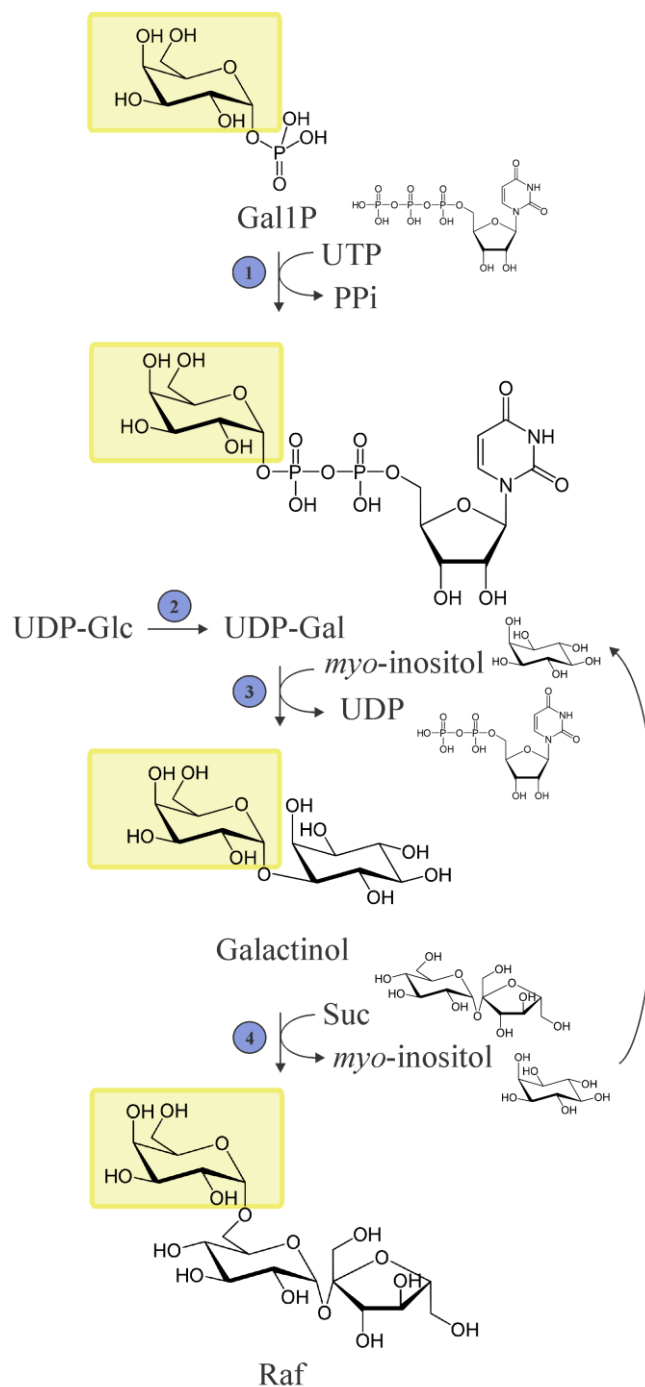


Figura 6: Vía de síntesis de la Raf. (1) USPPasa, (2) UDP-Glc 4-epimerasa, (3) GolSasa y (4) RafSasa. En amarillo se destaca el residuo galactosilo que es transferido entre los diferentes metabolitos.

1.4.1 Sobre la UDP-azúcar pirofosforilasa

La síntesis primaria de UDP-azúcares es catalizada por pirofosforilasas específicas, que utilizan UTP y un azúcar-1P (que puede estar N-acetilado) como sustratos, para formar

pirofosfato inorgánico (PPi) y el UDP-azúcar correspondiente. Esta reacción es reversible [123, 124], dependiente de Mg^{2+} [125–127] y sigue un mecanismo del tipo bi-bi ordenado [124]. En las enzimas de plantas y parásitos eucariotas, primero se une el UTP y luego lo hace el azúcar-1P; a continuación, se libera el PPi y, finalmente, lo hace el UDP-azúcar [128–130]. En comparación con la UDPGlcPPasa, la USPPasa fue recientemente identificada en plantas de arveja y *Arabidopsis* [131–133]. Cabe aclarar que se habían descrito anteriormente ensayos con extractos crudos de plantas donde se detectaban actividades enzimáticas similares a las de la USPPasa, pero que habían sido atribuidas a otras enzimas [134]. Las USPPasas han sido identificadas en la mayoría de las especies de eucariotas fotosintéticos (excluyendo algunas algas), parásitos eucariotas y algunas especies bacterianas, pero no se han reportado en vertebrados [130, 135].

La USPPasa es una proteína de 67-70 kDa [125, 131, 132] y, a diferencia de la UDPGlcPPasa vegetal, es activa como monómero [136]. La USPPasa cataliza la conversión reversible de una amplia gama de azúcares-1P: principalmente Glc1P, Gal1P, ácido glucurónico-1-fosfato (GlcA1P), ácido galacturónico-1-fosfato, L-arabinosa-1-fosfato y xilosa-1-fosfato. Por ejemplo, las USPPasas de *Arabidopsis* y cebada muestran actividad con Gal1P, Glc1P y GlcA1P, entre otros [137, 138]. En la planta modelo *Arabidopsis*, la USPPasa se expresa en diferentes tejidos y etapas de desarrollo, como raíces, cotiledones y tejidos vasculares; siendo su expresión más fuerte en las flores, más específicamente, en el polen en desarrollo [132, 133]. La mutación del gen que codifica para esta enzima hace que no sea posible obtener plantas homocigotas, ya que el polen no se desarrolla de forma adecuada [139]. Estos hallazgos demuestran la importancia de esta enzima (y de la UDP-Gal) para el normal desarrollo de las plantas.

1.4.2 Sobre la galactinol sintasa

La GolSasa es miembro de la familia 8 de glicosiltransferasas (GT8), que incluye varias enzimas involucradas en la biosíntesis de varios conjugados de azúcar [140–142]. Estas enzimas constituyen una gran familia involucrada específicamente en la biosíntesis de oligosacáridos, polisacáridos y glicoconjugados [143], que juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La enzima GolSasa se encuentra sólo en las angiospermas, lo que hace que el mecanismo de síntesis de Gol y los RFO sea un evento metabólico altamente específico de plantas. La GolSasa se describe como una enzima extravacuolar (citosólica) [144]. Esta enzima

fue detectada por primera vez en extractos de semillas maduras de arveja [145] y fue parcialmente purificada de pepino (*Cucumis sativus*) maduro [146]. Las GolSasas de semillas de leguminosas y hojas de cucurbitáceas fueron las primeras en ser caracterizadas bioquímicamente [147]. Recientemente, los genes que codifican para la GolSasa han sido aislados y las enzimas correspondientes caracterizadas cinéticamente a partir de diversas variedades vegetales, incluyendo *Ajuga reptans* [101], *Curcubita pepo* [121], *Phaseolus vulgaris* [113], *Glycine max* [148] y *C. sativus* [149], entre otros. El número de isoformas de GolSasas en las diferentes especies vegetales es variable, como así también lo son sus propiedades físicas y químicas. En los estudios iniciales con *C. pepo*, la GolSasa fue caracterizada como un polipéptido monomérico de 38 a 43 kDa, con actividad óptima en un rango de pH comprendido entre 5,6 y 7,5 y con requisito de un metal divalente, particularmente Mn^{2+} [113, 121].

La creciente evidencia indica que la GolSasa es la enzima clave en la biosíntesis de los RFO, ya que su actividad es la que determina los niveles de acumulación de estos oligosacáridos [114, 121]. De esta forma, es importante para la resistencia al estrés de las plantas, en la translocación de fotosintatos y en la fisiología de la semilla [150]. La expresión del gen que codifica para la GolSasa es regulada mediante tres tipos de factores de transcripción: factores de *shock* térmico (HSF), factor 1A de unión a elementos de respuesta a la deshidratación/factor de unión a elementos de respuesta a frío (DREB1A/CBF3) y factor de transcripción WRKY. Se ha demostrado que los dos primeros están involucrados en el control de la expresión génica de dicha enzima en *Arabidopsis* en condiciones de estrés [103, 151–153], mientras que el tercer factor actúa en la regulación de la expresión de GolSasa y RafSasa en *Boea hygrometrica* [117].

Teniendo en cuenta la importancia de la GolSasa para el metabolismo de la Raf, se sabe relativamente poco sobre las propiedades cinéticas y estructurales de esta enzima. La mayoría de los informes se caracterizan por contener determinaciones cinéticas escasas e incompletas, y todos los trabajos realizados hasta ahora se han utilizado GolSasas de especies de dicotiledóneas [113, 121, 154, 155].

1.4.3 Sobre la rafinosa sintasa

La RafSasa, una Gol-Suc galactosiltransferasa, es una de las enzimas clave en canalizar la Suc hacia la vía biosintética de RFO. Este tipo de enzimas pertenecen a la familia glicosil hidrolasas 36 (GH36) de la superfamilia hidrolasa GH-D. Los análisis de la cinética de estado

estacionario e inhibición por el producto *myo*-inositol determinaron que la síntesis de la Raf procede mediante un mecanismo del tipo ping-pong bi-bi [114, 156]. En el trabajo de Li y colaboradores [157], se propone que la RafSasa primero une e hidroliza el Gol, liberando *myo*-inositol y reteniendo el residuo de Gal, formando un intermediario enzima-residuo glicosilo durante un periodo hasta que: 1) se une a la Suc y se sintetiza Raf; o 2) se libera la Gal, dando lugar a la actividad hidrolítica sobre el Gol. Cuanto más baja sea la concentración de Suc, mayor es la probabilidad de que la RafSasa hidrolice el Gol y, por lo tanto, menor es la oportunidad que tiene de producir Raf. Un rol dual de la RafSasa como glicosiltransferasa con algo de actividad catalítica hidrolasa está en línea con la clasificación de esta enzima como miembro de la familia GH36. Es probable que una familia de enzimas comparta la topología estructural del sitio activo y un mecanismo catalítico común (aunque las homologías de secuencia general pueden ser débiles) [158]. De hecho, se ha demostrado que todas las α -galactosidasas estudiadas hasta ahora, como así también las Stasintinas de la familia GH36, funcionan mediante un mecanismo del tipo ping-pong [114, 159–161]. Se han identificado dos motivos (KxD y RxxxD) conservados en todos los miembros del clan GH-D [162–164]. El Asp conservado en el motivo KxD actúa como un nucleófilo catalítico para generar el intermediario covalente enzima-residuo glicosilo, mientras que el Asp en el motivo RxxxD actúa como ácido-base catalítico [114, 165].

La RafSasa fue purificada por primera vez de semillas de *Vicia faba* [111]. También se obtuvo y caracterizó la enzima de otras especies, tales como pepino [166], arroz [165] y *Arabidopsis* [167]. La RafSasa de *A. reptans* sólo se ha descrito utilizando un extracto crudo de hojas [101] y las características de las enzimas de semillas maduras de arveja y soja (*G. max*) han sido purificadas sólo parcialmente [112, 114]. Se han registrado patentes que involucran genes que codifican para RafSasas [168, 169] y se han depositado varias secuencias en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). En el trabajo de Li y colaboradores [156], se estudiaron *in vitro* las propiedades cinéticas de la RafSasa recombinante de arroz, pudiendo así demostrar el mecanismo de catálisis, tanto en reacciones de hidrólisis de Gol como así también de síntesis de Raf. La RafSasa comparte una alta homología de secuencia con la α -galactosidasa alcalina (EC 3.2.1.22) [170] y, aunque se ha informado sobre la existencia de varios genes que codifican para RafSasas sólo unas pocas de estas enzimas tienen la capacidad de sintetizar Raf *in vitro* o *in vivo* [114, 165, 171–174]. Recientemente [157], el grupo de Li y colaboradores demostró que el gen de maíz *ZmRAFS* mejora la tolerancia a la sequía de las plantas de maíz y de *Arabidopsis* a través de la síntesis Raf o de la hidrólisis de Gol, dependiendo de la disponibilidad

de Suc en las células vegetales. Estos resultados proporcionan nuevas vías para el mejoramiento de la tolerancia al estrés por sequía de las plantas mediante la manipulación de la vía anabólica de la Raf.

1.4.4 Roles de la rafinosa y el galactinol y tolerancia a estrés

Existe gran cantidad de literatura dedicada a la acumulación de RFO debido a estrés. Todas las plantas, en algún momento, sintetizan alguno de los RFO, pero muchas de ellas, como arroz o Arabidopsis, no transportan ni acumulan grandes cantidades de estos oligosacáridos en sus tejidos y órganos [175]. Se ha sugerido que la Raf es importante para la tolerancia de las plantas al estrés osmótico. En el trabajo de Sun y sus colaboradores [176], se sobreexpresó el gen de la GolSasa de *Thellungiella salsuginea* en plantas de Arabidopsis, lo cual incrementó significativamente el contenido de Gol y Raf. Dichas plantas mostraron altas tasas de germinación y crecieron bien bajo estrés osmótico. Por otra parte, se identificaron tres enzimas clave en la síntesis de RFO en sésamo (*Sesamum indicum*): GolSasa, RafSasa y Sta sintasa [177]. Estudios realizados con plantas de sésamo crecidas bajo diferentes condiciones de estrés abiótico sugieren que los genes que codifican para la GolSasa y la RafSasa se encuentran regulados por estrés osmótico, sequía, sal y anegamiento, pero sólo ligeramente afectados por frío. Las plantas crecidas bajo condiciones de estrés osmótico mostraron niveles aumentados de Gol y Raf, mejorando su tolerancia a este tipo de estrés.

Trabajos realizados en diferentes especies vegetales demostraron que la exposición al estrés por frío induce la acumulación compartimentada de la Raf y azúcares relacionados a su metabolismo: Sta y Gal en las vacuolas, Gol en las vacuolas y citosol, y Suc y Raf en vacuolas, citosol y cloroplastos [116, 178]. Cuando se elimina el estrés por frío, los niveles de estos metabolitos disminuyen gradualmente en los compartimentos respectivos. La expresión de tres de los siete genes de GolSasa en Arabidopsis fue inducida por diferentes tipos de estrés abiótico y, curiosamente, sólo *AtGOLS3* fue inducido por frío, pero no por sequía o alta salinidad [102]. Se ha informado que la Raf está presente en los cloroplastos de Arabidopsis [116], donde juega un papel clave en la estabilización del PSII durante los ciclos de congelación-descongelación [178]. En cuanto a la RafSasa, en el trabajo de Egert y colaboradores [172] se caracterizaron mutantes de Arabidopsis que carecían del gen que codifica para la RafSasa 5, demostrando que esta enzima es la responsable de la acumulación de Raf en plantas crecidas bajo estrés por frío entre

otros tipos de estrés abiótico. Saito y Yoshida [179] encontraron que, en arroz, la expresión de dos genes que codifican para la GolSasa y de cuatro genes que codifican para la RafSasa se inducía en condiciones de estrés por frío. También demostraron que el enfriamiento durante un período prolongado aumentó considerablemente el contenido de Gol y Raf. En este estudio se encontró que, bajo condiciones de estrés por frío, los niveles de Raf fueron más altos en las láminas de las hojas que en las vainas. De manera similar, los niveles de Gol y Raf fueron significativamente mayores en frutos de durazno recolectados y tratados con frío [180]. Curiosamente, los niveles de Raf se correlacionaron bien con el grado de resistencia a la harinosidad (síntoma de daño por frío). Además, se han identificado dos genes que codifican la GolSasa en planta de trigo (*Triticum aestivum*), cuya expresión es inducida por frío, pero no por sequía, calor o tratamientos con ABA [181]. Las líneas transgénicas de arroz que sobreexpresan constitutivamente cada uno de estos dos genes acumularon niveles significativamente más altos de Gol y Raf que las plantas de tipo WT y exhibieron una mayor tolerancia al estrés por frío.

La sequía es un factor de estrés ambiental abiótico significativo para las plantas. El agua es el principal recurso limitante para el crecimiento, rendimiento y productividad en vegetales. Las respuestas de las plantas a la sequía a nivel bioquímico generalmente involucran ajuste osmótico, estabilización de estructuras celulares y regulación redox [182]. La sobreexpresión homóloga de la GolSasa 2 en *Arabidopsis* condujo a niveles más altos de Gol y Raf, con una reducción concomitante de la transpiración foliar, lo que resultó en una mayor tolerancia al estrés por sequía [102]. La expresión de esta enzima también mejoró la tolerancia a la sequía y un aumento del rendimiento de granos en dos genotipos diferentes de arroz en condiciones de campo seco. Las líneas transgénicas desarrolladas presentaron niveles más altos de Gol que el control no transgénico. El mayor rendimiento de granos de arroz transgénico en condiciones de sequía se relacionó con un mayor número de panículas, fertilidad del grano y biomasa. En este caso, la tolerancia modificada a la sequía se asoció con un mayor contenido relativo de agua en las hojas, mayor actividad de fotosíntesis, menor reducción del crecimiento de las plantas y una capacidad de recuperación más rápida [183].

Por otra parte, se observó que hay al menos tres isoformas de GolSasa relacionadas con estrés abiótico en la especie vegetal *Coffea arabica* [184]. Las tres isoformas son reguladas diferencialmente a nivel de ARNm en hojas de plantas de café sometidas a déficit hídrico. CaGolS1 fue la única isoforma altamente regulada durante todo el período de déficit hídrico y también después de la rehidratación, mientras que CaGolS2 y CaGolS3 se expresaron

significativamente sólo bajo déficit hídrico severo. En este estudio, los niveles de estaquiosa (Sta) en hojas de café eran mucho más altos que los niveles de Raf después del tratamiento de déficit de agua. Este efecto se acentuó aún más en condiciones de estrés severo, lo cual podría indicar que la Sta probablemente desempeña una función importante como protector contra posibles daños causados por estrés por sequía en comparación con la Raf. En el trabajo de Qiu y colaboradores [185], se demostró que las plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el gen que codifica para una GolSasa (*GmGolS2-1*) de soja resultaban tener en una menor pérdida relativa de electrolitos, niveles reducidos de malondialdehído (marcador de estrés oxidativo) y un mayor contenido de carbohidratos solubles y prolina que las plantas de tabaco de tipo salvaje bajo condiciones de estrés por sequía. Finalmente, el grupo de investigación de Li y colaboradores [157] determinó que las plantas de maíz mutantes en el gen de la RafSasa carecían por completo de Raf y acumulaban Gol, siendo más sensibles al estrés por sequía que las plantas control. Esto indicó que la enzima RafSasa y su producto Raf contribuyen a la tolerancia de las plantas al estrés por sequía respecto al control. Aún más, las plantas de *Arabidopsis* sobreexpresantes del gen de la RafSasa de maíz incrementaron de manera significativa su tolerancia a la sequía.

El metabolismo de Raf también se ha relacionado con la alta salinidad. Se ha sugerido que los osmolitos como la Raf podrían facilitar la retención de agua en el citosol y permitir la captura de Na^+ en la vacuola o el apoplasto, contribuyendo al proceso de compartimentación de la sal durante el estrés salino [184]. El perfil de expresión de ARNm de los tres genes que codifican para la GolSasa de *C. arabica* en plantas sometidas a estrés salino muestra que las isoformas se inducen diferencialmente dependiendo de las condiciones de estrés abiótico, como se informó para *Arabidopsis* [102]. Los altos niveles de transcritos de los genes de GolSasa y la acumulación extremadamente elevada de Raf detectada en las hojas de café sometidas a salinidad indican que este RFO podría tener un papel importante aumentando la tolerancia de las plantas a este tipo de estrés. Cabe mencionar que plantas de *Arabidopsis* transgénicas sobreexpresantes de GolSasa de *Thellungiella salsuginea* no solo muestran una mejor tolerancia al estrés osmótico, sino también al estrés por alta salinidad. En comparación con las plantas de tipo salvaje, las *Arabidopsis* transgénicas exhibieron una mayor tasa de germinación, capacidad de fotosíntesis y crecimiento de plántulas bajo estrés salino [176].

Las especies reactivas del oxígeno son esenciales para diversos procesos fisiológicos vegetales y son continuamente producidos durante la respiración mitocondrial y la fotosíntesis.

Sin embargo, la exposición a estrés ambiental, como sequía, frío, calor y alta irradiación de luz, da lugar a un aumento excesivo de las concentraciones de especies reactivas del oxígeno, que son entonces asociadas con el daño oxidativo a nivel celular [186]. Existe evidencia acumulada que sugiere que los RFO cumplen funciones importantes en la protección contra el estrés oxidativo en plantas y semillas [186–188]. De hecho, las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresaban las *GolSasa* de garbanzo (*Cicer arietinum*, *CaGolS1* y *CaGolS2*) mostraron un aumento significativo de los niveles de *Gol* y *Raf* y crecieron mejor que las plantas control cuando fueron expuestas al calor y al estrés oxidativo. La tolerancia mejorada de estas líneas transgénicas se asoció con una menor acumulación de especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica [189].

1.4.5 Sobre *Brachypodium distachyon*

B. distachyon es una planta pequeña y con un ciclo de vida corto que pertenece a la subfamilia Pooideae de la familia Poaceae. De igual manera que arroz, trigo y cebada, *B. distachyon* utiliza la vía fotosintética C_3 [190, 191]. Además, tiene muchos atributos que se ajustan a las características de una planta modelo. Como *Arabidopsis*, *B. distachyon* tiene un genoma diploide pequeño (~310 Mb), es de baja estatura, tiene un ciclo de vida rápido, se autopoliniza y sus requisitos de crecimiento son simples [192]. Su área de distribución natural incluye la Cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio, el suroeste de Asia y el noreste de África [193–195]. Como resultado del proceso de naturalización, las poblaciones de esta especie también se encuentran en América del Norte y del Sur, Australia y Europa Occidental [194]. *B. distachyon* se encuentra estrechamente relacionado, en términos evolutivos, con numerosos cereales económicamente importantes como trigo, cebada, centeno, avena y pastos forrajeros, tales como *Lolium* y *Festuca* [190, 196–199]; lo que lo convierte en un excelente modelo vegetal para comprender la biología genética, molecular y evolutiva de los pastos de zonas templadas, cereales y cultivos empleados para biocombustibles como el pasto varilla.

Se han desarrollado herramientas y recursos para *B. distachyon*, como por ejemplo la secuencia completa del genoma, una colección de ecotipos naturales, un mapa genético de alta densidad, bibliotecas genómicas y de ADNc, una colección de etiquetas de secuencia expresada (EST en inglés), *microarrays*, marcadores de repetición de secuencia simple (SSR en inglés), protocolos de regeneración *in vitro* y mutagénesis por T-ADN [195, 196, 200, 201]. Como

modelo de gramíneas, *B. distachyon* se ha utilizado en estudios biológicos relacionados con el crecimiento de las raíces [202], la tolerancia al estrés [203, 204], la acumulación de proteínas de almacenamiento en semillas [205–207], el *turnover* de ácidos grasos [208], interacciones planta-patógeno [209, 210] y la composición de la pared celular [211]. Además, es una especie vegetal susceptible a la manipulación y transformación *in vitro*. Teniendo en cuenta todos estos aspectos, *B. distachyon* es un modelo generalmente útil para explorar la biología de las monocotiledóneas [212].

Además, varios trabajos de investigación abordan los efectos desencadenados por diferentes tipos de condiciones de estrés abiótico (como salinidad, sequía, frío y calor) en esta especie vegetal, aunque la mayoría de ellos se centran en las consecuencias a nivel de la transcripción de genes [113, 203, 213, 214]. Resulta interesante destacar que *B. distachyon* produce Gol y Raf cuando se expone al frío y a la sequía [199, 215, 216]. Por lo tanto, esta especie resulta un buen candidato para realizar estudios relacionados con el metabolismo de la Raf.

En este trabajo de Tesis se presenta el estudio de diferentes rutas metabólicas y de las enzimas involucradas en las mismas. La combinación de datos estructurales y bioquímicos nos permitió establecer relaciones estructura-función, en el contexto de los escenarios evolutivos y metabólicos donde estas enzimas participan. Además, se obtuvo información relevante para el diseño y producción de nuevas enzimas con actividades catalíticas que permiten expandir el espectro de moléculas con aplicaciones únicas y diferentes. Estas últimas serán de utilidad para resolver problemas específicos en distintos procesos de biorrefinería, relacionados con la valorización de desechos bio-industriales y con la generación de moléculas que permitan a futuro el procesamiento y la producción de polímeros de aplicaciones múltiples.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

El presente trabajo de Tesis se centra en el estudio de las enzimas que intervienen en la síntesis y degradación del Mol y la Raf en plantas. De esta forma, se pretende mejorar nuestra comprensión sobre los mecanismos moleculares que regulan dichas rutas metabólicas.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Estudio del metabolismo del manitol en plantas de apio

Se estudiará el metabolismo del Mol en plantas de apio, ya que esta especie presenta ciertas características apropiadas para su uso: es una planta pequeña, fácil de manipular y se conocen las secuencias de los genes que codifican para algunas enzimas del metabolismo del Mol, por ejemplo, la Man6PRasa y la MoldHasa. Se analizarán los efectos del fotoperiodo y de condiciones de estrés abiótico sobre la partición del carbono, con el objeto de generar cambios en los niveles de Mol. Se tomarán muestras a intervalos regulares de tiempo y se analizarán los niveles de transcriptos, proteínas, actividades enzimáticas y metabolitos. Además, se investigará la existencia de mecanismos de modificación postraduccional en las enzimas que intervienen en la síntesis y degradación del Mol. También se caracterizarán las enzimas involucradas en el metabolismo del Mol, para lo cual se clonarán los genes que codifican para la Man6PRasa y la MoldHasa de apio y se expresarán las proteínas recombinantes. Dichas enzimas serán purificadas y caracterizadas cinética y estructuralmente. Esto permitirá realizar un estudio comparativo con las enzimas que intervienen en la síntesis del glucitol y así evaluar su utilidad para valorizar compuestos de desecho mediante procesos de biorrefinerías.

2.2.2 Estudio de la ruta de síntesis de la rafinosa en *B. distachyon*

Para estudiar la ruta de síntesis de Raf en *B. distachyon* se obtendrán en forma recombinante las enzimas clave de esta vía: la USPPasa, la GolSasa y la RafSasa; a fin de caracterizarlas estructural y cinéticamente. Más específicamente, se propone la obtención de

enzimas con alta eficiencia catalítica para la aplicación específica al agregado de valor, recuperación y aprovechamiento de sub-productos mediante procesos de biorrefinerías

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, Merck, Perkin Elmer, Amersham Bioscience.

Genes y oligonucleótidos sintéticos: Bio Basic Inc.

3.2 Vectores

pUC57 (GenScript). Vector de clonado para sistemas bacterianos de *E. coli* derivado del plásmido pUC19. Este plásmido confiere a la célula resistencia al antibiótico ampicilina.

pET28 (c+) (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 isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, un análogo a la lactosa) y 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.

pGEM-T Easy (Promega). Vector de clonado abierto que contiene una timina (T) en el extremo 3', la cual es compatible con los fragmentos de DNA amplificados por PCR que poseen extremos con adenina (A) en 3'.

3.3 Cepas bacterianas y antibióticos

Escherichia coli Top10 F' (Invitrogen). F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK* λ - *rpsL*(Str^R) *endA1 nupG*. Cepa empleada durante las etapas de biología molecular para generar las construcciones de expresión.*

Escherichia coli BL21 (DE3) (Invitrogen). F⁻ *ompT hsdS_B* (*r_B⁻, m_B⁻*) *gal dcm* (DE3). Cepa empleada para la expresión recombinante de todas las enzimas caracterizadas en este trabajo.

Kanamicina. Concentración final 50 μ g/ml.

Ampicilina. Concentración final 100 μ g/ml.

3.4 Medios de cultivo

Luria Bertani (LB). Extracto de levadura 5 g/l, tripteína 10 g/l y NaCl 5 g/l.

LB-agar. Medio LB suplementado con agar-agar 1,6% (p/v).

3.5 Material vegetal

Se crecieron plantas de apio (*Apium graveolens*) en las cámaras de cultivo del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET-UNL, Santa Fe) con una intensidad lumínica de 100 μ mol m⁻² s⁻¹, temperatura de 23 °C y humedad relativa del 70%. Se cosecharon las hojas y se congelaron inmediatamente con N₂ líquido y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

3.6 Obtención de genes sintéticos

Los genes codificantes de la Man6PRasa y la MolDHasa de apio y la USPPasa, la GolSasa y la RafSasa de *B. distachyon* se obtuvieron por síntesis *de novo* (Bio Basic, Canadá). Los codones fueron optimizados para su expresión en *E. coli*, con la adición de los sitios de restricción *NdeI* y *SacI* en los extremos 5' y 3', respectivamente, y se insertaron en el vector pUC57.

3.7 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 1, donde se remarcan las secuencias que determinan los sitios de las enzimas de restricción indicadas (en cursiva) o los nucleótidos que producen mutaciones (en negrita y subrayado).

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Las secuencias en itálica corresponden a los sitios de restricción de cada oligonucleótido. En negrita y subrayado se detallan las bases que producen mutaciones en el gen blanco.

Oligonucleótido	Secuencia	Mutación
AgrMan6PRasa-Fw (<i>NheI</i>)	<i>CATATGGCAATAACTCTTAACAGCGG</i>	-
AgrMan6PRasa-Rv (<i>BamHI</i>)	<i>GGATCCTCAAGCATAAACATCTATTC</i>	-
M6PRwt-K48A-Fw	GCTGCTGACTAC <u>GCG</u> AATGAGTTAGAAG	K48A
M6PRwt-K48A-Rv	CTTCTAACTCATT <u>GCG</u> TAGTCAGCAGC	K48A
MolDHasa-D214S-Fw	CAGGTTACCGTTATT <u>TCT</u> TATCTCTGAATCTAAACG	D214S
MolDHasa-D214S-Rv	CGTTTAGATTCAGAGATA <u>GAA</u> AATAACGGTAACCTG	D214S
MolDHasa-D214S-I215T-Fw	GGTACCGTTATTTCTA <u>C</u> CTCTGAATCTAAACG	I215T
MolDHasa-D214S-I215T-Rv	CGTTTAGATTCAGAG <u>G</u> TAGAAATAACGGTAACC	I215T
MolDHasa-S343N-Fw	GGAACGTCTGGTTAAA <u>AA</u> TGATGTTTCGTTACCG	S343N
MolDHasa-S343N-Rv	CGGTAACGAACATCA <u>TT</u> TTTAACCAGACGTTCC	S343N

3.8 Extracción de ARN y RT-PCR para obtención del gen que codifica para la Man6PRasa

Se llevó a cabo la extracción de ARN total a partir de hojas de apio utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) y siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El ADN copia fue sintetizado a 42 °C por 1 h en un volumen de reacción de 15 µl conteniendo 1600 ng de ARN total, dNTPs 1 mM, 80 pmol oligo(dT) y 40 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega).

Para amplificar el gen codificante de la Man6PRasa de hojas de apio, utilizamos los oligonucleótidos específicos AgrMan6PRasa-Fw y AgrMan6PRasa-Rv (Tabla 1), basados en las secuencias descritas por Everard [53] y Khalil [217]. Las reacciones se realizaron con 2 µl de la mezcla de reacción de RT, dNTPs 2 mM; oligonucleótidos 0,1 mM; 5 µl *buffer Pfu* 10 X y 2,5 U de *Pfu* ADN polimerasa (PBL), en un volumen final de 50 µl. El programa utilizado fue el siguiente:

1 ciclo de desnaturalización a 95 °C, 5 min

30 ciclos de: (i) desnaturalización a 95 °C, 1 min

(ii) hibridación a 50 °C, 1 min

(iii) elongación a 68 °C, 2 min

1 ciclo de elongación a 68 °C, 10 min

Las reacciones se realizaron en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad), los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y se visualizaron en un transiluminador de LED azules.

3.9 Electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1% (p/v) en *buffer* 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). Se utilizó el sistema Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad) para la corrida propiamente dicha y la visualización del fragmento de ADN se realizó a través del transiluminador *UltraSlim Led illuminator* (MestroGen).

3.10 Clonado

Los productos amplificados por PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y la banda de interés se escindió del gel y se purificó con las herramientas comerciales *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) y *EasyPure Quick Gel Extraction Kit* (TransGen Biotech). Las muestras purificadas se ligaron al vector de clonado pGEM-T Easy (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.11 Mutagénesis sitio-dirigida

Para introducir las mutaciones deseadas en los genes se utilizó la técnica de *QuikChange* (Agilent). La misma consistió en la utilización de un par de oligonucleótidos que son complementarios entre sí y que, además, tienen en sus centros la región portadora de la mutación. Mediante la técnica de PCR se extendieron ambas cadenas del ADN molde (plásmido). Las reacciones se realizaron con 50 ng de ADN, dNTPs 2 mM; oligonucleótidos 125

ng; 5 μ l *buffer Pfu* 10 X y 2,5 U de *Pfu* ADN polimerasa (PBL), en un volumen final de 50 μ l. El programa básico utilizado fue el siguiente:

- 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C, 5 min
- 16 ciclos de: (i) desnaturalización a 95 °C, 1 min
- (ii) hibridación a 55 °C, 1 min
- (iii) elongación a 68 °C, 1 min/500 pb

Las reacciones se realizaron en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Luego, el templado se removió por digestión con la enzima de restricción *DpnI* y el ADN sintetizado en la reacción de PCR se utilizó para transformar células de *E. coli* TOP10. La confirmación de la identidad de los clones que contenían la mutación se realizó mediante secuenciación automática.

3.12 Transformación de células de *E. coli* competentes

Las bacterias se cultivaron hasta saturación en medio LB durante toda la noche a 37 °C. Luego se realizó una dilución 1/100 en medio LB fresco y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,6. Se tomaron alícuotas de 1 ml y se separaron las células por centrifugación a 2.500 x g durante 5 min y a temperatura ambiente. Luego se resuspendieron en 500 μ l de ST1 (MOPS-NaOH 10 mM; KCl 10 mM; pH 7,0). Se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones que el paso anterior y se resuspendieron en 500 μ l de ST2 (MOPS-NaOH 100 mM; KCl 10 mM; CaCl₂ 50 mM; pH 6,5). Se incubaron 15 min en hielo y se separaron las células mediante una nueva centrifugación. Finalmente, se resuspendieron en 100 μ l de ST2. A estas células competentes se le adicionaron 2 μ l de ADN plasmídico (o 5 μ l de la reacción de ligación). La mezcla se incubó en hielo durante 1 h y luego se realizó el tratamiento térmico: 45 s a 42 °C. Las células fueron enfriadas en hielo durante 2 min, diluidas en 1 ml de LB-Glc e incubadas 1 h a 37 °C. Luego, las bacterias se centrifugaron 6 min a 2.500 x g y se resuspendieron en 100 μ l de medio LB, para posteriormente sembrarlas en placas de Petri conteniendo medio LB-agar con el antibiótico correspondiente, según la construcción plasmídica con la que se haya transformado. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C.

3.13 Minipreparación de ADN plasmídico

Las células de *E. coli* transformadas se repicaron en medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente y se cultivaron a 37 °C durante toda la noche. Las células se colectaron por centrifugación y se extrajo el ADN plasmídico utilizando las herramientas comerciales *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) y *EasyPure Plasmid MiniPrep Kit* (TransGen Biotech). La obtención del ADN plasmídico se corroboró por electroforesis en gel de agarosa.

3.14 Secuenciación de ADN

Los plásmidos seleccionados 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 ng/μl, se envió a la empresa MacroGen (Corea del Sur) 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.

3.15 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 contenían 1-2 μg de ADN plasmídico, el *buffer* de reacción correspondiente que provee el fabricante y de 10 a 20 U de la enzima de restricción; y se incubaron 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.

3.16 Ligación de fragmentos de ADN

Las ligaciones se realizaron utilizando la enzima T4 ADN ligasa (PBL), siguiendo las indicaciones del proveedor. En el caso de la ligación del producto de PCR amplificado al vector de clonado pGEM-T Easy, se empleó una mezcla inserto:vector en una relación molar de 3:1 con el agregado de 2 U de ligasa en el *buffer* provisto por el fabricante. La mezcla de reacción se dejó toda la noche a 4 °C y, posteriormente, se utilizó para transformar células competentes. Asimismo, para las reacciones que implicaron la ligación de los diferentes genes a los vectores de expresión seleccionados, se empleó una mezcla inserto:vector en una relación molar 5:1, la que fue previamente calentada 5 min a 65 °C y, *a posteriori*, se agregaron 2 U de ligasa en el *buffer* provisto por el fabricante, en un volumen final de 20 µl. Las ligaciones se incubaron toda la noche a 16 °C y luego se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli*.

3.17 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Se crecieron células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con las construcciones mencionadas en la Tabla 1, en medio LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina hasta saturación. Luego se centrifugó el cultivo a temperatura ambiente y se resuspendieron las células en 1 ml de medio LB fresco, para luego inocular 1 l de medio de cultivo LB suplementado con kanamicina. Se crecieron las células a 37 °C y 200 rpm en agitador orbital hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600 nm de ~0,6, momento en el cual se indujo la expresión de la proteína de interés mediante el agregado de IPTG 0,5 mM. Las células se cultivaron toda la noche a 21 °C y 200 rpm y luego se cosecharon centrifugando a 4 °C durante 15 min a 5.000 x g.

Las células se resuspendieron en *buffer* A [Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, glicerol 5% (v/v) e imidazol 10 mM] y se lisaron por ultrasonido. Se centrifugó a 16.000 x g durante 20 min a 4 °C hasta obtener un sobrenadante limpio de partículas en suspensión. La fracción soluble se sembró en una columna HisTrap HP de 1 ml (GE Healthcare) previamente equilibrada con *buffer* A. La elución de la proteína retenida se realizó con un gradiente de imidazol de 10-300 mM en *buffer* A. Las fracciones que contenían actividad enzimática se reunieron y concentraron utilizando un dispositivo de ultrafiltración (Millipore, límite de corte 5-30 kDa) a 4 °C. En el caso de la GolSasa, se llevó a cabo un paso adicional de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular. El *pool* obtenido luego de la purificación

mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) se cargó en una columna HiLoad 16/600 Superdex 200 *pg* (GE Healthcare), previamente equilibrada con *buffer* G [HEPES-NaOH 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM]. Nuevamente, las fracciones que contenían actividad enzimática se reunieron y concentraron.

Las soluciones que contenían las proteínas purificadas se suplementaron con glicerol al 5% (v/v), se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. En estas condiciones, las enzimas permanecieron estables y activas durante, al menos, 6 meses.

3.18 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 [218]. La concentración de acrilamida del gel de apilamiento fue de 4%, mientras que la concentración del gel de separación fue variada entre 10% y 12%, 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 omitió la presencia de β -ME. Como marcadores de masa molecular se empleó BLUeye Prestained Protein Ladder (Sigma). Este es un set de marcadores preteñidos listos para utilizar, el cual consiste en 12 proteínas de masas moleculares 11, 17, 20, 25, 35, 48, 63, 75, 100, 135, 180 y 245 kDa. La corrida electroforética se realizó a 30 mA constantes durante 1 h. Luego, se visualizaron las proteínas en el gel por tinción con *Coomassie Brilliant Blue* R-250 en una solución de metanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). La posterior decoloración se llevó a cabo en una solución de metanol 5% (v/v) y ácido acético 7,5% (v/v).

3.19 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) con un límite de corte apropiado para cada proteína (de 5 a 30 kDa) y se procedió según las indicaciones del fabricante.

3.20 Cuantificación del contenido proteico

Para determinar la concentración de las proteínas totales presentes en las muestras se utilizó la técnica de Bradford [219], utilizando como patrón una solución de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas UV/visible Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific).

3.21 Cromatografía de filtración por geles: determinación de la masa molecular

Para determinar la masa molecular al estado nativo de las proteínas bajo estudio, se utilizó una columna *Superdex 200 10/300* (GE Healthcare) conectada a un equipo ÄKTA Explorer 100 (GE Healthcare). Las cromatografías se realizaron a 0,5 ml/min en *buffer G* [HEPES-NaOH 50 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; EDTA 0,1 mM]. La columna se calibró utilizando las siguientes proteínas: ribonucleasa (13,7 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), conalbúmina (75 kDa), aldolasa (158 kDa), ferritina (440 kDa) y tiroglobulina (669 kDa), contenidas en el *kit* comercial *Gel Filtration Calibration Kit - High Molecular Weight* (GE Healthcare). El V_0 de la columna se determinó empleando una solución de Azul de Dextrano (Promega). La curva de calibrado se realizó graficando el K_{av} en función del log de la MM de los marcadores comerciales. El K_{av} se obtiene a partir de la siguiente ecuación: $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_c - V_0)$; donde V_e es el volumen de elusión de la proteína de interés, V_0 es el volumen muerto y V_c es el volumen de la columna.

3.22 Ensayos de actividad enzimática

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para producir/consumir 1 μmol de producto/sustrato en 1 min bajo las condiciones especificadas para cada ensayo. En todas las experiencias en donde se haya seguido la oxidación/reducción de NAD(P)H/NAD(P)⁺ a 340 nm, se empleó el coeficiente de extinción molar de 6,22 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para determinar la variación de la forma reducida de la coenzima en el medio. A no ser que se especifique lo contrario, los ensayos fueron realizados a 25 °C en un volumen final de 50 μl utilizando un lector de microplacas UV/visible Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific) y cantidades adecuadas de las respectivas muestras.

Las medidas de actividad de la Man6P_Rasa en el sentido de reducción de la Man6P se realizaron en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NADPH 0,3 mM, DTT 1 mM, Man6P 30 mM y una dilución adecuada de la enzima.

Las medidas de actividad de la MolD_Hasa en el sentido de oxidación del Mol se realizaron en Tris-HCl 25 mM pH 9,0, Mol 200 mM, NAD⁺ 5 mM y una dilución adecuada de la enzima.

La actividad de la USPP_a se evaluó utilizando el método colorimétrico de alta sensibilidad desarrollado por nuestro grupo de trabajo [220], el cual se basa en la cuantificación del ortofosfato inorgánico (Pi) liberado de la hidrólisis específica de un de los productos de la actividad de la enzima. Específicamente, durante la síntesis de UDP-Gal a partir de UTP y el azúcar-1P (por ejemplo, Gal1P) se libera PPi, el cual es hidrolizado a Pi por una pirofosfatasa inorgánica. El Pi es luego cuantificado mediante la formación de un complejo de fosfomolibdato-Verde de Malaquita, el cual presenta color verde y es detectado a 630 nm. El medio de reacción estándar contenía MOPS-NaOH 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, UTP 1 mM, Gal1P 2 mM, 0,2 mg ml⁻¹ BSA, 0,025 U de pirofosfatasa inorgánica de levadura (EC 3.6.1.1) y una dilución adecuada de la enzima. Las reacciones se incubaron durante 10 min a 37 °C y se terminaron con la adición del reactivo de color, el cual se prepara en medio ácido.

La actividad de la Gol_Sasa se determinó en la dirección de la síntesis de Gol, utilizando un método cinético acoplado a piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa [221]. Este procedimiento sigue a la generación de UDP midiendo la desaparición de NADH. La mezcla de ensayo estándar contenía HEPES-NaOH 50 mM pH 7,0, MgCl₂ 10 mM, PEP 0,5 mM, NADH 0,3 mM, UDP-Gal 1 mM, *myo*-inositol 20 mM, 1 U de piruvato quinasa (EC 2.7.1.40), 1 U de lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27), BSA 0,2 mg ml⁻¹ y enzima en una dilución adecuada. La reacción se incubó a 30 °C.

Las medidas de actividad de la Raf_Sasa en el sentido de síntesis de Raf se llevaron a cabo en HEPES-NaOH 100 mM pH 7,0, Gol 2 mM, Suc 25 mM, NAD⁺ 5 mM, 2 U de *myo*-inositol deshidrogenasa de *Bacillus subtilis* (EC 1.1.1.18, Megazyme) y enzima en una dilución adecuada. La reacción se incubó a 30 °C. La actividad de la Raf_Sasa en el sentido de hidrólisis se evaluó empleando el método de Somogyi-Nelson [222, 223], para el cual se realizó una curva de calibrado con Gal. La mezcla de reacción contenía HEPES-NaOH 100 mM pH 7,0, 40 mM Gol y enzima en una dilución adecuada. Eventualmente, el Gol fue reemplazado por Raf o Sta. Para evaluar la actividad hidrolasa sobre maltosa (Mal) y melibiosa (Mel), dado que son azúcares

reductores, se utilizó el método específico de la Glc oxidasa, utilizando un *kit* comercial (Glicemia Enzimática, Wiener Lab).

3.23 Determinación de los parámetros cinéticos

Los datos de actividad enzimática se graficaron en función de la concentración de sustrato o efector utilizando el programa Origin 8.1 (OriginLab). Para calcular las constantes cinéticas, los datos experimentales se ajustaron a la ecuación de Hill modificada: $v = V_{\max} [S]^{n_H} / (S_{0,5}^{n_H} + [S]^{n_H})$; donde $S_{0,5}$ es la concentración de sustrato ($[S]$) que produce el 50% de la velocidad máxima (V_{\max}), y n_H es el coeficiente de Hill [224]. En el caso de que una enzima presente un comportamiento hiperbólico (n_H igual a 1), la ecuación de Hill modificada se convierte en la ecuación de velocidad descrita por Briggs-Haldane, conocida como de Michaelis-Menten, en la cual el $S_{0,5}$ es equivalente a la K_m . Los valores de k_{cat} se calcularon utilizando la V_{\max} expresada en U mg^{-1} y considerando la masa molecular teórica de cada una de las enzimas. Los valores de las constantes cinéticas son el resultado de al menos dos determinaciones, con una variación menor al 10%. Los valores de las mismas se expresan \pm su error estándar, calculado por el programa informático a partir del ajuste de a los datos experimentales a la ecuación utilizada.

3.24 Estudios de óxido-reducción

Para analizar el efecto de la diamida, el H_2O_2 , el ditioneitol (DTT) y el glutatión oxidado y reducido (GSSG y GSH, respectivamente) sobre la actividad de la GolSasa recombinante, se incubó la enzima con concentraciones crecientes de los compuestos oxidantes o reductores durante 15 min a 30 °C con HEPES-NaOH 50 mM pH 7,0. Para eliminar el exceso de compuestos oxidantes, la GolSasa se desaló por ultrafiltración a 10.000 x g y a 4 °C, utilizando un dispositivo Vivaspin 500 (Sartorius). Para evaluar la reversibilidad del proceso, se incubó la enzima oxidada con DTT, GSH o Trx de *E. coli* (*EcoTrx*). La enzima *EcoTrx* se expresó y purificó como se describió anteriormente [65]. Las reacciones se incubaron durante 15 min a 30 °C con HEPES-NaOH 50 mM pH 7,0. Se tomaron alícuotas a intervalos de tiempo regulares y se ensayó su actividad en condiciones estándar (ver arriba). En paralelo, se procesó un control donde la muestra fue tratada de la misma manera, pero sin el agregado del agente oxidante.

Antes y después de procesar la muestra se realizó la medida del contenido proteico, para corregir cualquier variación que ocurra en el proceso de desalado. Con estos valores, se calcularon los respectivos de actividad específica antes y después de la ultrafiltración. La actividad de la enzima se relativizó respecto al valor inicial de actividad y al valor correspondiente al control y se graficó la actividad enzimática normalizada en función de la concentración de reductor.

3.25 Ensayos de desplazamiento térmico

Para analizar el efecto de la unión de los sustratos a la Man6PRasa se utilizó el método descrito por Huynh y Partch [225]. Los ensayos se realizaron con 0,15 mg ml⁻¹ de proteína, *Sypro Orange* 4X (Sigma), HEPES-NaOH 25 mM pH 7,0, concentraciones variables de Man6P (5, 15 y 30 mM) y concentraciones variables de NADP⁺ y NADPH (0,03 y 0,3 mM), en un volumen final de 20 µl en placas de PCR de 96 pocillos (Applied Biosystems). Se utilizaron dos controles diferentes, uno sin proteína ni ligando (compuesto de *buffer*, agua y colorante) y otro sin proteína (compuesto por ligando, *buffer*, agua y colorante). Las microplacas se sellaron con sellos adhesivos *Microseal 'B'* (Bio-Rad) y se calentaron en un equipo StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) de 25 a 95 °C, en incrementos de 0,2 °C (los cambios en la fluorescencia se midieron simultáneamente), ajustado para ROX como colorante de referencia.

3.26 Modelado molecular

Se construyó el modelo 3D de la MolDHasa utilizando como molde las estructuras cristalinas de sinapil alcohol deshidrogenasa en complejo con NADP⁺ de la especie *Populus tremuloides* (1YQD, [227]) publicada en el servidor Protein Data Bank (www.rcsb.org) con la que la proteína a modelar presentó mayor identidad de secuencia (mayor al 70%). Se realizaron 100 modelos con el programa Modeller 9v2.

Debido a que no se encontraron estructuras cristalinas con suficiente identidad de secuencia para ser utilizadas como molde, la estructura 3D de GolSasa se modeló empleando el servidor I-TASSER. Este servidor consiste en una plataforma integrada para la predicción automatizada de la estructura y función de las proteínas basada en el paradigma de secuencia a estructura a función (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). La función de la proteína se infiere luego haciendo coincidir estructuralmente los modelos 3D con otras proteínas

conocidas [228–231]. En base a las predicciones del I-TASSER, se generaron cinco modelos diferentes de las estructuras de las enzimas en estudio y finalmente se seleccionó un modelo para cada una en función de la calidad general.

Luego, usamos el servidor Verify 3D (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/Verify3D/>) [232] para evaluar la calidad de los modelos obtenidos para la MolDHasa por modelado por homología y para la GolSasa por *fold recognition*. Además, empleando el servidor web 3DLigandSite se logró predecir los posibles sitios de unión de ligandos para ambas enzimas (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dligandsite/>) [233].

3.27 Ensayos de cristalización

Para llevar a cabo los ensayos de cristalización, se purificó la Man6PRasa primero por IMAC y luego por cromatografía de exclusión molecular. Los cristales de la Man6PRasa se obtuvieron por primera vez utilizando el método de difusión de vapor de gota sentada a 20 °C. El ensayo inicial se realizó utilizando los *kits* de *screening* de matriz dispersa Cryo 1+2, Crystal screening 1+2, PEG/Ion, Index, MCSG-1, MCSG-T2, Wizard 1+2 y Wizard 3+4 (Hampton Research), en placas de cristalización de 96 pocillos CrystalQuick (Greiner Bio-One). En total se analizaron 768 condiciones independientes. Se obtuvieron cristales en varias condiciones, siendo la mejor la que contenía formiato de amonio 0,2 M (pH 6,6) y PEG 3500 al 20% (p/v), para las gotas que constaban de 0,5 µl de proteína 10 mg ml⁻¹ y 0,5 µl de solución del reservorio. La condición de cristalización inicial fue optimizada empleando el método de difusión de vapor de gota sentada a 20 °C y adicionando los metabolitos Man6P y NADP⁺. Se dejaron crecer los cristales por dos semanas y para difractarlos se empaparon en una solución crioprotectora que contenía glicerol 20% (v/v) durante unos minutos antes de congelarlos en nitrógeno líquido. Los datos de difracción de rayos X se recopilaron en la línea de luz SBC19-ID de la fuente de fotones avanzada en el Argonne National Laboratory (Chicago, IL, USA). Los datos obtenidos fueron utilizados para realizar el *phasing*, la construcción del modelo y su posterior refinamiento.

3.28 Cromatografía en capa delgada

Se empleó la técnica de cromatografía en capa delgada para el análisis de la composición de carbohidratos en el medio de reacción de la RafSasa [234, 235]. Como soporte se usaron

placas TLC Silica gel F₂₅₄ (Merck) y para la fase móvil se utilizó butanol:ácido acético:agua en una relación 5:3:1. Para el revelado, la mejor detección se dio con Orcinol 0,25% en solución de ácido sulfúrico al 5% en etanol y secando con aire caliente hasta la aparición de color.

3.29 Ensayos con plantas de apio

Se crecieron plantas de apio bajo 4 condiciones diferentes: fotoperiodo de día largo, fotoperiodo de día normal, fotoperiodo de día corto y estrés por frío. Las condiciones de luz/oscuridad, intensidad lumínica, temperatura y humedad relativa de cada ensayo se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Condiciones de crecimiento de las plantas de apio en los diferentes ensayos.

Ensayo	Luz/oscuridad (h)	Intensidad lumínica ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Humedad relativa (%)
Fotoperiodo día largo	16/8	100	23	70
Fotoperiodo día normal	12/12	100	23	70
Fotoperiodo día corto	8/16	100	23	70
Estrés por frío	16/8	100	10	70

En los ensayos de diferentes fotoperiodos e intensidad lumínica, las plantas fueron crecidas durante las primeras 6 semanas en una cámara de cultivo del Instituto y los últimos 7 días se pasaron a una cámara climática de menor tamaño y condiciones de cultivo estrictamente controladas (FitoClima 600, ARALAB, Portugal). Luego de 50 días desde la siembra, se cosechó la cuarta hoja de las plantas de apio, 3 a 5 réplicas biológicas, cada 2 h durante un ciclo completo de luz/oscuridad. Las muestras se congelaron de forma inmediata en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su uso.

El ensayo de estrés por frío se llevó a cabo de la siguiente manera: las plantas se crecieron las primeras 4 semanas en la cámara de cultivo del Instituto, luego se pasaron a dos cámaras climáticas bajo idénticas condiciones (16 h de luz y 8 h de oscuridad, 23°C) durante 7 días más para aclimatación de las mismas. La muestra a tiempo cero se tomó en igualdad de condiciones e inmediatamente se cambió la temperatura de una de las cámaras FitoClima 600 a 10°C , manteniendo la otra a 23°C como control. A partir de este momento, se cosechó la cuarta hoja de las plantas de apio (por 6 réplicas biológicas), a mitad del fotoperiodo (8 h desde el inicio

del mismo) durante 7 días consecutivos. Todas las muestras se congelaron de forma inmediata en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

3.30 Cuantificación de azúcares solubles y almidón

La extracción de azúcares solubles a partir de las muestras recolectadas de plantas de apio se realizó siguiendo el protocolo descrito por Stitt [236]. Este consiste en una extracción etanólica que permite separar en el sobrenadante los azúcares solubles a cuantificar y en el precipitado el almidón. En el primer caso, se dispensa el sobrenadante obtenido de cada muestra en una microplaca que contenga la mezcla de reacción (HEPES-KOH 100 mM pH 7,0; MgCl₂ 3 mM y ATP 3 mM) y la enzima Glc6PDHase, y se mide la absorbancia a 340 nm. Una vez que la absorbancia se estabilizó, se adicionan de manera sucesiva las enzimas hexoquinasa, fosfoglucoisomerasa e invertasa, esperando entre cada una que la absorbancia a 340 nm sea constante. La diferencia entre las absorbancias de cada intervalo constante nos permite calcular el contenido de Glc, Fru y Suc, respectivamente. Para cuantificar el almidón en el precipitado obtenido de la extracción etanólica, primero hay que digerirlo. Esto se hace mediante una reacción catalizada por las enzimas amiloglucosidasa y α -amilasa, incubando las muestras a 37 °C toda la noche. De esta manera se obtiene Glc, la cual puede ser cuantificada en una microplaca que contenga la misma mezcla de reacción que se describió más arriba para la determinación de azúcares solubles.

3.31 Determinación de clorofilas

A partir de los extractos utilizados para el análisis de azúcares solubles también se pudieron determinar los niveles de clorofilas a y b, realizando medidas a 645 y 665 nm. Para calcular los niveles de clorofilas, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g } \mu\text{l totales de extracto}^{-1}) = 5,48 \times A_{665} - 2,16 \times A_{645}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g } \mu\text{l totales de extracto}^{-1}) = 9,67 \times A_{645} - 3,04 \times A_{665}$$

3.32 Medida de contenido proteico y niveles de aminoácidos

El contenido proteico en cada muestra se determinó mediante el método de Bradford [219]. Por otro lado, se empleó el método de la fluorescamina [237] para la detección de los niveles de aminoácidos. Este se basa en la fluorescencia producida por la reacción de la fluorescamina con aminoácidos liberados por hidrólisis del enlace amida peptídico. La mezcla de reacción contiene fluorescamina 0,1 % en acetonitrilo, *buffer* borato de sodio 0,1 M pH 8,0 y extracto etanólico. Se debe hacer una curva de calibrado en las mismas condiciones de la mezcla de reacción, empleando como estándar glutamato en 70 % (v/v) etanol a diferentes concentraciones. Luego de incubar 5 min a temperatura ambiente, se midió la fluorescencia de las muestras (excitación a 405 nm, emisión 485 nm) en fluorímetro Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific) y utilizando placa negra FluoroNunc F96 MicroWell (Thermo Scientific).

3.33 Medidas de niveles de fotosíntesis y de eficiencia cuántica máxima del PSII

Durante el ensayo de estrés por frío se llevaron a cabo las medidas de los niveles de fotosíntesis y de la relación F_v/F_m (Fluorescencia variable/Fluorescencia máxima). Esta relación es una estimación de la eficiencia cuántica máxima de la actividad fotoquímica del PSII cuando todos los centros de reacción del mismo están abiertos [238]. Una disminución en la relación F_v/F_m indica una reducción en la eficiencia fotoquímica del PSII, por lo que este parámetro puede ser empleado para detectar perturbaciones en el sistema fotosintético causadas por el estrés abiótico [239, 240]. Para poder llevar a cabo esta experiencia se utilizó el sistema portátil de fotosíntesis LI-6400XT (LI-COR, Inc), el cual permite realizar mediciones de intercambio de gases y fluorescencia de clorofila. Estas mediciones son en tiempo real con control basado en las condiciones ambientales a nivel de la hoja. La determinación se realizó sobre la cuarta hoja de las plantas de apio (10 réplicas biológicas por cada condición: control y estrés por frío), a mitad del fotoperiodo (8 h desde el inicio del mismo), en igualdad de condiciones (día cero) e inmediatamente se cambió la temperatura de una de las cámaras FitoClima 600 a 10 °C, manteniendo la otra a 23 °C como control. A partir de este momento se repitieron las medidas a los 2, 4 y 6 días.

4 RESULTADOS

4.1 Estudio de las enzimas del metabolismo del manitol en planta de apio

4.1.1 Caracterización cinética y estructural de la Man6PRasa

La Man6PRasa es la enzima clave en la vía de síntesis del Mol en hojas de apio. Esta enzima pertenece a la familia 2 de las AKR, su conformación estructural es un dímero y su actividad catalítica es dependiente de NADPH [40, 55, 56]. Para comenzar el estudio de la Man6PRasa, obtuvimos la secuencia codificante por síntesis *de novo*, la cual fue subclonada en el vector de expresión. La enzima recombinante purificada mostró una actividad (en el sentido de reducción de la Man6P a Mol1P) de $0,001 \text{ U mg}^{-1}$, un valor considerablemente más bajo que el informado para otros miembros de la familia 2 de las AKR [58, 59]. El análisis de la enzima recombinante por SDS-PAGE y cromatografía de exclusión molecular (*Superdex 200*) mostró que la enzima se encuentra en su estado nativo como un monómero de $\sim 40 \text{ kDa}$, mientras que la bibliografía informa que la estructura cuaternaria de la Man6PRasa de apio es un dímero [40, 53].

A partir de estos resultados, se realizó una nueva búsqueda de secuencias que codifiquen para la Man6PRasa de apio en la base de datos del NCBI, mediante el algoritmo BLAST, utilizando como *query* la secuencia utilizada para la síntesis *de novo* [53]. De esta forma encontramos la secuencia informada por Khalil [217], la cual difiere en 3 bases respecto de la primera (Figura Suplementaria 1). Dichos cambios resultan en el reemplazo de 3 aminoácidos, los cuales se ubican hacia el dominio C-terminal de la secuencia proteica (Figura Suplementaria 2). Este es un dato relevante, debido a que en el trabajo de Figueroa e Iglesias [58] se expresó y purificó la enzima aldosa-6-fosfato reductasa (Ald6PRasa) de hojas de manzano (una proteína dimérica y que pertenece al grupo 2 de la familia de las AKR) con el *His-tag* en el C-terminal, lo cual resultó en una disminución importante de la actividad catalítica. Dichos autores demostraron que la unión entre las dos subunidades que componen la enzima funcional se da entre los dominios C-terminales de cada una y, por lo tanto, el *His-tag* ubicado en dicha posición impide la adecuada interacción entre subunidades, la cual es determinante para la formación del dímero y de la actividad catalítica de la enzima. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que la secuencia que codifica para la Man6PRasa de apio descrita por Everard y colaboradores [53] y empleada

por nosotros para la síntesis *de novo*, no es correcta, lo que explicaría la conformación monomérica obtenida para la misma y la falta de actividad enzimática.

A partir de esto, se amplificó la secuencia que codifica para la Man6PRasa a partir de ARN total. Dicha secuencia comprende un marco abierto de lectura de 927 pares de bases (pb) (Material Suplementario, Secuencia 1.1), codifica para una proteína putativa de 309 aminoácidos (Material Suplementario, Secuencia 1.2) con un pI teórico de 6,40 y una masa estimada de 35,2 kDa, similar a la descrita para la Man6PRasa de apio y para otras reductasas de la familia 2 de AKR de plantas [58, 59].

Esta secuencia se subclonó en el vector de expresión, se produjo de forma recombinante y se purificó por IMAC. El análisis por SDS-PAGE de la proteína purificada mostró una banda mayoritaria de ~37 kDa, mientras que la proteína nativa eluyó de la columna de exclusión molecular como una proteína de 65 kDa (Figura 7). Por lo tanto, se puede concluir que la Man6PRasa de hojas de apio recombinante tiene una estructura cuaternaria que resulta ser un homodímero. Este resultado es acorde a lo publicado con anterioridad para la enzima purificada de fuente [40, 53], y a los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de trabajo para las Ald6PRasas recombinantes de manzano [58] y de durazno [59]. A continuación, se determinaron los parámetros cinéticos de la Man6PRasa en el sentido de reducción de la Man6P (sentido fisiológico), siendo la V_{\max} de 3,5 U mg⁻¹ y los $S_{0,5}$ de 4,4 mM y 0,026 mM para la Man6P y el NADPH, respectivamente (Tabla 4). Estos valores son similares a los reportados para esta misma enzima purificada de fuente y para las otras AKR de plantas antes mencionadas [53, 58, 59] (Tabla Suplementaria 1).

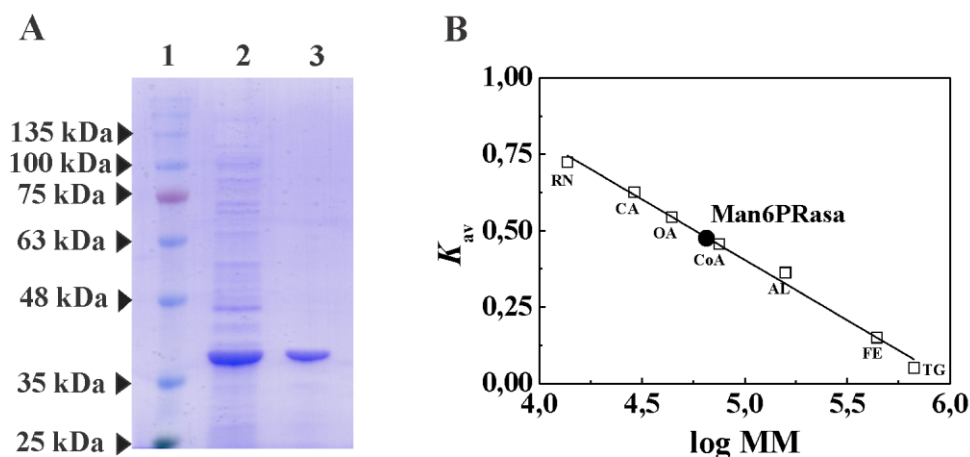


Figura 7: Análisis de la Man6PRasa mediante SDS-PAGE y cromatografía de filtración por gel. **(A)** SDS-PAGE reductor al 12%. Calle 1, marcadores de masa molecular; calle 2, fracción soluble de células recombinantes que expresan Man6PRasa (extracto crudo); calle 3, Man6PRasa (~1 μ g) purificada por IMAC. **(B)** Cromatografía de filtración en gel. Gráfico de K_{av} versus log (masa molecular). (\square) Proteínas patrones de masa molecular: RN (ribonucleasa, 13,7 kDa), CA (anhidrasa carbónica, 29 kDa), OA (ovoalbúmina, 44 kDa), CoA (conalbúmina, 75 kDa), AL (aldolasa, 158 kDa), FE (ferritina, 440 kDa) y TG (tiroglobulina, 669 kDa); (\bullet) Man6PRasa.

4.1.2 Ensayos de cristalización y obtención de la estructura de la Man6PRasa

Se llevaron a cabo ensayos de cristalización de la Man6PRasa de apio por el método de difusión por vapor de gota sentada. Se obtuvieron cristales en diferentes condiciones independientes, pero los cristales con mejor morfología y tamaño para su análisis se obtuvieron con una gota de 6 μ l de Man6PRasa 10 mg ml⁻¹; *buffer* Tris-HCl 20 mM pH 8,0; Man6P 30 mM y NADP⁺ 0,3 mM; y 6 μ l de solución del reservorio compuesta por formiato de amonio 0,2 M pH 6,6 y PEG 3500 al 20% (p/v). Los cristales difractaron con una resolución de 1,73 Å y los datos recopilados fueron utilizados para realizar el *phasing*, la construcción del modelo y su posterior refinamiento. Finalmente se obtuvo la estructura resuelta de la Man6PRasa de apio, siendo ésta la primera reductasa de plantas perteneciente a la familia 2 de las AKR en ser cristalizada. Los parámetros cristalográficos se presentan en la Tabla 3. La enzima cristalizó en el grupo espacial monoclinico C 1 2 1 y se encontraron cuatro cadenas polipeptídicas (2 moléculas diméricas) en la unidad asimétrica.

Tabla 3: Parámetros del cristal de la Man6PRasa de apio.

Parámetro	Valor
Resolución	1,73 Å
R-libre	20,62%
R-trabajo	17,93%
Grupo espacial	C 1 2 1
Longitudes de la celda	α : 152,202 Å β : 61,779 Å γ : 148,063 Å
Ángulos de la celda	a: 90 ° b: 107,671 ° c: 90 °

Como se muestra en la Figura 8, la estructura cuaternaria de la Man6PRasa es dimérica y ambas subunidades hacen contacto mediante los dominios C-terminales de cada una. Si bien el cristal se produjo en presencia de los ligandos Man6P y NADP⁺, el modelo final se obtuvo en complejo con NADP⁺ y ácido manónico, observándose un sitio activo por cada subunidad. La Man6PRasa presenta el plegamiento general (β/α)₈ de barril TIM (triosa-P isomerasa), interrumpido por dos bucles que conectan la hebra β y la hélice α en las repeticiones 4 y 7 (Figura 9A). El motivo N-terminal de la proteína (hebras β 1 y 2) forma una horquilla β que cubre el fondo de la estructura de barril (Figura 9B). El sitio activo de la Man6PRasa se encuentra en una cavidad profunda dentro del barril (β/α)₈ y es definido por una tétrada de residuos catalíticos: Asp⁴², Tyr⁴⁷, Lys⁷⁶ e His¹⁰⁷ [56, 241] (Figura 9C), que se encuentran conservados tanto en secuencia como en estructura en la mayoría de las AKR [242]. Es relevante notar que la posición general del sitio activo se mantiene en todas las proteínas que presentan la conformación (β/α)₈ de barril TIM, un tipo de plegamiento que se cree que se estableció como altamente conservado y bastante general para las enzimas [243]. Cada subunidad de la Man6PRasa muestra tres bucles flexibles (Figura 9D), los que están implicados en la determinación de la especificidad por el sustrato en otras AKR [242, 244, 245]. Las longitudes y posiciones en la secuencia de estos bucles pueden variar entre las AKR de otras familias.

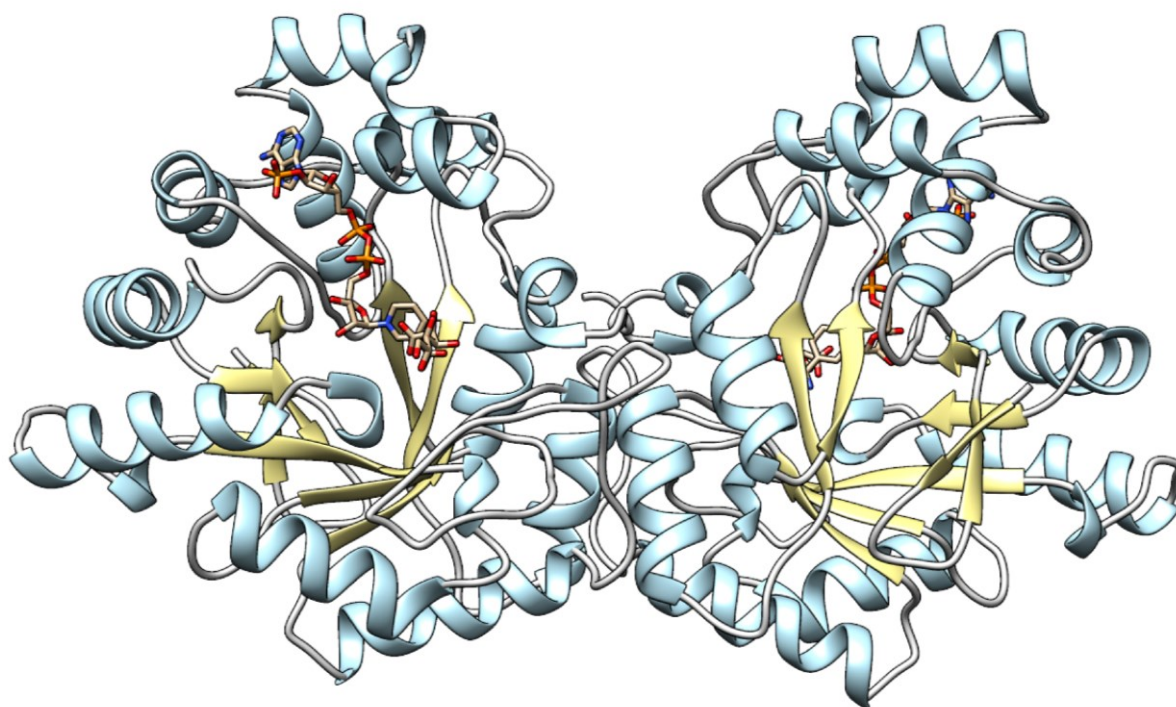


Figura 8: Estructura cristalina dimérica de la Man6PRasa en complejo con NADP⁺ y ácido manónico.

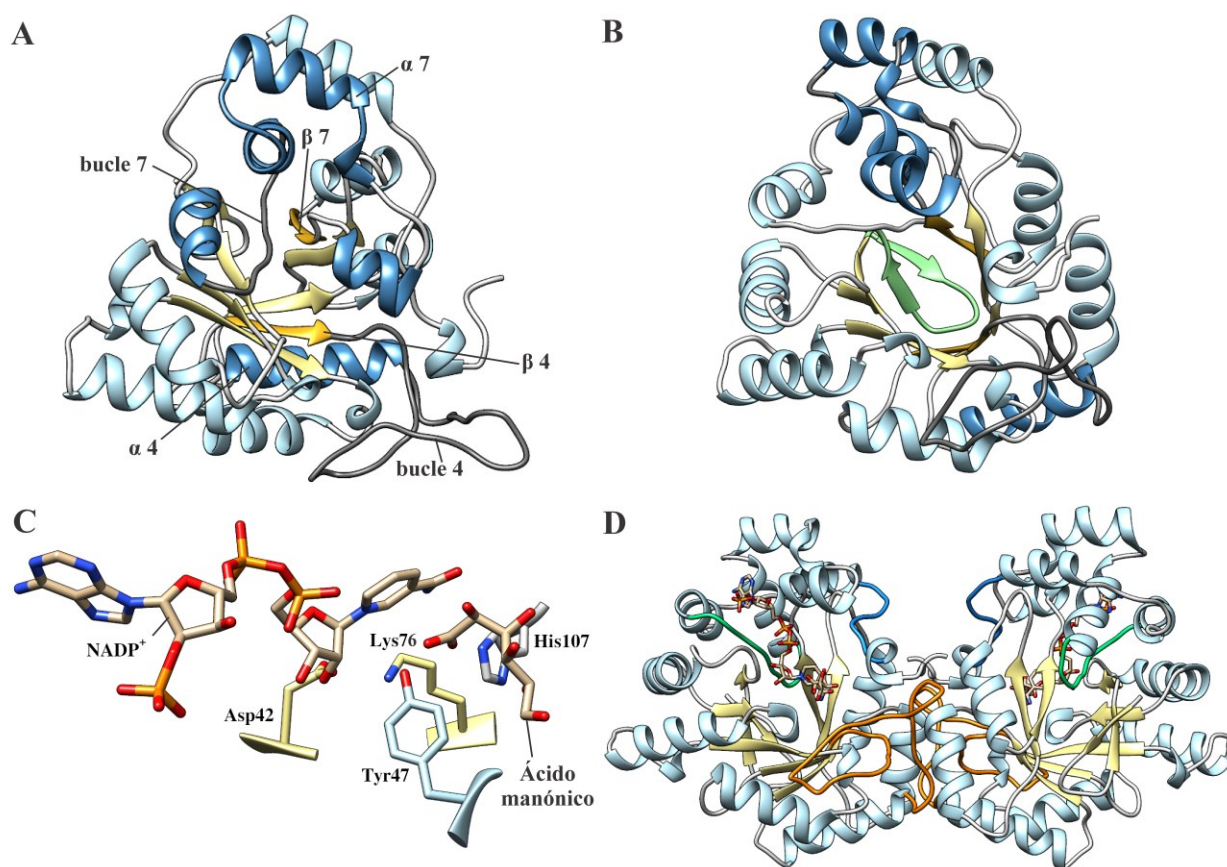


Figura 9: (A) Monómero de la Man6PRasa con plegamiento $(\beta/\alpha)_8$ de barril TIM. Las repeticiones 4 y 7 y los bucles que las interrumpen se encuentran resaltados en colores más oscuros. (B) Hebras β 1 y 2 en el extremo N-terminal formando la estructura de horquilla (verde) en el fondo de la estructura de barril. (C) Tétrada de aminoácidos que conforman el sitio activo y que se encuentra conservada en las AKR. (D) Bucles flexibles 4 (naranja), 7 (verde) y C-terminal (azul), que determinan la especificidad por el sustrato azúcar en las AKR.

En cuanto a los residuos que componen el sitio activo de las AKR, se ha sugerido por estudios previos [246–248] que el grupo hidroxilo de la Tyr⁴⁷ es el candidato más probable para proporcionar asistencia catalítica ácida para la reducción del grupo carbonilo del sustrato. En cuanto a la Lys⁷⁶, estudios realizados en la xilosa reductasa de *Candida tenuis* [56, 249] han demostrado su importancia al establecer que el $-\text{NH}_3^+$ de su cadena lateral facilita la reducción del grupo carbonilo por el NAD(P)H unido. Esto lo hace mediante estabilización electrostática del estado de transición de la enzima. En líneas generales, este aminoácido contribuye a un sitio activo polar pre-organizado, el cual mantiene una carga global neutra, para facilitar las interacciones productivas de reactivos no cargados y el grupo catalítico ácido en la enzima. Varios autores han utilizado la mutagénesis sitio-dirigida para analizar la implicancia de la His¹⁰⁷

en el sitio activo [56, 246–248]. La retención de actividad, baja pero medible, en mutantes de esta His por Asn, Gln, Glu o Ala sugiere una función auxiliar para este residuo en el mecanismo catalítico de las AKR. Tratando de conciliar la evidencia obtenida por estos autores en un mecanismo unificado para la His¹⁰⁷ (que sería coherente con el patrón de conservación de este residuo), se propuso que la His tiene un rol preponderante en el posicionamiento del grupo carbonilo del sustrato para la catálisis [56]. Finalmente, se ha determinado que el Trp¹⁹ está implicado en la unión selectiva de la aldosa. La relación estructura-función propuesta para el Trp¹⁹ puede ser de importancia general porque las enzimas de las familias 1 a 5 de las AKR que prefieren los aldehídos suelen tener un residuo de Trp en una posición homóloga a la del Trp¹⁹. Por el contrario, las AKR que prefieren las cetonas a menudo tienen residuos de Tyr o Phe, aunque también pueden ser otros aminoácidos, en la misma posición que el Trp¹⁹.

4.1.3 Análisis de la estabilidad de los ligandos utilizados en los ensayos de cristalización de la Man6PRasa

Teniendo en cuenta que la estructura cristalina de la Man6PRasa contiene ácido manónico en lugar de Man6P (el ligando incorporado en los ensayos de cristalización), se diseñaron diferentes experimentos para evaluar la estabilidad de los sustratos en las condiciones de cristalización. Para esto, se reprodujo tal medio en cuanto a pH, temperatura y concentraciones de Man6P y NADP⁺. Alternativamente, se realizaron pruebas con Man y NADPH, ensayando las diferentes combinaciones posibles entre azúcares y cofactores. Para examinar la estabilidad de los diferentes sustratos, se tomaron alícuotas de las reacciones a diferentes tiempos (al inicio del ensayo, 1 hora, 1 día y 1 semana luego de comenzar el ensayo) y se midieron en cada punto las concentraciones de Pi y NADPH. En la Figura 10A se puede observar el aumento de los niveles de Pi en las reacciones que contenían Man6P, lo que muestra que el grupo fosfato se hidroliza del azúcar y se libera al medio durante el experimento. También se puede notar el aumento de Pi en las reacciones que contenían Man y NADP⁺/NADPH, lo cual sugiere la hidrólisis del grupo fosfato de los cofactores. Como se puede notar en la Figura 10B, los niveles de NADPH disminuyen considerablemente una hora luego de iniciada la reacción en presencia de Man6PRasa, tanto con Man6P como con Man, indicando que la enzima también puede utilizar el azúcar no fosforilado como sustrato. Una semana después, los niveles de NADPH son muy bajos, indicando oxidación completa de este compuesto. Finalmente, en la

reacción correspondiente a los sustratos Man y NADP^+ en presencia de la enzima se observa al tiempo de 1 día un aumento del contenido de NADPH. En estas condiciones la Man se oxida a ácido manónico con la consecuente reducción del NADP^+ a NADPH, el que luego de un tiempo se oxida nuevamente.

En consecuencia, a partir de los resultados presentados hasta el momento, proponemos que el ácido manónico presente en la estructura cristalina de la Man6PRasa proviene de la Man6P, la cual pierde el grupo fosfato por hidrólisis espontánea y luego, la Man resultante experimenta un proceso de oxidación mediado por la Man6PRasa en el tiempo que toma el ensayo de cristalización.

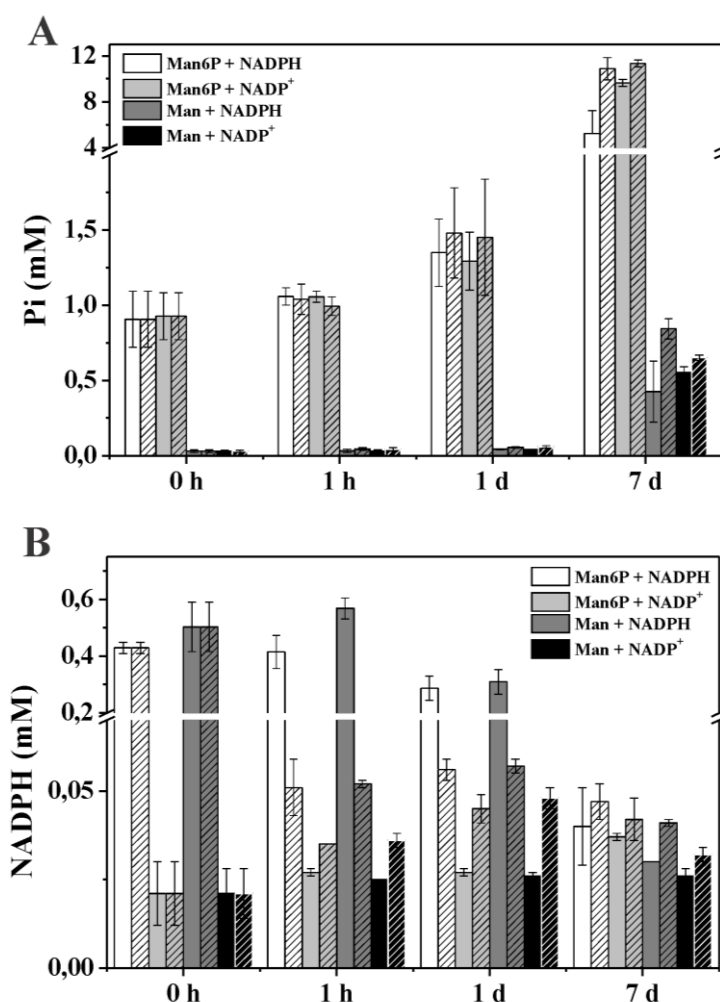


Figura 10: Análisis de la estabilidad de los ligandos utilizados en los ensayos de cristalización de la Man6PRasa. Medidas de los niveles de Pi (A) y de NADPH (B). Las reacciones se incubaron a diferentes tiempos con Man6P 50 mM y NADPH 0,5 mM (blanco), Man6P 50 mM y NADP^+ 0,5 mM (gris claro), Man 50 mM y NADPH 0,5 mM

(gris oscuro), y Man 50 mM y NADP⁺ 0,5 mM (negro), en presencia (barras rayadas) y ausencia (barras lisas) de Man6PRasa (5 mg/ml).

4.1.4 Ensayos de desplazamiento térmico

Se decidió evaluar si los ligandos utilizados en los ensayos de cristalización afectaban de alguna forma la estabilidad de la Man6PRasa. Para esto realizamos ensayos de desplazamiento térmico (*thermal shift assay*), técnica se utiliza para determinar los cambios en la temperatura de desnaturalización (temperatura de *melting*) de proteínas bajo diferentes condiciones. El método más común para medir estos cambios térmicos es la fluorimetría de barrido diferencial (*differential scanning flourometry*), que utiliza fluoróforos específicos que brindan alta sensibilidad. De esta forma se puede investigar la estabilización de proteínas inducida por ligandos, lo cual ayuda a aumentar la probabilidad de cristalización de muestras biológicas [250].

Se llevaron a cabo ensayos de desplazamiento térmico con el colorante SYPRO Orange para determinar la temperatura de *melting* de la Man6PRasa en ausencia y presencia de diferentes sustratos. Los resultados se presentan en la Figura 11. La Man6PRasa presenta una temperatura de *melting* basal de 50 °C, la cual se mantiene al estar en presencia de 5 mM de Man6P, pero que disminuye 0,5 y 2,5 °C cuando la concentración de dicho metabolito aumenta a 15 y 30 mM, respectivamente. En cuanto al efecto del cofactor NADPH sobre la estabilidad de la enzima, se puede observar que a una concentración de 0,03 mM (cerca al valor de $S_{0,5}$, ver Tabla 4) la temperatura de *melting* aumenta 5 °C, mientras que a 0,3 mM aumenta aún más, llegando a 58,8 °C. El mismo efecto presenta el NADP⁺, pero en menor medida, produciendo un incremento de 2 y 6 °C a concentraciones de 0,03 y 0,3 mM, respectivamente. Cuando la Man6PRasa se encuentra en presencia de NADP⁺ y Man6P, el aumento de la temperatura de desnaturalización es más bajo que en el caso en el que se encuentra sólo el cofactor.

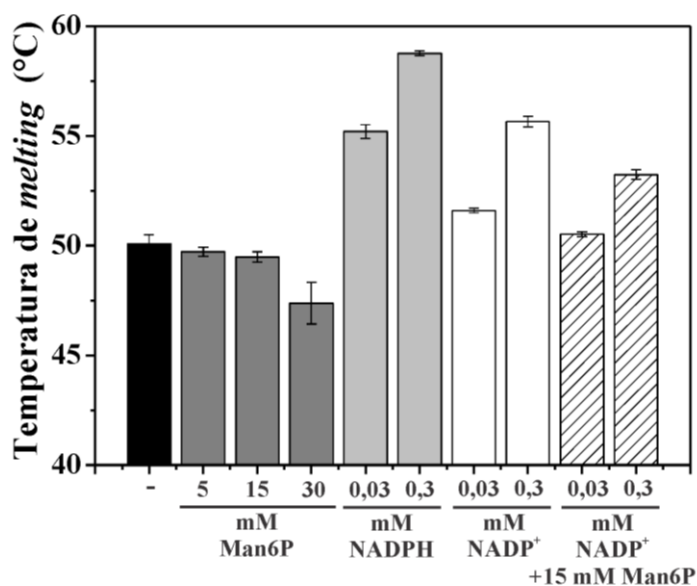


Figura 11: Ensayo de desplazamiento térmico. Se analizó la influencia de diferentes concentraciones de los sustratos fisiológicos (Man6P y NADPH) y del NADP⁺ sobre la temperatura de *melting* de la Man6PRasa.

4.1.5 Obtención y caracterización cinética y estructural de la mutante K48A

Con el objetivo de determinar qué residuos estarían implicados en la unión del grupo fosfato de la Man6P, se analizó detalladamente la estructura resuelta de la Man6PRasa. Para esto, se seleccionaron los aminoácidos que se encontraban a menos de 5 Å del C6 del ácido manónico, donde hipotéticamente se ubicaría el fosfato de la Man6P, los cuales resultaron ser: Trp¹⁹, Tyr⁴⁷, Lys⁴⁸, His¹⁰⁷, Phe¹⁰⁸ y Asn²⁹⁷ (Figura 12). Luego, se realizó un alineamiento de la secuencia proteica de la Man6PRasa con las secuencias de otras aldosas reductasas que utilizan como sustrato azúcares-P (Ald6PRasas de *M. domestica* y *P. persica*) y azúcares no fosforilados (xilosa reductasa de *C. tenuis* y aldosa reductasa de *Homo sapiens*; Figura 13). De esta forma se comprobó que los residuos Trp¹⁹, Tyr⁴⁷, His¹⁰⁷ y Phe¹⁰⁸ se encuentran conservados en todas las enzimas, mientras que el residuo Asn²⁹⁷ sólo está presente en la Man6PRasa. Por el contrario, la Lys⁴⁸ se encontró en las secuencias de reductasas que unen azúcares-P, pero no en las otras dos (xilosa reductasa y aldosa reductasa). Por esta razón, se seleccionó este residuo para llevar a cabo la mutación K48A y así estudiar su relevancia en la unión al azúcar-P.

Para ello se empleó la técnica de *QuikChange*, como se describe en el apartado 3.11 de Materiales y Métodos. Se confirmó la inserción de la mutación mediante secuenciación y se procedió a la obtención de la enzima mutante de forma recombinante. Concluida la purificación, se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto crudo y de las eluciones que se obtuvieron luego de la purificación, obteniendo una banda mayoritaria de ~35 kDa. Se determinó una masa molecular de 64 kDa por cromatografía de exclusión molecular, confirmando que mantiene la estructura cuaternaria homodimérica.

Seguidamente se realizó la caracterización cinética de la Man6PRasa mutada. En la Tabla 4 se presentan los parámetros obtenidos, en comparación con los de la enzima salvaje. En la Figura 14 se presentan gráficamente los resultados obtenidos en la Tabla 4. Ambas proteínas fueron caracterizadas con Man6P, Man y Glc6P, para evaluar la especificidad por el sustrato. Tanto la enzima salvaje como la mutante pudieron utilizar los 3 tipos de azúcares. La enzima cataliza las reacciones con Man y Glc6P con eficiencias similares entre sí, pero bastante menores (2 órdenes de magnitud) que para la Man6P (Figura 14D). Como puede apreciarse de la Tabla 4 y de la Figura 14A y C, la afinidad de la Man6PRasa-K48A por la Man se mantiene en ~145 mM, pero la V_{\max} es mayor con Man que con Man6P. Además, la eficiencia catalítica es 4 veces mayor con Man y 2 órdenes de magnitud menor con Man6P que para la Man6PRasa (Figura 14D). La eficiencia catalítica del NADPH en presencia de Man es un orden de magnitud más grande para la mutante K48A que para la enzima salvaje, mientras que las eficiencias catalíticas del cofactor con los azúcares-P presentan un detrimento de un orden de magnitud al hacer esta misma comparación (Figura 14E). Cabe destacar que la Man6PRasa-K48A emplea con la misma eficiencia el cofactor NADPH en presencia de los azúcares Man6P y Man.

Tabla 4: Caracterización cinética de la Man6PRasa y la mutante K48A. Las reacciones se llevaron a cabo a pH 7,5 y en presencia de 3 mM de DTT. Para calcular la eficiencia catalítica, se utilizó la masa molecular teórica de la Man6PRasa unida a la etiqueta de histidinas (77,2 kDa).

Enzima	Sustrato	$S_{0,5}$ (mM)	V_{max} (U mg ⁻¹)	Ef. Cat. (M ⁻¹ s ⁻¹)
Man6PRasa	Man6P	4,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1	1,0 x 10 ³
	NADPH _(Man6P)	0,026 ± 0,002		1,7 x 10 ⁵
	Man	145 ± 68	0,17 ± 0,03	1,5
	NADPH _(Man)	0,14 ± 0,01		1,6 x 10 ³
	Glc6P	12,3 ± 1,8	0,073 ± 0,009	7,6
	NADPH _(Glc6P)	0,020 ± 0,001		4,7 x 10 ³
Man6PRasa-K48A	Man6P	16,3 ± 2,5	0,68 ± 0,18	53,3
	NADPH _(Man6P)	0,029 ± 0,002		3,1 x 10 ⁴
	Man	147 ± 15	0,76 ± 0,03	6,7
	NADPH _(Man)	0,042 ± 0,003		2,4 x 10 ⁴
	Glc6P	14,9 ± 2,5	0,017 ± 0,001	1,5
	NADPH _(Glc6P)	0,058 ± 0,006		3,8 x 10 ²

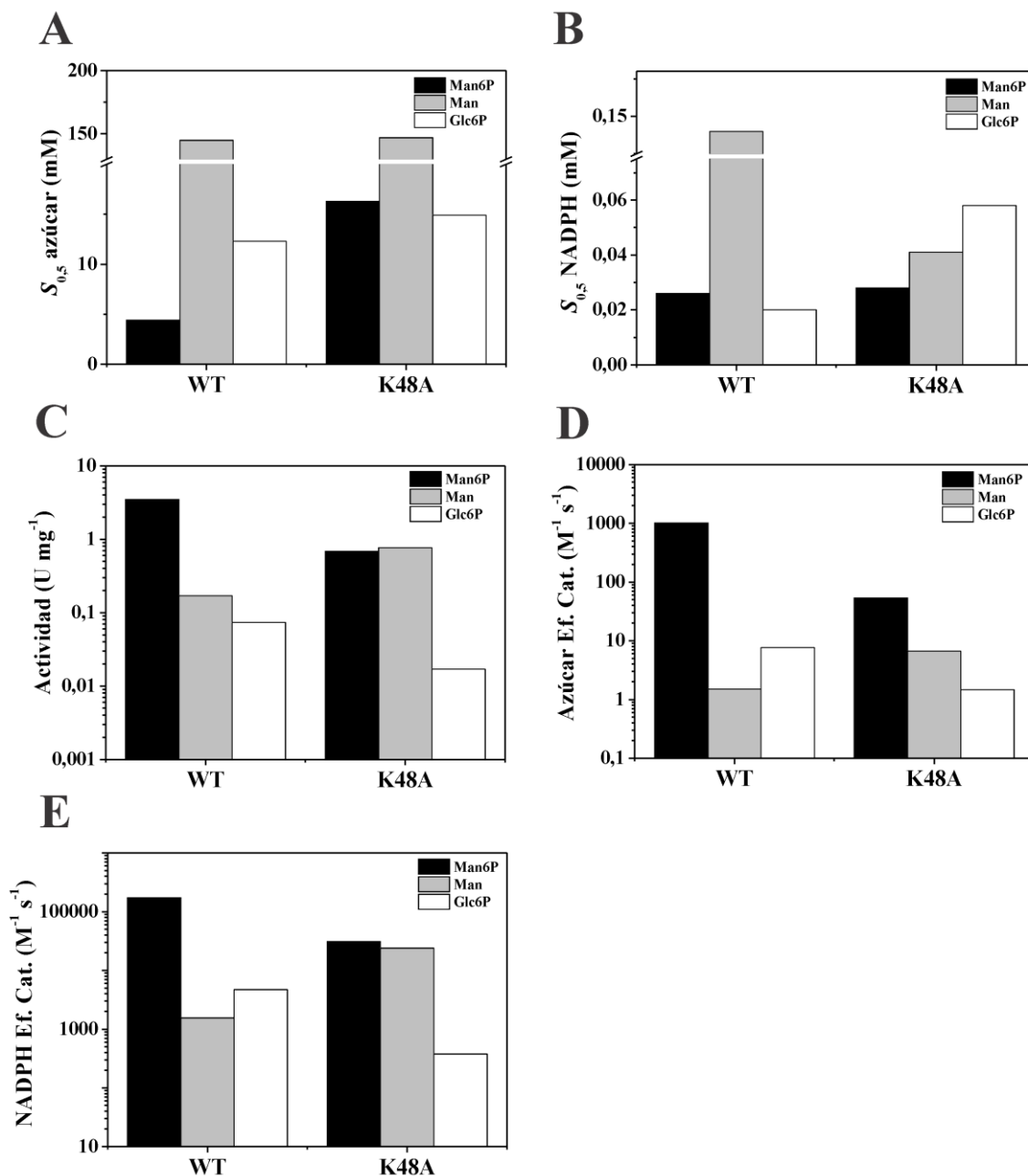


Figura 14: Comparación gráfica de los parámetros cinéticos $S_{0,5}$ de los sustratos, V_{max} y eficiencia catalítica entre la Man6PRasa y la mutante K48A. Ef. Cat.: eficiencia catalítica.

4.1.6 Caracterización cinética y estructural de la MoldHasa

La MoldHasa cataliza el paso inicial de la ruta mediante la cual el manitol se incorpora al metabolismo central de carbohidratos y juega un papel fundamental en la regulación de la concentración del azúcar-alcohol en la planta [67]. Pertenece a la familia de las MDR, es una metaloproteína que tiene un átomo de Zn^{2+} , presenta conformación monomérica y masa

molecular de aproximadamente 43 kDa [50, 67]. Su actividad catalítica es dependiente del cofactor NADH.

En este trabajo se obtuvo de forma recombinante la MolDHasa a partir del gen sintetizado *de novo* (NCBI ID U24561.1; Material Suplementario, Secuencia 2.1), el cual comprende un marco abierto de lectura de 1095 pb que codifica una proteína putativa de 365 aminoácidos (Material Suplementario, Secuencia 2.2) con un pI teórico de 6,25 y una masa estimada de 40,1 kDa, idéntica a la descrita por Williamson y colaboradores [252]. Se llevó a cabo un SDS-PAGE en condiciones reductoras del extracto crudo y de las eluciones que se obtuvieron luego de la purificación por IMAC, obteniendo una banda mayoritaria de ~40 kDa (Figura 15A). También se determinó su masa molecular por cromatografía de filtración por geles, la cual resultó ser de 80 kDa (Figura 15B), lo cual indica que la MolDHasa obtenida de forma recombinante presenta una conformación estructural homodimérica. Este resultado difiere de los datos informados en la bibliografía, donde se describe a esta enzima como monómero [50, 253]. Luego, se determinaron los parámetros cinéticos de la enzima; así, se obtuvo una V_{\max} de $1,8 \text{ U mg}^{-1}$ en el sentido de degradación del Mol (sentido fisiológico), siendo el $S_{0,5}$ de 25,5 mM y de 0,97 mM para el Mol y el NAD^+ , respectivamente (Tabla 5). Dichos valores son similares a los informados por Stoop y colaboradores [67] para la enzima purificada de fuente.

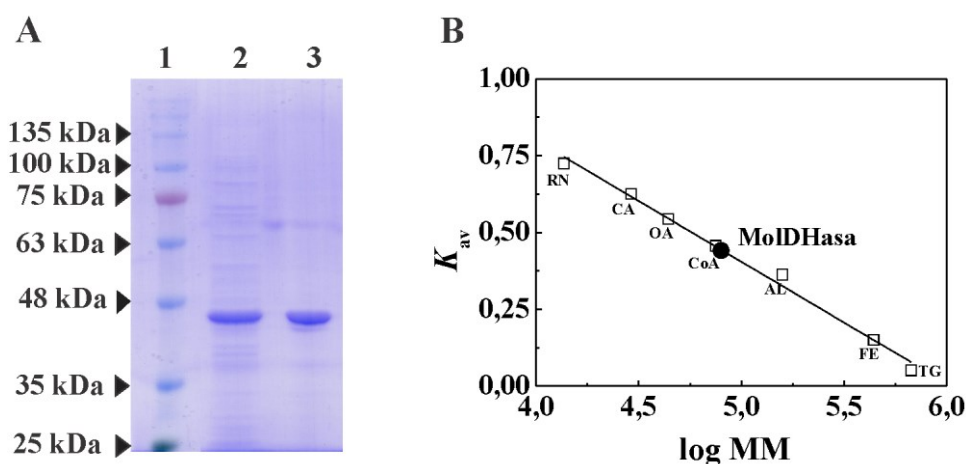


Figura 15: Análisis de la MolDHasa mediante SDS-PAGE y cromatografía de filtración por geles. **(A)** SDS-PAGE al 12% reductor. Calle 1, marcadores de masa molecular; calle 2, fracción soluble de células recombinantes que expresan MolDHasa (extracto crudo); calle 3, MolDHasa (~1 μg) purificada por IMAC. **(B)** Cromatografía de filtración por geles. Gráfico de K_{av} versus \log (masa molecular). (□) Proteínas patrones de masa molecular: RN (ribonucleasa, 13,7 kDa), CA (anhidrasa carbónica, 29 kDa), OA (ovoalbúmina, 44 kDa), CoA (conalbúmina, 75 kDa), AL (aldolasa, 158 kDa), FE (ferritina, 440 kDa) y TG (tiroglobulina, 669 kDa); (●) MolDHasa.

4.1.7 Modelado 3D de la MoldHasa

Para evaluar la especificidad de la MoldHasa por el NADH, primero realizamos un modelado por homología de la enzima, el cual resultó de utilidad para determinar cuáles aminoácidos se encontrarían involucrados en la unión del cofactor. Para ello, se llevó a cabo una búsqueda de secuencias homólogas a la MoldHasa y cuya estructura se encuentre resuelta. Esto se realizó colocando la secuencia proteica de la MoldHasa en el servidor BLAST del NCBI y utilizando la base de datos *Protein Data Bank* para la búsqueda, lo que arrojó como primer resultado la cadena A de la sinapil alcohol deshidrogenasa de *Populus tremuloides* en complejo con NADP⁺ (PDB ID 1YQD). Esta enzima posee una identidad del 71% con la MoldHasa de apio, es un homodímero y su estructura está resuelta por difracción de rayos X. Se obtuvo un modelo final de la MoldHasa de apio (Figura 16A) por modelado por homología.

Aunque originalmente se informó que la sinapil alcohol deshidrogenasa unía sólo un ion Zn²⁺ por monómero [254], la estructura cristalina de esta enzima, y por lo tanto el modelo de la MoldHasa, contiene dos iones Zn²⁺ por cada subunidad, uno con función catalítica y el otro con propiedades estructurales. La presencia de dichos iones es característica de las enzimas de la familia MDR dependiente de Zn²⁺. Los residuos de Cys 103, 106, 109 y 116 son los encargados de formar un complejo con el Zn²⁺ estructural (centro 4 Cys-Zn²⁺) (Figura 16B). En varias alcohol deshidrogenasas tetraméricas dependientes de Zn²⁺, los bucles de unión de Zn²⁺ estructural están involucrados en la oligomerización; asociándose los dímeros a través de estos bucles que sobresalen, formando el tetrámero funcional [255]. Debido a que la MoldHasa es dimérica, estos bucles no están en contacto con otras moléculas de MoldHasa y el papel funcional del Zn²⁺ estructural sigue siendo desconocido. El Zn²⁺ catalítico se encuentra en la base de la hendidura del sitio activo y es coordinado por las cadenas laterales de la Cys⁵⁰, His⁷⁰ y Cys¹⁶⁶. La coordinación tetraédrica del Zn²⁺ se completa con una molécula de agua, la cual forma un puente de hidrógeno con la Ser⁵² (Figura 16C) [227].

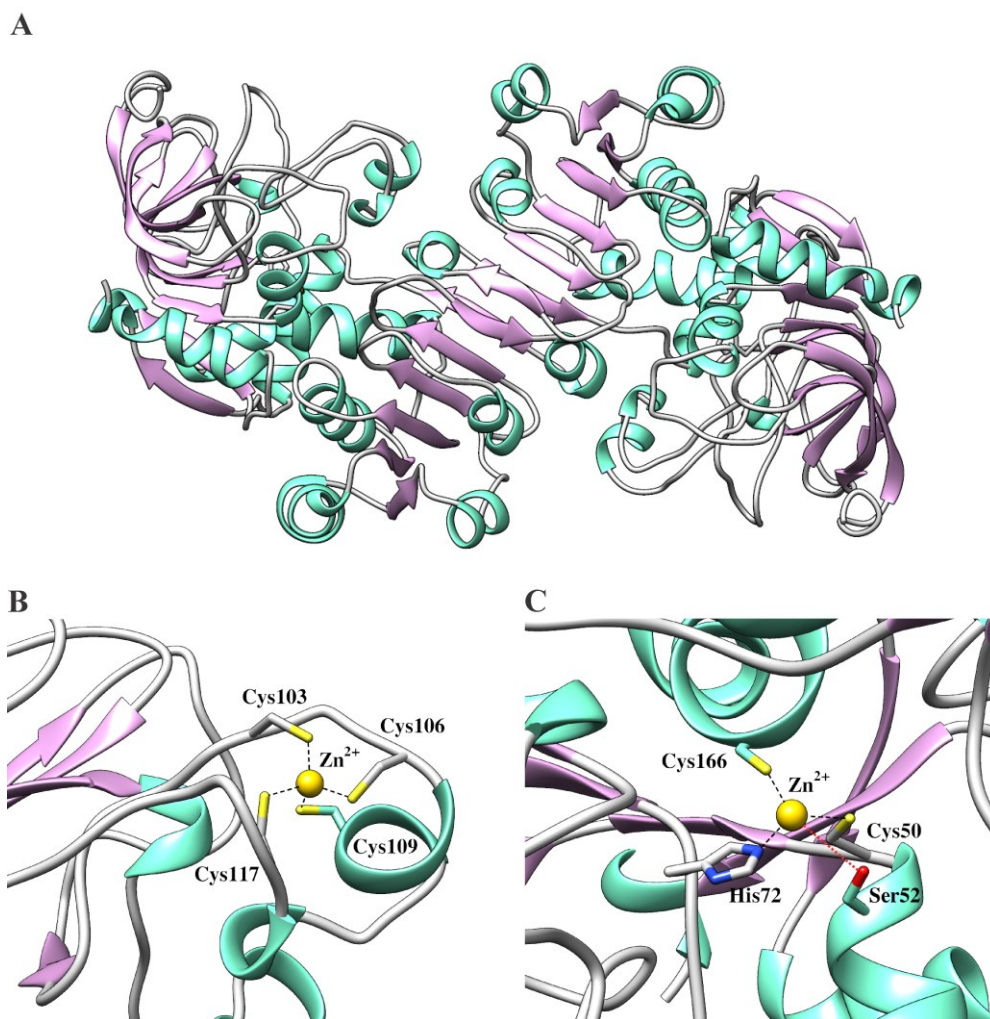


Figura 16: (A) Modelo estructural de la MoldHase de conformación dimérica. (B) Coordinación de las Cys 103, 106, 109 y 117 con el Zn^{2+} estructural. C. El Zn^{2+} catalítico está coordinado tetraédricamente por Cys⁵⁰, His⁷², Cys¹⁶⁶ y una molécula de agua (no se muestra en la imagen). La línea de puntos roja representa la coordinación entre el Zn^{2+} , la molécula de agua y el puente hidrógeno que forma esta última con la Ser⁵².

Cada subunidad de la MoldHase se compone de dos dominios: uno de unión a dinucleótido (residuos 170 a 302), que adopta el clásico plegamiento de Rossmann [256], y otro de unión a sustrato (residuos 1 a 169 y 303 a 362). La hendidura profunda entre los dominios de unión al Mol y al cofactor que contiene al Zn^{2+} catalítico, es esencial para el mecanismo catalítico de las enzimas de la superfamilia MDR [257]. Cada sitio activo de la MoldHase está compuesto por aminoácidos que pertenecen a las dos subunidades de la molécula dimérica. La dimerización ocurre a través del dominio de unión al cofactor (residuos 282 a 302) de cada subunidad. La hebra más externa de la lámina β de seis hebras paralelas de la subunidad A forma enlaces de hidrógeno con la correspondiente cadena β de la subunidad B, exhibiendo una

disposición antiparalela (Figura 17A). El sitio activo de la MolDHasa está delineado por residuos alifáticos y aromáticos, los cuales forman un bolsillo en el que se unen los sustratos a través de interacciones de van der Waals que dependen en gran medida de su forma. Los residuos Trp⁶¹, Ser¹¹⁵, His¹¹⁶, Ala²⁷⁹, Ile³⁰² y Asn³⁰³ de la subunidad A demarcan parte del bolsillo catalítico, el cual también es definido por los aminoácidos Phe²⁸⁹, Leu²⁹² y Lys²⁹³ de la subunidad B. El resto de la delimitación del sitio activo está moldeado por los residuos polares (de la subunidad A) que coordinan el Zn²⁺ catalítico, y que incluyen la Cys⁵⁰, la His⁷², la Cys¹⁶⁶, la Ser⁵² (la cual establece un puente de hidrógeno con una molécula de agua) y la Cys⁹⁸ (Figura 17B).

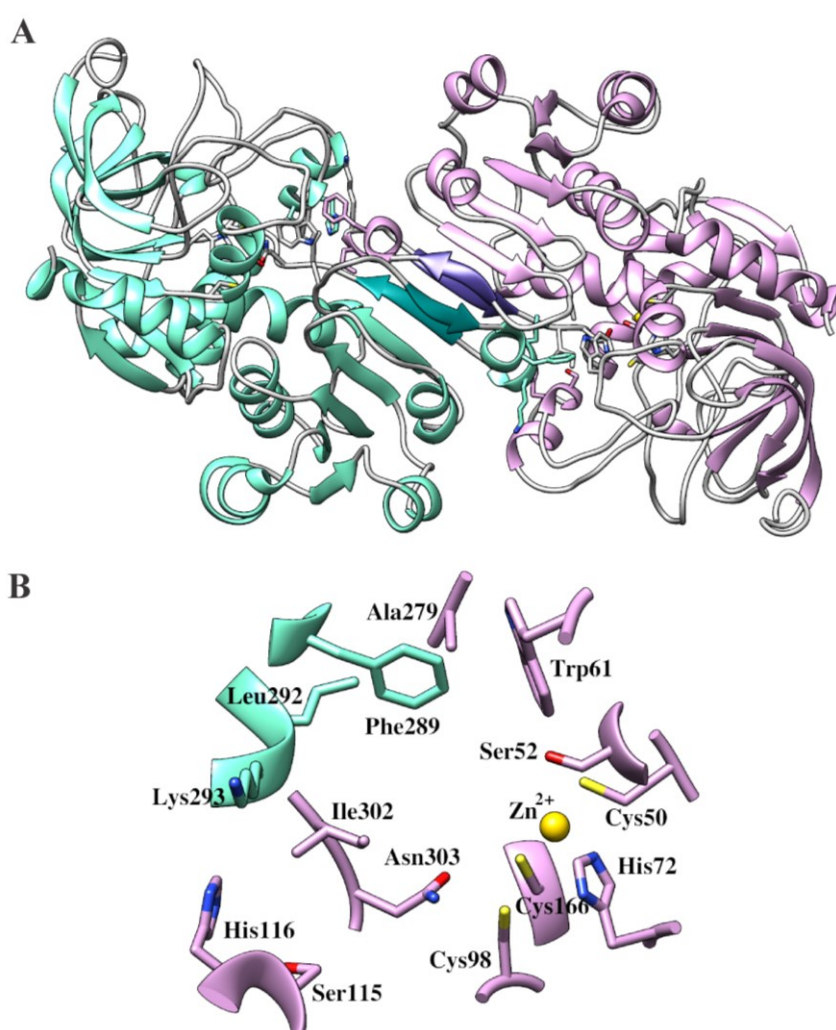


Figura 17: (A) Representación de cinta del dímero de la MolDHasa y sus dos sitios activos. La subunidad A es de color lila y la B es de color verde. Las hebras β de cada subunidad involucradas en la formación del dímero están resaltadas en colores más oscuros. El Zn²⁺ catalítico está representado como una esfera amarilla. (B) Conformación del sitio activo: Cys⁵⁰, Ser⁵², Trp⁶¹, His⁷², Cys⁹⁸, Ser¹¹⁵, His¹¹⁶, Cys¹⁶⁶, Ala²⁷⁹, Ile³⁰² y Asn³⁰³ de la subunidad A (residuos en lila); Phe²⁸⁹, Leu²⁹² y Lys²⁹³ de la subunidad B (residuos en verde).

La sinapil alcohol deshidrogenasa es específica para el cofactor NADP⁺, mientras que la MoldHasa es específica para NAD⁺. A partir de la comparación entre la estructura resuelta de la enzima de *P. tremuloides* y el modelo obtenido para la proteína de apio se logró determinar el sitio de unión al cofactor. De esta forma, se identificaron los cinco aminoácidos que serían los responsables de la unión al grupo fosfato del cofactor NADP⁺ (Figura 18). Dos de estos grupos se encuentran conservados en ambas enzimas (Ser²¹⁶ y Lys²¹⁹). Los otros tres aminoácidos, que difieren considerablemente entre la MoldHasa y la sinapil alcohol deshidrogenasa, se presentaron como buenos candidatos a ser mutados para lograr obtener la enzima de apio con especificidad alterada por el cofactor: D214S, I215T y S343N (Figura 18C).

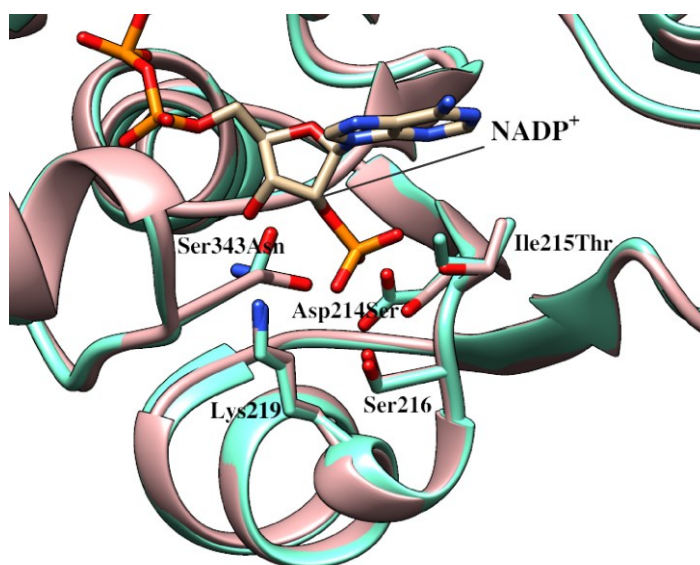


Figura 18. Análisis comparativo de los sitios de unión al cofactor en la sinapil alcohol deshidrogenasa y la MoldHasa. La estructura cristalina de la sinapil alcohol deshidrogenasa (rosa) se superpuso con el modelo por homología obtenido para la MoldHasa (verde). Se resaltan los residuos conservados (Ser²¹⁶ y Lys²¹⁹) y aquellos elegidos para llevar a cabo el cambio de especificidad por el cofactor para la MoldHasa (Asp214Ser, Ile215Thr y Ser343Asn).

4.1.8 Cambio de especificidad por el cofactor de la MoldHasa

A partir del modelo obtenido para la MoldHasa, se seleccionaron los aminoácidos candidatos a ser mutados para el cambio de especificidad por el cofactor y se diseñaron los oligonucleótidos necesarios para llevar cabo dicha tarea mediante la técnica de *QuikChange*, como se describe en la sección 3.11 de Materiales y Métodos. Las mutantes a estudiar fueron: D214S, D214S-I215T, D214S-I215T-S343N y D214S-S343N. Se confirmó la inserción de las

mutaciones mediante secuenciación automática y se procedió a la obtención de las enzimas modificadas de forma recombinante. En todos los casos, concluida la purificación, se llevó a cabo un SDS-PAGE en condiciones reductoras del extracto crudo y de las eluciones obtenidas, observando en todos los casos una banda mayoritaria de ~40 kDa. Luego, se determinó la masa molecular por cromatografía de exclusión molecular, confirmando que todas las mutantes mantienen la estructura cuaternaria homodimérica de ~80 kDa observada para la enzima salvaje. Se caracterizaron cinéticamente las mutantes con ambos cofactores, NAD^+ y NADP^+ , para evaluar la eficiencia de las enzimas mutantes en el uso de los mismos. Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos se presentan en la Tabla 5, y una representación gráfica de los mismos en la Figura 19.

Tabla 5: Parámetros cinéticos obtenidos para la MolDHasa y las mutantes. Se midió la actividad enzimática en sentido de oxidación de Mol en presencia de ambos cofactores, a pH 9,0 y 25 °C.

Enzima	Sustrato	$S_{0,5}$ (mM)	V_{\max} (U mg^{-1})	Ef. Cat. ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
MolDHasa	$\text{Mol}_{\text{NAD}^+}$	25 ± 2	$1,8 \pm 0,4$	$9,8 \times 10^1$
	NAD^+	$0,9 \pm 0,1$		$2,6 \times 10^3$
	$\text{Mol}_{\text{NADP}^+}$	76 ± 11	$0,047 \pm 0,001$	$8,7 \times 10^{-1}$
	NADP^+	$2,0 \pm 0,1$		$3,2 \times 10^1$
MolDHasa-D214S	$\text{Mol}_{\text{NAD}^+}$	28 ± 3	$0,114 \pm 0,004$	5,6
	NAD^+	$0,51 \pm 0,06$		$3,1 \times 10^2$
	$\text{Mol}_{\text{NADP}^+}$	5 ± 1	$0,0182 \pm 0,001$	4,7
	NADP^+	$0,45 \pm 0,04$		$5,6 \times 10^1$
MolDHasa-D214S-I215T	$\text{Mol}_{\text{NAD}^+}$	48 ± 6	$0,0097 \pm 0,0006$	$2,8 \times 10^{-1}$
	NAD^+	$2,0 \pm 0,2$		6,7
	$\text{Mol}_{\text{NADP}^+}$	3 ± 2	$0,0022 \pm 0,0004$	1,2
	NADP^+	$0,43 \pm 0,05$		7,1
MolDHasa-D214S-I215T-S343N	$\text{Mol}_{\text{NAD}^+}$	61 ± 12	$0,002 \pm 0,001$	$4,4 \times 10^{-2}$
	NAD^+	$3,1 \pm 0,2$		$8,4 \times 10^{-1}$
	$\text{Mol}_{\text{NADP}^+}$	$0,9 \pm 0,2$	$0,0035 \pm 0,0008$	5,2
	NADP^+	$0,041 \pm 0,003$		$1,2 \times 10^2$
MolDHasa-D214S-S343N	$\text{Mol}_{\text{NAD}^+}$	$99,3 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	9,4
	NAD^+	$1,9 \pm 0,4$		$4,9 \times 10^2$
	$\text{Mol}_{\text{NADP}^+}$	5 ± 1	$0,12 \pm 0,02$	$2,9 \times 10^1$
	NADP^+	$0,30 \pm 0,03$		$5,3 \times 10^2$

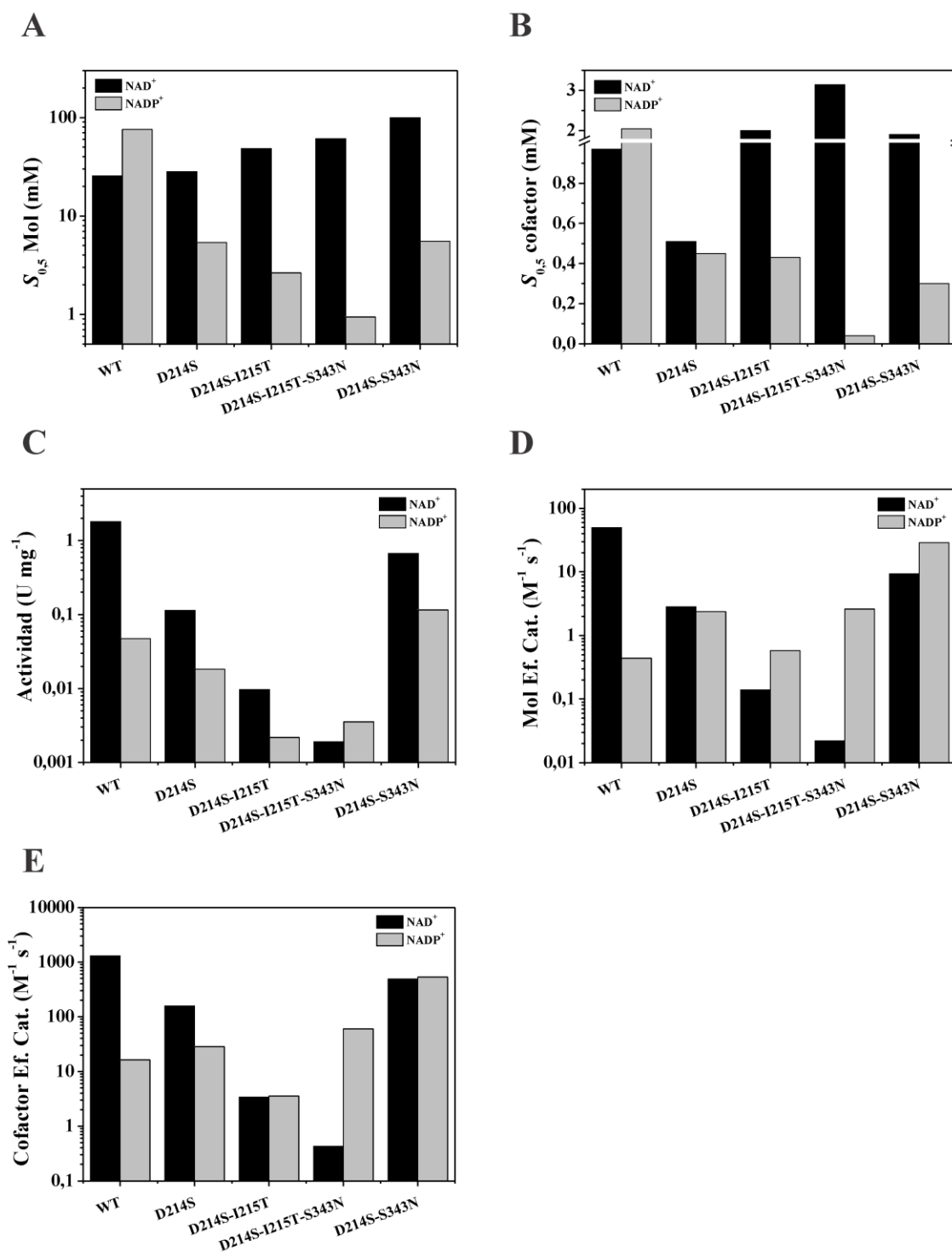


Figura 19: Comparación de los parámetros cinéticos obtenidos para la MoldHsa salvaje y las mutantes D214S, D214S-I215T, D214S-I215T-S343N y D214S-S343N. Ef. Cat.: eficiencia catalítica.

Al analizar los resultados presentados en la Figura 19, encontramos que la introducción de la primera mutación (D214S) no afecta el $S_{0,5}$ de la enzima por el Mol en presencia de NAD^+ pero aumenta significativamente (en 14 veces) su afinidad cuando se encuentra con el cofactor

NADP⁺ (Figura 19A). También aumenta la afinidad aparente (se reduce el $S_{0,5}$) por el cofactor NAD⁺ a casi el doble, y aún más (4,5 veces) por el NADP⁺ (Figura 19B). En cuanto a la variación de la V_{max} , esta disminuye para ambos cofactores, aunque más marcadamente con NAD⁺ (15 veces menos) que con NADP⁺ (más de 2 veces) (Figura 19C). Además, se observa un aumento de más de 5 veces en la eficiencia catalítica de Mol con NADP⁺, mientras que dicho parámetro disminuye un orden de magnitud con NAD⁺ (Figura 19D). La eficiencia catalítica para los cofactores sigue la misma tendencia: aumentando 2 veces la eficiencia catalítica con NADP⁺ y disminuyendo 8 veces con NAD⁺ (Figura 19E).

Siguiendo con la mutante D214S-I215T de la MolDHasa, encontramos que la afinidad de la enzima para el Mol aumenta el doble con NADP⁺ y disminuye en la misma proporción con NAD⁺ (Figura 19A). El $S_{0,5}$ del NAD⁺ se incrementa 4 veces y el del NADP⁺ se mantiene (Figura 19B); mientras que las actividades enzimáticas (Figura 19C) y eficiencias catalíticas (Figura 19D y E) para esta mutante presentan un detrimento marcado en todos los casos. Al insertar la tercera mutación, D214S-I215T-S343N, la eficiencia catalítica resultó 141 veces mayor para NADP⁺ que para NAD⁺, mientras que la eficiencia catalítica de la MolDHasa salvaje con NAD⁺ era casi 80 veces mayor que con NADP⁺ (Figura 19E). En este punto es importante mencionar que, aunque la triple mutante presente mayores afinidades por los sustratos, actividad y eficiencias catalíticas en presencia de NADP⁺, y en consecuencia haber logrado producir el cambio deseado de especificidad por el cofactor, las actividades enzimáticas se ven seriamente afectadas.

Al estudiar en detalle las mutantes simple, doble y triple, advertimos que la inserción de la segunda mutación no sólo no es beneficiosa para el objetivo planteado, sino que parece ser perjudicial para la actividad enzimática en general. Es por esto que se obtuvo la mutante D214S-S343N. En este caso, las afinidades por el Mol y el NAD⁺ bajan 4 y 2 veces respectivamente; siendo los valores de este parámetro para Mol y NADP⁺ similares a los obtenidos para la mutante simple: 14 y 7 veces mayores respectivamente en comparación con la MolDHasa WT (Figura 19A y B). La actividad enzimática con NADP⁺ resultó en un aumento de dos veces con respecto a la enzima salvaje (Figura 19C), lo cual resulta de un aumento de la eficiencia catalítica con este cofactor de más de 30 veces (Figura 19E). Esto es una notable mejora en comparación con las demás mutantes. Si bien la eficiencia catalítica con NAD⁺ es menor que la de la enzima salvaje, el valor es similar al obtenido con NADP⁺, lo que quiere decir que la mutante D214S-S343N puede utilizar de igual forma ambos cofactores; aunque cabe señalar que

detenta mayor eficiencia catalítica del Mol en presencia de NADP^+ (Figura 19D).

4.2 Estudio de la vía de síntesis de rafinosa en *B. distachyon*

4.2.1 Caracterización cinética y estructural de la USPPasa

La secuencia que codifica para la USPPasa de *B. distachyon* (NCBI ID KQK17397.1) fue sintetizada *de novo*, se subclonó en el vector de expresión y la enzima recombinante se produjo fusionada a una etiqueta de histidinas en la región N-terminal. Dicha secuencia comprende un marco abierto de lectura de 1863 pb (Material Suplementario, Secuencia 3.1), codificando para una proteína de 621 aminoácidos (Material Suplementario, Secuencia 3.2), con una masa molecular teórica de 68,2 kDa y un pI de 6,15. El análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras de la proteína purificada mostró una banda de aproximadamente 70 kDa (Figura 20A), mientras que la cromatografía de filtración por geles indicó que la USPPasa es un monómero con una masa molecular de 68 kDa (Figura 20B). Estos datos están de acuerdo con los informados para otras USPPasas de plantas (Tabla Suplementaria 2).

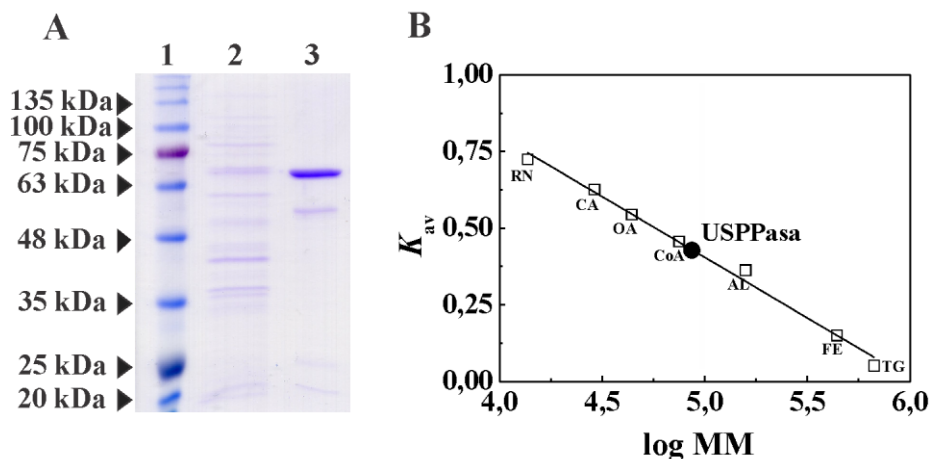


Figura 20: Análisis de la USPPasa mediante SDS-PAGE y cromatografía de filtración por geles. **A.** SDS-PAGE reductor. Calle 1, marcadores de masa molecular; calle 2, fracción soluble de células recombinantes que expresan USPPasa (extracto crudo); calle 3, USPPasa purificada por IMAC. **B.** Cromatografía de filtración por geles. Gráfico de K_{av} versus \log (masa molecular). (\square) Proteínas patrones de masa molecular: RN (ribonucleasa, 13,7 kDa), CA (anhidrasa carbónica, 29 kDa), OA (ovoalbúmina, 44 kDa), CoA (conalbúmina, 75 kDa), AL (aldolasa, 158 kDa), FE (ferritina, 440 kDa) y TG (tiroglobulina, 669 kDa); (\bullet) USPPasa.

Las USPPasas de plantas suelen presentar actividad con diferentes azúcares 1-fosfato

[105]. Para probar qué metabolitos podrían ser utilizados por la USPPasa de *B. distachyon*, medimos la actividad con una concentración fija (2 mM) de Gal1P, Glc1P, GlcA1P, glucosamina-1-fosfato (GlcN1P), N-acetil-glucosamina-1-fosfato (GlcNAc1P) y manosa-1-fosfato (Man1P). La actividad más alta se observó con Gal1P, seguida de cerca por Glc1P (26% menor), mientras que con otros azúcares-1P (GlcA1P, GlcN1P, GlcNAc1P y Man1P) fue de 5 a 17 veces menor que con Gal1P (Figura 21). Luego, determinamos los parámetros cinéticos para la USPPasa en la dirección de la síntesis del UDP- azúcar. Pudimos calcular los valores de V_{max} y $S_{0,5}$ al usar Gal1P, Glc1P y GlcA1P como sustratos (Tabla 6), pero no para GlcNAc1P, GlcN1P y Man1P porque las curvas no alcanzaron la saturación (Figura 22). La V_{max} de la USPPasa fue más alta con Gal1P, ligeramente más baja con Glc1P y 5 veces más baja con GlcA1P. Las afinidades aparentes (estimadas a partir de los valores $S_{0,5}$) para Gal1P y Glc1P fueron similares, pero 5 veces menores para GlcA1P. La eficiencia catalítica de la USPPasa fue casi la misma para Gal1P y Glc1P, pero un orden de magnitud menor para GlcA1P (Tabla 6). En general, estos resultados son similares a los obtenidos para USPPasas de otras especies de plantas (Tabla Suplementaria 2) e indican que la USPPasa podría proporcionar uno de los sustratos (es decir, UDP-Gal) para la síntesis de Gol.

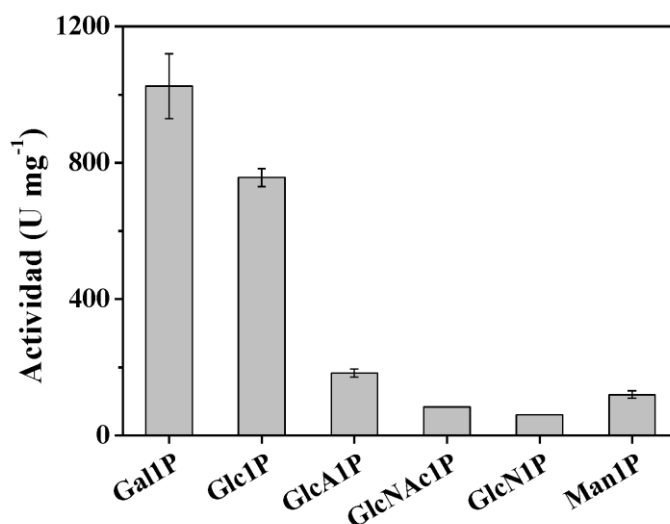


Figura 21: Actividad de la USPPasa con diferentes azúcares-1P. La actividad enzimática se ensayó en la dirección de la síntesis de UDP-azúcar, con UTP 1 mM y azúcar-1P 2 mM.

Tabla 6: Parámetros cinéticos para los sustratos de la USPPasa. Las reacciones se realizaron en la dirección de la síntesis del UDP-azúcar.

Sustrato	$S_{0,5}$ (mM)	V_{max} (U mg ⁻¹)	Ef. Cat. (M ⁻¹ s ⁻¹)
Gal1P	0,25 ± 0,03	1024 ± 95	4,7 x 10 ⁶
UTP _{Gal1P}	0,109 ± 0,007		1,1 x 10 ⁷
Glc1P	0,28 ± 0,02	757 ± 27	3,1 x 10 ⁶
UTP _{Glc1P}	0,11 ± 0,01		7,8 x 10 ⁶
GlcA1P	1,4 ± 0,3	183 ± 12	1,5 x 10 ⁵
UTP _{GlcA1P}	0,14 ± 0,01		1,5 x 10 ⁶

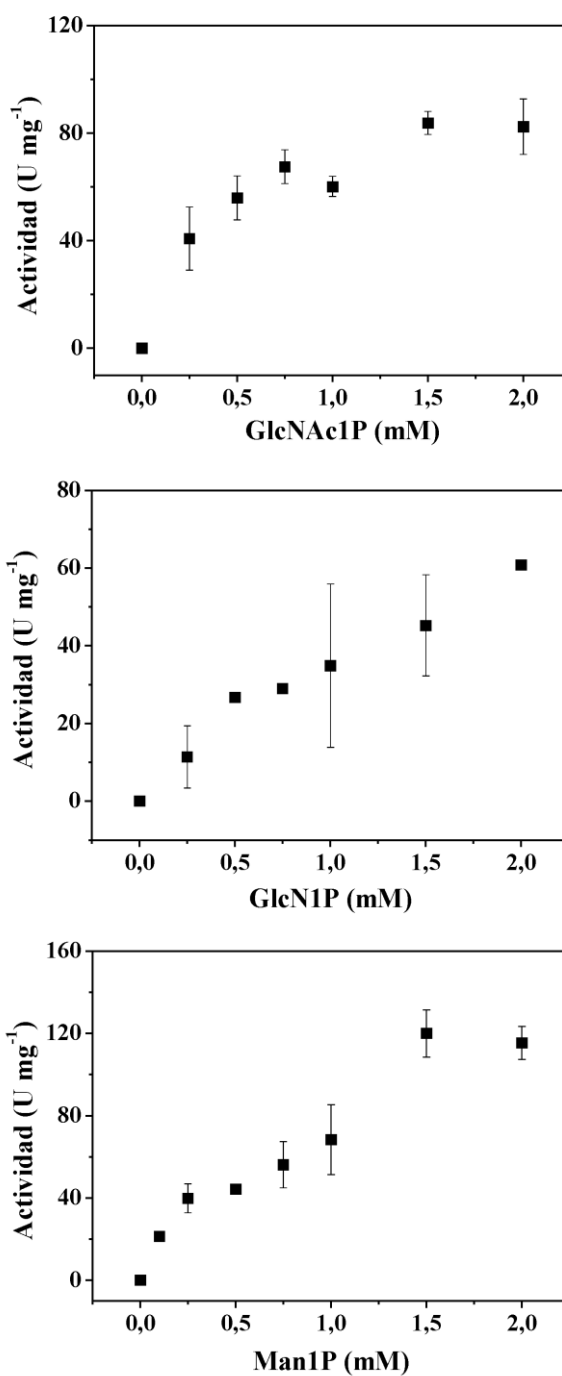


Figura 22: Actividad de USPPasa con concentraciones crecientes de GlcNAc1P, GlcN1P y Man1P. La actividad enzimática se ensayó en la dirección de la síntesis de azúcar-UDP, con UTP 1 mM y concentraciones variables del azúcar-1P.

4.2.2 Caracterización cinética y estructural de la GolSasa

La GolSasa tiene una influencia significativa sobre la acumulación de RFO en plantas,

como la primera enzima que compromete el carbono hacia la biosíntesis de RFO y, por lo tanto, influye en la partición del carbono entre Suc y este tipo de metabolitos. Es una galactosiltransferasa que pertenece a la familia 8 de las GT, y se encuentra en forma monomérica [140–142]. La especie vegetal *B. distachyon* presenta dos genes (*BdGolS1* y *BdGolS2*) [199] que codifican para enzimas GolSasas. En este trabajo de Tesis se obtuvo por síntesis *de novo* la secuencia que codifica para la GolSasa 1 (NCBI ID KQK21944.1). Dicha secuencia presenta un marco abierto de lectura de 1014 pb (Material Suplementario, Secuencia 4.1) y codifica para una proteína de 337 aminoácidos (Material Suplementario, Secuencia 4.2), con una masa molecular teórica de 37,9 kDa y un pI de 6,36. La GolSasa recombinante se obtuvo con alto grado de pureza mediante IMAC y cromatografía de filtración por geles, según lo observado mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 23A). La enzima eluyó de la cromatografía de filtración por geles como un monómero de 45 kDa (Figura 23B), lo que concuerda con los resultados obtenidos para GolSasas de otras especies de plantas [258–260].

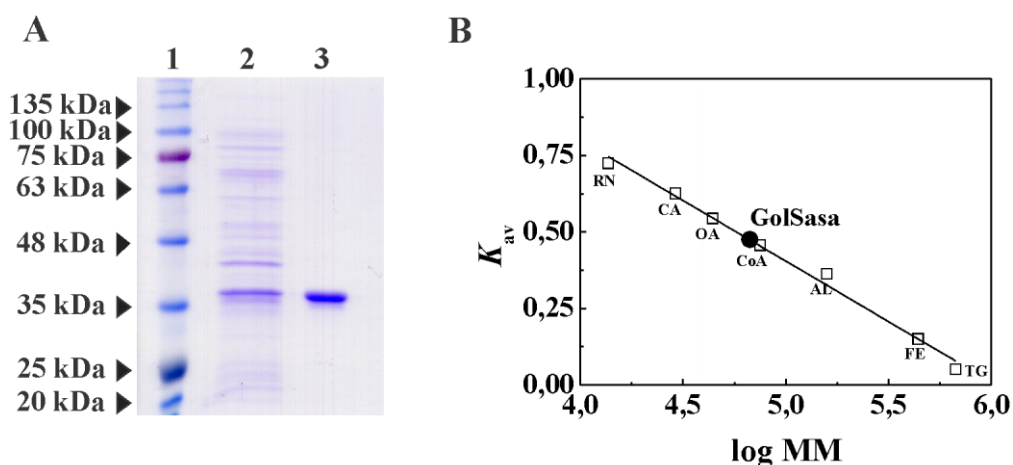


Figura 23: Análisis de la GolSasa mediante SDS-PAGE y cromatografía de filtración por geles. (A) SDS-PAGE reductor. Calle 1, marcadores de masa molecular; calle 2, fracción soluble de células recombinantes que expresan GolSasa (extracto crudo); calle 3, GolSasa (~1 µg) purificada por IMAC y cromatografía de exclusión molecular. (B) Cromatografía de filtración por geles. Gráfico de K_{av} versus log (masa molecular). (□) Proteínas patrones de masa molecular: RN (ribonucleasa, 13,7 kDa), CA (anhidrasa carbónica, 29 kDa), OA (ovoalbúmina, 44 kDa), CoA (conalbúmina, 75 kDa), AL (aldolasa, 158 kDa), FE (ferritina, 440 kDa) y TG (tiroglobulina, 669 kDa); (●) GolSasa.

La caracterización cinética de la GolSasa comenzó con el análisis del efecto de cationes divalentes sobre la actividad de la enzima. La GolSasa exhibió una actividad de 14,9 U mg⁻¹ en ausencia de cationes metálicos, aumentando a 28,6 U mg⁻¹ con Mg²⁺ y 41,4 U mg⁻¹ con Mn²⁺ (10

mM cada uno). La afinidad aparente por Mn^{2+} fue 10 veces mayor que por Mg^{2+} ($A_{0,5}$ de 0,09 y 1,4 mM, respectivamente; Figura 24A). La concentración de Mn^{2+} libre en el citosol de células vegetales se encuentra en el rango de 0,3 a 0,8 μM [261, 262]; por lo tanto, desde el punto de vista fisiológico, la activación de la GolSasa por Mn^{2+} no sería relevante *in vivo*. La concentración total de Mg^{2+} en células vegetales varía de 15 a 25 mM [263, 264], pero la concentración de Mg^{2+} libre en el citosol está cerca de 0,25 mM [265, 266]. A partir de estos datos, se continuó con la caracterización cinética de la GolSasa con Mg^{2+} 10 mM. Posteriormente, se midió la actividad de GolSasa a diferentes valores de pH y temperatura. Como se muestra en la Figura 24B, la actividad fue óptima a valores de pH en el rango de 7,0 a 9,0 y a 35°C. Los datos de la actividad de la GolSasa a diferentes temperaturas se utilizaron para calcular la energía de activación [267], la que resultó ser de 31,76 kJ mol^{-1} (Figura 24C, recuadro interno).

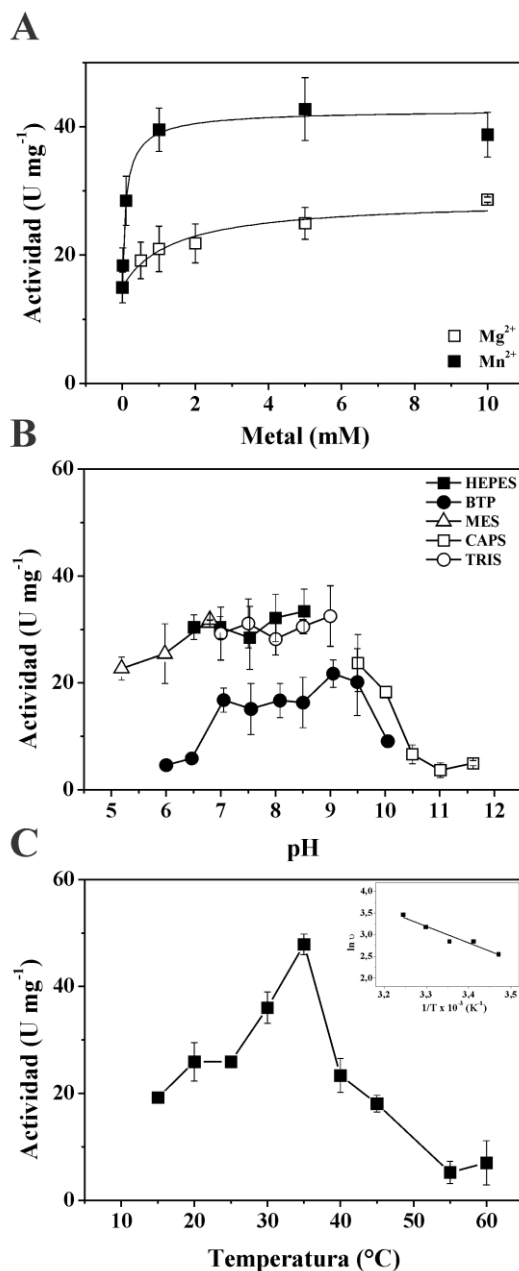


Figura 24: (A) Actividad de la GolSasa en función de la concentración de Mn^{2+} (cuadrados negros) o Mg^{2+} (cuadrados blancos). (B) Actividad de la GolSasa a diferentes valores de pH. Las soluciones reguladoras utilizadas fueron: HEPES-NaOH (pH 6,8-8,2), Bis-Tris Propano-NaOH (BTP, pH 6,1-10,1), MES-NaOH (pH 5,0-6,8), CAPS-NaOH (pH 9,5- 11,0) y Tris-HCl (pH 7,5-9). (C) Actividad de la GolSasa a diferentes temperaturas. El recuadro interno muestra el gráfico de Arrhenius, realizado con los datos de actividad enzimática obtenidos entre 15 y 35 °C.

Una vez determinadas las condiciones óptimas para el ensayo de actividad enzimática, se determinaron los parámetros cinéticos para la GolSasa, tanto con UDP-Gal (el sustrato fisiológico) como con UDP-Glc (utilizada para probar la especificidad de la enzima

recombinante; Tabla 7). La V_{\max} de la enzima fue 26 veces mayor con UDP-Gal que con UDP-Glc, mientras que el valor de $S_{0,5}$ para UDP-Gal fue 40 veces menor que para UDP-Glc. De manera similar, la afinidad aparente por el *myo*-inositol fue 8 veces mayor con UDP-Gal que con UDP-Glc. La eficiencia catalítica fue tres órdenes de magnitud mayor con UDP-Gal que con UDP-Glc (Tabla 7). No se detectó actividad cuando se usaron UDP-GlcA (uno de los productos putativos de la USPPasa) o ADP-Glc como sustratos alternativos (datos no mostrados). También se probó el efecto de varias hexosas-P (Glc6P, Man6P, Fru6P, Fru1,6bisP y GlcN-6P) sobre la actividad de la enzima, pero no se observaron diferencias significativas cuando se agregaron a la mezcla de reacción a una concentración de 5 mM (datos no mostrados).

Tabla 7: Parámetros cinéticos para los sustratos de GolSasa. Las reacciones se realizaron en la dirección de la síntesis de Gol.

Sustrato	$S_{0,5}$ (mM)	V_{\max} (U mg ⁻¹)	Ef. Cat. (M ⁻¹ s ⁻¹)
UDP-Gal	0,06 ± 0,01	28,6 ± 0,9	3,2 x 10 ⁵
<i>myo</i> -inositol _{UDP-Gal}	2,5 ± 0,3		7,6 x 10 ³
UDP-Glc	2,6 ± 0,5	1,1 ± 0,2	2,8 x 10 ²
<i>myo</i> -inositol _{UDP-Glc}	20 ± 3		3,7 x 10 ¹

4.2.3 Árbol filogenético de la GolSasa

Para comprender mejor la función y las propiedades de la GolSasa de *B. distachyon*, primero se construyó un árbol filogenético con secuencias de GolSasas y de proteínas del tipo glucogenina de diferentes especies de plantas. El árbol resultante se dividió en cuatro grupos principales, de A a D (Figura 25). Las secuencias de las GolSasas de monocotiledóneas (familia Poaceae) resultaron agrupadas en un único clado (A), como se observó en estudios anteriores [140, 184, 268]. Las secuencias de dicotiledóneas se separaron en tres clados (B a D). Los grupos B y D contienen secuencias de GolSasas, mientras que el grupo C incluye secuencias anotadas como proteínas de tipo glucogenina. Las dos secuencias anotadas como GolSasas en el genoma de *B. distachyon* (16_Bdi y 17_Bdi, Tabla Suplementaria 5) se ubicaron en el clado que contenía secuencias de monocotiledóneas (A), aunque en diferentes subgrupos.

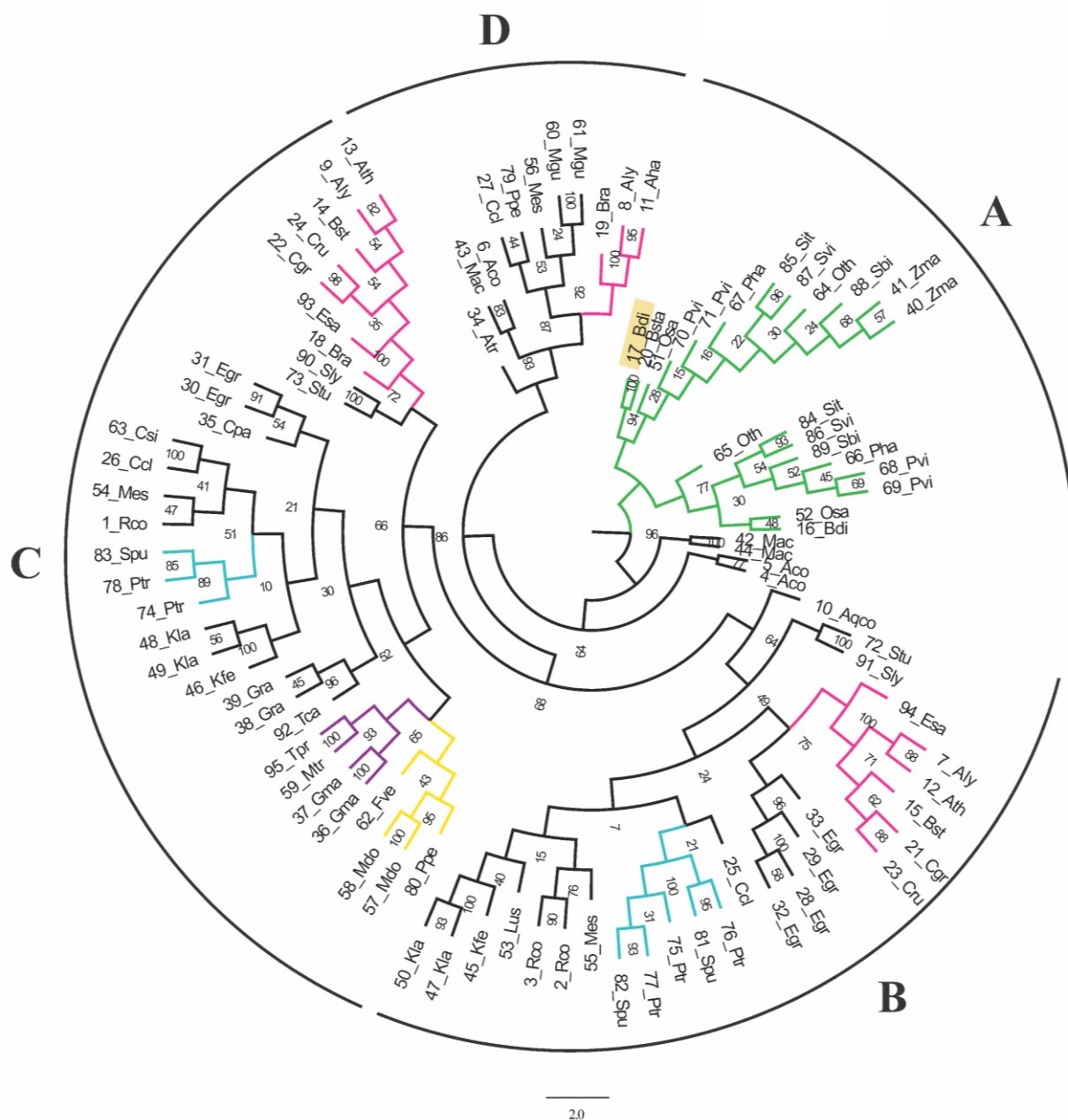


Figura 25: Análisis filogenético de GolSasas y proteínas del tipo glucogenina de plantas. El árbol se reconstruyó utilizando el método de *neighbor-joining* con un *bootstrap* de 1.000 en el programa Seaview 5.0.1. Las secuencias se codificaron con números para mayor claridad (ver Tabla Suplementaria 5). La GolSasa 1 de *B. distachyon* está resaltada en amarillo (17_Bdi). Grupo A, GolSasas de monocotiledóneas; grupo B, GolSasas de dicotiledóneas; grupo C, proteínas de tipo glucogenina de dicotiledóneas; grupo D, GolSasas de dicotiledóneas. Los números de nodo representan los valores de *bootstrap* obtenidos durante la reconstrucción del árbol. Las familias se colorearon de la siguiente manera: Poaceae (verde), Brassicaceae (rosa), Rosaceae (amarillo), Fabaceae (violeta) y Salicaceae (celeste).

4.2.4 Modelado 3D de la GolSasa

Para construir un modelo 3D de la GolSasa, primero se buscaron estructuras resueltas (moldes) en el *Protein Data Bank* usando el algoritmo BLAST del servidor NCBI. Esta búsqueda arrojó como resultado que las estructuras cristalinas de las glucogeninas humana (4UEG) y de conejo (1LL0) son las que se ajustan mejor a la secuencia proteica de la GolSasa de *B. distachyon*. La secuencia de la GolSasa tiene una identidad relativamente baja (24-28%) con estas enzimas, lo que imposibilita el modelado por homología [269]. Por lo tanto, se construyó el modelo 3D utilizando servidor I-TASSER (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*), un programa en línea de predicción por “reconocimiento de plegamiento”. El resultado generado por este servidor incluyó cinco modelos atómicos de longitud completa, clasificados según la densidad del clúster, de los cuales seleccionamos el modelo 1 para continuar con el análisis estructural. El modelo 3D de la GolSasa se obtuvo en complejo con UDP-Glc y Mn^{2+} , utilizando las estructuras cristalinas resueltas antes mencionadas como moldes. Dicho modelo posee 10 hélices α , 8 cadenas β y una gran cantidad de regiones desordenadas. La región N-terminal de la estructura presenta el plegamiento de Rossmann compuesto por cinco cadenas β , con la última cadena en dirección antiparalela (Figura 26A).

Una inspección detallada de la secuencia de la proteína mostró una alta conservación de los motivos encontrados en las enzimas de la familia GT8, incluidos DxD, HxxGxxKPW, GLG, NAG y FLAG, descritos en publicaciones anteriores [140, 270, 271]. La mayoría de estas regiones se encuentran en el interior de la estructura proteica, formando un bolsillo catalítico que no permite el acceso del agua (Figura 26B). El motivo DxD (Asp¹²¹-Ala¹²²-Asp¹²³) está ubicado entre las cadenas β 4 y β 5 del plegamiento de Rossmann y forma parte del dominio catalítico; los dos residuos de Asp interactúan con el Mn^{2+} y la Ala¹²² participa en la unión de la ribosa del UDP-azúcar. Un análisis exhaustivo del modelo y el alineamiento de secuencias (no mostrado) nos permitió determinar qué residuos estarían involucrados en la unión del UDP-azúcar: Phe²⁹, Leu³⁰, Ala³¹, Gly³², Asn¹⁸⁷, Ala¹⁸⁸, Gly¹⁸⁹, His²⁵⁹ y Cys²⁶¹. El servidor I-TASSER no proporciona información sobre el sitio de unión del *myo*-inositol, ya que no hay estructuras cristalinas resueltas para las glicosiltransferasas que usan este sustrato. Sin embargo, el análisis del modelo obtenido en el servidor 3DLigandSite detecta posibles candidatos putativos implicados en la unión de *myo*-inositol: Asp¹⁴⁶, Cys¹⁴⁷, Pro¹⁸¹, Pro¹⁸², Asn¹⁸⁷, Ala¹⁸⁸, Gly¹⁸⁹, Gln²¹⁸ y Cys²⁶¹ (Figura 26B).

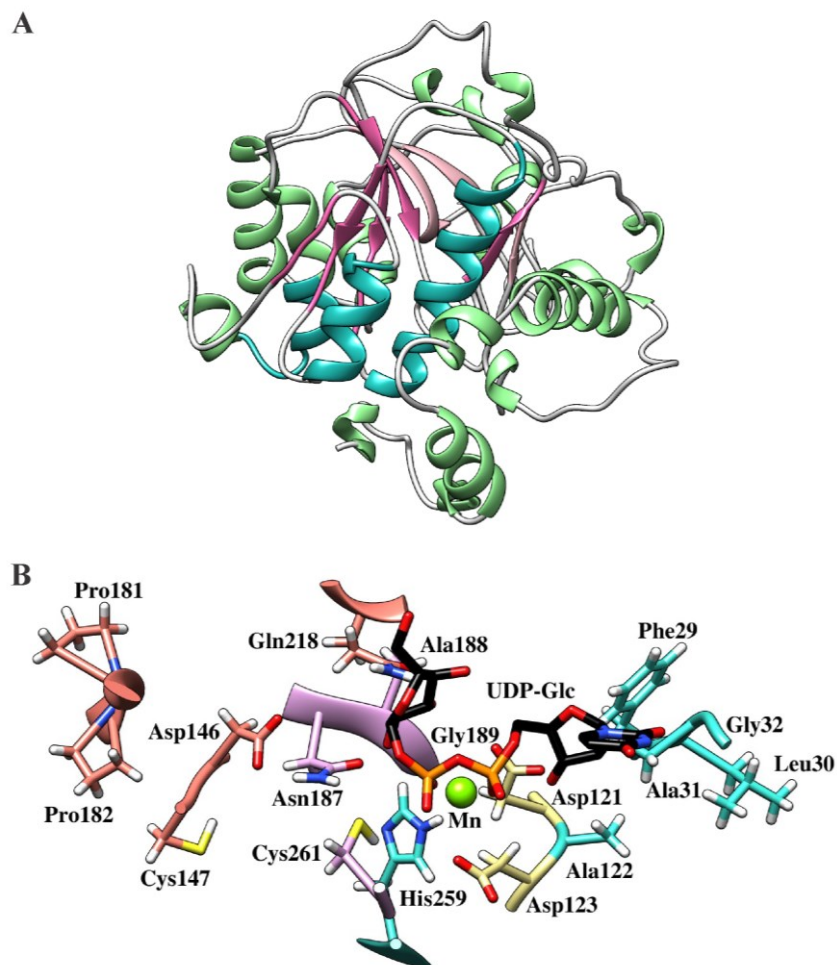


Figura 26: Modelo tridimensional de la GolSasa obtenido por “reconocimiento de plegamiento” (*threading*). (A) La imagen muestra el plegamiento de Rossmann dentro del dominio N-terminal, con las cadenas β resaltadas en rosa y las hélices α en verde más oscuras. (B) Se muestra la enzima en complejo con UDP-Glc (coloreado por tipo de átomo) y Mn^{2+} (esfera verde). Los residuos del supuesto sitio catalítico se colorearon de la siguiente manera: amarillo, residuos que se unen al ion metálico; celeste, residuos que interactúan con el UDP-azúcar; rosa, residuos que se unen al *myo*-inositol; violeta, residuos que unen ambos sustratos.

4.2.5 Ensayos de óxido-reducción con la GolSasa

En el modelo obtenido para la GolSasa se observaron varios residuos de Cys (Figura 27), encontrándose la Cys²⁶¹ en el sitio catalítico putativo (Figura 26B). Por lo tanto, nos propusimos evaluar el efecto de agentes oxidantes y reductores sobre la actividad de la enzima recombinante. La GolSasa se incubó, en una primera etapa, con concentraciones crecientes de diferentes agentes oxidantes, como se describe en Materiales y Métodos (sección 3.24). La incubación de la enzima recombinante con diamida 1 mM o H₂O₂ 0,5 mM produjo una inhibición del 40 %,

mientras que la actividad fue insignificante después de la incubación con 10 mM de ambos oxidantes (Figura 28). La incubación con GSSG 0,1 mM mostró una inhibición del 40% de la actividad de la GolSasa, mientras que concentraciones más altas produjeron el mismo efecto. La exposición a los agentes reductores DTT y GSH aumentó ligeramente (~ 25 %) la actividad de la enzima recombinante (Figura 28).

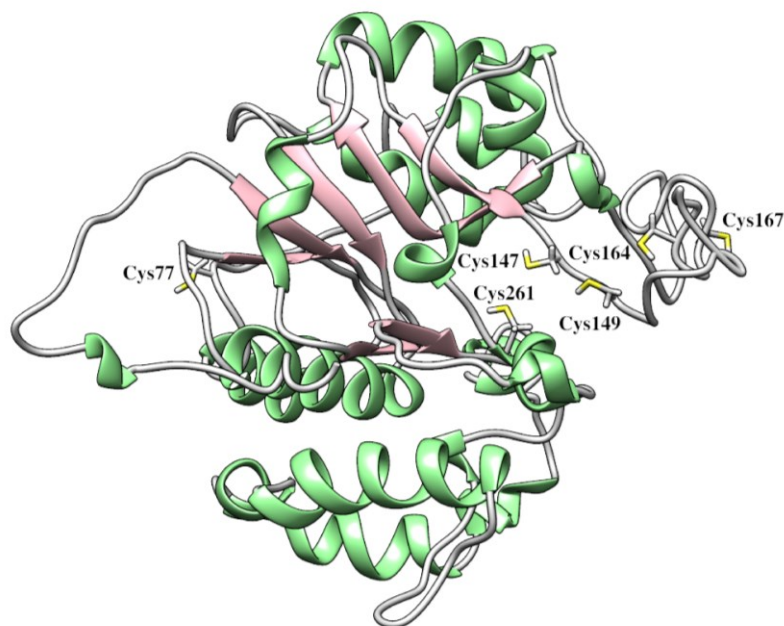


Figura 27: Modelo estructural de la GolSasa donde los residuos de cisteína se muestran en diferentes colores y sus posiciones etiquetadas. Cys¹⁴⁷, Cys¹⁴⁹, Cys¹⁶⁴ y Cys¹⁶⁷ se encuentran en posiciones cercanas en la conformación estructural adquirida y la Cys²⁶¹ se localiza en el bolsillo del sitio activo. La Cys⁷⁷ se sitúa en el extremo opuesto de la estructura a las demás Cys.

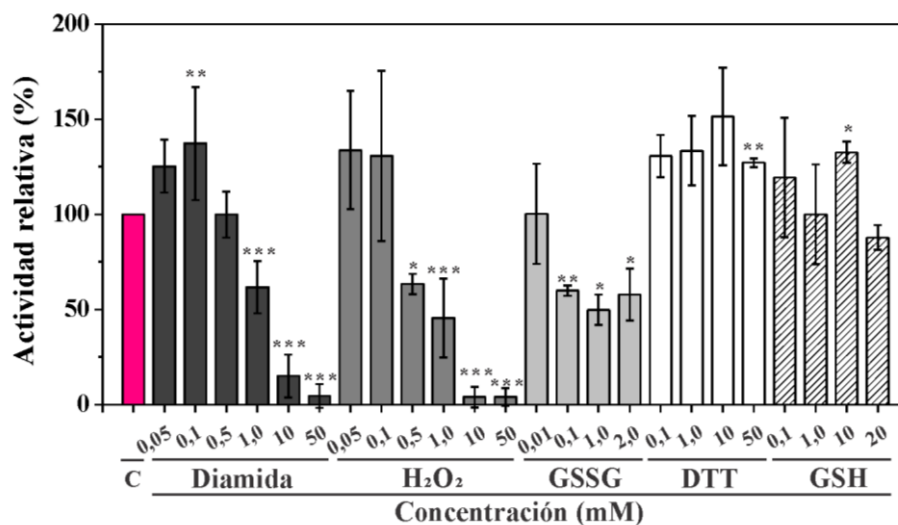


Figura 28: Efecto de agentes oxidantes y reductores sobre la actividad de la GolSasa. Los datos mostrados son la media de al menos dos conjuntos de datos independientes \pm el error estándar. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ (prueba t).

A continuación, se estudió la posibilidad de recuperar la actividad de la GolSasa oxidada por incubación con agentes reductores químicos o biológicos. La enzima se trató primero con diamida y H₂O₂ 1 mM y luego se incubó con DTT 1 mM. Alternativamente, la enzima oxidada se incubó con tioredoxina de *Escherichia coli* (*EcoTrx*). Se observó que la actividad de la GolSasa oxidada con diamida fue recuperada por incubación con DTT y con *EcoTrx*. Sin embargo, la actividad de la enzima oxidada con H₂O₂ no pudo ser restaurada por ninguno de los agentes reductores probados (Figura 29), lo que sugiere la ocurrencia de un proceso oxidativo irreversible cuando la enzima es incubada con H₂O₂. La enzima tratada con GSSG no mostró variaciones significativas después de la incubación con GSH o *EcoTrx* (Figura 30).

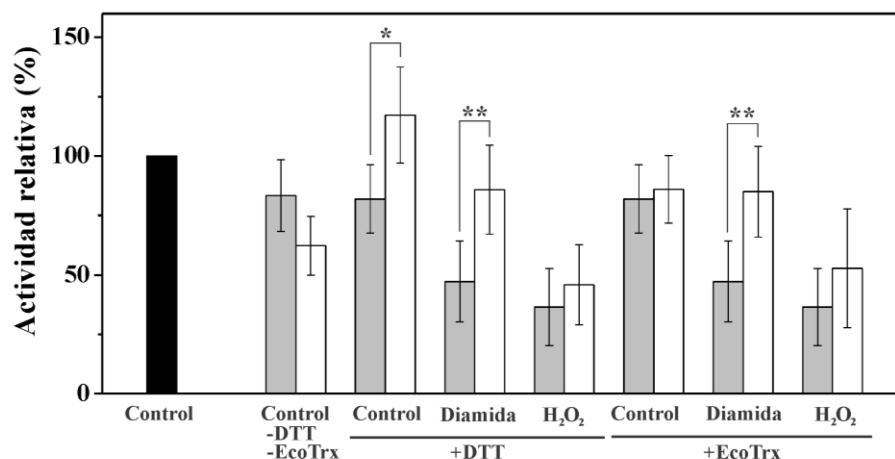


Figura 29: Recuperación de la actividad de la GolSasa oxidada por reducción con DTT o *EcoTrx*. Los datos de actividad enzimática se relacionaron con el valor obtenido al comienzo de cada ensayo. Los datos presentados son la media de dos conjuntos de datos independientes \pm el error estándar. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ (prueba *t*).

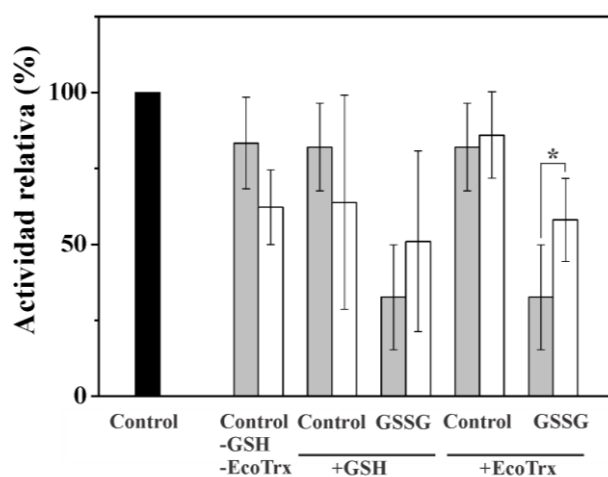


Figura 30: Tratamiento de la GolSasa oxidada con GSSG con DTT o *EcoTrx*. Los datos de actividad enzimática se relacionaron con el valor obtenido al comienzo de cada ensayo. Los datos presentados son la media de dos conjuntos de datos independientes \pm el error estándar. *, $p < 0,05$ (prueba *t*).

4.2.6 Caracterización cinética y estructural de la RafSasa

La RafSasa presenta actividad galactosiltransferasa y también galactosil hidrolasa, pertenece a la familia 36 de las GH, presenta conformación monomérica y las publicaciones sobre su caracterización son escasas [258], refiriéndose la mayoría de los trabajos al estudio de la

expresión de los genes que codifican para las diferentes isoformas de esta enzima y su relación con la tolerancia de las plantas a diversas condiciones de estrés abiótico [172, 187, 272]. En este trabajo, se obtuvo por síntesis *de novo* la secuencia que codifica para la RafSasa de *B. distachyon* (NCBI ID XM_003569223.3). Dicha secuencia comprende un marco abierto de lectura de 2346 pb (Material Suplementario, Secuencia 5.1) que codifica para una proteína putativa de 782 aminoácidos (Material Suplementario, Secuencia 5.2), con un pI teórico de 5,70 y una masa molecular estimada de 84,2 kDa. Luego de expresar la proteína recombinante, se realizó un SDS-PAGE en condiciones reductoras del extracto crudo y de las fracciones que se obtuvieron luego de la purificación, donde se observó una banda mayoritaria de ~80 kDa (Figura 31A). A continuación, se determinó la masa molecular al estado nativo por cromatografía de exclusión molecular, la cual resultó ser de 110 kDa (Figura 31B); por lo tanto, podemos concluir que la estructura cuaternaria de la RafSasa es monomérica. La enzima purificada se utilizó para realizar la caracterización cinética en el sentido de síntesis de Raf (sentido fisiológico), empleando para ello el método acoplado con la *myo*-inositol deshidrogenasa de *B. subtilis*, como se describió en Materiales y Métodos (sección 3.22). Los resultados obtenidos utilizando esta técnica no fueron concluyentes ya que, aún en ausencia del sustrato Suc, la enzima presentaba actividad.

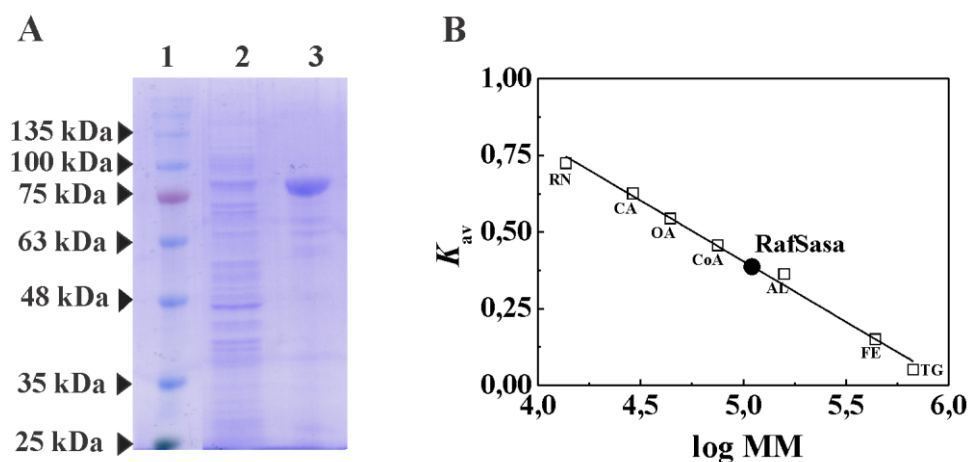


Figura 31: Análisis de la RafSasa mediante SDS-PAGE y cromatografía de filtración por geles. **(A)** SDS-PAGE al 12% reductor. Calle 1, marcadores de masa molecular; calle 2, fracción soluble de células recombinantes que expresan RafSasa (extracto crudo); calle 3, RafSasa (~1 µg) purificada por IMAC. **(B)** Cromatografía de filtración por geles. Gráfico de K_{av} versus log (masa molecular). (□) Proteínas patrones de masa molecular: RN (ribonucleasa, 13,7 kDa), CA (anhidrasa carbónica, 29 kDa), OA (ovoalbúmina, 44 kDa), CoA (conalbúmina, 75 kDa), AL (aldolasa, 158 kDa), FE (ferritina, 440 kDa) y TG (tiroglobulina, 669 kDa); (●) RafSasa.

Por lo expuesto anteriormente, se procedió a un análisis cualitativo de los productos de reacción mediante la técnica de cromatografía en capa delgada. Para ello, se puso a punto este método para los azúcares a ensayar y se evaluó el rango de detección para cada uno de ellos. El único compuesto que no se detectó en las condiciones elegidas fue el *myo*-inositol. En el primer experimento se corrieron patrones (Suc, Gol y Raf), una mezcla de los sustratos de la reacción (Gol y Suc) sin enzima y con cantidades diferentes de la RafSasa, luego de incubar a temperatura ambiente durante 4 h. Al revelar la placa no logramos detectar Raf en las calles donde se encontraba presente la RafSasa; sin embargo, desapareció la mancha correspondiente al Gol y se mantuvo la mancha correspondiente a la Suc. También encontramos otra mancha de diferente color, ligeramente más arriba que la correspondiente a Suc, que no se correspondía con ninguno de los patrones utilizados (Figura 32A). Se planteó la hipótesis de que la banda incógnita podría corresponderse con Gal. Para confirmar esta posibilidad, se hizo un segundo experimento donde se corrieron patrones de Gol y Gal, los sustratos Gol o Raf sin enzima y en presencia de RafSasa, luego de incubar a temperatura ambiente durante 1 h. Al revelar la placa, observamos la presencia de Gal en las calles correspondientes a las reacciones en presencia de la enzima. También se puede notar la presencia de Suc en la calle correspondiente a la reacción que tenía Raf como sustrato (Figura 32B).

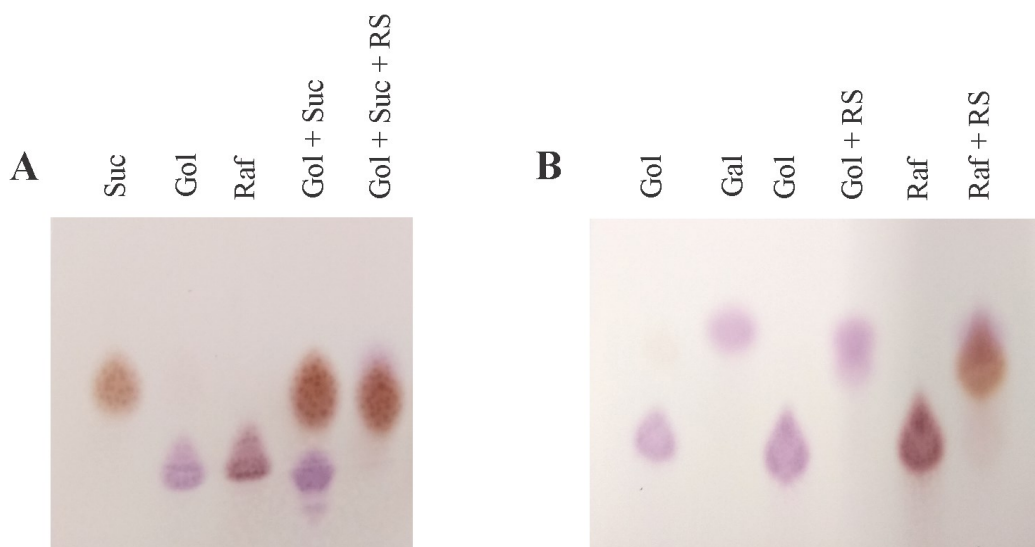


Figura 32: Cromatografía en capa delgada. **(A)** Patrones Suc, Gol y Raf 5 mM (10 nmol); reacciones Gol 10 mM + Suc 25 mM en ausencia y presencia de RafSasa (RS, 10 μ l RafSasa 7 mg ml⁻¹), incubadas durante 4 h. **(B)** Patrones Gol y Gal 5 mM (10 nmol); reacciones Gol/Raf 10 mM en ausencia y presencia de RafSasa (RS, 10 μ l RafSasa 7 mg ml⁻¹), incubadas durante 1 h.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de cromatografía en capa delgada y en las medidas de actividad con el método acoplado, y la bibliografía recientemente publicada [156, 157], llegamos a la conclusión de que la RafSasa hidroliza el sustrato Gol y, por esta razón, se detectaba actividad con el método acoplado cuando la enzima se incubaba con Gol (sin Suc). Esta es una limitante del ensayo propuesto, ya que se basa en la determinación del *myo*-inositol liberado a partir de la reacción enzimática, lo cual ocurre durante la síntesis de Raf, pero también cuando se produce la hidrólisis del Gol. En las publicaciones donde se caracteriza la actividad sintasa de esta enzima se analizan los productos de reacción por HPLC, método con el que no contamos actualmente. Estudios previos reportaron que las RafSasas de *Arabidopsis* [167] y de arroz [156, 165] poseen una actividad secundaria de tipo galactosidasa. Por lo tanto, nos abocamos a caracterizar la actividad hidrolasa de la RafSasa de *B. distachyon* empleando el método de Somogyi-Nelson para cuantificar la hidrólisis de azúcares no reductores (Gol, Raf y Sta) y el método específico de la Glc oxidasa para analizar la hidrólisis de azúcares reductores (Mel y Mal). La enzima fue capaz de hidrolizar el Gol, la Raf y la Mel (Tabla 8), pero no así la Sta y la Mal a las concentraciones máximas ensayadas.

Tabla 8: Parámetros cinéticos de la RafSasa en dirección de hidrólisis. Ef. Cat.: eficiencia catalítica.

Sustrato	$S_{0,5}$ (mM)	V_{max} (U mg ⁻¹)	Ef. Cat. (M ⁻¹ s ⁻¹)
Gol	1,8 ± 0,2	0,72 ± 0,02	5,8 x 10 ²
Raf	12,3 ± 0,9	0,49 ± 0,01	5,7 x 10 ¹
Mel	84 ± 13	0,022 ± 0,002	3,8 x 10 ⁻¹

En el trabajo de Li y colaboradores [157], se muestra que las cantidades relativas de Gol y Suc determinan si se completa la reacción de transferencia (formando Raf) o se produce la hidrólisis del Gol. Por esta razón, se llevó a cabo un ensayo de inhibición de la actividad hidrolasa con respecto a la concentración de Suc y manteniendo los niveles de Gol constantes. Las medidas se hicieron empleando el método de Somogyi-Nelson. Como se observa en la Figura 33A, el aumento de los niveles de Suc produce una disminución de la actividad hidrolasa de la RafSasa, siendo casi indetectable cuando el disacárido se encuentra a una concentración de 15 mM o más. Las reacciones realizadas con concentraciones de Suc de 0, 2, 5 y 10 mM se analizaron mediante cromatografía en capa delgada. Como se puede observar en la Figura 33B, a medida que disminuye la relación Gol:Suc (es decir, a medida que aumentan los niveles de Suc)

se produce en mayor grado la síntesis de Raf (calles 4 a 7). Estos resultados demuestran que la relación de los sustratos (Suc y Gol) es determinante para la actividad de galactosiltransferasa de la RafSasa de *B. distachyon*.

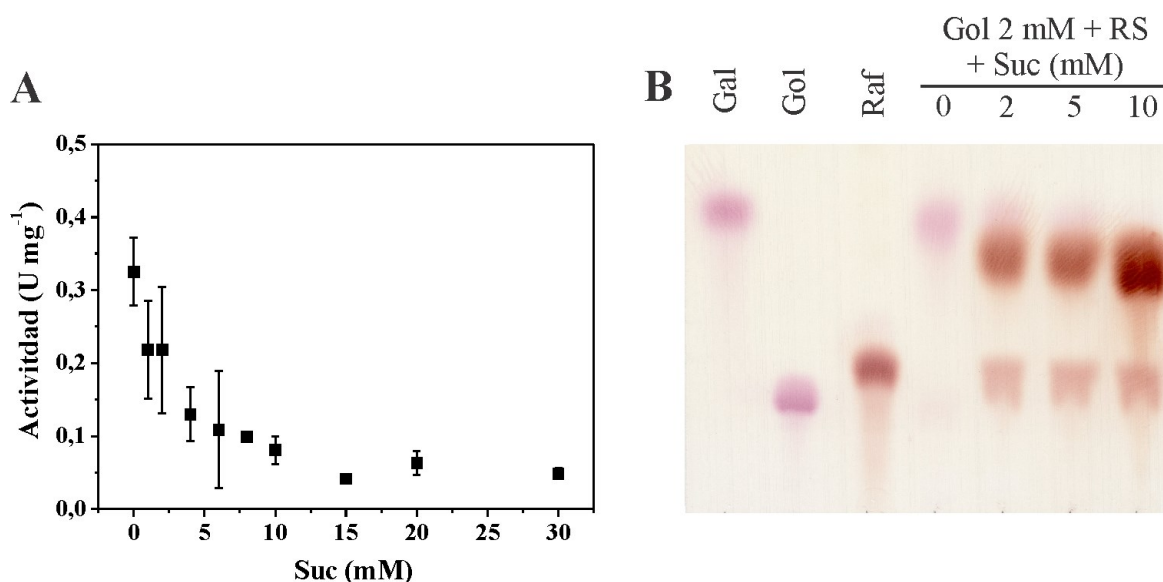


Figura 33: Ensayo de inhibición de la actividad hidrolasa de la RafSasa por Suc. **(A)** Curva de actividad hidrolasa en función de la concentración de Suc en el medio de reacción, con una concentración constante de Gol (2 mM). **(B)** Ensayo de cromatografía en capa delgada en el cual se corrieron los patrones Gal, Gol y Raf 5 mM (10 nmol) y alícuotas de las reacciones presentadas en el panel A para las concentraciones de Suc de 0, 2, 5 y 10 mM. RS: RafSasa.

4.3 Estudio del metabolismo del manitol en planta de apio

4.3.1 Metabolismo del carbono en plantas de apio crecidas bajo diferentes fotoperiodos

Se ha descrito que en hojas maduras de manzano, una especie que acumula glucitol, las concentraciones de carbohidratos fluctúan según el ciclo de luz/oscuridad [273, 274]. Tanto las concentraciones de glucitol como las de almidón se incrementan durante el día hasta llegar a un valor máximo, para luego disminuir durante la noche hasta alcanzar su nivel más bajo. Con el objeto de analizar el efecto del fotoperiodo y el estrés por frío sobre la partición del carbono en plantas de apio, se cultivaron las plantas bajo cuatro condiciones diferentes (Tabla 2). Los resultados obtenidos para Glc y Fru en los 3 fotoperiodos no mostraron un patrón definido respecto a las horas de luz u oscuridad, aunque los niveles para estos azúcares solubles fueron

similares entre sí en cada ensayo (Figuras 34 A-B, 35 A-B y 36 A-B). En el ensayo donde las plantas fueron crecidas en condiciones de día largo (16 h de luz) el contenido de almidón tampoco varía a lo largo del día (Figura 34D), a diferencia de los niveles de Suc los cuales aumentan durante las horas de luz y disminuyen durante la noche (Figura 34C). La acumulación del almidón en este caso es diferente a lo observado para la planta modelo *Arabidopsis*, la cual acumula grandes cantidades de este polisacárido en hojas durante las horas de luz, para utilizarlo como fuente de carbono durante la noche siguiente [275]. Las plantas crecidas en condiciones de fotoperiodo normal (12 h de luz, Figura 35) y corto (8 h de luz, Figura 36) mostraron acumulación neta tanto de Suc como de almidón durante el día y su posterior degradación en la noche siguiente, lo cual se asemeja a lo reportado para *Arabidopsis* [276].

Por otra parte, observamos una diferencia notable entre el contenido de azúcares solubles y almidón entre las plantas crecidas bajo los distintos fotoperiodos. Las plantas de apio crecidas en la mayor cantidad de horas de luz fueron las que presentaron los niveles más elevados de azúcares solubles y almidón; y a su vez, las plantas de fotoperiodo de 12 h de luz acumularon niveles intermedios de estos metabolitos. Las plantas que sólo contaban con 8 h de luz exhibieron las cantidades más bajas de azúcares y almidón. Los niveles de Glc y Fru fueron dos órdenes de magnitud menores en plantas crecidas en condiciones de día corto en comparación con plantas crecidas en día largo, mientras que el contenido de Suc y almidón fueron 20 y 10 veces más bajos, respectivamente. Estas diferencias pueden deberse a que las plantas crecidas en bajo fotoperiodo corto (8 h de luz) estén limitadas en la cantidad de carbono que pueden fijar. Es decir, la cantidad de luz que reciben no es suficiente para fijar niveles de CO₂ adecuados para mantener el correcto funcionamiento del metabolismo. De hecho, el fenotipo de estas plantas presentó diferencias notorias con aquellas crecidas bajo condiciones de día largo, tales como hojas más pálidas y tallos más largos.

Estos resultados sugieren que, bajo condiciones donde el carbono fijado fotosintéticamente es limitante para el normal desarrollo de las plantas de apio (por ejemplo, cuando son crecidas en día corto), las mismas utilizan almidón para sostener las demandas energéticas de los diferentes tejidos. Por el contrario, cuando el carbono fijado fotosintéticamente es abundante, las plantas podrían utilizar otros compuestos (por ejemplo, Mol) durante la noche para suplir carbono y energía a los diferentes tejidos. Esta hipótesis podría investigarse creciendo plantas de apio en fotoperiodo de día corto (8h de luz) pero a alta intensidad lumínica. De esta forma, la posibilidad de que estas plantas fijen mayores niveles de

carbono en un periodo de tiempo diario más corto se podría evaluar al comparar su fenotipo y contenido de azúcares solubles y almidón con los de las plantas crecidas en 16 h o 12 h de luz.

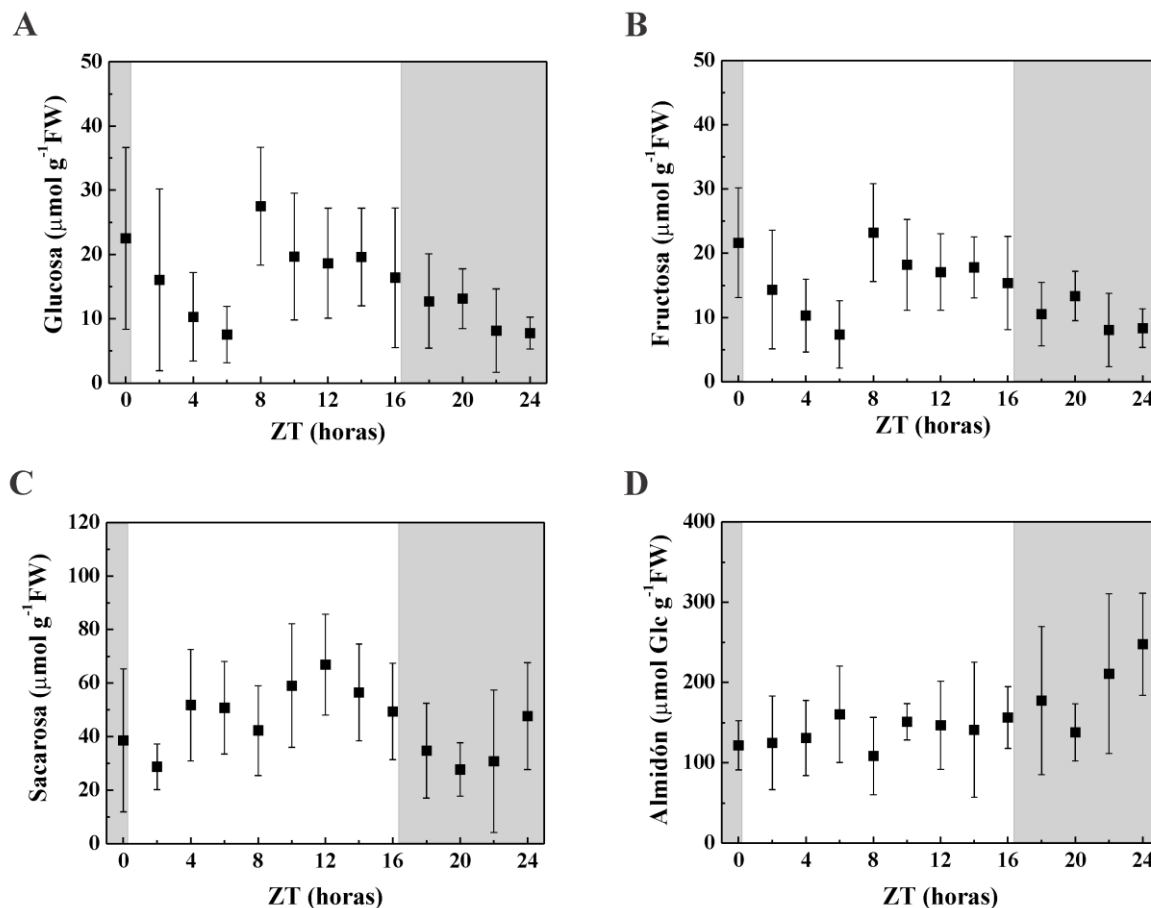


Figura 34: Análisis del contenido de azúcares solubles y almidón en plantas de apio crecidas bajo condiciones de día largo (16 horas luz/8 horas oscuridad). (A) Glc; (B) Fru; (C) Suc; y (D) Almidón. En todos los casos se muestra el promedio \pm la desviación estándar ($n=5$). Fondo blanco: muestras recolectadas durante las horas de luz; fondo gris: muestras recolectadas durante las horas de oscuridad.

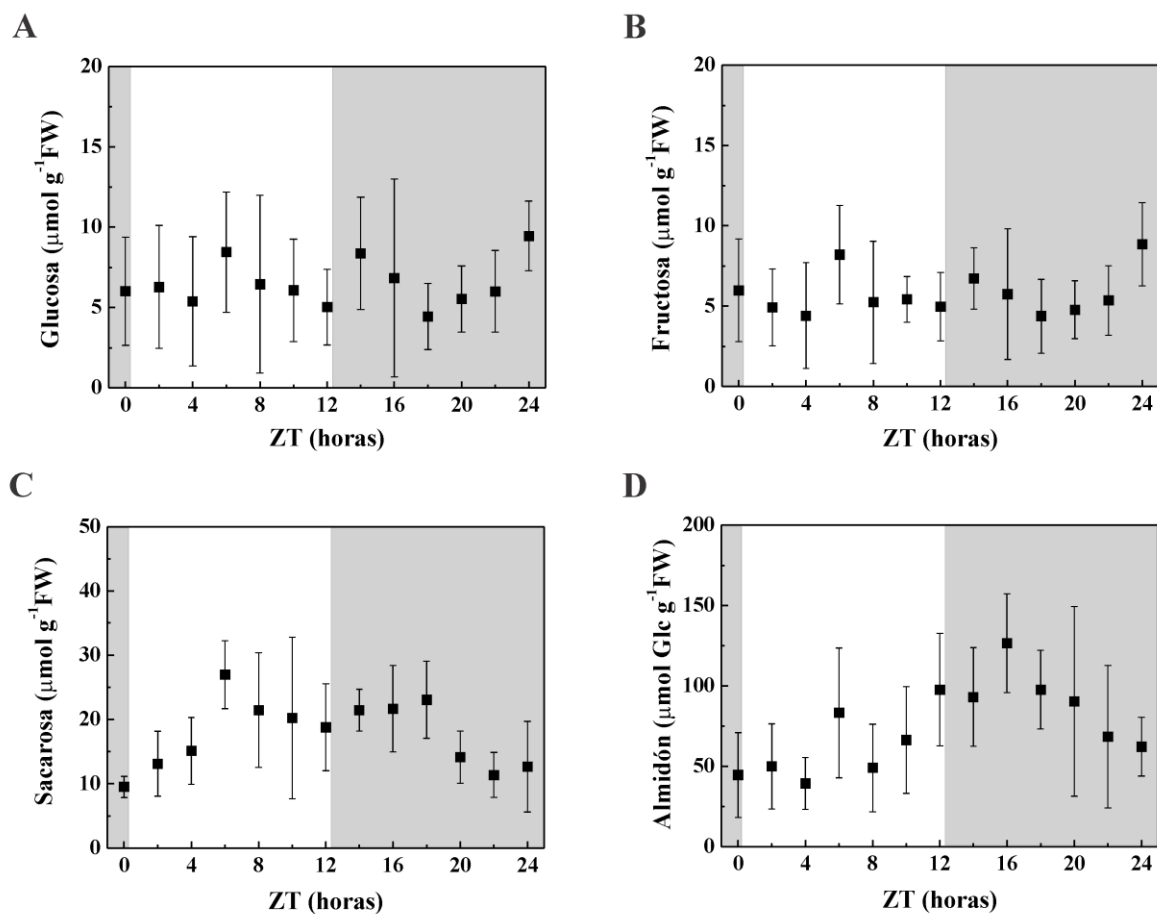


Figura 35: Análisis del contenido de azúcares solubles y almidón en plantas de apio crecidas bajo condiciones de día normal (12 horas luz/12 horas oscuridad). **(A)** Glc; **(B)** Fru; **(C)** Suc; y **(D)** Almidón. En todos los casos se muestra el promedio \pm la desviación estándar (n=5). Fondo blanco: muestras recolectadas durante las horas de luz; fondo gris: muestras recolectadas durante las horas de oscuridad.

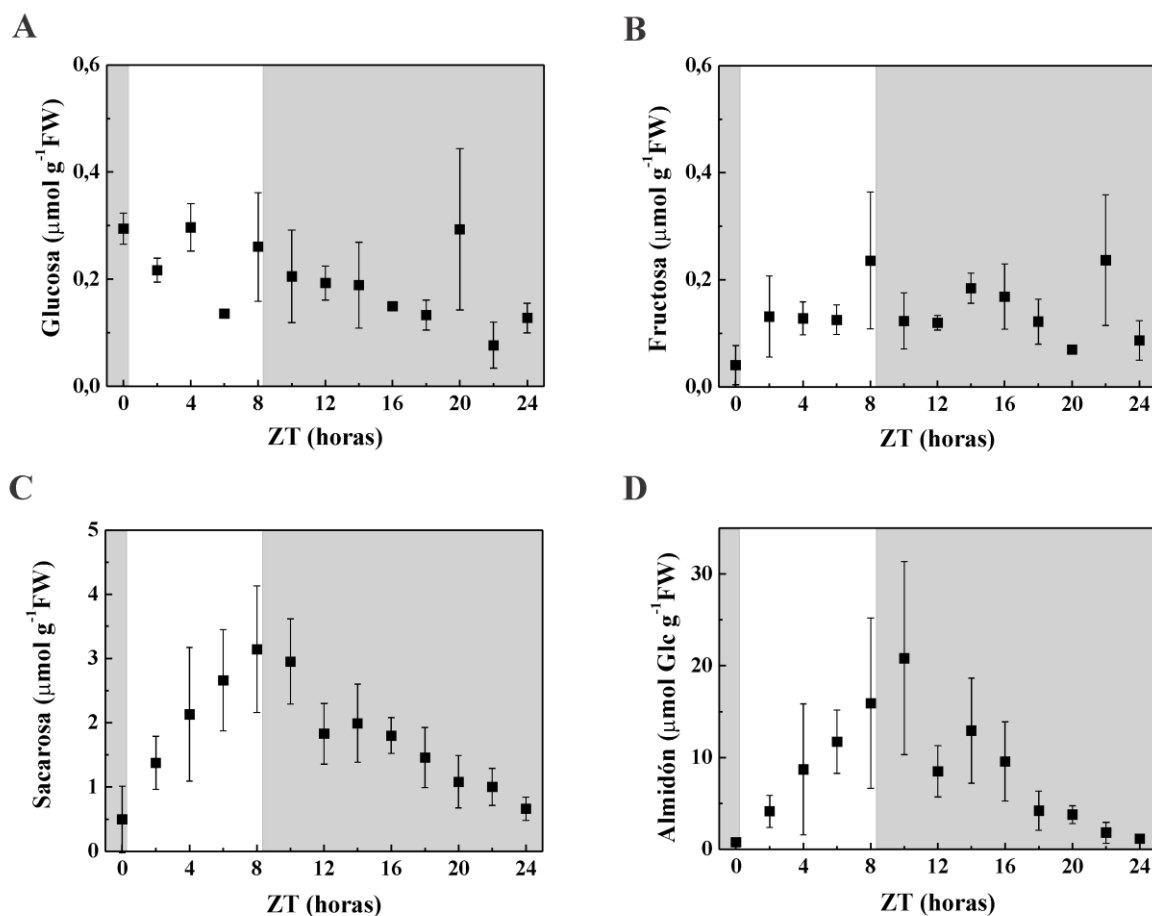


Figura 36: Análisis del contenido de azúcares solubles y almidón en plantas de apio crecidas bajo condiciones de día corto (8 horas luz/16 horas oscuridad). **(A)** Glc; **(B)** Fru; **(C)** Suc; y **(D)** Almidón. En todos los casos se muestra el promedio \pm la desviación estándar ($n=3$). Fondo blanco: muestras recolectadas durante las horas de luz; fondo gris: muestras recolectadas durante las horas de oscuridad.

4.3.2 Metabolismo del carbono en plantas de apio sometidas a estrés por frío

Con el objeto de analizar el efecto del estrés por frío sobre la partición del carbono en plantas de apio, las plantas fueron sometidas a un tratamiento de 10 °C por una semana. La Figura 37 muestra que los niveles de azúcares solubles Glc, Fru y Suc (A, B y C) y los aminoácidos totales (G) se mantuvieron relativamente constantes durante todo el ensayo, tanto en plantas crecidas a 10 como a 23 °C (tratamiento y control, respectivamente). La relación clorofila a/clorofila b (E) presentó un leve aumento y las proteínas totales (F) disminuyeron ligeramente en el periodo analizado (7 días), tanto en las plantas tratadas (10 °C) como en los controles (23 °C). En todos los casos no se observaron diferencias significativas entre los grupos bajo estudio. Por el contrario, el contenido de almidón en plantas control incrementó a lo largo

del tratamiento (7 días), pero permaneció constante en las plantas tratadas a baja temperatura (Figura 37D). Este cambio podría deberse a una menor disponibilidad de carbono (menor fotosíntesis) o a una partición diferencial de este último (incremento en la síntesis de otros metabolitos en detrimento del almidón), o bien por una combinación de ambas.

Para evaluar estas alternativas, se repitió el experimento y se determinaron los niveles de fotosíntesis de las plantas crecidas a 10 y 23 °C. Como se puede observar en la Figura 38A las plantas de apio del grupo control fijan una mayor cantidad de CO₂ a medida que transcurren los días, mientras que el grupo tratado a 10 °C mantiene constantes sus niveles de fotosíntesis durante el tiempo que dura el ensayo. En cuanto a la relación Fv/Fm (Figura 38B), se observa que los valores presentados por las plantas tratadas a 10 °C son ligeramente inferiores que los obtenidos con los controles, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Al margen de esto, ambos grupos presentaron valores de Fv/Fm en el rango esperado para plantas con estados fisiológicos normales (entre 0,6 y 0,8). Esto nos estaría indicando que la temperatura de 10 °C durante 7 días no tiene efecto estresante sobre las plantas de apio.

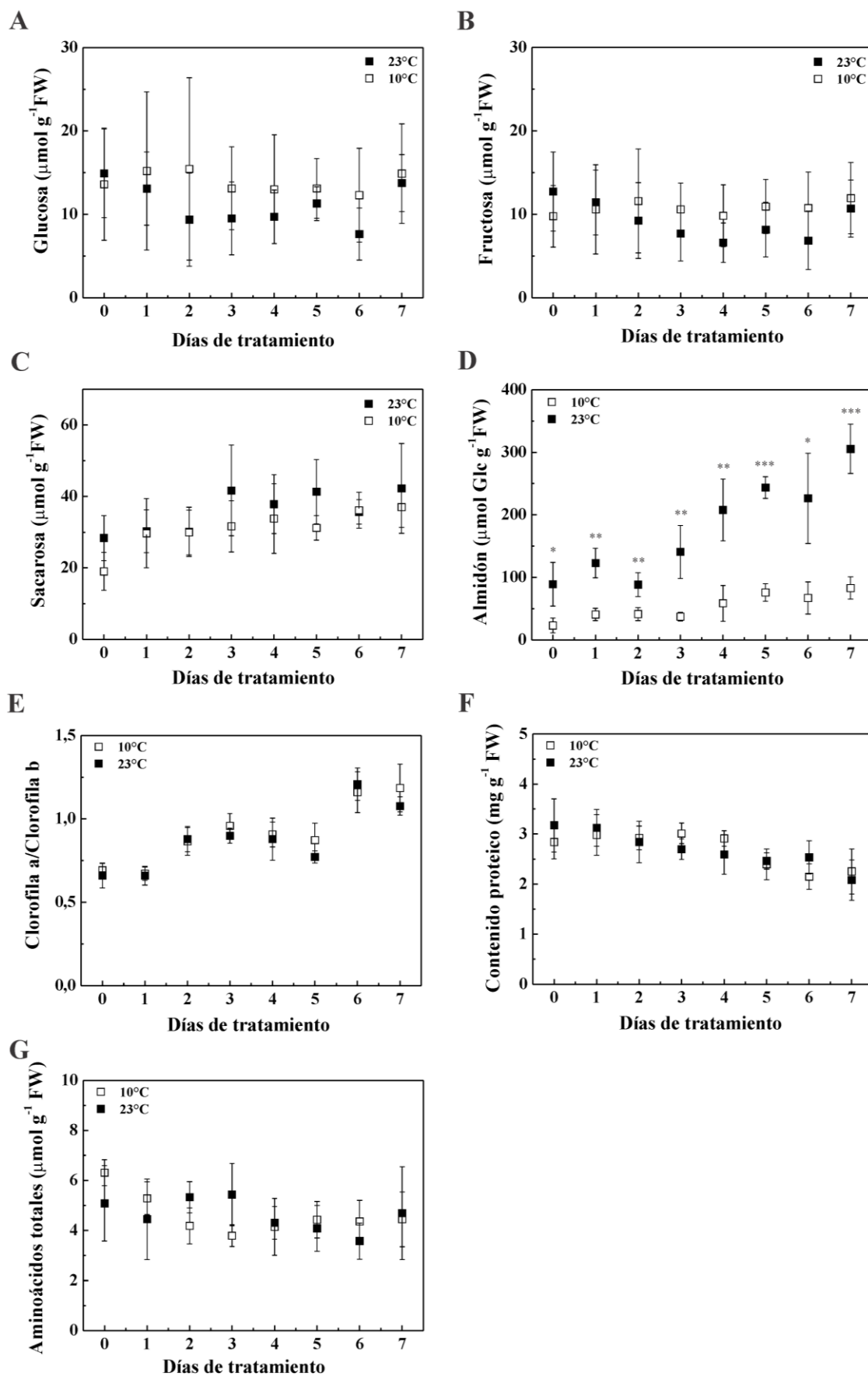


Figura 37: Análisis del contenido de azúcares solubles Glc (A), Fru (B) y Suc (C), almidón (D), clorofila a/clorofila b (E); contenido proteico (F) y aminoácidos totales (G) en plantas de apio crecidas bajo condiciones control (negro) y de estrés por frío (blanco). En todos los casos se muestra el promedio \pm la desviación estándar ($n=6$). En las gráficas A, B, C y D los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las muestras del ensayo de estrés por frío y los controles respectivos: $*P<0,05$, $**P<0,01$ y $***P<0,001$ (2-Sample t, Minitab Statistical Software).

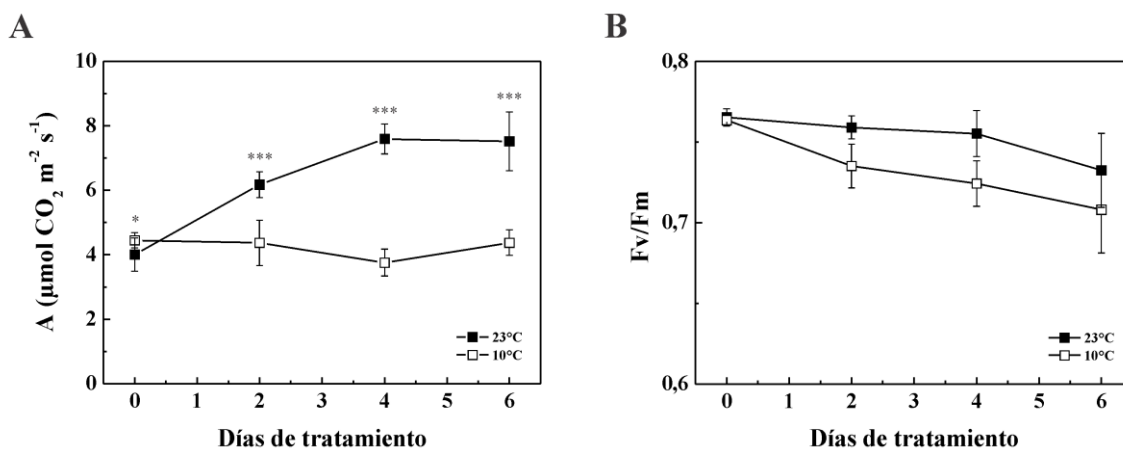


Figura 38: Medidas de los niveles de CO₂ fijados (A) y de la eficiencia cuántica del PSII (B) de la cuarta hoja de las plantas de apio crecidas bajo condiciones control (negro) y de estrés por frío (blanco). Notar que en B la escala se muestra de 0,6 a 0,8. En todos los casos se muestra el promedio \pm la desviación estándar ($n=10$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las muestras del ensayo de estrés por frío y los controles respectivos: $*P<0,05$, $**P<0,01$ y $***P<0,001$ (2-Sample t, Minitab Statistical Software).

5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

5.1 Sobre las enzimas del metabolismo del manitol en planta de apio

La superfamilia de las AKR se encuentra distribuida en todos los reinos vivientes, desde procariontes hasta animales, y sus miembros catalizan una gran variedad de reacciones [55]. Esta superfamilia de proteínas incluye aldosa reductasas, aldehído reductasas, hidroxil esteroide deshidrogenasas y dihidrodiol deshidrogenasas [242]. Estas enzimas reducen sustratos tales como aldehídos de azúcar, ceto-esteroides, ceto-prostaglandinas, aldehídos de la vitamina A, quinonas y subproductos de la peroxidación lipídica [57]. Aunque la mayoría de las AKR son proteínas monoméricas de aproximadamente 320 aminoácidos de longitud, los miembros de las familias AKR2, AKR6 y AKR7 pueden formar multímeros [55]. En plantas, se han descrito recientemente 35 proteínas pertenecientes a la súper-familia de las AKR, y en particular a las familias 2, 4 y 6 [277]. La familia AKR2 incluye 14 miembros, entre los cuales se encuentran la Man6PRasa de apio y las Ald6PRasas de manzano y durazno [40, 58, 59].

La Man6PRasa de apio fue purificada hasta homogeneidad electroforética, lo cual nos permitió su caracterización cinética. La enzima recombinante mostró propiedades cinéticas similares a las publicadas para la enzima purificada de fuente y a otras Ald6PRasas de rosáceas ya caracterizadas [53, 58, 59] (Tabla Suplementaria 1). Además, fue capaz de utilizar el azúcar no fosforilado Man y también, con menor eficiencia, la Glc6P. Este tipo de comportamiento ha sido reportado para otras reductasas de la familia AKR2, las cuales mostraron una marcada especificidad por el azúcar sustrato. En contraste, las AKR de la familia 4 de plantas presentan una especificidad relajada, pudiendo utilizar una multiplicidad de sustratos [278]. En cuanto a su estructura cuaternaria, la Man6PRasa resultó ser un dímero, en concordancia con lo ya reportado para otros miembros de la familia AKR2 [53, 58, 59, 241].

Se obtuvieron cristales de la Man6PRasa en presencia de NADP⁺ y Man6P y se logró dilucidar su estructura. Cabe destacar que esta es la primera estructura resuelta de un miembro de la familia AKR2 de plantas. A partir de esta nueva información fue posible llevar a cabo un análisis más detallado de los residuos involucrados en el sitio activo, como así también los aminoácidos que forman parte de la unión a los sustratos. La estructura tridimensional de la Man6PRasa presenta un motivo de barril (α/β)₈, el cual se encuentra conservado en todas las proteínas de la familia AKR. También muestra grandes bucles en la parte posterior del barril,

cuyas modificaciones son las que determinan la especificidad por el azúcar-P, y tiene un dominio de unión al cofactor, el que se encuentra conservado en otros miembros de la familia. Este tipo de enzimas tienen un mecanismo cinético del tipo bi-bi ordenado, en el cual el cofactor NAD(P)H se une primero y sale al final [279, 280]. Las AKR retienen una tétrada catalítica conservada, estando ésta constituida en la Man6PRasa por los residuos Asp⁴², Tyr⁴⁷, Lys⁷⁶ e His¹⁰⁷.

Si bien los ensayos de cristalización se habían llevado a cabo en presencia del cofactor NADP⁺ y del sustrato Man6P, en el cristal se puede observar la presencia de ácido manónico. Luego de hacer un ensayo de estabilidad de sustratos en condiciones similares a las utilizadas para la cristalización, llegamos a la conclusión de que la Man6P que se había adicionado al medio perdía el fosfato con el pasar de los días y luego se oxidaba, explicando así la aparición del ácido manónico en la estructura cristalina de la Man6PRasa.

También se hizo un estudio de desplazamiento de temperatura de la Man6PRasa de apio en presencia de NADP(H) y Man6P, para evaluar si los mismos tienen algún tipo de influencia en la estabilización de la estructura. Se advirtió que a concentraciones crecientes de Man6P la temperatura de desnaturalización de la Man6PRasa disminuye aproximadamente 2 °C con respecto al control de enzima sin ligando. En cuanto al cofactor NADPH y su forma oxidada (NADP⁺), encontramos que ambos estabilizan la estructura de la proteína, aumentando su temperatura de desnaturalización en 8 y 5 °C, respectivamente. Este resultado coincide con datos bibliográficos, los cuales mencionan que una pequeña porción del bucle 7 de la enzima experimenta un cambio conformacional al unirse el cofactor y bloquea el grupo fosfato del NADP(H) en el sitio activo, y esto representa el paso limitante del mecanismo de reacción [281–283]. Por estudios estructurales comparativos entre las formas apo y holo de otras aldosas reductasas se ha establecido que el cofactor NADPH no sólo proporciona el hidruro para la reducción del sustrato, sino que también es un componente estructural clave en la organización tanto de los residuos del sitio activo como del bolsillo de unión del sustrato, produciendo una forma catalíticamente competente de la enzima [284, 285]. Estos datos están de acuerdo con el mecanismo de reacción bi-bi ordenado propuesto para las enzimas de la familia 2 de las AKR, donde primero se une el cofactor y luego lo hace el sustrato carbonado.

Por otra parte, se determinaron específicamente los residuos que estarían interaccionando con el grupo fosfato de la Man6P. Varios de estos aminoácidos forman parte del sitio activo y la mayoría se encuentran conservados en diferentes reductasas; sin embargo, la Lys⁴⁸ sólo se halla

en las secuencias de reductasas cuyo sustrato es un azúcar-P. Para definir la importancia de la Lys⁴⁸ en la interacción con el grupo fosfato de la Man6P, se obtuvo la mutante sitio-dirigida Man6PRasa-K48A. Haciendo un análisis comparativo de los parámetros cinéticos obtenidos para la enzima salvaje y la mutante observamos que el $S_{0,5}$ para la Man se mantiene prácticamente inalterado, mientras que la V_{max} obtenida con este sustrato resulta mayor en la enzima mutante, lo que resulta en una eficiencia catalítica aumentada con respecto a la de la enzima salvaje. La afinidad por el sustrato Man6P y la actividad enzimática se ven disminuidas en la mutante, por lo que la eficiencia catalítica con el azúcar-P también se ve disminuida en un orden de magnitud. Estos resultados sustentan la significancia de la Lys⁴⁸ en la unión del sustrato Man6P y, más específicamente, en la estabilización de su carga negativa.

La MolDHasa es una enzima que se encuentra en todas las formas de vida, incluyendo animales, levaduras, bacterias y plantas. Esta enzima pertenece a la superfamilia de las MDRs, y de acuerdo a similitud de secuencias es incluida en la familia cinamil alcohol deshidrogenasas (CAD), donde también se agrupan las sinapil alcohol deshidrogenasas [63, 286]. La MolDHasa de plantas es distinta de las MolDHasas que se encuentran en microorganismos, que oxidan Mol a Fru o Mol1P a Fru6P [287]. En apio, la MolDHasa proporciona el paso inicial por el cual el Mol transportado hacia los tejidos heterotróficos es direccionado hacia el metabolismo central [71].

En este trabajo de tesis se llevó a cabo el clonado molecular del gen que codifica para la MolDHasa de apio y se lograron obtener células de *E. coli* que expresaron la enzima recombinante de forma soluble y activa. La MolDHasa altamente purificada adopta una estructura homodimérica en solución, lo cual difiere con la estructura monomérica determinada en el trabajo de Stoop y colaboradores [50]. Sin embargo, la búsqueda por alineamiento de secuencias en el servidor *Protein Data Bank* arrojó las estructuras cristalizadas de varias deshidrogenasas de plantas, con identidades de entre 55 y 72% con la proteína en estudio, cuyas estructuras tridimensionales son homodiméricas [288–291]. Cabe destacar que la publicación de Stoop [50] es la única existente donde se determina la estructura cuaternaria de la MolDHasa de apio. Este detalle es también advertido por la publicación de Persson y colaboradores [63], donde se menciona que la estructura monomérica de la MolDHasa difiere significativamente de la reportada para los otros miembros de la familia MDR, las cuales son diméricas o tetraméricas. Una posible explicación a la discrepancia entre el resultado publicado y los obtenidos en este trabajo de Tesis puede ser el *buffer* utilizado para la determinación de la masa molecular por

filtración por geles. Existe evidencia de que una misma enzima puede presentar diferentes conformaciones cuaternarias de acuerdo a la especie y pH del *buffer* del medio [292]. Por lo tanto, concluimos que el resultado obtenido en este trabajo de tesis, que indica que la estructura de la MolDHasa de apio es dimerica, es correcto.

Se caracterizó cinéticamente la enzima recombinante en presencia de los sustratos fisiológicos (Mol y NAD⁺), obteniéndose parámetros similares a los reportados para la enzima purificada de fuente [67]. También se obtuvo un modelo por homología de la MolDHasa de apio, utilizando como templado la estructura resuelta de la sinapil alcohol deshidrogenasa de *P. tremuloides*. A partir de la estructura modelada se realizó un análisis más detallado del sitio activo, el cual se compone de aminoácidos de ambas subunidades. En dicho modelo se pudo observar que los residuos de Cys¹⁰³, Cys¹⁰⁶, Cys¹⁰⁹ y Cys¹¹⁶ son los encargados de formar un complejo con el Zn²⁺ estructural, mientras que los residuos de Cys⁵⁰ y Cys¹⁶⁶ forman una tetrada junto con los aminoácidos His⁷⁰ y Ser⁵² para formar un complejo con el Zn²⁺ catalítico (Ser⁵² a través de una molécula de agua).

La sinapil alcohol deshidrogenasa empleada como molde es un homodímero con una identidad de 71% con la MolDHasa de apio y dependiente del cofactor NADP⁺. Se llevó a cabo un alineamiento de estructuras para precisar cuáles residuos estarían implicados en la unión a cofactor. De esta manera, se lograron seleccionar tres aminoácidos a mutar para cambiar la especificidad de la MolDHasa por el cofactor NAD⁺ a NADP⁺. A partir de este análisis se diseñaron cuatro mutantes: D214S, D214S-I215T, D214S-I215T-S343N y D214S-S343N. Al analizar los resultados obtenidos de la caracterización cinética se puede destacar que la afinidad por el Mol en presencia de NADP⁺ aumenta drásticamente desde la inserción de la primera mutación (D214S), mientras que la afinidad por el azúcar-alcohol aumenta aún más en las mutantes D214S-I215T y D214S-I215T-S343N. El $S_{0,5}$ para el Mol en presencia de NAD⁺ obtenido para la mutante D214S resultó ser similar al observado para la enzima salvaje, pero dicho valor aumenta a medida que se adicionan mutaciones. La afinidad aparente por el cofactor NADP⁺ aumenta en el sentido D214S < D214S-I215T < D214S-I215T-S343N; sucediendo exactamente lo contrario para la afinidad aparente por el NAD⁺.

Estudios previos con deshidrogenasas de plantas dependientes de NADP⁺ mostraron que el residuo de Ser²¹⁴ arriba referido es el principal determinante de la especificidad por el cofactor [293]. La presencia de un residuo de Ser o Thr en la posición correspondiente es importante para estabilizar el grupo fosfato del NADP⁺, y es lo que permite que la enzima lo distinga del NAD⁺.

En este tipo de enzimas, la especificidad por el cofactor se puede cambiar a NAD^+ sustituyendo el aminoácido equivalente por Asp o Glu, cuyas cadenas laterales pueden formar un puente de hidrógeno con los grupos hidroxilo 2' y 3' de la ribosa de la adenina del NAD^+ [289, 294]. Tanto las V_{\max} como las eficiencias catalíticas de las mutantes simple (D214S) y doble (D214S-I215T) disminuyen para ambos cofactores, pero este efecto se revierte en la mutante D214S-I215T-S343N: ésta tiene una velocidad y eficiencia catalíticas mayores con NADP^+ que con NAD^+ .

A partir de estos resultados podemos decir que la triple mutante logra el objetivo de cambio de especificidad de cofactor propuesto. Existen muchos trabajos donde se llevan a cabo mutaciones para el cambio de cofactor, pero un examen más detenido de estos estudios muestra que la inversión de la especificidad del cofactor sigue siendo un problema sin resolver: muchos de estos esfuerzos solo tuvieron un éxito marginal en lograr una especificidad revertida sin comprometer la actividad catalítica. Aunque las características e interacciones de las proteínas que componen el bolsillo de unión a (fosfo-) adenosina se encuentran distantes de los sitios catalíticos de las enzimas, se ha demostrado que tienen una influencia enorme sobre la actividad enzimática. Cambios químicos sutiles en el cofactor pueden tener un efecto dramático sobre la actividad [295], y mutaciones en la parte del bolsillo de unión a cofactor que interactúa con la adenosina pueden afectar la cinética de la reacción [296] e incluso la especificidad por el sustrato [297]. Combinada con la naturaleza dinámica de la unión del cofactor [298–301], esta sensibilidad a la perturbación estructural ha demostrado ser un obstáculo importante para los enfoques de diseño racional y computacional [302].

Por otro lado, se observó que la mutación I215T parecía ser perjudicial para la actividad general de la enzima, por lo que se planteó la obtención de una cuarta mutante que no incluía este cambio. La mutante D214S-S343N tiene la misma afinidad aparente por el sustrato Mol en presencia de NAD^+ que la versión salvaje, pero este parámetro se ve aumentado en la reacción con NADP^+ , siendo similar al de la mutante simple (D214S). La MolDHasa-D214S-S343N también tiene mejor afinidad por el NADP^+ que por el NAD^+ y, si bien la V_{\max} aún es mayor con NAD^+ , la V_{\max} con NADP^+ es superior que para las otras mutantes e incluso que la de la enzima salvaje con dicho cofactor. Finalmente, al analizar la eficiencia catalítica para el cofactor, se puede notar que: (i) con NAD^+ ésta es aproximadamente 5 veces menor que la de la enzima salvaje y (ii) con NADP^+ es 16 veces mayor al hacer la misma comparación y en ambos casos los valores obtenidos para este parámetro son mejores que los de las demás mutantes.

Específicamente, la mutante D214S-S343N es capaz de utilizar con la misma eficiencia NADP⁺ y NAD⁺; pero la eficiencia catalítica con Mol es mejor con el primero.

Resumiendo, en este trabajo de tesis no sólo se caracterizaron cinética y estructuralmente enzimas involucradas en la vía del manitol en plantas de apio, sino que se obtuvieron nuevas versiones de éstas con especificidad alterada por el sustrato o el cofactor, lo que permite ampliar el espectro de reacciones que catalizan los productos finales que se obtienen de ellas. Por lo tanto, las enzimas mutantes aquí generadas podrían ser empleadas para el agregado de valor, recuperación y aprovechamiento de sub-productos industriales mediante procesos de biorrefinerías.

5.2 Sobre las enzimas de la vía de síntesis de rafinosa en *B. distachyon*

En contraposición con la importancia fisiológica de la Raf, sobre todo frente a diferentes condiciones de estrés abiótico, el número de estudios sobre las enzimas implicadas en el metabolismo de este oligosacárido es relativamente escaso [118, 186, 303]. Por ello, en este trabajo de tesis se informa la producción recombinante de tres enzimas de *B. distachyon* involucradas en la síntesis de Raf, USPPasa, GolSasa y RafSasa.

Se ha determinado la existencia de USPPasas en la mayoría de las especies de plantas, parásitos eucariotas y algunas especies bacterianas, pero no se han reportado en vertebrados [130, 135]. La USPPasa cataliza la conversión reversible de una amplia gama de azúcares-1P y UTP al correspondiente UDP-azúcar y PPI. Uno de los productos principales de la reacción catalizada por la USPPasa es la UDP-Gal, la cual se utiliza para la síntesis de galactolípidos, tales como monogalactosil diacilglicerol y digalactosil diacilglicerol, constituyentes de una gran parte de las membranas del cloroplasto [304, 305]. Además, la Gal que se origina a partir de UDP-Gal se deposita en las paredes celulares como componente de hemicelulosas, como los galactomananos [306] y de pectinas, como ramnogalacturonano I y ramnogalacturonano II [307, 308]. La UDP-Gal también se usa como precursor del Gol, que junto con la Suc se utiliza para la síntesis de los polisacáridos Raf y Sta [309]. En plantas, la UDP-Gal también podría ser utilizada para formar conjugados de hormonas como auxina-galactósido [310] y metabolitos secundarios como el triterpenoide saponina-galactósido [311].

La masa molecular de USPPasa determinada por SDS-PAGE y cromatografía de filtración por geles están de acuerdo con el valor teórico y con los datos reportados para

USPPasas de especies de dicotiledóneas [107, 125, 131, 132]. La USPPasa recombinante es activa como monómero y, a diferencia de las UDPGlcPPasas de parásitos y plantas, no hay evidencia de oligomerización [105, 136]. La reacción catalizada por la USPPasa es reversible [123, 134] y dependiente de Mg^{2+} [126, 127, 132], siguiendo un mecanismo bi-bi ordenado [134]. En este trabajo, se caracterizó cinéticamente la USPPasa en la dirección de la síntesis de UDP-azúcar. La mostró una afinidad aparente similar por Gal1P y Glc1P, pero 5 veces menor por GlcA1P. Estos parámetros son consistentes con los reportados previamente para USPPasas de otras plantas (Tabla Suplementaria 2). Curiosamente, el $S_{0,5}$ para UTP se mantuvo relativamente constante, independientemente del azúcar-1P utilizado. Los parámetros cinéticos no se pudieron determinar para GlcN1P, GlcNAc y Man1P, porque las curvas no alcanzaron la saturación a la concentración más alta probada, lo que indica que la afinidad aparente por estos sustratos es considerablemente menor que para Gal1P y Glc1P.

El genoma de *B. distachyon* tiene dos genes que codifican GolSasas putativas, que comparten una identidad de aminoácidos de ~74%. Reconstruimos un árbol filogenético utilizando 95 secuencias de GolSasas y de proteínas similares a la glucogenina de varias especies de plantas. Las secuencias se dividieron en cuatro grupos principales, y ambas GolSasas de *B. distachyon* se ubicaron en el clado que contenía GolSasas de especies monocotiledóneas, aunque en diferentes subgrupos. La presencia de varios genes de GolSasa en la misma especie sugiere la duplicación de genes seguida de sub-funcionalización, un proceso que conduce a innovaciones moleculares en los organismos [312, 313]. La sub-funcionalización de las GolSasas [314], no sólo en *B. distachyon* sino también en otras especies de plantas, podría permitir que las plantas toleren diferentes condiciones de estrés abiótico [271]. Como se mencionó anteriormente, los genes que codifican para la GolSasa se expresan de forma diferencial en plantas de *Arabidopsis* expuestas a sequía, calor y alta salinidad (*AtGolS1* y *AtGolS2*) o frío (*AtGolS3*) [102].

El análisis por SDS-PAGE y cromatografía de filtración por geles mostró que la GolSasa de *B. distachyon* es un monómero, lo cual es consistente con los datos informados previamente para GolSasas de otras especies de plantas [113, 121, 258, 259] (Tabla Suplementaria 3). La actividad de la enzima es mayor en presencia de Mn^{2+} que Mg^{2+} , siendo la primera requerida para una catálisis óptima [113, 121, 154, 260, 315]. Los valores óptimos de pH y temperatura determinados para la GolSasa son similares a los reportados para otras GolSasas de plantas [101, 113, 148, 149], y la energía de activación calculada es similar a la obtenida para la Ald6PRasa de

hojas de manzano [58]. La caracterización cinética de la GolSasa mostró valores de $S_{0,5}$ y V_{\max} que se asemejan a los descriptos para GolSasas de especies de dicotiledóneas.

La secuencia proteica de la GolSasa mostró motivos altamente conservados en otros miembros de la familia GT8 [140]. Esta información, combinada con el modelo obtenido por reconocimiento estructural, permitió determinar los residuos supuestamente implicados en la unión de los sustratos y del metal. Se ha demostrado que los dos residuos de Asp del motivo DxD presentes en las glicosiltransferasas, así como los dos grupos fosfato del NDP-azúcar, están involucrados en la coordinación del ion metálico divalente [316–318]. Esto es consistente con nuestros resultados de modelado para la GolSasa, donde se observó que el Asp¹²¹ y el Asp¹²³ se unen al ion Mn²⁺.

Un mecanismo común que afecta la actividad enzimática *in vivo* es la oxidación de residuos de Cys, principalmente causada por especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno y GSSG [319]. La GolSasa contiene seis residuos Cys; uno de ellos (la Cys²⁶¹) es parte del sitio catalítico putativo y podría estar involucrado en la unión de ambos sustratos, UDP-Gal y *myo*-inositol. La enzima recombinante se inactivó mediante oxidación con diamida y la actividad se recuperó por reducción con DTT y *Eco*Trx, lo que sugiere la existencia de un mecanismo regulador redox. A diferencia de la diamida, que se considera un oxidante suave, el H₂O₂ es un oxidante fuerte [320]. La incubación de la enzima recombinante con H₂O₂ provocó una inactivación irreversible, probablemente debido a la oxidación del tiol a ácidos sulfínico o sulfónico, estados de oxidación que no pueden revertirse con DTT o Trx [321, 322]. Si bien la modificación oxidativa de uno o unos pocos aminoácidos expuestos a la superficie generalmente tiene poco efecto sobre la estabilidad de la enzima, la oxidación se vuelve más crítica si el aminoácido modificado se encuentra dentro del sitio activo o participa activamente en el mecanismo catalítico, como sería el caso de la Cys²⁶¹ de la GolSasa [320]. Hasta donde sabemos, esta es la primera caracterización cinética completa de una GolSasa de una especie de monocotiledónea.

Uno de los pasos clave en la biosíntesis de Raf y RFO está mediado por la enzima RafSasa. Esta pertenece a un grupo de enzimas de la familia de las GH36 que ejecutan la transferencia de un residuo galactosilo del Gol a la Suc. Esta transferencia produce la molécula de trisacárido Raf, liberándose *myo*-inositol como un subproducto [323]. Se obtuvo de forma recombinante la RafSasa de *B. distachyon* y su caracterización estructural determinó que es un monómero. La masa molecular determinada por SDS-PAGE y filtración por gel concuerda con

el valor teórico calculado a partir de la secuencia aminoacídica y es semejante a las publicadas para RafSasas de otras especies de plantas [114, 157, 167]. Mediante estudios detallados de la cinética de estado estacionario se estableció que la RafSasa es una transglicosidasa que opera por un mecanismo de reacción del tipo ping-pong bi-bi y que también puede actuar como una glicosil hidrolasa [114]. En un inicio se planteó llevar a cabo la caracterización cinética de la RafSasa en el sentido de síntesis empleando un sistema de enzima acoplada, siguiendo la aparición del producto Raf indirectamente a partir de la detección del *myo*-inositol liberado. Pero los resultados obtenidos demostraban que se estaba produciendo *myo*-inositol aun en ausencia del sustrato Suc. Por esta razón se decidió analizar la composición de las reacciones, mediante la técnica de cromatografía en capa delgada, advirtiéndose la aparición de un producto que no se había tenido en consideración. La RafSasa estaba hidrolizando el sustrato Gol a Gal y *myo*-inositol, no produciendo Raf.

Esta dualidad de la actividad de la RafSasa de *B. distachyon* ya había sido reportada para las enzimas de arroz, maíz, arveja y Arabidopsis [114, 156, 157, 167]. De esta forma, se procedió a caracterizar la actividad de la RafSasa en sentido de hidrólisis. La enzima fue capaz de utilizar como sustratos Gol, Raf y Mel y los parámetros obtenidos para los dos primeros son similares a los reportados para otras especies [114, 156, 157, 167] (Tabla Suplementaria 4). Por otro lado, en las condiciones ensayadas no fue capaz de hidrolizar Mal ni Sta; siendo tal vez la razón de esto que la primera es un disacárido con una unión α -1,4, a diferencia de los sustratos mencionados anteriormente que tienen una unión α -1,6, y que la segunda a pesar de contar con enlaces α -1,6 es un tetrasacárido lo cual tal vez incide en su impedimento de unión al sitio activo. En un trabajo de investigación reciente [157] se estableció que la disponibilidad de Suc determina directamente si la RafSasa sintetiza Raf o hidroliza el Gol, condición que se cumple también para la enzima en estudio. Se realizó una curva de actividad hidrolítica a una concentración fija de Gol y crecientes de Suc, probándose que la disminución de la hidrólisis del Gol es proporcional a la relación Gol:Suc.

La combinación de información estructural con datos bioquímicos permite establecer relaciones estructura-función, en el contexto de escenarios evolutivos y metabólicos en los que participan las enzimas estudiadas. En general, este trabajo de Tesis sienta las bases para comprender mejor la síntesis de Raf en las plantas.

5.3 Sobre el estudio del metabolismo del manitol en plantas de apio

Está bien establecido que aunque la asimilación fotosintética del carbono ocurre sólo durante las horas de luz, los procesos de crecimiento y mantenimiento que requieren carbono se dan durante todo el día [276]. El carbono está disponible de noche porque la tasa de asimilación en las horas de luz es suficiente para mantener no sólo la demanda inmediata para el crecimiento, sino también la acumulación de compuestos de almacenamiento en la hoja, que luego son movilizados para proveer carbono para el crecimiento durante la noche. En *Arabidopsis* y otras especies de plantas, los productos inmediatos de la asimilación fotosintética de carbono en el día se reparten entre Suc (disponible de inmediato para el crecimiento) y almidón, que se acumula en la hoja durante las horas de luz. Por la noche, el almidón se degrada para producir Suc. En plantas que crecen con un adecuado nivel de nutrientes y temperatura favorable, los niveles de almidón son relativamente bajos al final de la noche. Este patrón de asimilación, almacenamiento y utilización del carbono se encuentra finamente modulado y es de importancia fundamental para el mantenimiento de un balance adecuado de carbono, tanto para sostener el crecimiento durante el ciclo de luz y oscuridad como así también para establecer una nueva tasa de crecimiento en respuesta a alteraciones en la disponibilidad de carbono impuestas por perturbaciones ambientales [276].

Por otra parte, los cambios en las condiciones ambientales dan como resultado ajustes precisos de asimilación y almacenamiento que sirven para mantener este patrón. Por ejemplo, un cambio en la duración del fotoperiodo genera alteraciones en la partición de fotoasimilados entre almidón y Suc durante el día y en la tasa de degradación del almidón por la noche. La tasa de síntesis de almidón está inversamente relacionada con la duración del fotoperiodo, de modo que la proporción del polisacárido reservado para su uso por la noche es mayor cuanto más larga es la noche. Además, la tasa de degradación de almidón durante la noche es ajustada de forma que continúe para permitir la utilización casi completa del suministro de almidón precisamente al final de la noche [276].

La prevalencia de este patrón básico de asimilación, acumulación y utilización de carbono se ha demostrado en diferentes especies vegetales, pero no en apio. Con el objeto de analizar el efecto del fotoperiodo sobre la partición del carbono en plantas de apio, se cultivaron las plantas bajo diferentes condiciones: día largo (16/8 h), día normal (12/12 h) y día corto (8/16 h). Los resultados obtenidos con plantas crecidas en condiciones de día largo muestran que los

niveles de Suc se elevan durante el día y disminuyen en las horas de oscuridad, mientras que la Glc, la Fru y el almidón no mostraron un patrón definido. La acumulación del almidón en este caso es diferente a lo observado para la planta modelo *Arabidopsis*, la cual acumula grandes cantidades de este metabolito en hojas durante las horas de luz para utilizarlo como fuente de carbono durante la noche siguiente [324]. Las plantas crecidas con fotoperiodos normal y corto no mostraron un patrón claro para los niveles de Glc y Fru; sin embargo, mostraron una acumulación neta de Suc y almidón en las horas de luz y su posterior degradación en la noche siguiente, lo cual se asemeja a lo reportado para *Arabidopsis* [276].

Nuestros resultados concuerdan con los de estudios anteriores, donde se muestra que la tasa de síntesis de almidón aumenta y la tasa de degradación del almidón disminuye en fotoperiodos cortos [276, 325–327], marcando el ritmo de descomposición del almidón y evitando así una completa depleción de Suc por la noche. Se ha descrito que la capacidad enzimática para la fotosíntesis se mantiene cuando las plantas son crecidas en fotoperiodos cortos, mientras que la capacidad enzimática de las vías necesarias para el crecimiento se reduce [328]. Los niveles de azúcares solubles y almidón en las plantas de fotoperiodo normal y corto fueron considerablemente menores que para las plantas crecidas bajo condiciones de fotoperiodo largo. Estos resultados sugieren que, bajo condiciones donde el carbono fijado fotosintéticamente es limitante para el normal desarrollo de las plantas de apio (por ejemplo, cuando son crecidas en día corto), las mismas utilizan el almidón para sostener las demandas energéticas de los diferentes tejidos. Por el contrario, cuando el carbono fijado fotosintéticamente es abundante, las plantas podrían utilizar otros compuestos (por ejemplo, Mol) durante la noche para suplir carbono y energía a los diferentes tejidos.

También se llevó a cabo un ensayo donde las plantas de apio se crecieron bajo estrés por frío (10 °C). En este caso los niveles de azúcares solubles se mantuvieron relativamente constantes tanto en plantas crecidas a 10 como a 23 °C (control). El contenido de almidón en plantas control incrementó a lo largo del tratamiento, pero permaneció constante en las plantas crecidas a baja temperatura. Este cambio podría deberse a una menor disponibilidad de carbono (menor fotosíntesis), a una partición diferencial del mismo (incremento en la síntesis de otros metabolitos en detrimento del almidón) o a una combinación de ambas. Para evaluar estas hipótesis, se determinaron los niveles de fotosíntesis y de la relación Fv/Fm de las plantas crecidas a 10 y a 23 °C. Se pudo determinar que las plantas de apio del grupo control fijaban mayores niveles de CO₂ que las crecidas en condiciones de baja temperatura. Mientras que la

eficiencia fotoquímica del PSII, evaluada a partir de la medida de F_v/F_m , se mantiene dentro de valores considerados normales para ambos grupos en estudio, indicando que el tratamiento a 10 °C por una semana no genera consecuencias estresantes sobre las plantas de apio.

Si bien los resultados arriba detallados podrían explicar en parte la diferencia en la acumulación de almidón entre los diferentes grupos, habría que plantear un balance global del carbono en la hoja de apio. Es decir, se debería calcular el carbono neto disponible a partir de la diferencia entre los niveles de CO_2 fijados por fotosíntesis y el carbono utilizado para la respiración; y a este valor se le debería restar el carbono dirigido a la síntesis de Glc, Fru, Suc, aminoácidos y demás compuestos que requieren del mismo para su síntesis. Finalmente, determinar el contenido de Mol en estas muestras sería imprescindible para resolver si la diferencia de almidón fijado se corresponde totalmente con los niveles de fotosíntesis desiguales entre los grupos de plantas crecidas bajo condiciones control y de estrés por frío, o si se destina una mayor proporción de carbono hacia el soluto compatible Mol. Esto lo podremos resolver una vez que tengamos acceso a un método confiable para la medida de los niveles de Mol.

Para concluir con esta parte del trabajo de Tesis, resta analizar los niveles de actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de Suc (Suc6PSasa), almidón (ADPGlcPPasa) y Mol (Man6PRasa y MolDHasa), lo cual aportará información importante sobre la regulación de las distintas rutas metabólicas que operan en plantas de apio y que podrían estar alteradas cuando las plantas son crecidas bajo diferentes condiciones ambientales.

6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] JH Bryce, SA Hill (1999) Energy production in plant cells, En: *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, (Ed.: PJ Lea, RC Leegood) John Wiley, p. 1–28.
- [2] AA Iglesias, FE Podestá, CS Andreo (1997) Structural and regulatory properties of the enzymes involved in C3, C4 and CAM pathways for photosynthetic carbon assimilation, En: *Handbook of Photosynthesis*, (Ed.: M Pessaraki) Marcel Dekker, p. 481–503.
- [3] CM Figueroa, C V Piattoni, KEJ Trípodí, FE Podestá, AA Iglesias (2016) Carbon photoassimilation and photosynthate partitioning in plants, En: *Handbook of Photosynthesis*, Third edit., (Ed.: M Pessaraki) CRC Press, Taylor and Francis Group, p. 509–535.
- [4] M Stitt, J Lunn, B Usadel (2010) Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism - More than the icing on the cake. *Plant J.* 61 (6) p. 1067–1091.
- [5] A Buléon, P Colonna, V Planchot, S Ball (1998) Starch granules: Structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 23 (2) p. 85–112.
- [6] RF Tester, J Karkalas, X Qi (2004) Starch-composition, fine structure and architecture. *J. Cereal Sci.* 39 (2) p. 151–165.
- [7] 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.
- [8] MA Ballicora, AA Iglesias, J Preiss (2004) ADP-glucose pyrophosphorylase: A regulatory enzyme for plant starch synthesis. *Photosynth. Res.* 79 (1) p. 1–24.
- [9] 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. 1315–1320.
- [10] 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: A novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell* 14 (9) p. 2191–2213.
- [11] DML Ferrero, C V. Piattoni, MD Asencion Diez, BE Rojas, MD Hartman, MA Ballicora, AA Iglesias (2020) Phosphorylation of ADP-glucose pyrophosphorylase during wheat seeds development. *Front. Plant Sci.* 11 (July) p. 1–11.
- [12] K Kainuma, D French (1972) Naegeli amyloextrin and its relationship to starch granule structure. II. Role of water in crystallization of B-starch. *Biopolymers* 11 (11) p. 2241–2250.
- [13] K Denyer, F Dunlap, T Thorbj, P Keeling, AM Smith, J Centre, N Nr, UKK D (1996) The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize. *Plant Physiol.* 112 (1 1996) p. 779–

785.

- [14] 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.
- [15] M Tegeder, P Weber (2006) Metabolite transporters in the control of plant primary metabolism, En: *Control of primary Metabolism in Plants*, (Ed.: W Plaxton, M McManus) Blackwell Publishing Ltd, p. 85–120.
- [16] YC Du, A Nose, K Wasano (1999) Effects of chilling temperature on photosynthetic rates, photosynthetic enzyme activities and metabolite levels in leaves of three sugarcane species. *Plant, Cell Environ.* 22 (3) p. 317–324.
- [17] JW Riesmeier, UI Flügge, B Schulz, D Heineke, HW Heldt, L Willmitzer, WB Frommer (1993) Antisense repression of the chloroplast triose phosphate translocator affects carbon partitioning in transgenic potato plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (13) p. 6160–6164.
- [18] AA Iglesias, FE Podestá (2005) Photosynthate formation and partitioning in crop plants, En: *Handbook of Photosynthesis*, (Ed.: M Pessaraki) Taylor and Francis Group, p. 525–545.
- [19] CV Piattoni, CM Figueroa, V Perotti, FE Podestá, A. Iglesias (2014) Biochemistry and physiology of carbon partitioning in crop plants, En: *Handbook of Plant and Crop Physiology*, (Ed.: M Pessaraki) CRC Press, Taylor and Francis Group, p. 193–215.
- [20] C. Smith (1999) Carbohydrate biochemistry, En: *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, (Ed.: PJ Lea, RC Leegood) John Wiley, p. 81–118.
- [21] D Toroser, SC Huber (1997) Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic-stress activation of sucrose-phosphate synthase in spinach leaves. *Plant Physiol.* 114 (3) p. 947–955.
- [22] D Toroser, GS Athwal, SC Huber (1998) Site-specific regulatory interaction between spinach leaf sucrose-phosphate synthase and 14-3-3 proteins. *FEBS Lett.* 435 (1) p. 110–114.
- [23] H Winter, SC Huber (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 19 (1) p. 31–67.
- [24] JE Lunn, RT Furbank (1999) Tansley Review No. 105: Sucrose biosynthesis in C4 plants. *New Phytol.* 143 (2) p. 221–237.
- [25] E MacRae, JE Lunn (2012) Photosynthetic sucrose biosynthesis: an evolutionary perspective, En: *Photosynthesis: Plastid Biology, Energy Conversion and Carbon Assimilation*, (Ed.: JJ Eaton-Rye, BC Tripathy, T. Sharkey) Springer, p. 675–702.
- [26] R Wyse, D Briskin, B Aloni (1985) Regulation of carbon partitioning in photosynthetic tissue, in *Proceedings of the Eighth Annual Symposium on Plant Physiology*, p. 231–253.
- [27] LQ Chen, XQ Qu, BH Hou, D Sosso, S Osorio, AR Fernie, WB Frommer (2012) Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* (80-.). 335 (6065) p.

207–211.

- [28] FR Baker, KA Leach, DM Braun (2012) SWEET as sugar: New sucrose effluxers in plants. *Mol. Plant* 5 (4) p. 766–768.
- [29] G Roblin, S Sakr, J Bonmort, S Delrot (1998) Regulation of a plant plasma membrane sucrose transporter by phosphorylation. *FEBS Lett.* 424 (3) p. 165–168.
- [30] SC Huber, JL Huber, PC Liao, DA Gage, RW McMichael, 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.
- [31] 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.
- [32] A Sturm (1999) Update on biochemistry invertases . Primary structures , functions , and roles in plant development and sucrose partitioning some common molecular features but differ. *Plant Physiol.* 121 (September) p. 1–7.
- [33] MD Brownleader, JB Harborne, PM Dey (1997) Carbohydrate metabolism: Primary metabolism of monosaccharides, En: *Plant Biochemistry*, (Ed.: PM Dey, JB Harborne) Academic Press, p. 111–141.
- [34] 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.
- [35] NJ Kruger, A Von Schaewen (2003) The oxidative pentose phosphate pathway: Structure and organisation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6 (3) p. 236–246.
- [36] 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.
- [37] M Eicks, V Maurino, S Knappe, UI Flügge, 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.
- [38] W Loescher, J Everard (2000) Regulation of sugar alcohol biosynthesis. *Photosynth. Physiol. Metab.* 9 p. 275–299.
- [39] KL Webb, JAW Burley (1962) Sorbitol translocation in apple. *Science* (80-.). 137 (3532) p. 766.
- [40] WH Loescher, RH Tyson, JD Everard, RJ Redgwell, RL Bieleski (1992) Mannitol synthesis in higher plants. *Plant Physiol.* 98 (4) p. 1396–1402.
- [41] JM Davis, JK Fellman, WH Loescher (1988) Biosynthesis of sucrose and mannitol as a function

- of leaf age in celery (*Apium graveolens* L.). *Plant Physiol.* 86 (1) p. 129–33.
- [42] A Moing (2000) Sugar alcohols as carbohydrate reserves in some higher plants. *Dev. Crop Sci.* 26 (C) p. 337–358.
- [43] JB Drossopoulos, CA Niavis (1988) Seasonal changes of the metabolites in the leaves, bark and xylem tissues of olive tree (*Olea europaea*. L) I. Nitrogenous compounds. *Ann. Bot.* 62 (3) p. 313–320.
- [44] F Keller, P Matile (1989) Storage of sugars and mannitol in petioles of celery leaves. *New Phytol.* 113 (3) p. 291–299.
- [45] ME Rumpho, GE Edwards, WH Loescher (1983) A pathway for photosynthetic carbon flow to mannitol in celery leaves: activity and localization of key enzymes. *Plant Physiol.* 73 (4) p. 869–73.
- [46] Z Gao, WH Loescher (2000) NADPH supply and mannitol biosynthesis. Characterization, cloning, and regulation of the non-reversible glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in celery leaves. *Plant Physiol.* 124 (1) p. 321–330.
- [47] N Noiraud, L Maurousset, R Lemoine (2001) Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. *Plant Cell* 13 (3) p. 695–705.
- [48] M Juchaux-Cachau, L Landouar-Arsivaud, JP Pichaut, C Campion, B Porcheron, J Jeauffre, N Noiraud-Romy, P Simoneau, L Maurousset, R Lemoine (2007) Characterization of AgMaT2, a plasma membrane mannitol transporter from celery, expressed in phloem cells, including phloem parenchyma cells. *Plant Physiol.* 145 (1) p. 62–74.
- [49] JMH Stoop, DM Pharr (1992) Partial purification and characterization of mannitol: mannose 1-oxidoreductase from celeriac (*Apium graveolens* var. *rapaceum*) roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 298 (2) p. 612–619.
- [50] JMH Stoop, JD Williamson, M a Conkling, DM Pharr (1995) Purification of NAD-dependent mannitol dehydrogenase from celery suspension cultures. *Plant Physiol.* 108 (3) p. 1219–1225.
- [51] JM Davis, WH Loescher (1990) [14C]-Assimilate translocation in the light and dark in celery (*Apium graveolens*) leaves of different ages. *Physiol. Plant.* 79 (4) p. 656–662.
- [52] JK Fellman, WH Loescher (1987) Comparative studies of sucrose and mannitol utilization in celery (*Apium graveolens*). *Physiol. Plant.* 69 (2) p. 337–341.
- [53] JD Everard, C Cantini, R Grumet, J Plummer, WH Loescher (1997) Molecular cloning of mannose-6-phosphate reductase and its developmental expression in celery. *Plant Physiol.* 113 (4) p. 1427–35.
- [54] R Prata, JD Williamson, MA Conkling, DM Pharr (1997) Sugar repression of mannitol dehydrogenase activity in celery cells. *Plant Physiol.* 114 (1) p. 307–314.

- [55] D Hyndman, DR Bauman, V V. Heredia, TM Penning (2003) The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chem. Biol. Interact.* 143–144 p. 621–631.
- [56] R Kratzer, DK Wilson, B Nidetzky (2006) Catalytic mechanism and substrate selectivity of aldo-keto reductases: Insights from structure-function studies of *Candida tenuis* xylose reductase. *IUBMB Life* 58 (9) p. 499–507.
- [57] TM Penning (2015) The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chem. Biol. Interact.* 234 (August 2014) p. 236–246.
- [58] CM Figueroa, AA Iglesias (2010) Aldose-6-phosphate reductase from apple leaves: Importance of the quaternary structure for enzyme activity. *Biochimie* 92 (1) p. 81–88.
- [59] MD Hartman, CM Figueroa, DG Arias, AA Iglesias (2017) Inhibition of recombinant aldose-6-phosphate reductase from peach leaves by hexose-phosphates, inorganic phosphate and oxidants. *Plant Cell Physiol.* 58 (1) p. 145–155.
- [60] R Yadav, R Prasad (2014) Identification and functional characterization of sorbitol-6-phosphate dehydrogenase protein from rice and structural elucidation by in silico approach. *Planta* 240 (1) p. 223–238.
- [61] S Robert, P SimierA, A Fer, Group (1999) Purification and characterization of mannose 6-phosphate reductase, a potential target for the control of *Striga hermonthica* and *Orobanche ramosa*. *Aust. J. Plant Physiol.* 26 p. 233–237.
- [62] JD Everard, VR Franceschi, WH Loescher (1993) Mannose-6-phosphate reductase, a key enzyme in photoassimilate partitioning, is abundant and located in the cytosol of photosynthetically active cells of celery (*Apium graveolens* L.) source leaves. *Plant Physiol.* 102 (2) p. 345–356.
- [63] B Persson, J Hedlund, H Jörnvall (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: The MDR superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (24) p. 3879–3894.
- [64] Y Oura, K Yamada, K Shiratake, S Yamaki (2000) Purification and characterization of a NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase from Japanese pear fruit. *Phytochemistry* 54 (6) p. 567–572.
- [65] MD Hartman, CM Figueroa, C V. Piattoni, AA Iglesias (2014) Glucitol dehydrogenase from peach (*Prunus persica*) fruits is regulated by thioredoxin h. *Plant Cell Physiol.* 55 (6) p. 1157–1168.
- [66] ZX Guo, TF Pan, KT Li, FL Zhong, L Lin, DM Pan, LX Lu (2012) Cloning of NAD-SDH cDNA from plum fruit and its expression and characterization. *Plant Physiol. Biochem.* 57 p. 175–180.
- [67] JMH Stoop, JD Williamson, MA Conkling, JJ MacKay, DM Pharr (1998) Characterization of NAD-dependent mannitol dehydrogenase from celery as affected by ions, chelators, reducing

- agents and metabolites. *Plant Sci.* 131 (1) p. 43–51.
- [68] E Zamski, YT Yamamoto, JD Williamson, M a Conkling, DM Pharr (1996) Immunolocalization of mannitol dehydrogenase in celery plants and cells. *Plant Physiol.* 112 (3) p. 931–8.
- [69] P Geigenberger, M Stitt (1993) Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* 189 (3) p. 329–339.
- [70] KD Nolte, KE Koch (1993) Companion-cell specific localization of sucrose synthase in zones of phloem loading and unloading. *Plant Physiol.* 101 (3) p. 899–905.
- [71] DM Pharr, JMH Stoop, MES Feusi, JD Williamson, MO Massel, MA Conkling (1995) The dual role of mannitol as osmoprotectant and photoassimilate in celery. *Hort Sci.* 29 (5) p. 573d – 573.
- [72] J Stoop, DM Pharr (1993) Effect of different carbon sources on relative growth rate, internal carbohydrates, and mannitol 1-oxidoreductase activity in celery suspension cultures. *Plant Physiol.* 103 (3) p. 1001–1008.
- [73] A Krapp, M Stitt (1995) An evaluation of direct and indirect mechanisms for the “sink-regulation” of photosynthesis in spinach: Changes in gas exchange, carbohydrates, metabolites, enzyme activities and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. *Planta* 195 (3) p. 313–323.
- [74] JC Jang, J Sheen (1997) Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci.* 2 (6) p. 208–214.
- [75] KE Koch, KD Nolte, ER Duke, DR McCarty, WT Avigne (1992) Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *Plant Cell* 4 (January) p. 59–69.
- [76] KE Koch (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 (1) p. 509–540.
- [77] CM Figueroa, RI Minen, FE Podestá, AA Iglesias (2019) Carbon metabolic pathways and relationships with plant stress, En: *Handbook of Plant and Crop Stress*, Fourth Edi., (Ed.: M Pessarakli) CRC Press, Taylor & Francis Group, p. 389–404.
- [78] HJ Bohnert, RG Jensen (1996) Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol.* 14 (3) p. 89–97.
- [79] J Nadwodnik, G Lohaus (2008) Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* 227 (5) p. 1079–1089.
- [80] A Moing, N Langlois, L Svanella, A Zanetto, JP Gaudillère (1997) Variability in sorbitol: Sucrose ratio in mature leaves of different *Prunus* species. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 122 (1) p. 83–90.
- [81] SJ Webb, JS Bhorjee (1968) Infrared studies of DNA, water, and inositol associations. *Can. J.*

Biochem. 46 (7) p. 691–695.

- [82] SN Timasheff (1993) The control of protein stability and association by weak interactions with water: How do solvents affect these processes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22 (1) p. 67–97.
- [83] F Del Viso, AF Puebla, CM Fusari, AC Casabuono, AS Couto, HG Pontis, HE Hopp, RA Heinz (2009) Molecular characterization of a putative sucrose:Fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) of the cold-resistant patagonian grass *Bromus pictus* associated with fructan accumulation under low temperatures. *Plant Cell Physiol.* 50 (3) p. 489–503.
- [84] HG Pontis (1989) Fructans and cold stress. *J. Plant Physiol.* 134 (2) p. 148–150.
- [85] JA Tognetti, GL Salerno, MD Crespi, HG Pontis (1990) Sucrose and fructan metabolism of different wheat cultivars at chilling temperatures. *Physiol. Plant.* 78 (4) p. 554–559.
- [86] F del Viso, AF Puebla, HE Hopp, RA Heinz (2009) Cloning and functional characterization of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) in the cold tolerant Patagonian species *Bromus pictus*. *Planta* 231 (1) p. 13–25.
- [87] G Goldstein, PS Nobel (1994) Water relations and low-temperature acclimation for cactus species varying in freezing tolerance. *Plant Physiol.* 104 (2) p. 675–681.
- [88] G Marigo, JP Peltier (1996) Analysis of the diurnal change in osmotic potential in leaves of *Fraxinus excelsior* L. *J. Exp. Bot.* 47 (299) p. 763–769.
- [89] P Guicherd, JP Peltier, E Gout, R Bligny, G Marigo (1997) Osmotic adjustment in *Fraxinus excelsior* L.: malate and mannitol accumulation in leaves under drought conditions. *Springer Lex. Kosmet. und Körperpfl.* p. 211–211.
- [90] R Gucci, L Lombardini, M Tattini (1997) Analysis of leaf water relations in leaves of two olive (*Olea europaea*) cultivars differing in tolerance to salinity. *Tree Physiol.* 17 (1) p. 13–21.
- [91] JD Everard, R Gucci, SC Kann, J a. Flore, WH Loescher (1994) Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity. *Plant Physiol.* 106 (1) p. 281–292.
- [92] J Stoop, DM Pharr (1994) Mannitol metabolism in celery stressed by excess macronutrients. *Plant Physiol.* 106 (2) p. 503–511.
- [93] G Zhifang, WH Loescher (2003) Expression of a celery mannose 6-phosphate reductase in *Arabidopsis thaliana* enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimer. *Plant, Cell Environ.* 26 (2) p. 275–283.
- [94] CM Sickler, GE Edwards, O Kiirats, Z Gao, W Loescher (2007) Response of mannitol-producing *Arabidopsis thaliana* to abiotic stress. *Funct. Plant Biol.* 34 (4) p. 382–391.
- [95] DH Jennings, RM Burke (1990) Compatible solutes – the mycological dimension and their role

- as physiological buffering agents. *New Phytol.* 116 (2) p. 277–283.
- [96] N Smirnoff, QJ Cumbes (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28 (4) p. 1057–1060.
- [97] B Shen, RG Jensen, HJ Bohnert (1997) Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol.* 115 (2) p. 527–532.
- [98] S Peters, F Keller (2009) Frost tolerance in excised leaves of the common bugle (*Ajuga reptans* L.) correlates positively with the concentrations of raffinose family oligosaccharides (RFOs). *Plant Cell Environ.* 32.
- [99] B Downie, S Gurusinghe, P Dahal, RR Thacker, JC Snyder, H Nonogaki, K Yim, K Fukunaga, V Alvarado, KJ Bradford (2003) Expression of a Galactinol synthase gene in tomato seeds is up-regulated before maturation desiccation and again after imbibition whenever radicle protrusion is prevented. *Plant Physiol.* 131 p. 1347–1359.
- [100] E Haritatos, F Keller, R Turgeon (1996) Raffinose oligosaccharide concentrations measured in individual cell and tissue types in *Cucumis melo* L. leaves: Implications for phloem loading. *Planta* 198 (4) p. 614–622.
- [101] M Bachmann, P Matile, F Keller (1994) Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. *Plant Physiol.* 105 p. 1335–1345.
- [102] T Taji, C Ohsumi, S Iuchi, M Seki, M Kasuga, M Kobayashi, K Yamaguchi-Shinozaki, K Shinozaki (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 29 (4) p. 417–426.
- [103] TJ Panikulangara, G Eggers-Schumacher, M Wunderlich, H Stransky, F Schöffl (2004) Galactinol synthase1. A Novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of Raffinose Family Oligosaccharides in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 136 (2) p. 3148–3158.
- [104] E Zuther, K Büchel, M Hundertmark, M Stitt, DK Hinch, AG Heyer (2004) The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 576 (1–2) p. 169–173.
- [105] D Decker, LA Kleczkowski (2019) UDP-sugar producing pyrophosphorylases: Distinct and essential enzymes with overlapping substrate specificities, providing de novo precursors for glycosylation reactions. *Front. Plant Sci.* 9 (1822) p. 1–19.
- [106] LF Leloir (1951) The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. *Arch. Biochem. Biophys.* 33 (2) p. 186–190.
- [107] N Dai, M Petrikov, V Portnoy, N Katzir, DM Pharr, A Schaffer (2006) Cloning and expression analysis of a UDP-galactose/glucose pyrophosphorylase from melon fruit provides evidence for

- the major metabolic pathway of galactose metabolism in raffinose oligosaccharide metabolizing plants. *Plant Physiol.* 142 (1) p. 294–304.
- [108] PA Frey (1996) The Leloir pathway: A mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* 10 (4) p. 461–470.
- [109] EL Smart, DM Pharr (1981) Separation and characteristics of galactose-1-phosphate and glucose-1-phosphate uridylyltransferase from fruit peduncles of cucumber. *Planta* 153 (4) p. 370–375.
- [110] ME Studer Feusi, JD Burton, JD Williamson, DM Pharr (1999) Galactosyl-sucrose metabolism and UDP-galactose pyrophosphorylase from *Cucumis melo* L. fruit. *Physiol. Plant.* 106 (1) p. 9–16.
- [111] L Lehle, W Tanner (1973) The function of *myo*-inositol in the biosynthesis of raffinose: purification and characterization of galactinol:sucrose 6-galactosyltransferase from *Vicia faba* seeds. *Eur. J. Biochem.* 38 (1) p. 103–110.
- [112] E Castillo, BO De Lumen, P Reyes, HZ De Lumen (1990) Raffinose synthase and Galactinol synthase in developing seeds and leaves of legumes. *J. Agric. Food Chem.* 38 p. 351–355.
- [113] JJ Liu, W Odegard, BO De Lumen (1995) Galactinol synthase from kidney bean cotyledon and zucchini leaf: Purification and N-terminal sequences. *Plant Physiol.* 109 (2) p. 505–511.
- [114] T Peterbauer, L Mach, J Mucha, A Richter (2002) Functional expression of a cDNA encoding pea (*Pisum sativum* L.) raffinose synthase, partial purification of the enzyme from maturing seeds, and steady-state kinetic analysis of raffinose synthesis. *Planta* 215 (5) p. 839–846.
- [115] TY Zhao, R Thacker, JW Corum, JC Snyder, RB Meeley, RL Obendorf, B Downie (2004) Expression of the maize Galactinol synthase gene family: (I) Expression of two different genes during seed development and germination. *Physiol. Plant.* 121 (4) p. 634–646.
- [116] T Schneider, F Keller (2009) Raffinose in chloroplasts is synthesized in the cytosol and transported across the chloroplast envelope. *Plant Cell Physiol.* 50 (12) p. 2174–2182.
- [117] Z Wang, Y Zhu, L Wang, X Liu, Y Liu, J Phillips, X Deng (2009) A WRKY transcription factor participates in dehydration tolerance in *Boea hygrometrica* by binding to the W-box elements of the galactinol synthase (BhGolS1) promoter. *Planta* 230 (6) p. 1155–1166.
- [118] S Sengupta, S Mukherjee, P Basak, AL Majumder (2015) Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Front. Plant Sci.* 6 (August) p. 1–11.
- [119] NS Robbins, DM Pharr (1987) Regulation of photosynthetic carbon metabolism in cucumber by light intensity and photosynthetic period. *Plant Physiol.* 85 (2) p. 592–597.
- [120] DM Saravitz, DM Pharr, TE Carter (1987) Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. *Plant Physiol.* 83 (1) p. 185–189.

- [121] PT Smith, TM Kuo, C Gerald Crawford (1991) Purification and characterization of galactinol synthase from mature zucchini squash leaves. *Plant Physiol.* 96 (3) p. 693–698.
- [122] WD Hitz, TJ Carlson, PS Kerr, SA Sebastian (2002) Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. *Plant Physiol.* 128 (2) p. 650–660.
- [123] LA Kleczkowski, S Kunz, M Wilczynska (2010) Mechanisms of UDP-glucose synthesis in plants. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 29 (4) p. 191–203.
- [124] LA Kleczkowski, M Geisler, E Fitzek, M Wilczynska (2011) A common structural blueprint for plant UDP-sugar-producing pyrophosphorylases. *Biochem. J.* 439 (3) p. 375–379.
- [125] LA Litterer, KL Plaisance, JA Schnurr, KK Storey, HJG Jung, JW Gronwald, DA Somers (2006) Biosynthesis of UDP-glucuronic acid in developing soybean embryos: Possible role of UDP-sugar pyrophosphorylase. *Physiol. Plant.* 128 (2) p. 200–211.
- [126] H Mu, JH Ke, W Liu, CX Zhuang, WK Yip (2009) UDP-glucose pyrophosphorylase2 (OsUgp2), a pollen-preferential gene in rice, plays a critical role in starch accumulation during pollen maturation. *Chinese Sci. Bull.* 54 (2) p. 234–243.
- [127] T Yang, M Echols, A Martin, M Bar-Peled (2010) Identification and characterization of a strict and a promiscuous N-acetylglucosamine-1-P uridylyltransferase in Arabidopsis. *Biochem. J.* 430 (2) p. 275–284.
- [128] L Elling (1996) Kinetic characterization of UDP-glucose pyrophosphorylase from germinated barley (MALT). *Phytochemistry* 42 (4) p. 955–960.
- [129] A Dickmanns, S Damerow, P Neumann, EC Schulz, AC Lamerz, FH Routier, R Ficner (2011) Structural basis for the broad substrate range of the UDP-sugar pyrophosphorylase from *Leishmania major*. *J. Mol. Biol.* 405 (2) p. 461–478.
- [130] LA Kleczkowski, D Decker (2015) Sugar activation for production of nucleotide sugars as substrates for glycosyltransferases in plants. *J. Appl. Glycosci.* 62 (2) p. 25–36.
- [131] T Kotake, D Yamaguchi, H Ohzono, S Hojo, S Kaneko, HK Ishida, Y Tsumuraya (2004) UDP-sugar pyrophosphorylase with broad substrate specificity toward various monosaccharide 1-phosphates from pea sprouts. *J. Biol. Chem.* 279 (44) p. 45728–45736.
- [132] LA Litterer, JA Schnurr, KL Plaisance, KK Storey, JW Gronwald, DA Somers (2006) Characterization and expression of Arabidopsis UDP-sugar pyrophosphorylase. *Plant Physiol. Biochem.* 44 (4) p. 171–180.
- [133] T Kotake, S Hojo, D Yamaguchi, T Aohara, T Konishi, Y Tsumuraya (2007) Properties and physiological functions of UDP-sugar pyrophosphorylase in Arabidopsis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (3) p. 761–771.

- [134] LA Kleczkowski, D Decker, M Wilczynska (2011) UDP-sugar pyrophosphorylase: A new old mechanism for sugar activation. *Plant Physiol.* 156 (1) p. 3–10.
- [135] W Gross, C Schnarrenberger (1995) Purification and characterization of a galactose-1-phosphate : UDP-glucose uridyltransferase from the red alga *Galdieria sulphuraria*. *Eur. J. Biochem.* 263 p. 258–263.
- [136] S Damerow, AC Lamerz, T Haselhorst, J Führung, P Zarnovican, M von Itsztein, FH Routier (2010) Leishmania UDP-sugar pyrophosphorylase: The missing link in galactose salvage? *J. Biol. Chem.* 285 (2) p. 878–887.
- [137] D Decker, LA Kleczkowski (2017) Substrate specificity and inhibitor sensitivity of plant UDP-sugar producing pyrophosphorylases. *Front. Plant Sci.* 8 (1610) p. 1–16.
- [138] C Wahl, M Spiertz, L Elling (2017) Characterization of a new UDP-sugar pyrophosphorylase from *Hordeum vulgare* (barley). *J. Biotechnol.* 258 p. 51–55.
- [139] JA Schnurr, KK Storey, HJG Jung, DA Somers, JW Gronwald (2006) UDP-sugar pyrophosphorylase is essential for pollen development in Arabidopsis. *Planta* 224 (3) p. 520–532.
- [140] S Sengupta, S Mukherjee, S Parween, AL Majumder (2012) Galactinol synthase across evolutionary diverse taxa: Functional preference for higher plants? *FEBS Lett.* 586 (10) p. 1488–1496.
- [141] TB dos Santos, RB de Lima, GT Nagashima, CL de Oliveira Petkowicz, V Carpentieri-Pípolo, LFP Pereira, DS Domingues, LGE Vieira (2015) Galactinol synthase transcriptional profile in two genotypes of *Coffea canephora* with contrasting tolerance to drought. *Genet. Mol. Biol.* 38 (2) p. 182–190.
- [142] Y Yin, D Mohnen, I Gelineo-Albersheim, Y Xu, MG Hahn (2018) Glycosyltransferases of the GT8 family, En: *Annual Plant Reviews*, 41, p. 167–211.
- [143] BI Cantarel, PM Coutinho, C Rancurel, T Bernard, V Lombard, B Henrissat (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 37 (SUPPL. 1) p. 233–238.
- [144] F Keller (1992) Galactinol synthase is an extravacuolar enzyme in tubers of Japanese artichoke (*Stachys sieboldii*). *Plant Physiol.* 99 (3) p. 1251–1253.
- [145] RB Frydman, EF Neufeld (1963) Synthesis of galactosylinositol by extracts from peas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12 (2) p. 121–125.
- [146] DM Pharr, HN Sox, RD Locy, SC Huber (1981) Partial characterization of the galactinol forming enzyme from leaves of *cucumis sartinus* L. *Plant Sci. Lett.* 23 p. 25–33.
- [147] F Keller, D Pharr (1996) Metabolism of carbohydrates in sinks and source: galactosyl-sucrose

- oligosaccharides, En: *Photoassimilate distribution in plants and crops: source–sink relationships*, (Ed.: E Zamski, AA SchaVer) Marcel Dekker, p. 157–183.
- [148] M Ribeiro, CR Felix, S De Paulino Lozzi (2000) Soybean seed galactinol synthase activity as determined by a novel colorimetric assay. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 12 (3) p. 203–212.
- [149] N Wakiuchi, R Shiomi, H Tamaki (2003) Production of galactinol from sucrose by plant enzymes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (7) p. 1465–1471.
- [150] T Zhou, R Zhang, S Guo (2012) Molecular cloning and characterization of GhGolS1, a novel gene encoding galactinol synthase from cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Mol. Biol. Report.* 30 (3) p. 699–709.
- [151] W Busch, M Wunderlich, F Schöffl (2005) Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 41 (1) p. 1–14.
- [152] Y Ito, K Katsura, K Maruyama, T Taji, M Kobayashi, M Seki, K Shinozaki, K Yamaguchi-Shinozaki (2006) Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol.* 47 (1) p. 141–153.
- [153] K Maruyama, M Takeda, S Kidokoro, K Yamada, Y Sakuma, K Urano, M Fujita, K Yoshiwara, S Matsukura, Y Morishita, R Sasaki, H Suzuki, K Saito, D Shibata, K Shinozaki, K Yamaguchi-Shinozaki (2009) Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant Physiol.* 150 (4) p. 1972–1980.
- [154] LW Handley, DM Pharr (1982) Ion stimulation, UDP inhibition and effects of sulfhydryl reagents on the activity of galactinol synthase from leaves of cucumber, *Cucumis sativus* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 108 (5) p. 447–455.
- [155] L Handley, D Pharr, R McFeeters (1983) Relationship between galactinol synthase activity and sugar composition of leaves and seeds. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 108 (4) p. 600–605.
- [156] T Li, M Dong, W Xie, Y Zhang, D Tao, S Li (2018) Kinetic properties of raffinose synthase from rice (*Oryza sativa* L.). *Food Biosci.* 25 (June 2017) p. 39–43.
- [157] T Li, Y Zhang, Y Liu, X Li, G Hao, Q Han, LMA Dirk, AB Downie, YL Ruan, J Wang, G Wang, T Zhao (2020) Raffinose synthase enhances drought tolerance through raffinose synthesis or galactinol hydrolysis in maize and Arabidopsis plants. *J. Biol. Chem.* 295 (23) p. 8064–8077.
- [158] B Henrissat, PM Coutinho, GJ Davies (2001) A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 47 (1–2) p. 55–72.
- [159] T Peterbauer, M Puschenreiter, A Richter (1998) Metabolism of galactosylononitol in seeds of *Vigna umbellata*. *Plant Cell Physiol.* 39 (3) p. 334–341.

- [160] H Brumer III, PFG Sims, ML Sinnott (1999) Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: Purification and characterization of the main α -galactosidase. *Biochem. J.* 339 (1) p. 43.
- [161] KMJ VanLaere, R Hartemink, G Beldman, SP Voragen, C Dijkema, HA Schols, AG J. (1999) α -galactosidase of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. *Curr. Microbiol.* 38 (2) p. 101–106.
- [162] SC Garman, L Hannick, A Zhu, DN Garboczi (2002) The 1.9 Å structure of α -N-acetylgalactosaminidase: Molecular basis of glycosidase deficiency diseases. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* 58 (s1) p. c271–c271.
- [163] Z Fujimoto, S Kaneko, M Momma, H Kobayashi, H Mizuno (2003) Crystal structure of rice α -galactosidase complexed with D-galactose. *J. Biol. Chem.* 278 (22) p. 20313–20318.
- [164] RH Lee, MC Lin, SCG Chen (2004) A novel alkaline α -galactosidase gene is involved in rice leaf senescence. *Plant Mol. Biol.* 55 (2) p. 281–295.
- [165] S Li, T Li, WD Kim, M Kitaoka, S Yoshida, M Nakajima, H Kobayashi (2007) Characterization of raffinose synthase from rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare). *Biotechnol. Lett.* 29 (4) p. 635–640.
- [166] O C, N J, K T (2005) Raffinose synthase gene, process for producing raffinose, and transformed plant., 2005.
- [167] R Gangl, R Tenhaken (2016) Raffinose family oligosaccharides act as galactose stores in seeds and are required for rapid germination of Arabidopsis in the dark. *Front. Plant Sci.* 7 (JULY2016) p. 1–15.
- [168] C Osumi, J Nozaki, T Kida (2000) *Estados Unidos.* 6,166,292. United States Patent and Trademark Office.
- [169] E Watanabe, K Kenji Oeda (2010) *Estados Unidos.* 7,723,567 B1. United States Patent and Trademark Office.
- [170] S Peters, A Egert, B Stieger, F Keller (2010) Functional identification of Arabidopsis ATSIP2 (At3g57520) as an alkaline α -galactosidase with a substrate specificity for raffinose and an apparent sink-specific expression pattern. *Plant Cell Physiol.* 51 (10) p. 1815–1819.
- [171] XL Sui, FZ Meng, HY Wang, YX Wei, RF Li, Z yu Wang, LP Hu, SH Wang, ZX Zhang (2012) Molecular cloning, characteristics and low temperature response of raffinose synthase gene in *Cucumis sativus* L. *J. Plant Physiol.* 169 (18) p. 1883–1891.
- [172] A Egert, F Keller, S Peters (2013) Abiotic stress-induced accumulation of raffinose in Arabidopsis leaves is mediated by a single raffinose synthase (RS5, At5g40390). *BMC Plant Biol.* 13 (1) p. 1–9.

- [173] LB Lahuta, WE Pluskota, J Stelmaszewska, J Szablińska (2014) Dehydration induces expression of galactinol synthase and raffinose synthase in seedlings of pea (*Pisum sativum* L.). *J. Plant Physiol.* 171 (14) p. 1306–1314.
- [174] R Gangl, R Behmüller, R Tenhaken (2015) Molecular cloning of AtRS4, a seed specific multifunctional RFO synthase/galactosylhydrolase in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 6 (September) p. 1–15.
- [175] V Amiard, A Morvan-Bertrand, JP Billard, C Huault, F Keller, MP Prud'homme (2003) Fructans, but not the sucrosyl-galactosides, raffinose and loliose, are affected by drought stress in perennial ryegrass. *Plant Physiol.* 132 (4) p. 2218–2229.
- [176] Z Sun, X Qi, Z Wang, P Li, C Wu, H Zhang, Y Zhao (2013) Overexpression of TsGOLS2, a galactinol synthase, in *Arabidopsis thaliana* enhances tolerance to high salinity and osmotic stresses. *Plant Physiol. Biochem.* 69 p. 82–89.
- [177] J You, Y Wang, Y Zhang, K Dossa, D Li, R Zhou, L Wang, X Zhang (2018) Genome-wide identification and expression analyses of genes involved in raffinose accumulation in sesame. *Sci. Rep.* 8 (1) p. 1–11.
- [178] M Knaupp, KB Mishra, L Nedbal, AG Heyer (2011) Evidence for a role of raffinose in stabilizing photosystem II during freeze-thaw cycles. *Planta* 234 (3) p. 477–486.
- [179] M Saito, M Yoshida (2011) Expression analysis of the gene family associated with raffinose accumulation in rice seedlings under cold stress. *J. Plant Physiol.* 168 (18) p. 2268–2271.
- [180] CA Bustamante, LL Monti, J Gabilondo, F Scossa, G Valentini, CO Budde, M V. Lara, AR Fernie, MF Drincovich (2016) Differential metabolic rearrangements after cold storage are correlated with chilling injury resistance of peach fruits. *Front. Plant Sci.* 7 (September 2016) p. 1–15.
- [181] E Shimosaka, K Ozawa (2015) Overexpression of cold-inducible wheat galactinol synthase confers tolerance to chilling stress in transgenic rice. *Breed. Sci.* 65 (5) p. 363–371.
- [182] GLH Barchet, R Dauwe, RD Guy, WR Schroeder, RY Soolanayakanahally, MM Campbell, SD Mansfield (2014) Investigating the drought-stress response of hybrid poplar genotypes by metabolite profiling. *Tree Physiol.* 34 (11) p. 1203–1219.
- [183] MG Selvaraj, T Ishizaki, M Valencia, S Ogawa, B Dedicova, T Ogata, K Yoshiwara, K Maruyama, M Kusano, K Saito, F Takahashi, K Shinozaki, K Nakashima, M Ishitani (2017) Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* galactinol synthase gene improves drought tolerance in transgenic rice and increased grain yield in the field. *Plant Biotechnol. J.* 15 (11) p. 1465–1477.
- [184] TB dos Santos, IGF Budzinski, CJ Marur, CLO Petkowicz, LFP Pereira, LGE Vieira (2011)

- Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. *Plant Physiol. Biochem.* 49 (4) p. 441–448.
- [185] S Qiu, J Zhang, J He, W Sha, M Li, Y Zhao, Y Zhai (2020) Overexpression of GmGolS2-1, a soybean galactinol synthase gene, enhances transgenic tobacco drought tolerance. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* (0123456789).
- [186] AI Elsayed, MS Rafudeen, D Golldack (2014) Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: Protection against abiotic stress. *Plant Biol.* 16 (1) p. 1–8.
- [187] A Nishizawa-Yokoi, Y Yabuta, S Shigeoka (2008) The contribution of carbohydrates including raffinose family oligosaccharides and sugar alcohols to protection of plant cells from oxidative damage. *Plant Signal. Behav.* 3 (11) p. 1016–1018.
- [188] A Nishizawa, Y Yabuta, S Shigeoka (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.* 147 (3) p. 1251–1263.
- [189] P Salvi, NU Kamble, M Majee (2018) Stress-inducible galactinol synthase of chickpea (CaGolS) is implicated in heat and oxidative stress tolerance through reducing stress-induced excessive reactive oxygen species accumulation. *Plant Cell Physiol.* 59 (1) p. 155–166.
- [190] J Brkljacic, E Grotewold, R Scholl, T Mockler, DF Garvin, P Vain, T Brutnell, R Sibout, M Bevan, H Budak, AL Caicedo, C Gao, Y Gu, SP Hazen, BF Holt, SY Hong, M Jordan, AJ Manzaneda, T Mitchell-Olds, K Mochida, LAJ Mur, CM Park, J Sedbrook, M Watt, SJ Zheng, JP Vogel (2011) Brachypodium as a model for the grasses: Today and the future. *Plant Physiol.* 157 (1) p. 3–13.
- [191] KBG Scholthof, S Irigoyen, P Catalan, KK Mandadi (2018) Brachypodium: A monocot grass model genus for plant biology. *Plant Cell* 30 (8) p. 1673–1694.
- [192] E Wolny, R Hasterok (2009) Comparative cytogenetic analysis of the genomes of the model grass *Brachypodium distachyon* and its close relatives. *Ann. Bot.* 104 (5) p. 873–881.
- [193] J Draper, LAJ Mur, G Jenkins, GC Ghosh-Biswas, P Bablak, R Hasterok, APM Routledge (2001) *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol.* 127 (4) p. 1539–1555.
- [194] U Schippmann (1991) Revision der europäischen Arten der Gattung *Brachypodium* Palisot de Beauvois (Poaceae). *Boissiera.* 45 p. 1-250.
- [195] DF Garvin, YQ Gu, R Hasterok, SP Hazen, G Jenkins, TC Mockler, LAJ Mur, JP Vogel (2008) Development of genetic and genomic research resources for *Brachypodium distachyon*, a new model system for grass crop research. *Crop Sci.* 48 (SUPPL. 1).
- [196] J Vogel, T Hill (2008) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of

Brachypodium distachyon inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep.* 27 (3) p. 471–478.

- [197] JP Vogel, DF Garvin, TC Mockler, J Schmutz, D Rokhsar, MW Bevan, K Barry, S Lucas, M Harmon-Smith, K Lail, H Tice, J Grimwood, N McKenzie, N Huo, YQ Gu, GR Lazo, OD Anderson, FM You, MC Luo, J Dvorak, J Wright, M Febrer, D Idziak, R Hasterok, E Lindquist, M Wang, SE Fox, HD Priest, SA Filichkin, SA Givan, DW Bryant, JH Chang, H Wu, W Wu, AP Hsia, PS Schnable, A Kalyanaraman, B Barbazuk, TP Michael, SP Hazen, JN Bragg, D Laudencia-Chingcuanco, Y Weng, G Haberer, M Spannagl, K Mayer, T Rattei, T Mitros, SJ Lee, JKC Rose, LA Mueller, TL York, T Wicker, JP Buchmann, J Tanskanen, AH Schulman, H Gundlach, M Beven, A Costa De Oliveira, L Da C. Maia, W Belknap, N Jiang, J Lai, L Zhu, J Ma, C Sun, E Pritham, J Salse, F Murat, M Abrouk, R Bruggmann, J Messing, N Fahlgren, CM Sullivan, JC Carrington, EJ Chapman, GD May, J Zhai, M Ganssmann, SGR Gurazada, M German, BC Meyers, PJ Green, L Tyler, J Wu, J Thomson, S Chen, H V. Scheller, J Harholt, P Ulvskov, JA Kimbrel, LE Bartley, P Cao, KH Jung, MK Sharma, M Vega-Sanchez, P Ronald, CD Dardick, S De Bodt, W Verelst, D Inzé, M Heese, A Schnittger, X Yang, UC Kalluri, GA Tuskan, Z Hua, RD Vierstra, Y Cui, S Ouyang, Q Sun, Z Liu, A Yilmaz, E Grotewold, R Sibout, K Hematy, G Mouille, H Höfte, T Micheel, J Pelloux, D O'Connor, J Schnable, S Rowe, F Harmon, CL Cass, JC Sedbrook, ME Byrne, S Walsh, J Higgins, P Li, T Brutnell, T Unver, H Budak, H Belcram, M Charles, B Chalhoub, I Baxter (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463 (7282) p. 763–768.
- [198] J King, A Thomas, C James, I King, I Armstead (2013) A DArT marker genetic map of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) integrated with detailed comparative mapping information; comparison with existing DArT marker genetic maps of *Lolium perenne*, *L. multiflorum* and *Festuca pratensis*. *BMC Genomics* 14 (1).
- [199] E Filiz, II Ozyigit, R Vatansever (2015) Genome-wide identification of galactinol synthase (GolS) genes in *Solanum lycopersicum* and *Brachypodium distachyon*. *Comput. Biol. Chem.* 58 p. 149–157.
- [200] P Vain (2011) *Brachypodium* as a model system for grass research. *J. Cereal Sci.* 54 (1) p. 1–7.
- [201] T Girin, LC David, C Chardin, R Sibout, A Krapp, S Ferrario-Méry, F Daniel-Vedele (2014) *Brachypodium*: A promising hub between model species and cereals. *J. Exp. Bot.* 65 (19) p. 5683–5686.
- [202] M Watt, K Schneebeil, P Dong, IW Wilson (2009) The shoot and root growth of *Brachypodium* and its potential as a model for wheat and other cereal crops. *Funct. Plant Biol.* 36 (11) p. 960–969.
- [203] W Verelst, E Bertolini, S De Bodt, K Vandepoele, M Demeulenaere, ME Pè, D Inzé (2013)

- Molecular and physiological analysis of growth-limiting drought stress in *Brachypodium distachyon* leaves. *Mol. Plant* 6 (2) p. 311–322.
- [204] IK Rivera-Contreras, T Zamora-Hernández, AA Huerta-Heredia, J Capataz-Tafur, BE Barrera-Figueroa, P Juntawong, JM Peña-Castro (2016) Transcriptomic analysis of submergence-tolerant and sensitive *Brachypodium distachyon* ecotypes reveals oxidative stress as a major tolerance factor. *Sci. Rep.* 6 (January) p. 1–15.
- [205] DL Laudencia-Chingcuanco, WH Vensel (2008) Globulins are the main seed storage proteins in *Brachypodium distachyon*. *Theor. Appl. Genet.* 117 (4) p. 555–563.
- [206] F Guillon, C Larré, F Petipas, A Berger, J Moussawi, H Rogniaux, A Santoni, L Saulnier, F Jamme, M Miquel, L Lepiniec, B Dubreucq (2012) A comprehensive overview of grain development in *Brachypodium distachyon* variety Bd21. *J. Exp. Bot.* 63 (2) p. 739–755.
- [207] C Larré, S Penninck, B Bouchet, V Lollier, O Tranquet, S Denery-Papini, F Guillon, H Rogniaux (2010) *Brachypodium distachyon* grain: Identification and subcellular localization of storage proteins. *J. Exp. Bot.* 61 (6) p. 1771–1783.
- [208] Y Yang, J Munz, C Cass, A Zienkiewicz, Q Kong, W Ma, Sanjaya, J Sedbrook, C Benning (2015) Ectopic expression of WRINKLED1 affects fatty acid homeostasis in *Brachypodium distachyon* vegetative tissues. *Plant Physiol.* 169 (3) p. 1836–1847.
- [209] D Parker, M Beckmann, DP Enot, DP Overy, ZC Rios, M Gilbert, N Talbot, J Draper (2008) Rice blast infection of *Brachypodium distachyon* as a model system to study dynamic host/pathogen interactions. *Nat. Protoc.* 3 (3) p. 435–445.
- [210] TL Fitzgerald, JJ Powell, K Schneebeli, MM Hsia, DM Gardiner, JN Bragg, CL McIntyre, JM Manners, M Ayliffe, M Watt, JP Vogel, RJ Henry, K Kazan (2015) *Brachypodium* as an emerging model for cereal-pathogen interactions. *Ann. Bot.* 115 (5) p. 717–731.
- [211] DM Rancour, JM Marita, RD Hatfield (2012) Cell wall composition throughout development for the model grass *Brachypodium distachyon*. *Front. Plant Sci.* 3 (DEC) p. 1–14.
- [212] A Betekhtin, K Hus, M Rojek-Jelonek, E Kurczynska, C Nibau, JH Doonan, R Hasterok (2020) In vitro tissue culture in *Brachypodium*: Applications and challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (3).
- [213] DW Lv, S Subburaj, M Cao, X Yan, X Li, R Appels, DF Sun, W Ma, YM Yan (2014) Proteome and phosphoproteome characterization reveals new response and defense mechanisms of *Brachypodium distachyon* leaves under salt stress. *Mol. Cell. Proteomics* 13 (2) p. 632–652.
- [214] HD Priest, SE Fox, ER Rowley, JR Murray, TP Michael, TC Mockler (2014) Analysis of global gene expression in *Brachypodium distachyon* reveals extensive network plasticity in response to abiotic stress. *PLoS One* 9 (1) p. 1–15.
- [215] JY Ryu, SY Hong, SH Jo, JC Woo, S Lee, CM Park (2014) Molecular and functional

characterization of cold-responsive C-repeat binding factors from *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biol.* 14 (1) p. 1–15.

- [216] AH Ahkami, W Wang, TW Wietsma, T Winkler, I Lange, C Jansson, BM Lange, NG McDowell (2019) Metabolic shifts associated with drought-induced senescence in *Brachypodium*. *Plant Sci.* 289 (September) p. 110278.
- [217] SRM Khalil, AS Ibrahim, BA Hussien, EA Hussien, MS Tawfik (2017) Cloning of a functional mannose-6-phosphate reductase (M6PR) gene homolog from Egyptian celery plants (*Apium graveolens*): Overexpression in non-mannitol producing plants resulted in mannitol accumulation in transgenic individuals. *3 Biotech* 7 (5) p. 341.
- [218] UK Laemmli (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat. Publ. Gr.* 227 p. 1979.
- [219] MM Bradford (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72 p. 248–254.
- [220] 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.
- [221] NZ Wayllace, HA Valdez, A Merás, RA Ugalde, M V. Busi, DF Gomez-Casati (2012) An enzyme-coupled continuous spectrophotometric assay for glycogen synthases. *Mol. Biol. Rep.* 39 (1) p. 585–591.
- [222] N Norton (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 3 (2) p. 375–380.
- [223] M Somogyi (1945) A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160 p. 61–68.
- [224] A V Hill (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of huemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.* 40 p. 4–6.
- [225] K Huynh, CL Partch (2015) Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. *Curr. Protoc. protein Sci.* 79 (February) p. 28.9.1-28.9.14.
- [226] JL Vaitukaitis (1981) Production of antisera with small doses of immunogen: Multiple intradermal injections. *Methods Enzymol.* 73 (C) p. 46–52.
- [227] EK Bomati, JP Noel (2005) Structural and kinetic basis for substrate selectivity in *Populus tremuloides* sinapyl alcohol dehydrogenase. *Plant Cell* 17 (5) p. 1598–1611.
- [228] Y Zhang (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9 p. 1–8.
- [229] J Yang, Y Zhang, K Rohini, PS Srikumar, K Anbarasu, L Structural, B Suite, A Ec, DC Security, A Roy, D Xu, J Poisson, Y Zhang, A Kucukural, Y Zhang, B Cbhmodelo (2011) Function Prediction. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 9 (December) p. 5–9.

- [230] J Yang, Y Zhang (2015) Protein structure and function prediction using I-TASSER. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 52 (1) p. 5.8.1-5.8.15.
- [231] J Yang, Y Zhang (2015) I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* 43 (W1) p. W174–W181.
- [232] D Eisenberg, R Luthy, J Bowie (1997) Verify3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods Enzymol.* 277 p. 396–404.
- [233] MN Wass, LA Kelley, MJE Sternberg (2010) 3DLigandSite: Predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucleic Acids Res.* 38 (SUPPL. 2) p. 469–473.
- [234] S Farag (1979) Separation and analysis of some sugars by using thin layer chromatography. *J. Sugarbeet Res.* 20 (3) p. 251–254.
- [235] J Ferey, D Da Silva, S Bravo-Veyrat, P Lafite, R Daniellou, B Maunit (2016) Validation of a thin-layer chromatography/densitometry method for the characterization of invertase activity. *J. Chromatogr. A* 1477 p. 108–113.
- [236] M Stitt, RMC Lilley, R Gerhardt, HW Heldt (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymol.* 174 (C) p. 518–552.
- [237] T Bantan-Polak, M Kassai, KB Grant (2001) A comparison of fluorescamine and naphthalene-2, 3-dicarboxaldehyde fluorogenic reagents for microplate-based detection of amino acids. *Anal. Biochem.* 297 (2) p. 128–136.
- [238] NR Baker, E Rosenqvist (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.* 55 (403) p. 1607–1621.
- [239] C Glynn, DA Herms, M Egawa, R Hansen, WJ Mattson (2003) Effects of nutrient availability on biomass allocation as well as constitutive and rapid induced herbivore resistance in poplar. *Oikos* 101 (2) p. 385–397.
- [240] GC Percival, GA Fraser (2001) Measurement of the salinity and freezing tolerance of *Crataegus* genotypes using chlorophyll fluorescence. 27 (September) p. 233–245.
- [241] KL Kavanagh, M Klimacek, B Nidetzky, DK Wilson (2002) The structure of apo and holo forms of xylose reductase, a dimeric aldo-keto reductase from *Candida tenuis*. *Biochemistry* 41 (28) p. 8785–8795.
- [242] JM Jez, MJ Bennett, BP Schlegel, M Lewis, TM Penning (1997) Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. J.* 326 (3) p. 625–636.
- [243] GK Farber, GA Petsko (1990) The evolution of α/β barrel enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 15 p. 228–234.
- [244] OA Barski, KH Gabbay, KM Bohren (1996) The C-terminal loop of aldehyde reductase

determines the substrate and inhibitor specificity. *Biochemistry* 35 p. 14276–14280.

- [245] H Ma, TM Penning (1999) Conversion of mammalian 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase to 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase using loop chimeras: Changing specificity from androgens to progestins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 p. 11161–11166.
- [246] KM Bohren, CE Grimshaw, C-J Lai, DH Harrison, D Ringe, GA Petsko, KH Gabbay (1994) Tyrosine-48 is the proton donor and Histidine-110 directs substrate stereochemical selectivity in the reduction reaction of human aldose reductase: Enzyme kinetics and crystal structure of the Y48H mutant enzyme. *Biochemistry* 33 p. 2021–2032.
- [247] OA Barski, KH Gabbay, CE Grimshaw, KM Bohren (1995) Mechanism of human aldehyde reductase: characterization of the active site pocket. *Biochemistry* 34 p. 11264–11275.
- [248] BP Schlegel, K Ratnam, TM Penning (1998) Retention of NADPH-linked quinone reductase activity in an aldo-keto reductase following mutation of the catalytic tyrosine. *Biochemistry* 37 (31) p. 11003–11011.
- [249] R Kratzer, B Nidetzky (2005) Electrostatic stabilization in a pre-organized polar active site: The catalytic role of Lys-80 in *Candida tenuis* xylose reductase (AKR2B5) probed by site-directed mutagenesis and functional complementation studies. *Biochem. J.* 389 (2) p. 507–515.
- [250] ML Dart, T Machleidt, E Jost, MK Schwinn, MB Robers, C Shi, TA Kirkland, MP Killoran, JM Wilkinson, JR Hartnett, K Zimmerman, K V. Wood (2018) Homogeneous assay for target engagement utilizing bioluminescent thermal shift. *ACS Med. Chem. Lett.* 9 (6) p. 546–551.
- [251] DH Harrison, KM Bohren, D Ringed, GA Petsko, KH Gabbay (1994) An anion binding site in human aldose reductase: Mechanistic implications for the binding of citrate, cacodylate, and glucose 6-phosphate. *Biochemistry* 33 (8) p. 2011–2020.
- [252] JD Williamson, JMH Stoop, MO Massel, MA Conkling, DM Pharr (1995) Sequence analysis of a mannitol dehydrogenase cDNA from plants reveals a function for the pathogenesis-related protein ELI3. *Pnas* 92 (16) p. 7148–52.
- [253] J Stoop, J Williamson, D Masonpharr (1996) Mannitol metabolism in plants: A method for coping with stress. *Trends Plant Sci.* 1 (5) p. 139–144.
- [254] D Wyrambik, H Grisebach (1979) Enzymic synthesis of lignin precursors. *Eur. J. Biochem.* 97 p. 503–509.
- [255] MJ Banfield, ME Salvucci, EN Baker, CA Smith (2001) Crystal structure of the NADP(H)-dependent ketose reductase from *Bemisia argentifolii* at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 306 (2) p. 239–250.
- [256] ST Rao, MG Rossmann (1973) Comparison of super-secondary structures in proteins. *J. Mol. Biol.* 76 (2) p. 241–256.

- [257] J Strommer (2011) The plant ADH gene family. *Plant J.* 66 (1) p. 128–142.
- [258] K Kito, K Yamane, T Yamamori, H Matsuhira, Y Tanaka, T Takabe (2018) Isolation, functional characterization and stress responses of raffinose synthase genes in sugar beet. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 27 (1) p. 36–45.
- [259] Y Zhou, Y Liu, S Wang, C Shi, R Zhang, J Rao, X Wang, X Gu, Y Wang, D Li, C Wei (2017) Molecular cloning and characterization of galactinol synthases in *Camellia sinensis* with different responses to biotic and abiotic stressors. *J. Agric. Food Chem.* 65 (13) p. 2751–2759.
- [260] X Li, JJ Zhuo, Y Jing, X Liu, XF Wang (2011) Expression of a galactinol synthase gene is positively associated with desiccation tolerance of *Brassica napus* seeds during development. *J. Plant Physiol.* 168 (15) p. 1761–1770.
- [261] H Quiquampoix, BC Loughman, RG Ratcliffe (1993) A ¹P-NMR study of the uptake and compartmentation of manganese by maize roots. *J. Exp. Bot.* 44 (12) p. 1819–1827.
- [262] JK Pittman (2005) Managing the manganese: Molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytol.* 167 (3) p. 733–742.
- [263] AS Moomaw, ME Maguire (2008) The unique nature of Mg²⁺ channels. *Physiology* 23 (5) p. 275–285.
- [264] BM Waters (2011) Moving magnesium in plant cells. *New Phytol.* 190 (3) p. 510–513.
- [265] AU Igamberdiev, LA Kleczkowski (2006) Equilibration of adenylates in the mitochondrial intermembrane space maintains respiration and regulates cytosolic metabolism. *J. Exp. Bot.* 57 (10) p. 2133–2141.
- [266] R Bligny, E Gout (2017) Regulation of respiration by cellular key parameters: Energy demand, ADP, and Mg²⁺, En: *Plant Respiration: Metabolic Fluxes and Carbon Balance. Advances in Photosynthesis and Respiration*, (Ed.: G Tcherkez, J Ghashghaie) Springer, Cham.
- [267] V Segel, J Pelleg, D Fuks, S Dorfman (1993) A model describing the curved arrhenius plots in self-diffusion of metals. *Phys. Status Solidi* 140 (2) p. 363–368.
- [268] J Zhou, Y Yang, J Yu, L Wang, X Yu, M Ohtani, M Kusano, K Saito, T Demura, Q Zhuge (2014) Responses of *Populus trichocarpa* galactinol synthase genes to abiotic stresses. *J. Plant Res.* 127 (2) p. 347–358.
- [269] K Ginalski (2006) Comparative modeling for protein structure prediction. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16 (2) p. 172–177.
- [270] P Salvi, SC Saxena, BP Petla, NU Kamble, H Kaur, P Verma, V Rao, S Ghosh, M Majee (2016) Differentially expressed galactinol synthase(s) in chickpea are implicated in seed vigor and longevity by limiting the age induced ROS accumulation. *Sci. Rep.* 6 (September) p. 1–15.
- [271] Y Fan, M Yu, M Liu, R Zhang, W Sun, M Qian, H Duan, W Chang, J Ma, C Qu, K Zhang, B

- Lei, K Lu (2017) Genome-wide identification, evolutionary and expression analyses of the galactinol synthase gene family in rapeseed and tobacco. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (12) p. 1–21.
- [272] LB Lahuta, RJ Górecki (2011) Raffinose in seedlings of winter vetch (*Vicia villosa* Roth.) under osmotic stress and followed by recovery. *Acta Physiol. Plant.* 33 (3) p. 725–733.
- [273] Z Wang, Z Yuan, B Quebedeaux (1998) Photoperiod alters partitioning of newly-fixed ¹⁴C and reserve carbon into sorbitol, sucrose and starch in apple leaves, stems, and roots. *Aust. J. Plant Physiol.* 25 (4) p. 503–506.
- [274] R Zhou, R Sicher, B Quebedeaux (2001) Diurnal changes in carbohydrate metabolism in mature apple leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 28 (11) p. 1143–1150.
- [275] R Sulpice, A Flis, AA Ivakov, F Apelt, N Krohn, B Encke, C Abel, R Feil, JE Lunn, M Stitt (2014) Arabidopsis coordinates the diurnal regulation of carbon allocation and growth across a wide range of photoperiods. *Mol. Plant* 7 (1) p. 137–155.
- [276] AM Smith, M Stitt (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell Environ.* 30 (9) p. 1126–1149.
- [277] D Sengupta, D Naik, AR Reddy (2015) Plant aldo-keto reductases (AKRs) as multi-tasking soldiers involved in diverse plant metabolic processes and stress defense: A structure-function update. *J. Plant Physiol.* 179 p. 40–55.
- [278] PJ Simpson, C Tantitadapitak, AM Reed, OC Mather, CM Bunce, SA White, JP Ride (2009) Characterization of two novel aldo-keto reductases from Arabidopsis: expression patterns, broad substrate specificity, and an open active-site structure suggest a role in toxicant metabolism following stress. *J. Mol. Biol.* 392 (2) p. 465–480.
- [279] WC Cooper, Y Jin, TM Penning (2007) Elucidation of a complete kinetic mechanism for a mammalian hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) and identification of all enzyme forms on the reaction coordinate: The example of rat liver 3 α -HSD (AKR1C9). *J. Biol. Chem.* 282 (46) p. 33484–33493.
- [280] CE Grimshaw, KM Bohren, CJ Lai, KH Gabbay (1995) Human aldose reductase: subtle effects revealed by rapid kinetic studies of the C298A mutant enzyme. *Biochemistry* 34 (44) p. 14366–14373.
- [281] CE Grimshaw, CG Putney, M Shahbaz (1990) Spectroscopic and kinetic characterization of nonenzymic and aldose reductase mediated covalent NADP-glycolaldehyde adduct formation. *Biochemistry* 29 (42) p. 9936–9946.
- [282] DW Borhani, TM Harter, JM Petrash (1992) The crystal structure of the aldose reductase·NADPH binary complex. *J. Biol. Chem.* 267 (34) p. 24841–24847.
- [283] TJ Kubiseski, DJ Hyndman, N a Morjana, TG Flynn (1992) Pig muscle aldose reductase.

Biochemistry 267 (10) p. 6510–6517.

- [284] G Sanli, M Blaber (2001) Structural assembly of the active site in an aldo-keto reductase by NADPH cofactor. *J. Mol. Biol.* 309 (5) p. 1209–1218.
- [285] G Sanli, JI Dudley, M Blaber (2003) Structural biology of the aldo-keto reductase family of enzymes: Catalysis and cofactor binding. *Cell Biochem. Biophys.* 38 (1) p. 79–101.
- [286] J Hedlund, H Jörnvall, B Persson (2010) Subdivision of the MDR superfamily of medium-chain dehydrogenases/reductases through iterative hidden Markov model refinement. *BMC Bioinformatics* 11.
- [287] KM Blumenthal, EL Smith (1975) Functional arginine residues involved in coenzyme binding by glutamate dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 250 (16) p. 6555–6559.
- [288] A Stavrinides, EC Tatsis, L Caputi, E Foureau, CEM Stevenson, DM Lawson, V Courdavault, SE O'Connor (2016) Structural investigation of heteroyohimbine alkaloid synthesis reveals active site elements that control stereoselectivity. *Nat. Commun.* 7 (May).
- [289] CS Tan, M Hassan, ZA Mohamed Hussein, I Ismail, KL Ho, CL Ng, Z Zainal (2018) Structural and kinetic studies of a novel nerol dehydrogenase from *Persicaria minor*, a nerol-specific enzyme for citral biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem.* 123 p. 359–368.
- [290] SY Jun, AM Walker, H Kim, J Ralph, W Vermerris, SE Sattler, CH Kang (2017) The enzyme activity and substrate specificity of two major cinnamyl alcohol dehydrogenases in Sorghum (*Sorghum bicolor*), SbCAD2 and SbCAD4. *Plant Physiol.* 174 (4) p. 2128–2145.
- [291] B Youn, R Camacho, SGA Moinuddin, C Lee, LB Davin, NG Lewis, C Kang (2006) Crystal structures and catalytic mechanism of the Arabidopsis cinnamyl alcohol dehydrogenases AtCAD5 and AtCAD4. *Org. Biomol. Chem.* 4 (9) p. 1687–1697.
- [292] AC Ebrecht, AM Orlof, N Sasoni, CM Figueroa, AA Iglesias, MA Ballicora (2015) On the ancestral UDP-glucose pyrophosphorylase activity of GalF from *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 6 (NOV) p. 1–13.
- [293] V Lauvergeat, K Kennedy, C Feuillet, JH McKie, L Gorrichon, M Baltas, AM Boudet, J Grima-Pettenatic, KT Douglas (1995) Site-directed mutagenesis of a serine residue in cinnamyl alcohol dehydrogenase, a plant NADPH-dependent dehydrogenase, affects the specificity for the coenzyme. *Biochemistry* 34 (38) p. 12426–12434.
- [294] SJJ Brouns, AP Turnbull, HLDM Willems, J Akerboom, J van der Oost (2007) Crystal structure and biochemical properties of the d-arabinose dehydrogenase from *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.* 371 (5) p. 1249–1260.
- [295] AD Mesecar, BL Stoddard, DE Koshland (1997) Orbital steering in the catalytic power of enzymes: Small structural changes with large catalytic consequences. *Science* (80-.). 277

(5323) p. 202–206.

- [296] JKB Cahn, CA Werlang, A Baumschlager, S Brinkmann-Chen, SL Mayo, FH Arnold (2017) A general tool for engineering the NAD/NADP cofactor preference of oxidoreductases. *ACS Synth. Biol.* 6 (2) p. 326–333.
- [297] DJ Maddock, WM Patrick, ML Gerth (2015) Substitutions at the cofactor phosphate-binding site of a clostridial alcohol dehydrogenase lead to unexpected changes in substrate specificity. *Protein Eng. Des. Sel.* 28 (8) p. 251–258.
- [298] CE Naylor, S Gover, AK Basak, MS Cosgrove, HR Levy, MJ Adams (2001) NADP⁺ and NAD⁺ binding to the dual coenzyme specific enzyme *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase: Different interdomain hinge angles are seen in different binary and ternary complexes. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 57 (5) p. 635–648.
- [299] KL Kavanagh, M Klimacek, B Nidetzky, DK Wilson (2003) Crystal structure of *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase: Evidence for a very divergent long-chain dehydrogenase family. *Chem. Biol. Interact.* 143–144 p. 551–558.
- [300] E Campbell, IR Wheeldon, S Banta (2010) Broadening the cofactor specificity of a thermostable alcohol dehydrogenase using rational protein design introduces novel kinetic transient behavior. *Biotechnol. Bioeng.* 107 (5) p. 763–774.
- [301] B V. Plapp (2010) Conformational changes and catalysis by alcohol dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 493 (1) p. 3–12.
- [302] GA Khoury, H Fazelinia, JW Chin, RJ Pantazes, PC Cirino, CD Maranas (2009) Computational design of *Candida boidinii* xylose reductase for altered cofactor specificity. *Protein Sci.* 18 (10) p. 2125–2138.
- [303] W Van den Ende (2013) Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Front. Plant Sci.* 4 (July) p. 1–11.
- [304] P Dörmann, C Benning (2002) Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci.* 7 (3) p. 112–118.
- [305] AA Kelly, P Dörmann (2002) DGD2, an Arabidopsis gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. *J. Biol. Chem.* 277 (2) p. 1166–1173.
- [306] M Pauly, S Gille, L Liu, N Mansoori, A de Souza, A Schultink, G Xiong (2013) Hemicellulose biosynthesis. *Planta* 238 (4) p. 627–642.
- [307] A Bacic (2006) Breaking an impasse in pectin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (15) p. 5639–5640.
- [308] D Loqué, H V. Scheller, M Pauly (2015) Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel

- production. *Curr. Opin. Plant Biol.* 25 p. 151–161.
- [309] L a Kleczkowski, M Geisler, I Ciereszko, H Johansson (2004) UDP-glucose pyrophosphorylase. An old protein with new tricks. *Plant Physiol.* 134 (3) p. 912–918.
- [310] LJ Corcuera, L Michalczuk, RS Bandurski (1982) Enzymic synthesis of indol-3-ylacetyl-myoinositol galactoside. *Biochem. J.* 207 (2) p. 283–290.
- [311] M Shibuya, K Nishimura, N Yasuyama, Y Ebizuka (2010) Identification and characterization of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of soyasaponin I in *Glycine max.* *FEBS Lett.* 584 (11) p. 2258–2264.
- [312] G Blanc, KH Wolfe (2004) Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during Arabidopsis evolution. *Plant Cell* 16 (7) p. 1679–1691.
- [313] EW Ganko, BC Meyers, TJ Vision (2007) Divergence in expression between duplicated genes in Arabidopsis. *Mol. Biol. Evol.* 24 (10) p. 2298–2309.
- [314] S Rastogi, DA Liberles (2005) Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. *BMC Evol. Biol.* 5 (28) p. 1–7.
- [315] JA Webb (1983) Partial purification of galactinol synthase from leaves of *Cucurbita pepo.* *Can. J. Bot.* 61 (1) p. 376–376.
- [316] C Breton, A Imberty (1999) Structure/function studies of glycosyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (5) p. 563–571.
- [317] UM Ünligil, JM Rini (2000) Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10 (5) p. 510–517.
- [318] C Breton, L Šnajdrová, C Jeanneau, J Koča, A Imberty (2006) Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* 16 (2) p. 29–37.
- [319] C V. Piattoni, SA Guerrero, AA Iglesias (2013) A differential redox regulation of the pathways metabolizing glyceraldehyde-3-phosphate tunes the production of reducing power in the cytosol of plant cells. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (4) p. 8073–8092.
- [320] BO Burek, S Bormann, F Hollmann, JZ Bloh, D Holtmann (2019) Hydrogen peroxide driven biocatalysis. *Green Chem.* 21 (12) p. 3232–3249.
- [321] PJ Kiley, G Storz (2004) Exploiting thiol modifications. *PLoS Biol.* 2 (11) p. 1714–1717.
- [322] LB Poole, PA Karplus, A Claiborne (2004) Protein sulfenic acids in redox signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44 (1) p. 325–347.
- [323] EC Dierking, KD Bilyeu (2008) Association of a soybean raffinose synthase gene with low raffinose and stachyose seed phenotype. *Plant Genome* 1 (2) p. 135–145.
- [324] Y Gibon, OE Bläsing, N Palacios-Rojas, D Pankovic, JHM Hendriks, J Fisahn, M Höhne, M Günther, M Stitt (2004) Adjustment of diurnal starch turnover to short days: Depletion of sugar

during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following. *Plant J.* 39 (6) p. 847–862.

- [325] M Stitt, P V. Bulpin, T Ap Rees (1978) Pathway of starch breakdown in photosynthetic tissues of *Pisum sativum*. *BBA - Gen. Subj.* 544 (1) p. 200–214.
- [326] NJ Chatterton, JE Silvius (1980) Photosynthate partitioning into leaf starch as affected by daily photosynthetic period duration in six species. *Physiol. Plant.* 49 (2) p. 141–144.
- [327] NJ Chatterton, JE Silvius (1981) Photosynthate partitioning into starch in soybean leaves. *Plant Physiol.* 67 (2) p. 257–260.
- [328] Y Gibon, ET Pyl, R Sulpice, JE Lunn, M HÖhne, M GÜnther, M Stitt (2009) Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods. *Plant, Cell Environ.* 32 (7) p. 859–874.
- [329] BG Kim, JH Ahn (2013) Characterization of uridine diphosphate-sugar pyrophosphorylase from *Populus deltoids*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 56 (5) p. 525–531.
- [330] F Unda, T Canam, L Preston, SD Mansfield (2012) Isolation and characterization of galactinol synthases from *Hybrid poplar*. *J. Exp. Bot.* 63 (5) p. 2059–2069.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

1. Secuencias de enzimas utilizadas en el trabajo de Tesis

1.1 Secuencia nucleotídica de la manosa-6-fosfato reductasa de Apium graveolens

ATGGCAATAACTCTTAACAGCGGCTTTAAAATGCCCGTTTTGGGTCTCGGCGTCTGGCGTA
TGGACCGTAATGAAATCAAGAATCTCCTCCTTTCCGCGATTAACCTTGGTTATCGTCACTT
TGACTGTGCTGCTGACTACAAGAATGAGTTAGAAGTAGGGGAGGCATTTAAAGAGGCTTT
TGATACTGATCTTGTCAAGAGGGAGGATCTGTTTATTACTACCAAGCTCTGGAACCTCAGA
CCATGGACATGTAATTGAGGCATGCAAAAACAGTCTCAAGAAGCTTCAGCTAGAATATCT
TGATCTTTACCTCATTCACTTCCCAATGGCTTCTAAACATTCCGGAATTGGTACTACTCGA
AGTATCTTGGATGATGAAGGTGTTTTGGAGGTTGATAACAACCTTCACTGGAAGCTACA
TGGCATGAGATGGAGAAGCTGGTTGAAATGGGCTTAGTCCGTAGCATAGGAATCAGCAA
CTATGATGTTTACTTGACCAGAGATATCTTGTCATATTCCAAGATCAAGCCTGCTGTAAT
CAGATCGAGACGCACCCTTACTTCCAAAGAGATTCTCTGATCAAATTCTGTCACAAGTAT
GGCATTGCTATCACAGCACACACACCACTAGGCGGCGCATTGGCTAATACTGAGCGATTT
GGATCAGTTTCGTGCTTAGATGATCCAGTTCTTAAGAAATTATCTGACAAACACAACAAG
TCACCAGCTCAGATTGTTCTCCGTTGGGGTGTGCAGCGCAACACAATTGTAATTCCCAAGT
CATCGAAAACAAAAGACTCGAGGAAAACCTCAACATTTTTGACTTTGAGTTGAGCAAGG
AAGATATGGAGCTCATCAAAACAATGGAGCGCAACCAAAGGAGTAACACACCTGCTAAA
GCTTGGGGAATAGATGTTTATGCTTGAGGATCC

1.2 Secuencia proteica de la manosa-6-fosfato reductasa de Apium graveolens

MAITLNSGFKMPVLGLGVWRMDRNEIKNLLLSAINLGYRHFDCAADYKNELEVGEAFKEAF
DTDLVKREDLFITTKLWNSDHGHVIEACKNSLKKLQLEYLDLYLIHFPMASKHSGIGTTRSILD
DEGVLEVDTTISLEATWHEMEKLVEMGLVRSIGISNYDVYLTRDILSYKIKPAVNQIETHPYF
QRDSLIFCHKYGIAITAHTPLGGALANterFGSVSCLDDPVLKKLSDKHNSPAQIVLRWGV
QRNTIVIPKSSKTKRLEENLNIFDFELSKEDMELIKTMERNQRSNTPAKAWGIDVYA

2.1 Secuencia nucleotídica de la manitol deshidrogenasa de *Apium graveolens*

ATGGCTAAAAGCTCTGAAATCGAACACCCGGTTAAAGCGTTCGGTTGGGCGGCACGTGAT
ACCACCGGTCTGCTGAGCCCGTTCAAATTCAGCCGCCGTGCTACCGGTGAAAAAGATGTT
CGTCTGAAAGTTCTGTTCTGCGGTGTTTGCCACTCTGATCACCACATGATCCACAACA
GGGGTTTCACCACCTACCCGATCGTTCCGGGTCACGAAATCGTTGGCGTAGTGACGGAGG
TTGGATCTAAAGTCGAAAAGGTTAAAGTGGGTGACAATGTAGGTATAGGCTGCCTGGTGG
GTTTCATGCCGTAGCTGTGAAAGCTGCTGTGACAACCGTGAATCTCATTGTGAGAATACCA
TCGATACTTACGGCTCTATTTATTTTGTATGGTACTATGACCCACGGTGGCTATTCCGACAC
CATGGTTGCAGATGAACACTTCATTCTGCGTTGGCCGAAAAACCTGCCGCTGGATTCTGGT
GCTCCGCTGCTGTGCGCTGGTATTACCACCTATTCCTCCGCTGAAATACTACGGTCTGGATA
AACCGGGTACCAAAATTGGCGTTGTTGGTCTGGGCGGTCTGGGTACGTTGCGGTTAAAA
TGGCGAAAGCGTTCGGCGCACAGGTTACCGTTATTGATATCTCTGAATCTAAACGTAAAG
AAGCTCTGGAAAACTGGGTGCTGATTCTTTCCTGCTGAACTCTGATCAGGAACAGATGA
AAGGTGCACGTTCTAGCCTGGATGGTATCATCGATAACCGTTCCGGTTAACACCCGCTGG
CGCCGCTGTTTCGATCTGCTGAAACCGAACGGTAAACTGGTTATGGTTGGTGCGCCGGAAA
AACCGTTCGAACTGCCGGTTTTTCAGCCTGCTGAAAGGTCGTAAACTGCTGGGCGGCACCA
TCAACGGTGGTATCAAAGAAACCCAGGAAATGCTGGATTTTCGCGGCGAAACACAACATC
ACCGCGGATGTTGAAGTTATCCCGATGGATTACGTTAACACCGCGATGGAACGTCTGGTT
AAATCTGATGTTTCGTTACCGTTTCGTGATCGATATCGCGAACACCATGCGTACCGAAGAA
TCTCTGGGTGCGGAGCTC

2.2 Secuencia proteica de la manitol deshidrogenasa de *Apium graveolens*

MAKSSEIEHPVKAFGWAARDTTGLLSPFKFSRRATGEKDVRLKVLFCGVCHSDHHMIHNNW
GFTTYPIVPGHEIVGVVTEVVGSKVEKVKVGDNVIGIGCLV GSCRSCESCCDNRESHCENTIDTY
GSIYFDGTMTHGGYSDTMVADEHFILRWPKNLPLDSGAPLLCAGITTYSPLKYYGLDKPGTKI
GVVGLGGLGHVAVKMAKAFGAQVTVIDISESKRKEALEKLGADSFLNSDQEQMKGARSSL
DGIIDTVPVNHPLAPLFDLLKPNGKLV MVGAPEKPFELPVFSLKGRKLLGGTINGGIKETQEM
LDFAAKHNITADVEVIPMDYVNTAMERLVKSDVRYRFVIDIANTMRTEESLGAEL

3.1 Secuencia nucleotídica de la UDP-azúcar pirofosforilasa de *Brachypodium distachyon*

ATGGCTAGCGGCGCTGATAGCGCGGCTGAAGGCGTAGCGGCACTGGGTATCTCTGATTGC
 CCGGCGCCACTGCGTCGTAACCTGCAGCTGCTGTCTCACGATCAGGTGGAACCTGGCAAAA
 ATGCTGCTGAACGAAGGTCAAACCCATCTGTTTGAACATTGGCCTGAACCGGGTGTGAT
 GATGATAAAAAACGTAGCTTCTTTGATCAGGTTTCATCGTTTACTCTAGCTATCCGGGTG
 GTTTAGCTAGCTACATTCGTAACGCTAAAAAACTGTTAGCTGATAGTCGCGCTGGTAAAA
 ACCCGTATGATGGTTTCACTCCGTCTGTTCCGTCTGGTGAAGTGTGACCTTTGGCGATGA
 TAACTTCGTTAGCCTGGAAGCTACCGGTGTGAAAGAAGCTCGCAACGCGGTATTCGTGCT
 GGTGGCAGGTGGCCTGGGTGAACGCCTGGGTACAAAGGTATTAAAGTGGCGCTGCCGCG
 TGAAATCACCTCTGGTAAATGTTTCCTGCAGCACTATATCGAATCAATCCTGGCTCTGCAG
 GAAGCATCTTGTA AAAATGGAAGGTGAATGTCATAACCAGATCCCGTTTGTATCATGACC
 TCTGACGATACCAACGCGCTGACCATCAAACCTGCTGGAAAGCAACGCGTATTTCCGGCATG
 GAACCGAGCCAGGTAAAATTCTGAAACAGGAAAAAGTCGCGTGCCTGGCGGATAACGA
 CGCGCGCCTGGCGCTGGATCCGAACGATATGTATAAAAATCCAGACCAAACCGCACGGTCA
 CGGCGATGTTTCATAGCCTGCTGTATTCTTCTGGCCTGCTGGAACACTGGAAATCTACCGGC
 CGTAAATGGGTTCTGTTCTTCCAGGACACTAACGGTCTGCTGTTCAATGCGATCCCGAGCG
 CTCTGGGCGTAAGCGCTTCCAAAGGTTACAACGTTAACTCCCTGGCAGTTCCGCGTAAAG
 CAAAAGAAGCTATTGGCGGTATTACCAAACCTGACCCATCTGGACGGTTCGCACCATGGTTA
 TTAACGTGGAATATAATCAGCTGGACCCGCTGCTGCGTGCACCGGCCATCCGGACGGCG
 ACGCGAACTGTGAAACCGGCTACAGCCCGTATCCGGGCAACATTAACCAGCTGATCCTGG
 AACTGGGCCCATACATTGAAGAACTGAAAAAGACGCACGGCGCGATCTCTGAATTTGTGA
 ACCCGAAATATACTGATTCTACCAAATCTGCGTTCAAAGCAGCACCCGTCTGGAATGCA
 TGATGCAGGATTACCCGAAAACCCTGCCGCCGACCGCAAAAGTAGGTTTCACTGTTATGG
 ATACCTGGCTGGCTTATGCGCCAGTTAAAAACAACCCGGAAGACGCGGCGAAAGTTCCGA
 AAGGTAACCCGTATCACTCTGCGACCAGCGGTGAAATGGCGATCTACCGTGCTAACTCCC
 TGATTCTGCGTAAAGCAAGCGCGCAGATCGCTGATCCGGTAATTGATACTTTCAACGGTC
 AGGAAGTTGAAGTTTGGGCTCGCATCACCTGGAGCCCGCGTTGGGGTCTGACCTTCAAAG
 ATGTTTCGTGGTAAAGTTCACGGCAACAGCAGCGTTAGCCAGCGTTCTGTTCTCGTGATCA
 ACGGCCAGAACATCGTTCTGGATGGTCTGTCTCTGGACGGCGCCCTGATTGTGAACAGCG
 TTGATGAAGCGGAAGTTAAAGTGACCGGCCACGTTGAAAACAAAGGTTGGGCAATTCAG
 CACATCGATCATAAAGACACCTCTGAAAAAGAAGAAATTCGTATCCGTGGCTTCAAACCTG
 GAAAAAGTTGAACAGATGGAAGTTAACTACACCGAACCGGGTAAACACTGCATGAGCAG
 CGAGCTC

3.2 *Secuencia proteica de la UDP-azúcar pirofosforilasa de Brachypodium distachyon*

MASGADSAAEGVAALGISDCPAPLRRNLQLLSDQVELAKMLLNEGQTHLFEHWPEPGVDD
DKKRSFFDQVHRLHSSYPGGLASYIRNAKLLADSRAGKNPYDGFTPSVPSGEVLTFGDDNF
VSLEATGVKEARNAVFLVAGGLGERLGYKGIKVALPREITSGKCFLQHYIESILALQEASCK
MEGECHTQIPFVIMTSDDTNALTIKLLSNAYFGMEPSQVKILKQEKVACLADNDARLALDPN
DMYKIQTCPHGHGDVHSLLYSSGLLEHWKSTGRKWVLFQDTNGLLFNAIPALGVSASKGY
NVNSLAVPRKAKEAIGGITKLTHLDGRMTVINVEYNQLDPLLRTGHPDGDANCETGYSPYP
GNINQLILELGPYIEELKKTHGAISEFVNPKYTDSTKSAFKSSTRLECMMDYPKTLPPTAKVG
FTVMDTWLAYAPVKNNPEDAAKVPKGNPYHSATSGEMAIYRANSLILRKASAQIADPVIDTF
NGQEVEVWARITWSPRWGLTFKDVRGKVHGNSSVSQRSVLVINGQNIVLDGLSLDGALIVNS
VDEAEVKVTGHVENKGWAIQHIDHKDTSEKEEIRIRGFKLEKVEQMEVNYTEPGKHCMS

4.1 *Secuencia nucleotídica de la galactinol sintasa de Brachypodium distachyon*

ATGGCGCCGGAAGTGTCTCGTAAAATGACCACCGCGAAAGCGGCGGCAGCGGCTGTAA
ACCGGCAACCAAAGCGTTTGTACCTTCCTGGCGGGCGATGGTGACTATTGGAAAGGTGT
TGTTGGTCTGGCAAAGGTCTGCGTAAAGCAGGTAGCGCGTATCCGCTGGTTGTTGCAAT
GCTGCCGGATGTTCCGGAATCTCACCGTCGTATCCTGGCGTCTCAGGGTTGCATTCTGCGT
GAAATCGTTCCGGTTTACCCGCCGAAAACCAGACCCAGTTCGCGATGGCGTATTACGTG
ATTAAGTATAGCAAAGTGCATCTGCGGAAATTCGTTGAATATGAACGTATGGTTTATCTGG
ATGCAGATATTCAGGTCTTTGATAACGTTGATGAACTGTTTATCTCCCGAAAGGTCACCT
TTATGCTGTTATGGATTGCTTCTGCGAAAAACGTGGTCTCACACCCCGCAGTACCAGATT
GGCTACTGCCAGCAGTGTCTGACCGTGTGACTTGGCCGGCAGCTGAAATGGGTCCGCCG
CCGGCGCTGTACTTTAACGCGGGTATGTTTCGTCCATGAACCGTCCATGGCCACCGCGAAA
GCGCTGCTGGATACCCTGCGTGTGTCACCGACTACCCCGTTCGCGGAACAGGATTTCTG
AACGTTTTCTTCCGTGAACAGTACAAACCGATCCCGCTGGTTTATAACCTGGTTCTGGCTA
TGCTGTGGCGCCACCCAGAAAACGTTTCAGCTGGCGAAAGTTAAAGCTGTGCACTACTGCG
CGGCGGGCAGCAAACCGTGGCGTTTCACAGGCAAGGAAGCCAACATGGACCGTGAAGAC
ATTAAGGTAAGTTAAATAATGGTGGGATATCTACAACGATGAATCTCTGGATTTCAA
GGCCTGCCGGCGGATGCGGATGAACTGGAAGCGGCGGCGAAAAACCGATCCGTGCGGC
TCTGGCGGAAGCCGGCACCGTTAAATACATCACCGCGCCGAGCGCGGCGGAGCTC

4.2 Secuencia proteica de la galactinol sintasa de *Brachypodium distachyon*

MAPELSRKMTTAKAAAAAVKPA TKAFVTFLAGDGDYWKGVVGLAKGLRKAGSAYPLVVA
MLPDVPESHRRILASQGCILREIVPVYPPENQTQFAMAYYVINYSKLRIWVFEYERMVYLDA
DIQVFDNVDELFDLPKGFYAVMDCFCEKTWSHTPQYQIGYCQQCPDRVTWPA AEMGPPPA
LYFNAGMFVHEPSMATAKALLD TLRVSPTTFAEQDFLN VFFREQYKPIPLVYNLVLAMLWR
HPENVQLAKVKAVHYCAAGSKPWRFTGKEANMDREDIKVLVKKWWDIYNDES LDFKGLPA
DADELEAAAKKPIRAALAEAGTVKYITAPSAA

5.1 Secuencia nucleotídica de la rafinosa sintasa de *Brachypodium distachyon*

ATGGCGCCGAACCTGTCTAAAGCGACTGCGGCGGATGTGCTGGGTGGCGCTGTGGCGGCT
GATGGTCTGAAACCGTCTCCGTCCCGCTT CACCCTGAAAGGTGGCAAAGATCTGGCTGTT
GACGGCCACCCGGCGCTGCTGGACGTGCCGGCCAACATCCGTCTGACCCCGGCGTCCACC
CTGGTTCCGTCTAGCAGCGCAAACGCGGCTAACGGTGCCTTCTGGGTTTTGACGCGCCG
GAACCTCTGAGTCGCCACGTTGTGCCGATCGGCCGTCTGGTTAGCACCAAATTCATGAGC
ATTTTTCGTTTTCAAAGTTTGGTGGACCACCCACTGGACCGGCACTCGTGGTTCGTGACCTGG
AAAATGAAACTCAGATGCTGCTGCTGGATCGCCCAGGGCCGGGCCGCCCCGTATGTTCTGC
TGCTGCCGATCCTGGACGGTCCGTTCCGTGCATCCCTGGAACCGGAAAAAAGCGATCACG
TTGCGCTGTGTCTGGAATCCGGCTCTTCCGCTGTAAAAGGCGCGGCGTTTTCGTAGCGCCGT
TTACCTGCATGCCGGTGACGACCCGTTTTCACTGGTTCGTGACGCCGCGCGTGTAGTTCGT
GCACACCTGGGCACCTTCCGCCTGCTGGAAGAAAAACGCCGCCGCGGATCGTTGATAAAA
TTCGGTTGGTGTACTTGGGATGCGTTTTACCTGAAAGTTCACCCGGCGGGCGTCTGGGAA
GGTGTTCGCGGCCTGGCTGATGGCGGCTGCCCGCCGGGCTGGTGCTGATTGACGACGGT
TGGCAGTCCATCTGCCACGACGACGACGACCCGGCGTCTGGCGCAGAGGGTATGAACCGT
ACCGCGGCGGGCGAACAGATGCCGTGTCGCCTGATGAAATTCGAAGAAAATCACAAATT
CCGTGAATATGAAGGCGTTAAAGGTAAAGGCCTGGGTGGTTTTCGTAAAAGAAATGAAGG
CCGCTTTCCCGACTGTTGAGCAGGTTTACGTTTGGCATGCTCTGTGCGGCTACTGGGGTGG
CCTGCGTCCTGGCGCTCCAGGCCTGCCGCCGGCGGAAGTTGTTAAACCACGCCTGTCTCC
GGGCTGCAACGCACCATGGAAGACCTGGCGGTTGATAAAAATCGTTAACAACGGTGTGG
GCCTGGTCGACCCGAAGCGTGTGCTGGA ACTGTACGAAGGCCTGCATAGCCATCTGCAGG
CATCCGGTATTGACGGCGTGAAAGTAGATGTTATCCACCTGCTGGAAATGCTGTGTGAAG
AACACGGTGGTTCGTGTTGAACTGGCGAAAGCTTATTTCCGCGCGCTGACCGAAAGCGTCC
GTCGTCATTTCAACGGTAACGGTGTGATTGCCAGCATGGAACACTGCAATGACTTCATGC

TGCTGGGCACTGAAGCCGTTGCGCTGGGCCGTGTTGGCGATGATTTCTGGTGCCTGATCC
GTCTGGCGATCCGAACGGCACCTTCTGGCTGCAGGGTTGTCACATGGTTCCTGCTGCGTAC
AACTCTCTGTGGATGGGCAGCTTCATTCATCCGGACTGGGATATGTTTCAGTCCACCCACC
CGTGCCTGCGTTTCACGCGGCTAGCCGTGCAGTTTCTGGTGGTCCGGTTTATGTATCCGA
TGCTGTAGGCTGTCACGACTTCGCACTGCTGCGTCGTCTCGCACTGCCGGATGGCACCGTT
CTGCGTTGCGCTCACCACGCGCTGCCGACCCGTGACTGCCTGTTTCGTGGATCCGCTGCACG
ATGGCGAAACCGTTCTGAAAATCTGGAACCTGAACGTGTTTCAGCGGGCTACTGGGTATGT
TCAACTGCCAGGGTGGTGGCTGGAGCCCGGAAGCACGTCGTAACAAATGTTTCTCTCACT
GCTCTGTTCCGCTGACCGTTCATGCGGGTCTGCAGATGTTGAATGGGGCCAGAGCAAAG
GTGGTCTGGGTGTGGGCGCAGCGGAATTCGCGGTTTACTTCGTGGAAGCGGGTAGCGTGC
GTCTGCTGAAACCGGAAGAAACCGTTGAACTGACCCTGGAACCGTTTAACTATGAATTAC
TGGTGGTTGCGCCGGTTAGCCGCGTTGTGGAACGTGACGCGGGCTTCGCTCCGATCGGTC
TCGCTAACATGCTGAACGCTGGCGGGCGCCGTTCAAGGTCTGGAATGCGGTGTTGGTGAAG
TGGAAGTTGCGGTGAAAGGCGCGGGTCAGATGGTTGCGTACTCTTCTGCTCGTCCAGTGA
TGTGCAAAGTTGATGGCGTTGAAGCTGAATTCGTGTATAGCGGTGAAGACGGTCTGGTGA
CCGTTGATGTTCCGTGGTCCGGTTCTAGCTCTAAACTGGTTCGTGTTTCAGTACCTGTATGA
GCTC

5.2 Secuencia proteica de la rafinosa sintasa de *Brachypodium distachyon*

MAPNLSKATAADVLLGGAVAADGLKPSRFTLKGKDLAVDGHALLDVPANIRLTPASTLV
PSSSANAANGAFLGFDPEPLSRHVPIGRLVSTKFMISIFRFKVVWTTHTWTGRDLENETQ
MLLLDRPGPRPYVLLLPILDGPFASLEPEKSDHVALCLESGSSAVKGAAFRSAVYLHAGDD
PFSLVRDAARVVRAHLGTFRLLEKTPPPIVDKFGWCTWDAFYLVHPAGVWEGVRGLADG
GCPPGLVLIDDGWQSICHDDDDPASGAEGMNRTAAGEQMPCLMKFEENHKFREYEGVKGK
GLGGFVKEMKAAFPTVEQVYVWHALCGYWGGLRPGAPGLPPAEVVKPRLSPGLQRTMEDL
AVDKIVNNGVGLVDPKRVLELYEGLHSHLQASGIDGVKVDVIHLLEMLCEEHGGRRVELAKA
YFRALTESVRRHFNGNGVIASMEHCNDFMLLGTEAVALGRVGGDFWCTDPSGDPNGTFWLQ
GCHMVHCAYNSLWMGSFIHPDWD MFQSTHPCAAFHAASRAVSGGPVYVSDAVGCHDFALL
RRLALPDGTVLRCAHHALPTRDCLFVDPLHDGETVLKIWNLN VFSGVLGMFNCQGGGWSPE
ARRNKCFSHCSVPLTVHAGPADVEWGQSKGGLGVGAAEFVYFVEAGSVRLKPEETVELT
LEPFNYELLVVAPVSRVVERDAGFAPIGLANMLNAGGAVQGLECGVGEVEVAVKAGQMV
AYSSARPVMCKVDGVEAEFVYSGEDGLVTVDVPWSGSSSKLVRVQYLY

2. Tablas Suplementarias

Tabla Suplementaria 1: Análisis comparativo de los parámetros cinéticos de diferentes reductasas de plantas. NR: no reportado; *: estas enzimas utilizan Glc6P en lugar de Man6P.

Enzima	Organismo	Fuente	Estructura	MM (kDa)	$S_{0,5}$ Man6P (mM)	$S_{0,5}$ NADPH (mM)	V_{max} (U mg ⁻¹)	Referencia
M6PR	<i>Apium graveolens</i>	Hoja	Dímero	58	15,8	NR	3,76	[40]
M6PR	<i>Apium graveolens</i>	Hoja	Dímero	NR	13,6	0,0021	3,7-6,8	[53]
		Recombinante	Dímero	NR	10,1	0,0062	6-8,9	
M6PR	<i>Striga hermonthica</i>	Hoja	Monómero	33	5,9	0,0102	0,44	[61]
	<i>Orobancha ramosa</i>	Espiga floral	Monómero	27	8,6	0,0698	1,98	
A6PRasa	<i>Malus domestica</i>	Recombinante	Dímero	68	9,6*	0,013	1,25	[58]
Ald6PRasa	<i>Prunus persica</i>	Recombinante	Dímero	67	11*	0,031	3,1	[59]
Man6PRasa	<i>Apium graveolens</i>	Recombinante	Dímero	65	4,4	0,026	3,5	Este trabajo

Tabla Suplementaria 2: Análisis comparativo de los parámetros cinéticos de diferentes USPPasas de plantas. NR: no reportado; *: MM teórica

Enzima	Organismo	Fuente	MM (kDa)	$S_{0,5}$ Gal1P (mM)	$S_{0,5}$ UTP _{Gal1P} (mM)	V_{max} (U mg ⁻¹)	$S_{0,5}$ Glc1P (mM)	$S_{0,5}$ UTP _{Glc1P} (mM)	V_{max} (U mg ⁻¹)	Referencia
UGGPasa	<i>Cucumis melo</i>	Recombinante	68	0,43	NR	714	0,27	ND	222	[107]
PsUSP	<i>Pisum sativum</i>	Recombinante	67	0,58	NR	161	0,34	0,048	106	[131]
AtUSP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Recombinante	70	0,27	NR	86,9	0,23	NR	84,3	[133]
AtUSP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Recombinante	70	NR	NR	24,6	0,42	0,19	41,7	[132]
USP1	<i>Glycine max</i>	Recombinante	71	NR	NR	112,91	0,23	0,19	110,48	[125]
PdUSPasa	<i>Populus deltoides</i>	Recombinante	51,5*	NR	NR	NR	1,49	1,98	23,44	[329]
USPPasa	<i>Brachypodium distachyon</i>	Recombinante	68	0,25	0,109	1024,3	0,28	0,11	756,8	Este trabajo

Tabla Suplementaria 3: Comparación de parámetros cinéticos de GolSasas de plantas. NR: no reportado; *: MM teórica; a: nM min⁻¹; b: U g FW⁻¹; c: mM min⁻¹ mg⁻¹.

Enzima	Organismo	Fuente	MM (kDa)	S _{0,5} UDP-Gal (mM)	S _{0,5} myo-inositol (mM)	V _{max} (U mg ⁻¹)	Referencia
BvGolS1	<i>Beta vulgaris</i>	Recombinante	40	0,79	4,76	NR	[258]
		Raiz	40	NR	NR	4,70 x 10 ⁻⁶	
		Hoja	40	NR	NR	0,38 x 10 ⁻⁶	
CsGolS1	<i>Camellia sinensis</i>	Recombinante	50	NR	NR	0,19	[259]
CsGolS2		Recombinante	50	NR	NR	0,08	
CsGolS3		Recombinante	50	NR	NR	0,3	
PaXgGolS1	<i>Hybrid poplar</i>	Recombinante	NR	0,8	NR	657,5 ^a	[330]
PaXgGolS2		Recombinante	NR	0,65	NR	1245 ^a	
GS	<i>Phaseolous vulgaris</i>	Semilla	38	0,4	4,5	8,75	[113]
GS	<i>Curcubita pepo</i>	Hoja	36	NR	NR	32,1	
GS	<i>Curcubita pepo</i>	Hoja	42	1,8	6,5	23,3	[121]
GolSase	<i>Cucumis sativus</i>	Hoja	NR	0,16	4	0,81	[154]
GS	<i>Ajuga reptans</i>	Hoja	NR	0,53	6,4	303 ^b	[101]
BnGolS	<i>Brassica napus</i>	Recombinante	39,4*	0,401	4,96	73 ^c	[260]
GolSasa	<i>Brachypodium distachyon</i>	Recombinante	45	0,06	2,5	28,6	Este trabajo

Tabla Suplementaria 4: Parámetros cinéticos de diferentes RafSasas de plantas en la dirección de hidrólisis. NR: no reportado; *: MM teórica.

Enzima	Organismo	Fuente	MM (kDa)	Sustrato	$S_{0.5}$ (mM)	V_{max} (U mg ⁻¹)	Referencia
RS	<i>Oryza sativa</i>	Recombinante	NR	Gol	2,15	0,834	[156]
				Raf	10,9	0,678	
				pNP α Gal	12	0,6	
ZmRS	<i>Zea mays</i>	Recombinante	85	Gol	1,58	ND	[157]
RS	<i>Pisum sativum</i>	Recombinante	88,7*	Gol	1	0,00164	[114]
AtRS5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Recombinante	90	Gol	2,7	0,125	[167]
RafSasa	<i>Brachypodium distachyon</i>	Recombinante	110	Gol	1,8 \pm 0,1	0,72 \pm 0,02	Este trabajo
				Raf	12,3 \pm 0,9	0,49 \pm 0,01	
				Mel	84,3 \pm 12,9	0,022 \pm 0,002	

Tabla Suplementaria 5: Códigos de las secuencias proteicas de plantas utilizadas para la construcción del árbol filogenético presentado en la Figura 25. Las secuencias fueron nombradas con un código numérico para mejorar la claridad de la figura. Todas las secuencias se obtuvieron del servidor Phytozome v12.1.

Código	Organismo	Familia	Nombre del transcripción
1_Rco	<i>R. communis</i>	Euphorbiaceae	30076.m004605
2_Rco	<i>R. communis</i>	Euphorbiaceae	30128.m008945
3_Rco	<i>R. communis</i>	Euphorbiaceae	30128.m008946
4_Aco	<i>A. comosus</i>	Bromeliaceae	Aco001744.1
5_Aco	<i>A. comosus</i>	Bromeliaceae	Aco002583.1
6_Aco	<i>A. comosus</i>	Bromeliaceae	Aco005386.1
7_Aly	<i>A. lyrata</i>	Brassicaceae	AL1G66490.t1
8_Aly	<i>A. lyrata</i>	Brassicaceae	AL2G16220.t1
9_Aly	<i>A. lyrata</i>	Brassicaceae	AL4G46730.t1
10_Aqco	<i>A. coerulea</i>	Ranunculaceae	Aqcoe2G257100.1.p
11_Aha	<i>A. halleri</i>	Brassicaceae	Araha.32566s0001.1.p
12_Ath	<i>A. thaliana</i>	Brassicaceae	AT1G56600.1
13_Ath	<i>A. thaliana</i>	Brassicaceae	AT2G47180.1
14_Bst	<i>B. stricta</i>	Brassicaceae	Bostr.25993s0046.1.p
15_Bst	<i>B. stricta</i>	Brassicaceae	Bostr.8169s0004.1.p
16_Bdi	<i>B. distachyon</i>	Poaceae	Bradi1g17200.1.p
17_Bdi	<i>B. distachyon</i>	Poaceae	Bradi1g64120.1.p
18_Bra	<i>B. rapa FPsc</i>	Brassicaceae	Brara.D02832.1.p
19_Bra	<i>B. rapa FPsc</i>	Brassicaceae	Brara.I01595.1.p
20_Bst	<i>B. stacei</i>	Poaceae	Brast02G160300.1.p
21_Cgr	<i>C. grandiflora</i>	Brassicaceae	Cagra.11315s0002.1.p
22_Cgr	<i>C. grandiflora</i>	Brassicaceae	Cagra.6400s0002.1.p
23_Cru	<i>C. rubella</i>	Brassicaceae	Carubv10020539m
24_Cru	<i>C. rubella</i>	Brassicaceae	Carubv10025703m
25_Ccl	<i>C. clementina</i>	Rutaceae	Ciclev10001308m
26_Ccl	<i>C. clementina</i>	Rutaceae	Ciclev10021027m
27_Ccl	<i>C. clementina</i>	Rutaceae	Ciclev10032043m
28_Egr	<i>E. grandis</i>	Myrtaceae	Eucgr.B01791.1.p
29_Egr	<i>E. grandis</i>	Myrtaceae	Eucgr.B01793.1.p
30_Egr	<i>E. grandis</i>	Myrtaceae	Eucgr.H00906.1.p
31_Egr	<i>E. grandis</i>	Myrtaceae	Eucgr.K03563.1.p
32_Egr	<i>E. grandis</i>	Myrtaceae	Eucgr.L00234.1.p
33_Egr	<i>E. grandis</i>	Myrtaceae	Eucgr.L00245.1.p
34_Atr	<i>A. trichopoda</i>	Amborellaceae	evm_27.model.AmTr_v1.0_scaffold00003.201

35_Cpa	<i>C. papaya</i>	Caricaceae	evm.model.supercontig_145.23
36_Gma	<i>G. max</i>	Fabaceae	Glyma.03G222000.1.p
37_Gma	<i>G. max</i>	Fabaceae	Glyma.19G219100.1.p
38_Gra	<i>G. raimondii</i>	Malvaceae	Gorai.001G145800.1
39_Gra	<i>G. raimondii</i>	Malvaceae	Gorai.007G120900.1
40_Zma	<i>Z. mays</i>	Poaceae	GRMZM2G165919_P01
41_Zma	<i>Z. mays</i>	Poaceae	GRMZM5G872256_P02
42_Mac	<i>M. acuminata</i>	Musaceae	GSMUA_Achr11P16140_001
43_Mac	<i>M. acuminata</i>	Musaceae	GSMUA_Achr6P27280_001
44_Mac	<i>M. acuminata</i>	Musaceae	GSMUA_Achr8P10810_001
45_Kfe	<i>K. fedtschenkoi</i>	Crassulaceae	Kaladp0057s0103.1.p
46_Kfe	<i>K. fedtschenkoi</i>	Crassulaceae	Kaladp0085s0102.1.p
47_Kla	<i>K. laxiflora</i>	Campanulaceae	Kalax.0267s0048.1.p
48_Kla	<i>K. laxiflora</i>	Campanulaceae	Kalax.0285s0036.1.p
49_Kla	<i>K. laxiflora</i>	Campanulaceae	Kalax.0397s0014.1.p
50_Kla	<i>K. laxiflora</i>	Campanulaceae	Kalax.0803s0006.1.p
51_Osa	<i>O. sativa</i>	Poaceae	LOC_Os03g20120.1
52_Osa	<i>O. sativa</i>	Poaceae	LOC_Os07g48830.1
53_Lus	<i>L. usitatissimum</i>	Linaceae	Lus10031434
54_Mes	<i>M. esculenta</i>	Euphorbiaceae	Manes.05G012000.1.p
55_Mes	<i>M. esculenta</i>	Euphorbiaceae	Manes.09G179100.1.p
56_Mes	<i>M. esculenta</i>	Euphorbiaceae	Manes.13G029000.1.p
57_Mdo	<i>M. domestica</i>	Rosaceae	MDP0000446914
58_Mdo	<i>M. domestica</i>	Rosaceae	MDP0000466683
59_Mtr	<i>M. truncatula</i>	Fabaceae	Medtr7g109920.1
60_Mgu	<i>M. guttatus</i>	Phrymaceae	Migut.E00169.1.p
61_Mgu	<i>M. guttatus</i>	Phrymaceae	Migut.L01457.1.p
62_Fve	<i>F. vesca</i>	Rosaceae	mrna24544.1-v1.0-hybrid
63_Csi	<i>C. sinensis</i>	Rutaceae	orange1.lg019647m
64_Oth	<i>O. thomaeum</i>	Poaceae	Oropetium_20150105_01144A
65_Oth	<i>O. thomaeum</i>	Poaceae	Oropetium_20150105_10155A
66_Pha	<i>P. hallii</i>	Poaceae	Pahal.B05006.1
67_Pha	<i>P. hallii</i>	Poaceae	Pahal.D02454.1
68_Pvi	<i>P. virgatum</i>	Poaceae	Pavir.Ba00293.1.p
69_Pvi	<i>P. virgatum</i>	Poaceae	Pavir.Bb03717.1.p
70_Pvi	<i>P. virgatum</i>	Poaceae	Pavir.J07018.1.p
71_Pvi	<i>P. virgatum</i>	Poaceae	Pavir.J40731.1.p
72_Stu	<i>S. tuberosum</i>	Solanaceae	PGSC0003DMP400006276

73_Stu	<i>S. tuberosum</i>	Solanaceae	PGSC0003DMP400009269
74_Ptr	<i>P. trichocarpa</i>	Salicaceae	Potri.002G191600.1
75_Ptr	<i>P. trichocarpa</i>	Salicaceae	Potri.005G006800.1
76_Ptr	<i>P. trichocarpa</i>	Salicaceae	Potri.013G005800.1
77_Ptr	<i>P. trichocarpa</i>	Salicaceae	Potri.013G005900.1
78_Ptr	<i>P. trichocarpa</i>	Salicaceae	Potri.014G116800.1
79_Ppe	<i>P. persica</i>	Rosaceae	Prupe.1G251600.1.p
80_Ppe	<i>P. persica</i>	Rosaceae	Prupe.3G005100.1.p
81_Spu	<i>S. purpurea</i>	Salicaceae	SapurV1A.0088s0080.1.p
82_Spu	<i>S. purpurea</i>	Salicaceae	SapurV1A.0088s0090.1.p
83_Spu	<i>S. purpurea</i>	Salicaceae	SapurV1A.0294s0080.1.p
84_Sit	<i>S. italica</i>	Poaceae	Seita.2G438500.1.p
85_Sit	<i>S. italica</i>	Poaceae	Seita.9G424800.1.p
86_Svi	<i>S. viridis</i>	Poaceae	Sevir.2G450900.1.p
87_Svi	<i>S. viridis</i>	Poaceae	Sevir.9G429000.1.p
88_Sbi	<i>S. bicolor</i>	Poaceae	Sobic.001G391300.1.p
89_Sbi	<i>S. bicolor</i>	Poaceae	Sobic.002G423600.1.p
90_Sly	<i>S. lycopersicum</i>	Solanaceae	Solyc01g079170.2.1
91_Sly	<i>S. lycopersicum</i>	Solanaceae	Solyc02g084980.2.1
92_Tca	<i>T. cacao</i>	Malvaceae	Thecc1EG004881t1
93_Esa	<i>E. salsugineum</i>	Brassicaceae	Thhalv10001530m
94_Esa	<i>E. salsugineum</i>	Brassicaceae	Thhalv10024122m
95_Tpr	<i>T. pratense</i>	Fabaceae	Tp57577_TGAC_v2_mRNA4274
