



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

C E F O B I



CONICET

U N R

CENTRO DE ESTUDIOS FOTOSINTÉTICOS Y BIOQUÍMICOS

TESIS DE DOCTORADO

“CARACTERIZACIÓN DE LOS ASPECTOS EVOLUTIVOS,  
BIOQUÍMICOS Y REGULATORIOS DEL METABOLISMO DEL  
ALMIDÓN”

Presentada por Nicolás Hedin

Directora: María Victoria Busi

Co-Directora: Julieta Barchiesi

Rosario, Argentina

2018

“CARACTERIZACIÓN DE LOS ASPECTOS EVOLUTIVOS, BIOQUÍMICOS Y REGULATORIOS DEL  
METABOLISMO DEL ALMIDÓN”

Nicolás Hedin

Licenciado en Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos, del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CEFOBI-CONICET), dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de septiembre de 2013 y el 31 de marzo del 2018, bajo la dirección de la Dra. María Victoria Busi, y la co-dirección de la Dra. Julieta Barchiesi.

Defensa: marzo de 2018

Parte de los resultados de esta tesis han sido publicados en las siguientes revistas científicas y congresos.

### **Publicaciones en revistas científicas**

- **Hedin N**, Barchiesi J, Gomez-Casati DF, Iglesias AA, Ballicora MA and Busi MV. 2017. Identification and characterization of a novel starch branching enzyme from the picoalgae *Ostreococcus tauri*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Vol. 618, 52-61.
- Barchiesi J, **Hedin N**, Iglesias AA, Gomez-Casati DF, Ballicora MA and Busi MV. 2017. Identification of a novel starch synthase III from the picoalgae *Ostreococcus tauri*. **Biochimie**, Vol 133, 37-44.
- Barchiesi J, **Hedin N**, Gomez-Casati DF and Busi MV. 2015. Starch-Binding Domains in *Ostreococcus tauri* Starch Synthase III isoforms. **BMC Research Notes**, Vol 8, 1.
- Gomez-Casati DF, Busi MV, Barchiesi J, Peralta D, **Hedin N** and Bhadauria V. 2017. Applications of Bioinformatics to Plant Biotechnology. In: Next-generation Sequencing and Bioinformatics for Plant Science. Vijai Bhadauria. In: **Next-Generation Sequencing and Bioinformatics for Plant Science**. Vijai Bhadauria. Caister Academic Press, U.K.
- Busi MV, Gomez-Casati DF, Martín M, Barchiesi J, Grisolia MJ, **Hedin N** and Carrillo JB. 2015. Starch metabolism in green plants. In: **Polysaccharides**. **Jean-Michel Merillon and Kishan G. Ramawat** Eds. Springer, Heidelberg, Germany. 978-3-319-03751-6.

### Publicaciones en Congresos

- Reunión anual SAIB, congreso, Córdoba – Argentina, 2016, Exposición oral: “Identification and characterization of a novel starch branching enzyme from *Ostreococcus tauri*” y poster: “Analysis of metabolic integrators from *Nannochloropsis gaditana*”
- Reunión anual ALAMY, Bratislava– Eslovaquia, 2016, Poster: “Functional demonstration of starch binding domains present in *Ostreococcus tauri* starch synthases isoforms”
- Reunión anual SAIB, congreso, Mar del Plata – Argentina, 2015, Poster: “Characterization of a novel carbohydrate binding domain of a putative amylase”
- Reunión anual SOLABBIA, congreso, Florianópolis – Brasil, 2015, Poster: “Characterization of novel *Ostreococcus tauri* starch binding domains”
- Reunión anual SAIB, congreso, Rosario – Argentina, 2014, Poster: “Multiple starch synthase III isoforms in the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri*”
- Reunión anual SAIB, congreso, Buenos Aires – Argentina, 2013, Poster: “Starch-binding domains conservation in starch synthase III isoforms”
- Reunión anual SBR, congreso, Zavalla – Argentina, 2013, Poster: “Role of the starch synthase III of *Arabidopsis thaliana* on starch degradation”

## I. Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis Vicky, por haberme ayudado a formarme profesionalmente y haberme guiado a través de este camino. También agradezco a mi co-directora Juli B. quien con su inagotable paciencia me guio en el trabajo del día a día. Igualmente agradecido me siento con Diego quien junto a Vicky y Juli B. formó parte del grupo que me enseñó a desarrollar un pensamiento crítico y también supieron confiar en mí.

A los chicos y chicas del Lab 3 y Anexo, con los que pasé gran parte de los últimos años de mi vida, y de quienes aprendí muchas cosas que me sirvieron no solo para mi desarrollo profesional, sino que para mi desarrollo personal también. Diego, Ale, Manu, Cele, Coca, Mauri, Laura, Juli C, Dalmacio, Natael, Colo y Belu.

A toda la gente del CEFOTI y la UNR que de una u otra manera marcaron mi paso por el instituto.

A Agus por aceptarme en mis errores y aciertos, por haber estado a mi lado estos años y pensar en un futuro juntos. También por haberme ayudado a no refugiarme en mis miedos.

A mis viejos y mi hermana por estar siempre a mi lado incondicionalmente, y por haber sido en gran parte el motivo por el cual haya llegado hasta acá.

A la gente que siempre está, esos otros hermanos que me regalan su amistad: Cabru, Naka, Marian, Seba, Chespi, Pablo D, Botti y Jime.

A toda la gente de Biología, gracias por confiar en mí y dejarme ser parte. Gracias también a aquellos A2A y JTP con los que compartí tanto momentos buenos: Cin, Fede, Alvaro, Papa, Nico, Euge y Sofi.

# ÍNDICE

I.	Agradecimientos .....	5
II.	Abreviaturas y anglicismos.....	11
	A. Abreviaturas .....	11
	B. Anglicismos.....	13
III.	Resumen.....	14
IV.	Introducción: .....	17
	A. ESTRUCTURA DEL ALMIDÓN .....	18
	B. SÍNTESIS DE ALMIDÓN.....	23
	C. COMPLEJOS BIOSINTÉTICOS.....	27
	D. DEGRADACIÓN DE ALMIDÓN .....	28
	E. Módulos de unión a carbohidratos .....	31
V.	Objetivos .....	36
	A. OBJETIVO GENERAL.....	36
	B. OBJETIVOS PARTICULARES .....	36
	1. Caracterizar la enzima ramificante del almidón OsttaSBE .....	36
	2. Caracterizar la enzima amilasa putativa OsttaAMILASA .....	36
VI.	Materiales y Métodos .....	39
	A. Material biológico .....	39
	1. Cultivares de <i>A. thaliana</i> .....	39
	2. Cepas de células utilizadas .....	39
	3. Cepas de algas utilizadas.....	39
	B. Medios de cultivo .....	40
	C. Soluciones Buffer .....	40
	D. Antibióticos y otros compuestos relacionados .....	40
	E. Oligonucleótidos utilizados .....	41
	1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	42
	2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....	42
	3. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa .....	42
	4. Obtención de ADN plasmídico a mini escala.....	43
	5. Reacciones de digestión empleando enzimas de corte .....	43
	6. Clonado de fragmentos de ADN.....	43
	7. Clonado en vector de expresión .....	44

8.	Mutagénesis sitio-dirigida .....	45
9.	Obtención de células competentes.....	45
10.	Transformación de células competentes .....	46
11.	Análisis de transformantes mediante PCR de colonia .....	47
12.	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> por “Floral Dip” .....	47
13.	Extracción y cuantificación de ADN genómico de planta.....	48
14.	Extracción de ARN total de plantas y algas .....	48
15.	Cuantificación de ARN total .....	49
16.	Obtención de ADN copia .....	49
17.	Cuantificación de ARN mensajeros mediante PCR cuantitativa (qPCR).....	49
18.	Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	51
19.	Autoinducción de proteínas recombinantes.....	51
20.	Cuantificación de proteínas.....	52
21.	Electroforesis y detección inmunológica .....	52
22.	Ensayo de <i>pull-down</i> . .....	52
23.	Análisis de espectrometría de masa .....	53
24.	Dicroísmo circular (CD).....	53
25.	Medidas espectrofluorométricas .....	53
26.	Cromatografía de exclusión molecular .....	54
27.	Ensayos de actividad ramificante .....	54
28.	Ensayos de actividad almidón sintasa total .....	54
29.	Ensayos de actividad amilasa .....	55
30.	Ensayos de actividad enzimática en extractos crudos .....	56
31.	Ensayo de unión a polisacáridos .....	56
32.	Ensayo de estabilidad térmica .....	57
33.	Determinación del contenido de almidón total en roseta .....	58
34.	Determinación enzimática del contenido de almidón .....	58
35.	Observaciones por microscopía .....	59
36.	Obtención de perfiles metabólicos .....	59
37.	Alineamientos de secuencia.....	60
38.	Modelado por homología.....	61
39.	Análisis de datos de secuenciación de RNA .....	61
VII.	CAPITULO 1 - Caracterización de OsttaSBE .....	64

A.	Introducción: .....	64
B.	Resultados .....	65
1.	Análisis evolutivo de OsttaSBE .....	65
2.	Análisis de estructura proteica <i>in silico</i> .....	67
3.	Clonado, expresión y purificación de OsttaSBE .....	72
4.	Ensayo de actividad ramificante .....	76
5.	Ensayos de unión a polisacáridos.....	81
C.	Discusión: .....	84
VIII.	CAPITULO 2 - Caracterización de plantas sobreexpresantes de OsttaSBE.....	87
A.	Introducción: .....	87
B.	Resultados .....	88
1.	Plantas sobreexpresantes de la enzima ramificante de <i>Ostreococcus tauri</i> .....	88
2.	Determinación del contenido de almidón en tejido fotosintético.....	90
3.	Respuesta transcripcional de los genes involucrados en la síntesis y degradación del almidón.....	95
4.	Estudio de las actividades enzimáticas sintasa y ramificante en plantas OEOsttaSBE ...	101
5.	Estudio de la interacción proteína-proteína de OsttaSBE y OsttaSSIII.....	102
6.	Perfil metabólico de las plantas OEOsttaSBE. ....	106
C.	Discusión: .....	107
IX.	CAPITULO 3 - Caracterización de OsttaAMILASA .....	114
A.	Introducción .....	114
B.	Resultados .....	115
1.	Análisis de estructura proteica <i>in silico</i> .....	115
2.	Clonado expresión y purificación de OsttaAMILASA.....	118
3.	Ensayo de actividad amilolítica para la enzima OsttaAMILASA .....	120
4.	Análisis de transcritos de RNA secuenciados.....	121
5.	Ensayo de <i>pull-down</i> con OsttaAMILASA y extracto crudo de <i>O. tauri</i> .....	124
6.	Estudio de interacción proteína-proteína mediante ensayo de desnaturalización.....	126
7.	Ensayos de unión a polisacáridos.....	127
8.	Análisis espectrofotométrico de unión a polisacáridos solubles .....	129
9.	Estudio del comportamiento de OsttaAMILASA como efector de la actividad amilasa.	132
C.	Discusión: .....	134
X.	Conclusiones.....	138

XI.	Bibliografía .....	140
-----	--------------------	-----

## II. Abreviaturas y anglicismos

### A. Abreviaturas

°C	Grados Celsius
AA	Aminoácido
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADPGlc	Adenosina difosfo-glucosa
AGPasa	Enzima ADP-glucosa pirofosforilasa
AMY	Alfa-amilasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
BAM	Beta-amilasa
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BE	Enzima ramificante
BSA	Albúmina sérica bovina
C <sub>3</sub>	Carbono tres
C <sub>6</sub>	Carbono seis
Ca <sup>2+</sup>	Catión Calcio
CAZymes	Enzimas activas sobre carbohidratos
CBM	Módulo de unión a carbohidratos
CETAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CMC	Carboximetilcelulosa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Da	Dalton
DBE	Enzima deramificante de almidón
DC	Dominio catalítico
DEPC	Di-etil-pirocarbonato
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DO	Densidad óptica
DP	Grado de polimerización
DPE	Enzima desproporcionante
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>g</i>	fuerza de gravedad
g	Gramo
GBSS	Almidón sintasa unidas a gránulo
GC/MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masa
GH	Glucósido Hidrolasa
Glc6P	Glucosa-6-fosfato
Glc1P	Glucosa-1-fosfato
GWD	Diquinasa de glucanos y agua
h	Horas
His	Histidina
IPTG	Isopropil b-D-tiogalactopiranosido
ISA	Isoamilasa

k	Kilo
<i>K<sub>ad</sub></i>	Constante de adsorción
l	Litro
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LDA	Dextrinasa límite
M	Molar
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz)
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MMLV	Retrotranscriptasa del Virus de la Leucemia Murina
MOS	Malto oligosacáridos
MS	Medio basal Murashige y Skoog con vitaminas de Gamborg
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	Azul de nitrotetrazolio
Ni <sup>2+</sup>	Catión Níquel
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución salina tamponada de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Banco de datos de proteínas (Protein data bank)
PEG	Polietilenglicol
PEP	Fosfoenolpiruvato
Pi	Ortofosfato inorgánico
Pir	Piruvato
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
PPI	Pirofosfato inorgánico
PTST	Proteína de direccionamiento a almidón
PVPP	Polivinil poli pirrolidona insoluble
PWD	Diquinasa de fosfoglucono y agua
qPCR	PCR cuantitativa
Redox	Reducción oxidación
RNA-Seq	Secuenciación de ARN
rpm	Revoluciones por minuto
SBD	Dominio de unión a almidón
SBE	Enzima ramificante del almidón
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
Seg	Segundos
SEX	Fenotipo de exceso de almidón
SSs	Almidón Sintasa soluble
SS	Almidón Sintasa
SSI	Almidón sintasa I
SSII	Almidón sintasa II
SSIII	Almidón sintasa III
SSIV	Almidón sintasa IV
T4	Bacteriófago T4
TBE	Tris borato EDTA
TBS	Buffer Tris salino

TEM	Microscopía electrónica de barrido
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TOF	Tiempo de vuelo
U	Unidades
UA	Unidad de absorbancia
UDP	Uridina difosfato
UDPGlc	Uridina difosfo-glucosa
V/V	Volumen / volumen

## B. Anglicismos

Background	Entorno
Binding	Unión
Buffer	Solución tampón
Channeling	Canalización
Cluster	Conjunto o Racimo
Coiled-coil	Hélice superenrollada
Floral-dip	Inmersión floral
GAP	Brecha
Knock-down	Disminución de la expresión génica
Knock-out	Inactivación génica
Melting	Fusión
Microarray	Microarreglo
ORF	Marco abierto de lectura
Protein data bank	Banco de datos de proteínas
Quencher	Extintor
Quenching	Extinción de la fluorescencia
Splicing	Empalme

### III. Resumen

El almidón es la principal forma de reserva de carbono en plantas superiores y constituye el polisacárido de mayor importancia en la dieta humana. Este polímero está formado por dos componentes mayoritarios: amilosa, que está compuesta predominantemente por cadenas lineales de glucosa con uniones  $\alpha$ -1,4; y amilopectina, un  $\alpha$ -1,4 glucano con ramificaciones en  $\alpha$ -1,6. A través de la formación de los gránulos insolubles semicristalinos de almidón, las células logran mantener al mínimo el efecto osmótico que causaría esta gran cantidad de residuos de glucosa por separado. El complejo ordenamiento a nivel molecular de estas estructuras involucra a una gran cantidad de enzimas asociadas a la síntesis del almidón. Entre ellas encontramos las almidón sintetasas (SS, EC 2.4.1.21) tanto solubles como unidas a gránulo, las enzimas ramificantes (BE, EC 2.4.1.18) involucradas en la generación de los enlaces  $\alpha$ -1,6, y las enzimas deramificantes (DBE, EC 3.2.1.68) responsable de la escisión de ramificaciones ubicadas en posiciones no compatibles con la estructura altamente ordenada del gránulo. Si bien los mecanismos exactos de inicio de síntesis del gránulo no fueron dilucidados hasta el momento, se ha visto que la gran mayoría de plantas sintetizan más de un gránulo excepto el organismo eucariota fotosintético más pequeño conocido hasta la fecha, *Ostreococcus tauri*. Este alga unicelular posee un único gránulo de almidón situado en el único cloroplasto presente en la célula que, al momento de la división celular, se particiona de tal manera que dota de un gránulo a cada uno de sus descendientes. En esta tesis intentamos ampliar los conocimientos sobre los mecanismos moleculares que gobiernan el metabolismo del almidón en *Ostreococcus tauri* basándonos fundamentalmente en los procesos de síntesis y haciendo principal énfasis en sus aspectos bioquímicos, evolutivos y regulatorios.

En una primera sección se presenta la completa caracterización de la enzima ramificante OsstaSBE. Los parámetros que caracterizan la cinética enzimática de OsstaSBE se encuentran dentro de lo esperado para ortólogos de plantas superiores. El modelo molecular propuesto a partir del modelado por homología no solo resulta de buena calidad de acuerdo a criterios aceptados por la comunidad científica, sino que también permitieron la exitosa identificación de los residuos más importantes para la catálisis. Posteriormente se logró corroborar esta información mediante la generación de proteínas recombinantes mutantes para cada uno de estos aminoácidos, las cuales, al no presentar actividad enzimática, demostraron la importancia de los mismos a nivel catalítico. Se detalla también el comportamiento de sus dos módulos de unión a carbohidratos presentes en la estructura de la proteína, frente a la presencia de distintos polisacáridos. Se determinó, mediante

la generación de proteínas truncadas, la necesidad absoluta de la presencia de uno de estos módulos, siendo a su vez el primer reporte de un módulo de esta familia en una enzima ramificante.

En una segunda sección se detalla la generación de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresando OsttaSBE. Estas líneas presentan una clara disminución en el tamaño de sus gránulos de almidón, demostrando la gran importancia de la enzima ramificante en su morfología. El aumento de los niveles de transcritos de OsttaSBE trae aparejado un concomitante aumento de aquellos transcritos que codifican para la almidón sintasa III endógena, en sintonía con la formación de complejos macromoleculares previamente reportados. Si bien nuestros ensayos de interacción no pudieron demostrar la interacción con la isoforma B de la almidón sintasa III de *Ostreococcus*, entendemos que en el alga esta asociación puede estar dándose tanto con la isoforma A como con la C, las cuales no hemos podido expresar en su forma entera hasta la fecha. Sumado al gránulo de menores proporciones se detectó un aumento generalizado de la degradación del almidón, consecuencia de un mecanismo de constante reestructuración de los gránulos que no llegan a desarrollar los tamaños observados en las líneas salvajes.

En la última sección se presenta la caracterización de un polipéptido (OsttaAMILASA) cuya estructura modular presenta un dominio de unión a carbohidratos de la familia 20 y un dominio de hélice superenrollada que suele estar ligado a la interacción proteína-proteína. Los CBM20 están asociados a proteínas de degradación como por ejemplo amilasas, glucoamilasas y la proteína Laforina presente en *Homo sapiens* cuya función es similar a las fosfoglucano fosfatasa de plantas. Si bien no se pudo contar con la información proveniente de ortólogos en otros organismos, ya que los alineamientos de la secuencia completa de OsttaAMILASA no arrojaron resultados satisfactorios, sí se pudo hacer un análisis de los perfiles de expresión en el ritmo circadiano. Esta proteína no presenta perfiles de expresión típicos de enzimas degradativas como pudimos ver gracias al análisis de datos de RNA-Seq que se obtuvieron de mediciones llevadas a cabo a lo largo de día. OsttaAMILASA presenta una elevada afinidad por el almidón a través de su CBM, y también forma complejos macromoleculares con la almidón sintasa III B de *Ostreococcus*. Estos datos sugieren un mecanismo de asociación de las almidón sintasas al gránulo durante la síntesis, llevado a cabo por OsttaAMILASA.

## **INTRODUCCIÓN**

## IV. Introducción:

Los hidratos de carbono son las biomoléculas más abundantes. Cada año la fotosíntesis convierte más de 100 billones de toneladas de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en celulosa, almidón y otros carbohidratos. Algunos compuestos, como la sacarosa y el almidón son los principales componentes en la dieta humana y la oxidación de los carbohidratos es la principal vía de obtención de energía en la mayoría de las células no fotosintéticas [10]).

La mayoría de los carbohidratos que se encuentran en la naturaleza, se presentan en forma de polímeros de alta masa molecular denominados polisacáridos o glucanos. Estos polisacáridos difieren entre sí por las unidades monosacáridicas que los componen, el largo de sus cadenas, el tipo de enlaces que los unen y también por el grado de ramificación. Cuando se componen de un solo tipo de residuos se los denomina homopolisacáridos, mientras que cuando las unidades que lo componen son de más de un tipo se los denomina heteropolisacáridos. Algunos de los homopolisacáridos, como el glucógeno y el almidón, sirven como reserva energética, mientras otros como la celulosa y la quitina funcionan como elementos estructurales en la pared celular de plantas y en los exoesqueletos de animales respectivamente [10].

El glucógeno representa el principal polisacárido de reserva energética presente en bacterias, hongos y animales. Al igual que el almidón, se compone de residuos de glucosa enlazados entre sí con uniones  $\alpha$ -1,4, y presentan ramificaciones en  $\alpha$ -1,6. La disposición de estos últimos enlaces, no parece seguir un patrón específico, sino que se dan de manera homogénea a lo largo de toda la molécula, ascendiendo el porcentaje de residuos de glucosa involucrados en este tipo de uniones a un 8 – 10% [11]. La estructura que se genera es una molécula esférica de tamaño reducido altamente soluble en agua [12]. Mientras que en eucariotas el glucógeno es sintetizado a partir de UDP-Glucosa (UDPGlc), en bacterias la síntesis se da a partir de ADP-Glucosa (ADPGlc) [13].

Por otra parte, dentro de los homopolisacáridos de reserva encontramos al almidón, que es la principal forma de almacenamiento, fuente de carbono y energía en organismos fotosintéticos como las algas y plantas. Este polisacárido tiene una enorme y compleja estructura conocida como gránulo de almidón que pueden presentar tamaños de 25  $\mu\text{m}$  o aún mayores, y se alojan dentro de los plastidios: cloroplastos en el caso de tejidos fotosintéticos y amiloplasto para los tejidos de reserva [14]. Es justamente la naturaleza de este gránulo lo que permite almacenar residuos de

glucosa en grandes cantidades sin afectar osmóticamente a la célula; por lo tanto, el almidón presenta la particularidad de ser altamente denso y osmóticamente inerte [15].

Teniendo en cuenta sus funciones biológicas, el almidón es normalmente dividido en dos grupos: por un lado, existe el almidón transitorio, que es el producido en los tejidos fotosintéticos mediante la fijación del dióxido de carbono. Este almidón es posteriormente degradado durante la noche para mantener las funciones metabólicas, producir energía y mantener la biosíntesis de diversos compuestos en ausencia de fotosíntesis. Es justamente cuando por diversos motivos, hay una disminución en el almidón transitorio que se da un retardo en el crecimiento en el organismo conjuntamente con el hambreado. Por otra parte, en los tejidos no fotosintéticos como las semillas, tallos, raíces y tubérculos el almidón es almacenado por lapsos mayores de tiempo hasta que es necesaria su degradación como por ejemplo durante la germinación de las semillas. Este tipo de almidón se denomina de reserva y suele ser encontrado en amiloplastos [7].

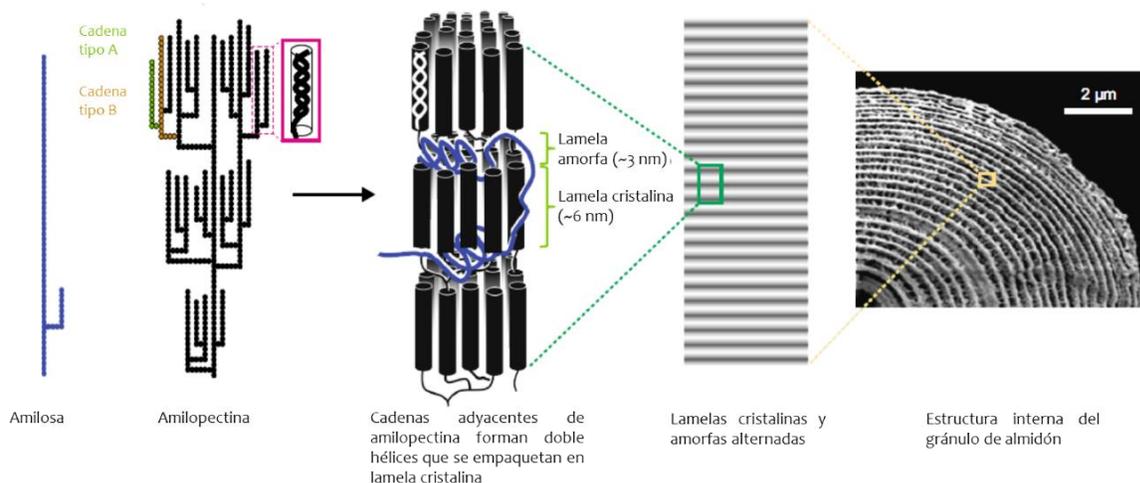
Este último presenta mayor valor para los humanos, siendo la principal fuente de carbohidratos en las dietas equilibradas proveyendo aproximadamente el 50% de las calorías que consumimos a diario [6] y funcionando también como materia prima renovable para usos industriales. Por ejemplo, el almidón es ampliamente utilizado como espesante y texturizante en la industria alimentaria, debido a que gelatiniza al ser calentado en agua. Las pastas derivadas de este polisacárido también tienen innumerables usos en las industrias no relacionadas con la alimentaria, como en la producción de papeles y cartones, o bioplásticos degradables y materiales para embalajes, o la creciente industria de la producción de bioetanol, entre otras aplicaciones [7]. Debido a la gran importancia que tiene para nuestra vida diaria, resulta sumamente importante poder conocer su estructura molecular, como se sintetizan los distintos tipos de almidones y de qué manera los organismos fotosintéticos definen la cantidad que deben acumular.

## A. ESTRUCTURA DEL ALMIDÓN

El almidón consiste en dos polímeros de glucosa, la amilosa y la amilopectina, que cuando se combinan dan lugar al gránulo insoluble semi cristalino. Ambos polímeros están formados por residuos de glucosa unidos mediante enlaces  $\alpha$ -1,4, presentando ramificaciones en  $\alpha$ -1,6. La estructura de estos polímeros es distinta entre sí, siendo los mecanismos de síntesis también

distintos. La amilopectina puede representar un 75 – 90 % del total del almidón en organismos salvajes y posee entre el 4 y el 5% de sus glucosas involucradas en ramificaciones. La amilopectina es la que funciona como estructura del gránulo de almidón y es a su vez la responsable de la naturaleza semi cristalina. Por otra parte, la amilosa si bien presenta ramificaciones, estas aparecen en menor proporción, siendo mínimas muchas veces. Estas moléculas se encuentran poco representadas en el gránulo, y se cree que su función sería la de generar un gránulo más denso al rellenar espacios de la estructura semi cristalina no ocupados por la amilopectina [16].

La frecuencia y patrones de ramificación de la amilopectina lejos de ser azarosos, siguen un patrón que le da su estructura característica (Figura 1). Como se observa en la figura, las cadenas de amilopectina pueden ser clasificadas en 2 tipos: A – cadenas externas que no presentan ramificaciones y B – aquellas cadenas que presentan una o más ramificaciones. El modelo aceptado para la estructura de la amilopectina sugiere una estructura en ramillete donde las cadenas de tipo B se encuentran solamente formando parte del *cluster*, no teniendo lugar de esta manera ramificaciones que no respeten esta estructura [17, 18]. De acuerdo a diversos estudios, estos *clusters* presentan una regularidad de 9 nm donde cadenas paralelas se asocian formando así doble



**Figura 1:** Estructura molecular del almidón de acuerdo al modelo de cluster. Estructura típica de la amilosa donde las esferas azules representan cada uno de los residuos de glucosa que la componen, y la estructura en ramillete de la amilopectina donde las esferas negras, verdes y naranjas representan también cada uno de los residuos de glucosa, indicando con color verde las cadenas del tipo A y con naranja las de tipo B. El recuadro rosa muestra la estructura típica de doble hélice formada en la amilopectina. Las regiones altamente ramificadas constituyen las láminas cristalinas mientras que las regiones entre clusters constituyen las láminas amorfas. A la derecha se muestra una micrografía electrónica de un gránulo tratado con amilasas. Cada “anillo de crecimiento” presenta un espesor de entre 200 – 400 nm. Tomado de [7] con modificaciones.

hélices. Estas doble hélices pueden presentarse formando dos tipos de estructuras distintas según el grado de empaquetamiento, siendo las menos densas aquellas que presentan mayor hidratación. Este grado de empaquetamiento representa uno de los factores responsables de la existencia de tan diversos tipos de gránulos de almidón en distintos organismos [19].

Mediante análisis microscópicos se pudo determinar que existe un nivel de organización más allá de los *cluster* de 9 nm. En la micrografía de la Figura 1 se pueden apreciar capas concéntricas dentro del gránulo denominadas “anillos de crecimiento” debido a su parecido con los anillos de crecimiento de los árboles con crecimiento secundario.

La biosíntesis de este conjunto de moléculas que dan lugar al almidón es única en el grupo de eucariotas perteneciente a Archaeplastida dentro del cual podemos encontrar a las algas rojas (Rhodophytas), el grupo minoritario de las Glaucophytas y las algas verdes junto a las plantas terrestres (Viridiplantae). Con la creciente disponibilidad de genomas secuenciados se pueden hacer cada vez mejores y más detallados análisis comparativos entre los organismos perteneciente a Archaeplastida, razón por la cual es aceptado que todos los miembros de este grupo provienen de un ancestro común que se originó de un evento de endosimbiosis involucrando la captura de una célula de cianobacteria por parte de una célula eucariota no fotosintética [20]. Es justamente ésta la razón por la cual Zeeman y colaboradores [21] propusieron que la síntesis de almidón evolucionó a partir de la síntesis de glucógeno, que es la molécula de reserva utilizada por la gran mayoría de las cianobacterias que se conocen hoy en día y aquellos eucariotas no pertenecientes a Archaeplastida.

Recientemente, en lo que a secuenciación de genomas se refiere, se han presentado cuatro nuevos genomas perteneciente a las algas verdes: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carterii*, *Ostreococcus tauri* y *Micromonas pusilla* [1, 22-24]. Si bien *Chlamydomonas* ha sido un modelo ampliamente utilizado para estudiar el metabolismo del almidón, resultan sumamente interesantes algunas características de *Ostreococcus*, lo cual lo convierte en un excelente objeto de estudio. *O. tauri* es una especie de picofitoplancton perteneciente a un grupo de algas verdes que se piensa que divergió muy tempranamente del ancestro de todas las algas verdes y plantas (Prasinophyceae) [1]. Se trata de la célula eucariota más pequeña que se ha descrito y además su genoma es el más reducido dentro de los eucariotas fotosintéticos dilucidados hasta el momento. Su genoma se encuentra representado en 12,56 mega pares de bases, siendo casi unas doce veces

más reducido que el de *Arabidopsis thaliana* (organismo fotosintético modelo ampliamente estudiado). Es llamativo que este genoma tan compacto se encuentre dividido en 20 cromosomas (*Arabidopsis* presenta 5), como así también sus 8162 genes que *a priori* no parecen corresponder a un genoma reducido, pero si tenemos en cuenta que la densidad de genes es de 1,3 kB/gen, que su distancia entre los distintos marcos abierto de lectura (ORF por sus siglas en inglés) se reduce a 197 bases y que el porcentaje de genes con intrones es del 39%, podemos entender el gran número de genes presentes en el genoma de *Ostreococcus* (Tabla 1).

Más allá de su relativamente simple genoma, con respecto al metabolismo de polisacáridos, *Ostreococcus* presenta una complejidad estructural comparable a la de plantas superiores. La biosíntesis de almidón a partir de ADP-Glucosa (ADPGlc) contiene la misma cantidad de pasos que se encuentran en plantas e incluso en *Chlamydomonas*, presentando en algunos casos varias isoformas de la misma enzima [8], e incluso presentando para algunas de ellas, mayor cantidad de isoformas que las que se encuentran en *Arabidopsis* como hemos reportado previamente para el caso de la almidón sintasa III (SSIII) [25]. Este hecho lejos de pasar inadvertido, parece tener su asidero en otra particularidad del alga que es la presencia de un único gránulo de almidón alojado en el único cloroplasto presente en la célula. La presencia de las tres SSIII junto a la ausencia de SSIV (en cuyos detalles ahondaremos más adelante en esta sección) parecen estar íntimamente relacionado a esta particularidad y podría también explicar los mecanismos moleculares mediante los cuales el gránulo de almidón se divide sincronizadamente con la división celular al final del período de luz (Figura 2).

Tabla 1. Características generales de los genomas de *Ostreococcus tauri* y *Arabidopsis thaliana* (Tomado de [1] con modificaciones)

Organismo	<i>O. tauri</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Tamaño (Mpb)	12,56	140,12
N° de Cromosomas	20	5
Contenido G+C (%)	58	36
Número de genes	8166	26207
Densidad de genes (kb/gen)	1,3	4,5
Tamaño promedio de gen (pb)	1254	2232
Distancia promedio inter-ORF (pb)	197	2213
Genes con intron (%)	39	79
Largo promedio de intrones (pb)	103	164
Secuencia codificante (%)	81,6	33
rRNA	4	800

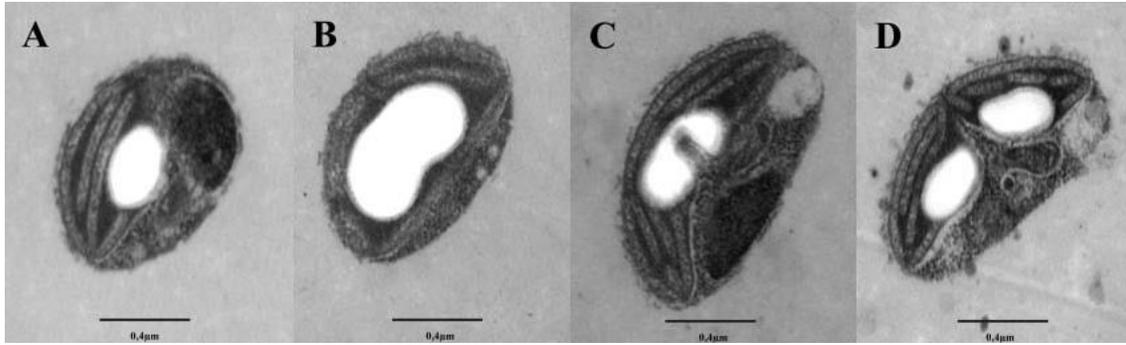


Figura 2: Micrografía electrónica de *Ostreococcus tauri* en división donde se observan sus gránulos de almidón. Las figuras de la A a la D se presentan en sentido cronológico de acuerdo a la división del gránulo en cultivos celulares que no presentan una completa sincronización celular y por lo tanto se encuentran en diferentes etapas de la división. Todas las micrografías provienen de microscopía electrónica de transmisión. Tomado de [2] con modificaciones.

En contraposición, los mecanismos que regulan estos procesos, presentan algunas diferencias con los de plantas superiores. Si bien hasta el momento son pocos los trabajos publicados en donde se estudia en detalle la bioquímica del metabolismo del almidón en *Ostreococcus*, existen resultados que informaron un menor grado de influencia de la regulación mediante estado redox de puntos clave de esta ruta [26], sugiriéndose un mayor impacto de la transcripción génica sobre el control de la síntesis y degradación del almidón [27].

Es justamente debido al papel que tiene la transcripción en la regulación génica, que se pueden obtener valiosos datos a partir de estudios como RNA-Seq o microarreglos de ARN. Sorokina y colaboradores [8] utilizando resultados de *Microarray* y diversas herramientas bioinformáticas de predicción, lograron detectar el comportamiento de aquellos genes involucrados en el metabolismo del almidón. Si bien mediante estos análisis se sentaron sólidas bases sobre las cuales estudiar a *Ostreococcus*, es cierto que la situación actual de esta alga dista mucho de semejarse a la de otros organismos fotosintéticos modelo como son por ejemplo *Arabidopsis* y *Chlamydomonas*, y mucha de la información que se tiene sobre *Ostreococcus* precisa ser validada mediante técnicas bioquímicas. Para describir lo que se conoce actualmente sobre los mecanismos moleculares del metabolismo del almidón, en los próximos párrafos se detallarán las rutas metabólicas generales, haciendo mención cuando así fuera posible de los datos de estudios bioquímicos con los que se cuenta sobre *Ostreococcus*.

## B. SÍNTESIS DE ALMIDÓN

La síntesis de almidón comienza con la producción de ADPGlc, que posteriormente será sustrato de las almidón sintetas. En cloroplastos fotosintéticamente activos, la síntesis de ADPGlc está directamente ligada al ciclo de Calvin-Benson a través de la conversión de fructosa-6-fosfato a glucosa-6-fosfato catalizado por la glucosa-6-fosfato isomerasa, para luego dar lugar a la glucosa-1-fosfato mediante la fosfoglucomutasa (Figura 3). *Ostreococcus* presenta una sola copia de localización plastídica del gen que codifica para esta última enzima, en tanto que para *Arabidopsis* la situación es diferente presentando tres copias (PGM1, 2 y 3) de las cuales solo PGM1 es de localización plastídica [28].

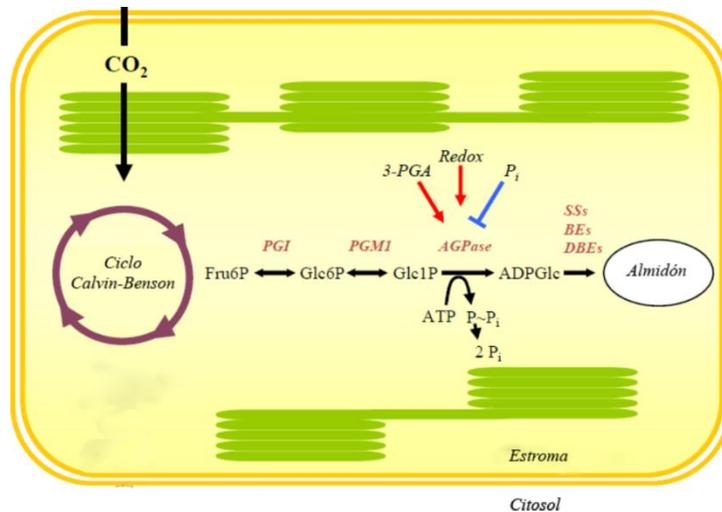


Figura 3: Parte del dióxido de carbono asimilado mediante el ciclo de Calvin-Benson es retenido en los cloroplastos para la biosíntesis de almidón. La regulación alostérica y redox (en plantas superiores, no en *Ostreococcus*) controlan el flujo de carbono hacia almidón. Tomado con modificaciones de [6]

El paso siguiente y también uno de los más regulados en plantas superiores, es la formación de ADP-Glucosa (ADPGlc). Este paso consiste en la conversión de Glc-1-P y ATP en ADPGlc y pirofosfato ( $PP_i$ ) mediante la acción de la enzima ADP Glucosa Pirofosforilasa (AGPasa), conformada en eucariotas por dos subunidades grandes y dos subunidades chicas [29]. Si bien la reacción se puede dar tanto en el sentido de la síntesis como de la degradación de ADPGlc, es la hidrólisis del pirofosfato ( $PP_i$ ) por parte de una pirofosfatasa alcalina de localización plastídica la que torna este paso irreversible en el sentido de la síntesis [30]. En plantas superiores la función de las subunidades grandes en este heterotetrámero son las de regular la actividad enzimática, en tanto que las subunidades pequeñas son las catalíticas. Se observó que AGPasa es activada

alostéricamente por 3 fosfoglicerato (3PG), y es inhibida por ortofosfato ( $P_i$ ) [31]. Este heterotetrámero es también sensible a regulación redox mediante la reducción de un puente disulfuro entre cisteínas de las subunidades pequeñas [32]. Si bien para el caso de las algas verde en general se observó que tanto el 3PG y  $P_i$  son reguladores alostéricos, en *Ostreococcus*, como así también en *Chlamydomonas*, la regulación redox no parece jugar un papel tan determinante como en plantas superiores, sugiriendo así que la regulación redox habría aparecido tarde en la evolución del grupo Archeplastida. Por otro lado, el heterotetrámero de *Ostreococcus* funcionaría de manera distinta a la de otras plantas superiores, ya que la subunidad pequeña no posee capacidad de catalizar la reacción, siendo la subunidad grande responsable de convertir Glc-1-P más ATP en ADPGlc y [26]. Mientras que *Arabidopsis* presenta dos subunidades pequeñas y cuatro grandes, *Ostreococcus* tiene solo una grande y dos pequeñas que no presentan las cisteínas involucradas en la formación de puentes disulfuro [33].

Las enzimas que utilizan ADPGlc como sustrato son las almidón sintasas (SS por sus siglas en inglés) las cuales transfieren el residuo glucosídico desde la ADPGlc hacia el extremo no reductor del polisacárido en crecimiento, formando así un nuevo enlace  $\alpha$ -1,4. Las SS se pueden dividir en dos grandes grupos de acuerdo al producto que generan, por un lado encontramos las almidón sintasa unidas a gránulos (GBSS por sus siglas en inglés), mientras que por el otro lado están las almidón sintasa solubles (SSS).

La GBSS es la responsable de la síntesis de la amilosa y se la suele encontrar unida al gránulo debido que llevaría a cabo su acción enzimática dentro del mismo [33]. Estudios llevados a cabo en maíz permitieron dilucidar que efectivamente la síntesis de amilosa es la función de la GBSS, ya que las líneas mutantes *waxy* deficientes en GBSS se caracterizan por presentar amilopectina y no amilosa [34]. Ambas, plantas superiores y *Ostreococcus* presentan una sola copia que codifica para esta sintasa unida a gránulo.

Por otra parte, las almidón sintasa solubles están involucradas en la síntesis de amilopectina y presentan un mayor grado de complejidad en su estructura, pudiendo presentar hasta tres dominios que le permiten unirse a polisacáridos denominados módulos de unión a carbohidratos (CBM por sus siglas en inglés), e incluso presentan motivos *coiled-coil* postulados como responsables de la interacción de las SSS con otras proteínas [35-37]. En *Arabidopsis* se describieron 4 familias distintas de almidón sintasas solubles: SSI, SSII, SSIII y SSIV. Trabajando con

líneas mutantes para cada una de estas sintasas, se pudo determinar cuál es la función de ellas y si existe redundancia en sus funciones. Así, se propuso que la SSI elongaría aquellas cadenas que presentan solo 6 residuos de glucosa (DP6 por “grado de polimerización” en inglés) llevándolas a contener entre 8 y 10 residuos (DP8-10). Tanto en plantas superiores como en *Ostreococcus* hay una sola copia de este gen. Posteriormente, también presentando una sola copia del gen para ambos organismos, actuaría la SSII donde su deficiencia genera un acumulación de cadenas de DP8 y se observa una disminución de las cadenas de 18 residuos (DP18), indicando estos resultados que SSII tomaría cadenas DP6-8 elongándola de esta manera hasta DP18.

Para el caso de la SSIII el análisis es más complejo, ya que son muy variados los reportes relacionados a esta isoforma. Por un lado, se propone que SSIII elongaría las cadenas producto de SSII dándole su longitud final. También se propone que sería la encargada de elongar las cadenas que enlazan los *clusters* contiguos [7]. Se reportaron además líneas mutantes *ssIII* en las cuales se observó un aumento generalizado de la actividad SSS total y en el contenido de almidón sugiriendo que la SSIII, al menos en *Arabidopsis*, tendría funciones regulatorias del resto de las SSS [38] [39]. Por otra parte, se observó que ante la ausencia de SSIV, *Arabidopsis* dependería de la SSIII para poder iniciar la síntesis de nuevos gránulos [39] [40]. Para el caso de esta sintasa es sumamente interesante notar que mientras en *Arabidopsis* existe solo un gen que la codifica, en *Ostreococcus* existen tres isoformas distintas llamadas A, B y C, cada una con una disposición diferente de módulos de unión a carbohidratos. El hecho que existan tres copias de este gen podría tener relación con el mecanismo de partición del gránulo de almidón [25] [2]. Cabe destacar que de las enzimas del metabolismo del almidón de *O. tauri*, las SSIII son las más caracterizadas bioquímicamente [25] [41].

Finalmente, la SSIV estaría asociada a la formación de los gránulos de almidón y la cantidad de almidón durante los períodos de luz y oscuridad. Mutantes de *Arabidopsis* nulas para *ssIV* mostraron una alteración en el contenido de almidón, siendo menor al final del día en comparación con las plantas salvajes, pero presentando un mayor nivel al final de la noche manteniendo siempre la estructura característica de la amilopectina. Estas plantas muestran también una marcada alteración en la cantidad y forma de los gránulos: en vez de presentar seis gránulos discoidales, se observan entre cero y tres gránulos de forma alargada [42]. Llamativamente, las plantas que solo presentan la SSIV como SS soluble sintetizan la misma cantidad de gránulos que las plantas salvajes, pero la cantidad de almidón total es mucho menor que la de las plantas salvajes, y además presenta una estructura aberrante [39]. A diferencia de plantas

superiores y otras algas como *Chlamydomonas*, *Ostreococcus* no presenta ningún gen que codifique para la SSIV. Es probable que esta ausencia se deba al hecho que, al tener un único gránulo, no es necesaria la presencia de la SSIV o justamente esta ausencia haya llevado a la configuración de un único gránulo [33].

Una vez sintetizadas las cadenas glucosídicas, es necesario introducir las ramificaciones en la amilopectina, para así poder formar la estructura típica en ramillete (Figura 1 y Figura 4). Esta tarea la realizan las enzimas ramificantes del almidón (SBE por sus siglas en inglés, BE en el caso de las enzimas ramificante en general) que pertenecen a la familia de las glucosido hidrolasa 13 (GH13) de acuerdo a la clasificación de CAZy [43]. Estas enzimas clivan los enlaces  $\alpha$ -1,4 de la cadena glucosídica, para generar un nuevo enlace  $\alpha$ -1,6 en la misma u otra cadena. De esta manera las SBE no solo generan nuevas ramificaciones, sino que generan sustratos adicionales para las SS. Las SBE suelen tener un dominio amino terminal (N-terminal) conteniendo uno o más CBM, y su dominio catalítico (DC) [44]. De acuerdo a su secuencia se las suele dividir en SBEI (o familia B) y SBEII (o familia A). Se cree que es la capacidad de generar ramificaciones en lugares puntuales lo que determina la correcta formación del ramillete o *cluster* [7]. Las SBEI suelen transferir cadenas de mayor longitud que aquellas transferidas por las SBEII, y también, son las más afines por la amilosa. Las mutantes en SBE llevan siendo estudiadas por mucho tiempo, constituyéndose en uno de los casos más emblemáticos el análisis de los guisantes “arrugados” (mutantes en SBEII) que utilizó Gregor Mendel [45]. *Arabidopsis* particularmente presenta solo SBE de la familia II (SBE2 y SBE3)

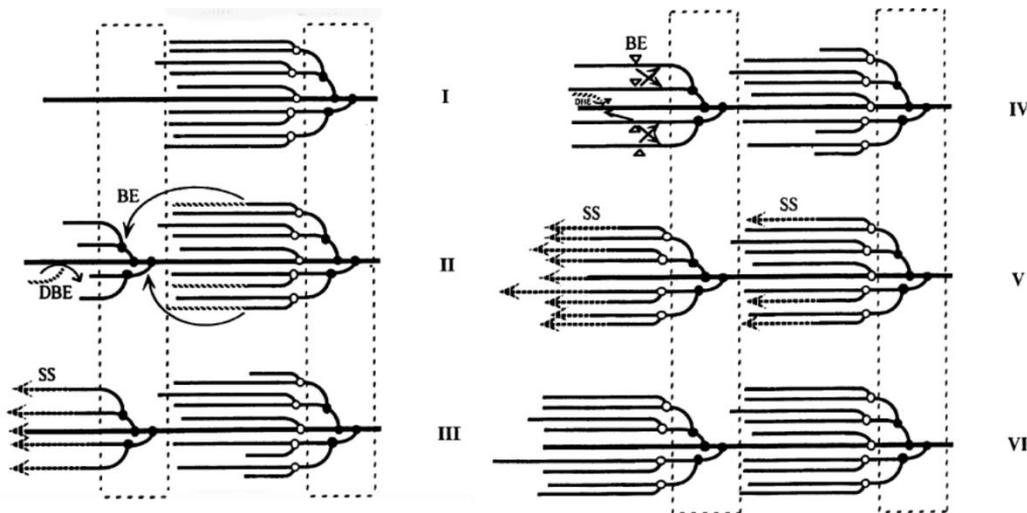


Figura 4: Modelo para la síntesis de amilopectina en ramilletes. BE enzima ramificante, DBE enzima deramificante, SS almidón sintasa. En números romanos se indica el orden en el que se darían las reacciones. Tomado de [4] con modificaciones.

aunque también se puede detectar una isoforma de la pseudofamilia III de la cual no se sabe con exactitud su función [33]. Para *Ostreococcus* la situación es distinta, encontrándose un gen de la familia I mientras que se reportaron dos de la familia II. Recientemente, y debido a este trabajo de Tesis, se hizo la caracterización bioquímica de uno de los productos génicos de la familia II [44].

Finalmente, en lo que a la síntesis respecta, las enzimas desramificantes liberan cadenas lineales de polisacárido, escindiendo los enlaces  $\alpha$ -1,6. Estas enzimas denominadas DBE por sus siglas en inglés, pertenecen a la familia de las GH13 al igual que las SBE mencionadas en el párrafo anterior y pueden también ser subdivididas en dos grandes grupos de acuerdo a su especificidad de sustrato y secuencia proteica: Isoamilasas (ISA) y dextrinasa límite (LDA o pululanasa por su afinidad por el polisacárido pululano) [21]. Tanto *Arabidopsis* como *Ostreococcus* codifican para tres ISA: ISA1, ISA2 e ISA3, y para una LDA. Tanto ISA1 como ISA2 están involucradas en el proceso de desramificación durante la síntesis de amilopectina. Por otra parte ISA3 y LDA funcionan durante la degradación y por lo tanto serán abordadas en los próximos párrafos. Mutantes de ISA1 y 2 presentan polisacáridos solubles en agua (fitoglucógeno) en detrimento del almidón [46]. La explicación más aceptada es el “modelo del recorte” por el cual se propone que las DBE de síntesis removerían los excesos de ramificaciones en la pre-amilopectina para de esta manera generar la amilopectina con las ramificaciones perfectamente ordenadas y compatibles con la formación del ramillete (Figura 4) [13].

### C. COMPLEJOS BIOSINTÉTICOS

Existen numerosos reportes sobre la formación de complejos entre enzimas involucradas en la biosíntesis de almidón, e incluso, sobre la importancia de la fosforilación proteica en la formación de los mismos. Tetlow y colaboradores [47] observaron la formación de complejos proteicos dependiente de fosforilación entre las enzimas ramificantes de la familia I y II. Posteriormente mediante cromatografía de exclusión molecular se pudieron observar en maíz complejos macromoleculares formados por SSII, SSIII, SBEII y posiblemente SSI [36] [35]. Se pudo detectar también un complejo análogo pero que carece de la SSIII. Situación similar fue observada nuevamente en trigo, con la formación de complejos compuestos por SSI, SSII y BEII [12]. Interesantemente, en *Arabidopsis* se describió la interacción entre la GBSS y una proteína compuesta por un dominio *coiled-coil* y un CBM que se denominó proteína de direccionamiento a

almidón (PTST por sus siglas en inglés). PTST demostró facilitar la unión de GBSS al gránulo de almidón [48].

En líneas generales, la formación del complejo generaría un aumento en la afinidad por el almidón ya que cuando se asocian, las proteínas muestran mayor adherencia a los gránulos que estando aisladas [7]. No se sabe todavía si esta función es necesaria para lograr la actividad óptima de cada una de las enzimas, o si la razón sería poder canalizar el sustrato desde una enzima a la otra aumentando así la eficiencia general del proceso de síntesis de amilopectina. Por otra parte, se sugiere que el complejo podría conferir especificidad enzimática, ya que por ejemplo, mediante impedimento estérico se podría limitar la acción de las SBE logrando así que solo se formen las ramificaciones que van a dar lugar a la estructura en ramillete. Por último, se propone que el complejo podría funcionar como un regulador alostérico de las enzimas que lo componen, o que el complejo en sí podría actuar como protector frente al ataque de las enzimas degradativas, como se explicará en los próximos párrafos [49].

#### D. DEGRADACIÓN DE ALMIDÓN

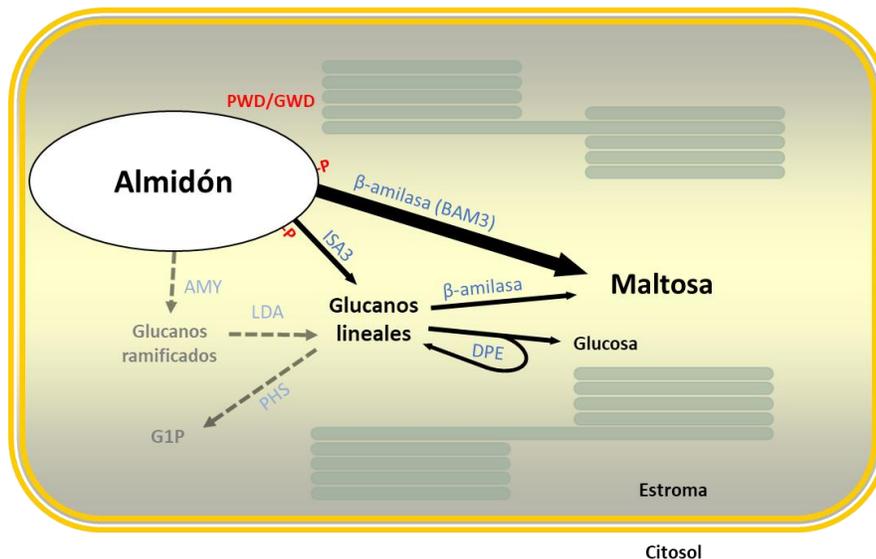
El almidón transitorio es degradado durante los períodos de oscuridad para mantener así sus funciones metabólicas. Los productos mayoritarios de la degradación son la maltosa (disacárido compuesto por dos glucosas unidas en  $\alpha$ -1,4) y la glucosa, que pueden ser exportadas desde los cloroplastos al citosol para su uso posterior. También se puede generar Glc1P directamente desde el almidón como se detallará más adelante [21].

Existe amplia evidencia sobre la necesidad de que el almidón sea fosforilado para poder llevar a cabo su posterior degradación como se ha observado en papa, *Arabidopsis* y otros organismos [6]. La enzima diquinasa de glucanos y agua (GWD por sus siglas en inglés) fosforila los residuos glucosídicos en el carbono 6 (C<sub>6</sub>); a continuación, otra quinasa llamada diquinasa de fosfoglucono y agua (PWD por sus siglas en inglés) reconoce este producto fosforilado y agrega otro grupo fosfato en el C<sub>3</sub>, siendo la relación de fosfatos C<sub>3</sub>:C<sub>6</sub> aproximadamente 1:5 [50]. Las mutantes *gwd* y *pwd* presentaron un fenotipo de exceso de almidón (SEX por sus siglas en inglés). En *Arabidopsis* se ha reportado un gen que codifica para PWD y dos para GWD, siendo uno de ellos de localización citosólica por lo que se cree que su participación en la degradación del almidón sería

nula [6]. Por otro lado, *Ostreococcus* presenta tres copias de GWD y dos copias de PWD. Como se sabe de estudios previos sobre  $\beta$ -amilasas [51], el almidón fosforilado no es un buen sustrato, por lo tanto previo a la escisión de los enlaces glucosídicos, debe existir otro paso que es la defosforilación del almidón. Se ha demostrado que existen un grupo de fosfatasa de fosfoglucanos denominadas SEX4 (siglas en inglés para Fenotipo de Exceso de Almidón 4) y LSF2 (por sus siglas en inglés para Tipo SEX4-2) que son capaces de remover los fosfatos presentes en el almidón. Mas específicamente, SEX4 tiene la capacidad de remover fosfatos unidos a los C<sub>3</sub> y C<sub>6</sub> [52], mientras que LSF2 presenta preferencia por C<sub>3</sub> [53]. Existe también otro miembro de esta familia de fosfatasa que es LSF1, la cual se propone que tendría un rol regulatorio ya que no se ha evidenciado actividad fosfatasa para ella [54]. Mientras que *Arabidopsis* presenta dos genes codificantes para estas fosfatasa (SEX4 y LSF2), *Ostreococcus* no presenta ortólogos de SEX4 pero sí dos de LSF2, lo cual plantea el interrogante sobre cómo sería la defosforilación del C<sub>6</sub> [55].

Una vez lograda la solubilización de las cadenas de la superficie del gránulo, las enzimas hidrolíticas degradan los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 (Figura 5). En primera instancia actúan las exoglucosidasas  $\beta$ -amilasas que liberan maltosa desde los extremos reductores. En plantas mutantes para este tipo de amilasas se reportó el fenotipo *sex*, donde hay una acumulación de almidón debido a la falta de degradación [56]. En *Arabidopsis* se conocen nueve genes que codifican para  $\beta$ -amilasas, de las cuales cuatro (BAM1-4) son de localización plastídica [6]. Tanto BAM1 como BAM3 son enzimas con elevada actividad específica *in vitro* [57], mientras que BAM2 presenta una muy baja actividad específica y BAM4 no presenta actividad alguna debido a sustituciones de aminoácidos en su sitio activo. Llamativamente la ausencia de BAM2 no conduce a ningún fenotipo observable, al menos hasta el momento, mientras que las mutantes *bam4* presentan un fenotipo *sex* característico de las mutantes *bam1* y *bam3*. Si bien no existe evidencia que demuestre fehacientemente la razón de estas observaciones, se sugiere que BAM4 tendría funciones regulatorias de la velocidad de degradación de almidón mediante el registro de los niveles de maltosa [57]. Si bien existen algunos reportes sobre las isoformas 5, 6, 7, 8 y 9, no existen conclusiones certeras sobre sus posibles funciones teniendo en cuenta que son de localización citosólica [6]. Por su parte *Ostreococcus* presenta solo dos genes que codifican para  $\beta$ -amilasas, de las cuales no existen trabajos al respecto [33].

Cuando las amilasas se encuentran con un residuo de glucosa que está formando parte de una ramificación no pueden continuar degradando, por lo tanto, es en este punto donde actúan las enzimas desramificantes involucradas en la degradación. Como se mencionó previamente en esta introducción, en *Arabidopsis* tanto ISA1 como ISA2 funcionan durante la síntesis del polisacárido, mientras que ISA3 y LDA lo hacen durante la degradación [46] [58]. Tanto ISA como LDA muestran una gran afinidad por los productos de la degradación de las  $\beta$ -amilasas, esto es, polisacáridos con cadenas cortas [6]. Nuevamente las mutantes *isa3* presentan un fenotipo *sex* indicando la incapacidad de la célula para degradar el almidón ante la ausencia de esta enzima desramificante. Si bien mutantes *lda* no generan fenotipo *sex*, las dobles mutantes *isa3lda* presentan un fenotipo mucho más severo que *lda* [58]. *Ostreococcus* presenta un ortólogo de ISA3 y uno de LDA que no fueron estudiados hasta el momento.



*Figura 5:* El almidón es degradado a maltosa y glucosa durante la noche. La fosforilación mediante PWD y GWD permitirían la acción directa de BAM3 e ISA3. Los glucanos lineales pueden ser metabolizados por DPE liberando glucosa. AMY podría atacar el gránulo liberando cadenas ramificadas de glucanos que luego podrán ser desramificadas por LDA. Sumada a la acción de BAM, PHS podría liberar glucosa-1 fosfato. Las reacciones de AMY, LDA y PHS no generan fenotipo *sex* al estar ausente (gris claro). El grosor de las flechas refleja los flujos estimados de cada metabolito. La glucosa y maltosa son posteriormente transportados al citosol (no mostrado). Tomado con modificaciones de [9].

Contrariamente a lo que sucede con BAM, las  $\alpha$ -amilasas son endoenzimas que tienen la capacidad de degradar enlaces  $\alpha$ -1,4 en regiones internas del polisacárido liberando así una gran variedad de polisacáridos lineales y ramificados. Tanto *Ostreococcus* como *Arabidopsis* presentan tres genes que codifican estas enzimas, habiéndose encontrado solo para el caso de AMY3 de

plantas superiores un péptido tránsito de localización en cloroplasto [59] [33]. Mutantes *isa3lda* presentan un aumento en los productos típicos de AMY3, y también se detectó un aumento no solo de la actividad AMY sino que también de la proteína AMY3 [58], sugiriendo que AMY3 podría actuar bajo ciertas condiciones específicas.

Por último, existen dos grupos de enzimas que son las menos estudiadas dentro de la degradación del almidón que son las glucano fosforilasas (PHS o PHO) y las enzimas desproporcionantes (DPE). Por un lado, PHS cataliza la adición reversible de un residuo de glucosa a un extremo reductor de un aceptor glucosídico a partir de Glc1P liberando  $P_i$ . Si bien se propone que esta enzima actuaría en el sentido de la degradación, algunos resultados tejidos específicos parecen contradecir esta hipótesis [6]. Por estas razones es que no existe un consenso claro sobre la función de PHS. *Ostreococcus*, al igual que otras algas como *Micromonas pusilla*, presenta tres genes que codifican esta enzima en tanto que *Arabidopsis* solo posee dos, de las cuales una es de localización citoplasmática [33].

El último grupo de enzimas tratado en esta introducción son las DPE cuya función es metabolizar los malto oligosacáridos (MOS) cortos transfiriendo parte de una cadena lineal a otra cadena o incluso a glucosa; así ante la presencia de malto oligosacáridos cortos, esta enzima genera glucosa y un amplio espectro de MOS siendo los de mayor longitud sustrato de las amilasas que continúan con el proceso de degradación. De esta manera las DPE junto a las  $\beta$ -amilasas y las fosforilasas podrían resultar en la producción tanto de maltosa como glucosa y Glc1P [6]. La maltosa no actúa como un dador ni aceptor eficiente para la DPE lo que la deja con un solo destino que es su transporte al citoplasma. Mutantes *dpe1* generan un fenotipo de exceso de almidón que podría deberse a un bloqueo de la degradación por parte de la acumulación de maltotriosa, dejando así en claro que DPE es necesaria para la correcta degradación del gránulo de almidón [60]. Tanto *Arabidopsis* como *Ostreococcus* presentan una copia del gen que codifica para DPE1.

## E. Módulos de unión a carbohidratos

Numerosas proteínas involucradas en la degradación de almidón poseen módulos de unión a almidón (SBD, por *Starch Binding Domain*) diferentes del dominio catalítico y asociados a él [61]. Una de las funciones de estos dominios es unir a la enzima a la superficie insoluble del gránulo

de almidón. Se ha sugerido también que los SBD modifican la superficie del gránulo [62], lo que probablemente permitiría la unión de otras proteínas que no poseen estos dominios, pero que también están involucradas en la degradación del almidón. Estos dominios se consideran como una ventaja evolutiva dado que rompen los sustratos estructurados (como el gránulo de almidón) más eficientemente debido a la presencia de dos sitios de unión a polisacáridos [62, 63]. Los SBD fueron clasificados en trece familias: CBM20, CBM21, CBM25, CBM26, CBM34, CBM41, CBM45, CBM48, CBM53, CBM58, CBM68, CBM69 y CBM74 (CAZy - Carbohydrate Active enZyme, <http://www.cazy.org/CAZy>, [43])

Específicamente, los SBD son dominios estructurales distintivos pertenecientes a la familia de módulos de unión a carbohidratos (CBM) que presentan una amplia diversidad de ligandos a los cuales pueden adherirse [64]. De esta manera, se define a los CBM como una secuencia contigua de aminoácidos con plegamiento discreto, que posee la capacidad de unirse a carbohidratos [65]. Si bien estos dominios suelen encontrarse dentro de enzimas activas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, existen ciertas excepciones donde los CBM no se encuentran asociados a ningún dominio catalítico. Un ejemplo de este tipo de proteínas es la recientemente descrita Proteína de Direccionamiento a Almidón (PTST, por sus siglas en inglés) para la cual Seung y colaboradores demostraron que se trata de una secuencia con un CBM unido a un dominio *coiled-coil* que probablemente le sirva para interactuar con otras proteínas como GBSS. Mutantes de *Arabidopsis* en PTST no presentan GBSS unida a gránulo, por lo tanto se sugiere que la función sería justamente permitir el anclaje a su sustrato o medio donde va a catalizar su reacción enzimática [48].

Una gran variedad de CBM, ya sea caracterizados o putativos, fueron clasificados en familias en base a su identidad de secuencia de aminoácidos [66]. A la fecha, se han identificado 120.675 secuencias, de las cuales 120.193 fueron clasificadas en 83 familias basados en su secuencia aminoacídica, su especificidad de unión a sustrato y su estructura (a febrero de 2018) [43].

Los CBM contienen desde 30 a 200 aminoácidos y pueden existir de forma única, doble o triple en una proteína. Su ubicación puede ser tanto N- como C-terminal y ocasionalmente pueden encontrarse centralmente en la cadena polipeptídica. CBM de distintas familias son estructuralmente similares y su capacidad para unir carbohidratos puede ser atribuida, al menos en parte, a varios residuos aromáticos que conforman una superficie hidrofóbica. Algunas proteínas,

como por ejemplo la almidón sintasa III de *Arabidopsis* [67] [37], la SSIIIb de *Ostreococcus* [25] o la enzima ramificante del mismo alga [44] poseen una compleja estructura molecular comprendiendo varios módulos discretos unidos por secuencias poco estructuradas. Como se menciona en el párrafo anterior, estos módulos han sido encontrados en proteínas con capacidad catalítica como en otras donde no se ha detectado la misma. En el primer caso, conducirían la catálisis en una prolongada asociación física de la enzima con los sustratos, incrementando la velocidad de reacción. Cuando están presentes en proteínas que no poseen actividad hidrolítica, se constituyen en una subunidad organizadora de los dominios catalíticos generando complejos multienzimáticos cohesivos que pierden actividad enzimática cuando los CBM son removidos de la estructura [65].

A principios del 2011 Sorokina y colaboradores [8] publicaron ensayos de expresión génica regulada por el ritmo día/noche de las siguientes enzimas del metabolismo del almidón de *O tauri*:

<b>N° E.C.</b>	<b>Nombre de la enzima (<i>Locus tag</i>)</b>
<b>5.3.1.9</b>	Glucosa-6-fosfato isomerasa (Ot11g02980)
<b>5.4.2.2</b>	Fosfoglucomutasa (Ot15g02630)
<b>2.7.7.27</b>	ADP-glucosa Pirofosforilasa (Ot07g03280, Ot07g02930, Ot20g00490)
<b>2.4.1.21</b>	Almidón sintasas solubles (Ot06g03410, Ot13g01250, Ot16g02790, Ot13g01230, Ot16g01560)
<b>2.4.1.242</b>	Almidón sintasa unida a gránulo (GBSSI) (Ot06g03200)
<b>2.4.1.18</b>	Enzima ramificante (Ot01g03030, Ot03g00840, Ot04g04110)
<b>2.4.1.1</b>	Almidón fosforilasa (Ot11g00280, Ot04g02110)
<b>2.4.1.25</b>	Enzima desproporcionante (Ot02g05750, Ot11g02300)
<b>2.7.9.4</b>	$\alpha$ -glucano agua diquinasa (GWD) (Ot13g01510, Ot16g02370, Ot04g04170, Ot08g01260)
<b>3.2.1.1</b>	$\alpha$ -amilasa (Ot16g00380, Ot02g05490, Ot10g00260, Ot07g02010)
<b>3.2.1.2</b>	$\beta$ -amilasa (Ot02g06980, Ot03g03190, Ot03g03170)
<b>3.2.1.68</b>	Isoamilasa (Ot14g02550, Ot12g00310)

E.C. = Número de la comisión enzimática

De estas enzimas, no existían trabajos publicados sobre la caracterización estructural, bioquímica o regulatoria de la mayoría de ellas al momento del inicio de esta tesis, siendo nuestro grupo de trabajo uno de los primeros en lograr esta tarea ([26] [25] [41] [44] [55])

Actualmente, los CBM más estudiados corresponden a hongos y bacterias y se conoce muy poco de aquellos provenientes de enzimas de organismos fotosintéticos. Varias de las enzimas que al inicio la tesis se habían predicho mediante análisis bioinformáticos como implicadas en la degradación de almidón en *O. tauri* [8], presentan en su estructura primaria algún CBM según la base de datos del CAZY: la isoamilasa (Ot14g02550) presenta un CBM de la familia 48, mientras que la pululanasa (Ot01g03030) presentan un CBM de la familia 48 en tándem con uno de la familia 41; y la  $\alpha$ -amilasa (Ot06g02060) posee un CBM de la familia 20.

Este trabajo de tesis aporta nuevos conocimientos al metabolismo del almidón en el organismo modelo *O. tauri*. Se logró caracterizar la función del gen Ot01g03030 (OsttaSBE), dilucidando que codifica para una proteína involucrada en la formación de enlaces  $\alpha$ -1,6 en las moléculas de amilopectina. También se propuso un mecanismo de catálisis, basado en estudios estructurales de la proteína. Se estudió el efecto de esta SBE sobre el metabolismo de plantas superiores mediante la generación de plantas transgénicas. Por otro lado, también se profundizó en el conocimiento del producto proteico codificado por el gen Ot06g02060 (OsttaAMILASA), llegando a la conclusión de que serviría de andamiaje para diversas enzimas del metabolismo de almidón.

## **OBJETIVOS**

## V. Objetivos

### A. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del trabajo de tesis es la caracterización de algunas de las enzimas involucradas en el metabolismo de almidón que presentan módulos de unión a carbohidratos

### B. OBJETIVOS PARTICULARES

#### 1. Caracterizar la enzima ramificante del almidón OsttaSBE

- Realizar el análisis evolutivo de OsttaSBE
- Realizar análisis de estructura proteica *in silico* de OsttaSBE
- Realizar análisis de estructura proteica *in silico* de los CBM de OsttaSBE
- Clonar OsttaSBE, generar mutantes y versiones truncadas
- Expresar y purificar las diferentes isoformas y construcciones de OsttaSBE
- Ensayar actividad ramificante en las diferentes proteínas
- Estudiar la capacidad de unión a polisacáridos
- Generar plantas sobreexpresantes de la enzima ramificante de *Ostreococcus tauri*.

#### 2. Caracterizar la enzima amilasa putativa OsttaAMILASA

- Realizar el análisis de la estructura proteica *in silico* de OsttaAMILASA y de su CBM
- Clonar OsttaAMILASA y su CBM. Expresar y purificar OsttaAMILASA y su CBM
- Ensayar actividad amilolítica para OsttaAMILASA
- Estudiar la posible interacción entre OsttaAMILASA y otras proteínas del metabolismo de almidón
- Estudiar el efecto del agregado de OsttaAMILASA a otra enzima de origen comercial

- Estudiar la capacidad de unión a polisacáridos insolubles
- Estudiar la capacidad de unión a polisacáridos solubles mediante espectrofotometría

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## VI. Materiales y Métodos

### A. Material biológico

#### 1. Cultivares de *A. thaliana*

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* variedad Columbia (*Col0*) de tipo salvaje, además generamos plantas transgénicas de *A. thaliana* sobreexpresantes de OsttaSBE con el antibiótico kanamicina como marcador de selección. Las semillas se esterilizaron con una solución de lavandina comercial al 5% (V/V) y Tween 20 al 0,05% (V/V) durante 15 min. Luego se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y se sembraron en tierra o en medio MS suplementado con el antibiótico adecuado. Finalmente se mantuvieron en oscuridad a 4°C por 48 h y se transfirieron a invernadero a 25°C con humedad variable (40- 70%). Las condiciones de iluminación se lograron mediante la combinación de lámparas fluorescentes blancas frías (Cool White, Philips) y de tipo GroLux (Sylvania, Vinhedo, SP, Brasil) con una intensidad de 100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  utilizando un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad (día largo).

Las plantas transgénicas se seleccionaron durante 15 días en placas de Petri con medio MS agar utilizando el antibiótico adecuado. Luego de este período las plantas resistentes al antibiótico se trasplantaron a macetas con tierra y perlita.

#### 2. Cepas de células utilizadas

1) ***E. coli* XL1-Blue:** *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' proAB lacI  $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)].

2) ***E. coli* BL21 (DE3):** F', *ompT, hsdSB (rB-, m B-), dmc, gal*, (DE3).

3) ***E. coli* DB3.1:** F-*gyrA462endA1 gln V44 (sr1-reA) mcrB mrr hsdS20 (rB-, mB-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (sm<sup>r</sup>) xyl5 leu mtl1*.

4) ***A. tumefaciens*:** cepa GV3101, plásmido Ti: pTiC58, chromo C58, kan<sup>R</sup>, opinas: Nopalina.

#### 3. Cepas de algas utilizadas

*Ostreococcus tauri* RCC 745 adquirida de la colección de cultivos de Roscoff (<http://www.roscoff-culture-collection.org/rcc-strain-details/745>)

B. Medios de cultivo

**Medio LB (Luria Bertani):** Tripteína 10 g; Extracto de levadura 5 g; NaCl 10 g; Agua c.s.p. 1 litro. pH 7,0.

**Medio LB agar:** medio LB con el agregado de 15 g/l de agar.

**Murashige y Skoog medio basal con vitaminas Gamborg (MS, Sigma M 0404)**

**Medio de selección para semillas de *A. thaliana* transformadas:** Se prepararon cajas de Petri de forma estéril con medio MS, 0,8% P/V de agar y el antibiótico Kanamicina a una concentración de 50 µg/ml

C. Soluciones Buffer

**10 X TBE Buffer:** Tris-base 108 g; ácido bórico 55 g; 0,5 M EDTA; agua csp 1 litro. pH 8,0.

**TE Buffer:** Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; agua csp 800 ml; ajustar pH 8 con HCl; Agua csp 1 litro.

**10 X PBS:** NaCl 80 g; KCl 2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 26,8 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,4 g; agua c.s.p. 800 ml; HCl hasta pH 7,4; agua c.s.p. 1 litro.

**Buffer de Infiltración (transformación de *A. thaliana*):** Sacarosa 5%, detergente Silwet L-77R (HELENA CHEMICAL COMPANY) 0,03%.

**10 X MOPS:** 83,7 g MOPS; 13,6 g Acetato de sodio trihidrato; 3,7 g EDTA disodio dihidrato.

D. Antibióticos y otros compuestos relacionados

Compuesto	Concentración en cultivo
Ampicilina	50 µg / ml
Cloranfenicol	50 µg / ml
Kanamicina	25 µg / ml
Gentamicina	25 µg / ml
Rifampicina	100 µg / ml
Spectinomomicina	100 µg / ml
Isopropil β-D-tiogalactopiranosido (IPTG)	0,6 mM
5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactopiranosido (XGal)	50 mg / ml

Tabla 2: Compuestos utilizados

E. Oligonucleótidos utilizados

<b>Nombre del oligonucleótido</b>	<b>Secuencia del oligonucleótido</b>	<b>Gen</b>
OsttaSBEup	AAGGCGGCCGCGCTGGAAATGTC	Ot01g03030
OsttaSBEdown	ATTACAATGGGTCATATGAGCTATCGACAC	Ot01g03030
OsttaSBECBM41up	AGAGGATCCGATCCTTCGAGTGCGTTAC	Ot01g03030
OsttaSBECBM41down	TCTAAGCTTCTACCCGCTCACCAACCACAC	Ot01g03030
OsttaSBECBM48up	GAGGGATCCTCCTCTGGGCGCGGAATTTG	Ot01g03030
OsttaSBECBM48down	CTCAAGCTTCTACGCGTACGGATCGCTCGAG	Ot01g03030
OsttaSBEDCup	ATAGCGGCCGCGAGTGGACTGCGCGATCTAC	Ot01g03030
OsttaSBEDCdown	CTCCATATGCTAATTGTGCGTCTCTCCAC	Ot01g03030
OsttaSBEpCHF3up	ACCCGGGAAATGTCCGGTCACCCACACGTC	Ot01g03030
OsttaSBEpCHF3down	CAACTGCAGCTATCGACTGCACGAATACGGC	Ot01g03030
OsttaSBEglu684up	GCGTAGTCCCAGCCC GCGCCGTATAGATAAA	Ot01g03030
OsttaSBEglu684down	TTTATCTATACGGCGCGGGCTGGGACTACGC	Ot01g03030
OsttaSBEAsp647up	CATCAGGTGTCCATTAAAGCGAATCGAAACCCA TCAAC	Ot01g03030
OsttaSBEAsp647down	GTTGATGGGTTTCGATTGCTTTAATGGGACACCT GATG	Ot01g03030
ATAct2up	AATCTCCGGCGACTTGACAG	Actina
ATAct2down	AAACCCTCGTAGATTGGCACAG	Actina
OsttaAMILASaup	ATAGAATTCAAAGATGCGGGTGCGAGCG	Ot06g02060
OsttaAMILASAdown	TTTCTCGAGTGTGTCATTTAGCGCGTCTT	Ot06g02060
OsttaAMILASACBM20up	GCTGAATTCGTGCAAGTTCAGATGAAGC	Ot06g02060
OsttaAMILASACBM20down	TGTCTCGAGTTACCACGCGTCGTAGATCCAC	Ot06g02060

Tabla 3: Cebadores utilizados en esta tesis

## Detalles de técnicas

### 1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El protocolo general de amplificación constó en un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 minutos, un número determinado de ciclos (puesto a punto para cada uno de los fragmentos a amplificar): fase de desnaturalización 30 segundos a 94°C; fase de hibridación a la temperatura óptima para cada juego de cebadores determinado por gradiente de temperatura; fase de elongación 1 minuto por cada 1.000 pb a amplificar, a 72°C, más una extensión final de 7 minutos. De esta forma el número de ciclos se estableció en función del objetivo buscado en cada experimento.

### 2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para la visualización de los productos de las reacciones de PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1,0 - 1,5% (dependiendo del tamaño del fragmento) en Buffer TBE 1X, con el agregado de bromuro de etidio (5 mg/ml). La identificación de los productos se llevó a cabo por comparación con marcadores de masa molecular adecuados (100 pb, 400pb; Lambda Ladder PB-L Productos Bio-Logicos R).

### 3. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Para esta técnica se utilizó el kit GFX (GFX PCR and Gel Band Purification Kit, Amersham). Luego de la electroforesis en gel de agarosa, se cortaron las bandas conteniendo los fragmentos de ADN a purificar y se transfirieron a un microtubo. Se agregaron 500 µl de solución de captura y se incubó a 50°C por 10 minutos hasta la completa disolución de la agarosa. Luego, se transfirió la solución con el ADN a la columna de purificación y se mezcló por pipeteo (de cuatro a seis veces). La columna fue centrifugada en una microcentrífuga a 12.000 x *g* durante 30 segundos, y luego de descartar el fluido que traspasó al tubo colector fue reubicada en otro tubo. Se agregaron 500 µl de solución de lavado y se repitió el paso de centrifugación a máxima velocidad por 30 seg. El tubo colector fue descartado y la columna fue ubicada en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se agregaron 50 µl de buffer de elución directamente sobre la matriz de la columna GFX. Se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifugó a 12.000 x *g* durante 1 minuto para recuperar en el eluido, el ADN purificado.

#### 4. Obtención de ADN plasmídico a mini escala

Diferentes cultivos de 5 ml de bacterias en medio LB y el antibiótico correspondiente fueron crecidos a partir de colonias individuales durante toda la noche a 37°C. Posteriormente se centrifugaron los cultivos 1 minuto a máxima velocidad. Después de retirar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado con el agregado de 200 µl de solución P1 (50 mM Glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8,0 y 10 mM EDTA pH 8,0) y agitación con vórtex. Se adicionaron 300 µl de solución P2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) y se mezcló por inversión, hasta clarificar. Posteriormente los tubos fueron incubados 5 minutos en hielo, mezclando a los 2,5 minutos. Se agregaron 300 µl de 3M KAc pH 4,8 y se mezcló rápidamente por inversión hasta que los grumos se repartieron homogéneamente en todo el tubo. Seguidamente, los tubos fueron dejados en hielo durante 5 minutos, mezclando a los 2,5 minutos y centrifugados a máxima velocidad durante 15 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, al que se le agregó 5 µl de ARNasa 10 mg/ml, y se incubó 30 minutos a 37°C. Finalmente se adicionaron 400 µl de cloroformo, se agitó por inversión y se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos. Luego, 730 µl de la fase superior fueron transferidos a otro tubo, sin tomar la interfase. El ADN fue precipitado agregando 700 µl de isopropanol. Se mezcló por inversión e incubó en hielo durante 25 minutos. Después de centrifugar 25 minutos a máxima velocidad y de descartar el sobrenadante, se lavó el precipitado de ADN con 500 µl de etanol 70% V/V (centrifugación 5 minutos a máxima velocidad). El sobrenadante fue descartado y el precipitado se secó por 5 minutos a temperatura ambiente. El ADN fue resuspendido en 30 µl de agua Mili Q.

#### 5. Reacciones de digestión empleando enzimas de corte

Las digestiones de ADN se llevaron a cabo a 37 °C durante 1 a 3 h, utilizando enzimas comerciales (Promega) y siguiendo las indicaciones recomendadas por los proveedores de las enzimas de restricción. El resultado de las digestiones se verificó mediante electroforesis de los productos en geles de agarosa 0,8% (p/v).

#### 6. Clonado de fragmentos de ADN

Las secuencias de ADN de interés se amplificaron a partir de ADNc mediante ensayos de PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 3) diseñados a partir de las secuencias disponibles en las bases de datos JGI genome portal (<http://genome.jgi.doe.gov/Ostta4/Ostta4.home.html>). El fragmento amplificado fue aislado y purificado según se describió en los puntos anteriores.

Ligación a pRSF-Duet: El protocolo de la ligación fue el siguiente:

<b>Fragmento PCR purificado 50ng (5 <math>\mu</math>l aproximadamente)</b>	
pRSF-Duet	1 $\mu$ l
Buffer de ligación rápida 2X	7 $\mu$ l
T4 ADN Ligasa (Promega)	1 $\mu$ l
Volumen final	14 $\mu$ l

Tabla 4: Protocolo de ligación con extremos cohesivos

Esta preparación fue incubada por 2 h a temperatura ambiente

Ligación a pGEM-T-Easy

Las reacciones de unión de los fragmentos aislados de ADN al vector pGEM-T-Easy, se llevaron a cabo utilizando una relación molar inserto:vector igual a 3:1. Se utilizó 1 U de T4 ADN ligasa (Promega), el buffer de reacción provisto por el fabricante de la enzima y agua destilada c.s.p 10  $\mu$ l. La reacción se incubó a 16°C durante 18 h.

Posteriormente, con las ligaciones obtenidas se transformaron bacterias competentes XL1Blue y se seleccionaron en medio de LB agar con los antibióticos adecuados. Las colonias resistentes se analizaron por medio de PCR utilizando como molde 1  $\mu$ l de una colonia resuspendida en 10  $\mu$ l de agua destilada estéril. Aquellos clones que resultaron positivos, se inocularon en medio LB líquido suplementado con los antibióticos adecuados para obtener ADN plasmídico. Los plásmidos se analizaron por ensayos de PCR y restricción con las enzimas correspondientes. Las construcciones obtenidas se secuenciaron para analizar la fidelidad de las secuencias.

## 7. Clonado en vector de expresión

Los vectores de expresión permiten la síntesis de grandes cantidades de proteínas codificadas en un gen de interés. Los mismos constan de un promotor T7lac fuerte e inducible, señales de iniciación de la traducción, sitios de múltiple clonado (MCS) y secuencias que permiten la regulación de la replicación y el número de copias en las células hospedadoras. Estos plásmidos se utilizan en células hospedadoras que contiene el gen que codifica para la T7 ARN polimerasa bajo el control de un promotor inducible por IPTG o lactosa (lacUV5). Estas cepas se distinguen por la presencia de la demarcación DE3 en su nombre.

Esta tecnología, permite obtener cantidades suficientes de proteína para su posterior caracterización fisicoquímica, y bioquímica y el tag de hexa-histidina codificada en estos vectores permite la purificación de la proteína de fusión por cromatografía de afinidad mediante el uso de una matriz cargada con iones  $Ni^{2+}$ . Así, la proteína recombinante puede ser purificada casi a homogeneidad del extracto bacteriano en un único paso.

En estos casos, la reacción de PCR se lleva a cabo utilizando la enzima Taq polimerasa Q5 (Q5 High-Fidelity DNA Polymerase; New England Biolabs), enzima con mayor procesividad que la Taq Polimerasa (GoTaq, Promega). El producto de PCR fue chequeado por electroforesis en geles de agarosa 0,8% (p/v) y el tamaño del fragmento amplificado fue comparado con el marcador de tamaño molecular Ladder 100 PB (PB-L Productos Biológicos); Todos los fragmentos amplificados presentaron la longitud esperada. Posteriormente, los fragmentos amplificados fueron purificados utilizando la técnica detallada en esta sección, para el siguiente paso de clonado.

#### 8. Mutagénesis sitio-dirigida

Los codones codificantes para los residuos de residuos glutamato 684 y aspartato 647 en OsttaSBE se cambiaron a tripletes que codifican para alanina utilizando el kit QuickChange II XL mutagénesis dirigida (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.). Para el cambio de aminoácido en OsttaSBE, el vector pRSF-Duet con la construcción OsttaSBE se utilizó como molde para la amplificación por PCR. Los cebadores utilizados fueron: OsttaSBEglu684up, GCGTAGTCCCAGCCC GCGCCGTATAGATAAA y OsttaSBEglu684down, TTTATCTATACGGCGCGGGCTGGGACTACGC para realizar el reemplazo del aminoácido glutamato; y OsttaSBEasp647up, CATCAGGTGTCCATTAAAGCGAATCGAAACCCATCAAC y OsttaSBEasp647down, GTTGATGGGTTTCGATTGCTTTAATGGGACACCTGATG para realizar el reemplazo del aspártico. Los vectores resultantes se verificaron mediante secuenciación de ADN y se utilizaron para transformar la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para luego realizar la expresión de las proteínas recombinantes con cambio de aminoácido.

#### 9. Obtención de células competentes

Células de *E. coli* de la cepa de interés se obtuvieron a partir de una colonia aislada en medio LB agar suplementado con el antibiótico adecuado y se inocularon en 3 ml de medio LB líquido. Se crecieron a 37°C con agitación durante 16 hs y 1 ml de este cultivo saturado se utilizó

para inocular 100 ml de medio LB fresco que se creció a 37°C con agitación hasta llegar a la densidad óptica de 600 nm ( $OD_{600}$ ) = 0,3 – 0,4. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 4°C y  $3.000 \times g$  durante 10 min y el precipitado resultante se resuspendió en 50 ml de la solución TfbI [AcOK 30 mM; KCl 100mM;  $CaCl_2$  10mM;  $MnCl_2$  50mM; Glicerol 15% (V/V); pH 5,8 ajustado con HAc 0,2M; filtrado) durante 20 min en hielo. Luego de este periodo se volvió a centrifugar a 4°C y  $2.100 \times g$  durante 10 min. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 1 ml de solución TfbII [MOPS 10mM;  $CaCl_2$  75mM; KCl 10mM; Glicerol 15% (V/V); pH 6,5 ajustado con AcONa filtrado] y se recogieron alícuotas de 110  $\mu$ l que fueron guardadas a -80°C ó -40°C hasta su uso.

Células de *A. tumefaciens* GV3101 aisladas a partir de una colonia se inocularon en 5 ml de medio LB con los antibióticos adecuados (rifampicina 100  $\mu$ g/ml, gentamicina 25  $\mu$ g/ml) y se crecieron a 28°C con agitación durante 24 h. Posteriormente se utilizó 2 ml de este cultivo líquido saturado para inocular 200 ml de medio LB, suplementado con los antibióticos antes indicados, y se creció durante 6 h a 28°C con agitación. Las células se centrifugaron a  $4.200 \times g$  durante 20 min a 4°C y el precipitado (pellet de células) se resuspendió en buffer TE frío. Finalmente, las células se centrifugaron, se resuspendieron en LB, se alicuotaron de a 500  $\mu$ l y se guardaron a -80°C o -40°C hasta su posterior uso.

#### 10. Transformación de células competentes

Las células de *E. coli* competentes (110  $\mu$ l) se transformaron por choque térmico con los plásmidos correspondientes utilizando protocolos de rutina [68]. Brevemente, las células competentes fueron incubadas en presencia del plásmido correspondiente durante 30 min en hielo, posteriormente se colocaron a 45°C durante 45 s y se llevaron nuevamente al hielo durante 15 min. Luego de este período se agregó 1ml de LB líquido y se incubaron a 37°C con agitación durante 45 min. Finalmente, las bacterias se centrifugaron (5 min a  $5.500 \times g$ ), se resuspendieron en 100  $\mu$ l de LB y se sembraron en placas de medio LB agar conteniendo los antibióticos adecuados para la selección de las colonias transformadas. Las placas se incubaron 16 hs a 37°C. La transformación de *A. tumefaciens* se realizó con una alícuota de 500  $\mu$ l de células competentes que se incubaron con 1  $\mu$ g de ADN plasmídico de modo sucesivo: 5 min en hielo, 5 min en N<sub>2</sub> (líquido) y 5 min a 37°C. La suspensión se diluyó a 1 ml con medio LB y se incubó con agitación a 28°C durante 2 h. Posteriormente las células se centrifugaron a  $2.000 \times g$  y se resuspendieron en un volumen de 200

µl que se sembraron en medio LB agar suplementados con los antibióticos adecuados. Las bacterias se incubaron a 28°C durante 48 h.

#### 11. Análisis de transformantes mediante PCR de colonia

El análisis de las colonias crecidas luego de la transformación se realizó mediante PCR de colonias. En este caso, se colocó directamente una colonia dentro de cada tubo de reacción junto al resto de los componentes del medio; el programa de temperaturas utilizado y el análisis de los productos fueron similares a los ya descritos.

Aquellas colonias en las que se pudo observar un producto de PCR del tamaño esperado, se utilizaron para inocular entre 3 y 10 ml de medio LB conteniendo el antibiótico adecuado. Luego de la incubación a 37°C durante 16 h, se extrajo el ADN plasmídico. Posteriormente, se analizó este ADN digiriéndolo con endonucleasas de restricción (según se detalla en esta sección) que produjeran un patrón distintivo de fragmentos de ADN al correr el producto del corte en un gel de agarosa 0,8% (P/V).

#### 12. Transformación de *Arabidopsis thaliana* por “Floral Dip”

Se crecieron plantas de *A. thaliana* variedad Columbia (Col0) hasta floración (aproximadamente 4 semanas). El momento adecuado para la transformación de las plantas por inmersión de los botones florales [69] es cuando las yemas están emergiendo (aprox. 2 cm. - 8 cm. de la roseta) y todavía no se encuentran flores abiertas. Las plantas se regaron abundantemente los dos últimos días. Previamente a la transformación de las plantas, se inoculo 30 ml de medio LB conteniendo, Rifampicina (100 µg/ml), Gentamicina (25 µg/ml) y Spectinomicina (100 µg/ml) con *Agrobacterium tumefaciens* portadores de la construcción de interés: *pCHF3* + *OsttaSBE* a continuación del promotor constitutivo 35S CaMV. Estos inóculos fueron crecidos con agitación a 28°C por 24 h, los cuales fueron utilizados como pre inóculo en 600ml de medio LB suplementado con antibióticos, que fueron crecidos con agitación a 28°C por 24 h. Los cultivos saturados se centrifugaron a 4.200 x *g* por 15 minutos. El precipitado bacteriano se resuspendió en un litro de medio de infiltración, el cual contiene 50 g. sacarosa, 0,5 g. de buffer MES y 300 µl de Silwet L-77R (Helena Chemical Company). Se llenaron vasos de precipitado con la solución de *Agrobacterium tumefaciens* resuspendida en medio de infiltración. Las plantas fueron invertidas sobre la solución de infiltración bacteriana de modo de que quedaran sumergidas totalmente en el líquido, incluida

la roseta. El tiempo de inmersión fue de 20 a 30 segundos y posteriormente al retirarlas, fueron puestas de costado en una bandeja, para que el exceso de líquido no penetre en la tierra. Luego se cubrió la bandeja que contenía las macetas con papel film y siguieron su crecimiento en el cuarto de plantas por 1-2 días. Cuando las flores se abrieron y las yemas comenzaron a crecer, las macetas se colocaron en posición vertical. Se dejaron crecer las plantas hasta la apertura de las silicuas con una irrigación decreciente. De esta manera se obtuvieron las semillas de la generación parental de plantas transformadas (OsttaSBE) que se recolectaron en un papel, se tamizaron los restos de los frutos y se guardaron las semillas en tubos de microcentrífuga destapados hasta que se encontraron libres de humedad para evitar la contaminación de las semillas. Posteriormente los tubos conteniendo solo semillas secas fueron tapados y mantenidos en heladera a 4°C hasta su utilización.

### 13. Extracción y cuantificación de ADN genómico de planta

El ADN genómico (ADNg) se extrajo a partir de 100 mg de hojas de *A. thaliana* que se trituró en presencia de N<sub>2</sub> en microtubos o 50 ml de cultivo de algas de DO: 0,5 – 0,6 que se mantuvieron en frío. Posteriormente se agregó 300 µl de buffer bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB), se trituró (en el caso de plantas) hasta lograr la completa homogeneización del tejido y se incubó a 60°C durante 30 min. Posteriormente se centrifugó a 13.000 x *g* durante 5 min, se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo y se agregó 300 µl de cloroformo. Después de agitar, se centrifugó nuevamente a 13.000 x *g* por 5 min. La fase acuosa (superior) fue transferida a otro tubo al que se le agregó un volumen igual de isopropanol y se precipitó el ADN por 20 min a temperatura ambiente. El precipitado obtenido luego de centrifugar a 7.000 x *g* por 10 min se lavó en etanol 70% (V/V) y se secó a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 20 µl de agua destilada y se conservó a -20°C. La cantidad de ADN total se determinó espectrofotométricamente a 260 nm (1 unidad de absorbancia equivale a 50 µg/ml de ADN). La pureza de las muestras obtenidas se determinó mediante la relación de absorbancia 260 nm/280 nm.

### 14. Extracción de ARN total de plantas y algas

El ARN total de diferentes tejidos de plantas y de algas fue extraído usando el reactivo Trizol (Invitrogen), compuesto por una mezcla de fenol y tiocianato de guanidina. Cada muestra se homogeneizó con nitrógeno líquido, según la relación 50-100 mg de tejido: 1 ml de Trizol para plantas y el pellet de 50 ml de cultivo de algas (DO: 0,4): 1ml de Trizol. Se agregó 200 µl de cloroformo y se agitó vigorosamente de forma manual durante 15 seg. La mezcla se dejó reposar

durante 3 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó 15 min a  $12.000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego de esta etapa se observa una separación en la mezcla de dos fases, una inferior orgánica de color rojo y otra superior, acuosa e incolora, que contiene al ARN. Se transfirió la fase superior a otro tubo y se agregó 200  $\mu\text{l}$  de alcohol isopropílico. Luego de agitar, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se centrifugó a  $12.000 \times g$  durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se descartó el sobrenadante (el ARN precipita en el fondo del tubo). Se lavó exhaustivamente el precipitado con etanol 70% (V/V) y se agitó durante 2 min. Finalmente se centrifugó a  $7.000 \times g$  durante 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se descartó el sobrenadante. El ARN se resuspendió en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato, para la inactivación de ARNasas).

#### 15. Cuantificación de ARN total

La cantidad de ARN total se determinó espectrofotométricamente a 260 nm (1 unidad de absorbancia equivale a 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ARN). La pureza de las muestras obtenidas se determinó mediante la relación de absorbancia 260 nm/280 nm.

#### 16. Obtención de ADN copia

El ADNc se obtuvo por transcripción reversa a partir de 5  $\mu\text{g}$  de ARN. La mezcla de reacción estaba compuesta por: 200 U de la enzima transcriptasa reversa M-MLV RT (Promega); 15  $\mu\text{g}$  de hexámeros Random pd(N) (Amersham Biosciences); 500  $\mu\text{M}$  de dNTPs; 1X buffer 5X M-MLV (Promega); 25 U Inhibidor de ARNasas (Promega);  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC c.s.p. 50  $\mu\text{l}$ . La reacción se incubó a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 1h.

#### 17. Cuantificación de ARN mensajeros mediante PCR cuantitativa (qPCR)

Los ensayos de qRT-PCR fueron llevados a cabo en un equipo Step One PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando el fluoróforo SYBRGreenI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), y GoTaq polimerasa (Promega, Madison, WI, USA). Los cebadores para realizar estos ensayos fueron diseñados utilizando el software en línea PrimerBlast [70]. Los ciclos de amplificación fueron definidos de la siguiente manera: Desnaturalización 2 min a  $94^{\circ}\text{C}$ ; 40 ciclos a  $94^{\circ}\text{C}$  por 10 s,  $63^{\circ}\text{C}$  por 15 s, y  $72^{\circ}\text{C}$  por 20 s, seguido de 10 min de extensión a  $72^{\circ}\text{C}$ . Tres réplicas técnicas fueron llevadas a cabo por cada réplica biológica. Las curvas de desnaturalización ("melting") fueron determinadas utilizando una disminución de la fluorescencia a partir de un incremento de temperatura (de  $65$  a  $98^{\circ}\text{C}$ ). Los productos de PCR fueron analizados mediante

electroforesis en gel de agarosa al 2%, para confirmar el tamaño y especificidad de la reacción. Los niveles de transcritos relativos fueron calculados como la relación de la abundancia del transcritpo en relación al transcritpo del gen control  $\beta$ -ACT (At3g18780). Los nombres completos de los genes se encuentran en la siguiente tabla.

<i>Nombre</i>	<i>Acc. N°</i>	<i>Cebador 5'</i>	<i>Cebador 3'</i>
<i>ACT2</i>	AT3G18780	TGCTGGAATCCACGAGACAACCTA	TGCTGAGGGAAGCAAGAATGGAAC
<i>UBC21</i>	AT5G25760	GACTCCTTACGAAGGCGGTGTTTT	GCTCAGGATGAGCCATCAATGCTA
<i>CBP</i>	AT5G44200	CCGGCCTATTCGTGTGGATTTTGA	CATAATTCGTTGGCGCAGCTTGAG
<i>OsttaSBE</i>	OT01G03030	TGTGGTTGGTGAGCGGGTACT	CTCGTGCTGCGGCCGATAAA
<i>GBSS</i>	AT1G32900	TCAGATGGTTATCCTTGGGACTGGA	GGCTCAAACCTGCTTGGGACA
<i>SSI</i>	AT5G24300	CGAGATTCGAGCCCTGTGGTTT	GGGAGTGAAGACCCACCCTGTA
<i>SSII</i>	AT3G01180	TAACATTGCTCATCAGGGGCGG	AACAGTGAGAACTCTATCCGCAGC
<i>SSIII</i>	AT1G11720	GGTCTAGTGCTCCGGTTTCATGG	AGTTGGTGAAACCGTTGTGGCT
<i>SSIV</i>	AT4G18240	AGTTCGAACAGCTGAGGGAGGA	GCGTTGAACTGAGCCTTGAGGA
<i>ApS</i>	AT5G48300	TCAGAGAGCCAAGGAGATGCCT	GGTAAGCTTGCACCCTCAGTCC
<i>ApL</i>	AT5G19220	TCTTGAGATGGCGTTTCCCCAC	AGTGAGTGCAAGATTTCGCCTCG
<i>SBEII</i>	AT5G03650	TGGTAGCGTGATTCTGGCAAC	GGTGCTCCGAAGTCATAAAACCGT
<i>SBEIII</i>	AT2G36390	TTCACCTCTGATGGAAGGCACG	GGTAACAGGCCTATGGGGACAAG
<i>DBE</i>	AT1G03310	TTGTGGGGAAGAAGGAGCAACG	CGTGATTCCAACAAAGGCGAGC
<i>GWD</i>	AT1G10760	TTGATTCGCCTCTGGTGTGGG	GAGCACGACTTGGTCTTCCTCG
<i>PWD</i>	AT5G26570	TTAGAGCGCGGCAGGAGAAAAT	TTGGAAGTGCGACTCCTACCCT
<i>SEX4</i>	AT3G52180	TGACATTGGATGGGGACAGAGGA	AAACGGTTCGGCCTCATTGTGT

AMY3	AT1G69830	GGGCAGTAGTTGCAGATGACCC	ACCCAACCTTCTTCCATCATCCAGC
DPEI	AT5G64860	CTATCGGAGCACCTGGAATGGC	CCACCAGCCTCGAATAGTGTCG

Tabla 5: Oligonucleótidos utilizados para PCR en tiempo real

## 18. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes fueron expresadas en células de *E. coli* BL21 (DE3). Luego de ser crecidas por 4 h a 37°C se agregó IPTG a concentración final 0,5 mM en el medio de cultivo y este fue incubado por 4 h a 28°C. Las células fueron precipitadas por centrifugación 10 minutos a 4.000 x *g* a 4°C. El precipitado fue lavado y resuspendido en buffer conteniendo 20 mM Tris-HCl, pH8 (5 ml/g de célula). Las células se rompieron utilizando ultrasonificador (VCX130, Sonics and Materials Inc., Connecticut, USA) y posterior centrifugado a 12.000 x *g* durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue filtrado a través de filtro de membrana de acetato de celulosa y cargado a una columna HiTrap TM Chelating HP (Amersham Biosciences) equilibrada con buffer de unión (20 mM Tris-HCl pH 8, 0,3 M NaCl, 1 mM β-Mercaptoetanol; 20 mM Imidazol). Este paso fue llevado a cabo a 4°C. La columna fue lavada con 10 a 15 volúmenes de buffer de unión, cada proteína fue eluida usando un gradiente lineal de buffer de elución (20 mM Tris-HCl pH 8, 0,3 M NaCl, 1 mM β-Mercaptoetanol; 0-500 mM Imidazol).

Todas las proteínas eluyeron en la fracción entre 200 y 300 mM de Imidazol. Las fracciones conteniendo la proteína fueron unidas y concentradas a un mínimo de 1mg/ml usando concentradores Centriplus-10 y Centriprep-10 (Millipore Corp., Massachusetts, USA). La proteína concentrada fue guardada a -20°C, -40°C o -80°C hasta su uso en los distintos ensayos.

## 19. Autoinducción de proteínas recombinantes

Clones de *E. coli* (DE3) conteniendo las construcciones en el vector pRSF-Duet, fueron crecidas durante 16 Hs. a 37°C con agitación en un medio LB conteniendo además MgSO<sub>4</sub> 1 mM, 100 mM PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 25 mM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 50 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 100 mM Na<sup>+</sup>, 50 mM K<sup>+</sup>, 0,5% glicerol, 0,05% glucosa, 0,2% α-lactosa. Tras las 16 Hs., se recolectaron las células y se procedió a su ruptura y posterior tratamiento como se indica en “Expresión y purificación de proteínas recombinantes” [71].

## 20. Cuantificación de proteínas

La totalidad de las proteínas fue determinada por el método de Bradford en el cual se tomaron concentraciones crecientes conocidas de la proteína albumina de suero bovino (BSA) con las cuales se realizó una curva de calibración para luego mediante la medida de absorbancia a 590nm determinar por interpolación la concentración de las proteínas incógnita.

## 21. Electroforesis y detección inmunológica

El análisis de electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) fue llevado a cabo con un equipo Mini Protean (Bio-Rad) usando geles de poliacrilamida/bisacrilamida al 10% o 15% (según el tamaño de la proteína a separar) como ha sido previamente descrito en [72]. Los geles fueron revelados por tinción con *Coomassie Brilliant Blue* (R250, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) o mediante la transferencia a membrana de nitro celulosa (Trans-Blot Transfer Medium, Nitrocellulose Membrane, Bio-Rad, California, USA), y posterior revelado con anticuerpo penta-His (Anti-His antibody selector kit, Qiagen, California, USA). El complejo antígeno - anticuerpo fue visualizado por la reacción de la fosfatasa alcalina unida al anticuerpo anti-his con los sustratos BCIP y NBT (Promega, Madison WI, USA).

## 22. Ensayo de *pull-down*.

Los ensayos de *pull-down* se llevaron a cabo como se ha descrito previamente por Wayllace y colaboradores [73]. OsttaAMILASA recombinante unida al *tag* de histidinas fue purificada y desalada utilizando concentradores Centricon (Millipore) de corte 3 kDa para posteriormente unirla a una resina de Niquel-sefarosa de alto rendimiento (GE Healthcare Bio-Sciences) previamente equilibrada con buffer de unión (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 20 mM de imidazol, NaCl 50 mM y 1 mM 2-mercaptoetanol). El extracto crudo de *Ostreococcus tauri* previamente sonificado como se indica en el apartado de purificación de proteínas, que carece de todo *tag* de histidinas (usado como presa), se añadió a la proteína cebo inmovilizada. En experimentos de control, BSA se utilizó como presa. Las proteínas no unidas se eliminaron con tres lavados de 5 ml de buffer de unión. La resina lavada se centrifugó a 500 x *g* durante 3 min a 4 ° C y se descartó el sobrenadante. Las proteínas unidas se eluyeron con un buffer que contiene 20 mM Tris-HCl pH 7,4, imidazol 500 mM, NaCl 50 mM y 1 mM 2-mercaptoetanol). Las proteínas recuperadas se sometieron a SDS-PAGE y se analizaron por tinción con azul de Coomassie.

### 23. Análisis de espectrometría de masa

El análisis de espectrometría de masas se llevó a cabo en el CEQUIBIEM (instalación proteómica), en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Las muestras fueron reducidas con DTT 20 mM durante 45 minutos a 56°C y alquiladas con iodoacetamida 20 mM durante 45 minutos en oscuridad. Se digirió con tripsina (corta el enlace peptídico en el carbonilo de la Lys y la Arg) durante toda la noche. Se realizó la extracción de los péptidos con acetonitrilo. A los digeridos con tripsina se les realizó una limpieza con Zip-Tip C18 (Merck - ZTC18S960) para extraer las sales. Las muestras fueron liofilizadas por centrifugación en vacío (Speed Vac) y vuelta a resuspender con 10 µl de Ácido Fórmico 0,1%. Se analizó por nano HPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap, lo que permitió en primer lugar una separación de los péptidos obtenidos por digestión trípica de la muestra y una posterior identificación de los mismos. La ionización de las muestras se realiza por electrospray. El análisis de los datos obtenidos se realiza con el programa Proteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific).

### 24. Dicroísmo circular (CD)

Espectros de UV-lejano de dicroísmo circular se obtuvieron utilizando un equipo Jasco J-810 espectro polarímetro (Jasco International Co.) en un intervalo de longitud de onda de 200 - 250 nm, a 25 ° C. Las mediciones se realizaron en una cubeta de cuarzo de 0,2 cm a una velocidad de 100 nm.min<sup>-1</sup>, el ancho de banda de 1 nm, tiempo de respuesta de 2 s, el paso de datos de 1 nm, y la acumulación de espectros de dicroísmo: 10. Los datos de los espectros se muestran como elipticidad molar obtenido luego de restar la línea de base, suavizado y normalización de los datos. Los espectros de dicroísmo se registraron en buffer 20mM Tris-HCl, pH 7,4.

### 25. Medidas espectrofluorométricas

Todos los experimentos fueron llevados a cabo usando OsttaAMILASA ó CBM20 10 µM en sus respectivas soluciones tampón 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7,4. La longitud de onda de excitación utilizada fue de 295 nm y las intensidades de emisión fueron recolectadas en un rango comprendido entre 300 y 450 nm ( $\lambda_{em}$ ), promediándose 5 barridos. Los experimentos de extinción de fluorescencia ("*quenching*") fueron llevados a cabo con el agregado de acrilamida 5M en buffer 20 mM Tris-HCl pH 7,5. Los datos fueron graficados como intensidad de fluorescencia relativa ( $F_0/F$ ), donde  $F_0$  es la intensidad de fluorescencia en ausencia de acrilamida; y  $F$  es la intensidad de

fluorescencia en presencia de acrilamida) en función de la concentración de acrilamida. Los experimentos de unión cuantitativa fueron llevados a cabo mediante el agregado de cantidades crecientes de carbohidratos a partir de una solución madre 1% en 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7,4 con agitación continua. La intensidad de fluorescencia fue determinada 2 min después de cada agregado usando longitud de onda de excitación de 295 nm y una longitud de onda de emisión de 350 nm. Las soluciones de carbohidratos utilizadas no emitían fluorescencia en las condiciones evaluadas.

## 26. Cromatografía de exclusión molecular

El análisis de las proteínas por cromatografía de filtración en gel se llevó a cabo utilizando el equipo para purificaciones ÄKTA purifier (GE Healthcare bio-Sciences) con una columna de exclusión molecular HiPrep 16/60 & 26/60 Sefacril S-300 de alta resolución (GE Healthcare bio-Sciences), calibrada con el kit de calibración de masa molecular (MWGF1000, Sigma-Aldrich).

## 27. Ensayos de actividad ramificante

La actividad ramificante se ensayó utilizando medio que contiene Tris-HCl 20 mM pH 7,4, amilopeptina (Fluka #10118), a concentración final de 0 - 40 mg/ml, y diferentes cantidades de la proteína recombinante: OsttaSBE, CBM48CD ó CD (0 - 2,5 mg) en un volumen final de 33  $\mu$ l. El ensayo fue iniciado por el agregado de cada una de las enzimas, y el incubado de esta mezcla de reacción a 37°C durante 30 minutos. La reacción fue detenida mediante la adición de 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, y 865  $\mu$ l de reactivo de iodo (CaCl<sub>2</sub> saturante, I<sub>2</sub> 0,6 mM y KI 0,9 mM) como ha sido reportado previamente [74].

La actividad enzimática fue medida como la disminución de absorbancia a 520 nm. La información se presenta como  $\Delta$ Abs contra un blanco sin enzima. Todos los parámetros presentados son la mediana de al menos tres determinaciones. Una unidad de actividad enzimática (U) es definida como la cantidad de enzima que provoca la disminución de la absorbancia en 1 por minuto a 520 nm.

## 28. Ensayos de actividad almidón sintasa total

Las medidas actividad sintasa se llevaron a cabo en buffer Bicina 10 mM pH 8 MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Excepto para el control sin aceptor de residuos de glucosa, se utilizó Glucógeno (Beef Liver Fisher - BP676-5) 2 mg/ml, ADP-Glc (Sigma - A0627-10MG) 5 mM, Fosfatasa Alcalina Bovina (Sigma

- P6774-2KU) 1 unidad, Volumen final de reacción 50 µl. La enzima recombinante o el extracto crudo se incubaron en el medio antes descrito a 30°C, se frenó la reacción mediante el agregado de 333 µl de solución de Verde de Malaquita (\*), se dejó reposar 1 minuto a temperatura ambiente y se agregaron 38 µl de Citrato Trisodico (34%p/v). Se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente y se procedió a leer absorbancia en microplaca a 630 nm. Se realizó una curva de calibración con NaHPO<sub>4</sub>.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de proteína que cataliza la incorporación de 1 µmol de glucosa a partir de ADP-Glc en glucógeno en 1 minuto bajo las condiciones especificadas

(\*) Solución de Verde de Malaquita: 3 volúmenes de solución 0,5 mM de Oxalato de Verde de Malaquita (Sigma - M6880), 1 volumen de Molibdato de Amonio 0,034 M en HCl 4M. La solución se agita durante 30 minutos y posteriormente se filtra a través de papel Whatman N°4. Si bien la solución es estable en oscuridad mediante el agregado de 1 volumen de Tween 20 2% (v/v) a 50 volúmenes de la solución de colorante, se aconseja preparar la solución en el momento de usarla.

## 29. Ensayos de actividad amilasa

Se utilizaron dos métodos para medir actividad amilasa. En el primero, la actividad de las enzimas se determinó utilizando un “kit” comercial (Amilokit, Wiener Lab). Se incubaron las muestras de proteína en presencia de un reactivo A que consiste en una solución de almidón 500 mg/l tamponada a pH 7; produciéndose la hidrólisis enzimática. La reacción se detiene por el agregado del reactivo B (solución 0,01 eq/l de iodo en ácido clorhídrico 0,02 M); que al mismo tiempo produce color con el almidón remanente no hidrolizado. La disminución del color respecto al sustrato coloreado (sin muestra) es proporcional a la actividad amilasa y se expresa en Unidades Amilolítica/decilitro (UA/dl) ( $UA/dl = [(C-D)/C * 1.000]$ ). Las medidas de absorbancia se realizan a 640 nm.

Para el segundo método se utilizó el “kit” comercial Glicemia Enzimática (Wiener Lab) que se basa en la oxidación de la glucosa liberada tras la degradación del almidón por parte de la amilasa, llevándose esta reacción a cabo en buffer Tris-HCl pH 7,4, durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se incuba la mezcla de reacción con el reactivo del kit conteniendo glucosa oxidasa 10 kU/L, peroxidasa 1kU/L, 4-aminofenazona 0,5 mM, 4-hidroxibenzoato y 100 mM buffer fosfato

pH 7,0, dando lugar a un compuesto coloreado que absorber a 505 nm y es directamente proporcional a la cantidad de glucosa liberada. Se realizan curvas de calibración para las cuales se tomaron concentraciones crecientes conocidas de glucosa, para luego mediante la medida de absorbancia a 505nm determinar por interpolación la concentración de la glucosa liberada y referirlo a la actividad enzimática. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de proteína que cataliza la liberación de 1  $\mu$ mol de glucosa a partir de almidón en 1 minuto bajo las condiciones especificadas

### 30. Ensayos de actividad enzimática en extractos crudos

Se pesaron 0,5 g de hojas manteniéndolas en N<sub>2</sub>(l). Se trituraron las muestras en mortero pre-enfriado con nitrógeno líquido hasta formar un polvo fino. Se agregaron 2 ml de buffer MOPS 100 mM pH 7,5, PMSF 1 mM. Se continuó con la ruptura mecánica del tejido y posteriormente se trasvaso el homogenado a tubos de 1,5 mL. Se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se recolectó el sobrenadante y se procedió a su desalado mediante el uso de columnas de Sephadex G-50 como se describió previamente [68]. Las muestras fueron utilizadas de acuerdo a los protocolos de ensayo de actividad mencionadas en esta sección de Materiales y Métodos.

### 31. Ensayo de unión a polisacáridos

Aproximadamente 20 mg de cada proteína purificada a ensayar fueron incubados con almidón (Fluka-85649, St. Louis, MO, USA), amilosa (Fluka-10130) o amilopectina (Fluka-10118) en 20 mM Tris-HCl pH 7,5 a una concentración final de polisacárido de 10% (p/v). Los ensayos de unión fueron realizados a temperatura ambiente en agitador orbital durante 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12.000 x g durante 10 minutos. Se removió el sobrenadante que posteriormente fue hervido en buffer de carga SDS Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 6% (v/v), azul de bromofenol 0,004% (p/v) y  $\beta$ -Mercaptoetanol 1% (v/v). El pellet fue lavado tres veces con 100  $\mu$ l de 20mM Tris-HCl (pH 7,5) mediante agitación y posterior centrifugación, retirando el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en igual volumen que el sobrenadante, y finalmente hervido bajo las mismas condiciones [37, 73, 75]. Después de analizar las muestras por SDS-PAGE, los niveles de proteína fueron determinados por análisis de densitometría de las bandas teñidas con azul de Coomassie R-250 usando el programa de análisis GelPro (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Frataxina recombinante de *Arabidopsis thaliana* fue utilizada como control negativo.

Las constantes de adsorción ( $K_{ad}$ ) fueron determinadas como se describió previamente, con modificaciones menores [37, 73]. Proteína purificada recombinante (concentraciones finales de 0 – 80  $\mu$ M) fue incubada con almidón (Fluka-85649, St. Louis, MO, USA), amilosa (Fluka-10130) o amilopectina (Fluka-10118) en 20 mM Tris-HCl pH 7,5 a una concentración final de polisacárido de 10% (p/v). Se realizó control negativo sin agregado de polisacáridos. Los ensayos de unión fueron realizados a temperatura ambiente en agitador orbital durante 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12.000 x  $g$  durante 10 minutos. Para calcular la concentración de proteína unida, la cantidad de proteína obtenida soluble fue restada a la cantidad total de proteína agregada al principio del ensayo. Las concentraciones proteicas fueron determinadas mediante el método de Lowry [76]. La constante de adsorción ( $K_{ad}$  en mililitros por gramo de polisacárido) fue obtenido de la pendiente obtenida al graficar proteína unida versus proteína libre como se reportó previamente [37, 73].

## 32. Ensayo de estabilidad térmica

La determinación de la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) de las proteínas fue realizada mediante la incorporación del reactivo SYPRO Orange (Thermo Fisher Scientific Inc, S6651) a las proteínas desplegadas por efecto de la temperatura. Se utilizó el equipo Step One PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los ensayos fueron realizados en placas de 48 pocillos MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) conteniendo solución 5X de SYPRO Orange, 1X de buffer de purificación usada para cada proteína y 5  $\mu$ M de la proteína en estudio o la mezcla de más de una. Los controles se componen de la mezcla de ensayo sin la proteína. Las muestras proteicas fueron previamente centrifugadas por al menos 15 minutos a 12.000 x  $g$  y 4°C para descartar proteínas desnaturalizadas previo al ensayo. Las placas fueron selladas con film MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) y se procedió a realizar la rampa de desnaturalización desde 20°C hasta 99°C incrementando de a 0,5°C por minuto. La toma de datos se hizo cada un minuto. El proceso de desnaturalización se observó como un aumento en la fluorescencia del colorante SYPRO Orange. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y analizados mediante el software de análisis GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc.), graficando intensidad de fluorescencia en función de la temperatura, y la segunda derivada también en función de la temperatura.

### 33. Determinación del contenido de almidón total en roseta

Para la comparación del contenido de almidón en las rosetas de plantas de *A. thaliana*, se cosecharon plantas enteras en un momento específico del ciclo diurno y se decoloraron en etanol 80% V/V a 60°C con agitación hasta la decoloración total. Luego se lavó por 1 h con H<sub>2</sub>O destilada y las hojas se incubaron con una solución de yodo preparado en el momento (I<sub>2</sub>/KI [KI 5 g, I<sub>2</sub> 0,5 g en 500 ml de agua]) durante 5 min y luego se destiñó en agua durante 1 a 2 h, y se fotografió inmediatamente. Las determinaciones cuantitativas se realizaron convirtiendo las imágenes a escala de grises y haciendo posteriormente densitometría mediante el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Los valores de bits de colores (B/N en este caso) son 0 para el color negro (mayor cantidad de Lugol unido) y 255 para el color blanco (ausencia total de Lugol).

### 34. Determinación enzimática del contenido de almidón

La determinación del contenido de almidón se realizó a partir de tejido fresco de hojas de plantas de *A. thaliana*. Se homogeneizó con N<sub>2</sub> (l) 0,5 - 0,6 g de tejido, se colocaron en tubos de 15 ml, e incubaron a 100°C por una 1 hora. Luego se agregó 5 ml de metanol:cloroformo:agua (12:5:3) y se agitó en vórtex, e incubó a 25°C por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 2.200 x g por 10 minutos. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y esta extracción se repitió dos o tres veces más (hasta que el sobrenadante estuviera claro). Los restos de m:c:a se evaporaron colocando los tubos abiertos a 50°C por aproximadamente 2 horas. Luego se agregó 2,5 ml de NaOH 0,1 N. Los tubos se taparon y agitaron en vórtex hasta resuspender el pellet. Posteriormente se incubaron los tubos a 50°C por 30 minutos, agitando ocasionalmente para solubilizar el almidón. Se agregó 2,5 ml de ácido acético 0,1 N, para llevar el pH a 5,1. De los 5 ml finales, se separaron 300 µl en un tubo de 1,5 ml, y agregó 100 µl de la solución enzimática (\*) 10X y se mezcló utilizando vórtex. Los tubos se colocaron inmediatamente a 50°C por aproximadamente 72 horas (36 horas para determinar el grado de degradabilidad de las líneas sobreexpresantes respecto a las salvajes). Luego de la incubación, se agitó en vórtex y se centrifugó un pulso corto para remover los restos de tejido. El sobrenadante se analizó espectrofotométricamente para determinar el contenido de glucosa mediante un kit comercial para la determinación de la glicemia (Wiener Lab.).

\* Solución enzimática ( $\alpha$ -amilasa/amiloglucosidasa), preparación stock 10X: Se disolvió 0,01 g de amiloglucosidasa y 1,3 g de  $\alpha$ -amilasa en 15 ml de buffer NaOAc 0,05 M, pH5,1.

### 35. Observaciones por microscopía

Las muestras para observar mediante microscopía electrónica de barrido (MEB/SEM) fueron obtenidas según los pasos descritos en “Determinación enzimática del contenido de almidón” pero sin someter las muestras a degradación enzimática. Se utilizó un microscopio Quanta 200F (FEI, Hillsboro, Oregon, USA) que cuenta con un emisor de electrones FEG. Se trabajó en alto vacío sin recubrir la muestra. Se usaron ampliaciones entre 10.000 y 40.000X, energía de 2,5 kV, detector de campo amplio LFD y distancia de trabajo (WD) de 5,8 a 7,6 mm. Las imágenes fueron analizadas mediante el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

### 36. Obtención de perfiles metabólicos

Se disgregaron mecánicamente rosetas de *Arabidopsis thaliana* usando mortero en nitrógeno líquido agregando 1,4 mL de metanol 100% mas 60 µl de ribitol (0,3 mg/ml) como standard interno y la muestra fue incubada en tubo de 2 mL a 70°C durante 10 minutos. Se centrifugó 10 minutos a 11.000 x *g* y se trasvasó el sobrenadante a un nuevo tubo. Se agregaron 750 µl de cloroformo y 1,4 mL de agua destilada antes de centrifugar a 2.200 x *g* por 15 min. Se liofilizó la muestra para posteriormente proceder a la derivatización según se describe en Lisec y col. ([77]).

Para el análisis, se realizaron cuatro réplicas biológicas y dos réplicas técnicas por tratamiento (8 réplicas en total). El análisis por GC–MS fue llevado a cabo utilizando un sistema automático XL de cromatografía gaseosa y un espectrómetro de masa Turbo (Perkin Elmer) en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas – UNR. 1 µl de muestra fue inyectado (relación de Split 1:40) a 280°C. La columna utilizada fue una VF-5 ms (Varian, Darmstadt, Germany) con las siguientes dimensiones: 30 m × 0,25 mm de diámetro interno, y un film de 0,25-µm con gas helio como gas portador (“*carrier*”), a un flujo constante de 1 mL/min. El programa de temperatura fue 5 min a 70°C, rampa de 5 min a 310°C, y un calentamiento final por 2 min a 310°C. La línea de transferencia del MS fue configurada a 280°C. El espectro fue monitoreado en un rango de masa (*m/z*) de 70–600. La configuración del resto de los parámetros fue realizada de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los cromatogramas fueron adquiridos con el software TurboMass 4.1 (Perkin Elmer). El programa de búsqueda espectral NIST98 (National Institute of Standards and Technology,

Gaithersburg, MD, USA) fue utilizado como plataforma. La MS y el tiempo de retención fueron comparados con la colección de la base de datos Golm Metabolome Database (Kopka, 2004 #552}). Los apareamientos fueron manualmente supervisados y aceptados con un umbral >650 (con un emparejamiento máximo igual a 1.000) y una desviación en el tiempo de retención <1,0%. La altura de los picos fue normalizada usando la cantidad de muestra fresca y el ribitol como estándar interno. El contenido relativo de los metabolitos fue determinado y el análisis estadístico de los mismos fue llevado a cabo mediante un ANOVA a una vía.

### 37. Alineamientos de secuencia

La búsqueda por homología de la secuencia aminoacídica de OsttaSBE (Código de Genbank: XP\_003074364, 1-1058 residuos aminoacídicos) fue realizada utilizando PSI-BLAST [78] con los parámetros por defecto (límite de inclusión de 0,005) hasta convergencia, utilizando bases de datos no redundantes. El mismo procedimiento fue válido para el CBM41 (aminoácidos 63-152), CBM48 (aminoácidos 302-389) y DC (aminoácidos 425-891). Las secuencias con valores de E menores a  $1.10^{-5}$  fueron tomados y alineados utilizando el programa CLUSTALW [79]. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos entre polipéptidos homólogos fue realizado usando el programa Unipro UGENE v.1.10.4 [80] con los parámetros por defecto.

De la misma manera se realizó el alineamiento de secuencia para el CBM20 (Código de Genbank: XP\_003079819, 81-178 residuos aminoacídicos) en este caso se tomaron para el alineamiento las secuencias de un CBM20 de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el CBM20 de OsttaAMILASA de *O. tauri*, el CBM20 de la cyclomaltodextrina glucanotransferasa de *Bacillus circulans*, el CBM20 de la 4- $\alpha$ -glucanotransferasa de *A. thaliana*, el CBM53 de la Almidón sintasa III de *A. thaliana* el CBM48 de la isoamilasa de *O. tauri*, y el CBM48 de la enzima desramificante de glucógeno de *E. coli*.

Los árboles filogenéticos fueron construidos mediante máxima verosimilitud, utilizando análisis de Bootstrap de 500 réplicas en el programa MEGA versión 7.0.14 [81]. El árbol fue enraizado a una pululanasa predicha de *Physcomitrella patens*.

### 38. Modelado por homología

Los modelos estructurales de tres dimensiones fueron obtenidos utilizando el programa @TOME V2.2, que incluye T.I.T.O. (Tool for Incremental Threading Optimization), Scwrl y Modeller [82]. La estructura de OsttaSBE fue modelada usando la enzima desramificante de almidón de *Hordeum vulgare* (código PDB 4J3S) [83]. Las estructuras cristalográficas de las enzimas ramificantes de *Oryza sativa* y *E. coli* (códigos PDB 3AMK y 5E6Z, respectivamente) fueron usadas para comparar el dominio catalítico [84, 85]. La estructura del CBM41 fue modelada usando como molde la pululanasa de *Klebsiella pneumoniae* (código PDB 2FHF)[86]. La estructura del CBM48 fue modelada usando como molde la enzima desramificante de *Hordeum vulgare* (código PDB 2Y4S)[87]. La estructura del CBM20 fue modelada usando como molde la enzima glucoamilasa de *Aspergillus niger* (código PDB 1ACZ) [88].

El alineamiento con los templados fue basado en homología y estructura secundaria. Los modelos fueron evaluados usando los programas Verify-3D [89, 90] y RAMPAGE [91]. La superposición de los modelos fue hecha mediante el servidor SuperPose v 1.0 [92].

### 39. Análisis de datos de secuenciación de RNA

Las lecturas de los experimentos de secuenciación de RNA-Seq fueron obtenidas en formato FASTQ a partir del proyecto PRJNA400530 alojado en NCBI – Sequence Read Service (SRA) [93]. Los controles de calidad fueron realizados utilizando la herramienta FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Las lecturas de *Ostreococcus tauri* fueron mapeadas al genoma y se utilizaron las anotaciones de referencia obtenidas del portal JGI Genome Portal ([94], [95]) usando la herramienta HISAT ([96]). Las lecturas alineadas fueron convertidas de SAM a BAM usando SAMTools (<http://samtools.sourceforge.net/>) para su posterior inspección visual usando el programa Integrative Genome Viewer ([97]). El ensamblado de los transcritos y la cuantificación de los mismos fue realizada mediante StringTie ([98])

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**CAPITULO 1**  
**Caracterización de OsttaSBE**

## VII. CAPITULO 1 - Caracterización de OsttaSBE

### A. Introducción:

En el año 2004 Ral y colaboradores demostraron que el polipéptido codificado por Ot01g03030 era el segundo más abundante de las proteínas unidas al gránulo de almidón, siendo GBSS la de expresión mayoritaria. Debido a la particularidad de *Ostreococcus tauri* en cuanto a la forma en que divide su gránulo de almidón, se propuso que esta proteína podría estar involucrada en este particular mecanismo [2]. Publicaciones posteriores clasificaron a este polipéptido como una enzima desramificante en base a predicciones bioinformáticas [8]. De acuerdo a Sorokina y col. [8], la mayor parte de la regulación enzimática en algas como *O. tauri* se lleva a cabo a nivel transcripcional, por lo tanto, hacer un estudio de los niveles de transcritos a través del día puede dar una idea del comportamiento circadiano de ciertos genes. Cuando se observan los patrones de expresión de las enzimas involucradas en el metabolismo del almidón (Figura 6) se puede observar el perfil típico presentado por las enzimas degradativas que actúan mayoritariamente durante la noche ( $\alpha$ -amilasa) y el de las enzimas involucradas en la síntesis de almidón, OsttaSSII, OsttaSSIII y

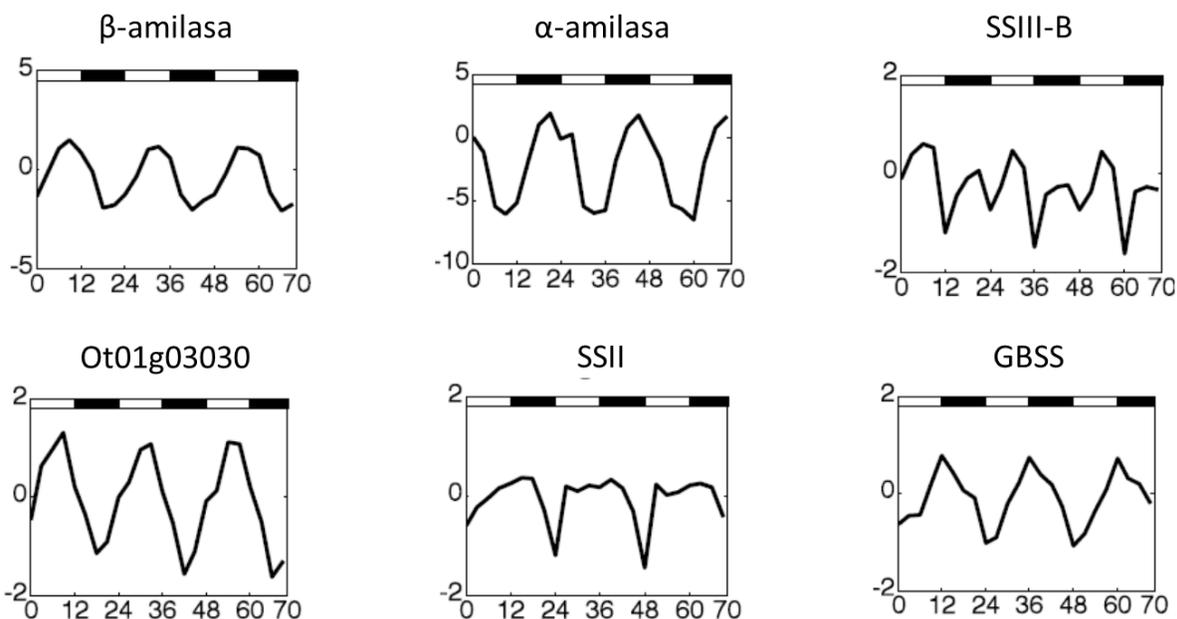


Figura 6: Expresión diurna de los ARNm de *O. tauri*. Tomado de [8]. Las barras superiores indican períodos de luz (vacías) y oscuridad (rellenas)

OsttaGBSS que se expresan principalmente de día. Sin embargo hay perfiles de expresión que parecieran ser contradictorios, como el de la  $\beta$ -amilasa cuya expresión se incrementa durante el día y la OsttaSSIII que también tiene picos de expresión nocturnos. Por su parte, el perfil de expresión de Ot01g03030 presenta un mayor nivel de transcritos durante el día y disminuye durante la noche.

La presencia de este polipéptido en los gránulos de almidón en inesperadamente grandes concentraciones, junto con el particular perfil de expresión de sus mensajeros respecto a lo que cabría de esperar para enzimas involucradas en la degradación del gránulo, permitieron plantearnos estudiar su rol específico en el metabolismo de almidón y la utilización de los gránulos de reserva en *O. tauri*.

## B. Resultados

### 1. Análisis evolutivo de OsttaSBE

Utilizando la secuencia proteica de interés, se realizaron búsquedas mediante PSI-BLAST [78] con la finalidad de identificar proteínas con alta similitud de secuencia a la de *O. tauri* en distintos organismos. Se encontraron secuencias en diversas algas y plantas con *E-Values* aceptables (menor a  $1 \times 10^{-5}$ ). Las mismas fueron utilizadas para realizar un árbol filogenético que nos permita inferir la relación evolutiva entre ellas. Los alineamientos se realizaron mediante el programa de alineamiento ClustalW, y con el programa de análisis MEGA7 se realizaron los árboles filogenéticos de máxima similitud (utilizando réplicas de *Bootstrap* de 500) (Figura 7).

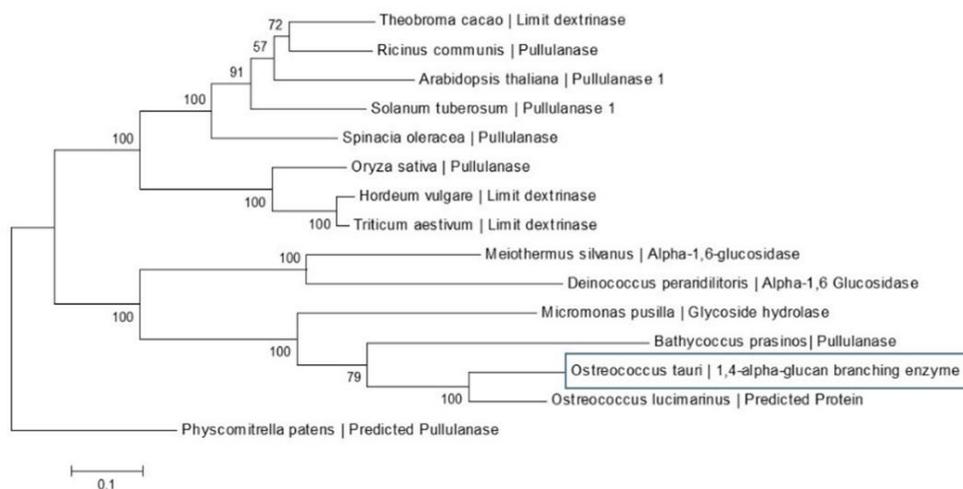


Figura 7: Árbol filogenético correspondiente a la enzima ramificante OsttaSBE

Se observa en la construcción filogenética un buen soporte por parte de los valores de *Bootstrap*, donde salvo una excepción, todos los nodos presentan valores por encima de 70 [99]. Como podemos ver en los árboles, la enzima ramificante se encontraría más próxima evolutivamente con el grupo de las proteínas estudiadas de algas, que con el grupo de plantas.

Resulta interesante observar que la enzima ramificante presenta homología con enzimas desramificantes (dextrinasa límite, pululanasa y alfa-1,6-glucosidasa). Esto se debe al hecho de que ambos grupos de proteínas pertenecen a la familia de las glucósido hidrolasa 13 (GH13), y ambos dominios catalíticos poseen alta identidad de secuencia [100]. También es llamativo que los alineamientos no muestren ninguna enzima ramificante, por esta razón decidimos confeccionar un segundo árbol filogenético donde se incluyeron también secuencias de proteínas ramificantes del almidón.

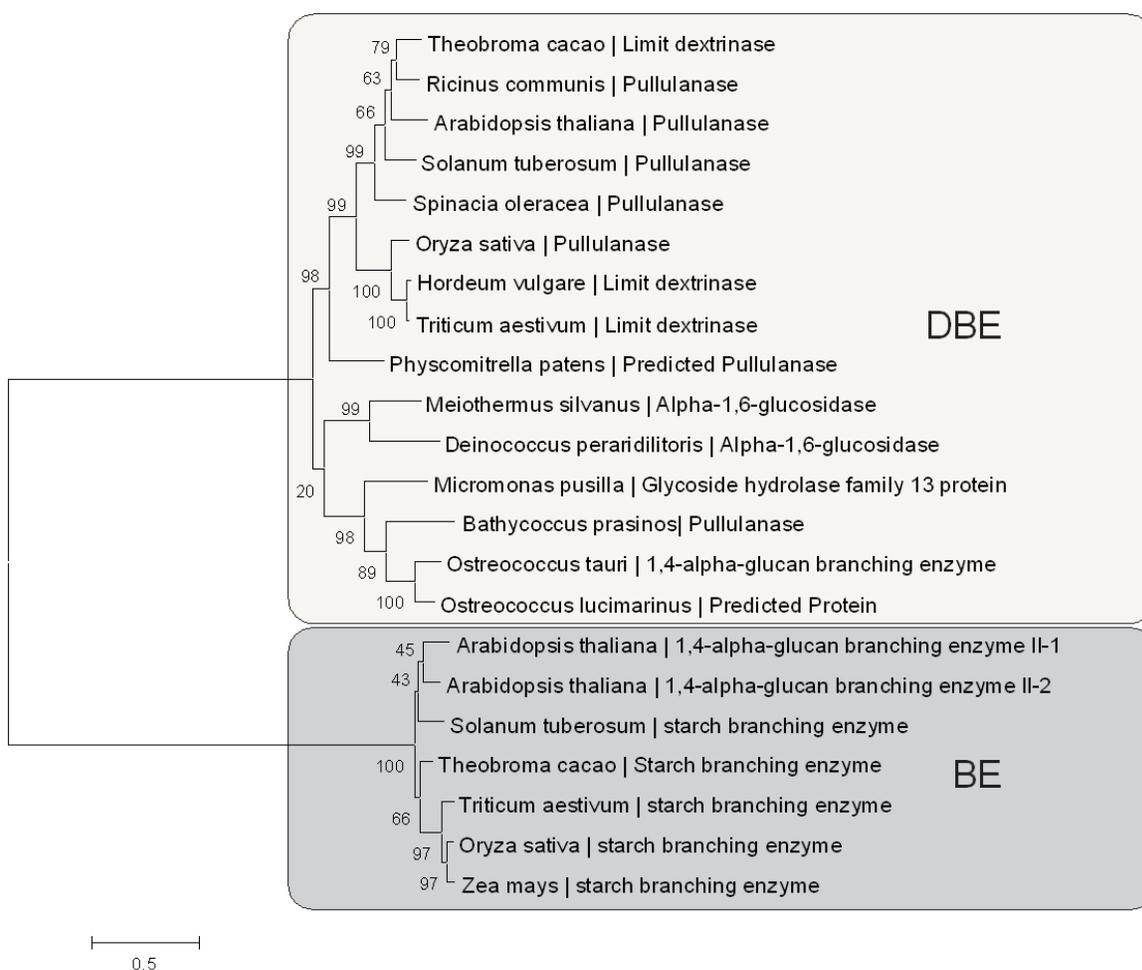


Figura 8: Árbol filogenético de enzimas ramificantes (BE) y desramificantes (DBE)

En este nuevo resultado (Figura 8) podemos observar que se forman dos *clústers* independientes donde se encuentran las enzimas ramificantes por un lado (SBE) y las desramificantes por el otro (DBE). OsttaSBE se encuentra en el segundo grupo (que aparece bien diferenciado del primero). Analizando las razones por las cuales se obtienen estos resultados encontramos que si bien los CBM de la familia 48 suelen estar presentes tanto en SBE como DBE, los CBM de la familia 41 se reportaron solo (al momento de estos análisis) en las enzimas desramificantes y no en las ramificantes, con lo que nuestro caso sería la primera descripción de este tipo de CBM en este tipo de enzimas si efectivamente esta fuera capaz de generar ramificaciones [101].

## 2. Análisis de estructura proteica *in silico*

Se realizaron análisis *in silico* con la finalidad de determinar el plegamiento de OsttaSBE utilizando @TOME V2 [82]. Se obtuvieron los modelos por homología con el programa Modeller, utilizando el servidor TITO [102]. Para OsttaSBE se tomó como templado (debido a su alta identidad) la estructura cristalina de la enzima desramificante de almidón (HvLD, código de la base de datos de proteínas - PDB: 4J3S, 47% de identidad de residuos) perteneciente a *Hordeum vulgare*. La estructura obtenida para la enzima ramificante fue validada mediante el programa Verify 3D, a partir del cual obtuvimos un 99,5% de valores de score positivos, siendo el 90,7% mayores a 0,2 (*score* promedio 0,394). A su vez el modelo fue validado utilizando ProSA-web, donde el valor Z-Score obtenido de -8,89 corroboró la calidad del modelo. De acuerdo a estos resultados, concluimos que el modelo de la estructura molecular de OsttaSBE es preciso y de buena calidad [103] [104].

La estructura propuesta para OsttaSBE presenta un plegamiento similar al de 4J3S de *H. vulgare*, manteniéndose conservadas las hélices alfa y las hojas beta a lo largo de la secuencia proteica (Figura 9A-B). La superposición de ambas estructuras demuestra fehacientemente que el templado y el modelo propuesto para OsttaSBE presentan una alta similitud (Figura 9C). También se ha informado previamente en la literatura que el mecanismo de catálisis de las glucósido hidrolasas 13 (GH13) se da a través de un mecanismo general de doble desplazamiento ácido/base [5]. En HvLD, el Asp473 ha sido identificado como el nucleófilo catalítico, en tanto que el Glu510 es el dador de protones ácido/base, mientras que el Asp642 actúa como un estabilizador del estado de transición [83]. Basados en el alineamiento de la secuencia aminoacídica, hemos identificado que

aquellos aminoácidos postulados como involucrados en la catálisis se encuentran conservados en OsttaSBE: Asp647 (nucleófilo catalítico), Glu684 (dador de protones) y Asp816 (estabilizador del intermediario de transición). La Figura 9D muestra un acercamiento de la superposición de los aminoácidos previamente mencionados. En la figura se puede observar que estos tres residuos mantienen no solo su disposición espacial, sino que también su configuración rotacional en OsttaSBE respecto a HvLD.

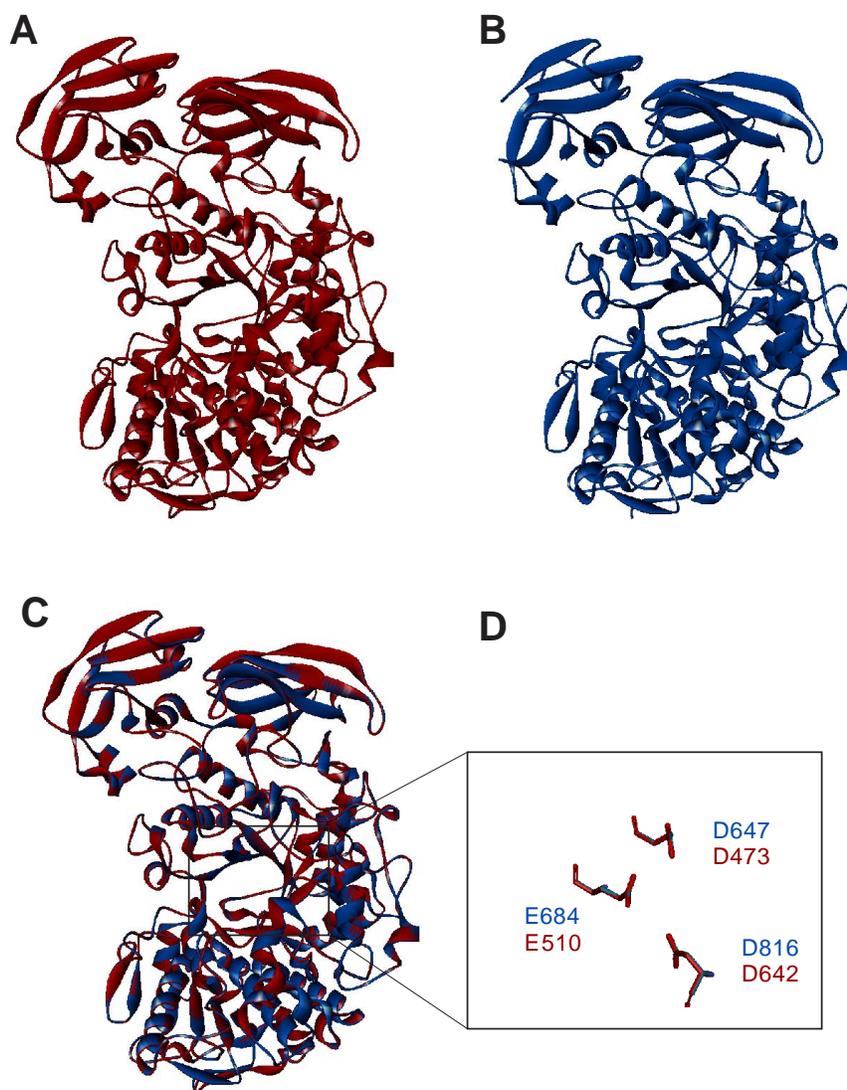


Figura 9: Modelo de OsttaSBE generado por homología de secuencia. A) estructura cristalográfica de 4J3S. B) Modelo propuesto para OsttaSBE. C) Superposición de 4J3S (Rojo) y OsttaSBE (Azul). D) Superposición de los residuos más importantes del dominio catalítico de 4J3S (Rojo) y OsttaSBE (Azul).

Se realizaron también estudios del dominio catalítico (DC) aislado. Para llevar a cabo este análisis, se tomaron las secuencias homólogas a OsttaSBE, presentes en enzimas ramificantes de *M. tuberculosis*, *E. coli*, *A. tumefaciens*, *A. thaliana*, *O. sativa*, *T. aestivum* y *Z. mays*. Posteriormente se realizaron alineamientos de secuencia y construcción de árboles filogenéticos (Figura 10). Estos estudios mostraron que el dominio catalítico de OsttaSBE tiene mayor identidad con los DC de enzimas bacterianas, que con aquellos de plantas superiores. Para cotejar estas diferencias, decidimos realizar la superposición de la estructura de OsttaSBE junto con una de bacterias (BE de *E. coli* 5E6Z) y otra de plantas (BE de *O. sativa*3AMK) por separado.

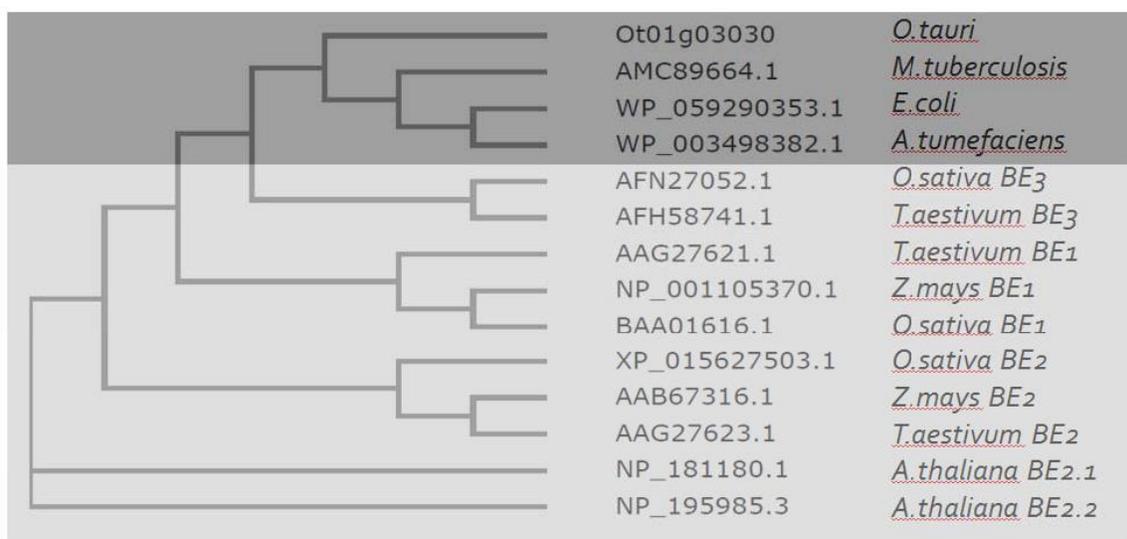


Figura 10: Árbol filogenético del tomando solo los dominios catalíticos de distintas enzimas ramificantes. Las BE de bacteria y *O. tauri* se muestra en gris oscuro, la de plantas en gris claro.

En la Figura 11 se puede observar que la topología global de OsttaSBE, 5E6Z y 3AMK es prácticamente idéntica, pero una mirada más detallada al sitio catalítico permite apreciar que existe una mayor conservación espacial de los aminoácidos involucrados en la catálisis (Asp647, Glu684 y Asp816, utilizando la numeración de OsttaSBE) con respecto a la BE de bacterias, que respecto a la de plantas. También pudimos identificar otros tres residuos previamente descritos en *E. coli* considerados importantes para la catálisis en este organismo. Estos residuos son Tyr300, Asp335 y Asp526 (numeración de *E. coli*) que se corresponden con los aminoácidos Tyr531, Asp573 y Asp816 en OsttaSBE [85, 105].

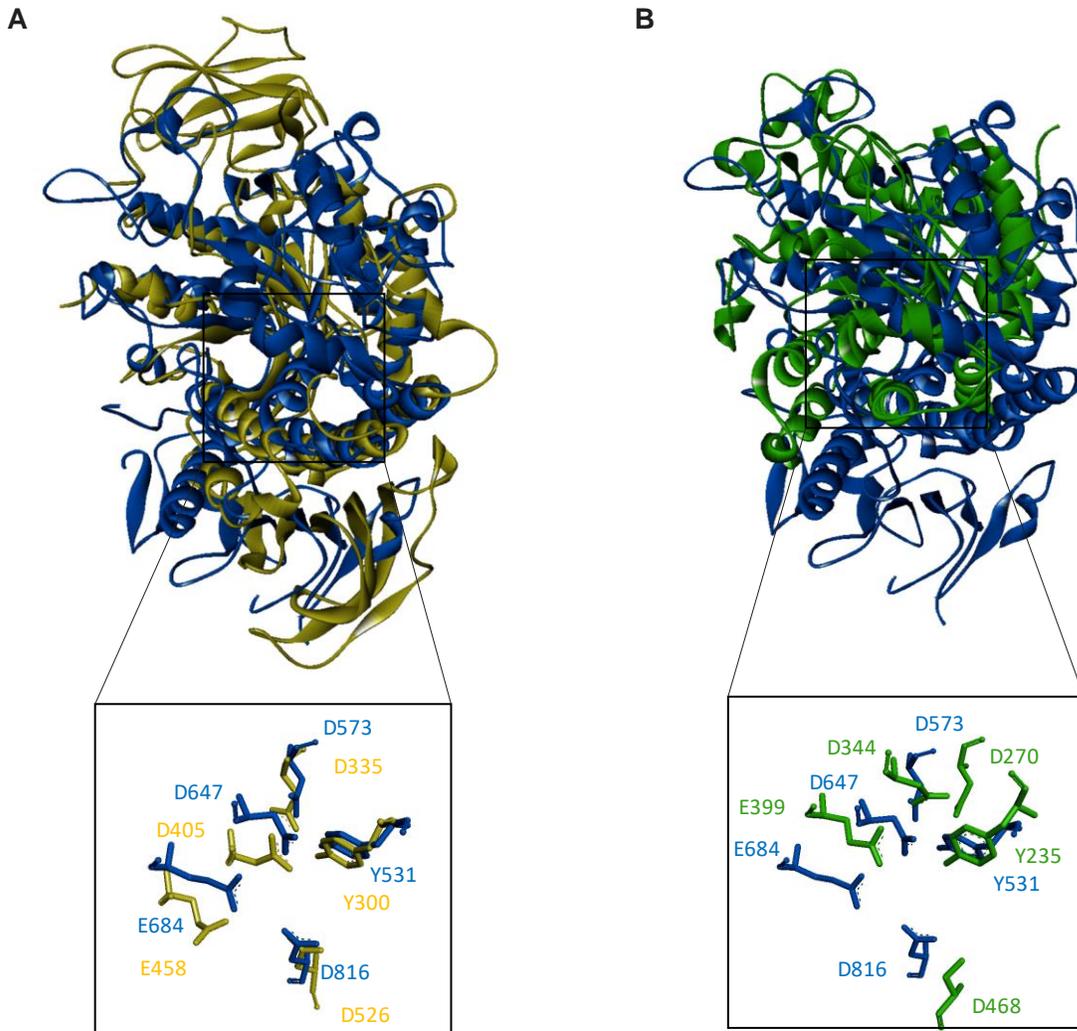


Figura 11: Superposición de OsttaSBE (Azul) y A) enzimas ramificantes del glucógeno de *E. coli* (PDB 5E6Z, amarillo) y B) ramificante de almidón de *O. sativa* (PDB 3AMK, verde)

Se realizaron también los modelados por homología de los módulos de unión a carbohidratos (CBM) por separado. Para el caso del CBM41 de la enzima ramificante se tomó como molde el CBM de la pululanasa de *Klebsiella pneumoniae* (2FHF) (18 % de identidad).

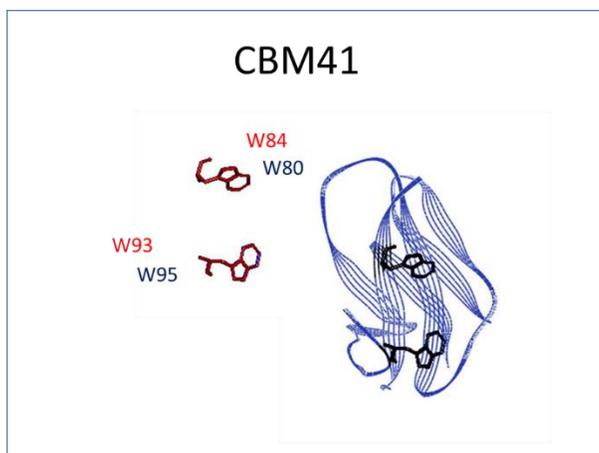


Figura 12: Estructura propuesta para el CBM41 de OsttaSBE

Según estudios anteriores de esta familia de módulos [86], tanto el triptófano 80 (W80 - nomenclatura para la pululanasa de *K. pneumoniae*) como el triptófano 95 (W95) se encuentran involucrados en la interacción con los polisacáridos por apilamiento o *stacking* de los anillos aromáticos con los residuos glucosídicos que permiten la unión a los distintos polisacáridos. En la Figura 12 se marcaron estos aminoácidos de color rojo (para el CBM por nosotros estudiado) y de color azul (para el CBM de 2FHF). Se puede observar que ambos triptófanos se encuentran perfectamente conservados espacialmente.

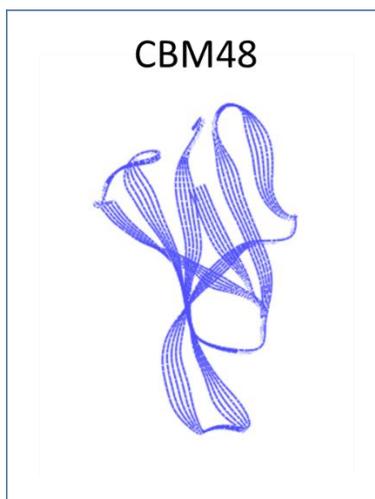


Figura 13: Estructura propuesta para el CBM48 de OsttaSBE

Para el CBM48 se realizó también el modelado por homología, tomando como molde la enzima desramificante de *Hordeum vulgare* (2Y4S) (44% identidad) (Figura 13). Para esta familia de

CBM en particular no fueron identificados los residuos involucrados en el reconocimiento de carbohidratos, por lo tanto, si bien pudimos proponer una estructura para este dominio, no se pudieron detectar los aminoácidos involucrados en la unión a polisacáridos.

### 3. Clonado, expresión y purificación de OsttaSBE

Con la finalidad de obtener ADN genómico a partir de *O. tauri* para utilizar de molde para el clonado de la secuencia codificante de OsttaSBE, se tuvieron que ensayar diversas condiciones para finalmente dar con aquellas que permitieran un óptimo crecimiento del organismo. Concluimos que el medio óptimo de crecimiento es agua de mar, consistente en sales comerciales de mar de la marca Sigma (S9883) en agua destilada (esterilización de la solución mediante filtrado), suplementadas a su vez con sales de Medio K (NCMA). Se crecieron a 20°C, sin agitación y un ciclo de luz/oscuridad de 16/8 horas (Figura 14).

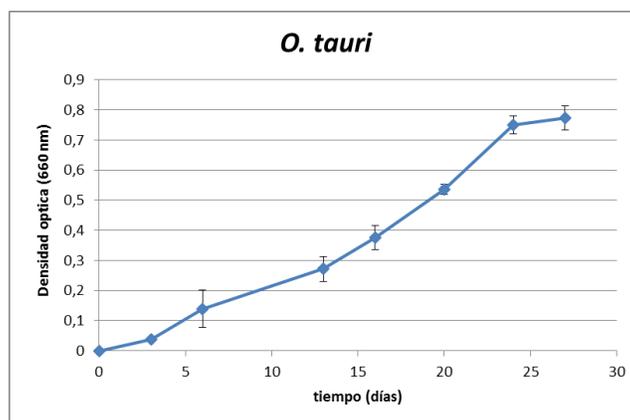


Figura 14: Curva de crecimiento de *Ostreococcus tauri* en las condiciones óptimas de crecimiento

Posteriormente se buscaron las mejores condiciones para lograr una extracción de ADN efectiva. Para tal fin se centrifugaron 50 ml de cultivo saturado de *O. tauri* y se procedió según se detalla en la sección Materiales y Métodos.

También fue necesario poner a punto una técnica de extracción de ARN de calidad suficiente para obtener posteriormente ADN copia (ADNc) de buena calidad y cantidad en *O. tauri*. Para tal fin se utilizó el método de TRIZOL (Invitrogen) o TRIAGENT(Sigma-Aldrich) según se detalla en Materiales y Métodos. Observamos que el factor determinante es la cantidad de cultivo inicial que se utiliza, y para obtener una extracción exitosa en cantidad y calidad, se debe partir de

50ml de cultivo de algas cuya densidad óptica a 600nm sea de aproximadamente 0,4 (fase exponencial de crecimiento).

A partir del ADNc se realizó el clonado de la enzima ramificante completa de *O. tauri* (OsttaSBE – 120 kDa), como así también de los dominios CBM41 (12kDa), CBM48 (12kDa), CBM41 y CBM48 en tándem (CBM41-48 – 37kDa), CBM41 junto al dominio catalítico (48DC – 87,5 kDa) y el dominio catalítico sólo (DC – 73,2 kDa) (Figura 15). Para todos los casos se utilizó el plásmido de expresión pRSFDuet-1 (NOVAGEN) de alto número de copias, que añade a los clonados una etiqueta de histidinas permitiéndonos así reconocer las proteínas expresadas con anticuerpos anti-his (penta-his QIAGEN), como así también purificar la proteína utilizando resina de Ni<sup>2+</sup>-Sefarosa. Todos los clonados fueron corroborados por restricción y secuenciación.

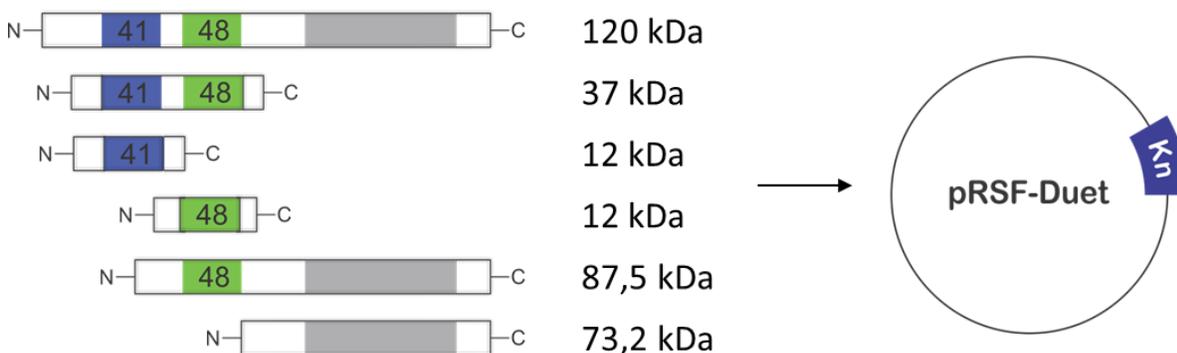


Figura 15: Diagrama de los clonados realizados en pRSF-Duet-1 (Novagen)

Las inducciones de OsttaSBE, 48DC, DC, CBM41, CBM48 y CBM41-48 se realizaron en cepas de expresión *E. coli* BL21 (DE3), utilizando temperaturas de 16°C durante 16 horas obteniéndose las proteínas y dominios por separado en su forma soluble. Posteriormente se realizaron las purificaciones, eluyéndolas en columna de Ni<sup>2+</sup>-Sefarosa con imidazol en concentraciones crecientes, obteniendo fracciones separadas según la concentración utilizada.

Analizando las fracciones purificadas solubles en SDS-PAGE pudimos comprobar que la masa molecular de la enzima ramificante es de 120kDa y que presenta un alto grado de pureza (Figura 16 A). Tanto las proteínas truncadas 48DC como DC solo pudieron obtenerse en forma soluble según se puede observar también en el apartado A de la Figura 16, coincidiendo sus masas moleculares – 87,5 y 73,2 respectivamente. En el caso del tándem CBM41-48, se puede observar nuevamente que la masa es coincidente con la esperada de acuerdo a la cantidad de aminoácidos

en cada caso (Figura 16B). Debido al reducido peso molecular de los CBM, la única manera fehaciente de determinar la identidad de las proteínas fue realizando un ensayo de *western-blot*. En la Figura 16C se puede observar que los CBM41 y CBM48 se condicen con las masas esperadas.

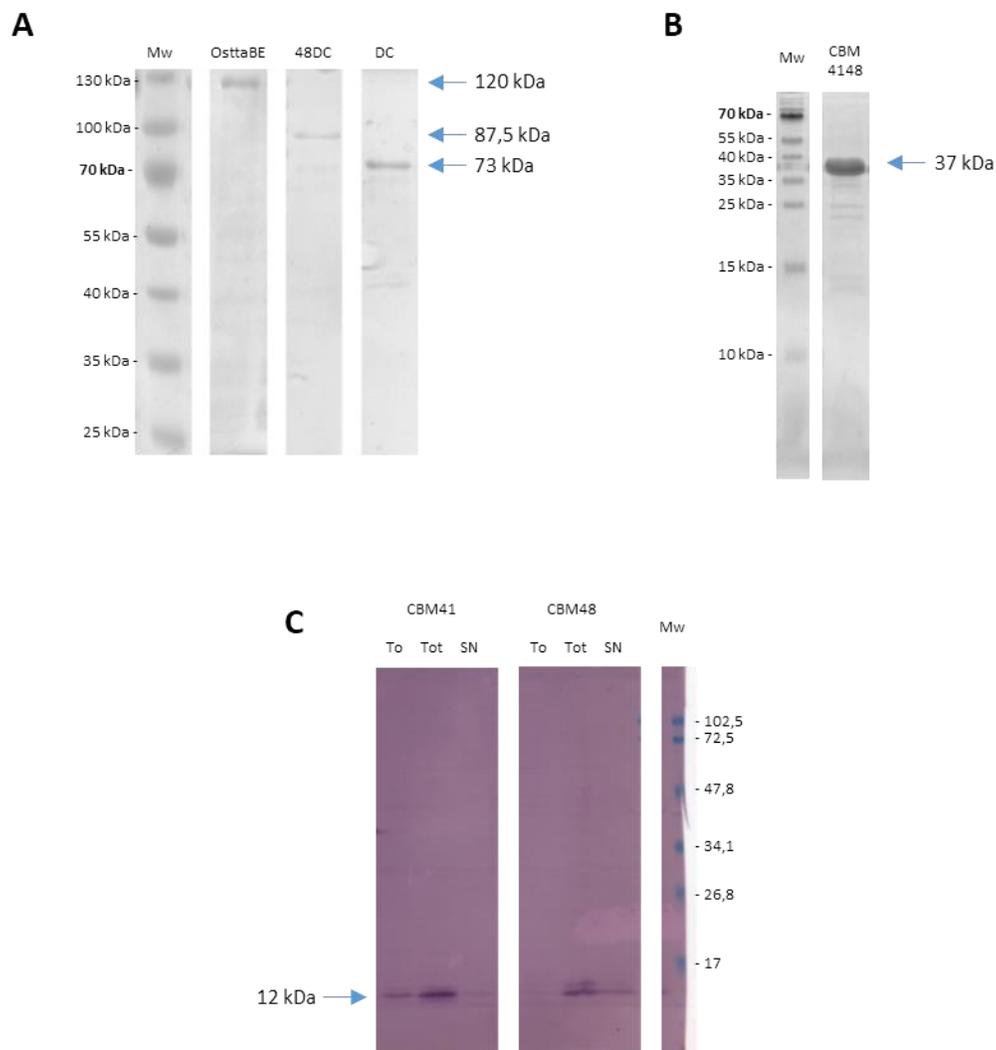


Figura 16 A) SDS-PAGE utilizando marcador de masa molecular (Thermo Scientific), se sembró una alícuota de enzima ramificante proveniente de la purificación de la misma (fracción soluble), como así también se sembraron las fracciones solubles correspondiente a los polipéptidos 48DC y a DC solo. B) SDS-PAGE utilizando marcador de masa molecular (Thermo Scientific), se sembró una alícuota de CBM4148 proveniente de la purificación de la misma (proteína soluble). C) Western-blot realizado con anticuerpos que reconocen poli-histidinas. La primera membrana corresponde al CBM41 de la enzima ramificante, la tercera corresponde al CBM48 de la enzima ramificante y la última a los marcadores de masa molecular. TO – tiempo cero de inducción, Tot – extracto total de inducción, SN – fracción soluble de la inducción.

Tanto las proteínas truncadas (48DC y DC) como también OsttaSBE obtenidas en forma soluble fueron sometidas a ensayos de dicroísmo circular en UV lejano (250–200nm) para determinar si las estructuras secundarias generadas al truncar esta proteína se corresponden con lo esperado de acuerdo a la información disponible (completa, 48DC y DC) y descartar así problemas de plegamiento.

Podemos observar en la Figura 17 que, a medida que quitamos módulos de unión a carbohidratos (que presentan mayoritariamente hojas beta), el pico comprendido entre 205 y 210 nm disminuye en intensidad sugiriendo una disminución de estructura beta. Por otro lado, no se observan espectros típicos de estructuras desnaturalizadas o plegadas al azar, lo que indica que las estructuras obtenidas para 48DC y DC presentarían el plegamiento correcto según los datos teóricos [106] [87].

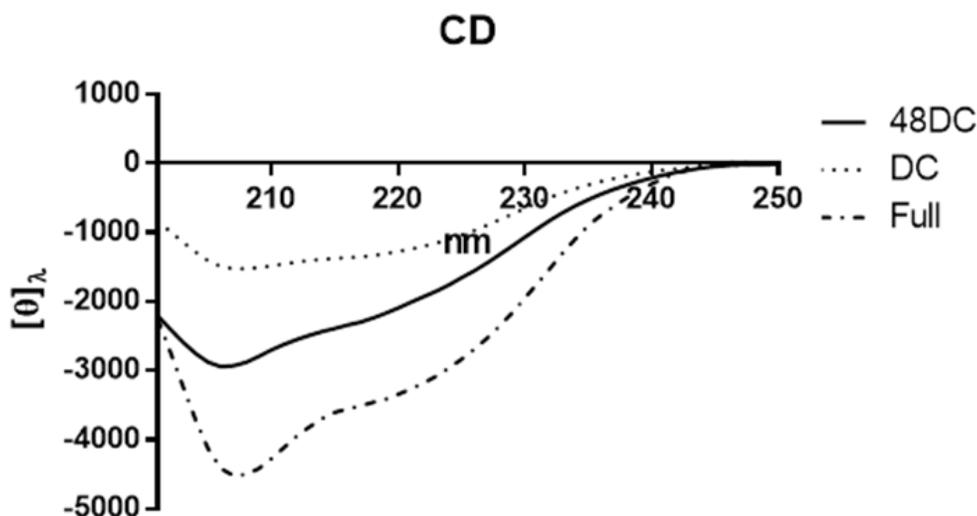
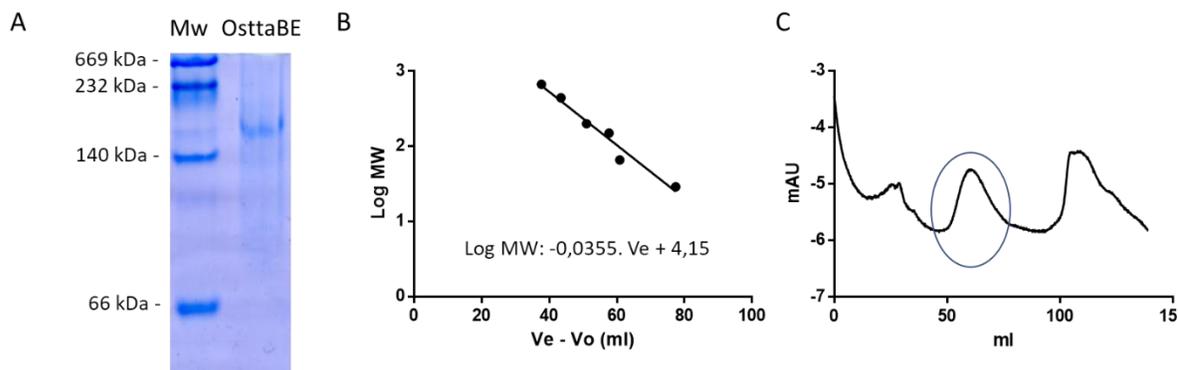


Figura 17: Espectro de dicroísmo circular de las proteínas 48DC, DC y Full (OsttaSBE). Técnica detallada en materiales y métodos.

Para determinar el grado de oligomerización de la proteína, se realizó un gel en condiciones nativas. Como se observa en la Figura 18A, se obtiene una banda definida posicionada entre las bandas del marcador correspondientes a 140 y 232 kDa. Este resultado es ambiguo debido que no se corresponde con monómero ni dímero. Por tal motivo decidimos realizar cromatografía de exclusión molecular, sembrando en la columna Sephadex G-200 un patrón de masa conocida para posteriormente graficar el logaritmo de esta masa en función del volumen en el cual eluye cada

proteína (Figura 18B) y así obtener la ecuación que describe el comportamiento de los datos. Finalmente se sembró la proteína OsttaSBE purificada y utilizando la ecuación previamente obtenida, se determinó que el volumen de elución de nuestra proteína (59,8ml - Figura 18C) se corresponde con una masa de aproximadamente 106 kDa, coincidiendo con la masa esperada para la conformación monomérica.



*Figura 18:* Estudio de oligomerización. A – Gel nativo (PAGE-Nativo) teñido con azul de Coomassie. Mw: Marcador de masa molecular, OsttaSBE: enzima de interés. B – Curva de calibración mediante cromatografía de exclusión molecular de patrón de masa molecular. C – Cromatograma de exclusión molecular de la enzima OsttaSBE. Círculo azul indica pico de OsttaSBE

Tomando en cuenta la predicción basada en datos de secuencia sobre la función de OsttaSBE como una enzima deramificante, en un primer momento decidimos evaluar su actividad propuesta por Sorokina y colaboradores [8]. Nuestros resultados mostraron en diversas condiciones de ensayo, que OsttaSBE no posee la capacidad de escindir ramificaciones de amilosa, amilopectina, almidón o celulosa microcristalina. Teniendo en cuenta que tanto las BE como DBE pertenecen a la familia de las glucósido hidrolasa 13 (GH13) [100] y también considerando que estas proteínas presentan un DC similar a las BE, decidimos ensayar su actividad inversa, la ramificación.

#### 4. Ensayo de actividad ramificante

Una vez expresada y purificada la enzima ramificante de *O. tauri* se comenzó a caracterizar su actividad catalítica. Para esto se adaptó un método espectrofotométrico que se basa en la diferencia de interacción tanto de la amilosa como de la amilopectina frente al reactivo de Lugol [74]. En la Figura 19 se observa que la amilosa absorbe a longitudes de onda mayores, mientras

que la amilopeptina lo hace a longitudes menores. Si tenemos en cuenta que la diferencia entre ambos tipos de moléculas es el grado de ramificación, podríamos esperar que a medida que aumentan las ramificaciones, disminuyan las longitudes de onda de absorción.

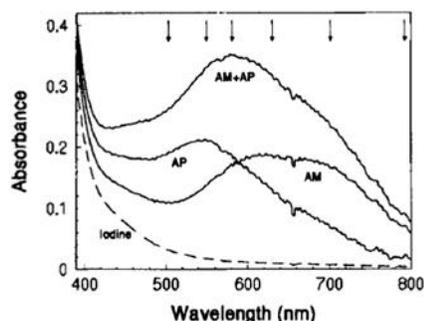


Figura 19: Perfil absorbancia de amilosa, amilopeptina y amilosa+amilopeptina (Tomado de [3])

Decidimos determinar a qué longitud de onda se observa una variación lineal de la absorbancia en función del tiempo en que la enzima catalizó las reacciones de ramificación. En la Figura 20A se observa que entre los 480 y 550 nanómetros (nm) se presenta un máximo del delta de absorción al graficar la diferencia entre las absorbancias inicial y final versus longitud de onda.

En este máximo de  $\Delta Abs$  se aprecia que a medida que aumenta el tiempo de reacción, también aumenta la diferencia de absorbancia. Por esta razón tomamos los  $\Delta Abs$  a 480, 500, 520 y 550 nm y los graficamos en función del tiempo de reacción (Figura 20B). Se observa que, tanto a 500 nm como a 520 nm, el comportamiento es lineal en función del tiempo y cualquiera de estas longitudes de onda son útiles para nuestro propósito. Elegimos realizar todas las medidas a 520 nm.

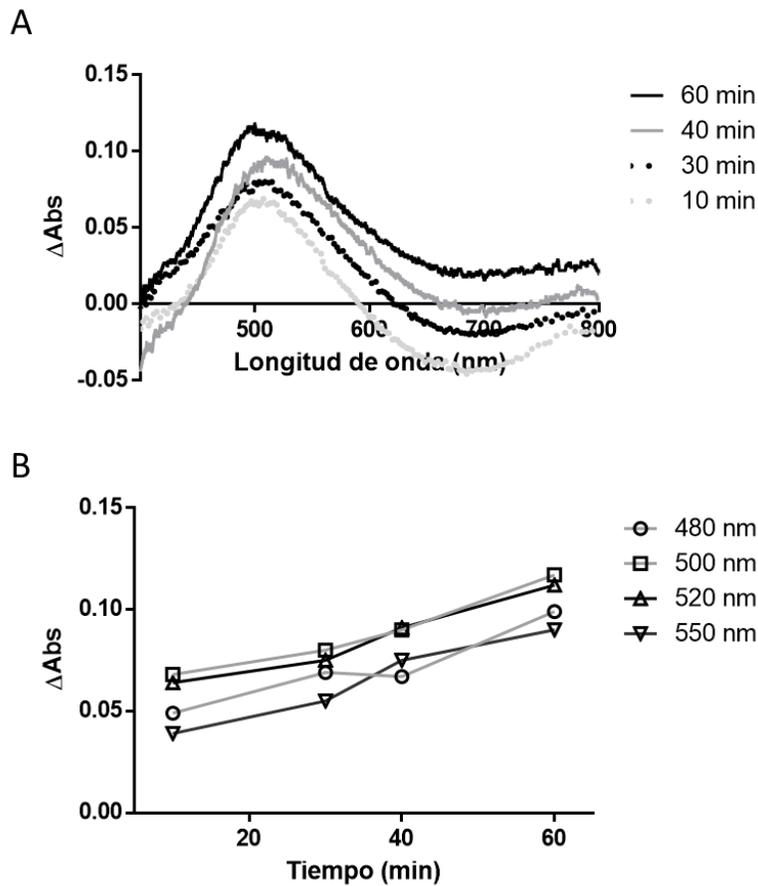


Figura 20A- Espectro de absorción inicial menos espectro de absorción a distintos tiempos de reacción para la enzima ramificante de *O. tauri*. B- Variación de absorbancia en función del tiempo de reacción a distintas longitudes de onda para la enzima ramificante de *O. tauri*.

Teniendo un método de ensayo de actividad puesto a punto, se decidió determinar las condiciones óptimas de almacenamiento de la proteína recombinante. Para esto se guardaron distintas alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (con y sin agregado de glicerol 10%) y a  $-80^{\circ}\text{C}$  (con y sin agregado de glicerol 10%). Se realizaron ensayos de actividad a distintos tiempos de almacenamiento y se graficó el  $\Delta Abs$  en función de los días transcurridos.

Los resultados observados en la Figura 21 indican que es necesario agregar glicerol al momento de almacenar la enzima para que ésta mantenga su actividad catalítica. Se decidió almacenar la proteína a  $-20^{\circ}\text{C}$  por cuestiones de practicidad.

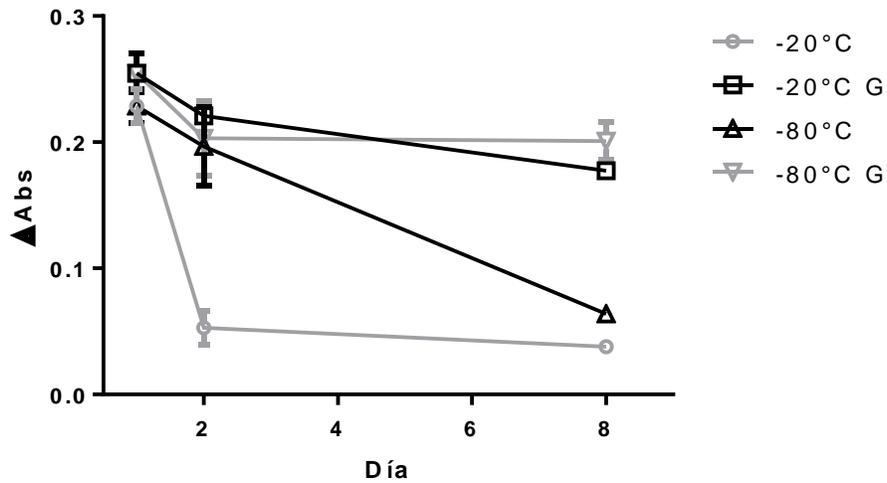


Figura 21: Variación de absorbancia en función de los días de almacenamiento en distintas condiciones para la enzima ramificante de *O. tauri*.

Se realizaron ensayos de actividad de la enzima completa (OsttaSBE), utilizando distintas concentraciones de sustrato (amilopeptina), con la finalidad de obtener los parámetros que caracterizan la actividad enzimática de la reacción catalizada (Figura 22).

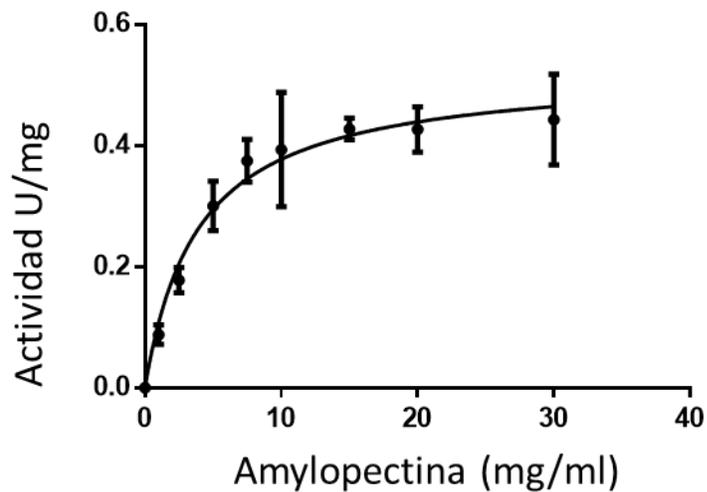


Figura 22: Curva de saturación de amilopeptina para OsttaSBE. Actividad en U/mg

Mediante el ajuste hiperbólico de Michaelis-Menten ( $n_H$  1,1), obtuvimos los parámetros cinéticos de la enzima, siendo su  $V_{max}$ : 0,53 U/mg y su  $K_m$ : 3,9 mg/ml. Estos valores fueron cotejados con los reportados para enzimas ramificantes de otros organismos, observando que los valores obtenidos se encuentran en el mismo orden de magnitud que los reportados para otras enzimas como por ejemplo las enzimas ramificante I y II de arroz (que presentan valores de  $K_m$  de 3,0 y 2,7 mg/ml respectivamente [107]), mientras que por ejemplo la enzima ramificante de *Synechocystis* sp. presenta una  $V_{max}$  de 1,0 U/mg [108] (BRENDA - <http://www.brenda-enzymes.info>).

Las construcciones 48DC y DC (Figura 24) fueron ensayadas con la finalidad de medir su actividad catalítica, pero las mismas no presentaron actividad detectable. Es importante recordar los resultados presentados en la Figura 17 donde pudimos observar que el acortamiento del polipéptido no parece influir en el plegamiento global de la estructura proteica remanente. Estos dos hechos tomados en conjunto sugieren que el CBM de la familia 41 estaría cumpliendo un rol primordial en la función ramificante de OsttaSBE.

En base a los resultados obtenidos en la Figura 9D, decidimos comprobar la importancia de los residuos nucleofílicos y dadores de protones en estudios *in vitro*. Por esta razón realizamos mutagénesis sitio dirigida de los residuos E684 y D647 mediante el kit comercial Quik Change II Site-Directed Mutagenesis (Agilent). En ambos casos se sustituyeron los mismos por residuos de alanina con la finalidad de no introducir residuos voluminosos en el sitio activo que pudieran afectarlo estéricamente.

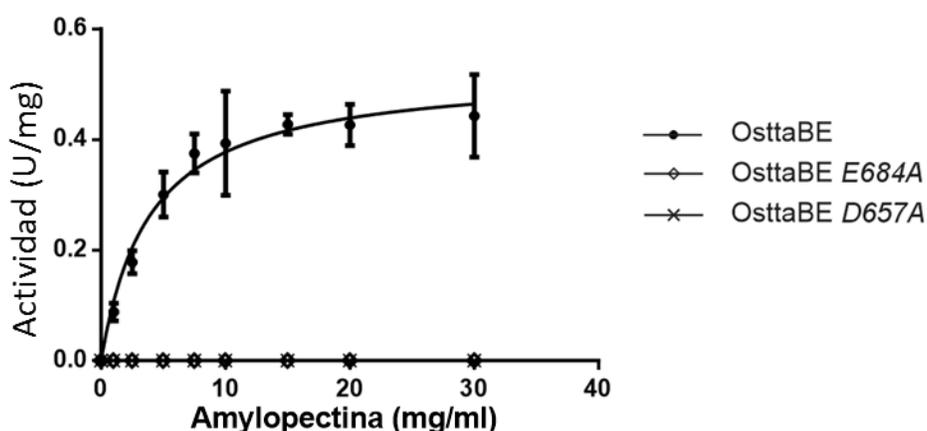


Figura 23: Gráfica de saturación de amilopectina para OsttaSBE (círculos negros), OsttaSBE E684A (triángulos), OsttaSBE D657A (cruces) en presencia de concentraciones variables de amilopectina (de 0 a 30 mg/ml).

En ambos casos se pudieron obtener proteínas en su estado nativo con buenos rendimientos (concentraciones proteicas entre 0,8 y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de igual manera que para la enzima sin modificar. Estas proteínas se sometieron a ensayos de actividad, donde se utilizó amilopectina como sustrato (Figura 23).

La ausencia de actividad se observó tanto para las isoformas con mutaciones en cada uno de los aminoácidos por separado, como también en la especie con ambos residuos mutados (doble mutante). Estos resultados concuerdan con lo esperado por el modelo molecular y refuerzan su validez, al demostrar empíricamente la absoluta necesidad de los residuos E684 y D647 para llevar a cabo la catálisis enzimática por parte de esta enzima ramificante.

## 5. Ensayos de unión a polisacáridos

Estudiamos la afinidad a distintos polisacáridos de los módulos de unión a carbohidratos (CBM) como así también el dominio catalítico solo, mediante ensayos de unión por co-sedimentación. Los distintos polipéptidos se encuentran resumidos en la Figura 24.

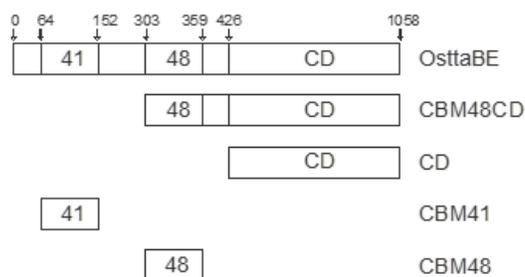


Figura 24: Construcciones clonadas de pRSF-Duet

Para ello, las proteínas desaladas fueron incubadas con el sustrato de interés en exceso (amilosa, amilopectina y almidón, todos al 5%p/v) por una hora a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó, y previos lavados, fueron sembradas en geles de poliacrilamida al 18% p/v tanto la fracción soluble, donde debería estar presente la proteína que no se unió al polisacárido, como la fracción insoluble, donde deberíamos encontrar la proteína unida al polisacárido y donde también se puede encontrar proteína desnaturalizada (se realizan controles para no informar errores por exceso). Posteriormente a la tinción por Azul de Coomassie, se realizó

una densitometría de las bandas, para poder graficar de manera más visible los resultados. En la Figura 25 se muestra un ejemplo de las corridas electroforéticas obtenidas.

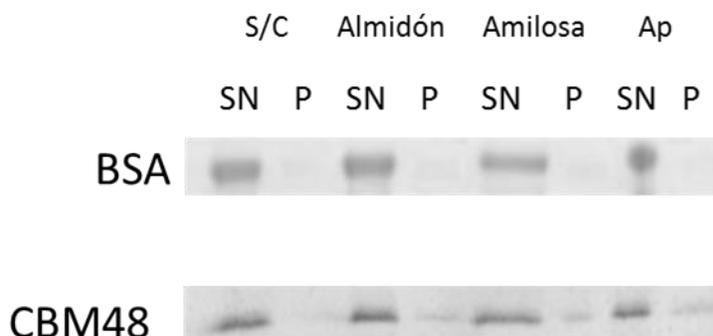


Figura 25: Ejemplo de gel de poliacrilamida donde se corrieron tanto las fracciones solubles (SN) como las fracciones insolubles (P) de los ensayos de cosedimentación para la proteína albumina sérica bovina (BSA – Control negativo de binding) y CBM48, incubadas ambas proteínas de la siguiente manera: sin carbohidrato; con almidón; con amilosa y con amilopectina (Ap).

Para estos ensayos se utilizaron concentraciones crecientes de los distintos polisacáridos (amilosa, amilopectina y almidón) que nos permitieron obtener las isotermas de adsorción para cada uno de ellos. En la Figura 26 se muestran los datos conseguidos para la enzima completa, provenientes de graficar la cantidad de proteína unida en función de la concentración de proteína libre.

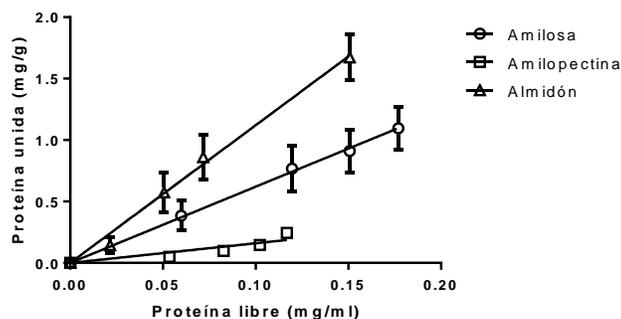


Figura 26: Isotermas de adsorción de la enzima ramificante

A partir de las isotermas de cada una de las distintas construcciones se pudieron obtener las constantes de adsorción que caracterizan la unión a cada uno de los polisacáridos. Estos resultados se encuentran condensados en la tabla 1.

Tabla 6: Valores de  $K_{ad}$  para la adsorción a polisacáridos por parte de los constructos provenientes de Ot01g03030

Proteína	$K_{ad}$ (ml . g <sup>-1</sup> almidón)	$K_{ad}$ (ml . g <sup>-1</sup> amilosa)	$K_{ad}$ (ml . g <sup>-1</sup> amilopectina)
OsttaSBE	10,9 ± 0,8	6,0 ± 0,5	1,6 ± 0,2
CBM48CD	4,6 ± 0,5	8,1 ± 0,9	3,1 ± 0,4
CD	1,3 ± 0,2	9,2 ± 1,0	n.d.
CBM41	2,0 ± 0,1	9,9 ± 1,4	n.d.
CBM48	12,6 ± 1,4	8,5 ± 1,1	4,2 ± 0,6

Ref: n.d.: no se detectó unión

Los datos mostrados en la Tabla 6 dan cuenta de la alta afinidad de OsttaSBE por el almidón (10,9 ± 0,8 ml.g<sup>-1</sup>), mientras que si bien presenta afinidad por amilosa y amilopectina (por separado), lo hace en menor grado. Por otro lado, el dominio catalítico unido al CBM 48 (CBM48CD) presenta mayor afinidad por amilosa que por almidón. Por último, es llamativo el comportamiento tanto del dominio catalítico aislado como del CBM 41. En ninguno de los dos casos se pudo detectar unión a amilopectina, mientras que el CBM 48 aislado sí se une a este polisacárido que actúa como sustrato de la enzima. El hecho que el CBM41 no presente afinidad por el sustrato podría indicar que este CBM cumple funciones de direccionamiento hacia el dominio catalítico, influyendo sobre la cinética enzimática y no sobre la adsorción a amilopectina como ya ha sido reportado para otros CBM [109].

Parece contradictorio que la enzima completa presente menor afinidad hacia su sustrato fisiológico, la amilopectina, que a amilosa o almidón. Sin embargo, existen informes previos que mencionan que la unión improductiva a sustratos suele ser uno de los pasos limitantes en las reacciones enzimáticas [110]. Estudios realizados por Walker y colaboradores [111], donde se analizó el comportamiento de la fusión de distintos CBM a un dominio multifuncional que hidroliza diversos polisacáridos (GH5), demostraron que la mayor eficiencia catalítica se daba en aquellas construcciones que presentaban afinidad moderada al sustrato utilizado. Este comportamiento

reportado para la familia GH5 concuerda con lo observado para la enzima ramificante, donde la afinidad por el sustrato (amilopectina) es moderada.

### C. Discusión:

Con el objeto de profundizar el conocimiento en el metabolismo de almidón de *O. tauri*, nos propusimos caracterizar la función de la enzima codificada por el gen Ot01g03030. Mediante el análisis de datos provenientes de experimentos de *microarray* [112] pudimos identificar un perfil de expresión de esta enzima que no coincidía con un perfil típico de enzima desramificante de degradación de almidón, como se la había clasificado previamente [8]. Por este motivo decidimos hacer un análisis bioinformático más detallado de dicho polipéptido mediante el cual detectamos que está formado por tres módulos: un CBM41, un CBM48 y un DC. Hasta el momento de estos análisis, los CBM de la familia 41 solo se habían identificado en enzimas desramificantes [101], por lo que nuestro trabajo es el primero en establecer esta configuración modular particular [44] y concluyendo que esta podría ser la causa por la cual se clasificó a Ot01g03030 previamente como enzima desramificante [8].

Mediante nuestros ensayos bioquímicos pudimos determinar fehacientemente la verdadera reacción enzimática llevada a cabo por esta proteína, siendo esta la ramificación del almidón (en contraposición a la desramificación) y denominándola entonces OsttaSBE (del inglés, *Starch Branching Enzyme* de *O. tauri*). Observamos que sus parámetros enzimáticos son afines con los de enzimas similares previamente estudiadas en otros organismos [107] [108] descartando así cualquier hipótesis que señale a esta actividad ramificante como residual. Es importante mencionar que la enzima no tendría capacidad de generar dímeros u oligómeros de mayor complejidad, siendo todas las actividades obtenidas correspondientes al monómero.

Cuando se analiza el dominio catalítico, se observa un dominio Glucósido Hidrolasa de la familia 13 (GH13) presente tanto en DBE como SBE [100]. El mecanismo que actúa en estas enzimas es el mismo (doble desplazamiento ácido base) variando fundamentalmente en que moléculas son tomadas como sustrato de cada uno de los pasos, siendo de esta manera difícil detectar aquellos residuos que hacen que tome como sustrato (ROH según la Figura 27) una molécula de H<sub>2</sub>O, que podría generar la escisión de un enlace  $\alpha$ -1,6, o use como sustrato otro residuo glicosídico para formar un nuevo enlace  $\alpha$ -1,6 [5]

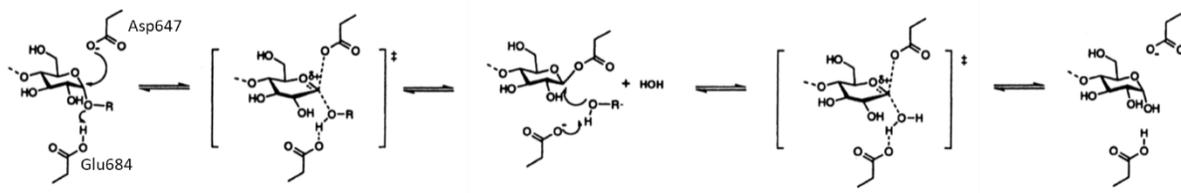


Figura 27: Pasos catalíticos del doble desplazamiento ácido base (Tomado de [5] con modificaciones). El dador de protones (Glu684), protona el oxígeno glicosídico, y el nucleófilo (Asp647) ataca el carbono 1 llevando a la formación del primer estado de transición. La base catalítica (Glu684) promueve el ataque de la molécula entrante ROH, pudiendo ser H<sub>2</sub>O en el caso de las hidrolasas u otro azúcar en el caso de las transglucosidasas, formándose así el segundo estado de transición, para finalmente dar lugar al producto de hidrólisis o transglucosilación. Si bien el mecanismo es el mismo para hidrolasas y transglucosidasas, en el gráfico se señalan los aminoácidos correspondientes a la enzima ramificante, usando la numeración de OsttaSBE.

A partir de estudios de unión a sustratos de OsttaSBE, como así también de versiones truncadas de este polipéptido pudimos determinar la afinidad por los diversos polisacáridos, observándose un comportamiento particular hacia la amilopectina. Si bien este polisacárido fue el único de los ensayados que sirvió como sustrato real de la enzima ramificante, utilizándolo como aceptor de nuevas ramificaciones en la catálisis enzimática *in vitro*, los ensayos de afinidad demuestran que sería al que menos se une. Encontramos la explicación a este fenómeno en el hecho que mayor afinidad no necesariamente es sinónimo de mayor actividad enzimática, de hecho uno de los pasos limitantes en las reacciones catalizadas enzimáticamente es la unión al sustrato y ha sido demostrado que la unión no productiva a sus propios sustratos suele ser uno de los factores que limitan la eficiencia catalítica [110]. Se ha informado mediante la generación de quimeras GH5 (que hidroliza diversos polisacáridos) con CBM de 18 familias diferentes que la construcción con mayor eficiencia catalítica es aquella que presenta afinidades moderadas hacia el sustrato. Es probablemente por esta misma razón que no hemos observado actividad enzimática cuando se utilizó amilosa o almidón, presentando ambos mayor afinidad en la enzima entera.

Finalmente generamos mutaciones que llevaron a la inactivación total de la enzima. Estos datos demuestran que la predicción bioinformática de la estructura de la enzima es certera y que nos permitieron identificar los residuos de mayor importancia. Por otra parte, resultó llamativa la total falta de actividad enzimática cuando el CBM41 es removido de la secuencia, sugiriendo que este CBM sería esencial para la correcta actividad enzimática. Considerando que el CBM41 no presentó unión a amilopectina, nuestro resultado refuerza la hipótesis de una función regulatoria directa de algunos CBM sobre la cinética enzimática [109].

## **CAPITULO 2**

# **Caracterización de plantas sobreexpresantes de OsttaSBE**

## VIII. CAPITULO 2 - Caracterización de plantas sobreexpresantes de OsttaSBE

### A. Introducción:

El almidón y el glucógeno representan la forma principal en la cual se almacena la glucosa, mediante la formación de enlaces  $\alpha$ -1,4 que darán lugar a las cadenas lineales, con ramificaciones  $\alpha$ -1,6 [113] [13]. Como resultado del alto grado de ramificaciones que se generan en el glucógeno, estos agregados no pueden crecer más allá de los 40 nm de diámetro debido a que la estructura altamente ramificada (y poco ordenada) impide la acción de las enzimas de síntesis [114]. La amilopectina, el componente mayoritario del almidón, se ordena en gránulos insolubles semi-cristalinos debido a la distribución asimétrica de las ramificaciones  $\alpha$ -1,6, que le permiten crecer de manera tal que pueden superar el tamaño del glucógeno.

*Ostreococcus tauri*, a pesar del pequeño tamaño de su genoma en comparación con otros organismos fotosintéticos como *Arabidopsis thaliana*, presenta una complejidad elevada en cuanto a los genes responsables del metabolismo de almidón [8]. Dentro de sus células de aproximadamente 0,8  $\mu$ m de diámetro, presenta una sola mitocondria y un solo cloroplasto en donde se encuentra el único gránulo de almidón. Este gránulo presenta la particularidad de dividirse sincrónicamente con las células al finalizar la fase luminosa [2]. Por cuestiones relacionadas al tamaño celular, los gránulos son mucho más pequeños que en otros organismos con prácticamente el mismo conjunto de enzimas (ej.: *A. thaliana*), lo que lleva a plantear el interrogante sobre los mecanismos que determinan la estructura final del gránulo de almidón en algas.

Habiendo demostrado en el primer capítulo que el polipéptido codificado por Ot01g03030 es una enzima ramificante (OsttaSBE) de características únicas, como lo es la presencia del CBM41 normalmente encontrado en enzimas desramificantes [44], entendemos que es importante dilucidar el efecto y la función que esta enzima tiene en la síntesis de amilopectina como así también conocer si cumple alguna función en la división de los gránulos. Por esta razón decidimos generar plantas de *Arabidopsis* transgénicas, sobreexpresantes de la SBE de *O. tauri* (plantas OEOsttaSBE), y realizar una caracterización a nivel molecular y fisiológico de los efectos generados.

## B. Resultados

### 1. Plantas sobreexpresantes de la enzima ramificante de *Ostreococcus tauri*.

Con la finalidad de estudiar el fenotipo que genera la sobreexpresión de la enzima proveniente del alga, se decidió transformar *Arabidopsis thaliana* con una construcción que presenta el gen Ot01g03030 completo en el plásmido binario pCHF3 con doble promotor 35S (para lograr expresión constitutiva) y que le confiere a la planta resistencia a kanamicina.

Se realizó la transformación utilizando el protocolo estándar de *floral dip*, infiltrando las inflorescencias con *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (detallado en Materiales y Métodos) portando la construcción de interés [69]. Posteriormente a la transformación, se crecieron las plantas en placas de Petri con medio Murashige & Skoog y kanamicina (50 µg/ml). Las semillas que superaron la selección con el antibiótico se pasaron a tierra a los 14 días, se crecieron hasta la finalización de su desarrollo reproductivo y se obtuvieron sus semillas (F1). Se realizó una nueva ronda de selección con este conjunto de semillas, y a los 20 días de crecimiento se tomaron hojas para realizar extracciones de ADN y ARN con la finalidad de corroborar la presencia del transgén.

Analizamos ARN mensajero extraído para cerciorarnos de la total ausencia de material genómico en el mismo. Para tal fin realizamos una reacción de PCR a punto final utilizando oligonucleótidos específicos para el gen que codifica actina, con la particularidad que amplifica entre dos exones, generando dos bandas de diferente tamaño según haya contaminación con ADN o no.

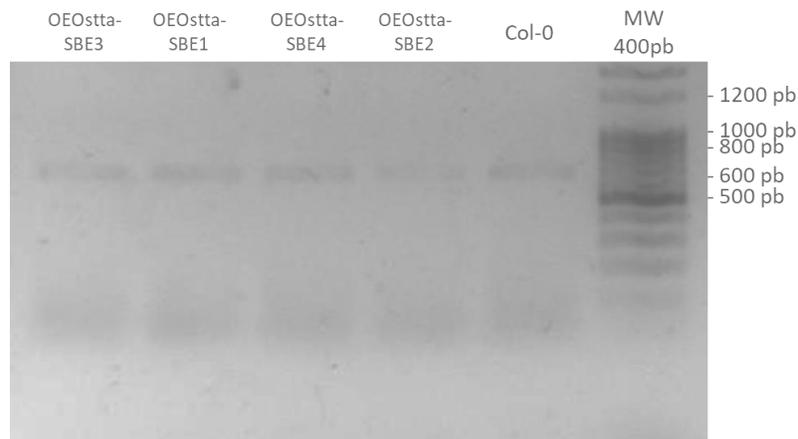


Figura 28: Control de ausencia de material genómico mediante PCR y posterior electroforesis en gel de agarosa

En la Figura 28 podemos observar que para todas las muestras analizadas (mutantes y salvajes) el producto observado presenta un tamaño entre 600 – 700 pb (648 pb es el tamaño esperado), y no se observa producto de aproximadamente 1.200 pb (1.168 pb), que indicaría la contaminación con material genómico.

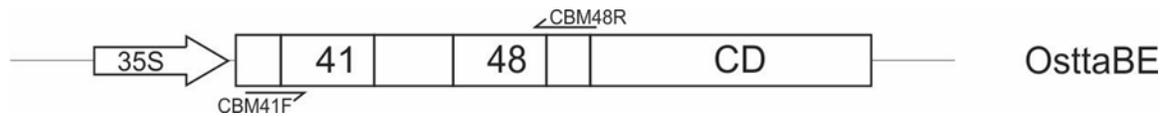


Figura 29: Diseño PCR sobre genómico

A continuación, se realizó PCR a punto final con la combinación de cebadores que se detalla en la Figura 29, sobre el ARN mensajero con la finalidad de analizar la presencia del transgén en la misma. Se utilizaron cebadores que amplifican 1.000 pb del constructo transgénico (Ot01g03030 no presenta intrones).

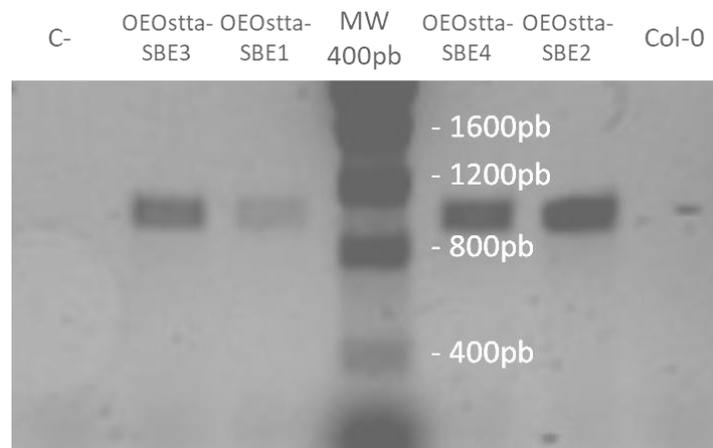


Figura 30: Producto de amplificación de transgén, resuelto por electroforesis en agarosa

Como puede observarse en la Figura 30, la presencia del transgén fue detectada en las líneas transformadas y no así en la línea control. Posteriormente a la identificación de las plantas sobreexpresantes de OsttaSBE, decidimos evaluar los niveles de expresión del mismo mediante qPCR (PCR en tiempo real). En las líneas transformadas se detectaron niveles de expresión variables respecto al gen de la  $\beta$ -actina (AT3G18780) (Figura 31) y en las líneas salvajes, total ausencia del transcripto.

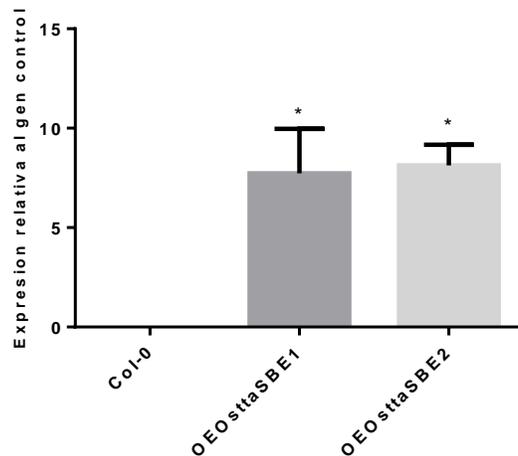


Figura 31: Niveles de expresión del transgen OsttaSBE. Los niveles de transcripto fueron realizados mediante qPCR (Real Time PCR). Los resultados son informados mediante la técnica del  $\Delta Ct$  en función del control interno  $\beta$ -actina. Promedio de 5 repeticiones. Las medidas fueron determinadas en hojas de líneas salvajes (negro), OEOSTtaSBE1 (gris claro) y OEOSTtaSBE2 (gris oscuro). Las diferencias significativas se señalan con (\*) cuando  $p < 0,05$ .

Estos resultados también demuestran la alta especificidad del juego de oligonucleótidos por el transcripto perteneciente a la enzima ramificante de *O. tauri*, que no permiten la detección de las enzimas ramificantes endógenas de *A. thaliana*. Nos propusimos caracterizar fenotípicamente estas dos líneas que presentaban niveles similares de expresión del transgén, con la finalidad de determinar la participación de esta proteína en el metabolismo del almidón.

## 2. Determinación del contenido de almidón en tejido fotosintético

Se realizó la tinción de las rosetas de *A. thaliana* mediante el método basado en la afinidad del reactivo de Lugol por la amilosa y la amilopectina como se detalla en Materiales y Métodos. En la Figura 33 se muestran los resultados obtenidos, donde preliminarmente no se observan diferencias significativas en el contenido de almidón entre las plantas salvajes y las portadoras del transgén. Por esta razón se decidió realizar una densitometría de las imágenes de rosetas para lograr un análisis cuantitativo.



Figura 33: Tinción con Lugol de plantas Col-0 (Wt), línea sobreexpresante 1 de la enzima ramificante (AtBE-1) y línea sobreexpresante 2 de la enzima ramificante (AtBE-2).

Tras tomar cinco fotos de rosetas para cada una de las líneas y convertir la información de color a escala de grises, se analizó el histograma de intensidad de blanco de al menos siete secciones de 900 píxeles de área cada una. La Figura 32 resume los datos obtenidos de la densitometría, donde se pueden observar diferencias significativas en las intensidades, siendo la escala de 0 (negro) a 255 (blanco), entendiéndose así que 255 indica ausencia de almidón, y 0 presencia del mismo.

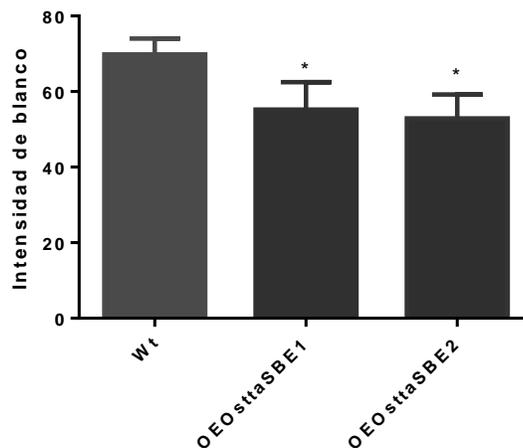


Figura 32: Análisis de histograma de escala de grises de las rosetas analizadas. Intensidad de blanco toma el valor 0 para el color negro y 255 para el blanco.

Para confirmar estos resultados hicimos determinaciones enzimáticas del contenido de almidón al final del período de luz. Para ello se extraen los gránulos y se someten a degradación con amilasa y glucosidasa comerciales según detallado en Materiales y Métodos, dosando finalmente

unidades de glucosa liberadas. La gráfica de la Figura 34 muestra la diferencia en el contenido total de almidón, expresado en función de la cantidad de glucosa liberada. En ambas líneas se observan diferencias significativas con respecto a las líneas salvajes.

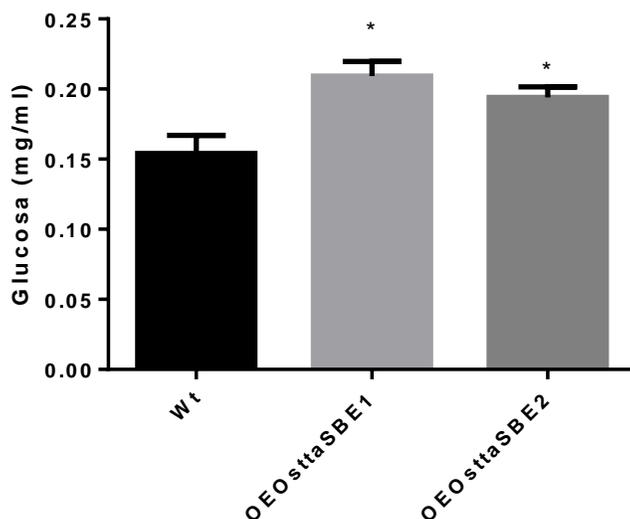


Figura 34: Determinación enzimática del contenido de almidón de las líneas Col-0 (Wt), AtBE-1 (1) y AtBE-2 (2)

Estos resultados sugieren que las plantas analizadas presentan mayor contenido de almidón al final del período diurno. Los resultados observados podrían deberse a una disminución en la capacidad de degradar almidón por parte de las células del mesófilo, a un aumento general de los niveles de síntesis de este polisacárido o a una mayor facilidad de degradación o acceso de las enzimas amilasa y glucosidasa por alteraciones en las ramificaciones del almidón presente en las plantas transgénicas respecto a las salvajes.

Para continuar con la caracterización, decidimos ahondar sobre las propiedades de los gránulos de almidón. Primero analizamos la degradabilidad del almidón extraído de las plantas tanto salvajes como sobreexpresantes frente al agregado de enzimas exógenas capaces de degradar almidón como las alfa amilasas (ROCHE – Catálogo: 10102814001). Observamos que ambas líneas OEOsttaSBE presentaron una mayor degradabilidad del almidón. El ensayo se realizó a tiempo final de 36 horas, detectando que la totalidad del contenido de almidón de ambas líneas sobreexpresantes estaba degradado (ausencia de turbidez Figura 35 B), mientras que el almidón proveniente de las líneas salvajes no pudo ser degradado en las mismas condiciones y cantidades. La

Figura 35A muestra la turbidez presentada por las líneas salvajes a las 36 horas en comparación con la muestra totalmente translúcida de las líneas sobreexpresantes.

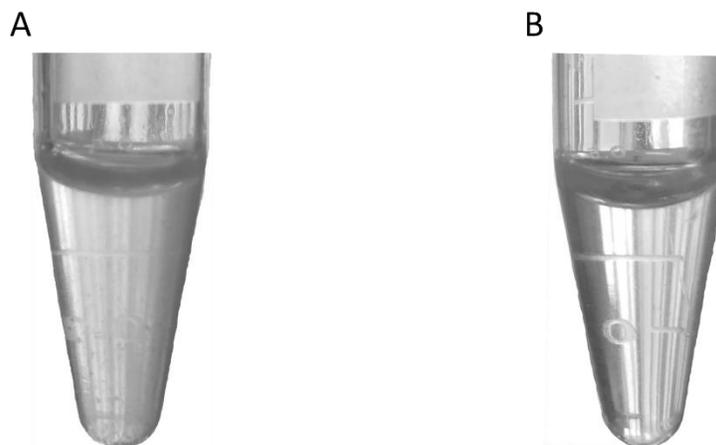


Figura 35: Turbidez remanente de almidón extraído de líneas a) Col-0, b)- Sobreexpresante de enzima ramificante (*OEOsttaSBE1* y *OEOsttaSBE2*)

Por último, obtuvimos preparaciones de los gránulos de todas las líneas en estudio para ser observados por microscopía electrónica de barrido. Las muestras tanto de las plantas salvajes como de las líneas sobreexpresantes (*OEOsttaSBE1* y *OEOsttaSBE2*) fueron resueltas mediante el uso de aumentos entre 10.000X y 40.000X. La Figura 36 resume las características observadas en las diversas imágenes tomadas para cada una de las líneas.

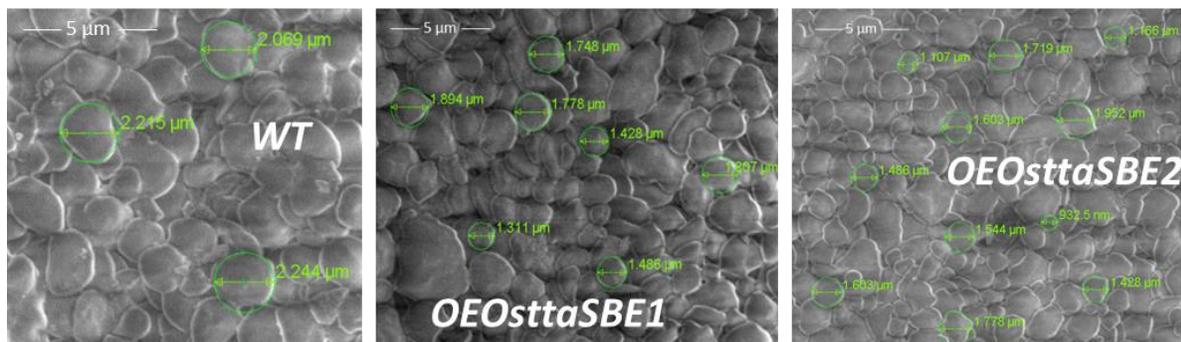
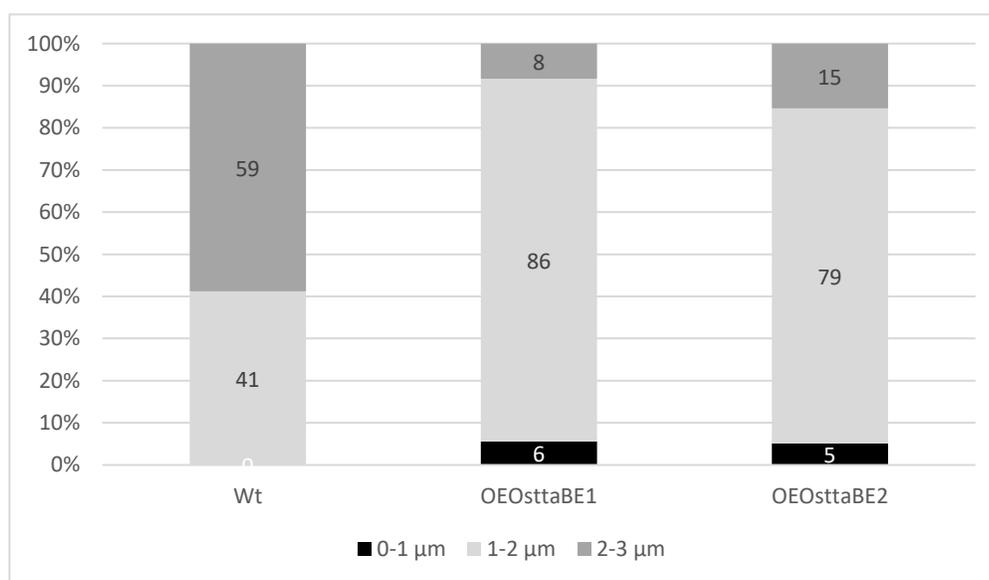


Figura 36: Micrografía electrónica de barrido de gránulos de almidón extraídos del mesófilo de *Arabidopsis thaliana*. Cada micrografía presenta su respectiva regla micrométrica. WT: *Wild type* (línea salvaje). *OEOsttaSBE*: Línea sobreexpresante de la enzima ramificante de *Ostreococcus tauri* 1 y 2.

Del análisis de las imágenes podemos inferir que los gránulos de las plantas OEOsttaSBE son de menor tamaño. Utilizando las diversas micrografías tomadas para cada línea, se realizaron medidas del diámetro de los gránulos y, para comparar diferencias, las imágenes fueron evaluadas creando un histograma de frecuencias a partir del rango de distribución de tamaños de los gránulos calculando también el porcentaje de cada una de las categorías. Estos análisis nos permiten confirmar la disminución en el tamaño de gránulos en las líneas transgénicas. En la Figura 37 podemos observar que la fracción de gránulos de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro se ve enriquecida en las líneas OEOsttaSBE, en detrimento de la fracción de gránulos entre 2 y 3  $\mu\text{m}$ . También se observan gránulos menores a 1  $\mu\text{m}$  que en las líneas salvajes no fueron detectados.



*Figura 37:* Distribución de tamaños de gránulos en líneas sobreexpresantes y salvaje. Datos agrupados según diámetro de los gránulos. Negro: de 0 a 1  $\mu\text{m}$ , gris claro de 1 a 2  $\mu\text{m}$  y gris oscuro de 2 a 3  $\mu\text{m}$ . Los valores se expresan en porcentaje respecto al total de los gránulos medidos.

Decidimos calcular también, el parámetro de circularidad que nos permite cuantificar la semejanza de los gránulos de reserva a una estructura circular. El parámetro de circularidad propuesto por Ingkasuwana y colaboradores [115], de unidades adimensionales, nos permite comparar las distintas líneas entre sí, siendo los valores cercanos a 1 indicio de gránulos circulares y distinto a 1 de apariencia oblonga.

$$Circularidad = \frac{4\pi \cdot Area}{perímetro^2}$$

No se encontraron diferencias significativas entre las líneas estudiadas ( $0,900 \pm 0,048$  para Salvaje,  $0,919 \pm 0,060$  para OEOSTtaSBE1 y  $0,943 \pm 0,029$  para OEOSTtaSBE2).

Estudios previos realizados en gránulos de almidón por Jenkins y Donald [116], informaron que un aumento en la cantidad de polisacáridos no ramificados genera un incremento en el tamaño de la región cristalina del clúster formado por amilosa y amilopectina, resultando afectada la morfología del gránulo transitorio de almidón ya sea por el contenido total de polisacárido como por la relación amilosa/amilopectina.

En el caso de las plantas OEOSTtaSBE, los resultados parecen ajustarse correctamente a la hipótesis propuesta por Jenkins y Donald, donde la fracción no ramificada (amilosa) interrumpiría el empaquetamiento de la amilopectina y, por lo tanto, un aumento en las ramificaciones ayudaría a compactar la estructura del gránulo.

Estos resultados nos permiten reforzar los resultados de la Figura 35, donde vimos que los gránulos de las plantas transgénicas presentan facilidad de degradación por parte de las amilasas. Teniendo en cuenta que la relación superficie/volumen disminuye a medida que aumenta el tamaño, en este caso de los gránulos de las plantas transgénicas, al presentar un menor tamaño, es mayor la superficie disponible para la acción de las amilasas y en consecuencia es más fácilmente degradado.

### 3. Respuesta transcripcional de los genes involucrados en la síntesis y degradación del almidón.

Se llevaron a cabo estudios cuantitativos de la expresión de genes mediante la técnica qPCR (PCR en tiempo real). Se estudiaron los transcriptos que dan lugar a proteínas involucradas en el metabolismo de almidón, en hojas cosechadas sobre el final de la fase lumínica (en un ciclo de 16hs luz: 8hs oscuridad) de acuerdo a lo detallado en la sección de Materiales y Métodos, utilizando como control interno el gen de la  $\beta$ -actina (AT3G18780). Las concentraciones relativas de transcripto de cada uno de los genes y por lo tanto sus niveles de expresión, fueron calculadas mediante la

diferencia en el Ct del gen en estudio con respecto al control interno ( $\beta$ -act, ver Materiales y Métodos), determinando de esta manera el  $\Delta$ Ct. Para evaluar si existen diferencias significativas en la expresión de los distintos genes según las líneas estudiadas, se realizaron ensayos estadísticos de ANOVA comparando las distintas muestras mediante el test no paramétrico de Dunnett, fijando la probabilidad de error de tipo I en 0,05.

Para entender como se ve afectada la expresión génica de las enzimas responsables de la síntesis de almidón se cuantificó la expresión de las almidón sintasas tanto soluble como insolubles. Como se ilustra en la Figura 38, la GBSS como así también la SSI presentan menores niveles de transcritos, siendo estas diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, la expresión de SSII si bien se aprecia menor, no es significativa según los ensayos estadísticos realizados. Por último, la expresión del transcritos de la enzima involucrada en la síntesis de las cadenas de mayor longitud de la amilopectina, la SSIII, se encuentra aumentada de manera significativa, y la de la SSIV, enzima involucrada en el iniciado y cantidad de gránulos, se mantiene en niveles estadísticamente invariables. Es interesante mencionar que plantas de maíz mutantes en SSIII muestran una disminución en extracto crudo de la actividad ramificante y por otra parte un aumento de la

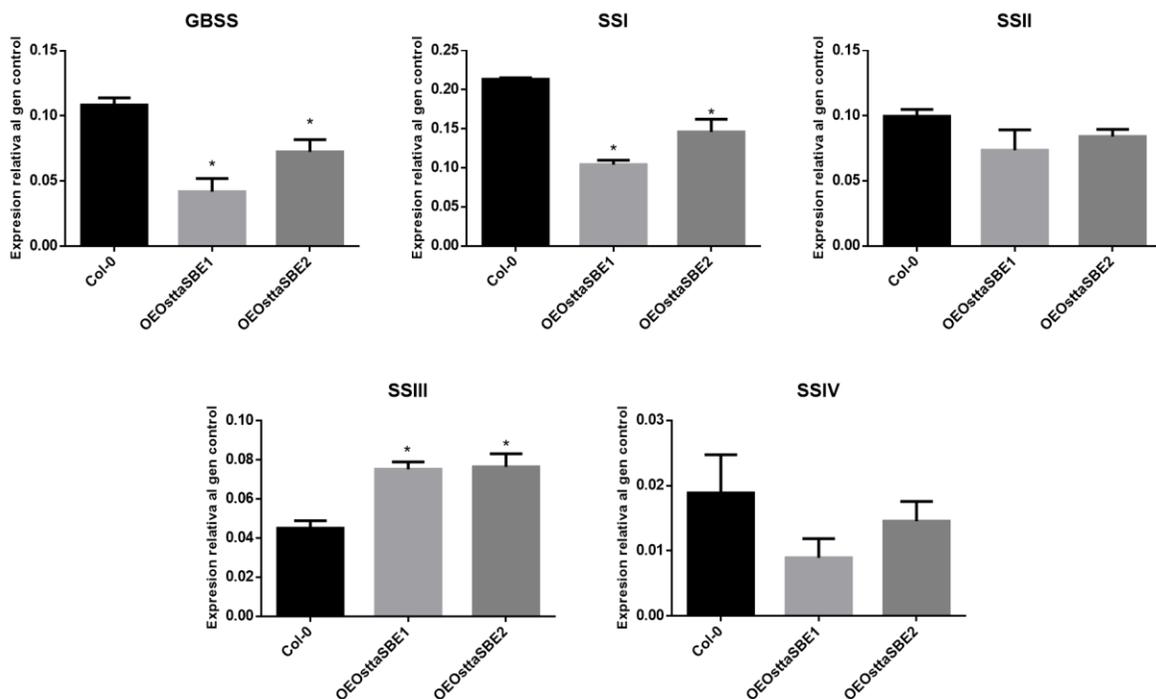


Figura 38: Niveles de expresión de genes involucrados en la síntesis de almidón. Los niveles de transcritos fueron realizados mediante qPCR (Real Time PCR). Los resultados son informados mediante la técnica del  $\Delta$ Ct en función del control interno  $\beta$ -actina. Promedio de 5 repeticiones. Las medidas fueron determinadas en hojas de líneas salvajes (negro), OEOsttaSBE1 (gris claro) y OEOsttaSBE2 (gris oscuro). Las diferencias significativas se señalan con (\*) cuando  $p < 0,05$ .

actividad SSI [36]. En nuestras líneas se observa esta relación en paralelo de la expresión de SBE, SSI y SSIII aunque en sentido contrario, ya que SBE y SSIII aumentan y SSI disminuye.

Por otro lado, para comprender más detalladamente los mecanismos fisiológicos afectados en estas líneas, es sumamente importante determinar si existe un aumento general de la síntesis de almidón. Teniendo en cuenta que el punto de control del flujo de carbono hacia la síntesis de polisacáridos está dado por la actividad de la enzima ADP glucosa pirofosforilasa [117], decidimos medir los niveles de transcritos tanto de la subunidad mayor como de la menor, siendo esta última la principal involucrada en dicha regulación. Para ambos casos pudimos observar aumentos menores en la expresión de ambas subunidades sin llegar a ser ninguno de ellos significativos cuando se los comparó con la línea salvaje (Figura 39). Por esta razón entendemos que, si este aumento en los niveles transcripcionales no da cuenta del aumento en los niveles dosados de almidón, un cambio en la regulación postraduccional redox o alostérica podría estar afectando la actividad de estas enzimas [6].

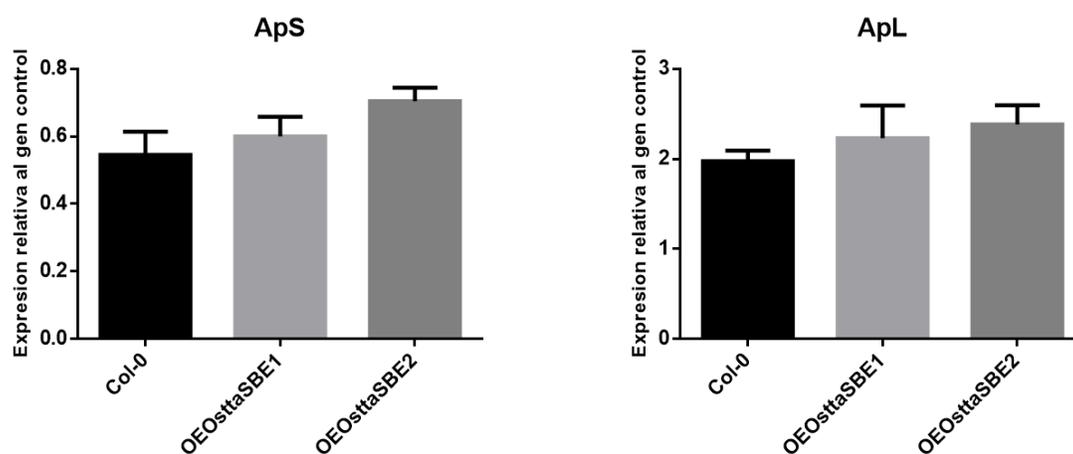


Figura 39: Niveles de expresión de genes involucrados en la síntesis de almidón. Los niveles de transcritos fueron realizados mediante qPCR (Real Time PCR). Los resultados son informados mediante la técnica del  $\Delta C_t$  en función del control interno  $\beta$ -actina. Promedio de 5 repeticiones. Las medidas fueron determinadas en hojas de líneas salvajes (negro), OEOSTtaSBE1 (gris claro) y OEOSTtaSBE2 (gris oscuro).

De la misma manera, se estudiaron los niveles de transcritos de las enzimas involucradas en la generación de ramificaciones para dar lugar a la amilopectina [118] sin observarse disminución en ninguna de las líneas sobreexpresantes en respuesta a la expresión de la enzima ramificante exógena de *O. tauri*. De hecho, la expresión de la enzima ramificante BEIII mostró niveles aumentados con respecto a la línea salvaje. Es también interesante destacar como se ven

aumentados los niveles de expresión de la enzima desramificante, pudiéndose observar un incremento significativo (de aproximadamente el doble) en las líneas sobreexpresantes (Figura 40). Esta enzima desramificante es del tipo isoamilasa, cuya función catalítica es de importancia durante la síntesis del almidón, ya que funciona como un sistema de escisión por hidrólisis de aquellos enlaces en las moléculas de amilopectina que resultan desfavorables para la estructura semicristalina del gránulo [118]. Cabe destacar que en *Arabidopsis* solo se encuentran presentes los genes codificantes para enzimas ramificantes pertenecientes a la subclase II (BE2 y BE3), y ningún gen de la subclase I [6].

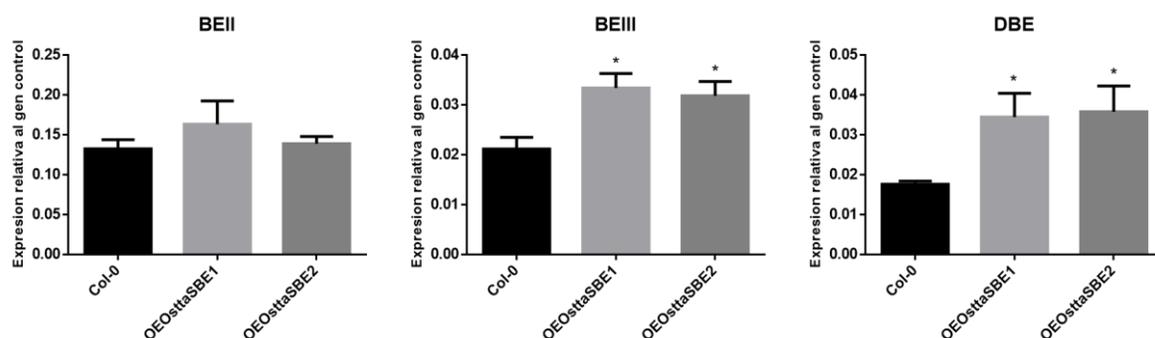


Figura 40: Niveles de expresión de genes involucrados en la ramificación y desramificación de la amilopectina. Los niveles de transcripto fueron realizados mediante qPCR (Real Time PCR). Los resultados son informados mediante la técnica del  $\Delta C_t$  en función del control interno  $\beta$ -actina. Promedio de 5 repeticiones. Las medidas fueron determinadas en hojas de líneas salvajes (negro), OEOsttaSBE1 (gris claro) y OEOsttaSBE2 (gris oscuro). Las diferencias significativas se señalan con (\*) cuando  $p < 0,05$ .

Burton y colaboradores [119] observaron que la disminución del producto génico de las isoamilasas da lugar a gránulos de geometría poco conservada y formas irregulares. Entendemos así que ante un aumento excesivo y no fisiológico en las ramificaciones de la amilopectina (por causa y efecto de la sobreexpresión de OstaSBE) *Arabidopsis* lograría corregir los enlaces glucosídicos aberrantes, mediante un aumento de la actividad desramificante. Esta hipótesis se ve validada por las imágenes de microscopía electrónica y por los valores conservados de circularidad que presentan los gránulos de almidón de las líneas transgénicas.

Decidimos también estudiar la respuesta de aquellos genes que se encuentran involucrados en la degradación del almidón transiente. Como se observa en la Figura 41, la expresión del gen codificante para una de las proteínas fosforilantes de polisacáridos PWD se encuentra aumentada de manera significativa (aproximadamente 2,7 veces); sin embargo, no se observan prácticamente cambios en los niveles de expresión de GWD. Si bien ambas enzimas fosforilan

residuos de glucosa, la enzima GWD actuaría en primera instancia, y posteriormente lo haría la enzima PWD según investigaciones realizadas sobre mutantes nulas en ambos genes [120]. Como es sabido sobre los mecanismos de fosforilación, el grupo fosfato se une a los polisacáridos con la finalidad de desestructurarlo en dos etapas, para que previa remoción de esos grupos que interferirían posteriormente en la actividad enzimática de las enzimas subsiguientes, actúen las enzimas encargadas de escindir los enlaces  $\alpha$ -1,4 (amilasas) y  $\alpha$ -1,6 (enzimas desramificantes - LDA e ISA). Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de la enzima ramificante añadiría enlaces  $\alpha$ -1,6 desestructurando el gránulo, entendemos a partir de los resultados obtenidos que la primera etapa de fosforilación no se vería afectada cuantitativamente, y por el contrario, sería necesaria una segunda etapa de fosforilación más activa llevada a cabo por la PWD (fosforila el C<sub>3</sub>) [121]. Por otra parte, también es de esperarse que un aumento en las ramificaciones  $\alpha$ -1,6 limite la disponibilidad de carbonos en la posición 6 para ser fosforilados, lo cual podría explicar que la expresión del gen codificante para la enzima desfosforilante específica de estos carbonos (GWD) se mantenga sin cambios.

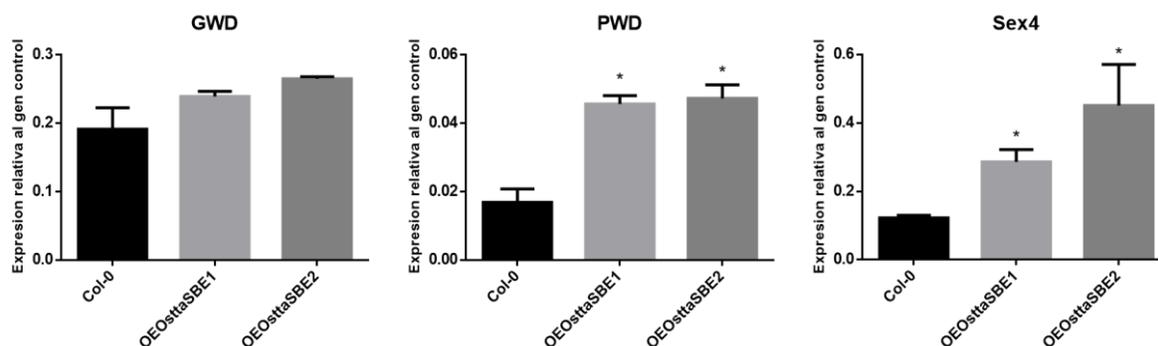


Figura 41: Niveles de expresión de genes involucrados en degradación del almidón. Los niveles de transcripto fueron realizados mediante qPCR (Real Time PCR). Los resultados son informados mediante la técnica del  $\Delta$ Ct en función del control interno  $\beta$ -actina. Promedio de 5 repeticiones. Las medidas fueron determinadas en hojas de líneas salvajes (negro), OEOSTtaSBE1 (gris claro) y OEOSTtaSBE2 (gris oscuro). Las diferencias significativas se señalan con (\*) cuando  $p < 0,05$ .

También observamos un aumento significativo de la expresión para ambas líneas de la enzima SEX4 (por sus siglas en inglés *Starch Excess Phenotype 4*) cuya función es remover los grupos fosfato tanto en el carbono seis como en el carbono tres, una vez desestructuradas las cadenas componentes del gránulo.

Posteriormente a la fosforilación y desfosforilación, el gránulo se hace accesible a las enzimas degradativas (amilasas, enzimas desramificantes, enzima desproporcionante) [51]. Dentro

del complejo set de enzimas responsables de la escisión del enlace  $\alpha$ -1,4, entendemos que las enzimas capaces de actuar como endo-amilasas son las que podrían sufrir mayores niveles de variación en su expresión. Por esta razón estudiamos los niveles de sus transcritos, detectando un aumento de los mismos. Si bien este tipo de amilasas no son las principales encargadas de la degradación del almidón en plantas salvajes, estudios previos realizados por Delatte y colaboradores [58] reportaron que plantas mutantes para las enzimas encargadas de la desramificación de la amilopectina posicionaban a las alfa amilasas en un primer plano de acción, observando un aumento de esta actividad enzimática. De tal modo, es esperable el aumento observado en los niveles de sus transcritos. Nuestros análisis se centraron en la amilasa Amy3, ya que es la única endo-amilasa cuya función se relacionó, al menos hasta el momento, con la degradación del gránulo almidón [6]. La Figura 42 A muestra un claro aumento en la expresión del gen codificante para esta enzima degradativa.

Por último, decidimos comprobar los niveles de expresión de la enzima desproporcionante (DPEI) cuya función es esencial para evitar acumulación de malto-triosas, producto de la degradación del almidón, evitando así que se detenga la degradación del gránulo de cuando es necesario [60]. Estos mensajeros también mostraron aumento en las plantas transgénicas (Figura 42 B) como podría esperarse según lo expuesto hasta el momento.

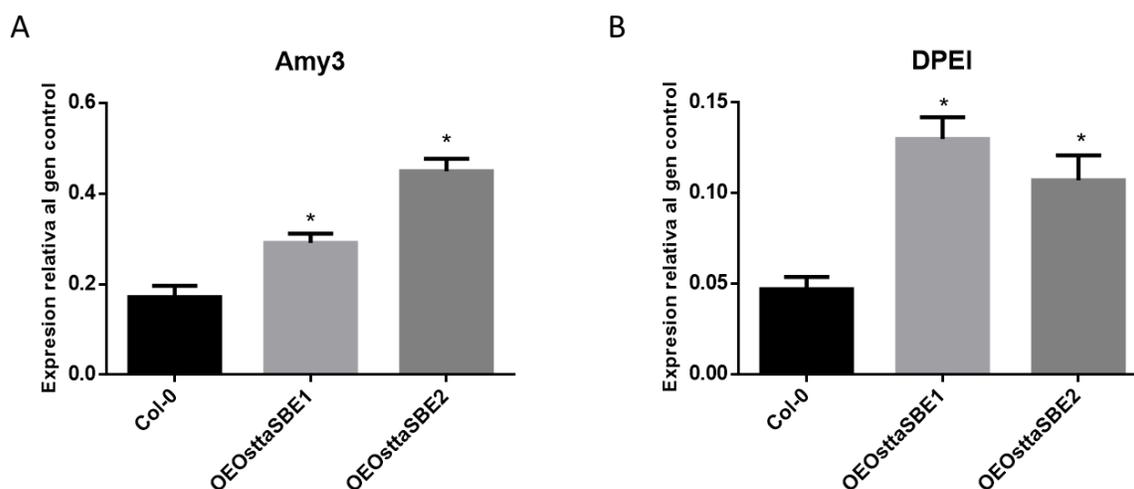


Figura 42: Niveles de expresión de genes involucrados en degradación del almidón. Los niveles de transcritos fueron realizados mediante qPCR (Real Time PCR). Los resultados son informados mediante la técnica del  $\Delta$ Ct en función del control interno  $\beta$ -actina. Promedio de 5 repeticiones. Las medidas fueron determinadas en hojas de líneas salvajes (negro), OEOsttaSBE1 (gris claro) y OEOsttaSBE2 (gris oscuro). Las diferencias significativas se señalan con (\*) cuando  $p < 0,05$ .

#### 4. Estudio de las actividades enzimáticas sintasa y ramificante en plantas OESttaSBE

Paralelamente a los estudios de transcriptos, realizamos ensayos para determinar la variación en la actividad enzimática de las enzimas almidón sintasa y enzima ramificante total. Si bien no es posible diferenciar la actividad de la enzima ramificante endógena con respecto a la exógena, buscamos comprobar si existe una correlación entre el aumento de transcripto observado para ambas enzimas y la actividad observada en un extracto crudo de *Arabidopsis thaliana*.

En la Figura 43 podemos observar un aumento significativo de la actividad ramificante (3,9 y 3,26 veces más para las líneas OESttaSBE1 y OESttaSBE2 respectivamente), en los extractos provenientes de plantas sobreexpresantes de SBE. De igual modo se puede observar un aumento en la actividad almidón sintasa total (1,8 y 2,0 veces más para las líneas sobreexpresantes 1 y 2 respectivamente) que se correspondería al aumento de los niveles del transcripto de la SSIII. Cabe aclarar que el método no permite diferenciar entre las actividades de las distintas almidón sintasas, razón por la cual los resultados observados se deben a la sumatoria de todas las actividades SS.

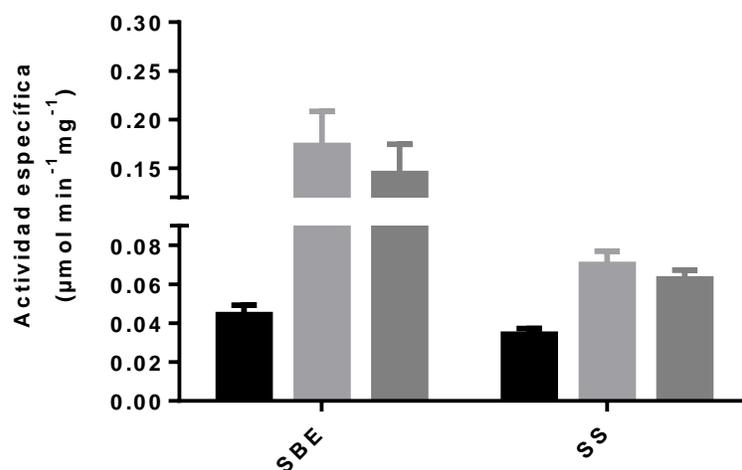


Figura 43: Actividad enzimática ramificante del almidón y sintasa de almidón. SBE representa la medida de actividad ramificante de almidón como se detalla en Materiales y Métodos, SS representa la actividad almidón sintasa como se detalla en Materiales y Métodos. Líneas salvaje (negro), OESttaSBE1 (gris claro), OESttaSBE2 (gris oscuro)

## 5. Estudio de la interacción proteína-proteína de OsttaSBE y OsttaSSIII.

Como se propuso previamente en ensayos realizados en *Zea mays* [36], tanto la enzima almidón sintasa III como la enzima ramificante, interaccionarían *in vivo* formando parte de un multicomplejo compuesto además por otras enzimas cuya finalidad sería la de dirigir correctamente la biosíntesis de las cadenas de amilopectina [36]. Por esta razón entendemos que los aumentos observados en el mensajero que codifica para la SSIII, correspondidos por sus niveles proteicos, podría responder a una mayor demanda de este polipéptido para formar parte del complejo regulatorio.

Teniendo en cuenta que estas interacciones fueron demostradas en maíz y OsttaSBE presenta características particulares en cuanto a su distribución modular y la presencia de un CBM41, decidimos analizar si estas interacciones podrían ocurrir entre la almidón sintasa III-B de *Ostreococcus tauri* y la OsttaSBE. Se eligió trabajar con la isoforma B de la almidón sintasa ya que es otra de las enzimas ampliamente caracterizadas por nuestro grupo ([25], Barchiesi y colaboradores 2018, manuscrito en preparación).

Como mencionamos anteriormente, aunque *O. tauri* constituye la célula eucariota más pequeña conocida y presenta el genoma más pequeño de un organismo fotosintético eucariótico descrito hasta la fecha, contiene más genes SSIII (tres copias) que cualquier otra especie de alga y de planta (p. Ej., *A. thaliana* solo presenta una copia) [33]. Por lo tanto, el genoma de *O. tauri* codifica tres SSIII, SSIII-A, SSIII-B y SSIII-C, las cuales son objeto de estudio de nuestro laboratorio. La conservación a lo largo de la evolución de las tres isoformas SSIII y la ausencia de SSIV, podría estar relacionada con la presencia de un único gránulo de almidón en esta alga, que presenta una composición similar a la del almidón vegetal superior, pero un mecanismo particular de partición y propagación [2].

Recientemente, usando técnicas de caracterización *in silico* e *in vitro*, hemos demostrado que OsttaSSIIIA, SSIII-B y SSIII-C contienen dos, tres y ningún dominio de unión a almidón, respectivamente Figura 44. Nuestro análisis filogenético ha indicado que OsttaSSIII-B, que presenta tres SBD N-terminales, es la isoforma más estrechamente relacionada con la SSIII de plantas superiores. Además, los datos de alineación de secuencias y modelos de homología mostraron que tanto las estructuras tridimensionales principales de todos los dominios modelados obtenidos como los residuos de aminoácidos principales implicados en la unión al almidón están bien conservados en los dominios de unión a almidón SSIII de *O. tauri*.

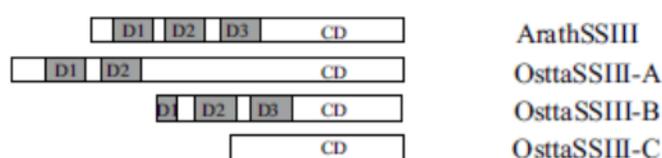


Figura 44: Esquema de la estructura de las almidón sintasa de *A. thaliana* y *O. tauri*. D1, 2 y 3 representan los dominios de unión a carbohidratos, CD es el dominio catalítico.

La cuantificación precisa de la unión proteína-proteína sigue siendo una de las mediciones más difíciles en la biotermodinámica experimental. La mayoría de los métodos cuantitativos determinan las constantes de disociación ( $K_d$ ) a partir de la cinética de asociación/disociación [122, 123] o de la fracción de complejo formada en función de las concentraciones del *partner*, por ejemplo, a partir de cambios en la fluorescencia [124-126] o el calor liberado [127, 128] a medida que transcurre la formación del complejo o de la cantidad de participantes libres [129].

Un enfoque diferente infiere constantes de disociación analizando la relación termodinámica entre el despliegue de proteínas y la unión del ligando [130-140]. Estos métodos determinan la energía libre de la unión del ligando, al observar como el mismo depende de la estabilidad de la proteína. Tienen la ventaja de ser capaces de medir un amplio rango de afinidades (incluyendo interacciones de alta afinidad que son difíciles de medir) en un amplio rango de concentraciones de ligandos (incluyendo concentraciones muy por encima de la saturación, lo cual no es posible mediante otros métodos). Una técnica particularmente conveniente para observar la estabilidad de la proteína mediante despliegue térmico se basa en el uso de un colorante que se vuelve fluorescente tras la interacción con el estado desplegado. El colorante comercial SYPRO

Orange (SO) [141] es un ejemplo de este tipo, y tiene propiedades de excitación y emisión compatibles con instrumentación de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR).

La estabilidad térmica de las proteínas relevantes se determina a diferentes temperaturas debido a que la perturbación de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) es dependiente de la interacción con el ligando. La técnica se basa en la detección de cambios en los niveles máximos de la fluorescencia emitida a medida que aumenta el porcentaje de residuos hidrofóbicos expuestos que interaccionan con el colorante. Normalmente en proteínas globulares el acceso a este tipo de aminoácidos se da a medida que se produce la desnaturalización de las mismas. Por lo tanto, es de esperarse aumentos en los niveles de fluorescencia a medida que se da la desnaturalización proteica.

Para analizar una posible interacción proteica decidimos estudiar la cinética de desnaturalización tanto de OsttaSSIII-B como de OsttaSBE separadas, y ambas en conjunto en presencia del colorante fluorescente Sypro Orange (Molecular Probes) cuyo  $\lambda_{ax}= 470\text{nm}$  y su  $\lambda_{em}= 570\text{ nm}$ , perfiles que son perfectamente compatibles con los de los equipos de real time. El colorante solo emite fluorescencia al estar unido a regiones hidrofóbicas de las proteínas, donde no sufre efecto de *quenching* por parte del solvente (agua). Cuando se evalúa la posible interacción entre proteínas, es importante notar que si no existe tal interacción el máximo de fluorescencia resultante del ensayo con ambas especies, va a reportar iguales temperaturas de desnaturalización que la suma de intensidades registradas para cada proteína por separado.

La Figura 45A muestra el comportamiento de la suma de las intensidades de fluorescencia para OsttaSSIIIB y OsttaSBE mediante línea punteada, en tanto que la línea continua representa el espectro obtenido cuando ambas proteínas son ensayadas en conjunto. En la Figura 45C se grafica la segunda derivada para poder apreciar de manera más precisa si existe un desplazamiento (hacia menores o mayores temperaturas) del punto de desnaturalización, y por

último, en las Figura 45B y D se observa el comportamiento de OsttaSBE frente a frataxina (control negativo de interacción) tanto de los valores RFU, como de la segunda derivada respectivamente.

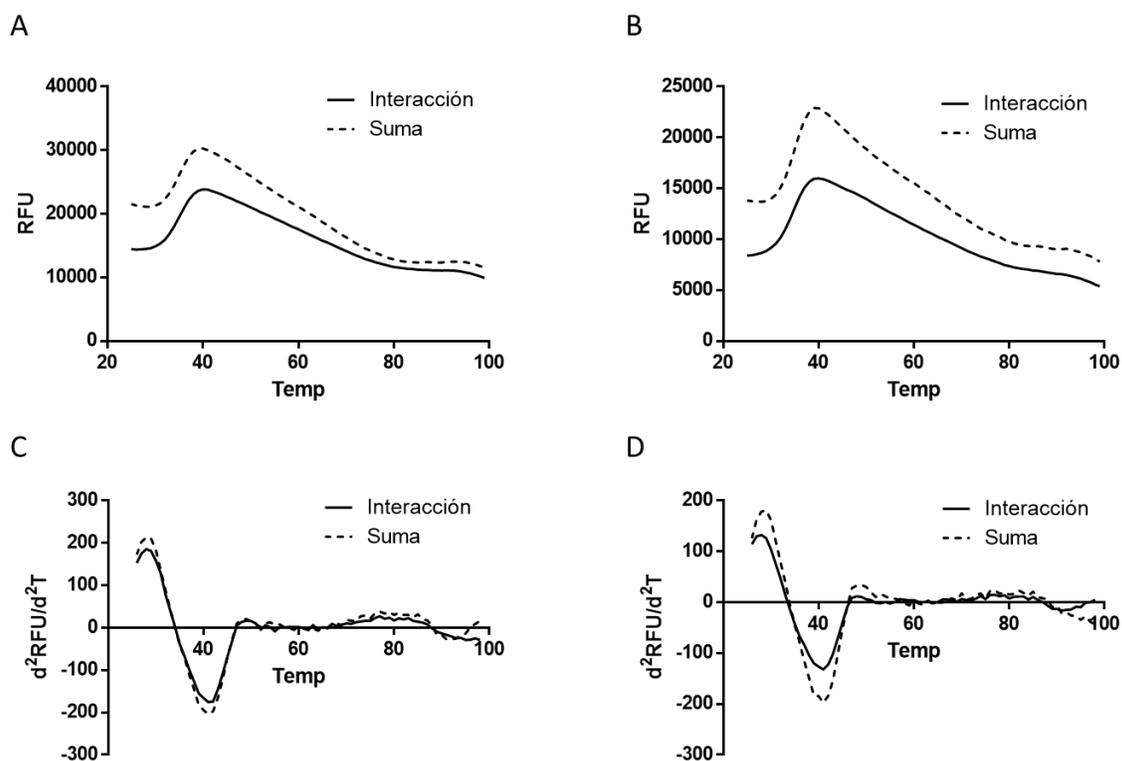


Figura 45: Curvas de desnaturalización de las proteínas SSIII B y BE ensayadas tanto en conjunto (interacción) como en reacciones separadas y sumadas sus intensidades (suma). A – OsttaSSIII B y OsttaSBE; B – OsttaSBE y Frataxina como control negativo; C – Segunda derivada del gráfico A; D- Segunda derivada del gráfico B. Se grafican Unidades Relativas de Fluorescencia – RFU (o doble derivada  $d^2RFU/d^2T$ ) en función de la temperatura.

En función de estos resultados, concluimos que al menos mediante esta técnica no se observó interacción *in vitro* entre OsstaSBE y OsttaSSIII-B, hecho que se ve reflejado en las curvas de desnaturalización que presentan las mismas temperaturas de desnaturalización.

Es importante tener en cuenta que en la presente tesis se ha estudiado solamente la posible interacción con la isoforma B de la almidón sintasa debido que de las tres SSIII, es ésta la que logramos obtener en su forma completa con el extremo amino terminal. Cabe aclarar que si bien la SSIII-B sería la que presenta mayor identidad con la SSIII de *A. thaliana*, no podemos descartar que la interacción en *O. tauri* se dé a través de alguna de las restantes isoformas. Es importante mencionar que en noviembre de 2017 se publicó en NCBI

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) una modificación en la predicción de la estructura de OsttaSSIII-C, donde de acuerdo a estos datos, presentaría una región amino terminal extensa con dominios de unión a carbohidratos. Por las razones expuestas, creemos que podría existir interacción entre las enzimas ramificantes y almidón sintasa del alga, tal y como ocurre en otros organismos, que solo serán verificables una vez expresadas las dos isoformas restantes de almidón sintasa III [36].

## 6. Perfil metabólico de las plantas OEOsttaSBE.

Por último, y con el objetivo de evaluar posibles modificaciones en el metabolismo de las plantas sobreexpresantes, decidimos llevar a cabo reacciones de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para conocer el perfil de metabolitos primarios en hojas cosechadas al final del periodo de luz.

En la Figura 46 se representan aquellos metabolitos que pudieron ser identificados y que presentaron variaciones. Se esquematiza la variación de cada uno, relativa a los niveles obtenidos

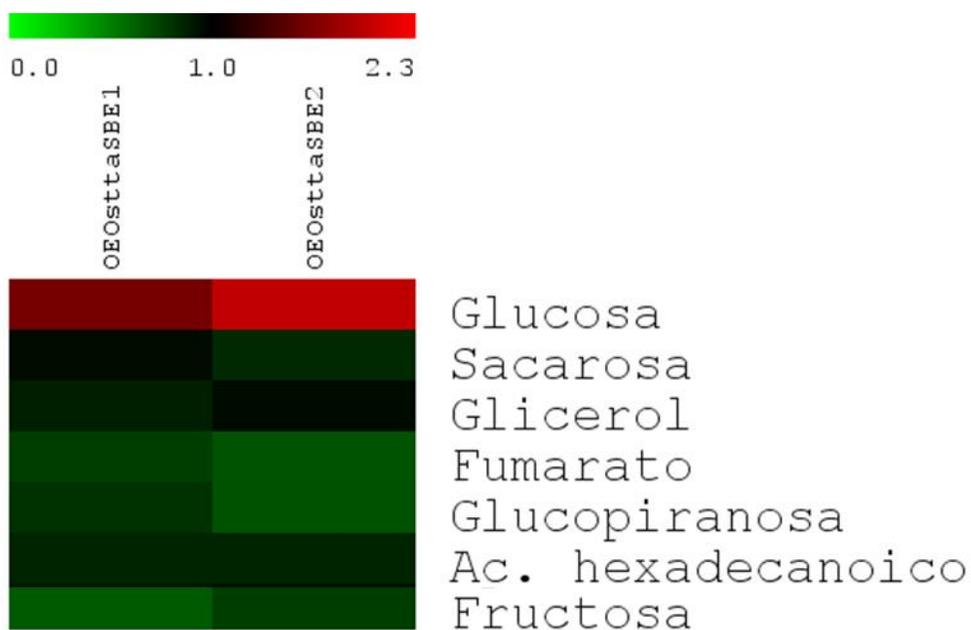


Figura 46: Perfil metabólico de un extracto total de hojas de *A. thaliana*. Se muestran los metabolitos que fueron identificados mediante GC-MS (Materiales y Métodos). Se muestran los niveles de cada metabolito identificados mediante GC-MS en relación a Col-0. El color verde representa niveles de metabolitos menores a los presentes en la planta salvaje, negro representa valores similares y rojo representa valores mayores.

en la línea salvaje. Con color verde se representan aquellos compuestos que se ven disminuidos respecto a las plantas salvajes, en tanto que en color rojo se representan aquellos que se vieron aumentados, teniendo entre ellos dos el color negro que representa la ausencia de variación.

En los resultados presentados se puede apreciar un marcado aumento de casi dos veces (1,96) en el contenido de glucosa para OEOsttaSBE2 (1,61 veces para OEOsttaSBE1). En contraposición, los niveles de fructosa se ven negativamente alterados (0,64 veces para OEOsttaSBE1 y 0,75 veces para OEOsttaSBE2) como así también lo hicieron en menor medida los niveles de sacarosa (0,95 veces para OEOsttaSBE1 y 0,83 veces para OEOsttaSBE2). Estos datos refuerzan nuestra hipótesis basada en las evidencias presentadas previamente, donde se estaría generando una mayor degradación del almidón, probablemente con la finalidad de corregir aberraciones en el ensamblado de los gránulos. Entendemos que es por esta razón que se ve un mayor contenido de glucosa, producto de degradación del polisacárido. Por otro lado, se observan menores niveles de otros azúcares solubles como la fructosa o sacarosa (involucrada en procesos de transporte) [142].

No se observaron variaciones significativas en metabolitos relacionados al metabolismo de lípidos como el glicerol y el ácido hexadecanoico, en tanto que sí se detectó una marcada disminución del ácido orgánico intermediario del ciclo de los ácidos tricarbónicos fumarato (0,75 veces para OEOsttaSBE1 y 0,67 veces para OEOsttaSBE2). Entendemos que una disminución de compuestos carbonados de esta naturaleza se da como resultado al aumento en glucosa y almidón (Figura 34).

### C. Discusión:

En este capítulo se presentaron los resultados obtenidos de la generación de plantas de *Arabidopsis* sobreexpresantes de la enzima ramificante de *Ostreococcus*, bajo el promotor constitutivo 35S las cuales se denominaron OEOsttaSBE, y su caracterización molecular y fisiológica. Se realizaron todos los ensayos en al menos dos líneas obtenidas independientemente. Como es de esperarse para aquellos sistemas donde se alteran los niveles de expresión de genes involucrados en la biosíntesis de determinados compuestos, estos se ven notablemente afectados. En nuestras líneas detectamos cambios tanto cualitativos como cuantitativos del almidón, siendo mayor la cantidad de este polisacárido y sus gránulos de menor tamaño en hojas de las plantas transgénicas

respecto a las líneas salvajes. Detectamos una relación directa entre los niveles de expresión de las almidón sintasas con respecto a los de la enzima ramificante, habiendo podido comprobar al menos *in vitro*, que OsttaSBE no posee la capacidad de interactuar con la almidón sintasa III-B de *Ostreococcus tauri* y quedando por corroborarse la capacidad de interacción con las isoformas III-A y C. Por último, reportamos los niveles de los diversos metabolitos cuantificados mediante GC-MS, observando un aumento en el contenido de glucosa, en detrimento del resto de los metabolitos analizados.

Existen diversas maneras de modificar la acción de las enzimas ramificante: modificar los niveles de expresión de los genes que la codifican, generar mutaciones puntuales que lleven a un aumento o disminución de la actividad enzimática, o a un cambio de la afinidad por sustratos con grados de polimerización mayores o menores [143]. Si bien al sobreexpresar el gen de interés en un entorno donde los genes endógenos homólogos se encuentran presentes genera fenotipos al que contribuyen tanto la proteína exógena como las endógenas, es una estrategia factible que presenta ventajas en determinados casos. Uno de ellos es el de las enzimas ramificante, ya que existen reportes previos donde su sobreexpresión en líneas mutantes *be2be3* (*A. thaliana* sin sus genes codificantes para enzima ramificante de la clase II) genera un pronunciado aumento en los niveles de polisacáridos altamente ramificados y solubles (poliglucanos) en detrimento de los gránulos de almidón [11], lo cual es una gran desventaja cuando se decide estudiar las propiedades de dicho almidón [144-146]. Por otro lado, las estrategias restantes presentan la ventaja de no afectar la cantidad de proteína presente en la célula, por lo tanto, los complejos enzimáticos que actúan en la biosíntesis de almidón no se verían afectados [36] pero no lograríamos de esta manera introducir un gen perteneciente a otra especie (como lo es la enzima ramificante de *Ostreococcus*). Por esta razón, como aproximación inicial, decidimos sobreexpresar la enzima en estudio de *O. tauri* en plantas de *Arabidopsis* salvajes, que cuenta con enzimas ramificantes de almidón endógenas (SBEII y SBEIII). Entendemos que es esta la razón por la cual más allá de haber obtenido plantas con almidón modificado, tanto la amilosa como la amilopectina continúan interaccionando de manera de generar gránulos insolubles perfectamente visibles mediante microscopía electrónica (Figura 36).

Es importante mencionar el hecho de que estas líneas obtenidas, si bien presentan un contenido de almidón mayor que su contraparte salvaje (aumentos del 34% y 17%), no presentan penalidades en el desarrollo, habiéndose observado crecimiento similar para todas las líneas. Este hecho se ve respaldado por estudios recientes llevados a cabo en *Arabidopsis*, donde la línea *be2be3*

fue complementada con la enzima ramificante de glucógeno de *E. coli* [11] obteniendo de esa manera polisacáridos modificados (poliglucanos) que no presentan la morfología típica del almidón, y aun así el crecimiento vegetativo no se vio afectado con respecto a las líneas salvajes. Incluso ensayos realizados en *Hordeum vulgare* carente de toda actividad ramificante demostraron que las penalidades en el crecimiento y rendimiento fueron menores [147].

Son destacables los resultados obtenidos en cuanto a la digestibilidad del almidón de las líneas transgénicas, haciendo de ellas no solo un interesante modelo en el cual continuar profundizando en el conocimiento del metabolismo del almidón, sino que también el polisacárido generado presenta cualidades únicas que lo convierten en un compuesto de elevado interés para aplicaciones biotecnológicas, como por ejemplo la producción de bioplásticos de mayor digestibilidad [148]. De acuerdo a la evidencia obtenida, entendemos que el mayor grado de digestibilidad enzimática se debe al mayor contenido de ramificaciones en las moléculas de almidón gracias a la expresión de la enzima ramificante de *O. tauri*. Reportes previos demostraron una correlación entre el contenido de amilosa y la lisis del almidón, observándose que aquellos polisacáridos con alta proporción de amilosa son más resistentes a la degradación enzimática [149]. Estudios en *Zea mays* deficiente en la isoforma de BE responsable de la síntesis de amilopectina en hoja dieron lugar a plantas con fenotipo de exceso de almidón (SEX) debido a la baja digestibilidad del polisacárido de reserva [150]. Algunas publicaciones donde también se obtuvieron resultados de mayor degradación de almidón [151, 152] sugieren que se debe en parte a una menor velocidad de cristalización del gránulo la cual genera mejores condiciones para que actúen las enzimas de la degradación [153]. Debido a esto, podríamos entender en parte la razón por la cual se observaron gránulos de menor tamaño en las micrografías electrónicas (Figura 36).

Estudios llevados a cabo en mutantes *ssIV* de *Arabidopsis* en donde se observaron gránulos más grandes, pero en mucha menor cantidad, arrojaron resultados que indican baja velocidad de degradación de los mismos explicada por los autores como un efecto debido al cambio del área de superficie [42].

Resulta más desafiante analizar los resultados obtenidos respecto al tamaño de los gránulos de almidón de las líneas transgénicas. En distintas publicaciones que detallan la introducción de dos isoformas de la enzima ramificante de *Zea mays* responsables de la síntesis de amilopectina en semillas [14], en plantas de *A. thaliana* mutantes nulas en las enzimas ramificantes, se observó un aumento de entre un 35% y un 80% en el tamaño de los gránulos. Estos datos en

principio parecen contradecir los obtenidos por nosotros, pero si tenemos en cuenta que el transgén proviene de *Zea mays* cuyo gránulo de almidón presenta un diámetro promedio de entre 5 y 25  $\mu\text{m}$  [14], mucho mayor que aquellos presentes en *Arabidopsis* (700% mayor) y que es una enzima amiloplástica, parecería existir una relación entre el ambiente en el que el gránulo es sintetizado (cloroplasto o amiloplasto), la enzima ramificante y el tamaño del gránulo. El alga cuya proteína estudiamos presenta un tamaño celular de menos de 1  $\mu\text{m}$  [154], muy por debajo del tamaño de los gránulos de almidón de *Arabidopsis*, y un tamaño de gránulos de aproximadamente 0,4  $\mu\text{m}$  [2]. Estos datos sugieren que la enzima ramificante sería un componente importante de la maquinaria encargada de determinar la morfología de los gránulos de almidón modificando la proporción de ramificaciones en el componente mayoritario del almidón, la amilopectina.

En sintonía con la morfología de los gránulos, resulta interesante hacer un análisis de las interacciones proteicas que se observan en relación a la biosíntesis del gránulo. Estudios realizados en diversos organismos demostraron la formación de complejos macromoleculares [12, 36] implicados en la síntesis de almidón. Se han verificado mediante diversas técnicas, asociaciones entre enzimas almidón sintasa de la familia I, II, III y IV en conjunto con enzimas ramificantes y desramificantes entre otras. Si bien no se conoce exactamente la razón por la cual se da la formación de estos complejos de elevado peso molecular, existen varias hipótesis. Por un lado, se cree que al tratarse de enzimas que forman parte de una misma vía, y los productos de algunas enzimas son sustrato de las siguientes, estos complejos podrían estar relacionados con el *channeling* de los sustratos. Otra explicación para estas observaciones es la función estérica que pueden cumplir estos complejos en la superficie de los gránulos, por un lado dificultando el acceso a las enzimas degradativas durante el período de síntesis (día), y por el otro facilitando la correcta síntesis de las moléculas de amilopectina para que posteriormente formen parte del gránulo altamente ordenado, posibilitando de esta manera un mecanismo de regulación de la arquitectura del almidón [36]. Como se observa en los resultados de expresión de genes, dentro del grupo de las almidón sintasas sólo la SSIII muestra niveles aumentados de transcripto. Estos datos se ven corroborados por las medidas en extracto crudo de actividad tanto ramificante como sintasa. Teniendo en cuenta las interacciones demostradas previamente entre SS y SBE, entendemos que para nuestro caso de estudio puede estar dándose una asociación donde se favorece la interacción con la isoforma III (SSIII), siendo las razones de esta preferencia aún desconocidas. Si bien se han demostrado interacciones entre SSIII y BE, es cierto que éstas fueron las más difíciles de reportar mediante el uso de diversas técnicas en maíz y trigo [12, 36]. Basándonos en estas evidencias previas, haciendo uso de ensayos *in vitro* y de

la proteína OsttaSSIII-B recombinante, intentamos demostrar esta interacción entre las proteínas de *O. tauri*. Si bien no pudimos corroborar que tal interacción exista, creemos que futuras investigaciones donde se ensaye la enzima ramificante del alga junto a las SSIII A y B podrían dar respuesta a los niveles aumentados de SSIII endógena en *Arabidopsis thaliana*.

Por último, informamos un aumento generalizado de los transcritos que darán lugar a las enzimas degradativas. La Figura 47 resume el comportamiento de los transcritos detectados y

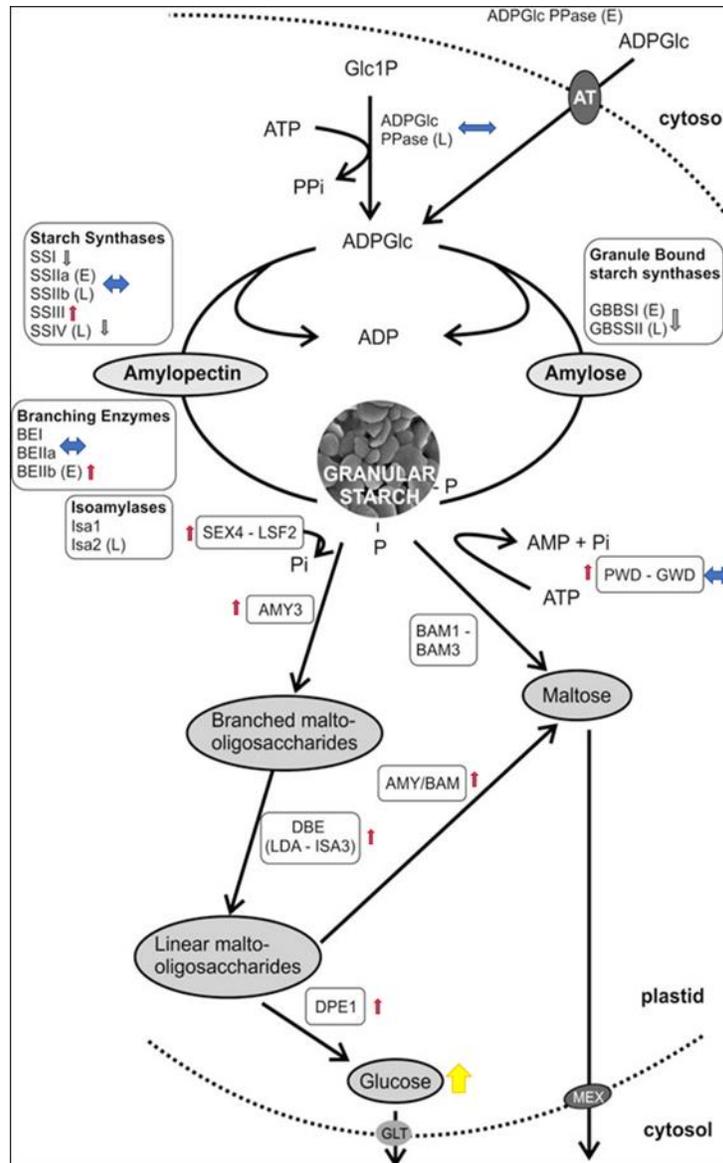


Figura 47: Resumen de los efectos observados en las plantas transgénicas con respecto a los transcritos dosados.

permite observar el claro aumento de la maquinaria de degradación del almidón, en lo que parecería ser un mecanismo de constante reestructuración de los gránulos que nunca llegan a desarrollar los tamaños observados en las líneas salvajes.

Finalmente cuantificamos los metabolitos en las líneas transgénicas generadas y como se muestra en la Figura 46, la glucosa fue el metabolito que más aumentó condiciéndose con un aumento generalizado de la degradación del almidón.

En suma, se lograron obtener plantas sobreexpresantes de la enzima ramificante perteneciente a *Ostreococcus tauri*. Los estudios de estas líneas se corresponden con los resultados del capítulo uno donde se propone por primera vez la función del polipéptido en estudio. Pudimos obtener plantas que presentan un elevado contenido de almidón y también un elevado régimen de degradación amilolítico sin resignar su crecimiento, lo que llevado a otras especies de interés agronómico podría ser de gran utilidad para sectores afines a la agricultura. Y, por último, si bien no logramos detectar interacción entre SS y BE, los resultados de los niveles de transcritos de los mismos, junto a sus niveles proteicos dejan el interrogante planteado para futuras investigaciones, que junto a otros puntos como la presencia del CBM de la familia 41, abre las puertas para el estudio del rol cumplido por esta enzima ramificante en la partición del único granulo de almidón presente en *O. tauri*.

## **CAPITULO 3**

### **Caracterización de OsttaAMILASA**

## IX. CAPITULO 3 - Caracterización de OsttaAMILASA

### A. Introducción

Muchas de las enzimas que sintetizan o degradan enlaces glucosídicos presentan organización modular característica, compuesta de un dominio catalítico y un uno o varios CBM unidos entre sí por regiones que no suelen estar conservadas [64, 155]. Como se ha mencionado en la introducción, los CBM son definidos como dominios proteicos involucrados en el metabolismo de carbohidratos, que tiene la habilidad de unirse a los mismos [65]. De acuerdo a la familia a la que pertenecen estos CBM, pueden encontrarse tanto amino como carboxilo terminal en la estructura proteica, y pueden existir como módulos únicos o con repeticiones (en tándem) [64].

Un tipo especial de CBM son aquellos que unen almidón, llamados módulos de unión a almidón (SBD por sus siglas en inglés, *starch binding domain*). Estos SBD han adquirido la ventaja evolutiva de poder desestructurar la superficie del sustrato debido a la presencia de dos sitios de unión [62, 156]. Al día de hoy, los SBD se han clasificado en 20 familias de CBM: CBM20, CBM21, CBM25, CBM26, CBM34, CBM41, CBM45, CBM48, CBM53, CBM58, CBM68, CBM69 y CBM74 [155] [157] ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)). Los SBD incluidos en la familia CBM20 fueron descritos en primera instancia en enzimas ciclodextrina glucosiltransferasa y enzimas hidrolíticas del almidón [158], sin embargo, estos CBM se han reportado no sólo en enzimas amilolíticas, sino también en no amilolíticas de animales, plantas, arqueas, bacterias y hongos, y se propone que cumplen funciones regulatorias en el metabolismo del almidón [159]. En la actualidad se han descrito módulos de esta familia en proteínas como las kinasas GWD (por sus siglas en inglés – *Glucan Water Dikinase*) proteína participante de la fosforilación del almidón para lograr la desestructuración del gránulo [50]; en la proteína Genetonina-1, cuya función exacta sigue sin dilucidarse pero se piensa que cumpliría roles regulatorios formando parte del musculo esquelético humano [160], y en la Laforina, proteína que funciona como fosfatasa encargada de disminuir los cuerpos de Lafora en animales [161].

Recientemente mediante análisis bioinformáticos detectamos en *O. tauri* una secuencia proteica portadora de un CBM de la familia 20. De acuerdo a los alineamientos realizados, esta secuencia está relacionada con las amilasas, pero no se han encontrado dominios típicos de este tipo de enzimas. En este capítulo se describe el estudio de este polipéptido denominado OsttaAMILASA u Ot06g02060 de acuerdo al etiquetado de su locus.

## B. Resultados

### 1. Análisis de estructura proteica *in silico*

La búsqueda mediante PSI-BLAST de la proteína de interés (Ot06g02060 – OsttaAMILASA), asignada como una  $\alpha$ -amilasa según la base de datos CAZY, sólo arrojó homología con una proteína de función desconocida de *Ostreococcus lucimarinus* y es por esta razón que no se pudieron realizar alineamientos de secuencia ni árboles filogenéticos de la misma.

Si bien no fue posible realizar el modelado molecular por homología de OsttaAMILASA, debido que no existen al momento proteínas homólogas a esta cuya estructura cristalográfica se haya resuelto, sí pudimos encontrar polipéptidos con secuencias similares a las del CBM20 perteneciente a la amilasa putativa. Para ello se tomó como molde la glucoamilasa de *Aspergillus niger* (1ACZ) [88]. Se decidió realizar un alineamiento de secuencia tanto de los CBM20 de *O. tauri* y de otros organismos, con la finalidad de observar si los aminoácidos implicados en la unión a polisacárido se encuentran conservados a través de las diferentes especies. Fueron incluidos en este análisis CBM de otras familias que se clasifican como SBD (CBM48 y 53), basando principalmente esta elección en el hecho que estas familias presentan un alto grado de similitud que ya fue reportado [158, 159] y además fueron estudiadas en detalle en el laboratorio [73, 162].

En la Figura 48 se muestra el alineamiento de secuencias, donde se resaltaron los aminoácidos implicados en la interacción con los polisacáridos. Se tomó como referencia para la numeración, la glucoamilasa de *A. niger* 1ACZ, estructura de la cual se conocen los residuos involucrados en la unión a carbohidratos, tanto de su sitio de unión primario (sitio 1 - triptófanos 543 y 590) como de su sitio secundario (sitio 2 – tirosinas 527 y 556) [88]. A partir de estos alineamientos identificamos en el CBM20 de *O. tauri* los residuos involucrados en la unión tanto del sitio 1, donde estos residuos forman un sitio expuesto a la superficie con una separación entre

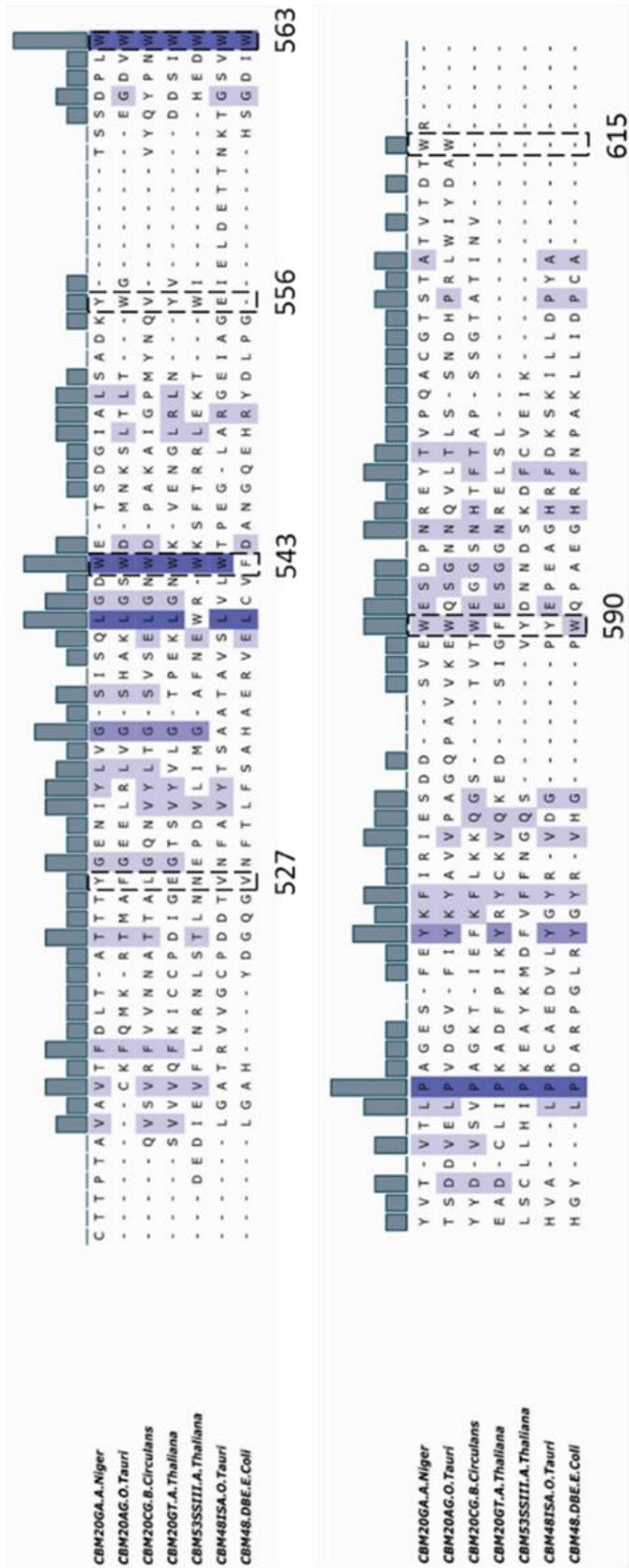


Figura 48: Alineamiento de secuencia aminoacídica de CBM. Se tomaron como referencia los residuos aromáticos de 1ACZ. Abreviaturas: CBM20GA.A.Niger es CBM20 (glucoamilasa) de *A. niger*; CBM20AG.O.tauri es CBM20 (glucan 1,4- $\alpha$ -glucosidasa) de *O. tauri*; CBM20CG.B.circulans es CBM20 (cyclomaltodextrina glucanotransferasa) de *B. circulans*; CBM20GT.A.thaliana es CBM20 (4- $\alpha$ -glucanotransferasa) de *A. thaliana*; CBM53SSIII. A. thaliana es CBM53 (Almidón sintasa III) de *A. thaliana*; CBM48ISA.O.tauri es CBM48 (isoamilasa) de *O. tauri*; CBM48.DBE.E.Coli es CBM48 (enzima desramificante de glucógeno) de *E. coli*.

anillos aromáticos adecuadas para unir glucosas con enlace  $\alpha$ -1,4, como del sitio 2, donde en lugar

de la tirosina 527 (numeración de *A. niger*), se encuentra otro aminoácido aromático, fenilalanina 92 (numeración de *O. tauri*), y la tirosina 556 (numeración de *A. niger*) se encuentra reemplazada por el triptófano 124 (numeración de *O. tauri*). Es importante notar que tanto el triptófano como la fenilalanina y la tirosina, son aminoácidos hidrofóbicos que presentan anillos aromáticos. Teniendo en cuenta que la interacción de estos SBD con los polisacáridos está dominada por efectos hidrofóbicos de apilamiento (o *flat stacking*), entendemos que el intercambio entre cualquiera de estos tres aminoácidos no perjudica la interacción [88].

Siguiendo el proceso detallado en Materiales y Métodos, se realizó el modelado molecular por homología del CBM20 de OsttaAMILASA y el resultado se puede ver en la Figura 49 donde se muestra la conservación espacial de los residuos anteriormente mencionados. En rojo se destacan aquellos pertenecientes al CBM20 de la proteína en estudio y en azul los residuos presentes en la glucoamilasa de *A. niger*.

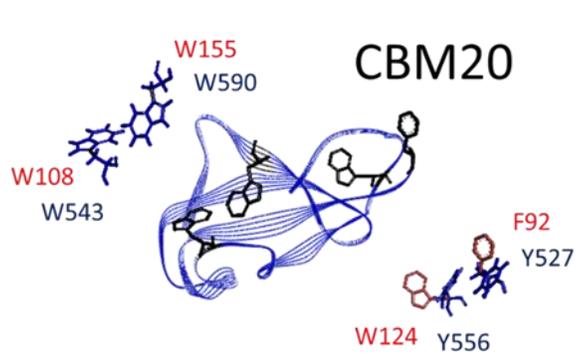


Figura 49: Estructura propuesta para el CBM20 de *O. tauri*

En el caso del sitio 1 al ser completo el solapamiento se observan sólo los aminoácidos de color azul. Para el caso del sitio de unión 2, debido a la sustitución conservativa de ambos residuos, es difícil determinar mediante modelos si la posición de los anillos permitiría unir residuos de glucosa. Si bien la posición espacial se mantiene conservada, los residuos aparecen rotados respecto a los de 1ACZ. Aunque este modelo nos permite proponer a estos residuos como importantes para la interacción con los aminoácidos, sería necesario determinar la estructura cristalográfica de este CBM.

## 2. Clonado expresión y purificación de OsttaAMILASA

A partir del ADNc obtenido según se detalla en Materiales y Métodos, se realizó el clonado de la enzima amilasa completa de *O. tauri* (OsttaAMILASA– 320 aminoácidos - 35,5 kDa), como así también del CBM20 (CBM20-A – 115 aminoácidos - 13kDa) de Ot06g02060 (Figura 50). Para todos los casos se utilizó el plásmido de expresión pRSFDuet-1 de alto número de copias, que añade a los clonados un marcado de seis histidinas que nos permite reconocer las proteínas expresadas con anticuerpos anti-his (penta-his QIAGEN), como así también purificar la proteína utilizando resina de Ni<sup>2+</sup>-Sefarosa. Todos los clonados fueron corroborados por restricción y secuenciación.

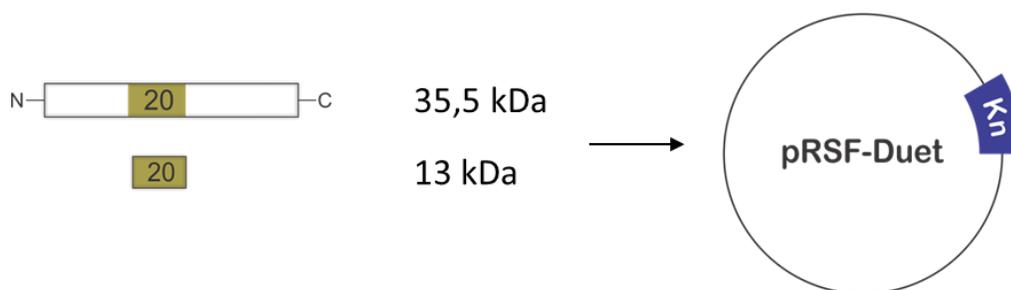


Figura 50: Diagrama de los clonados realizados en pRSF-Duet-1 (Novagen)

La inducción de OsttaAMILASA se realizó en cepas de expresión *Escherichia coli* BL21 (DE3), a 16°C durante 16 horas obteniéndosela en su forma soluble. Posteriormente se realizó la purificación de la misma eluyéndola en columna de Ni<sup>2+</sup>-Sefarosa con imidazol en concentraciones crecientes, obteniendo fracciones separadas según la concentración utilizada.

Para el CBM20 se utilizaron medios de autoinducción [71] a 37°C durante 16 horas. Esta fue la única condición dentro de las ensayadas que nos permitió obtener proteína expresada, probablemente debido a la toxicidad de la misma. Esta proteína se obtuvo de manera insoluble por lo que se realizó el replegado de la misma, utilizando urea 8M, para luego disminuir la concentración de urea de manera gradual, permitiendo de esta manera el replegamiento de la proteína hacia su conformación nativa. Debido a la posible desnaturalización de la proteína durante su replegado, hicimos un seguimiento de la concentración de proteína soluble en el transcurso del proceso. La Figura 51 muestra la evolución del replegado de la proteína, donde al final del proceso se disminuyó

el volumen total con la finalidad de obtener concentraciones proteicas mayores. Para quitar del medio la urea presente, se utilizaron concentradores Centricon (Millipore) cuya membrana sólo permite el paso de proteínas menores a 3 kDa.

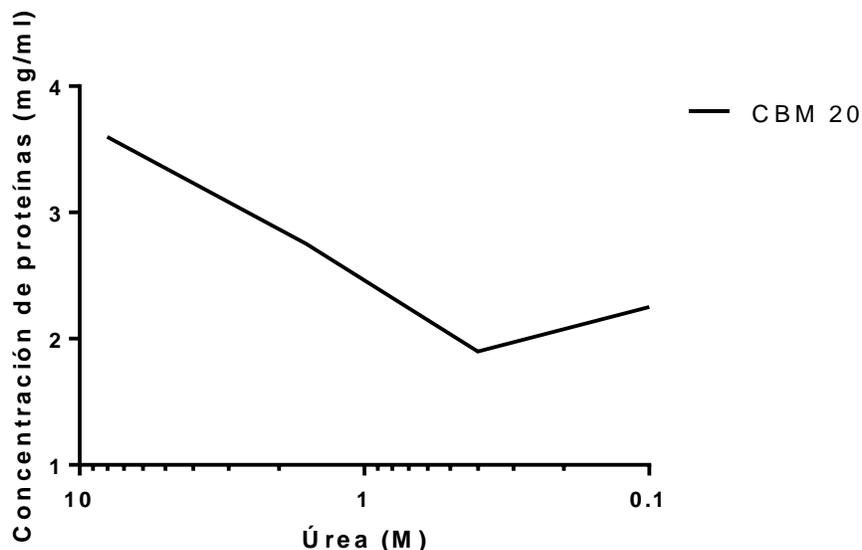


Figura 51: Evolución de la concentración de proteína solubles durante el desalado de la misma.

Analizando las fracciones solubles purificadas en SDS-PAGE pudimos comprobar que la masa molecular de la enzima amilasa es de 35,5 kDa y que se encuentra en un alto grado de pureza. Debido a la presencia de la etiqueta de histidinas, pudimos confirmar que efectivamente se trata de la proteína de interés mediante un ensayo de *western-blot* utilizando los anticuerpos anti histidina anteriormente mencionados. Los resultados del mismo se presentan en la Figura 52 A. En el caso del CBM20, mediante SDS-PAGE se puede observar que la masa es coincidente con la esperada de acuerdo a la cantidad de aminoácidos en su estructura primaria, 13 kDa (Figura 52 B). Este resultado pudo ser corroborado mediante la técnica de *western-blot* utilizando anticuerpos anti la etiqueta de histidinas (Figura 52 C).

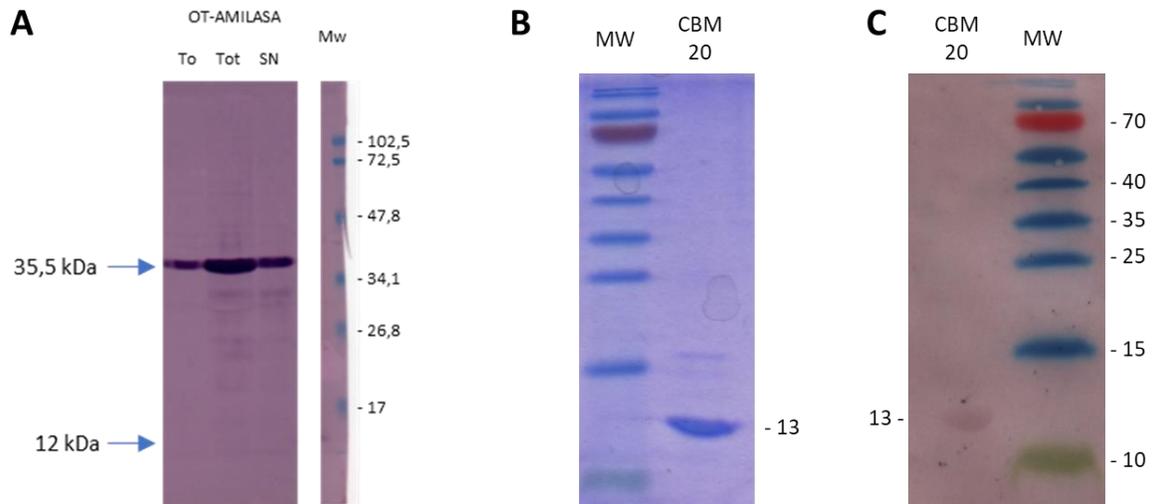


Figura 52: A) Western-blot realizado con anticuerpos que reconocen poli-histidinas. La membrana corresponde a la amilasa entera, la segunda membrana corresponde a los marcadores de masa molecular. TO – tiempo cero de inducción, Tot – extracto total de inducción, SN – fracción soluble de la inducción. B) SDS-PAGE con la proteína CBM20. Las calles sembradas corresponden a la inducción overnight del CBM20 de la amilasa, mostrando la fracción soluble – SN y la fracción total – Tot. C) Western-blot realizado con anticuerpos que reconocen poli-histidinas. La membrana corresponde a CBM20 y marcador de masa molecular similar a B).

### 3. Ensayo de actividad amilolítica para la enzima OsttaAMILASA

Con el objetivo de determinar su actividad catalítica, la amilasa purificada fue desalada. Se ensayaron distintas condiciones, variando la concentración de cationes divalentes, el pH de trabajo, temperaturas y tiempos de incubación. Se utilizó como sustrato del ensayo almidón en exceso (2 mg/ml), ya que esta enzima catalizaría la hidrólisis de los residuos de glucosa situados en el extremo no reductor del polisacárido liberando  $\alpha$ -D-glucosa [6]. A continuación, se cuantificó la glucosa liberada mediante el kit de Glicemia enzimática de Wiener Lab que se basa en la oxidación de la glucosa, con la concomitante liberación de peróxido de hidrógeno, el cual junto a fenol y 4-aminoantipireno, da color mediante una reacción catalizada por la peroxidasa. Para ninguna de las condiciones ensayadas se observó liberación de glucosa. Por tal motivo se decidió verificar la secuencia proteica por espectrometría de masa utilizando tecnología Orbitrap (Centro de Estudios Químicos y Biológicos en Espectrometría de masa, UBA), siendo el resultado de esta secuenciación el esperado, coincidiendo completamente la secuencia aminoacídica predicha en la literatura [163]. Por tal motivo decidimos utilizar un segundo método de detección, en el cual se cuantifica la cantidad de almidón remanente posterior a la reacción, haciendo uso del reactivo de Lugol y

posterior lectura espectrofotométrica. Al igual que con el método previamente descrito, tampoco pudimos detectar actividad amilolítica con este segundo ensayo.

Estos resultados sugieren que en las condiciones ensayadas la enzima no tendría actividad amilasa, o que podría estar mal predicha la función proteica, y no tratarse de una amilasa. Al realizar una búsqueda de dominios conservados utilizando el software CD-Search e InterPro (Según se detalla en Materiales y Métodos, [164]), observamos que solo su CBM presenta homología con amilasas, y no se detecta ningún dominio catalítico característico de las amilasas.

#### 4. Análisis de transcritos de RNA secuenciados.

En una primera instancia se hizo un análisis extensivo de los transcritos presentes en *Ostreococcus tauri*, aprovechando los datos crudos de un análisis de *microarray* realizado previamente en un laboratorio del Reino Unido [8, 165]. Si bien 6369 genes de los 8166 presente en *Ostreococcus* se encontraron representados en este chip, el correspondiente a OsttaAMILASA es de aquellos que no se encontraron. Como alternativa, decidimos hacer un análisis completo de datos crudos de RNA-Seq públicamente accesibles a través del European Nucleotide Archive (ENA) bajo el código PRJNA400530. Como dato preliminar de este estudio, pudimos observar que el transcripto de OsttaAMILASA no presenta eventos de corte y empalme con regiones corriente arriba o abajo de la propuesta como codificante para esta proteína (Figura 53). De haber existido tal evento, al

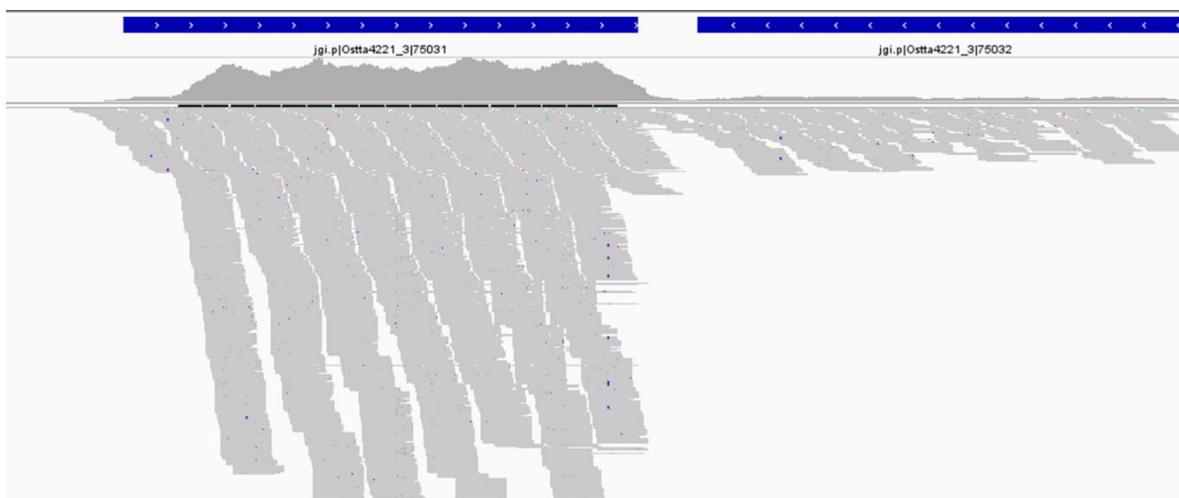


Figura 53: Inspección visual de los transcritos de OSTTAAMILASA. Jgi.p|Ostta-4221\_3|75031 corresponde a Ot06g02060/Ostta06g01880/OSTTAAMILASA según las diversas notaciones utilizadas por las distintas versiones de genoma.

tratarse de experimentos *paired-end*, hubiésemos observado lecturas distantes en el genoma unidas por una línea continua.

Debido que estos datos fueron tomados en diversos puntos del ciclo luz-oscuridad, pudimos analizar cómo es la expresión del gen Ot06g02060 en función del momento del día y si ésta responde a un patrón circadiano. En la Figura 54 se observan los perfiles típicos de expresión de genes involucrados en la síntesis (enzima ramificante - Ot01g03030, ADP-Glucosa pirofosforilasa - Ot07g03280y almidón sintasa II - Ot16g02790) como en la degradación ( $\alpha$ -amilasa-Ot16g00380). Vemos que la expresión de Ot06g02060 es elevada durante la fase lumínica y disminuye durante la noche, comenzando a aumentar hacia el final de la misma.

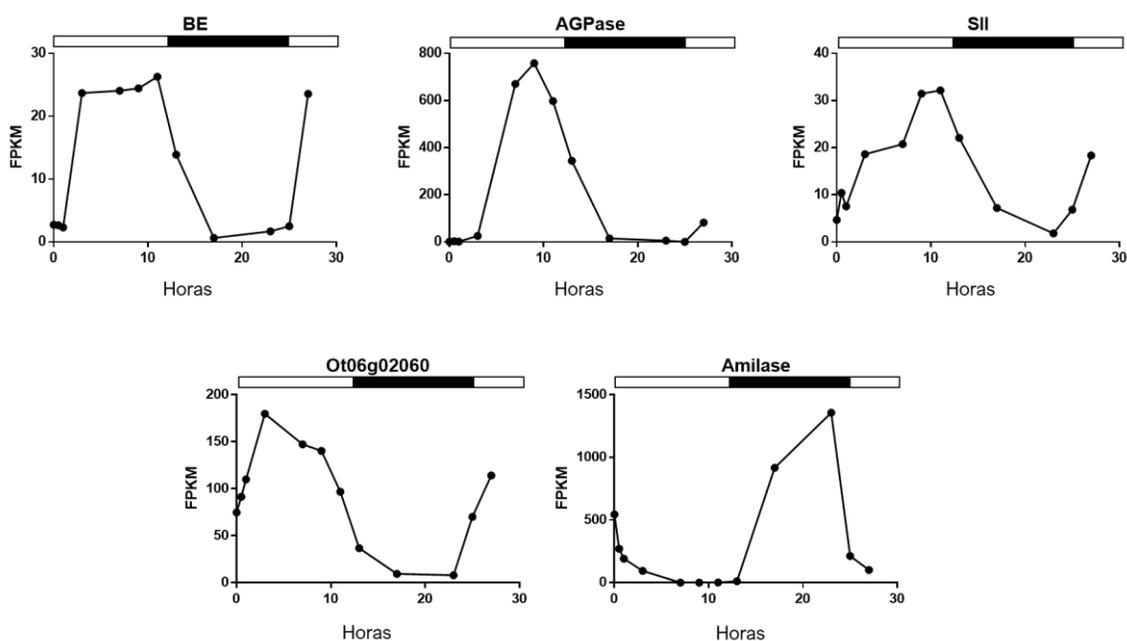


Figura 54: Nivel de expresión de la enzima ramificante de *Ostreococcus tauri* estudiada en el capítulo I (BE); ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPase); almidón sintasa II (SII); OSTTAAMILASA (Ot06g02060) y  $\alpha$ -amilasa (Amilase). FPKM representa las Reads por kilobase de transcripto por millón de reads mapeadas (da idea de la cantidad de transcripto presente), Horas representa las horas transcurridas desde el momento que se enciende la luz. Las barras superiores blancas y negras representan respectivamente la presencia y ausencia de iluminación al medio de cultivo.

Existen informes previos en plantas superiores en donde se estudió la regulación de la expresión de genes del metabolismo del almidón con respecto al momento del día. Las plantas alternan cada día entre un excedente de carbono en los períodos de luz y un balance negativo de carbono en la noche. Estos cambios diurnos se amortiguan al retener fotosintato (almidón) en las hojas en los períodos de luz, que se degrada durante la noche para sostener la síntesis y exportación

de sacarosa [166-168], [169]. Stitt y colaboradores, y Smith y Stitt [117, 169] propusieron que las plantas responden a la disminución de carbono de manera orquestada (por ejemplo, cuando se inducen cambios en los patrones de almacenamiento de fuentes de carbono y crecimiento antes de que el carbono disminuya de manera tal que ejerza una limitación severa sobre el metabolismo o el crecimiento). Esta hipótesis proporciona un marco para comprender cómo se coordinan el recambio de almidón, el metabolismo y el crecimiento para evitar la inanición.

Se postula que los azúcares inhiben la síntesis de almidón. Recientemente se demostró que la síntesis de este polisacárido disminuye cuando se incluyen pequeñas cantidades de sacarosa en el medio de enraizamiento de las plántulas de *Arabidopsis*, siempre que se cultiven en condiciones de días cortos donde el carbono es limitante [170] [169]. Por otro lado, y de manera crucial, los cambios en la señalización deben iniciarse ante variaciones relativamente pequeñas en el estado de carbono, mucho antes del inicio de la inanición. ([171])

Además, se conoce desde hace veinte años que los azúcares regulan la expresión génica en las plantas [172-174] [175]. Koch [176] desarrolló el concepto de los genes del festín y el hambre: niveles altos de azúcar induce genes “festivos” (requeridos para la biosíntesis y el crecimiento), mientras que el azúcar bajo induce genes de hambreado (que son requeridos para la asimilación de carbono o el catabolismo de fuentes alternativas de carbono). La inanición prolongada o la readmisión de azúcares a plántulas en condiciones de hambreado extremo conduce a cambios en los niveles de transcripción de cientos de genes que están implicados en el metabolismo, señalización y crecimiento [177-181].

El impacto biológico de los cambios en los niveles de transcripción depende de si son seguidos por cambios en las proteínas codificadas y qué tan rápido se producen estas modificaciones. Sin embargo, esto no significa que haya un vínculo causal directo. Gibon y colaboradores [182] [183] demostraron que las enzimas del metabolismo central de carbono y nitrógeno tienen una demora de días hasta verse afectadas. En tales casos, los cambios en las respuestas diurnas de las transcripciones se integran en el tiempo, lo que permite la adaptación gradual a un cambio sostenido en las condiciones. El ajuste rápido dentro de un único ciclo diurno requerirá que algunas proteínas cambien rápidamente y/o que los cambios de la transcripción estén acompañados de una rápida regulación postraducciona de las proteínas existentes [171]

En cambio, en algas se observó una relación más directa entre los genes expresados y el momento del día [8]. Un aumento de la transcripción de genes de síntesis se puede observar durante

el día y un aumento de los genes de degradación durante la noche. En estos organismos, las regulaciones postraduccionales no parecen jugar un rol tan importante como en plantas superiores [8]. Para los resultados obtenidos vemos que nuestro gen en estudio estaría a disposición de la maquinaria de síntesis de almidón debido al momento de transcripción que se produce durante el día.

#### 5. Ensayo de *pull-down* con OsttaAMILASA y extracto crudo de *O. tauri*.

Como ya quedó demostrado en la sección IX.B.3, el polipéptido OsttaAMILASA no presenta actividad degradativa de enlaces  $\alpha,1-4$  en las condiciones ensayadas. Sumado a esto, los estudios transcripcionales demostraron un patrón de expresión contrario al que suelen expresar las enzimas degradativas, específicamente las amilasas. Estos hechos nos condujeron a pensar en la posibilidad de que OsttaAMILASA podría estar cumpliendo otro tipo de función en el metabolismo del almidón. Como se menciona en la introducción, muchas proteínas que presentan CBM pueden cumplir funciones de andamiaje o ensamblado de complejos proteicos, y, por lo tanto, decidimos evaluar si OsttaAMILASA podría ser una proteína con funciones de anclaje para otros polipéptidos.

Con la finalidad de identificar posibles proteínas interactuantes entre el polipéptido codificado por el gen Ot06g02060 (OsttaAMILASA), se decidió realizar ensayos de *pull-down*. Para ello se unió la amilasa putativa a la resina de sefarosa-histidina. A continuación, se realizó la incubación de la resina portando OsttaAMILASA, con un extracto crudo de *O. tauri* sonificado, obtenido al principio y al final del período de luz. También se ensayaron distintas condiciones de fuerza iónica (para todas las condiciones estudiadas se realizaron los controles pertinentes). Posteriormente se realizaron lavados con concentraciones 1M de imidazol, logrando de esta manera desestabilizar la interacción de la proteína recombinante con la resina y por lo tanto separarla de la misma. La fracción obtenida fue sometida a SDS-PAGE con la posterior tinción utilizando Azul de Coomassie. Cabe destacar que este método se realiza en condiciones desnaturizantes con el agregado de Dodecil Sulfato Sódico (SDS), por lo tanto, la posible interacción de OsttaAMILASA con otra proteína del extracto crudo se desestabiliza y de existir interacción, deberían detectarse bandas adicionales a la de la proteína estudiada.

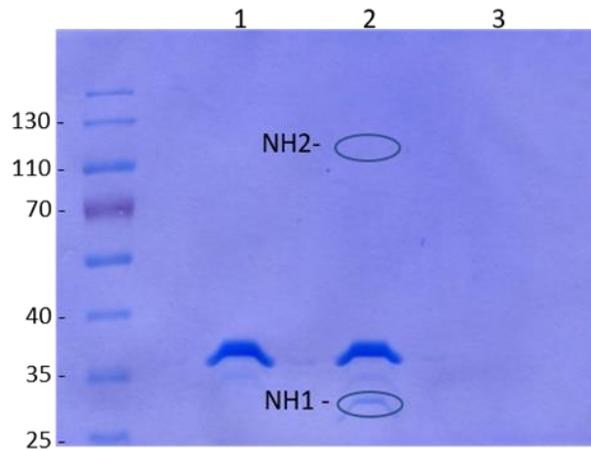


Figura 55: SDS-PAGE del ensayo de pull-down. Calle 1: proteína recombinante sola; Calle 2: proteína recombinante más extracto crudo de *O. tauri*; Calle 3: extracto crudo de *O. tauri*. A la izquierda del gel se muestran los números correspondientes a la masa molecular en kDa

La Figura 55 es el resultado de la única condición en la cual se pudieron detectar posibles interacciones de proteínas de un extracto crudo del alga con la proteína recombinante. En la primera calle de la figura se puede observar el control correspondiente a la resina de  $\text{Ni}_2^+$ -sefarosa incubada solamente con la proteína recombinante; en la segunda calle se muestra el producto de la interacción de la resina con la proteína y el extracto crudo de *O. tauri*, por último, y por último en la tercer calle se observa el producto de la elución de la resina incubada con extracto crudo de *O. tauri*, pero sin proteína recombinante. Se pueden observar dos bandas en la calle 2, marcadas como NH1 y NH2 (esta última de difícil visualización en la digitalización de la imagen), correspondientes a proteínas que se unieron específicamente a OsttaAMILASA. Estas bandas fueron escindidas del gel tomando especial recaudo en no contaminar las muestras con proteínas exógenas y fueron enviadas para su análisis por espectrometría de masa utilizando tecnología Orbitrap (Centro de Estudios Químicos y Biológicos en Espectrometría de masa, UBA, ver Materiales y Métodos).

De acuerdo a los resultados reportados, no se pudo detectar el *partner* de unión a la proteína de interés. NH1 sería producto de degradación de la proteína recombinante estudiada debido posiblemente a la existencia de proteasas en los extractos crudo de *O. tauri* que no fueron inactivadas por frío, ni por el PMSF utilizado durante los ensayos. Esto explicaría por qué en la calle 1 (control sin extracto crudo) la proteína no presenta la banda que fue identificada como producto de degradación.

Por último, la muestra NH2 no pudo ser identificada como polipéptido perteneciente a *Ostreococcus tauri*, sino que, de acuerdo al reporte del servicio de espectrometría de masas, se trataría de un polipéptido de *E. coli*.

#### 6. Estudio de interacción proteína-proteína mediante ensayo de desnaturalización.

Haciendo uso de la técnica presentada en el capítulo dos, donde se ensaya la posible interacción entre dos proteínas utilizando un colorante que permite seguir el proceso de desnaturalización, decidimos analizar si podría existir interacción entre las proteínas recombinantes de *O. tauri* que utilizamos en la presente tesis.

Los resultados se presentan de igual manera que en el segundo capítulo, y como se detalla también en Materiales y Métodos. Se puede observar en la Figura 56 que OsttaAMILASA no interaccionaría con la enzima ramificante presentada en el capítulo I, no detectándose cambios en la temperatura de desnaturalización cuando se grafica tanto, fluorescencia en función de la temperatura (A), como cuando se realiza su segunda derivada (B). En el caso de la interacción con SSIII-B, se puede observar un cambio de la temperatura de desnaturalización desde 45°C en el caso de las proteínas estudiadas por separado, a 50°C cuando se encuentran juntas en el medio de reacción demostrando de esta manera que existe interacción entre ellas.

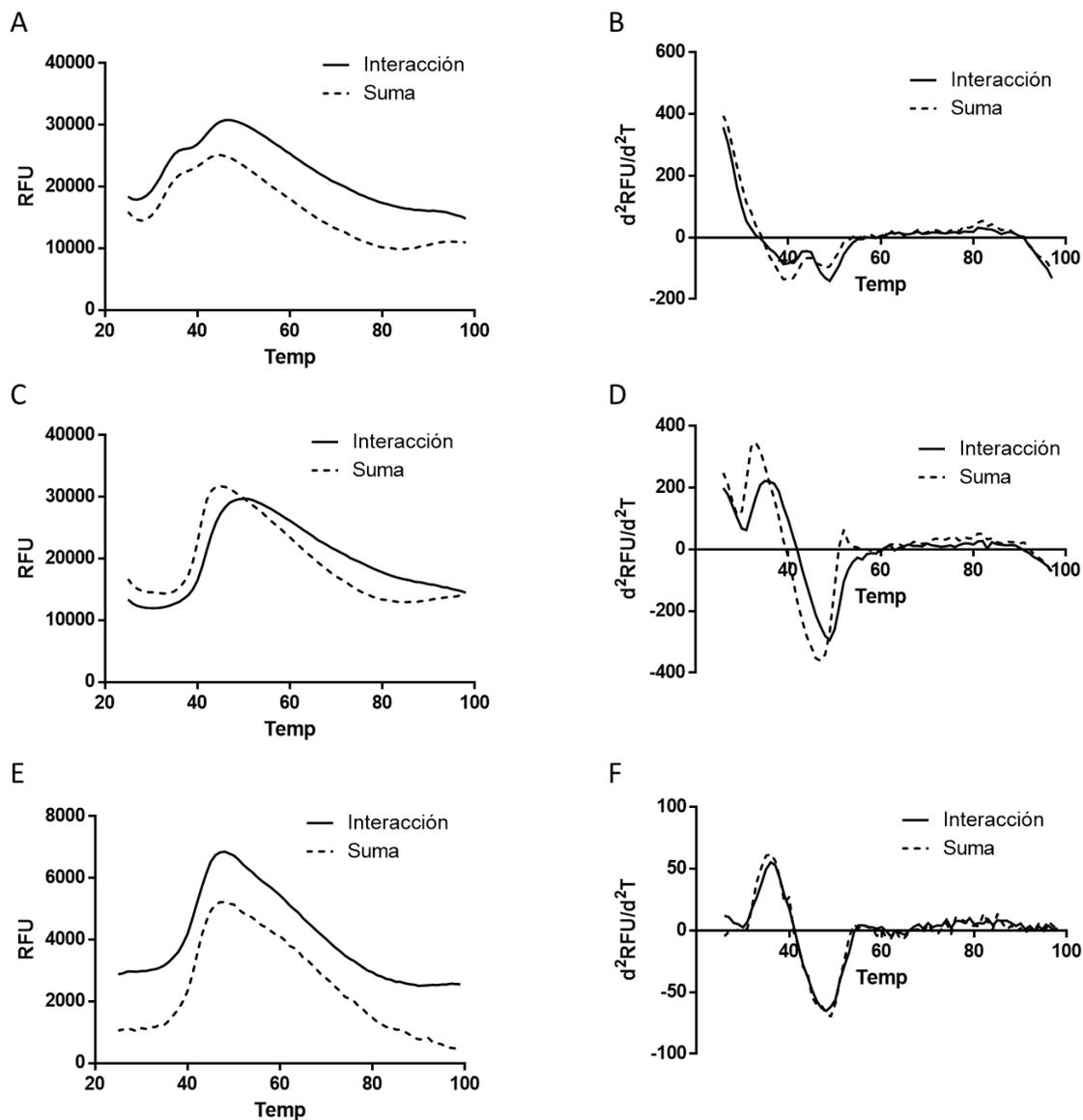


Figura 56: Curvas de desnaturalización de las proteínas OsttaAMILASA, OsttaSBE y OsttaSSIII-B ensayadas tanto en conjunto (interacción) como en reacciones separadas y sumadas sus intensidades (suma). A y B corresponden a OsttaAMILASA y OsttaSBE, C y D corresponden a OsttaAMILASA y OsttaSSIIIB, E y F corresponden a OsttaAMILASA y Frataxina como control negativo; B, D y F Corresponden a la segunda derivada de los gráficos A; C y E donde se grafican Unidades Relativas de Fluorescencia – RFU en función de la temperatura.

## 7. Ensayos de unión a polisacáridos

Estudiamos también la afinidad de OsttaAMILASA y su módulo de unión a carbohidratos (CBM) por distintos polisacáridos mediante ensayos de unión por co-sedimentación. Para ello, el CBM 20 por separado y la proteína entera fueron purificados a homogeneidad, desalados y posteriormente incubados con el sustrato de interés en exceso (amilosa, amilopectina, almidón y

celulosa microcristalina, todos al 5%) por una hora a temperatura ambiente. Luego, la mezcla se centrifugó, y posteriormente a tres lavados, fueron sembradas en geles de poliacrilamida al 18% para realizar una electroforesis en condiciones desnaturizantes que nos permita visualizar tanto la fracción soluble, donde debería estar presente la proteína libre que no se unió a polisacáridos, como la fracción insoluble, donde deberíamos encontrar la proteína unida a polisacáridos y donde también se puede encontrar proteína desnaturizada (se realizan controles para no informar errores por exceso). Por último, después de la tinción se realizó una densitometría de las bandas (utilizando software de análisis de imagen libre ImageJ) detectadas para poder graficar los resultados.

En la Figura 57 se muestran los ensayos de unión analizados por densitometría y expresado en porcentaje de proteína unida al polisacárido para ambas proteínas.

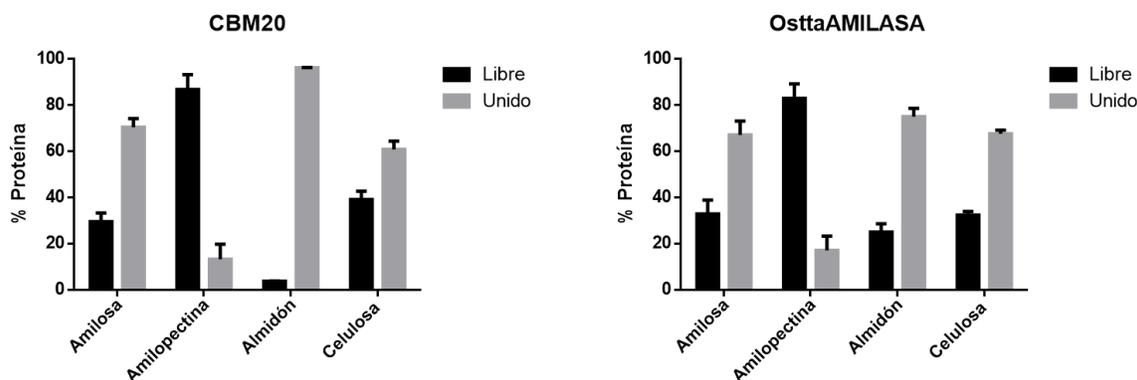


Figura 57: Porcentaje de proteína unida a los distintos polisacáridos (amilosa, amilopectina, almidón y celulosa microcristalina) utilizando la proteína CBM20, y la proteína OsttaAMILASA. En gris se muestra el porcentaje de proteína unida, mientras que en negro se muestra el porcentaje no unida.

Podemos observar un comportamiento similar tanto en el CBM aislado como en la proteína entera, aunque se puede apreciar una leve disminución de afinidad por el almidón en el caso de la proteína completa, hecho que probablemente se deba a efectos de índole estéricos como fue informado previamente por Peng y colaboradores [184]. Vemos una alta afinidad por el almidón y, en particular, esta unión se estaría dando principalmente por la interacción del componente minoritario que es la amilosa. Cuando se analiza el comportamiento de la proteína entera respecto al CBM con la amilopectina, se detecta una mayor adsorción de la proteína entera (5% más), hecho que sugiere que las porciones flanqueantes del CBM participarían de dicha unión o la conformación final de la proteína favorecería esta unión. También se observa en este caso una elevada afinidad

por la celulosa, qué, considerando que el alga no posee pared celular, este resultado carecería de relevancia fisiológica [185]. Estudios anteriores realizados en el laboratorio en base a otros CBM demostraron cierta “promiscuidad” en el reconocimiento de los polisacáridos por parte de estos módulos [162]. Esto, y la estructura lineal de la celulosa microcristalina son dos factores a considerar en la interpretación de este resultado.

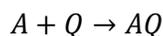
## 8. Análisis espectrofotométrico de unión a polisacáridos solubles

La fluorescencia del triptófano (Trp) es ampliamente utilizada para estudiar cambios conformacionales que pueden ocurrir en las proteínas, como así también para poder inferir estructuras locales. La fluorescencia del Trp es sensible a las condiciones del microentorno, como por ejemplo la polaridad. Es por estas razones que se puede utilizar como sonda de proteínas, ya que es posible obtener información a partir de cambios en la intensidad de fluorescencia, de la longitud de onda máxima de emisión, etc. Entre otros fenómenos se puede utilizar para seguir el estado de plegamiento de una proteína, la unión a sustrato y la accesibilidad a determinados *quenchers* ( $I^-$ ,  $O_2$ , Acrilamida, etc.) [186].

Los polisacáridos solubles, como su nombre lo indica, son más apropiados para preparar soluciones de carbohidratos debido a su mayor solubilidad. Por esto, hemos utilizado la fluorescencia de los Trp del CBM20 para lograr entender cómo es su comportamiento frente a polisacáridos solubles como la carboximetilcelulosa (CMC), y la  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD). Cabe destacar que la CMC además de ser soluble, presenta una estructura similar a la celulosa. Se realizaron medidas espectrofotométricas aprovechando la presencia de seis residuos Trp, de los cuales 3 estarían involucrados en la unión a polisacáridos (W108, W124 y W155), y los tres restantes podrían o no estar expuestos al solvente e interactuar o no con los polisacáridos (W118, W174 y W179) (Figura 48).

Excitando a 295 nm, cuantificamos la fluorescencia en presencia de distintas concentraciones de polisacáridos ( $F'$ ) y ésta fue graficada previa comparación a la fluorescencia inicial sin presencia de polisacáridos ( $F_0$ ). Para ambos casos se grafica  $F_0/F'$  vs concentración de sustrato (% P/V). En Figura 58 se presentan los resultados para cada uno de los polisacáridos estudiados.

Se realizó una regresión lineal de los datos, y de la pendiente de esta recta se obtiene el “grado de interacción física” o constante de asociación del complejo  $K_a$  entre los Trp y los polisacáridos.



$$K_a = \frac{[AQ]}{[A] + [Q]}$$

$$\frac{F_0}{F'} = 1 + K_a[Q]$$

Este método se basa en los clásicos gráficos de Stern-Volmer, donde ante la variación en la cantidad de un *quencher* se obtiene una disminución de la intensidad de fluorescencia. Como en estos casos se estudia la unión de ligandos a proteínas, se considera que la extinción de fluorescencia se debe al tipo “*quenching estático*” debido que la formación del complejo no presenta fluorescencia.

Calculando las  $K_a$  de la Figura 58 observamos una constante de  $2,7 \pm 0,3 \%^{-1}$  para  $\beta$ -CD y de  $1,5 \pm 0,2 \%^{-1}$  para CMC. Estos datos resultan de gran interés si tenemos en cuenta que previamente en el laboratorio hemos ensayado la afinidad de tres CBM distintos a polisacáridos solubles y en ninguno de los casos se obtuvieron valores de  $K_a$  de esta magnitud; por ejemplo, el mayor valor para CMC fue de  $0,8 - 0,2 \%^{-1}$ . Cabe destacar que estos resultados concuerdan con los de la Figura 57 en el hecho de tener alta afinidad por los polisacáridos, y además presentar afinidad por moléculas similares en ambos ensayos (CMC y celulosa). Es interesante notar que si bien la CMC presenta estructura lineal muy similar a la celulosa, la unión a esta es bastante menor cuando se la compara con una molécula cíclica como lo es la beta-ciclodextrina. Por otra parte también se debe tener en cuenta que la CMC presenta grupos carboximetilo que pueden resultar en impedimento estérico para su interacción con el CBM. En cambio la molécula cíclica derivada de la degradación enzimática del almidón  $\beta$ -CD (también llamada cicloamilosa), no presenta tales sustituciones, y este hecho junto a su alta solubilidad pueden explicar el porqué de esta fuerte interacción con el CBM.

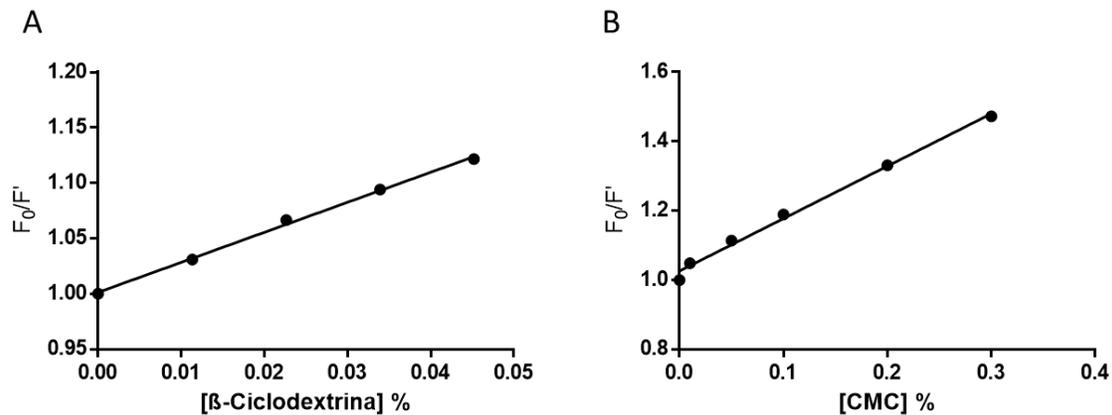


Figura 58: Fluorescencia relativa de los Trp en ausencia ( $F_0$ ) y en presencia ( $F'$ ) de distintas cantidades de sustratos. Se muestra la regresión lineal para cada uno de los casos. A)  $\beta$ -ciclodextrina, B) Carboximetilcelulosa.

Por otra parte, los máximos de emisión de los Trp son muy sensibles al entorno, pudiendo variar ampliamente desde 308 a 355 nm, y se relaciona con el grado de exposición al solvente. Ambientes más hidrofílicos produce un corrimiento de  $\lambda_{\max}$  hacia longitudes mayores (también denominado corrimiento al rojo), en cambio cuando se los somete a ambientes más hidrofóbicos, el valor de  $\lambda_{\max}$  disminuye, produciéndose lo que se denomina corrimiento hacia el azul [186].

La Figura 59 muestra el corrimiento en el espectro de emisión, que se da tanto para  $\beta$ -CD (A) como para CMC (B), coincidiendo con los resultados de la Figura 58. De los datos aportados por este experimento, podemos observar un corrimiento hacia el azul (menores longitudes de onda) lo que se condice con un arreglo del microambiente hacia propiedades más hidrofóbicas o lo que es similar, un menor acceso del solvente al sitio de unión al polisacárido [186].

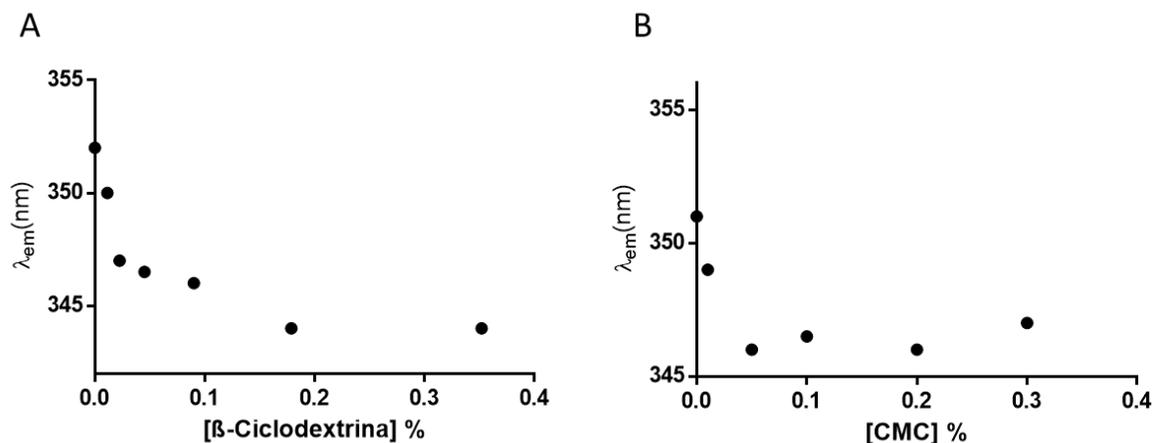


Figura 59: Variación de los máximos de emisión observados en los espectros obtenidos a distintas concentraciones de A)  $\beta$ -CD y B) CMC

#### 9. Estudio del comportamiento de OsttaAMILASA como efector de la actividad amilasa.

Como se mencionó previamente, el polipéptido OsttaAMILASA no presenta actividad degradativa en las condiciones ensayadas (por dos métodos diferentes) y, como se menciona al comienzo, muchas proteínas que presentan CBM pueden cumplir funciones de andamiaje o ensamblado de complejos proteicos. Mas aún, en ensayos realizados previamente en el laboratorio [73] se reportaron efectos de SBD actuando *in trans* con el dominio catalítico de una almidón sintasa de origen vegetal. En estos ensayos se logró reestablecer la afinidad aparente ( $S_{0,5}$ ) entre el dominio catalítico y el sustrato, quedando demostrado de esta manera la posible complementación de enzimas (o sus dominios) con CBM.

Teniendo en cuenta que OsttaAMILASA se une a almidón, decidimos ensayar su efecto sobre reacciones que toman como sustrato a este polisacárido, utilizando una amilasa comercial que no presente módulos de unión a carbohidratos en su estructura.

Las amilasas son de gran interés en diversos procesos biotecnológicos, constituyendo aproximadamente el 25% del mercado mundial de enzimas [187, 188]. Estas enzimas son utilizadas en un gran número de procesos industriales como por ejemplo en la industria alimenticia, en procesos de fermentación para obtener alcoholes, en la industria textil, en la producción de papeles y detergentes y en la industria farmacéutica [189]. La gran mayoría de las amilasas utilizadas

comercialmente son de origen bacteriano o fúngico, las cuales han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas [190].

Estudios previos donde se compara la eficiencia de degradación de almidón por parte de  $\alpha$ -amilasas de origen bacteriano que presentan SBD, con aquellas provenientes de páncreas porcino que no tienen estos dominios, determinaron que, si bien ambas enzimas se unen a los gránulos de almidón en igual medida, las que presentaban SBD poseían una mayor capacidad de hidrólisis de los polisacáridos. Por esta razón concluyeron que el efecto de los SBD sobre la degradación de almidón, está relacionado con la cinética de la hidrólisis y no con la adsorción al sustrato en sí [109, 191].

En base al gran interés que representan este grupo de enzimas, haciendo uso de los métodos de dosaje de actividad amilolítica previamente mencionados, es que decidimos evaluar el efecto del CBM20 y la proteína entera sobre la actividad catalítica de una amilasa comercial. Para tal fin se utilizó la  $\alpha$ -amilasa de páncreas de cerdo (Roche – 10102814001) de comprobada eficiencia catalítica.

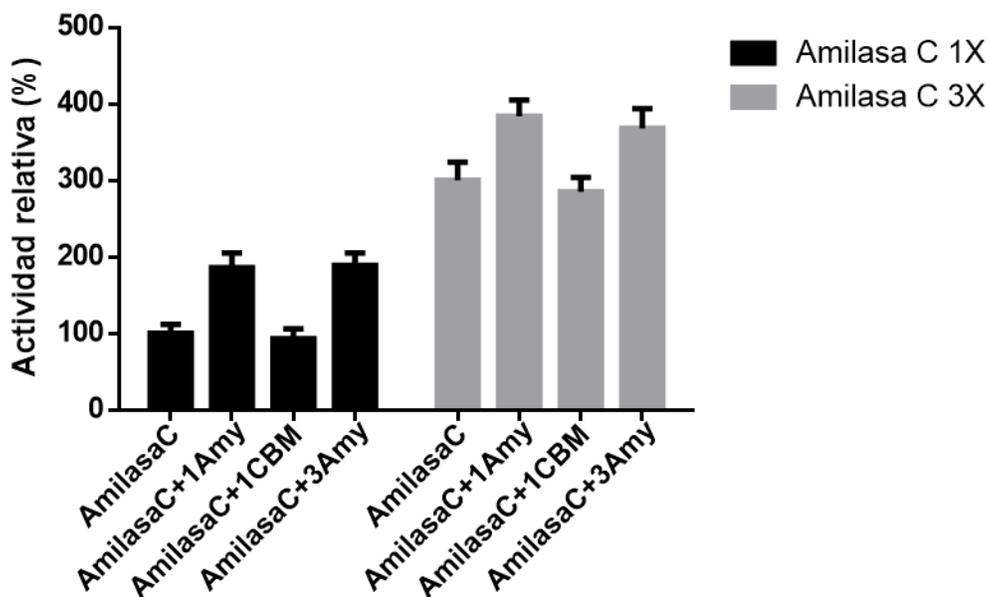


Figura 60: Efecto del agregado de OstaAMILASA (Amy) y CBM20 (CBM) sobre la actividad catalítica de una amilasa de origen comercial (AmilasaC). Los valores se expresan en porcentaje relativo a la actividad de la amilasa comercial sin ningún agregado de proteína exógena. Los números 1 y 3 se refieren a las cantidades mol a mol agregadas de cada proteína.

Se ensayaron medidas de actividad en distintas proporciones de amilasa comercial (AmilasaC) y proteína exógena, ya sea CBM20 u OsttaAMILASA (Amy), utilizando cantidades mol a mol de 1:1, 3:1 y 3:3 (AmilasaC:CBM/Amy). Se toma como 100% aquella actividad representada por la amilasa comercial en la cantidad 1X según se detalla en Materiales y Métodos, y el resto de los dosajes se hacen en referencia a este valor.

Los resultados presentados en la Figura 60 nos demuestran que el agregado de CBM tiene poca incidencia en los niveles de actividad registrados para la enzima comercial, mientras que el agregado del polipéptido completo mejoraría la actividad catalítica de la enzima observándose un aumento de un 86% en la actividad amilasa. El agregado de mayores concentraciones de OsttaAMILASA (3Amy) no genera cambios observables en la actividad enzimática de la amilasa comercial.

Si bien los mecanismos moleculares subyacentes a este fenómeno permanecen sin dilucidarse, según publicaciones previas podría deberse a efectos sobre la cinética de hidrólisis y no a efectos sobre la superficie del sustrato. Este resultado es interesante ya que OsttaAMILASA podría resultar en un activador enzimático y es un polipéptido del que no se han encontrado homólogos en otras especies además de *Ostreococcus lucimarinus*, siendo ambos organismos particulares en cuanto a la partición de su gránulo de almidón [2].

### C. Discusión:

Entre los dominios de unión a almidón, existen dos familias (CBM20 y CBM48) que presentan una clara relación en cuanto a su secuencia aminoacídica, su estructura y también en el modo en que interaccionan con los carbohidratos. Por estas razones se postula que provendrían de un ancestro común [192]. Es interesante destacar que los CBM20 fueron reportados tanto en el extremo N terminal de las proteínas, como en el extremo C terminal, formando parte tanto de enzimas amilolíticas, como no amilolíticas [61, 158, 159, 193-196].

A partir de los resultados obtenidos en este capítulo, pudimos determinar que Ot06g02060 presentan un módulo de unión a carbohidratos de la familia 20 que se encuentra en el centro de la secuencia proteica sin poderse detectar, al menos por las técnicas utilizadas por nosotros (CD-Search [164], PSI-Blast), un dominio catalítico típico de enzimas relacionadas con el

almidón. Mediante el análisis de los datos de RNA-Seq, pudimos concluir que ningún evento de corte y empalme que no se haya tenido en cuenta ocurre en *Ostreococcus*, y por lo tanto, descartamos que en realidad se trate de un gen que ha sido mal anotado y cuyo marco abierto de lectura solo represente una porción del total.

Como se ha informado en estudios anteriores, CBM20 puede formar parte de algunas glucósido hidrolasas ( $\beta$ -amilasas [197-199],  $\alpha$ -amilasas [200, 201], glucoamilasas [88, 202-204], y ciclodextrina gluconotransferasas [205-210]). Por otra parte, se ha detectado en organismos superiores que tanto este CBM como el CBM48 se presentan en enzimas no amilolíticas: Genetonina-1, Laforina, GWD (por sus siglas en inglés *Glucan Water Dikinase*), SEX4 (por sus siglas *Starch Excess Phenotype – 4*), AMPK (por sus siglas *AMP-activated Protein Kinase*) y proteínas AMP-like [192]. Este segundo grupo de proteínas presentan mayoritariamente funciones regulatorias, por ejemplo, tanto GWD como SEX4 están involucradas en la degradación del almidón, fosforilando y defosforilandolo respectivamente [6]. Por estas razones y basándonos en algunos de los resultados obtenidos, podríamos pensar que la proteína codificada por Ot06g02060 es una proteína regulatoria del metabolismo del almidón.

Por otra parte, es interesante destacar que los datos de los patrones de expresión obtenidos mediante el análisis de los experimentos de RNA-Seq muestran que la mayor cantidad de transcripto de Ot06g02060 se encuentra en las células durante el período de luz, coincidiendo con los perfiles de expresión de enzimas típicas de biosíntesis de almidón como por ejemplo la almidón sintasa y la enzima ramificante. Nuestras afirmaciones basan parte de su fundamento en trabajos previos, donde se determinó que la regulación de la expresión génica en algas se debe mayoritariamente a mecanismos que regulan la transcripción, siendo los mecanismos de regulación post-traduccionales los que menor aportan a este sistema [8]. Más aún, los ensayos *in vitro* presentados en este capítulo detallando la capacidad de unión a polisacáridos de características insolubles (como el almidón) presentaron una elevada afinidad por los mismos, mientras que enzimas regulatorias de la degradación del almidón, como la enzima fosforilante GWD3 de *Arabidopsis thaliana* [158], presentan afinidad moderada a baja hacia sus sustratos.

Son muy alentadores también los resultados que evidencian interacción entre OsttaAMILASA y la almidón sintasa III B. Dicha interacción no pudo ser detectada mediante el experimento clásico de *pull-down*, probablemente debido a la escasa cantidad de OsttaSSIII presente en las células y a que el método de tinción tiene sus limitaciones técnicas. Como se ha

informado previamente, los CBM no solo pueden aumentar la velocidad de las reacciones enzimáticas, generar un desestructuramiento en la superficie del gránulo de almidón (SBD), facilitar la interacción de proteínas solubles con el almidón insoluble, y acercar el sustrato al sitio activo de la enzima, sino que pueden actuar como componentes organizadores que reclutan otras subunidades de un complejo multienzimático [65]. Si bien futuros esfuerzos son necesarios para seguir dilucidando el particular modo que tiene *Ostreococcus tauri* de almacenar, particionar y utilizar sus reservas de carbono, en base a los resultados obtenidos proponemos que OsttaAMILASA podría ser una proteína *scaffold* sobre la cual se ensamblarían complejos multienzimáticos, siendo probablemente su función mantener la maquinaria de síntesis adherida al gránulo mientras éste va desarrollándose. Cabe destacar que este es el primer reporte de un CBM20 que estaría involucrado en mecanismos que funcionan durante el período de luz, y, lejos de cuestionar estos resultados, sugerimos que los mismos se suman a la lista de propiedades específicas que presenta esta alga respecto al metabolismo del almidón, como por ejemplo: i – presencia de un único gránulo que se divide sincrónicamente con la división celular al finalizar el día; ii- la presencia de una única mitocondria y un único cloroplasto; iii – la reciente publicación en la que demostramos la presencia de un CBM de la familia 41 en una enzima ramificante [211] [44].

Por último, y teniendo en cuenta la capacidad de unión del CBM20 a almidón, pensamos que esta proteína de *Ostreococcus tauri* podría resultar en una excelente herramienta de ingeniería de proteínas como etiqueta o *tag* de afinidad para la purificación de proteínas recombinantes a nivel industrial, donde el uso de otras secuencias de afinidad (como por ejemplo la 6xHis) suelen ser prohibitivas por su alto coste (a la hora de utilizar las resinas de Ni<sup>2+</sup>). Existen publicaciones previas que informan la utilización de la afinidad de proteínas hacia el almidón para lograr purificar proteínas recombinantes y se observaron eficiencias de purificación aún mayores que con la cola de Histidinas [212]. Si bien una de las maneras de aumentar la afinidad de estos SBD por el almidón es utilizándolos en tándem [213], el CBM20 estudiado en este capítulo podría evitar el uso de más de un SBD debido a su alta afinidad por el almidón. Por otra parte, se podría utilizar este CBM en el diseño de experimentos de bioingeniería de plantas logrando localizar diversas proteínas (fusionadas a OsttaAMILASA o a su CBM20 solo) en la superficie del gránulo durante su biosíntesis [158]. También serviría para generar quimeras con enzimas de interés industrial [214] o simplemente como un agregado a otras enzimas, con la finalidad de aumentar su actividad catalítica como fue observado en este capítulo para una enzima comercial.



## X. Conclusiones

El objetivo de esta tesis fue caracterizar algunas de las enzimas de *Ostreococcus tauri* involucradas en el metabolismo de almidón que presentan módulos de unión a carbohidratos. Particularmente nos propusimos ahondar en el conocimiento de la enzima ramificante, como así también en una amilasa putativa.

En primer lugar, se pudo caracterizar la enzima ramificante determinando sus parámetros cinéticos. Al comparar estos datos con los reportados para ortólogos de otros organismos, pudimos corroborar que las determinaciones de  $K_m$  y  $V_{max}$  informadas en esta tesis, se encuentran dentro de lo esperable para enzimas ramificantes. Pudimos proponer un buen modelo molecular de la estructura proteica, permitiéndonos determinar cuáles son los aminoácidos más importantes para la catálisis de doble desplazamiento ácido-base. Posteriormente y mediante mutagénesis sitio dirigida, pudimos corroborar esta información, ya que al mutar dos de los aminoácidos más importantes para la catálisis, la enzima carece de toda actividad enzimática. Por último, la generación de proteínas truncadas demostró la absoluta necesidad de la presencia de ambos CBM en tándem para llevar a cabo la generación de ramificaciones en  $\alpha$ -1,6. Pudimos también determinar el efecto de esta enzima en plantas superiores al generar líneas sobreexpresantes de la enzima ramificante de *Ostreococcus* en *Arabidopsis thaliana*. Los resultados de la caracterización de estas plantas son sumamente interesantes, partiendo del hecho de haber logrado que produzcan gránulos de menor tamaño con un aumento generalizado de los mecanismos de degradación del almidón.

Finalmente pudimos determinar que la enzima amilasa putativa no presenta esta actividad asignada por predicciones bioinformáticas. Pudimos determinar que se trata de un polipéptido que forma complejos con la almidón sintasa III de *Ostreococcus tauri*, al menos *in vitro*, y que su perfil de expresión durante el ciclo luz-oscuridad es característico de las enzimas involucradas en la síntesis de almidón. Determinamos su afinidad de unión a polisacáridos, obteniendo parámetros compatibles con la interacción con almidón, lo que no solo es importante desde el punto de vista fisiológico (siendo una proteína que guía al complejo biosintético de la amilopectina hacia el lugar donde debe sintetizar), sino que también podría resultar en una excelente herramienta biotecnológica para ser utilizado como etiqueta para purificar enzimas recombinantes. Por último, se presentan resultados interesantes donde el agregado de este

polipéptido logra aumentar la capacidad degradativa de las enzimas amilasas, siendo también de importancia para la industria.

En suma, se lograron hacer importantes aportes al entendimiento del metabolismo del almidón en esta alga unicelular.

## XI. Bibliografía

1. Derelle, E., et al., *Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(31): p. 11647-52.
2. Ral, J.P., et al., *Starch division and partitioning. A mechanism for granule propagation and maintenance in the picophytoplanktonic green alga *Ostreococcus tauri**. Plant Physiol, 2004. **136**(2): p. 3333-40.
3. Jarvis, C.E. and J.R. Walker, *Simultaneous, rapid, spectrophotometric determination of total starch, amylose and amylopectin*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1993. **63**(1): p. 53-57.
4. Vandeputte, G. and J. Delcour, *From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: a focus on rice starch*. Carbohydrate polymers, 2004. **58**(3): p. 245-266.
5. MacGregor, E.A., Š. Janeček, and B. Svensson, *Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 2001. **1546**(1): p. 1-20.
6. Streb, S. and S.C. Zeeman, *Starch metabolism in Arabidopsis*. Arabidopsis Book, 2012. **10**: p. e0160.
7. Pfister, B. and S.C. Zeeman, *Formation of starch in plant cells*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016. **73**(14): p. 2781-2807.
8. Sorokina, O., et al., *Microarray data can predict diurnal changes of starch content in the picoalga *Ostreococcus**. BMC Syst Biol, 2011. **5**: p. 36.
9. Zeeman, S.C., S.M. Smith, and A.M. Smith, *The diurnal metabolism of leaf starch*. Biochem J, 2007. **401**(1): p. 13-28.
10. Lehninger, A., D. Nelson, and M. Cox, *Principles of Biochemistry (2nd edn.)* Worth. New York, 1993.

11. Boyer, L., et al., *Expression of E. coli glycogen branching enzyme in an Arabidopsis mutant devoid of endogenous starch branching enzymes induces the synthesis of starch-like polyglucans*. bioRxiv, 2015: p. 019976.
12. Tetlow, I.J., et al., *Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes*. Plant Physiol, 2008. **146**(4): p. 1878-91.
13. Ball, S.G. and M.K. Morell, *From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule*. Annu Rev Plant Biol, 2003. **54**: p. 207-33.
14. Liu, F., et al., *Modification of starch metabolism in transgenic Arabidopsis thaliana increases plant biomass and triples oilseed production*. Plant biotechnology journal, 2016. **14**(3): p. 976-985.
15. MacNeill, G.J., et al., *Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation*. Journal of experimental botany, 2017. **68**(16): p. 4433-4453.
16. Manners, D.J., *Recent developments in our understanding of amylopectin structure*. Carbohydrate Polymers, 1989. **11**(2): p. 87-112.
17. Nikuni, Z., *Studies on starch granules*. Starch-Stärke, 1978. **30**(4): p. 105-111.
18. French, D., *Fine structure of starch and its relationship to the organization of starch granules*. Journal of the Japanese Society of Starch Science, 1972. **19**(1): p. 8-25.
19. Jenkins, P.J., R.E. Cameron, and A.M. Donald, *A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources*. Starch-Stärke, 1993. **45**(12): p. 417-420.
20. Moreira, D., H. Le Guyader, and H. Philippe, *The origin of red algae and the evolution of chloroplasts*. Nature, 2000. **405**(6782): p. 69.
21. Zeeman, S.C., J. Kossmann, and A.M. Smith, *Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants*. Annu Rev Plant Biol, 2010. **61**: p. 209-34.

22. Merchant, S.S., et al., *The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions*. Science, 2007. **318**(5848): p. 245-50.
23. Worden, A.Z., et al., *Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes Micromonas*. Science, 2009. **324**(5924): p. 268-72.
24. Prochnik, S.E., et al., *Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga Volvox carteri*. Science, 2010. **329**(5988): p. 223-6.
25. Barchiesi, J., et al., *Functional demonstrations of starch binding domains present in Ostreococcus tauri starch synthases isoforms*. BMC Res Notes, 2015. **8**: p. 613.
26. Kuhn, M.L., C.A. Falaschetti, and M.A. Ballicora, *Ostreococcus tauri ADP-glucose pyrophosphorylase reveals alternative paths for the evolution of subunit roles*. J Biol Chem, 2009. **284**(49): p. 34092-102.
27. Ral, J.-P., et al., *Circadian Clock Regulation of Starch Metabolism Establishes GBSSI as a Major Contributor to Amylopectin Synthesis in Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol, 2006. **142**(1): p. 305-317.
28. Malinova, I., et al., *Reduction of the cytosolic phosphoglucomutase in Arabidopsis reveals impact on plant growth, seed and root development, and carbohydrate partitioning*. PloS one, 2014. **9**(11): p. e112468.
29. Ballicora, M.A., A.A. Iglesias, and J. Preiss, *ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(2): p. 213-25, table of contents.
30. Gross, P. and T. Ap Rees, *Alkaline inorganic pyrophosphatase and starch synthesis in amyloplasts*. Planta, 1986. **167**(1): p. 140-145.
31. Sikka, V.K., et al., *Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADPglucose pyrophosphorylase*. Plant Science, 2001. **161**(3): p. 461-468.
32. Fu, Y., et al., *Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase*. J Biol Chem, 1998. **273**(39): p. 25045-52.

33. Deschamps, P., et al., *Early gene duplication within chloroplastida and its correspondence with relocation of starch metabolism to chloroplasts*. *Genetics*, 2008. **178**(4): p. 2373-87.
34. Konishi, Y., et al., *Characterization of starch granules from waxy, nonwaxy, and hybrid seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L.* *Agricultural and biological chemistry*, 1985. **49**(7): p. 1965-1971.
35. Hennen-Bierwagen, T.A., et al., *Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic enzymes in high molecular weight complexes: a model for regulation of carbon allocation in maize amyloplasts*. *Plant Physiol*, 2009. **149**(3): p. 1541-59.
36. Hennen-Bierwagen, T.A., et al., *Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multisubunit complexes*. *Plant Physiol*, 2008. **146**(4): p. 1892-908.
37. Valdez, H.A., et al., *Role of the N-Terminal Starch-Binding Domains in the Kinetic Properties of Starch Synthase III from *Arabidopsis thaliana**. *Biochemistry*, 2008. **47**(9): p. 3026-3032.
38. Zhang, X., A.M. Myers, and M.G. James, *Mutations Affecting Starch Synthase III in *Arabidopsis* Alter Leaf Starch Structure and Increase the Rate of Starch Synthesis*. *Plant Physiol*, 2005. **138**(2): p. 663-674.
39. Szydłowski, N., et al., *Starch granule initiation in *Arabidopsis* requires the presence of either class IV or class III starch synthases*. *The Plant Cell*, 2009. **21**(8): p. 2443-2457.
40. Busi, M.V., et al., *Functional and structural characterization of the catalytic domain of the starch synthase III from *Arabidopsis thaliana**. *Proteins*, 2008. **70**(1): p. 31-40.
41. Barchiesi, J., et al., *Identification of a novel starch synthase III from the picoalgae *Ostreococcus tauri**. *Biochimie*, 2017. **133**: p. 37-44.

42. Roldán, I., et al., *The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of Arabidopsis thaliana suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation*. The Plant Journal, 2007. **49**(3): p. 492-504.
43. Lombard, V., et al., *The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D490-5.
44. Hedin, N., et al., *Identification and characterization of a novel starch branching enzyme from the picoalgae Ostreococcus tauri*. Arch Biochem Biophys, 2017. **618**: p. 52-61.
45. Bhattacharyya, M.K., et al., *The wrinkled-seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme*. Cell, 1990. **60**(1): p. 115-122.
46. Wattedled, F., et al., *Mutants of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phytyloglycogen and an abnormal form of amylopectin*. Plant Physiology, 2005. **138**(1): p. 184-195.
47. Tetlow, I.J., et al., *Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions*. The Plant Cell, 2004. **16**(3): p. 694-708.
48. Seung, D., et al., *PROTEIN TARGETING TO STARCH is required for localising GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASE to starch granules and for normal amylose synthesis in Arabidopsis*. PLoS Biol, 2015. **13**(2): p. e1002080.
49. Tetlow, I. and M. Emes, *Starch biosynthesis in higher plants: the enzymes of starch synthesis*. 2011.
50. Ritte, G., et al., *Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases*. FEBS Lett, 2006. **580**(20): p. 4872-6.
51. Takeda, Y. and S. Hizukuri, *Re-examination of the action of sweet-potato beta-amylase on phosphorylated (1→4)- $\alpha$ -D-glucan*. Carbohydrate Research, 1981. **89**(1): p. 174-178.

52. Hejazi, M., et al., *The laforin-like dual-specificity phosphatase SEX4 from Arabidopsis hydrolyzes both C6-and C3-phosphate esters introduced by starch-related dikinases and thereby affects phase transition of  $\alpha$ -glucans*. *Plant physiology*, 2010. **152**(2): p. 711-722.
53. Santelia, D., et al., *The phosphoglucan phosphatase like sex Four2 dephosphorylates starch at the C3-position in Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2011. **23**(11): p. 4096-4111.
54. Comparot-Moss, S., et al., *A putative phosphatase, LSF1, is required for normal starch turnover in Arabidopsis leaves*. *Plant physiology*, 2010. **152**(2): p. 685-697.
55. Carrillo, J.B., et al., *Identification and analysis of OsttaDSP, a phosphoglucan phosphatase from Ostreococcus tauri*. *PloS one*, 2018. **13**(1): p. e0191621.
56. Scheidig, A., et al., *Downregulation of a chloroplast-targeted  $\beta$ -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves*. *The Plant Journal*, 2002. **30**(5): p. 581-591.
57. Fulton, D.C., et al.,  *$\beta$ -AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active  $\beta$ -amylases in Arabidopsis chloroplasts*. *The Plant Cell*, 2008. **20**(4): p. 1040-1058.
58. Delatte, T., et al., *Evidence for distinct mechanisms of starch granule breakdown in plants*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(17): p. 12050-12059.
59. Yu, T.S., et al., *alpha-Amylase is not required for breakdown of transitory starch in Arabidopsis leaves*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(11): p. 9773-9.
60. Critchley, J.H., et al., *A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2001. **26**(1): p. 89-100.
61. Rodriguez-Sanoja, R., N. Oviedo, and S. Sanchez, *Microbial starch-binding domain*. *Curr Opin Microbiol*, 2005. **8**(3): p. 260-7.
62. Southall, S.M., et al., *The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch*. *FEBS Lett*, 1999. **447**(1): p. 58-60.

63. Tormo, J., et al., *Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose*. The EMBO journal, 1996. **15**(21): p. 5739-5751.
64. Boraston, A.B., et al., *Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition*. Biochem J, 2004. **382**(Pt 3): p. 769-81.
65. Shoseyov, O., Z. Shani, and I. Levy, *Carbohydrate Binding Modules: Biochemical Properties and Novel Applications*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006. **70**(2): p. 283-295.
66. Cantarel, B.L., et al., *The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D233-8.
67. Palopoli, N., et al., *Starch-synthase III family encodes a tandem of three starch-binding domains*. Proteins, 2006. **65**(1): p. 27-31.
68. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular cloning: a laboratory manual. third*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
69. Clough, S.J. and A.F. Bent, *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. Plant J, 1998. **16**(6): p. 735-43.
70. Ye, J., et al., *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC bioinformatics, 2012. **13**(1): p. 134.
71. Studier, F.W., *Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures*. Protein expression and purification, 2005. **41**(1): p. 207-234.
72. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
73. Wayllace, N.Z., et al., *The starch-binding capacity of the noncatalytic SBD2 region and the interaction between the N- and C-terminal domains are involved in the modulation of the activity of starch synthase III from Arabidopsis thaliana*. FEBS J, 2010. **277**(2): p. 428-40.

74. Krisman, C.R., *alpha-1,4-glucan: alpha-1,4-glucan 6-glycosyltransferase from liver*. Biochim Biophys Acta, 1962. **65**: p. 307-15.
75. Kerk, D., et al., *A chloroplast-localized dual-specificity protein phosphatase in Arabidopsis contains a phylogenetically dispersed and ancient carbohydrate-binding domain, which binds the polysaccharide starch*. Plant J, 2006. **46**(3): p. 400-13.
76. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. Journal of biological chemistry, 1951. **193**(1): p. 265-275.
77. Lisec, J., et al., *Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants*. Nature protocols, 2006. **1**(1): p. 387.
78. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): p. 3389-402.
79. Larkin, M.A., et al., *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics, 2007. **23**(21): p. 2947-8.
80. Okonechnikov, K., O. Golosova, and M. Fursov, *Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit*. Bioinformatics, 2012. **28**(8): p. 1166-7.
81. Tamura, K., et al., *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0*. Mol Biol Evol, 2013. **30**(12): p. 2725-9.
82. Pons, J.L. and G. Labesse, *@TOME-2: a new pipeline for comparative modeling of protein-ligand complexes*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Web Server issue): p. W485-91.
83. Møller, M.S., et al., *Oligosaccharide and substrate binding in the starch debranching enzyme barley limit dextrinase*. Journal of molecular biology, 2015. **427**(6): p. 1263-1277.
84. Noguchi, J., et al., *Crystal structure of the branching enzyme I (BEI) from Oryza sativa L with implications for catalysis and substrate binding*. Glycobiology, 2011. **21**(8): p. 1108-1116.

85. Feng, L., et al., *Crystal structures of Escherichia coli branching enzyme in complex with cyclodextrins*. Acta Crystallographica Section D: Structural Biology, 2016. **72**(5): p. 641-647.
86. Mikami, B., et al., *Crystal structure of pullulanase: evidence for parallel binding of oligosaccharides in the active site*. Journal of molecular biology, 2006. **359**(3): p. 690-707.
87. Vester-Christensen, M.B., et al., *Crystal structure of an essential enzyme in seed starch degradation: barley limit dextrinase in complex with cyclodextrins*. Journal of molecular biology, 2010. **403**(5): p. 739-750.
88. Sorimachi, K., et al., *Solution structure of the granular starch binding domain of Aspergillus niger glucoamylase bound to beta-cyclodextrin*. Structure, 1997. **5**(5): p. 647-61.
89. Bowie, J.U., R. Luthy, and D. Eisenberg, *A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure*. Science, 1991. **253**(5016): p. 164-170.
90. Luthy, R., J.U. Bowie, and D. Eisenberg, *Assessment of protein models with three-dimensional profiles*. Nature, 1992. **356**(6364): p. 83-5.
91. Lovell, S.C., et al., *Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation*. Proteins, 2003. **50**(3): p. 437-50.
92. Maiti, R., et al., *SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W590-4.
93. Lelandais, G., et al., *Ostreococcus tauri is a new model green alga for studying iron metabolism in eukaryotic phytoplankton*. BMC genomics, 2016. **17**(1): p. 319.
94. Blanc-Mathieu, R., et al., *An improved genome of the model marine alga Ostreococcus tauri unfolds by assessing Illumina de novo assemblies*. BMC Genomics, 2014. **15**: p. 1103.
95. Palenik, B., et al., *The tiny eukaryote Ostreococcus provides genomic insights into the paradox of plankton speciation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7705-10.

96. Kim, D., B. Langmead, and S.L. Salzberg, *HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements*. Nature methods, 2015. **12**(4): p. 357.
97. Robinson, J.T., et al., *Integrative genomics viewer*. Nature biotechnology, 2011. **29**(1): p. 24.
98. Pertea, M., et al., *StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads*. Nature biotechnology, 2015. **33**(3): p. 290.
99. Hillis, D.M. and J.J. Bull, *An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis*. Systematic biology, 1993. **42**(2): p. 182-192.
100. Stam, M.R., et al., *Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of  $\alpha$ -amylase-related proteins*. Protein Engineering Design and Selection, 2006. **19**(12): p. 555-562.
101. Park, B.H., et al., *CAZymes Analysis Toolkit (CAT): web service for searching and analyzing carbohydrate-active enzymes in a newly sequenced organism using CAZy database*. Glycobiology, 2010. **20**(12): p. 1574-1584.
102. Labesse, G. and J. Mornon, *Incremental threading optimization (TITO) to help alignment and modelling of remote homologues*. Bioinformatics, 1998. **14**(2): p. 206-11.
103. Wiederstein, M. and M.J. Sippl, *ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Web Server issue): p. W407-10.
104. Sippl, M.J., *Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 1993. **17**(4): p. 355-362.
105. Mikkelsen, R., K. Binderup, and J. Preiss, *Tyrosine residue 300 is important for activity and stability of branching enzyme from *Escherichia coli**. Archives of biochemistry and biophysics, 2001. **385**(2): p. 372-377.

106. van Bueren, A.L. and A.B. Boraston, *The structural basis of  $\alpha$ -glucan recognition by a family 41 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima**. Journal of molecular biology, 2007. **365**(3): p. 555-560.
107. Nakamura, Y., et al., *Characterization of the reactions of starch branching enzymes from rice endosperm*. Plant and cell physiology, 2010. **51**(5): p. 776-794.
108. Lee, B.-H., et al., *Heterologous expression and characterization of glycogen branching enzyme from *Synechocystis* sp. PCC6803*. Journal of microbiology and biotechnology, 2008. **18**(8): p. 1386-1392.
109. Tawil, G., et al., *In depth study of a new highly efficient raw starch hydrolyzing  $\alpha$ -amylase from *Rhizomucor* sp.* Biomacromolecules, 2010. **12**(1): p. 34-42.
110. Gao, D., et al., *Increased enzyme binding to substrate is not necessary for more efficient cellulose hydrolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(27): p. 10922-7.
111. Walker, J.A., et al., *Multifunctional cellulase catalysis targeted by fusion to different carbohydrate-binding modules*. Biotechnology for biofuels, 2015. **8**(1): p. 220.
112. Monnier, A., et al., *Orchestrated transcription of biological processes in the marine picoeukaryote *Ostreococcus* exposed to light/dark cycles*. BMC genomics, 2010. **11**(1): p. 192.
113. Buléon, A., et al., *Starch granules: structure and biosynthesis*. International journal of biological macromolecules, 1998. **23**(2): p. 85-112.
114. Melendez-Hevia, E., T. Waddell, and E. Shelton, *Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule*. Biochemical Journal, 1993. **295**(2): p. 477-483.
115. Ingkasuwan, P., et al., *Inferring transcriptional gene regulation network of starch metabolism in *Arabidopsis thaliana* leaves using graphical Gaussian model*. BMC systems biology, 2012. **6**(1): p. 100.
116. Jenkins, P. and A. Donald, *The influence of amylose on starch granule structure*. International Journal of Biological Macromolecules, 1995. **17**(6): p. 315-321.

117. Smith, A.M. and M. Stitt, *Coordination of carbon supply and plant growth*. Plant Cell Environ, 2007. **30**(9): p. 1126-49.
118. Myers, A.M., et al., *Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal*. Plant Physiology, 2000. **122**(4): p. 989-998.
119. Burton, R.A., et al., *Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity*. The Plant Journal, 2002. **31**(1): p. 97-112.
120. Kötting, O., et al., *Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment?* Current opinion in plant biology, 2010. **13**(3): p. 320-328.
121. Streb, S., S. Eicke, and S.C. Zeeman, *The simultaneous abolition of three starch hydrolases blocks transient starch breakdown in Arabidopsis*. J Biol Chem, 2012. **287**(50): p. 41745-56.
122. Boozer, C., et al., *Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format: a review of new surface plasmon resonance technologies*. Current opinion in biotechnology, 2006. **17**(4): p. 400-405.
123. Abdiche, Y., et al., *Determining kinetics and affinities of protein interactions using a parallel real-time label-free biosensor, the Octet*. Analytical biochemistry, 2008. **377**(2): p. 209-217.
124. Brient-Litzler, E., A. Plückthun, and H. Bedouelle, *Knowledge-based design of reagentless fluorescent biosensors from a designed ankyrin repeat protein*. Protein Engineering, Design & Selection, 2009. **23**(4): p. 229-241.
125. Sloan, D.J. and H.W. Hellinga, *Structure-based engineering of environmentally sensitive fluorophores for monitoring protein-protein interactions*. Protein engineering, 1998. **11**(9): p. 819-823.
126. Yan, Y. and G. Marriott, *Analysis of protein interactions using fluorescence technologies*. Current opinion in chemical biology, 2003. **7**(5): p. 635-640.

127. Leavitt, S. and E. Freire, *Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry*. *Current opinion in structural biology*, 2001. **11**(5): p. 560-566.
128. Pierce, M.M., C. Raman, and B.T. Nall, *Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions*. *Methods*, 1999. **19**(2): p. 213-221.
129. Darling, R.J. and P.-A. Brault, *Kinetic exclusion assay technology: characterization of molecular interactions*. *Assay and drug development technologies*, 2004. **2**(6): p. 647-657.
130. Pantoliano, M.W., et al., *High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery*. *Journal of biomolecular screening*, 2001. **6**(6): p. 429-440.
131. Lo, M.-C., et al., *Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery*. *Analytical biochemistry*, 2004. **332**(1): p. 153-159.
132. Niesen, F.H., H. Berglund, and M. Vedadi, *The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability*. *Nature protocols*, 2007. **2**(9): p. 2212-2221.
133. Isom, D.G., et al., *Picomole-scale characterization of protein stability and function by quantitative cysteine reactivity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. **107**(11): p. 4908-4913.
134. Ghaemmaghami, S., M. Fitzgerald, and T. Oas, *A quantitative, high-throughput screen for protein stability*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. **97**(15): p. 8296-8301.
135. Park, C. and S. Marqusee, *Pulse proteolysis: a simple method for quantitative determination of protein stability and ligand binding*. *Nature methods*, 2005. **2**(3): p. 207-212.
136. West, G.M., L. Tang, and M.C. Fitzgerald, *Thermodynamic analysis of protein stability and ligand binding using a chemical modification-and mass spectrometry-based strategy*. *Analytical chemistry*, 2008. **80**(11): p. 4175-4185.

137. Senisterra, G.A. and P.J. Finerty Jr, *High throughput methods of assessing protein stability and aggregation*. Molecular BioSystems, 2009. **5**(3): p. 217-223.
138. Brandts, J.F. and L.N. Lin, *Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry*. Biochemistry, 1990. **29**(29): p. 6927-6940.
139. Isom, D.G., et al., *A miniaturized technique for assessing protein thermodynamics and function using fast determination of quantitative cysteine reactivity*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2011. **79**(4): p. 1034-1047.
140. Layton, C.J. and H.W. Hellinga, *Thermodynamic analysis of ligand-induced changes in protein thermal unfolding applied to high-throughput determination of ligand affinities with extrinsic fluorescent dyes*. Biochemistry, 2010. **49**(51): p. 10831-10841.
141. Steinberg, T.H., et al., *SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein*. Analytical biochemistry, 1996. **239**(2): p. 223-237.
142. Lemoine, R., et al., *Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors*. Frontiers in Plant Science, 2013. **4**.
143. Li, C. and R.G. Gilbert, *Progress in controlling starch structure by modifying starch-branching enzymes*. Planta, 2016. **243**(1): p. 13-22.
144. Kim, W.-S., et al., *Expression of Escherichia coli branching enzyme in caryopses of transgenic rice results in amylopectin with an increased degree of branching*. Planta, 2005. **220**(5): p. 689-695.
145. Kortstee, A.J., et al., *Expression of Escherichia coli branching enzyme in tubers of amylose-free transgenic potato leads to an increased branching degree of the amylopectin*. The Plant Journal, 1996. **10**(1): p. 83-90.
146. Tanaka, N., et al., *The structure of starch can be manipulated by changing the expression levels of starch branching enzyme IIb in rice endosperm*. Plant Biotechnology Journal, 2004. **2**(6): p. 507-516.

147. Carciofi, M., et al., *Concerted suppression of all starch branching enzyme genes in barley produces amylose-only starch granules*. BMC plant biology, 2012. **12**(1): p. 223.
148. Albertsson, A.-C. and M. Hakkarainen, *Designed to degrade*. Science, 2017. **358**(6365): p. 872-873.
149. Li, L., et al., *Characterization of maize amylose-extender (ae) mutant starches. Part I: Relationship between resistant starch contents and molecular structures*. Carbohydrate polymers, 2008. **74**(3): p. 396-404.
150. Yandeu-Nelson, M.D., et al., *Starch-branching enzyme Ila is required for proper diurnal cycling of starch in leaves of maize*. Plant physiology, 2011. **156**(2): p. 479-490.
151. Delatte, T., et al., *Arabidopsis mutants Atisa1 and Atisa2 have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis*. The Plant Journal, 2005. **41**(6): p. 815-830.
152. Pfister, B., et al., *Genetic evidence that chain length and branch point distributions are linked determinants of starch granule formation in Arabidopsis*. Plant physiology, 2014. **165**(4): p. 1457-1474.
153. Lu, K.-J., et al., *Distinct Functions of STARCH SYNTHASE 4 Domains in Starch Granule Formation*. Plant physiology, 2017: p. pp. 01008.2017.
154. Courties, C., et al., *Phylogenetic analysis and genome size of Ostreococcus tauri (Chlorophyta, Prasinophyceae)*. Journal of Phycology, 1998. **34**(5): p. 844-849.
155. Gomez-Casati, D.F., M. Martin, and M.V. Busi, *Polysaccharide-synthesizing glycosyltransferases and carbohydrate binding modules: the case of starch synthase III*. Protein Pept Lett, 2013. **20**(8): p. 856-63.
156. Giardina, T., et al., *Both binding sites of the starch-binding domain of Aspergillus niger glucoamylase are essential for inducing a conformational change in amylose*. J Mol Biol, 2001. **313**(5): p. 1149-59.

157. Valk, V., et al., *Carbohydrate-binding module 74 is a novel starch-binding domain associated with large and multidomain  $\alpha$ -amylase enzymes*. The FEBS journal, 2016. **283**(12): p. 2354-2368.
158. Christiansen, C., et al., *The carbohydrate-binding module family 20--diversity, structure, and function*. FEBS J, 2009. **276**(18): p. 5006-29.
159. Machovic, M. and S. Janecek, *Starch-binding domains in the post-genome era*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(23): p. 2710-24.
160. Bouju, S., et al., *Molecular cloning and functional expression of a novel human gene encoding two 41-43 kDa skeletal muscle internal membrane proteins*. Biochem J, 1998. **335 ( Pt 3)**: p. 549-56.
161. Lohi, H.T. and B.A. Minassian, *Starch-like polyglucosan formation in neuronal dendrites in the Lafora form of human epilepsy: a theory of pathogenesis*. Biologia (Bratisl), 2005. **60**: p. 123-129.
162. Valdez, H.A., et al., *Preferential binding of SBD from Arabidopsis thaliana SSIII to polysaccharides: Study of amino acid residues involved*. Starch - Stärke, 2011. **63**(8): p. 451-460.
163. Liu, Z. and K.L. Schey, *Optimization of a MALDI TOF-TOF mass spectrometer for intact protein analysis*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2005. **16**(4): p. 482-490.
164. Marchler-Bauer, A. and S.H. Bryant, *CD-Search: protein domain annotations on the fly*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W327-31.
165. Moulager, M., et al., *Light-dependent regulation of cell division in Ostreococcus: evidence for a major transcriptional input*. Plant Physiol, 2007. **144**(3): p. 1360-9.
166. Geiger, D.R. and J.C. Servaites, *Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C3 plants*. Annual review of plant biology, 1994. **45**(1): p. 235-256.
167. Smith, A.M., K. Denyer, and C. Martin, *The Synthesis of the Starch Granule*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1997. **48**: p. 67-87.

168. Smith, A.M., S.C. Zeeman, and S.M. Smith, *Starch degradation*. Annu Rev Plant Biol, 2005. **56**: p. 73-98.
169. Stitt, M., et al., *Multilevel genomics analysis of carbon signalling during low carbon availability: coordinating the supply and utilisation of carbon in a fluctuating environment*. Functional Plant Biology, 2007. **34**(6): p. 526-549.
170. Gibon, Y., et al., *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 light period*. The Plant Journal, 2004. **39**(6): p. 847-862.
171. Usadel, B., et al., *Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in Arabidopsis rosettes*. Plant Physiol, 2008. **146**(4): p. 1834-61.
172. Yu, S.-M., *Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation*. Plant Physiology, 1999. **121**(3): p. 687-693.
173. Koch, K., *Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development*. Current opinion in plant biology, 2004. **7**(3): p. 235-246.
174. Gibson, S.I., *Control of plant development and gene expression by sugar signaling*. Current opinion in plant biology, 2005. **8**(1): p. 93-102.
175. Rolland, F., E. Baena-Gonzalez, and J. Sheen, *Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms*. Annu. Rev. Plant Biol., 2006. **57**: p. 675-709.
176. Koch, K., *Carbohydrate-modulated gene expression in plants*. Annual review of plant biology, 1996. **47**(1): p. 509-540.
177. Contento, A.L., S.-J. Kim, and D.C. Bassham, *Transcriptome profiling of the response of Arabidopsis suspension culture cells to Suc starvation*. Plant physiology, 2004. **135**(4): p. 2330-2347.

178. Price, J., et al., *Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2004. **16**(8): p. 2128-2150.
179. Thum, K.E., et al., *Genome-wide investigation of light and carbon signaling interactions in Arabidopsis*. *Genome biology*, 2004. **5**(2): p. R10.
180. Li, Y., et al., *Establishing glucose-and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine*. *Genome Research*, 2006. **16**(3): p. 414-427.
181. Osuna, D., et al., *Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived Arabidopsis seedlings*. *The Plant Journal*, 2007. **49**(3): p. 463-491.
182. Gibon, Y., et al., *A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness*. *The Plant Cell*, 2004. **16**(12): p. 3304-3325.
183. Gibon, Y., et al., *Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in Arabidopsis rosettes*. *Genome biology*, 2006. **7**(8): p. R76.
184. Peng, H., et al., *A starch-binding domain identified in alpha-amylase (AmyP) represents a new family of carbohydrate-binding modules that contribute to enzymatic hydrolysis of soluble starch*. *FEBS Lett*, 2014. **588**(7): p. 1161-7.
185. Popper, Z.A. and M.G. Tuohy, *Beyond the green: understanding the evolutionary puzzle of plant and algal cell walls*. *Plant physiology*, 2010. **153**(2): p. 373-383.
186. Vivian, J.T. and P.R. Callis, *Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins*. *Biophys J*, 2001. **80**(5): p. 2093-109.
187. Reddy, N., A. Nimmagadda, and K.S. Rao, *An overview of the microbial  $\alpha$ -amylase family*. *African Journal of Biotechnology*, 2003. **2**(12): p. 645-648.

188. Rajagopalan, G. and C. Krishnan,  *$\alpha$ -Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate*. Bioresource technology, 2008. **99**(8): p. 3044-3050.
189. Souza, P.M.d., *Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry-A review*. Brazilian Journal of Microbiology, 2010. **41**(4): p. 850-861.
190. Gupta, R., et al., *Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective*. Process biochemistry, 2003. **38**(11): p. 1599-1616.
191. Božić, N., et al., *Raw starch degrading  $\alpha$ -amylases: an unsolved riddle*. Amylase, 2017. **1**(1): p. 12-25.
192. Janecek, S., B. Svensson, and E.A. MacGregor, *Structural and evolutionary aspects of two families of non-catalytic domains present in starch and glycogen binding proteins from microbes, plants and animals*. Enzyme Microb Technol, 2011. **49**(5): p. 429-40.
193. Janecek, S. and J. Sevcik, *The evolution of starch-binding domain*. FEBS Lett, 1999. **456**(1): p. 119-25.
194. Janecek, S., B. Svensson, and E.A. MacGregor, *Relation between domain evolution, specificity, and taxonomy of the alpha-amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain*. Eur J Biochem, 2003. **270**(4): p. 635-45.
195. Machovic, M., et al., *A new clan of CBM families based on bioinformatics of starch-binding domains from families CBM20 and CBM21*. FEBS J, 2005. **272**(21): p. 5497-513.
196. Gentry, M.S., J.E. Dixon, and C.A. Worby, *Lafora disease: insights into neurodegeneration from plant metabolism*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(12): p. 628-39.
197. Nanmori, T., et al., *Cloning of the beta-amylase gene from *Bacillus cereus* and characteristics of the primary structure of the enzyme*. Appl Environ Microbiol, 1993. **59**(2): p. 623-7.

198. Mikami, B., et al., *Structure of raw starch-digesting Bacillus cereus beta-amylase complexed with maltose*. Biochemistry, 1999. **38**(22): p. 7050-61.
199. Yamaguchi, T., et al., *Cloning, sequencing, and expression of a beta-amylase gene from Bacillus cereus var. mycoides and characterization of its products*. Biosci Biotechnol Biochem, 1996. **60**(8): p. 1255-9.
200. Lo, H.F., et al., *Deletion analysis of the C-terminal region of the alpha-amylase of Bacillus sp. strain TS-23*. Arch Microbiol, 2002. **178**(2): p. 115-23.
201. Kaneko, A., et al., *Molecular cloning and determination of the nucleotide sequence of a gene encoding an acid-stable  $\alpha$ -amylase from Aspergillus kawachii*. Journal of fermentation and bioengineering, 1996. **81**(4): p. 292-298.
202. Sauer, J., et al., *Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 2000. **1543**(2): p. 275-293.
203. Coutinho, P.M. and P.J. Reilly, *Glucoamylase structural, functional, and evolutionary relationships*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 1997. **29**(3): p. 334-347.
204. Bott, R., et al., *Three-dimensional structure of an intact glycoside hydrolase family 15 glucoamylase from Hypocrea jecorina*. Biochemistry, 2008. **47**(21): p. 5746-5754.
205. Klein, C. and G.E. Schulz, *Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution*. Journal of molecular biology, 1991. **217**(4): p. 737-750.
206. Lawson, C.L., et al., *Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from Bacillus circulans strain 251 in a maltose-dependent crystal form*. J Mol Biol, 1994. **236**(2): p. 590-600.
207. Penninga, D., et al., *The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from Bacillus circulans strain 251*. J Biol Chem, 1996. **271**(51): p. 32777-84.

208. Wind, R.D., et al., *Cyclodextrin formation by the thermostable alpha-amylase of Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes EM1 and reclassification of the enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(4): p. 1257-1265.
209. Knegtel, R.M., et al., *Crystal Structure at 2.3 Å Resolution and Revised Nucleotide Sequence of the Thermostable Cyclodextrin Glycosyltransferase from Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes EM1*. Journal of molecular biology, 1996. **256**(3): p. 611-622.
210. Uitdehaag, J.C., et al., *Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypical transglycosylase from the α-amylase family*. Enzyme and Microbial Technology, 2002. **30**(3): p. 295-304.
211. Chrétiennot-Dinet, M., et al., *A new marine picoeucaryote: Ostreococcus tauri gen. et sp. nov. (Chlorophyta, Prasinophyceae)*. Phycologia, 1995. **34**(4): p. 285-292.
212. Guillén, D., et al., *The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification*. Applied microbiology and biotechnology, 2013. **97**(9): p. 4141-4148.
213. Guillen, D., et al., *Alpha-amylase starch binding domains: cooperative effects of binding to starch granules of multiple tandemly arranged domains*. Applied and environmental microbiology, 2007. **73**(12): p. 3833-3837.
214. Ohdan, K., et al., *Introduction of Raw Starch-Binding Domains into Bacillus subtilis α-Amylase by Fusion with the Starch-Binding Domain of Bacillus Cyclomaltodextrin Glucanotransferase*. Applied and environmental microbiology, 2000. **66**(7): p. 3058-3064.