

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**TESIS DOCTORAL**

**“Caracterización de un ADNc de fresa específico de frutos maduros  
que presenta homología con péptido metionina sulfóxido reductasas”**



**ANDRÉS PEDRAZA LÓPEZ  
CÓRDOBA 1999**

Facultad de Ciencias  
Universidad de Córdoba

**“Caracterización de un ADNc de fresa específico de frutos maduros que presenta homología con péptido metionina sulfóxido reductasas”**

Memoria presentada por

**Andrés Pedraza López**

para optar al grado de

**Doctor en Ciencias Biológicas**

Córdoba, Enero de 1.999

Director

Dr. Antonio Rodríguez Franco  
Prof. Titular de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad de Córdoba

ANTONIO RODRÍGUEZ FRANCO, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba,

INFORMA:

Que el trabajo titulado **“Caracterización de un ADNc de fresa específico de frutos maduros que presenta homología con péptido metionina sulfóxido reductasas”** ha sido realizado bajo mi dirección por **Andrés Pedraza López**, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Córdoba, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (Sección Ciencias) de la Universidad de Córdoba y reúne todos los requisitos exigidos por la legislación vigente para optar al grado de Doctor, por lo que autorizo la presentación de esta Tesis para que sea defendida en acto público en la Universidad de Córdoba.

Y para que conste, firmo el presente documento en Córdoba a veintisiete de Enero de mil novecientos noventa y nueve.

Antonio Rodríguez Franco

EMILIO FERNÁNDEZ REYES, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba

INFORMA: Que el trabajo titulado **“Caracterización de un ADNc de fresa específico de frutos maduros que presenta homología con péptido metionina sulfóxido reductasas”** ha sido realizado por Andrés Pedraza López, bajo la dirección de D. Antonio Rodríguez Franco en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (Sección Ciencias) de la Universidad de Córdoba, reuniendo todos los requisitos exigidos por la legislación vigente para optar al grado de Doctor. La propuesta del tribunal que ha de juzgar dicho trabajo fue aprobada en el Consejo de Departamento del veintisiete de Enero de mil novecientos noventa y nueve.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Córdoba, a veintisiete de Enero de mil novecientos noventa y nueve.

Emilio Fernández Reyes

# ÍNDICE

---

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	12
<b>1. REACTIVOS</b>	12
1.1 <b>Reactivos y productos químicos</b>	12
1.2 <b>Soluciones</b>	13
1.2.1 <u>Soluciones generales</u>	13
1.2.2 <u>Soluciones para la purificación de DNA y RNA</u>	14
1.2.2.1 <b>Soluciones para el aislamiento y purificación de plásmidos</b>	14
1.2.2.2 <b>Soluciones para la purificación de DNA del fago <math>\lambda</math>FixII</b>	14
1.2.2.3 <b>Tampones y soluciones para la extracción de RNA total</b>	15
1.2.2.4 <b>Soluciones para la obtención de mRNA poliadenilado</b>	15
1.2.2.5 <b>Tampones y soluciones para la extracción de DNA genómico</b>	15
1.2.2.6 <b>Soluciones para la purificación de DNA mediante matriz de sílice</b>	16
1.2.3 <u>Soluciones para la hibridación de ácidos nucleicos</u>	16
1.2.4 <u>Fenol neutro</u>	16
1.2.5 <u>Suspensión de glutatión-agarosa</u>	17
1.2.6 <u>Formamida desionizada</u>	17
1.2.7 <u>Mezcla de acrilamida/bisacrilamida</u>	17
1.3 <b>Tampones</b>	17
1.4 <b>Medios de cultivo</b>	21
1.5 <b>Antibióticos</b>	22
1.6 <b>Enzimas</b>	22
1.6.1 <u>Enzimas modificadoras</u>	22
1.6.1.1 <b>Notas sobre las enzimas modificadoras</b>	23
<b>2. MATERIAL BIOLÓGICO. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO</b>	23
2.1 <b>Material vegetal</b>	23
2.1.1 <u>Plantas de fresa</u>	23
2.1.2 <u>Estadios de frutos de fresa</u>	24
2.1.3 <u>Tratamiento de los frutos con auxinas</u>	25
2.2 <b>Estirpes bacterianas</b>	25
2.2.1 <u>Medios de cultivo</u>	25
2.2.2 <u>Condiciones de cultivo</u>	26
2.3 <b>Plásmidos utilizados</b>	26

---

<b>3. TÉCNICAS DE CLONACIÓN MOLECULAR. MANIPULACIÓN DE MOLÉCULAS DE DNA</b>	27
3.1 Preparación de células competentes	27
3.2 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	27
3.3 Fraccionamiento de moléculas de DNA y purificación de fragmentos de restricción	28
3.4 Tratamiento para la obtención de fragmentos de DNA con extremos romos	29
3.5 Ligación de fragmentos de DNA a vectores plasmídicos	30
<b>4. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO (DOBLE CADENA)</b>	30
4.1 Minipreparaciones de DNA plasmídico por lisis alcalina	31
4.2 Minipreparaciones de DNA plasmídico por columna	31
4.3 Maxipreparaciones de DNA plasmídico	31
<b>5. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS</b>	32
<b>6. MARCAJE RADIATIVO DE MOLÉCULAS DE DNA Y RNA</b>	33
6.1 Marcaje de DNA	33
6.2 Marcaje de RNA	34
<b>7. AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO DE FRESA</b>	35
<b>8. FRACCIONAMIENTO, TRANSFERENCIA Y CONDICIONES DE HIBRIDACIÓN DE DNA DE FRESA</b>	35
8.1 Fraccionamiento	35
8.2 Transferencia	36
8.3 Condiciones de hibridación	36
<b>9. AISLAMIENTO DE RNA DE FRESA</b>	37
9.1 Aislamiento de RNA de frutos de fresa	37
9.2 Aislamiento de RNA de aquenios	38
<b>10. SEPARACIÓN, TRANSFERENCIA Y CONDICIONES DE HIBRIDACIÓN DE RNA DE FRUTOS DE FRESA</b>	39
10.1 Separación	39
10.2 Transferencia	39
10.3 Condiciones de hibridación	39
<b>11. AISLAMIENTO DE mRNA POLIADENILADO (POLI A) A PARTIR DE RNA TOTAL DE FRUTOS DE FRESA</b>	40
<b>12. AMPLIFICACIÓN DE EXTREMOS DE cDNA</b>	40

---

<b>13. CONSTRUCCIÓN Y ESCRUTINIO DE UNA GENOTECA GENÓMICA DE FRESA EN EL BACTERIÓFAGO <math>\lambda</math>FIXII</b>	43
13.1 Digestión parcial de DNA genómico con <i>Sau3AI</i> y obtención de fragmentos de 9 a 23 kb	43
13.2 Reacción de relleno parcial de los extremos cohesivos	43
13.3 Reacción de ligación a los brazos de $\lambda$ FIXII	44
13.4 Empaquetamiento, amplificación y escrutinio de la genoteca	44
<b>14. PURIFICACIÓN DE DNA DE BACTERIÓFAGO <math>\lambda</math>FIXII</b>	45
<b>15. DELECCIONES UNIDIRECCIONALES DEL DNA CON EXONUCLEASA III</b>	45
<b>16. SECUENCIACIÓN</b>	47
<b>17. EXPRESIÓN EN <i>E. coli</i> DEL GEN DE LA PMSR</b>	48
17.1 Estrategia de expresión	48
17.2 Clonación del cDNA que codifica una PMSR en el vector pGEX-KG	48
17.3 Inducción de la proteína de fusión	49
17.4 Purificación de la PMSR expresada en <i>E. coli</i>	50
17.5 Purificación de anticuerpos policlonales anti-PMSR	51
<b>18. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS</b>	51
18.1 Determinación de proteína	51
18.2 SDS-PAGE	51
18.3 Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida	52
<b>19. TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS. INMUNODETECCIÓN EN FILTROS (WESTERN BLOT)</b>	52
19.1 Electrotransferencia de proteínas	52
19.2 Tinción de proteínas en nitrocelulosa	52
19.3 Inmunodetección específica de PMSR	53
<b>20. TRANSFORMACIÓN DE FRESAS MEDIANTE BIOBALÍSTICA</b>	54
20.1 Esterilización del material de disparo	54
20.2 Esterilización de la fresa	54
20.3 Precipitación del DNA plasmídico de interés con las partículas de oro	54
20.4 Ensayo $\beta$ - glucuronidasa (GUS)	55
<b>21. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS</b>	56
21.1 Superóxido dismutasa	56



---

21.2 Catalasa	57
21.3 Peroxidasa	58
21.4 Actividad metionina sulfóxido reductasa (MSR)	58
<b>III. CAPÍTULO I</b>	60
1.1 Introducción	60
1.2 Resultados y Discusión	62
1.2.1 <u>Clonación del cDNA y análisis de la secuencia</u>	62
1.2.2 <u>Análisis mediante transferencia Southern del gen de la PMSR de fresa</u>	68
1.2.3 <u>Clonación del gen que codifica la PMSR de fresa</u>	69
1.2.4 <u>Análisis de restricción de los fagos obtenidos</u>	69
1.2.5 <u>Análisis de la secuencia nucleotídica</u>	70
1.2.6 <u>Análisis de la expresión de los genes de la PMSR de fresa mediante RT-PCR</u>	79
1.2.7 <u>Análisis de la expresión génica mediante experimentos de northern</u>	81
1.2.8 <u>Regulación hormonal en la expresión de la PMSR de fresa</u>	84
1.2.9 <u>Estudio de la expresión transitoria del gen PMSR2</u>	85
<b>IV. CAPÍTULO II</b>	89
2.1 Introducción	89
2.2 Resultados y Discusión	92
2.2.1 <u>Expresión y purificación de la PMSR de fresa en <i>E. coli</i></u>	92
2.2.2 <u>Ensayo de protección frente al peróxido de hidrógeno</u>	93
2.2.3 <u>Determinación enzimática de actividad</u>	95
2.2.4 <u>Análisis de la expresión de la PMSR mediante western blot</u>	101
<b>V. CAPÍTULO III</b>	103
3.1 Introducción	103
3.2 Resultados y Discusión	104
3.2.1 <u>Clonación del cDNA y análisis de la secuencia</u>	104
3.2.2 <u>Análisis de la expresión génica</u>	108
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	110
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	111

# **I. INTRODUCCIÓN**

La fresa es un fruto de gran interés agronómico y económico en España. De hecho, la producción mundial de fresa (*Fragaria x ananassa*, Duch.) es del orden de 2 millones de toneladas, siendo España con un 10% de la producción total el segundo productor del mundo detrás de EE.UU., que aporta el 22% de la producción. En nuestro país este fruto se cultiva principalmente en la provincia de Huelva, donde en 1991 ya se producía el 91% de la producción nacional (López Aranda et al., 1992). El fruto de fresa, por sus características morfológicas, se clasifica como un fruto blando. De entre los frutos blandos, la fresa es posiblemente el mejor estudiado desde el punto de vista fisiológico y bioquímico. Esto, indudablemente, se debe a su importancia y a su estructura poco usual de “falso fruto”, siendo el verdadero fruto el aquenio, pequeña semilla dispuesta en el exterior de un gran receptáculo blando y unido a él mediante conexiones vasculares. Sin embargo, a lo largo de este trabajo nos referiremos al fruto como al conjunto de ambos órganos.

El fruto de la fresa presenta una fase inicial de crecimiento y alargamiento que es seguida por una fase en la que tiene lugar la maduración. La maduración se define como un conjunto de cambios físico-químicos característicos de cada fruto que normalmente implica cambios de color originados por la degradación de pigmentos que ya existían y por la síntesis de nuevos pigmentos. Además, tienen lugar cambios de textura que dan lugar al reblandecimiento del tejido y a veces licuefacción, y a la producción de sabores y aromas altamente distintivos que pueden afectar la palatabilidad del fruto. Por tanto, la maduración es parte de un proceso de desarrollo continuo en el cual una serie de fases fisiológicas pueden solaparse.

### **Fisiología de la maduración del fruto de la fresa**

El fruto de la fresa crece rápidamente obteniéndose el tamaño completo aproximadamente a los 30 días después de la caída de los pétalos (antesis). La cinética de crecimiento del fruto de la fresa varía con el cultivar. Así, algunos cultivares poseen una única fase simple de crecimiento de tipo sigmoidal (Forney y Breen, 1985), mientras que otros muestran un patrón de crecimiento bifásico (Archbold y Dennis, 1984; Perkins-Veazie y Huber, 1987).

En una descripción detallada del fruto de la fresa durante el desarrollo (Knee et al., 1977), se demuestra que el crecimiento del receptáculo se debe principalmente a una combinación de división y expansión celular. Esta proliferación celular se

completa a los 7 días. El crecimiento posterior del receptáculo tiene lugar fundamentalmente por un aumento del volumen celular. El alargamiento celular se acompaña de cambios en las paredes celulares y la estructura subcelular. El reblandecimiento del fruto durante la maduración es acompañado por un incremento en la hidratación y una desorganización de la pared celular y por una significativa solubilización de la lamela media y la matriz de la pared celular.

### **Bioquímica de la maduración del fruto de la fresa**

Los azúcares son uno de los principales componentes solubles en los frutos blandos y, fundamentalmente, proveen energía para la mayor parte de las reacciones metabólicas. En los frutos maduros de la fresa, la glucosa y la fructosa están presentes en concentraciones similares y representan un 83% del contenido total de azúcares (Wrolstad y Shallenberger, 1981). Además, son componentes importantes del sabor.

Al igual que los azúcares, los ácidos orgánicos son importantes componentes tanto del aroma como del sabor. La relación azúcar/ácido se usa muy frecuentemente como un índice que predice la calidad del fruto y su aceptabilidad por el consumidor. En la fresa, los ácidos orgánicos no volátiles son cuantitativamente los componentes más importantes que determinan la acidez del fruto. Se han realizado extensos estudios sobre la composición cualitativa de los componentes volátiles en la fresa. Así, se han encontrado numerosos compuestos tales como ésteres de alcoholes y ácidos grasos, alcoholes, carbonilos, etc.

Es de destacar que además se han encontrado componentes azufrados en los receptáculos que, aunque están presentes en menor concentración que otros componentes volátiles, parecen jugar un papel fundamental en el sabor y aroma de la fresa (Dirinck et al., 1981). La mezcla de compuestos volátiles que proporcionan el aroma y el sabor de la fresa es compleja, llegándose a describir más de 200 componentes, siendo el ácido linoléico y sus derivados y el furaneol (2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona) los más importantes. Los frutos inmaduros carecen del característico sabor de la fresa ya que no poseen los componentes volátiles presentes en el fruto maduro que confieren importantes propiedades organolépticas.

El estudio de la biosíntesis de los compuestos responsables del aroma en los frutos blandos es inevitablemente complejo debido al gran número de componentes volátiles que se han identificado. Los frutos de la fresa maduros son capaces de

metabolizar un rango de aldehídos añadidos exógenamente con sus alcoholes dando lugar a una variedad de ésteres por reacción con los ácidos endógenos (Yamashita et al., 1976). El metabolismo de los precursores aromáticos de los frutos de la fresa puede ser modificado por factores como la adición de diversos cofactores y por la temperatura. La presencia de oxígeno parece ser esencial para el metabolismo de algunos precursores (Drawert y Berger, 1983).

La razón de por qué los compuestos aromáticos están presentes en los frutos y de cómo se regula su síntesis son importantes cuestiones. En términos generales, se ha propuesto como poco razonable la existencia de numerosas enzimas diferentes cada una de ellas responsable de la síntesis de sólo uno de estos compuestos. Esto requeriría un enorme gasto de energía para la síntesis de proteínas y la producción de sustancias que finalmente están destinadas a perderse con el fruto. Se ha propuesto que la enorme diversidad de las sustancias aromáticas presentes en el fruto maduro puede simplemente reflejar la pérdida de especificidad absoluta de enzimas tales como reductasas, esterasas, oxidasas, etc., implicadas en su formación (Yamashita et al., 1977).

Entre los componentes más importantes presentes en frutos maduros están los derivados fenólicos, que comprenden un grupo diverso de sustancias incluyendo metabolitos secundarios de plantas como los polifenoles (taninos), proantocianidinas (taninos condensados) y ésteres de los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico. Los compuestos fenólicos son componentes normales de los frutos (Hulme, 1971; Foo y Porter, 1980; Schuster y Herrmann, 1985) que afectan al gusto, la palatabilidad y el valor nutricional del fruto. Además, son responsables de la astringencia, ya que interaccionan con las proteínas y los mucopolisacáridos de la saliva (Ozawa et al., 1987). La astringencia de los frutos blandos se pierde a lo largo de la maduración, aunque este hecho no necesariamente se correlaciona con una disminución en el contenido de polifenoles solubles. Ozawa et al. (1987) demostraron que la presencia de polisacáridos puede inhibir la unión de los polifenoles a las proteínas. Así, estos autores sugirieron que en algunos frutos la pérdida de astringencia durante la maduración puede ser debida a interacciones entre las pectinas solubles y los polifenoles.

## **Cambios en la pared celular durante la maduración de la fresa**

Se conoce que la estructura celular y en particular la naturaleza e integridad de los polímeros de la pared celular determina las propiedades físicas de los tejidos de las plantas. La rapidez con la que los frutos blandos pierden su firmeza durante la maduración es un factor importante que determina la calidad del fruto y su vida media postcosecha.

La mayoría de los estudios y revisiones sobre la composición de la pared celular en la fresa se han centrado en el estudio de las sustancias pécticas, el principal carbohidrato encontrado en la lamela media. Una alta proporción de compuestos poliurónidos solubles se encuentra en el receptáculo tras la caída de los pétalos y también en los frutos maduros (Knee et al., 1977). Huber (1984) encontró que la proporción de compuestos poliurónidos totales solubles incrementa desde el 30% en frutos verdes hasta el 65% en frutos maduros. El incremento en la hidratación de la pared celular durante la maduración coincide con un aumento en la solubilidad de los compuestos poliurónidos (Knee et al., 1977). Sin embargo, poco se sabe acerca de las alteraciones de la celulosa, el principal carbohidrato componente de la pared celular, durante la maduración de los frutos blandos.

## **Pigmentos durante la maduración de la fresa**

La presencia de pigmentos en los frutos es significativa por una serie de razones. Los frutos y en particular los frutos blandos, muchos de los cuales están altamente coloreados, pueden necesitar los pigmentos para atraer a los comensales, ayudando así en la dispersión de las semillas. Además, los pigmentos son importantes componentes estéticos debido a que son indicadores naturales de la maduración del fruto, y algunos pigmentos, incluyendo carotenoides y flavonoides, tienen actividad vitamínica.

Durante la maduración de la fresa hay una destrucción de clorofila que coincide con la desaparición de los cloroplastos y con un descenso en el contenido de carotenoides (Gross, 1982). Las antocianinas, encontradas en muchos frutos blandos, son flavonoides derivados de metabolitos secundarios de la ruta de los fenilpropanoides y son los responsables de la intensa coloración roja de los frutos de la fresa. La biosíntesis de los flavonoides es una de las rutas bioquímicas más

estudiadas en las plantas, pero hasta hace relativamente poco tiempo había pocos estudios de la misma en frutos blandos. Se piensa que la síntesis de antocianinas en el fruto transcurre a través de una ruta común desde el precursor metabólico fenilalanina. La fenilalanina amonio liasa (PAL), primera enzima en la ruta, juega un papel central en dirigir la síntesis hacia metabolitos secundarios y por ello ha sido extensamente estudiada. Aoki et al. (1970) demostraron que la actividad PAL en frutos de fresa maduros es mucho mayor que en frutos verdes. Se encontró una correlación muy estrecha entre la actividad PAL y la concentración de antocianinas, que incrementa durante la maduración (Hyodo, 1971).

### **Respiración durante la maduración de los frutos**

Los frutos se han clasificado como climatéricos y no climatéricos basándose en los patrones de respiración que transcurren durante la maduración. Así, los frutos climatéricos presentan un pico de máxima actividad respiratoria (medida como consumo de oxígeno) que coincide con el comienzo de la maduración. Por el contrario, los frutos no climatéricos son aquellos en los cuales la respiración y el consumo de oxígeno descienden gradualmente a lo largo de la maduración. La mayoría de los frutos blandos, incluida la fresa, están clásicamente definidos como frutos no climatéricos en base a la ya mencionada pérdida de actividad respiratoria a lo largo del desarrollo del fruto.

Por otro lado, la producción de etileno, que suele utilizarse también como criterio para este tipo de clasificación, es más baja en los frutos no climatéricos que en los climatéricos. En estos últimos, esta producción de etileno suele estar asociada con un número de cambios en la maduración, incluyendo el reblandecimiento del fruto y la síntesis de pigmentos. Se conoce que esta hormona coordina e inicia eventos de maduración en estos frutos. En frutos climatéricos se han aislado y clonado al menos 19 mRNAs que se inducen por la acción del etileno. Muchos de estos genes se han secuenciado y se han utilizado para la construcción de plantas transgénicas con modificaciones en su patrón de maduración. Entre los genes clonados e identificados en tomate están los que codifican enzimas que degradan la pared celular (poligalacturonasa y pectinesterasa) (Grierson et al., 1986; Harriman y Handa, 1990), así como algunos que codifican enzimas relacionadas con la síntesis de etileno (ACC sintasa) (Hamilton et al., 1990; 1991). También se han realizado estudios de las

regiones 5' que flanquean dichos genes y se han identificado los factores de transcripción que se unen a los promotores que regulan dichos genes (Deikman y Fischer, 1988). La expresión en plantas transgénicas que contienen construcciones antisentido ha demostrado ser una metodología útil para inhibir la expresión de genes específicos de la maduración, así como para identificar otros de función desconocida. Asimismo, y mediante esta metodología, se han conseguido frutos con características alteradas, como maduración retardada y resistencia al reblandecimiento de los frutos (Smith et al., 1988; 1990; Oeller et al., 1991). Esto demuestra que este tipo de metodologías son útiles para obtener frutos más adecuados para el agricultor y en último término para el consumidor. Además, estos resultados han demostrado que el etileno en los frutos climatéricos es el componente que inicia todos los eventos de maduración, y no es un producto-efecto consecuencia de la maduración en los frutos climatéricos.

El papel del etileno en los frutos no climatéricos parece ser diferente. Los cambios en la maduración en los frutos no climatéricos transcurren sin que tenga lugar un aumento significativo en la producción del etileno.

### **Regulación hormonal del desarrollo y la maduración del fruto de la fresa**

La fresa ha sido el fruto blando más estudiado en el aspecto de la regulación hormonal de su desarrollo. Su estructura única, con los aquenios en el exterior del fruto, ha permitido que normalmente sea utilizado como modelo para estudiar el papel de las semillas en el desarrollo, puesto que éstos pueden separarse de una forma relativamente fácil del fruto con poco daño físico para las restantes partes del mismo.

Los clásicos estudios de Nitsch (1950; 1955) usando bioensayos para estimar la concentración de hormonas endógenas, demostraron que el crecimiento del receptáculo de la fresa está influenciado por la presencia de los aquenios. Nitsch demostró que la aplicación de hormonas sintéticas (auxinas o sus análogos) puede restaurar el crecimiento de los receptáculos de la fresa en los cuales los aquenios han sido retirados, y que los aquenios sintetizan y proveen de la auxina indol-3-ácido acético (IAA).

Desde hace tiempo, se han venido obteniendo resultados contradictorios en relación al papel de los aquenios en la maduración del fruto de la fresa. Nitsch (1950) y posteriormente Guttridge y Nunns (1974) mostraron que la retirada de los aquenios



de los receptáculos *in situ* no afecta a la maduración. Por otra parte, Mudge et al. (1981) observaron que la maduración se retrasa en frutos partenocárpicos tratados con la auxina artificial ácido naftalenacético (NAA) y sugirieron que la maduración podría ser manipulada para usos hortofrutícolas usando hormonas reguladoras del crecimiento. Kano y Asahira (1978) describieron que el fruto desaqueñizado cultivado *in vitro* madura antes que el fruto intacto.

Evidencias claras de la participación de los aquenios en la maduración han sido obtenidas por Given et al. (1988c). En ese estudio, usando el cultivar Brighton, mostraron que en un fruto de fresa verde, la retirada de los aquenios de la mitad del receptáculo acelera la maduración en la mitad desaqueñizada, medida por la acumulación de antocianinas y por la pérdida de clorofila y firmeza. Sin embargo, el aumento de la concentración de antocianinas y de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), se inhibió por la aplicación de las auxinas sintéticas ácido naftalenacético (NAA) y ácido 2,4 fenoxiacético (2,4 D) pero no por el ácido fenoxiacético (POA), análogo inactivo de las auxinas

Given et al. (1988a), propusieron que en el fruto normal, las auxinas producidas por los aquenios inhiben la maduración en los frutos verdes. Con el desarrollo del fruto la concentración de auxinas en los aquenios desciende y este hecho inicia y modula la maduración. Esto implica que la cantidad de IAA libre en el receptáculo debe disminuir hasta una concentración crítica permitiendo que proceda la maduración. El que la concentración de auxinas pueda ser la principal hormona que influye en la maduración de la fresa está apoyado por la insensibilidad del fruto de la fresa al etileno durante este proceso, por la producción débil de etileno endógena (Knee et al., 1977; Abeles y Takeda, 1990), por la no respuesta a etileno exógeno (Iwata et al., 1969b; Hoad et al., 1971) y por la ausencia de efectos tras la aplicación de inhibidores de la síntesis del etileno tales como la aminoetoxivinilglicina (AVG) o de sustancias que bloquean la percepción del etileno como las sales de plata y el norbornadieno (Given et al., 1988c).

El foco de interés en el papel de las auxinas en el desarrollo del fruto de la fresa se debe a la capacidad de estas hormonas de crecimiento de sustituir la polinización normal en el crecimiento del fruto en los frutos partenocárpicos. Sin embargo, esto no significa que otras hormonas como las giberelinas, las citoquininas y el ácido abcísico, puedan intervenir en el proceso de maduración (Lis et al., 1978). Así, la giberelina GA<sub>3</sub> actúa sinérgicamente con la hormona naftalenacetamida

(NAAm) en frutos intactos cultivados *in vitro* promoviendo el crecimiento y la maduración (Kano y Asahira, 1978). Estos autores también demostraron que la citoquinina N<sup>6</sup>-benziladenina (BA) suprime el crecimiento y la maduración cuando se aplica junto con NAAm. Estos experimentos permiten concluir que la auxina juega un papel principal como hormona dominante en la regulación del crecimiento y la maduración de frutos de la fresa, pero también que sus efectos pueden ser modificados por otros tipos de hormonas.

El efecto de la temperatura durante el desarrollo del akenio y su relación con la maduración está correlacionado con la actividad citoquinina en el akenio, donde principalmente se localiza (Kano y Asahira, 1979). Se ha sugerido que durante el tratamiento de los frutos a baja temperatura, la maduración se retrasa debido a que hay una elevada concentración de citoquininas como consecuencia del desarrollo tardío de los akenios.

Debido a las diferencias observadas en la sensibilidad de los frutos climatéricos y no climatéricos al etileno y a las auxinas, se desconoce si ambos tipos de fruto comparten el mismo juego de genes implicados en la maduración. Así, por ejemplo, determinados genes, como aquellos que podrían ser inducidos por el incremento en la actividad respiratoria (por ejemplo, proteínas de protección contra los radicales y derivados oxigenados), no debiera esperarse que se indujeran, al menos en altas concentraciones, en los frutos de la fresa ya que no tiene lugar el climaterio o incremento en la actividad respiratoria.

### **Expresión génica durante el desarrollo y la maduración**

La mayor parte de los estudios de la regulación de la expresión génica durante el desarrollo y la maduración de los frutos blandos, y en particular en la fresa, se han centrado en aquellos genes cuya expresión queda alterada por la adición o eliminación de auxinas. Así, la síntesis de antocianinas, que parece estar regulada en la maduración del fruto de la fresa por la síntesis de *novo* de la enzima PAL, se inhibe por la aplicación exógena de auxinas (Given et al., 1988b). Las diferentes formas de invertasa pueden estar diferencialmente reguladas por las auxinas durante el desarrollo del fruto temprano (Poovaiah y Veluthambi, 1985).

Se han descrito cambios en la abundancia de determinados polipéptidos durante el desarrollo del fruto de la fresa (Veluthambi y Poovaiah, 1984). Al eliminar

los aquenios del fruto, se retrasa el crecimiento y se inhibe la formación de polipéptidos de 81, 76 y 37 kDa. La adición de auxinas a receptáculos desaquenizados restablece su formación y el crecimiento del receptáculo. Por el contrario, determinados polipéptidos de 57 y 52 kDa están presentes en receptáculos desaquenizados pero están ausentes en frutos normales y en receptáculos desaquenizados tratados con auxina. Se desconoce el papel fisiológico que poseen estas proteínas.

Recientemente, se ha desarrollado un método para el aislamiento de ácidos nucleicos de frutos de la fresa (Manning, 1991). El elevado contenido en polifenoles y polisacáridos de este fruto lo convierte en un tejido particularmente recalcitrante para el aislamiento de los mismos. Estos métodos de aislamiento han permitido que se puedan estudiar los cambios en la expresión génica que tienen lugar durante la maduración. Así, se ha podido comprobar mediante la comparación de los productos de traducción *in vitro* de RNA total de receptáculos de los estadios blanco y rojo, separados en electroforesis de dos dimensiones que existen numerosas diferencias entre ambos estadios.

En los estudios relativos a la fresa nos encontramos ahora mismo en un estadio fascinante en la elucidación de los eventos moleculares los cuales nos van a permitir saber más de la maduración y de cómo podría tener lugar su regulación hormonal. Recientemente en nuestro laboratorio y gracias a la realización de una genoteca sustractiva de cDNA del estadio rojo frente a cDNA de estadio verde (Medina Escobar et al., 1997a), se han identificado, clonado y caracterizado muchos genes relacionados con la maduración. Uno de estos genes descritos codifica una posible pectato liasa de frutos de la fresa. El cDNA contiene una fase abierta de lectura de 396 aminoácidos que corresponde a una proteína de 44,8 kDa. El transcrito se expresa predominantemente en frutos maduros. La retirada de los aquenios de frutos verdes inmaduros induce la expresión de la pectato liasa, y al igual que otros genes relacionados con la maduración en fresa, esta inducción es parcialmente inhibida por la aplicación a los frutos desaquenizados de la auxina NAA (Medina Escobar et al., 1997b). Otro de los genes aislados y caracterizados corresponde a una posible proteína de choque térmico de bajo peso molecular. El cDNA tiene una fase abierta de lectura de 468 pares de bases codificando una proteína de 17,4 kDa. Su expresión está limitada a estadios de elongación y maduración de los frutos, no detectándose su expresión en raíces, hojas, flores o estolones (Medina Escobar et al., 1998). El estudio

de los mismos y de sus productos protéicos nos podrían dar información de los mecanismos básicos que conducen a cambios en la textura, el aroma y el color que ocurren durante la maduración del fruto de la fresa. Con estos trabajos, no sólo se pretende caracterizar algunos genes implicados en la maduración de la fresa, sino conseguir algunos de ellos que posean un marcado interés biotecnológico, cuya expresión restringida al final de la maduración nos permitiera, usando los promotores, dirigir la producción de construcciones antisentido en esas etapas finales de la maduración. De esta manera se podría manipular este fruto, como ya se ha hecho con el tomate, pudiéndose aumentar las cualidades organolépticas del mismo, así como el tiempo medio postcosecha, la resistencia a infecciones por patógenos (hongos, bacterias, etc.). En resumen, podemos esperar que esta información nos conduzca a una aproximación racional en la manipulación de estos parámetros de maduración en los frutos blandos para beneficio de productores y consumidores.

## **OBJETIVOS:**

Los principales objetivos de este trabajo han sido:

- 1.- La caracterización de genes implicados en la maduración de los frutos de la fresa, así como el tratar de averiguar que papel desempeñan en la fresa.
- 2.- En último término, se trataría de obtener frutos con características alteradas que beneficien a los productores y consumidores mediante la utilización de la biotecnología.

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. REACTIVOS

### 1.1 Reactivos y productos químicos

Todos los productos y reactivos fueron de alta calidad y se adquirieron a las casas comerciales que aparecen entre paréntesis.

Aceite mineral de PCR (Sigma)	Ditiotreitol (DTT) (Sigma)
Ácido acético (Panreac)	DNA de esperma de salmón (Sigma)
Ácido bórico (Sigma)	DNA de timo de ternera (Boehringer)
Ácido clorhídrico (Panreac)	dNTP's (Pharmacia)
Acrilamida (Boehringer)	Dodecil sulfato sódico (Sigma)
Agarosa (Promega)	EDTA-Na <sub>2</sub> (ácido etilen-diamino-tetraacético) (Sigma)
Albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma)	Etanol absoluto (Merck)
Alcohol isoamílico (Merck)	Eter etílico (Merk)
Ampicilina (Sigma)	Extracto de levadura (Difco)
Azul de bromofenol (Sigma)	<i>o</i> -fenilen-diamina (OPD)(Sigma)
Azul de Comassie 250 (Sigma)	Fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF)
N'N'-bis-metilen-acrilamida (Boehringer)	(Sigma)
Bacto-triptona (Difco)	Fenol (Sigma)
Bromuro de etidio (Sigma)	Ficoll (Sigma)
1-butanol (Panreac)	Formaldehido (Merck)
Carbonato de litio (Merck)	Fosfato potásico mono y diácido (Panreac)
Citrato sódico (Panreac)	Fosfato sódico (Panreac)
Cloroformo (Merck)	Gelatina (Bio-Rad)
Cloruro sódico (Panreac)	Glicerol (Panreac)
Cloruro de litio (Merck)	Glicina (ICN)
Cloruro cálcico (Panreac)	Glutación (Sigma)
Cloruro potásico (Panreac)	Glutación-agarosa (Sigma)
Cloruro de cesio (Sigma)	Hidrolizado de caseína (NZ amina)
Columnas de filtración en gel NICK Columns (Pharmacia)	(Sigma)
Dietil pirocarbonato (DEPC) (Sigma)	8-hidroxiquinoleína (Sigma)

IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido) (Pharmacia)	Sephadex G50 Medium (Pharmacia)
Isopropanol (Merck)	Sulfato de hierro (II) (Panreac)
Maltosa (USB)	Sulfato magnésico (Panreac)
$\beta$ -mercaptoetanol (Sigma)	TEMED (Sigma)
MOPS (ácido 3(N-morfolino) propanosulfónico (Sigma)	Trizma base (Sigma)
N-N-dimetil formamida (Merck)	Tritón X-100 (Sigma)
Nucleótidos trifosfato (NTP's) (Pharmacia)	Trombina (Sigma)
Persulfato amónico (Sigma)	X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D- galactopiranosido) (USB)
Polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma)	X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D- glucopiranosido) (Sigma)
Polivinilpolipirrolidona (PVPP) (Sigma)	Xilene-cianol FF (Sigma)
Sílice (Sigma)	Yoduro sódico (Sigma)

## 1.2 Soluciones

### 1.2.1 Soluciones generales

Todos los tampones y soluciones que lleven la clasificación “(autoclave)” se prepararon y, posteriormente, se esterizaron en el autoclave durante 20 min a 120°C.

Acetato potásico 3 M; pH 4,8

Acetato sódico 3 M; pH 6

Acetato sódico 1,5 M; pH 4,5

Cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ ) 1 M

Cloruro de litio (LiCl) 5 M

Cloruro potásico (KCl) 1 M

Cloruro sódico (NaCl) 5 M

DTT 1 M

DNA de esperma de salmón (10 mg/ml)

DNA de timo de ternera (100 mg/ml)

EDTA- $\text{Na}_2$  0,5 M; pH 8

Alcohol etílico 70% y 100% (absoluto)

Fenol/cloroformo/isoamílico (mezcla FCI) (25:24:1)



Gelatina 2%

Glucosa 18%

Hidróxido sódico (NaOH) 2 N

Maltosa 2%

Mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP y dGTP) 5 mM cada uno de ellos

SDS 10%

Sulfato magnésico (MgSO<sub>4</sub>) 1 M

Tris- glicina 0,1 M; pH 9

Tris-HCl 2 M; pH 7,5; 8,0; y 9

Tris-HCl 1,5 M; pH 8,8

Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8

tRNA (10 mg/ml)

Yoduro sódico (NaI) 6 M y 3 M

### **1.2.2 Soluciones para la purificación de DNA y RNA**

#### **1.2.2.1 Soluciones para el aislamiento y la purificación de plásmidos**

*Solución A* (esterilizar en el autoclave)

Tris-HCl 25 mM; pH 8,0

Glucosa 50 mM

EDTA- Na<sub>2</sub> 10 mM

*Solución B* (preparada en el momento de usar)

NaOH 0,2 N

SDS 1%

*Solución C* (esterilizar en el autoclave)

Acetato potásico 3 M; pH 4,8

#### **1.2.2.2 Soluciones para la purificación de DNA del fago FIX II**

Tampón de extracción

*Tris-HCl 1 M; pH 8*

EDTA-Na<sub>2</sub> 0,1 M

SDS 1%

Acetato potásico 5 M

### 1.2.2.3 *Tampones y soluciones para la extracción de RNA total*

Tampón de extracción

Tris-HCl 0,2M; pH 7,5

EDTA-Na<sub>2</sub> 10 mM, ajustado a pH 7,6 con ácido bórico

1/50 vol. SDS 25%

1/50 vol. β-mercaptoetanol

Acetato sódico 1M, pH 4,5

LiCl 12 M

### 1.2.2.4 **Tampones y soluciones para la obtención de mRNA poli adenilado (poli(A))**

*Tampón de unión a la columna*

Tris-HCl 0,01 M; pH 7,5

KCl 0,5 M

EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM

*Tampón de lavado*

Tris-HCl 0,01 M; pH 7,5

KCl 0,1 M

EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM

*Tampón de elución*

Tris-HCl 0,01 M; pH 7,5

EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM

### 1.2.2.5 **Tampones y soluciones para la extracción de DNA genómico**

*Tampón de extracción*

Tris-HCl 100 mM; pH 8

EDTA-Na<sub>2</sub> 50 mM

NaCl 500 mM

SDS 4%

PVPP 6%

β-mercaptoetanol 1%

Acetato potásico 3 M; pH 4,8

### 1.2.2.6 Soluciones para la purificación de DNA mediante matriz de sílice

#### Matriz de adhesión

Se prepara una suspensión de 100 mg/ml como sigue: mezclar 10 g de sílice con 100 ml de tampón PBS. Decantar la mezcla durante 2 h y retirar el sobrenadante. Repetir el lavado de la sílice con tampón PBS y después centrifugar durante 2 min a 2000 g. Disolver el precipitado en una solución de NaI 3M con una concentración final de 100 mg/ml (asumiendo una mínima pérdida de sílice durante el proceso de lavado) y almacenar en oscuridad a 4 °C.

#### Tampón de lavado

Tris-HCl 10 mM; pH 7,5

NaCl 50 mM

EDTA-Na<sub>2</sub> 2,5 mM

Alcohol etílico 50% (v/v)

### 1.2.3 Soluciones para la hibridación de ácidos nucleicos

#### *Solución Denhardt*

BSA 2% (fracción Pentax, Sigma A-7906)

Ficoll 2% ( M.W. 400.000, Sigma P-5288)

PVP 2% (Sigma P-5288)

Pasar por un filtro de 0,45 µm y almacenar en fracciones alícuotas a -20 °C hasta su uso.

#### DNA de esperma de salmón sonicado

Hidratar el DNA de esperma de salmón en 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada a una concentración final de 10 mg/ml. La solución debe adquirir un aspecto gelatinoso. La solución de DNA se sonicó durante 8 min al 30% de potencia en un sonicador Vibra Cell de Sonic & Materials INC. Este tratamiento de sonicación debe mantenerse hasta hacer perder el aspecto gelatinoso de la solución.

### 1.2.4 Fenol neutro

El fenol ácido, además de ser capaz de depurinar y alterar los ácidos nucleicos, disuelve y retiene de forma selectiva el DNA. Por ello, antes de su uso fue necesario neutralizarlo de acuerdo al siguiente protocolo:

Trasvasar a un vaso de precipitado 200 ml de fenol licuado en un baño a 50 °C. Añadir 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada y 10 g de Tris y agitar con un agitador magnético. Tras la disolución del Tris, el pH debe de ser cercano a 8,0 y sólo deberá existir una fase. A continuación se añaden otros 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada y se agita. Volverán a aparecer dos fases, pero la inferior de fenol neutro tendrá un volumen mayor de 200 ml. Retirar 100 ml de la fase acuosa superior y añadir H<sub>2</sub>O destilada. Mezclar y dejar que se separen ambas fases. La fase inferior debe disminuir de volumen. Este proceso se repite varias veces hasta que el fenol recupere su volumen original.

Repartir en fracciones alícuotas de 20 ml y guardar a -20 °C. Añadir a cada una 20 mg de 8-hidroxiquinoleína en el momento de usar para evitar la oxidación del fenol. La 8-hidroxiquinoleína también facilita la identificación de la fase fenólica al teñir ésta de amarillo pálido.

#### **1.2.5 Suspensión de glutatión-agarosa (50% v/v)**

Mezclar 400 mg de glutatión-agarosa con 10 ml de tampón PBST, e incubar durante toda una noche para permitir la separación de dos fases: una acuosa superior y una lechosa inferior. Eliminar de la fase superior la cantidad de PBST necesaria para que el volumen de ambas fases sea el mismo. Agitar la mezcla antes de usar para poner en suspensión la glutatión-agarosa.

#### **1.2.6 Formamida desionizada**

Añadir 5 g de resina Biorad AG 501-X8 a 50 ml de N-N-dimetil-formamida. Mezclar durante 30 min a temperatura ambiente y filtrar a través de una doble capa de papel secante. Repartir en fracciones alícuotas y almacenar a -20 °C hasta su uso.

#### **1.2.7 Mezcla de acrilamida/bisacrilamida al 30% (Ac/Bis (30%))**

Disolver 29,2 g de acrilamida y 0,8 g de bis-acrilamida en 70 ml de H<sub>2</sub>O destilada y completar el volumen hasta 100 ml, filtrar a través de papel y guardar a 4 °C en oscuridad.

### **1.3 Tampones**

#### **Tampón TE (autoclave)**

Tris-HCl 10 mM; pH 8

EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM

Tampón TAE (50X)

Trizma base 2 M  
EDTA-Na<sub>2</sub> 0,1 M  
Ajustar a pH 8,5 con ácido acético

Tampón de dilución de la Sau3A I

Tris-HCl 10 mM; pH 7,5  
KCl 50 mM  
DTT 1 mM  
EDTA- Na<sub>2</sub> 0,1 mM  
BSA 100 µg/ml  
Glicerol 50%

Tampón de Rellenado “Fill-In” (10X)

Tris-HCl 60 mM; pH 7,5  
NaCl 60 mM  
MgCl<sub>2</sub> 60 mM  
Gelatina 0,5%  
DTT 10 mM

Tampón MOPS (10X) (esterilizar en el autoclave)

MOPS 0,2 M  
Acetato sódico 50 mM  
EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM

El pH se ajustó a 7,0 con NaOH. Se trató con DEPC y se esterilizó en el autoclave. No se afecta aunque después de esterilizar adquiera una coloración amarilla.

Tampón TBE (10X)

Trizma base 108 g/l  
Ácido bórico 55 g/l  
EDTA-Na<sub>2</sub> 9,3 g/l  
Se ajustó a pH 8,0 con HCl

Tampón TNE (10X)

Tris 100 mM

EDTA-Na<sub>2</sub> 10 mM

NaCl 1 M

El pH se ajustó a 7,4 y se filtró (0,2 µm).

Almacenar a 4 °C.

Tampón SSC (20X)

NaCl 175,3 g/l

Citrato sódico 88,2 g/l

El pH se ajusta 7,0 con NaOH.

Solución de carga de DNA y RNA (5X)

Glicerol 25%

EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM; pH 8

Azul de bromofenol 0,2%

Esta solución se trató con DEPC y posteriormente se esterilizó para su uso en los geles para la separación de RNA.

Tampón OPA (10X)

Este tampón se obtuvo directamente de la casa comercial Pharmacia y tiene la siguiente composición:

Tris-acetato 100 mM, pH 7,5

Acetato magnésico 100 mM

Acetato potásico 500 mM

Tampón de la Exonucleasa III (5X)

Tris-HCl 75 mM; pH 8

MgCl<sub>2</sub> 3,3 mM

Tampón de la Nucleasa S1

Acetato sódico 15 mM; pH 4,5

NaCl 400 mM

ZnSO<sub>4</sub> 1,6 mM

Glicerol 8%

Mezcla de la Nucleasa S1

750 µl de Tampón de la Nucleasa S1  
200 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada  
200 U de Nucleasa S1

Tampón OPA de la T4 Ligasa (10X New England Biolabs)

Este tampón fue adquirido directamente a la casa comercial. Su composición es la siguiente:

Tris-HCl 0,5 M; pH 7,8  
MgCl<sub>2</sub> 100 mM  
DTT 200 mM  
ATP 10 mM  
BSA 500 µg/ml

Tampón de amplificación por PCR sin magnesio (10X)

KCl 500 mM  
Tris-HCl 100 mM; pH 9

Se esterilizó en el autoclave y se añadió Tritón X-100 a una concentración final del 1% (v/v).

Tampón de amplificación de PCR con magnesio (10X)

KCl 500 mM  
Tris-HCl 100 mM; pH 9

Se esterilizó en el autoclave y se añadió Tritón X-100 a una concentración final del 1% (v/v) y MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 15 mM.

Tampón SM (autoclave)

NaCl 10 g/l  
MgSO<sub>4</sub> (7 H<sub>2</sub>O) 2 g/l  
Tris-HCl 50 mM; pH 7,5  
Gelatina 0,1% (v/v)

PBS

NaCl 150 mM  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 mM  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 mM

PBST

NaCl 150 mM  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 mM  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 mM  
Tritón X-100 1% (v/v)

TCB

Tris-HCl 50 mM, pH 8  
NaCl 150 mM  
CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM  
2-β-mercaptoetanol 0,1% (v/v)

Tampón de electroforesis para SDS-PAGE

Disolver en un litro de H<sub>2</sub>O destilada 3 g de Tris, 14 g de clorhidrato de glicina y 1 g de SDS.

Tampón de carga para SDS-PAGE (2X)

En 40 ml de H<sub>2</sub>O destilada disolver 6,05 g de Tris, 2 g de SDS, 20 ml de glicerol, 2 ml de 2-β-mercaptoetanol y 2 mg de azul de bromofenol. Ajustar el pH a 6,4, completar el volumen hasta 100 ml con H<sub>2</sub>O bidestilada y guardar a -20 °C.

## **1.4 Medios de cultivo**

Medio LB (autoclave)

NaCl 10 g/l  
Bacto-triptona 10 g/l  
Extracto de levadura 5 g/l  
El pH final debe ser cercano a 7,5.  
Para medio LB sólido, añadir 15 g de agar/l.



Medio NZY (autoclave)

NZ amina (hidrolizado de caseína) 10 g/l  
NaCl 5 g/l  
Extracto de levadura 10 g/l  
MgSO<sub>4</sub> (7 H<sub>2</sub>O) 2 g/l  
Ajustar a pH 7,5 con NaOH.  
Para medio NZY sólido, añadir 15 g de agar/l.

Medio 2YT (autoclave)

NaCl 10 g/l  
Bacto-Tripton 16 g/l  
Extracto de levadura 10 g/l  
Ajustar a pH 7 con NaOH.  
Para medio 2YT sólido, se añadieron 15 g de agar/l.

## 1.5 Antibióticos

La ampicilina se preparó a una concentración de 100 mg/ml en H<sub>2</sub>O bidestilada, se esterilizó por filtración utilizando un filtro de 0,2 µm de diámetro de poro, se repartió en fracciones alícuotas y se congeló a -20 °C. Para su uso, se descongeló y se añadió a los medios en una concentración final de 100 µg/ml, procurando que éstos no estuviesen demasiado calientes (aproximadamente a 48 °C).

## 1.6 Enzimas

### 1.6.1 Enzimas modificadoras

T4 DNA ligasa; 6.200 U Weiss/ml (Pharmacia)  
T4 DNA Ligasa Alta Eficiencia; 30.000 U Weiss/ml (New England Biolabs)  
RNAsa H I “A” de páncreas bovino; 10 mg/ml (Pharmacia)  
Polimerasa Klenow (fragmento Klenow de la DNA polimerasa I); 1.000 U/ml y 9.100 U/ml (Pharmacia)  
Inhibidor de la RNAsa; 33.000 U/ml (Pharmacia)  
T3 RNA polimerasa; 12.000 U/ml (Boehringer)  
Taq polimerasa “*Ecotaq*”; 5.000 U/ml (Perkin-Elmer)

DNAsa I libre de RNAsa; 10.000 U/ml (Boehringer)

Exonucleasa III; 190.000 U/ml (Pharmacia)

Nucleasa S1; 50.000 U/ml (Pharmacia)

DNAsa I de páncreas bovino; 1 mg/ml (Pharmacia)

Trombina de plasma humano; 500 U/ml (Sigma)

### 1.6.1.1 Notas sobre las enzimas modificadoras

La RNAsa H se preparó disolviéndola a una concentración de 10 mg/ml en una solución compuesta por Tris-HCl (10 mM) pH 8 y NaCl (15 mM). La solución se incubó 15 min a 95 °C, para eliminar posibles contaminaciones con DNAsas, se repartió en fracciones alícuotas y se almacenó a -20 °C.

La DNAsa I se preparó disolviéndola a una concentración de 1 mg/ml en una solución compuesta por acetato sódico (5 mM) pH 4,5, CaCl<sub>2</sub> (1 mM) y glicerol (50%, v/v). La solución se repartió en fracciones alícuotas y se almacenó a -20 °C.

La trombina se preparó disolviéndola a una concentración de 500 U/ml en tampón PBS. La solución se repartió en fracciones alícuotas y se almacenó a -80 °C.

Se define la unidad de ligación como la cantidad de enzima necesaria para ligar el 90% de los extremos cohesivos 5' en 20 µl de una mezcla de ligación que contiene bacteriófago λ digerido con la enzima de restricción *Hind*III a una concentración de 300 µg/ml en 30 min a 16 °C. Una unidad Weiss (UW) corresponde a 137 unidades de ligación.

## 2. MATERIAL BIOLÓGICO. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

### 2.1 Material Vegetal

#### 2.1.1 Plantas de fresa

En este trabajo se han utilizado plantas de fresas *Fragaria x ananassa* Duch. de la variedad Chandler. Ésta es una planta dicotiledónea y octoploide. Las plantas fueron cultivadas en condiciones naturales en la finca experimental “*El Cebollar*” en la provincia de

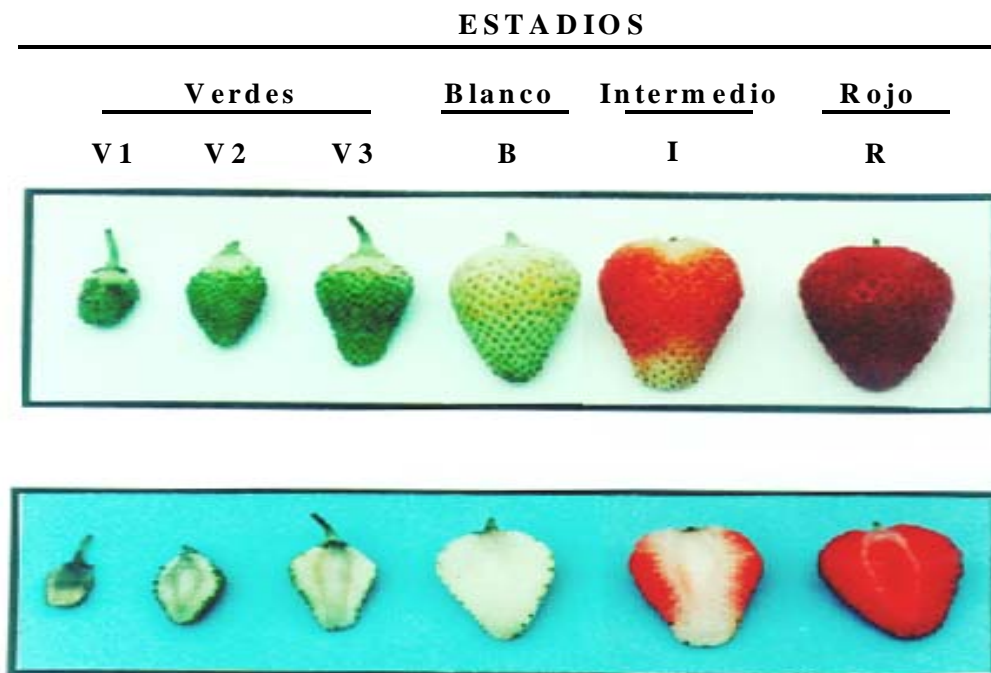
Huelva. El material biológico necesario fue seleccionado e inmediatamente congelado con nitrógeno líquido. Posteriormente, se guardó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 2.1.2 Estadios de frutos de fresa

Los frutos de fresa utilizados en el presente trabajo fueron seleccionados atendiendo a su aspecto exterior.

Los estadios seleccionados fueron los siguientes:

- ♣ Verde-1 (V-1). Corresponde a frutos en las primeras fases de crecimiento, son muy pequeños, verdes y con los aquenios muy juntos.
- ♣ Verde-2 (V-2). Son frutos más elongados, de aspecto parecido al anterior.
- ♣ Verde-3 (V-3). El fruto está bastante crecido y los aquenios se encuentran más separados.
- ♣ Blanco (B). Son frutos que han alcanzado su tamaño casi definitivo. El color blanco se debe a la pérdida de clorofila.
- ♣ Intermedio (I). El fruto, en este estadio, presenta tanto en la superficie como en el interior, alternancia de color blanco y rojo, manifestándose claros síntomas de maduración.
- ♣ Rojos (R). Son frutos rojos completamente maduros.



**Figura 1.** Estadios de maduración de los frutos de fresa utilizados en este trabajo.

### 2.1.3 Tratamiento de los frutos con auxinas

Con el objeto de poder determinar el efecto de las auxinas en la expresión de los genes aislados en nuestro trabajo, los frutos se sometieron al siguiente tratamiento:

Con la punta de un bisturí se retiraron los aquenios de frutos correspondientes al estadio verde-2 (V2). La retirada se realizó en la misma planta teniendo cuidado de no dañar el pedúnculo del fruto. Un grupo de frutos desaquenizados fue tratado con la hormona sintética ácido naftalenacético (NAA) que se aplicó a la superficie del fruto embebiéndola en una pasta de lanolina que contenía 1mM de NAA en 1% de DMSO (v/v). Al otro grupo de frutos desaquenizados, llamado grupo control, también se le aplicó la misma pasta que carecía de la hormona sintética NAA. Los frutos de esta manera tratados fueron recogidos tras 0, 24, 48, 72 y 96 horas después del tratamiento, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, y se almacenaron hasta su uso a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2 Estirpes bacterianas.

**Tabla I. Estirpes de *E. coli* utilizadas**

Estirpe	Genotipo
DH5 $\alpha$ F'	F' $\phi$ 80dlacZAM15 <i>AlacU169 recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i>
XL1-blue	$\Delta$ ( <i>mcra</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcreb-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZAM15 tn10 (tet')</i> ]

### 2.2.1 Medios de cultivo

Las cepas de *Escherichia coli*, empleadas en este trabajo para la subclonación de fragmentos de DNA, se cultivaron normalmente en medio de cultivo LB (Sambrook et al., 1989). Este medio contiene:

Bacto-triptona 10g/l

Extracto de levadura 5g/l

NaCl 10g/l

Bacto-agar al 1,5% (en medios sólidos)

### 2.2.2 Condiciones de cultivo

Las células se cultivaron en un incubador termostatzado a 37 °C con agitación continua (150-250 rpm). Se emplearon tubos de ensayo o erlenmeyers dependiendo del volumen de células a obtener, manteniendo en cualquier caso una relación de volumen líquido/volumen vacío de 1:4 para mantener una buena aireación del cultivo y un crecimiento óptimo.

El material empleado fue previamente esterilizado en el autoclave. Los antibióticos u otros compuestos como la glucosa, añadidos tanto a medios sólidos como líquidos previamente estériles, fueron filtrados a través de membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm de tamaño de poro teniendo en cuenta que la temperatura del cultivo no fuese superior a 50 °C.

Los cultivos de células que contenían plásmidos con el gen de resistencia a ampicilina fueron suplementados con 100 µg/ml de este antibiótico. De igual modo, para el análisis de selección de colonias recombinantes en función del marcador β-galactosidasa, se utilizaron placas de medio LB sólido suplementado con X-Gal (0,8 mg/l), IPTG (0,8 µg/l) y ampicilina, que fueron añadidos directamente a las placas previamente a su uso.

### 2.3 Plásmidos utilizados

En este trabajo los plásmidos utilizados han sido pBluescript KS+ y SK-. Estas designaciones indican que la zona de clonación múltiple (donde se encuentran enzimas de restricción) está en la misma orientación de transcripción que el gen *lacZ*, desde la enzima de restricción *KpnI* a *SacI*, o en la contraria. Esta zona de clonaje múltiple está flanqueada por los promotores de la RNA polimerasa T3 y T7 que pueden ser utilizados para la síntesis de RNA *in vitro*, siendo la elección del promotor la que determina la cadena del inserto clonado que se transcribe. Estos plásmidos tienen como característica más relevante que confieren resistencia al antibiótico ampicilina, lo que nos permite la selección de las colonias que hayan integrado el plásmido, es decir, de las portadoras del gen de la β-galactosidasa, que se ve interrumpido por la inserción de cualquier secuencia en la zona de multiclonación. Ello permite la selección por color de las colonias del plásmido original (azules) o recombinante (blancas). Otra característica a destacar es que poseen el origen de replicación del bacteriófago M13 (Sambrook et al., 1989), lo que permite obtener DNA de cadena simple.

Otro de los plásmidos utilizados fue el pGEX-KG, una versión mejorada del plásmido comercial pGEX-2T de Pharmacia, usado para la expresión de nuestra proteína de interés en *E. coli*. Como característica más notable, destacamos la existencia en la zona de clonaje

múltiple de una serie de residuos de glicina que son susceptibles de ser cortados por la trombina mucho mejor que en el plásmido comercializado por la empresa Pharmacia, lo que nos permitirá la posterior purificación de nuestra proteína.

Por último, se empleó el plásmido pTAK1, al cual se le insertó en fase de lectura con el gen reportador *uidA* que codifica la  $\beta$ -glucuronidasa (Gus) el promotor del gen que codifica una PMSR. Se usó para intentar transformar frutos de fresa mediante técnicas de biobalística.

### **3. TÉCNICAS DE CLONACIÓN MOLECULAR. MANIPULACIÓN DE MOLÉCULAS DE DNA**

#### **3.1 Preparación de células competentes**

Para obtener células competentes de las variedades DH5 $\alpha$ F' o XL1-Blue de *Escherichia coli*, éstas se cultivaron a partir de una colonia aislada en medio LB durante 8-10 h. Estas células se diluyeron posteriormente 100 veces en el mismo medio y se dejaron crecer hasta alcanzar una  $A_{595}$  de 0,45-0,55, lo que corresponde a la fase exponencial de crecimiento. Tras centrifugar las células a 2500-3500 rpm durante 5-10 min, se resuspendieron en 0,5 volúmenes (respecto del cultivo diluido) de una solución fría de CaCl<sub>2</sub> 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 20 mM, incubando las células en hielo durante 30 min. A continuación se centrifugó la suspensión de células y el precipitado se resuspendió en 0,1 vol de la solución fría de CaCl<sub>2</sub> 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 20 mM a la que se le añadió un 15% de glicerol. Para una mayor eficiencia de transformación, la solución de células competentes se mantuvo a 4 °C durante una noche y al día siguiente se distribuyó en fracciones alícuotas de 200  $\mu$ l que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso (Sambrook et al., 1989).

#### **3.2 Transformación de células competentes de *E. coli***

Las células competentes se descongelaron manteniéndolas en hielo. Para cada transformación se utilizó una fracción de 200  $\mu$ l a la cual se le añadieron de 50 a 200 ng del DNA plasmídico previamente ligado a sus correspondientes insertos. Tras incubar esta mezcla en hielo durante 30 min, se dió un choque térmico por incubación a 42 °C durante 1,5 min y después la mezcla se transfirió a hielo durante 1-2 min. Posteriormente, a temperatura

ambiente se añadieron 800 µl de medio LB. Se incubó 60 min a 37 °C sin agitación. Finalmente, se centrifugó el medio LB con las células transformadas y se resuspendió en un volumen mínimo del mismo medio. Se inocularon al menos dos placas con diferentes diluciones en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina, donde seleccionamos las colonias que al integrar el plásmido han adquirido resistencia al antibiótico (Sambrook et al., 1989). También se utilizó el medio anterior que contenía además X-gal/IPTG haciendo la selección entre colonias blancas (plásmido recombinante) y azules (plásmido nativo). Cuando se transformó con la mezcla de una ligación se utilizó siempre un control de un plásmido, por ejemplo pUC119.

### 3.3 Fraccionamiento de moléculas de DNA y purificación de fragmentos de restricción

Las moléculas de DNA fueron digeridas con las adecuadas enzimas de restricción, utilizando para ello las condiciones y tampones recomendados por las diferentes casas comerciales (Pharmacia, BRL, Boehringer Mannheim). En las digestiones de plásmidos procedentes de minipreparaciones rápidas (ver apartado 4.1), se incluyó 1 µg de RNAsa en la mezcla de digestión para que tuviera lugar la degradación del RNA contaminante en las preparaciones.

Los fragmentos de DNA se separaron según su tamaño en geles de agarosa. Éstas contenían normalmente un 0,8% de agarosa en 0,5X TBE o en 1X TAE con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. El porcentaje de agarosa se modificó según el tamaño de los fragmentos a separar, aumentándose hasta el 1,5% de agarosa cuando los fragmentos eran pequeños (Sambrook et al., 1982). Las muestras se cargaron en los pocillos del gel tras adicionar el tampón de carga. Se utilizaron como marcadores de peso molecular:

- DNA del fago λ digerido con la enzima de restricción *HindIII*.
- Marcador comercial 1 Kb (1Kb ladder; GIBCO BRL).

La electroforesis se llevó a cabo a 4-8 V/cm con tampones TBE. Cuando se utilizó TAE el voltaje fue de 3-4 V/cm. El DNA se visualizó mediante iluminación con luz ultravioleta de onda corta (220 nm) para fotografiarlo. Sin embargo, cuando se quería aislar un fragmento de la digestión del DNA, éste se visualizaba con radiación UV de onda larga (340 nm). Para ello, la pieza de agarosa que contenía la banda de DNA a purificar se escindió con un bisturí. Para el aislamiento del DNA se utilizó el kit comercial GeneClean II<sup>R</sup> (BIO 101

Inc) basado en una matriz de sílice cambiadora de iones. La eficiencia del método fue normalmente del 75%.

Otro método empleado para purificar el DNA cortado de la agarosa fue la electroelución. La banda cortada se introdujo en una bolsa de diálisis, previamente hervida durante 5 min en tampón TE, añadiéndose un volumen adecuado de tampón TE. La bolsa fue sellada con pinzas y se sometió a electroforesis en TBE 1X. La migración del DNA fuera de la agarosa se visualizó con luz ultravioleta de onda larga. Una vez que el DNA está totalmente fuera del fragmento de agarosa, se recoge el tampón que contiene el DNA y éste se precipita con 2,5 vol de etanol y 0,1 vol de acetato sódico 3 M.

### **3.4 Tratamiento para la obtención de fragmentos de DNA con extremos romos**

Cuando fue necesario transformar los extremos cohesivos del DNA en extremos romos se siguió el siguiente protocolo:

Para extremos 3' protuberantes

En un tubo eppendorf de 1,5 ml mezclar:

DNA (200 ng)	27 µl
Tampón OPA (Pharmacia)	3 µl
Polimerasa Klenow 1.000 U/ml (Pharmacia)	1 µl
Volumen final	31 µl

Incubar la mezcla a 37 °C durante 8 min, añadir 2 µl de una mezcla de dNTP (0,125 mM cada uno) e incubar a 37 °C otros 10 min.

Para extremos 5' protuberantes

En un eppendorf de 1,5 ml mezclar:

DNA (200 ng)	27 µl
Tampón OPA (Pharmacia)	3 µl
Polimerasa Klenow 1.000 U/ml (Pharmacia)	1 µl
Mezcla de dNTP (0,125 mM de cada uno)	2 µl
Volumen final	33 µl



Incubar la mezcla a 37 °C durante 10 min.

Posteriormente, y en ambos casos, se realizó un tratamiento con la mezcla fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) (mezcla FCI), y se precipitó con etanol.

### 3.5 Ligación de fragmentos de DNA a vectores plasmídicos

Para ello se utilizó una relación molar 2:1 del fragmento a ligar:molécula de vector. La ligación se llevó a cabo en un volumen de entre 5 µl y 20 µl, manteniendo una concentración de DNA en la mezcla de ligación de 10 ng/µl a 20 ng/µl.

Para calcular la cantidad de µg de fragmento y vector en una relación molar 2:1 se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de } \mu\text{g de fragmento} = \frac{2 \times \text{Tamaño del fragmento (bp)} \times \text{N}^{\circ} \text{ de } \mu\text{g de vector}}{\text{Tamaño del vector (bp)}}$$

Un ejemplo de ligación en el cual un fragmento de DNA de 2 kb se liga a un vector tipo pBluescript:

En un tubo eppendorf mezclar:

Fragmento 2.000 bp (100 ng/µl)	1,14 µl
Vector 3.000 bp (100 ng/µl)	0,85 µl
ATP (10 mM)	2 µl
Tampón OPA (Pharmacia)	2 µl
T4 ligasa 6.200 UW/ml (Pharmacia)	1 µl
H <sub>2</sub> O bidestilada	hasta 20 µl

Incubar a 14 °C durante una noche.

En el caso de extremos romos la concentración final de ATP en la mezcla de ligación será de 0,1 a 1 mM y la concentración de enzima de 10 a 15 UW en 20 µl de mezcla de ligación.

### 4. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO (DOBLE CADENA)

Se utilizaron varios métodos de aislamiento de DNA en función de la calidad y cantidad requerida:

#### **4.1 Minipreparaciones de DNA plasmídico por lisis alcalina**

El cultivo bacteriano (3 ml) en fase estacionaria de crecimiento se centrifugó a 5000 g, y la pella celular se resuspendió en 100 µl de una solución de glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se añadieron 200 µl de una solución de NaOH 0,1 N y SDS al 1%, preparada en el momento de ser utilizada. Se mezcló por inversión del tubo varias veces hasta observar una solución clara, evitando una agitación vigorosa para no extraer el DNA cromosómico. Se incubó 5 min en hielo. A continuación se añadieron 150 µl de una solución de acetato potásico 5 M, pH 4,8, se mezcló suavemente, y se mantuvo en hielo durante 5 min. El tubo se centrifugó a la máxima potencia en la minicentrífuga a 4 °C durante 5 min, el precipitado se desechó y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo en donde se añadió igual volumen de mezcla FCI. Se mezcló con el vortex y con la fase acuosa se repitió la extracción. Finalmente se realizó una extracción de los restos de fenol en la fase acuosa con cloroformo (saturado en agua) y la fase acuosa se precipitó con 2 vol de etanol al 95%. Tras incubar 20 min a -20 °C, se centrifugó y el precipitado se lavó 2 veces con etanol al 70%. La pella se secó en una microcentrífuga de vacío, y el DNA se resuspendió finalmente en 20-25 µl de tampón TE mediante agitación. El rendimiento de la minipreparación fue normalmente de 10-20 µg/ml de cultivo (Sambrook et al., 1989).

#### **4.2 Minipreparaciones de DNA plasmídico por columna**

Este método fue empleado para la obtención de DNA de buena calidad para las reacciones de secuenciación. Para ello, se utilizaron las columnas comerciales de la casa Qiagen<sup>TM</sup>, y se siguieron las indicaciones del fabricante. La eficiencia fue de 5-10 µg de plásmido por ml de cultivo.

#### **4.3 Maxipreparaciones de DNA plasmídico**

En la obtención de DNA a gran escala, el protocolo utilizado fue el mismo que en las minipreparaciones por lisis alcalina aunque el volumen de las soluciones fue proporcional al de los cultivos celulares. Inicialmente se usó como inóculo un cultivo de células que había crecido en un pequeño volumen de medio durante la noche. Una vez tratadas las muestras

con la solución de acetato potásico 5 M, pH 4,8, se forma un precipitado blanco muy aparatoso, por lo que tras centrifugar la solución se filtró a través de 3-4 capas de gasa estéril para eliminar restos celulares. No son necesarias las extracciones con FCI para desnaturalizar proteínas presentes en el extracto celular, ya que este método aísla el DNA plasmídico eficientemente. Debido al elevado volumen final tras la adición de las tres soluciones de la lisis alcalina, la precipitación de los ácidos nucleicos se llevó a cabo añadiendo 0,6 vol de isopropanol a temperatura ambiente durante 15 min. Se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y el precipitado se secó y resuspendió en 3,7 ml de tampón TE al que se le añadieron 0,3 ml de bromuro de etidio (10 mg/ml) y 4 g de CsCl. La suspensión homogeneizada se centrifugó a 4000 rpm, eliminando de esa forma gran parte del RNA que precipita bajo estas condiciones. La disolución se transfirió a tubos de ultracentrífuga sellados con calor (Quick-seal, Beckman) de 5,1 ml. Se contrapesaron los tubos de las diferentes muestras junto con las arandelas y tapones metálicos correspondientes al rotor de la ultracentrífuga (NVT-90, Beckman). Se utilizó un programa secuencial que consistió en: 90.000 rpm durante 1,5 h; 87.000 rpm 15 min; 83.000 rpm 15 min; 81.000 rpm 30 min; 80.000 rpm 30 min.

Al extraer los tubos del rotor se visualizó la banda fluorescente del DNA con luz ultravioleta de longitud de onda larga (320 nm). El DNA se extrajo mediante punción con una jeringa. Previamente, se cortó la parte superior del tubo o se hizo una punción para evitar que se hiciera el vacío. El bromuro de etidio se extrajo repetidas veces con butanol saturado en tampón TE hasta no observar el color rosa del bromuro de etidio. La preparación se diluyó 3 veces con tampón TE para disminuir la alta concentración de CsCl y se precipitó con 2,5 vol de etanol al 95% durante 15 min a temperatura ambiente (no en frío ya que precipitarían las sales). El precipitado se lavó al menos 2 veces con etanol al 70%, se secó y se resuspendió finalmente en 100-200  $\mu$ l de tampón TE mediante agitación. El rendimiento obtenido fue de 1-5  $\mu$ g de plásmido por ml de cultivo. El DNA se almacenó a 4 °C hasta su utilización (Sambrook et al. 1989).

## 5. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Las concentraciones de ácidos nucleicos se determinaron mediante diferentes métodos. Las muestras de ácidos nucleicos se cuantificaron de manera aproximada en geles de agarosa por referencia con un patrón de DNA de concentración conocida. No obstante, la mayoría de las muestras se cuantificaron espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 260 nm.

Un valor de  $A_{260}=1$  corresponde, aproximadamente, a 50 mg/ml de DNA de doble cadena, 40 mg/ml de RNA y 30 mg/ml de DNA de simple cadena.

Cuando fueron necesarias medidas más sensibles, se utilizaron análisis fluorométricos para determinar las concentraciones. Para dichas medidas, se utilizó el fluorímetro *Kontron Instruments SFM25*, utilizando como solución patrón DNA de timo de ternera a una concentración de 100 ng/μl. Para realizar dichas medidas el fluorímetro se ajustó a cero y se estabilizó midiendo en una cubeta de cuarzo que contenía 2 ml de un tampón fluoróforo compuesto por 2 ml de solución de Hoechst (100 ng/ml en TNE (1X)). Una vez ajustado, se añadió 1 μl de DNA patrón de timo de ternera (100 ng/μl) y se calibró el fluorímetro a 50 unidades relativas, para que cada unidad de incremento en la medida del fluorímetro represente un incremento de 2 ng de DNA en la solución problema. La cantidad de DNA presente en las muestras se calculó midiendo el incremento de unidades en el fluorímetro tras la adición de un volumen determinado de las mismas al tampón fluoróforo.

La pureza de las preparaciones de ácidos nucleicos se determinó calculando las relaciones entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm. Dicha relación es un índice de la contaminación de la muestra por proteínas. Este valor debe estar comprendido entre 1,7-1,9 para el caso de muestras de DNA y 1,9-2,0 en el caso de muestras de RNA. La integridad de las muestras de ácidos nucleicos se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa.

## 6. MARCAJE RADIATIVO DE MOLÉCULAS DE DNA Y RNA

### 6.1 Marcaje de DNA

El marcaje se realizó utilizando el kit comercial *Oligolabelling* (Pharmacia), basado en el uso de hexanucleótidos aleatorios como cebadores para la reacción de polimerización llevada a cabo por el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I. Para ello, en un tubo eppendorf (con rosca) de 1,5 ml se mezclaron:

DNA	25-50 ng
H <sub>2</sub> O bidestilada	hasta 34 μl

Esta mezcla se calentó durante 5 min a 95-100 °C en baño maría para desnaturalizar el DNA, tras lo cual se enfrió inmediatamente en hielo durante 2 min. A continuación, a cada tubo se añadió:

<i>Reagent mix</i> (Pharmacia)	10 $\mu$ l
( $\alpha$ - <sup>32</sup> P)dCTP, 3.000 Ci/mmol (Amershan)	5 $\mu$ l
Klenow polimerasa 9 U/ $\mu$ l (Pharmacia)	1 $\mu$ l

La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 1 h.

Para la purificación de la sonda marcada, se utilizaron columnas empaquetadas con Sephadex G-50 en una pipeta Pasteur con lana de vidrio o con Perlon, de menor toxicidad, en el fondo (Sambrook et al., 1989). Se centrifugó a 3300 rpm durante 4 min para eliminar el volumen vacío y posteriormente se añadió la sonda marcada centrifugando otra vez a la misma velocidad durante otros 4 min. La incorporación de desoxinucleótidos radiactivos se cuantificó mediante un contador de centelleo líquido (Beckman), tomando 1  $\mu$ l de la sonda radiactiva en 2 ml de solución de centelleo (Ready Gel<sup>TM</sup>, Beckman, para fases acuosas). El rendimiento del marcaje osciló entre 3-4 x 10<sup>8</sup> cpm/ $\mu$ g de DNA.

## 6.2 Marcaje de RNA

Se utilizó ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)UTP como nucleótido marcado radiactivamente. Se tomaron todas las precauciones habituales para trabajar con RNA.

En un vial de 0,5 ml, se mezclan los siguientes productos en el orden especificado:

H <sub>2</sub> O bidestilada	8 $\mu$ l
Tampón de la RNA polimerasa (5X) (Boehringer)	5 $\mu$ l
Inhibidor de la RNAsa; 33.000 U/ml (Pharmacia)	0,75 $\mu$ l
Mezcla de NTPs (2,5 mM de cada uno, excepto UTP)	5 $\mu$ l
DNA molde (1 mg/ml)	1 $\mu$ l
( $\alpha$ - <sup>32</sup> P)UTP; 3.000 Ci/mmol (Amershan)	5 $\mu$ l
T3 RNA polimerasa; 12.000 U/ml (Boehringer)	0,2 $\mu$ l
Volumen final	25 $\mu$ l

La mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C. A continuación se trató durante 10 min a 37 °C con 10 U de DNAsa libre de RNAsa (Boehringer). La reacción se detuvo añadiendo 1  $\mu$ l de EDTA-Na<sub>2</sub> 0,5 M pH 8. Para la purificación de la sonda radiactiva de los nucleótidos no

incorporados, se filtró por una columna de G50 (Nick<sup>TM</sup> columns; Pharmacia) equilibrada con agua tratada con DEPC (Sambrook et al., 1989).

## 7. AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO DE FRESA

El DNA genómico de fresa fue aislado de la siguiente manera: Se pusieron hojas jóvenes de fresa con agua destilada, en oscuridad y a 4 °C durante dos días. Después de este tratamiento previo, se cogieron dos gramos de hojas y se machacaron en un mortero con la ayuda de nitrógeno líquido hasta convertirlo en un polvo fino. Se resuspendió, con agitación suave en 25 ml de una solución previamente calentada a 65 °C que contenía Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 50 mM, β-mercaptoetanol al 1%, SDS al 4% y PVPP al 6%; pH 8,0. Tanto el β-mercaptoetanol como el SDS y el PVPP se añadieron justo antes de usar. La mezcla se incubó a 65 °C durante 1 h en agitación suave. A continuación, se le añadieron 8 ml de acetato potásico 3 M, pH 4,8, y la mezcla resultante se incubó durante 15 min en hielo, tras lo cual se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue filtrado a través de filtro miracloth, y se le añadieron 2 vol de etanol absoluto frío. El DNA fue recogido con un microcapilar de cristal, se lavó 2-3 veces con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente el DNA se resuspendió en el volumen deseado de agua.

## 8. FRACCIONAMIENTO, TRANSFERENCIA Y CONDICIONES DE HIBRIDACIÓN DE DNA DE FRESA

### 8.1 Fraccionamiento

La digestión de DNA genómico con enzimas de restricción se llevó a cabo normalmente a 37 °C durante 10-15 h en un volumen de 50 µl que contenía 1,5-2,5 µg de DNA y 20-30 U de enzima. En el caso de la enzima *SmaI*, la digestión se realizó a 30 °C. Se utilizaron volúmenes grandes de digestión para minimizar el posible efecto de impurezas presentes en las preparaciones. El DNA digerido se precipitó con 2,5 vol de etanol y acetato sódico 0,3 M para evitar problemas en la migración del gel de agarosa debido a diferentes concentraciones de sales en las diferentes digestiones con las restrictasas. Los productos de

digestión se fraccionaron en geles de 0,8% de agarosa en tampón 1 x TBE con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio, a 35 V durante 12-16 h.

## 8.2 Transferencia

Finalizado el fraccionamiento de moléculas de DNA, se fotografió el gel exponiéndolo a radiación ultravioleta, colocando una regla graduada en el inicio de los pocillos del gel. Se utilizaron como patrones de peso molecular un marcador comercial 1 kb (Gifco, BRL) o DNA del fago  $\lambda$  digerido con *HindIII*. Previamente a la transferencia de DNA a las membranas de nailon, el gel de agarosa que contenía el DNA fragmentado se sometió a un tratamiento de despurinización para facilitar su transferencia, sumergiendo el gel en una solución de HCl 0,25 N durante 8-10 min a temperatura ambiente con agitación suave. Todos los pasos posteriores también se realizaron con agitación suave. El gel se lavó con agua desionizada y se transfirió a una solución desnaturizante que contenía NaCl 1 M y de NaOH 0,5 M durante 15 min, pasado este tiempo se enjuagó con agua y se transfirió a una solución neutralizante de Tris-HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M a pH 7,4.

La transferencia del DNA fragmentado a membranas de nailon (Nytran 0,45 µm de Schleicher & Schuell o Hybond<sup>TM</sup>-N de Amersham) se realizó por capilaridad (Sambrook et al., 1989), usando tampón 20 x SSC. La membrana se humedeció previamente con agua y se equilibró con 5 x SSC. La transferencia se llevó a cabo durante 12-15 h, tras lo cual, la membrana se enjuagó en 2 x SSC y 0,2% SDS. El DNA se fijó calentando la membrana a 80 °C durante 1,5-2 h o radiando la membrana con luz ultravioleta en un UV Stratalinker<sup>TM</sup> 2400 (Stratagene).

## 8.3 Condiciones de hibridación.

La prehibridación se realizó a 65 °C durante 1-2 h en una solución que contenía 6 x SSC, 10 x Denhardt's, 50 µg/ml de fragmentos desnaturizados de DNA de esperma de salmón y 1% de SDS. Pasado este tiempo, a la solución de prehibridación se incorporó la sonda marcada radiactivamente previamente desnaturizada a 95 °C durante 2-3 min, con una radiactividad específica de  $1-5 \times 10^6$  cpm/ml de solución. La hibridación se llevó a cabo durante 15-24 h a 65 °C.

Las condiciones de lavado fueron:

- dos lavados de 30 min a 60 °C en 100 ml de una solución 2 x SSC y 0,2 x SDS en agitación continua .
- dos lavados de 30 min a 65 °C en 100 ml de una solución 0,2 x SSC y 0,2 x SDS manteniendo la agitación continuada.

Las membranas se expusieron junto a películas de autorradiografía (X-OMAT™) LS de baja sensibilidad o (X-OMAT™) AR de alta sensibilidad de la casa Kodak, con pantallas amplificadoras de señal y manteniéndolas a -80 °C. Para la reutilización de la membrana, la sonda radiactiva se eliminó introduciendo la membrana en una solución hirviendo de SDS al 0,5%, en donde se dejó hasta que alcanzase la temperatura ambiente.

## **9. AISLAMIENTO DE RNA DE FRESA**

### **9.1. Aislamiento de RNA de frutos de fresa**

En la obtención de RNA se trabajó en un entorno libre de RNAsas. Esto se consiguió tratando con DEPC al 0,1% las soluciones que se utilizaron para aislar el RNA (Sambrook et al., 1989). En este trabajo se ha utilizado el método descrito por Manning (1991), al cual se le han hecho algunas modificaciones. El protocolo usado fue el siguiente:

Cinco gramos de tejido congelado fueron machacados en un mortero hasta obtener un polvo fino, evitando que se descongelara añadiéndole de manera continua nitrógeno líquido. Al tejido así triturado, se le añadieron 10 ml de tampón de extracción (Tris 0,2 M, EDTA-Na<sub>2</sub> 10 mM, ajustado a pH 7,6 con ácido bórico). Justo antes de usar, también se añadió al tampón de extracción 1/50 vol de SDS al 25% y 1/50 vol de β-mercaptoetanol. Inmediatamente se añadieron 10 ml de mezcla FCI. La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó a temperatura ambiente hasta que se descongeló el tejido y pudo ser centrifugado a 10.000 rpm durante 15 min. Se recogió la fase acuosa y se diluyó hasta 2,5 vol con agua tratada con DEPC. La concentración de Na<sup>+</sup> se ajustó con acetato sódico 1 M pH 4,5 hasta una concentración de 80 mM. El objeto de esta dilución fue el de evitar que posibles restos de fenol impidiesen la mezcla de los extractos con etilenglicol monobutiléter 2 butoxi-etanol (2 BE) del paso siguiente. Con el extracto diluido, se procedió a realizar una precipitación diferencial con el 2 BE, que tiene la propiedad de precipitar carbohidratos de manera selectiva en un ambiente iónico adecuado cuando se añade a bajas concentraciones. Por el contrario, cuando se añade a concentraciones superiores, precipitan los ácidos nucleicos, quedando los polifenoles en solución. Para la precipitación de los carbohidratos, se añadieron 0,4 vol de 2 BE y la mezcla se



dejó en hielo durante al menos 30 min, tras lo cual se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min, obteniéndose un precipitado de carbohidratos.

El sobrenadante se pasó a un tubo estéril y los ácidos nucleicos se precipitaron añadiendo 0,6 vol de 2 BE. Se puso 30 min en hielo y se centrifugó de nuevo a 10.000 rpm durante 15 min. El precipitado de ácidos nucleicos totales (DNA y RNA) se lavó con etanol 70%. Después de eliminar el etanol, la pella se resuspendió en agua tratada con DEPC. El RNA se precipitó selectivamente por la adición de 1/3 del volumen de una solución de LiCl 12 M e incubación a 4 °C durante 12 h. A continuación, la mezcla se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 min, y el precipitado, que corresponde al RNA, se lavó con etanol al 70% y finalmente se resuspendió en el volumen adecuado de agua tratada con DEPC.

Este protocolo fue utilizado también para extraer RNA de los diferentes tejidos de la planta de fresa como raíces, estolones, hojas y flores.

## 9.2 Aislamiento de RNA de aquenios

Con el objetivo de poder determinar si los genes clonados se expresan en el receptáculo o en los aquenios de los frutos de fresa, se procedió a aislar RNA de ambos órganos. A fresas congeladas con nitrógeno líquido y con la ayuda de un bisturí, se le retiraron los aquenios. En todo momento, tanto los aquenios retirados como los receptáculos, se mantuvieron congelados por la adición continua de nitrógeno líquido.

La extracción de RNA de receptáculo se llevó a cabo de la misma manera que para los frutos y tejidos, anteriormente descrita.

Para los aquenios, fue necesario modificar el procedimiento de extracción, utilizándose el descrito para el aislamiento del DNA genómico de fresa, el cual se ha descrito en el apartado 7.

Este protocolo se siguió fielmente hasta la etapa en la que se obtiene el precipitado de ácidos nucleicos, el cual se resuspende con agua tratada con DEPC. El RNA se precipitó selectivamente por la adición de 1/3 del volumen de LiCl durante 12 h a 4 °C. Finalmente, se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 min, el precipitado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en el volumen adecuado de agua tratada con DEPC.

## **10. SEPARACIÓN, TRANSFERENCIA Y CONDICIONES DE HIBRIDACIÓN DE RNA DE FRUTOS DE FRESA**

### **10.1 Separación**

La separación y fraccionamiento de RNA total se llevó a cabo en geles de agarosa al 1,2-1,5%, en un tampón que contenía 1 x MOPS y 17,5% de formaldehído, añadiéndose éste una vez fundida la agarosa en el tampón a una temperatura no superior a 65 °C. El RNA total (15-30 µg) se desnaturalizó previamente por calentamiento a 65 °C durante 5 min en una solución que contenía 19% de formamida desionizada, 0,7% de formaldehído, 0,19% de MOPS, 0,019% de EDTA, 0,01% de BPB y 1,9% de glicerol. La electroforesis se desarrolló a 35 voltios durante 16-20 h en tampón 1 x MOPS; pH 7,0.

### **10.2 Transferencia**

Finalizado el fraccionamiento del RNA total, se hizo una fotografía del gel poniendo una regla graduada como referencia situándola en el inicio de los pocillos del gel. El RNA fue transferido por capilaridad utilizando 10 x SSC como tampón de transferencia durante 16-20 h (Sambrook et al., 1989). La membrana de nailon (Nytran 0,45 µm de Schleicher & Schuell o Hybond<sup>TM</sup>-N de Amersham) se trató de igual forma que cuando se transfirió el DNA.

### **10.3 Condiciones de hibridación**

La prehibridación e hibridación de las membranas con RNA de frutos de fresa se desarrolló a 65 °C en una solución conteniendo 5 x SSC, 1% de SDS, 5 x solución de Denhardt's, fosfato sódico 50 mM; pH 7 y 100 µg/ml de fragmentos desnaturalizados de DNA de esperma de salmón. La prehibridación se llevó a cabo durante 2 - 4 h. Pasado este tiempo se incorporó la sonda de DNA marcada radiactivamente ( $1-5 \times 10^6$  cpm/ml) y previamente desnaturalizada a 95 °C durante 2-3 min. La hibridación se realizó durante 16-20 h. Pasado este tiempo, la membrana se lavó para eliminar la radiactividad que se había unido inespecíficamente, primero a temperatura ambiente con 30 ml de tampón 0,2 x SSC, 0,2 x SDS. Posteriormente se realizaron 3 lavados a 65 °C de 15 min cada uno con 30 ml de la

misma solución, siempre con agitación constante. Las membranas se dispusieron entre plásticos para preservarlas húmedas, y se expusieron con películas autorradiográficas (Kodak), a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  con pantallas intensificadoras de señal.

Para la reutilización de las membranas, la sonda radiactiva se eliminó sumergiendo las membranas en una solución hirviendo al 0,5% de SDS hasta alcanzar la temperatura ambiente.

## **11. AISLAMIENTO DE mRNA POLIADENILADO (POLI (A)) A PARTIR DE RNA TOTAL DE FRUTOS DE FRESA**

Para el aislamiento de mRNA poliadenilado (poli A) se utilizó una columna de oligo dT celulosa (Pharmacia). El procedimiento fue el siguiente:

- Equilibrar la columna con 5 vol de tampón de unión.
- Resuspender el RNA total, obtenido como se describe en el apartado 9, en el tampón de elución a una concentración final de 1-5 mg/ml. Calentar a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 min e incubar rápidamente en hielo.
- Diluir con un volumen igual de tampón de unión y pasar por la columna.
- Dejar pasar la solución por la columna por gravedad. Recoger el eluido, y tras calentar de nuevo a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ , éste se pasa otra vez por la columna. Repetir este paso una vez más.
- Lavar la columna con 5-10 vol de tampón de lavado.
- Eluir con 2-3 vol de tampón de elución.
- Precipitar el líquido obtenido después de la elución con 2,5 vol de etanol 95% y 0,1 vol de acetato sódico 3 M.

## **12. AMPLIFICACIÓN DE EXTREMOS DE cDNA**

Para obtener el extremo 5' del cDNA correspondiente al gen que codifica una PMSR de fresa se utilizó el kit Marathon<sup>TM</sup> cDNA amplification (Clontech) y se procedió de la siguiente manera:

### **1.- Síntesis de la primera cadena de cDNA**

Para cada reacción en un tubo eppendorf de 0,5 ml mezclar:

poli A de frutos rojos 1,5  $\mu$ l

oligo síntesis cDNA 1  $\mu$ l

H<sub>2</sub>O hasta 5  $\mu$ l

Mezclar bien y calentar a 70 °C durante 2 min.

Añadir:

5x tampón de primera cadena 1  $\mu$ l

mezcla de dNTPs 0,5  $\mu$ l

H<sub>2</sub>O 0,5  $\mu$ l

transcriptasa inversa MML-V 0,5  $\mu$ l

Mezclar bien y calentar a 42 °C durante 1 h. Pasado el tiempo incubar en hielo para detener la reacción.

## 2.- Síntesis de la segunda cadena de cDNA

reacción primera cadena 7,5  $\mu$ l

H<sub>2</sub>O 20,7  $\mu$ l

5x tampón segunda cadena 8  $\mu$ l

mezcla dNTPs 0,8  $\mu$ l

20x mezcla de enzimas segunda cadena 2  $\mu$ l

Mezclar bien e incubar a 16 °C durante 1 h y 30 min.

Añadir 1  $\mu$ l T<sub>4</sub> DNA polimerasa e incubar a 16 °C 45 min.

Añadir 2  $\mu$ l de una mezcla de EDTA/glucógeno para terminar la síntesis de la 2<sup>a</sup> cadena

Añadir 50  $\mu$ l de fenol y 50  $\mu$ l de cloroformo

Mezclar bien, centrifugar a 14.000 rpm durante 10 min y pasar la fase acuosa a un tubo nuevo.

Añadir 0,5 vol de acetato amónico 4 M y 2,5 vol de etanol al 95%.

Mezclar bien y centrifugar 14.000 rpm durante 15 min.

Eliminar el sobrenadante y secar bien la pella.

Resuspender la pella en 6  $\mu$ l de agua estéril.

## 3.- Ligación del adaptador al cDNA

cDNA doble cadena 5  $\mu$ l

Adaptador Marathon 2  $\mu$ l

5x tampón de ligación 2 µl

T<sub>4</sub> DNA ligasa 1 µl

Incubar 16 °C toda la noche.

Calentar 70 °C durante 5 min para inactivar la ligasa.

Coger 1 µl de la mezcla de ligación y añadir 250 µl tampón tricina-EDTA.

Guardar a -20 °C hasta su uso, tanto el cDNA ligado al adaptador como el diluído.

#### 4.- PCR

prueba	control negativo	
5 µl	5 µl	1/250 cDNA
1 µl	-	oligonucleótido AP1
1 µl	1 µl	oligonucleótido específico
43 µl	43 µl	mezcla maestra (ver más adelante)
-	1 µl	H <sub>2</sub> O

Programa utilizado

1 ciclo a

94 °C 1 min.

30 ciclos a

94 °C 30 seg.

68 °C 4 min.

- Cada mezcla maestra contiene:

5 µl 10x tampón PCR

36 µl H<sub>2</sub>O

1 µl dNTP (10mM)

1 µl 50x mezcla de polimerasa (10 µl Taq polimerasa (Perkin Elmer) + 0,6 µl Pfu polimerasa (Stratagene) + 9,4 1 x tampón PCR).

### 13. CONSTRUCCIÓN Y ESCRUTINIO DE UNA GENOTECA GENÓMICA DE FRESA EN EL BACTERIÓFAGO FIXII

Para la construcción de genotecas genómicas se utilizó el vector  $\lambda$  FIXII ( $\lambda$  FIXII/XhoI Partial Fill-in Vector Kit) de la casa Stratagene. El uso de este vector de desplazamiento requiere que los fragmentos de DNA a ligar tengan un tamaño de 9-23 kb y cuenten con extremos cohesivos del tipo 5'-GA-3'.

#### 13.1 Digestión parcial de DNA genómico con *Sau3AI* y obtención de los fragmentos de 9 a 23 kb

DNA genómico (60  $\mu$ g) de alto peso molecular se digirió parcialmente con 0,8 U de la enzima *Sau3AI* en un volumen de 0,5 ml durante 1 h a 37 °C. Las unidades de *Sau3AI* y las condiciones de digestión parcial adecuadas fueron previamente establecidas mediante digestión con diluciones seriadas de esta enzima. El DNA parcialmente digerido se fraccionó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,5%. Se cortó la parte de gel que contenía fragmentos de DNA entre las 9 kb y 23 kb, y éstos se purificaron mediante electroelución en tampón 0,1X TBE. Tras la electroelución el DNA se concentró mediante deshidratación con butanol. Se realizó una extracción con mezcla FCI, y el DNA se precipitó con etanol. El DNA se resuspendió finalmente en 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O bidestilada.

#### 13.2 Reacción de relleno parcial de los extremos cohesivos

En un tubo eppendorf se mezclaron:

Fragmentos de DNA de 9 kb a 23 kb (5 $\mu$ g)	50 $\mu$ l
Tampón de Fill-In (10X)	30 $\mu$ l
dGTP (10 mM)	5 $\mu$ l
dATP (10 mM)	5 $\mu$ l
Polimerasa Klenow, (9.000 U/ml)	1,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bidestilada	208,5 $\mu$ l
Volumen final	300 $\mu$ l

La reacción se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. La mezcla se trató dos veces con mezcla FCI lavando la fase fenólica cada vez con 100 µl de H<sub>2</sub>O. Estos 200 µl de lavado se unieron a los sobrenadantes previamente recogidos, y el DNA se concentró mediante desecación hasta un volumen de 400 µl. El DNA se precipitó con etanol y se resuspendió en 15 µl de H<sub>2</sub>O. Se utilizaron 3 µl para la reacción de ligación a los brazos del bacteriófago λ FIXII.

### 13.3 Reacción de ligación a los brazos de λ FIXII

En un tubo eppendorf de 1,5 ml se mezclaron:

Vector λ FIX II (1 µg/µl)	1 µl
Fragmentos de DNA (300 ng/µl)	3 µl
ATP (10 mM)	0,55µl
Tampón OPA (Pharmacia)	0,5 µl
T4 ligasa 6.200 UW/ml (Pharmacia)	0,4 µl
Volumen final	5,5 µl

La reacción se incubó durante 36 h a 4 °C.

### 13.4 Empaquetamiento, amplificación y escrutinio de la genoteca

El DNA se empaquetó utilizando el kit Gigapack II Gold Packaging Extract (Stratagene) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. La genoteca se tituló y amplificó utilizando la estirpe de *E. coli* XL1-Blue MRA(P2) tal y como recomienda la casa comercial. Se obtuvo un título primario de 10<sup>10</sup> pfu.

Para realizar el escrutinio de la genoteca, se cogieron 25 µl de una dilución de fagos de 10<sup>-4</sup> y 600 µl de células XL1-blue MRA a una A<sub>600</sub> = 0,5 en MgSO<sub>4</sub> 10 mM, y se incubó 15 min a 37 °C. Pasado este tiempo, se le añadieron 8 ml de top-agarosa e inmediatamente se sembró en placas de Petri de 120 mm de diámetro de NZY. De esta manera se sembraron 6 placas y se pusieron a 37 °C toda la noche. Al día siguiente, las placas se incubaron durante 2 h a 4 °C. Para realizar la transferencia de los fagos a filtros de nailon, se dejó el primer filtro 2

min en contacto con los fagos y 4 min un segundo filtro. Los filtros fueron tratados de la siguiente manera:

- Desnaturalización en NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M durante 2 min.
- Neutralización en NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M pH 8 durante 5 min.
- Lavado en Tris-HCl 0,2 M pH7,5 , 2 x SSC durante 30 seg.

Después de este tratamiento, el DNA de los filtros fue fijado con el Stratalinker. La prehibridación e hibridación se realizaron como se ha descrito en el apartado 9.

La sonda utilizada para el escrutinio contenía el cDNA completo del gen a estudiar. Se procedió de la misma manera para el escrutinio secundario y el terciario.

#### **14. PURIFICACIÓN DE DNA DE BACTERIÓFAGO $\lambda$ FIXII**

Inocular 10 ml de LB conteniendo maltosa (0,2%) y MgSO<sub>4</sub> (10 mM) con una colonia de *E. coli* XL1-Blue MRA (P2). Crecer el cultivo a 30 °C durante toda una noche. Recolectar las células centrifugando a 5.000 g durante 2 min y diluir en MgSO<sub>4</sub> 10 mM hasta una A<sub>600</sub> = 0,5. Mezclar 50-100  $\mu$ l de suspensión de bacteriófago (300.000 ufp) con 100  $\mu$ l de células de *E. coli* del cultivo anterior e incubar durante 20 min a 37 °C. Añadir 5 ml de top-agarosa a la mezcla de fagos y células de *E. coli* y extender sobre una placa de NZY agarosa. Incubar a 37 °C entre 9-14 h. Transcurrido este tiempo, añadir 5 ml de tampón SM a la superficie de la placa y dejar durante 1-2 h a temperatura ambiente con agitación constante y suave. Transferir el SM a tubos de centrífuga y eliminar la contaminación bacteriana por centrifugación durante 10 min a 8000 g y a 4 °C. Recoger el sobrenadante y añadirle RNAsa y DNAsa I (concentración final de cada una de 1  $\mu$ g/ml) e incubar a 37 °C durante 30 min. Añadir un volumen igual de una solución que contenga polietilenglicol al 20% y NaCl 2M en tampón SM e incubar durante 1h a 0 °C. Recoger las partículas fágicas precipitadas por centrifugación a 10.000 g durante 20 min y a 4 °C. Eliminar el sobrenadante y resuspender la pella en 0,5 ml de tampón SM. Añadir 5  $\mu$ l de SDS al 10% y 5  $\mu$ l de EDTA 0,5 M, e incubar a 68 °C durante 15 min. Extraer con mezcla FCI y finalmente precipitar con isopropanol, resuspendiendo el DNA resultante en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O bidestilada.

#### **15. DELECCIONES UNIDIRECCIONALES DEL DNA CON EXONUCLEASA III**

Esta técnica permite obtener subclones seriados útiles para la secuenciación de grandes fragmentos de DNA. Es una modificación de la descrita por Henikoff (1987).



El DNA a delecionar (normalmente 10-15 µg de DNA plasmídico purificado con el kit Wizard Miniprep (Promega)) se digirió con enzimas de restricción para obtener DNA con un extremo cohesivo 5' (susceptible de ser delecionado) y otro 3' protuberante (protegido frente a la Exonucleasa III). Se trató el producto de la digestión con mezcla FCI, se precipitó con etanol y acetato potásico 3 M, y se resuspendió en 10 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada. El DNA así preparado se sometió a diferentes tiempos de digestión con la Exonucleasa III a 37 °C.

Para ocho tiempos de incubación, que corresponden a delecciones crecientes del fragmento, se mezcló en un tubo eppendorf:

DNA (1 mg/ml)	5 µl
Tampón de la Exonucleasa III (5X)	5 µl
H <sub>2</sub> O	12 µl

- Se incubó 1 min a 37 °C y se añadieron 3 µl de Exonucleasa III (la cantidad de enzima ha de ser determinada empíricamente). Se extrajeron alícuotas de 3 µl a distintos tiempos que se añadieron inmediatamente a tubos eppendorf incubados en etanol enfriado con hielo seco, para detener la reacción (5 min). Se añadieron a cada tiempo 3 µl de H<sub>2</sub>O y se incubaron a 70 °C durante 10 min.
- Se añadieron a cada tubo 19 µl de “Mezcla de la Nucleasa S1” y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente.
- Se añadió a cada tubo 0,5 U de Polimerasa Klenow, y se incubaron durante 2 min a 37 °C.
- Se añadieron 1,5 µl de una mezcla de dNTPs (0,25 mM de cada uno) y se incubaron durante 10 min a 37 °C.
- Se añadieron a cada tubo 5 µl de tampón OPA (10X) (Pharmacia), 3 UW de T4 ligasa (Pharmacia) y 1,5 µl de ATP 10 mM. Se incubaron a 12 °C toda una noche. Se transformó *E. coli* DH5αF' tal y como se describe en el apartado 3.2, y se sembraron sobre placas de LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml). Los subclones de tamaño adecuado se seleccionaron mediante el aislamiento de DNA plasmídico de transformantes individuales y análisis del mismo mediante digestión con enzimas de restricción y posterior electroforesis en geles de agarosa.

## 16. SECUENCIACIÓN

Para la secuenciación se utilizó un secuenciador automático *ABI PRISM™ 310* (Perkin Elmer). La reacción de secuenciación se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (AmpliTaq DNA polimerase, FS)*. Como cebadores se utilizaron los oligonucleótidos T3, T7, M13 Universal, M13 Reverse y, en ocasiones, oligonucleótidos específicos. El DNA a secuenciar consistió siempre en insertos clonados en el plásmido pBluescript o bien fragmentos de DNA amplificados por PCR. El DNA plasmídico se aisló utilizando los kits comerciales *Qiagen* o *Qiawell* y siguiendo las recomendaciones del kit.

La mezcla de reacción consistió en:

Terminator Ready Reaction Mix (Perkin-Elmer)	4 µl
DNA molde:	
plasmídico	1,4 µg
o fragmento de PCR	80 ng
oligonucleótido (3,2 pmol/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O bidestilada	hasta 10 µl

El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

- 25 ciclos de:

    96 °C, 10 seg

    50 °C, 1 min

    60 °C, 1min.

Tras la reacción de amplificación por PCR, los ácidos nucleicos se precipitaron añadiendo 1 µl de acetato sódico 3 M, pH 5,2 y 25 µl de etanol al 95%. Las muestras se incubaron en hielo durante 10 min y, a continuación, se centrifugaron a máxima velocidad en una minicentrífuga durante 30 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante, y los ácidos nucleicos se lavaron con 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó 15 min a máxima velocidad, se retiró todo el etanol y las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10-15 min.

Las muestras se disolvieron en 12,5 µl de *Template Suppression Reagent* y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se mezclaron mediante

agitación brusca para asegurar la resuspensión completa de las mismas. Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de ser analizadas en el secuenciador.

## **17. EXPRESIÓN EN *E. coli* DEL GEN DE LA PMSR**

### **17.1 Estrategia de expresión**

El cDNA que codifica la PMSR de fresa se expresó en la estirpe de *E. coli* XL1-blue mediante el sistema de expresión desarrollado por D. B. Smith y K. S. Johnson (1988) pero mejorado por K. Guan y J. E. Dixon (1991) utilizando para ello el plásmido pGEX-KG. Este plásmido lleva el promotor *pLac*, inducible por IPTG, que regula la expresión del gen de la glutatión-S-transferasa (GST) y permite obtener una proteína de fusión recombinante con la GST cuando el fragmento de DNA se inserta en la fase de lectura adecuada. Para ello, existen varios sitios de clonación alternativos en el vector. Esta proteína de fusión recombinante es inmovilizada y purificada mediante cromatografía de afinidad en una columna conteniendo agarosa ligada con glutatión. A continuación, dicha proteína puede eluirse de la columna con glutatión, tras lo cual puede digerirse con trombina, que corta a la proteína de fusión entre los aminoácidos arginina y glicina del linker y, por tanto, liberando así nuestra proteína de interés.

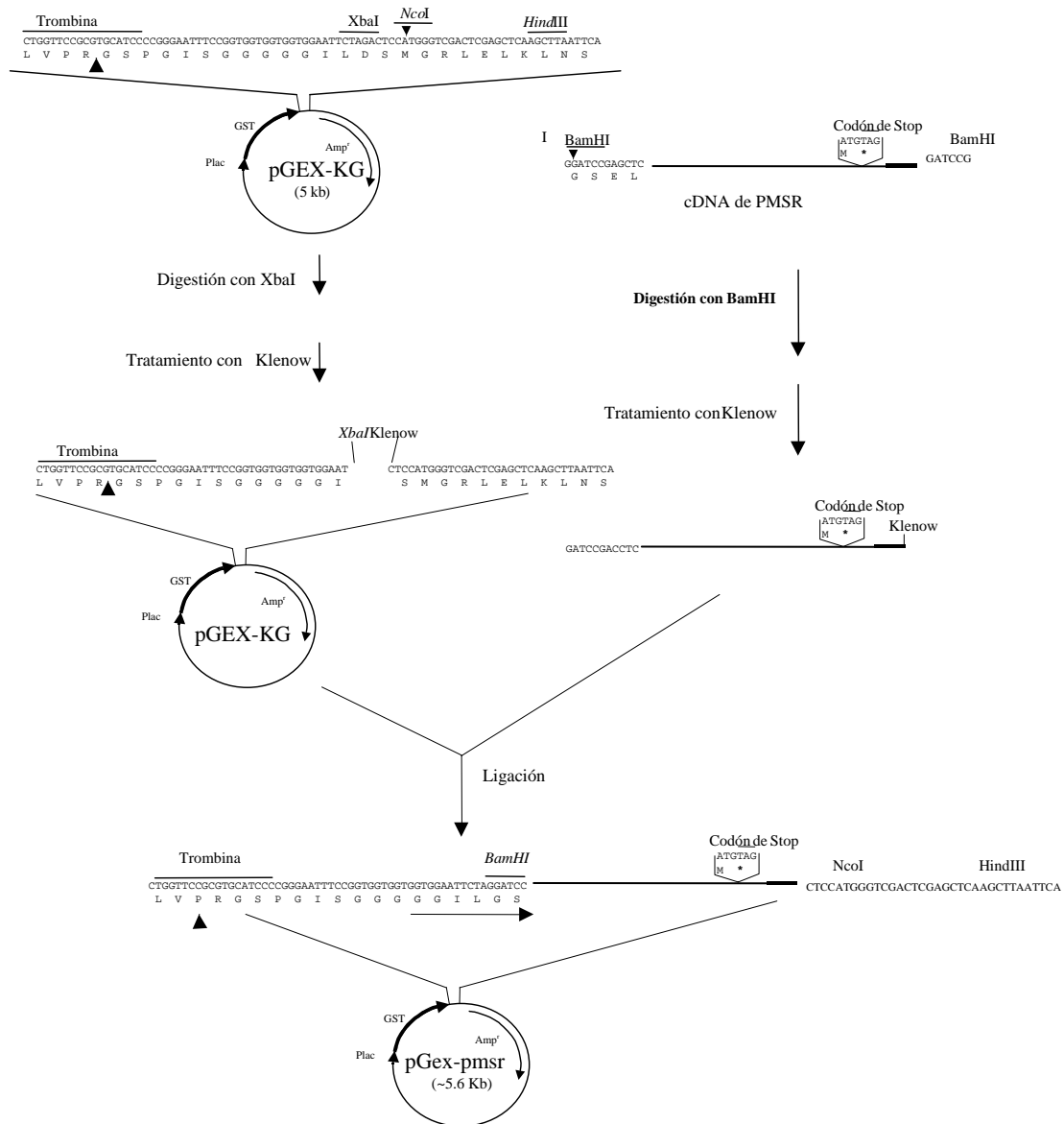
### **17.2 Clonación del cDNA que codifica una PMSR en el vector pGEX-KG**

En primer lugar, se transformó *E. coli* XL1-blue con el plásmido pGEX-KG y se sembró en placas de LB con ampicilina. A partir de una colonia individual y para obtener cantidad suficiente de dicho plásmido, se realizó una maxipreparación de DNA plasmídico.

El plásmido pGEX-KG fue digerido con la endonucleasa de restricción *XbaI* y mediante tratamiento con la polimerasa de Klenow se hicieron los extremos romos.

El cDNA que codifica la PMSR de fresa contenía dos sitios de corte para la endonucleasa de restricción *BamHI*, el primero aproximadamente a 100 pb del codón ATG de inicio y el otro después del codón de terminación. Dicho fragmento fue digerido con dicha enzima, tratándose con la polimerasa Klenow para hacer extremos romos. Tanto el plásmido como el cDNA así tratados se ligaron y transformaron. Al ligar el plásmido pGEX-KG y el fragmento de cDNA digerido con *BamHI*, al entrar en la orientación correcta y en fase de lectura se restaura el sitio de corte primero para *BamHI* que contenía el cDNA (Figura 2). Para comprobar que el cDNA se había insertado en la orientación correcta, se procedió a

digerir esta construcción con una serie de enzimas de restricción. De esta manera se obtuvo la construcción quimérica pGEX-PMSR.



**Figura 2.** Esquema de la clonación del cDNA de la PMSR de fresa en el plásmido pGEX-KG.

### 17.3 Inducción de la proteína de fusión

Se obtuvo un cultivo inoculando 3 ml de medio LB suplementado con ampicilina con una colonia aislada de la estirpe de *E. coli* XL1-blue conteniendo el plásmido con la construcción quimérica pGEX-PMSR. Una fracción de 1 ml de este cultivo se utilizó como inóculo para un cultivo de 10 ml de medio 2YT suplementado con ampicilina (100 µg/ml),

que se incubó hasta que alcanzó una  $A_{600} = 0,9$ . Una fracción de 1 ml del cultivo se retiró y se procesó tal y como se describe a continuación para la muestra inducida (control sin inducir). A continuación se añadieron 20  $\mu$ l de una solución de IPTG al 2,3% (concentración final 0,0046%) y el cultivo se creció a 37 °C durante otras 3 h. Una fracción de 1 ml de este cultivo se centrifugó durante 1 min a la máxima velocidad en una minicentrífuga, se resuspendió en 0,2 ml de tampón de carga para SDS-PAGE (1X) y se hirvió durante 5 min. Se comprobó la presencia de la proteína de fusión recombinante (46 kDa) en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12%. Para ello se aplicaron 20  $\mu$ l de la muestra de cultivo inducido junto a 20  $\mu$ l de la muestra control sin inducir retirada previamente.

#### 17.4 Purificación de la PMSR expresada en *E. coli*

Se obtuvo un cultivo inoculando 20 ml de LB suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) con una colonia individual de la estirpe de *E. coli* XL1-blue conteniendo el plásmido pGEX-PMSR. Con este cultivo se inoculó 1 litro de medio 2YT suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) que se incubó hasta que alcanzó una  $A_{600} = 0,9$ . A continuación, se añadieron 2 ml de IPTG al 2,3% y el cultivo se creció a 37 °C durante otras tres horas.

Las células se recogieron por centrifugación a 5000 g 5 min, se resuspendieron en 10 ml de tampón PBST conteniendo PMSF (0,2 mM), EDTA- $\text{Na}_2$  pH 8 (2 mM) y  $\beta$ -mercaptoetanol (0,1%). Las células se rompieron someténdolas dos veces a 1200 psi en una prensa francesa. El extracto de células rotas se centrifugó a 15.000 g durante 10 min para eliminar los restos celulares. El extracto crudo resultante se utilizó como material para la purificación de la enzima.

Se incubó 1 ml de extracto crudo con 2 ml de suspensión de glutatión-agarosa (50% v/v) agitándose suavemente durante 30 min a 4 °C. La glutatión-agarosa se lavó cuatro veces con 10 ml de tampón PBST a 4 °C (centrifugando 10 min a 5.000 g para separar la glutatión-agarosa del tampón de lavado), y una vez con 10 ml de tampón TCB, a temperatura ambiente. El precipitado de glutatión-agarosa se resuspendió en 2 ml de TCB.

La PMSR (20 kDa) se liberó al sobrenadante mediante incubación del mismo con 50 U de trombina (Sigma) (500 U/ml en PBS) durante toda una noche a temperatura ambiente.

La proteína de fusión (46 kDa) se liberó de la glutatión-agarosa añadiendo un tampón conteniendo 10 mM de glutatión, incubando durante 1 h a temperatura ambiente.

## 17.5 Purificación de anticuerpos policlonales anti-PMSR

Diez  $\mu\text{g}$  de la proteína PMSR purificada como se ha descrito anteriormente, se inocularon en un ratón junto con adyuvante completo de Freund. Al cabo de un mes, al ratón se le inyectaron de nuevo cinco  $\mu\text{g}$  de la proteína junto con adyuvante incompleto como dosis de recuerdo. Pasada una semana, se procedió a sangrar al ratón de la siguiente manera:

- Se inmovilizó el ratón mediante una trampa.
- Se realizó un pequeño corte, con una cuchilla de afeitar esterilizada, en la cola del ratón, recogiendo la sangre que brotaba en un tubo eppendorf.
- Después de recolectar la sangre, se incubó 30 min a 37 °C y posteriormente se dejó a 4 °C toda la noche.
- Finalmente, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante que contenía los anticuerpos se guardó a -20 °C hasta su uso.

## 18. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

### 18.1 Determinación de proteína

La concentración de proteína total se determinó colorimétricamente mediante el método descrito por Bradford (1976). A 0,1 ml de muestra se añadió 1 ml de reactivo Bradford y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, midiéndose la absorbancia a 595 nm.

### 18.2 SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se realizó según el método descrito por Laemmli (1970). El gel separador o analítico se preparó normalmente al 10% y el gel empaquetador al 4%. El volumen de muestra por pocillo fue de aproximadamente 25  $\mu\text{l}$ . Estas muestras contenían: SDS al 1%, DTT 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 6,8, glicerol al 10%, azul de bromofenol al 0,1% y unos 50  $\mu\text{g}$  de proteínas. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 min y se aplicaron a los pocillos. La electroforesis se llevó a cabo en una minicubeta (Bio-Rad) aplicando una corriente inicial de 10 mA por placa

hasta que penetrara la muestra. A continuación se aplicaron 20 mA (200 V) durante 1 h aproximadamente, hasta que el colorante alcanzara el final de la placa.

### **18.3 Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida**

Los geles se tiñeron para proteínas en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0,25% (p/v) en metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 7% (v/v). Posteriormente se destiñeron mediante sucesivos lavados en acético/isopropanol (10% de cada uno en agua bidestilada).

## **19. TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS. INMUNODETECCIÓN EN FILTROS (WESTERN BLOTTING)**

### **19.1 Electrotransferencia de proteínas**

La electrotransferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a filtros de nitrocelulosa se realizó en un sistema de transferencia de Bio Rad (Trans-Blot<sup>®</sup> Transfer Medium, 0,45  $\mu$ m), utilizando un tampón que contenía Tris-base 3 g/l, clorhidrato de glicina 14 g/l y metanol 200 ml.

Finalizada la electroforesis, se eliminó el gel concentrador. En contacto con el cátodo se colocaron 2 papeles secantes del mismo tamaño que el gel separador saturados en el tampón de transferencia, utilizando una pipeta a modo de rodillo para eliminar las burbujas. Sobre ellos se colocó el gel separador y seguidamente la membrana de nitrocelulosa, previamente humedecida en el tampón de transferencia. Finalmente se colocaron otras 2 piezas de papel secante saturados en el tampón en contacto con el ánodo.

La transferencia se llevó a cabo a 4 °C a 200 V durante un periodo de tiempo entre 1-3 horas en función del tamaño de la proteína de estudio.

### **19.2 Tinción de proteínas en nitrocelulosa**

Para la tinción de proteínas en nitrocelulosa se utilizaron dos soluciones que diferían en el colorante utilizado: rojo Ponceau y negro amido, siendo la solución de negro amido más sensible.

1. Solución de negro amido: utilizada mayoritariamente en la tinción del marcador de peso molecular, lo que a su vez nos daba idea de la eficiencia en la transferencia.

La membrana se sumergía durante 30 min, manteniendo agitación suave y continua en una solución que contenía por litro: 5 g de negro amido, 450 ml de metanol, 100 ml de ácido acético. Posteriormente se enjuagaba con agua desionizada para eliminar el exceso de colorante y se desteñía con una solución al 10% de ácido acético y 10% de isopropanol.

2. Solución de rojo Ponceau: es una solución de tinción comercial de rojo Ponceau (electroforesis cellogel, *atom*) utilizada principalmente para visualizar las proteínas posteriormente a la transferencia y así poder cortar las calles donde han migrado. El colorante tiene la ventaja de que puede eliminarse de la membrana tras sucesivos lavados con agua desionizada hasta no observar el color rojo. Este colorante no interfiere en los posteriores pasos de inmunodetección.

### 19.3 Inmunodetección específica de PMSR

Una vez realizada la transferencia, la posición de las bandas correspondientes a la PMSR se detectaron haciendo uso de anticuerpos policlonales anti-PMSR. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- a. La membrana se rehidrató en una solución TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 y NaCl 0,5 M).
- b. Posteriormente se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en una solución de bloqueo que contenía tampón TBS con un 1 % (p/v) de leche en polvo no grasa, manteniendo una agitación suave y continua.
- c. Pasado este tiempo se añadió el anticuerpo primario a una dilución 1:500 y se incubó a temperatura ambiente durante 1,5 h manteniendo la agitación.
- d. El exceso de anticuerpos se eliminó con sucesivos lavados con tampón TBS.
- e. A continuación se añadían los anticuerpos secundarios de ratón conjugados con peroxidasa (Sigma) a una dilución 1:500 con tampón TBS y 0,5% de leche en polvo según las recomendaciones de la casa comercial, incubándose durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente el exceso de anticuerpos se eliminó con sucesivos lavados con tampón TBS.
- f. El revelado se realizó por reacción de la peroxidasa. Para ello se mezclaron dos reactivos previamente preparados: solución A, obtenida disolviendo 6 mg de 4-cloro-1-naftol en 2 ml de metanol frío; solución B, obtenida mezclando 10 ml de tampón TBS a temperatura ambiente y 6 µl de peróxido de hidrógeno al 30%. Las



bandas resultantes de la inmunodetección aparecen en pocos minutos. La reacción se paró enjuagando con agua destilada. La membrana se secó y se conservó en oscuridad debido a que el producto de la reacción de la peroxidasa es fotosensible.

Como marcadores de peso molecular se utilizaron los patrones comerciales de SIGMA.

## **20. TRANSFORMACIÓN DE FRESAS MEDIANTE BIOBALÍSTICA**

### **20.1 Esterilización del material de disparo**

Los discos de ruptura y los macroportadores se sumergen en etanol al 70% durante 15 min y después se pasan a etanol al 100% durante 5 min y finalmente se dejan secar.

### **20.2 Esterilización de la fresa**

- Lavar el fruto de fresa con agua del grifo.
- Lavar con etanol 70% durante 50 s.
- Lavar en lejía al 10% con unas gotas de jabón durante 10 min.
- Lavar con agua estéril durante 10 min. Repetir 3 veces este último paso.
- Cortar las fresas con un bisturí estéril, pasarlas a placas chicas y cubrirlas con CPW 12% líquido. Listas para ser disparadas.

### **20.3 Precipitación del DNA plasmídico de interés con las partículas de oro**

- .- Preparar un stock de una suspensión de microproyectiles (60 mg de partículas de oro en 1 ml de etanol absoluto). Este stock puede ser almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- .- Agitar la suspensión stock durante 1 min, rápidamente recoger 35  $\mu\text{l}$  de la suspensión y pasar a un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml. Centrifugar a alta velocidad durante 30 seg, eliminar el etanol y resuspender la pella en 1 ml de agua estéril. Centrifugar 5 min a 850 g y eliminar el agua.
- .- Resuspender los microproyectiles en 25  $\mu\text{l}$  del DNA plasmídico de interés (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Añadir 220  $\mu\text{l}$  de agua estéril, 250  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  2,5 M y 50  $\mu\text{l}$  de espermidina 0,1 M en

este orden. Mezclar bien y agitar durante 10 min a 4 °C. Centrifugar a 70 g durante 5 min y eliminar el sobrenadante.

.- Resuspender el precipitado de DNA/microproyectiles añadiendo 600 µl de etanol absoluto. Centrifugar a alta velocidad, eliminar el etanol y resuspender la pella en 36 µl de etanol absoluto.

.- Limpiar todas las partes del sistema de biobalística con etanol al 70% y dejar secar.

.- Resuspender la suspensión de DNA/microproyectiles mediante pipeteo y coger 10 µl de la suspensión y colocarlo en el centro del macroproyectil, dejar evaporar el etanol.

.- Colocar la placa de Petri que contiene el material que va a ser disparado a unos 4 cm debajo. Disparar a una presión de 1300 psi.

#### 20.4 Ensayo β-glucuronidasa (GUS)

Mezclar una parte de X-gluc (stock a 25 mg/ml) con 49 partes de solución GUS. Añadir el X-gluc a la solución y no al contrario porque puede precipitar. Incubar el tejido y la solución durante 48 h a 37 °C.

Preparación de soluciones:

##### a) CPW 10X

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	272	mg/l
KNO <sub>3</sub>	1010	mg/l
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	14800	mg/l
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2460	mg/l
KI	1,6	mg/l
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,25	mg/l

##### b) CPW 12%

MOPS 20 mM  
 CPW 1X  
 Sacarosa 12 %

Se prepara una parte como líquido y se esteriliza en el autoclave y a otra parte se le añade 0,8 % de agar, se esteriliza en el autoclave y se rellenan placas de Petri de 60 mm de diámetro.

**c) Solución GUS**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,69 g 50mM
EDTA-Na <sub>2</sub>	0,037 g 1mM
Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup> CN (stock 0,1M)	1 ml 1mM
Tritón x-100 (stock 10%)	1 ml 0,1%
H <sub>2</sub> O	hasta 100 ml

Ajustar a pH 7,0 con NaOH, esterilizar filtrándolo con un filtro de 0,2 µm de diámetro de poro y guardar la solución protegida de la luz a 4 °C.

## **21. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS**

### **21.1 Superóxido dismutasa**

Se utilizó el método descrito por Beauchamp y Fridovich (1971), modificado por Dhinsa y Matowe (1981). Mide la inhibición en la reducción fotoquímica del nitroblue tetrazolium.

El ensayo espectrofotométrico para 1 ml de reacción consiste en:

- Solución fosfato pH 7,8 50 mM
- EDTA 0,1 mM
- Nitroblue tetrazolium 75 µM
- Riboflavina 2 µM
- Extracto de proteínas 20 µl

La riboflavina se añade al final y la reacción se inicia exponiendo la mezcla con la luz de un proyector de diapositivas (100 W), anteponiendo un frasco de Roux con agua para evitar el calentamiento de la mezcla. La reacción se detiene retirando la muestra a los 10 min de exposición con la luz.

El producto de la reacción se mide a 560 nm. Al volumen correspondiente al 50% de la inhibición se le asigna el valor de 1 U.

El extracto de proteínas se obtiene de la siguiente manera:

.- Triturar 0,2 g de frutos de fresa hasta obtener un polvo fino, evitando que se descongele añadiéndole continuamente nitrógeno líquido.

.- Resuspender en 0,4 ml de solución fosfato 50 mM; pH 7,0 conteniendo 1 mM de EDTA- $\text{Na}_2$  y 0,05% de Tritón X-100.

.- Centrifugar 10 min a 10.000 rpm, filtrar el sobrenadante a través de una membrana miracloth y guardar a 4 °C hasta su uso.

## 21.2 Catalasa

El método se basa en la determinación de la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  que puede ser seguida directamente por el descenso de absorbancia a una longitud de onda correspondiente a 240 nm en el ultravioleta durante 5 min. Para evitar la inactivación de la enzima durante el ensayo o la formación de burbujas en la cubeta debido a la liberación de  $\text{O}_2$ , es necesario usar una concentración relativamente baja de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las medidas se realizaron a temperatura ambiente. Antes de medir se realizó una dilución del extracto de proteínas 1/100.

	blanco	muestra
Solución fosfato	166 $\mu\text{l}$	-
Extracto diluido	333 $\mu\text{l}$	333 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}_2$	-	166 $\mu\text{l}$

Preparación de las soluciones:

a) Solución fosfato (50 mmol/l, pH 7,0)

b)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 mmol/l)

Diluir 0,34 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% en la solución fosfato preparada que se ha descrito anteriormente y llevar hasta 100 ml. Preparar esta solución antes de realizar el ensayo.

El extracto de proteínas se obtuvo de la misma manera que se ha descrito en el apartado anterior.

Tanto la actividad superóxido dismutasa como la catalasa fueron medidas en un espectrofotómetro Beckman DU 7500.

### 21.3 Actividad peroxidasa

Se ha utilizado como sustrato el *o*-fenilen-diamina (OPD), y determinado la actividad peroxidasa midiendo espectrofotométricamente la oxidación del OPD por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una reacción catalizada por esta enzima. Se midió el incremento de absorbancia de la mezcla de reacción a 490 nm y a una temperatura de 25 °C.

Los extractos de proteínas de los frutos en diferentes estadios de maduración se obtuvieron, básicamente, como se describe en el apartado 21.1, a excepción del tampón fosfato que tenía en esta ocasión un pH 6. La mezcla de reacción consistió en:

	Blanco	muestra
Sol. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 µl	200 µl
OPD	200 µl	200 µl
Extracto proteínas	–	100 µl
Tampón fosfato	100 µl	–

El OPD tenía una concentración final en la mezcla de reacción de 10 mM. La solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se preparó diluyendo peróxido de hidrógeno comercial 100 veces.

El coeficiente de extinción molar utilizado fue de 0,575 mmoles<sup>-1</sup>.l.mm<sup>-1</sup>. Las medidas fueron realizadas en un espectrofotómetro Beckman DU 7500.

### 21.4 Actividad metionina sulfóxido reductasa (PMSR)

El ensayo está basado en la capacidad de la enzima PMSR de reducir la metionina sulfóxido a metionina.

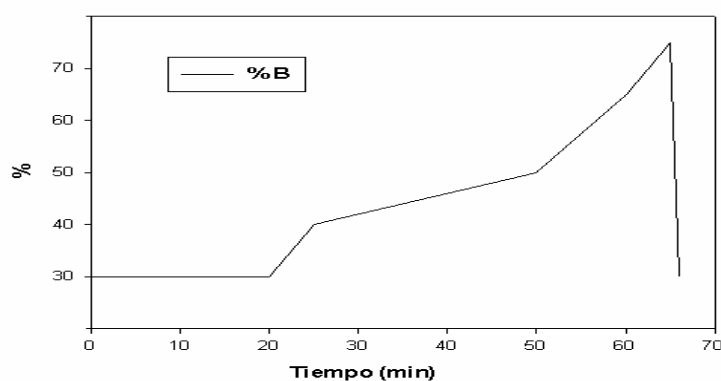
Las mezclas que se utilizaron en el análisis por separado mediante HPLC fueron las siguientes:

- Muestra conteniendo sólo Tris 20 mM pH 7,5.
- Muestra conteniendo sólo DTT 20mM.
- Muestra conteniendo sólo metionina 0,7 mM.
- Muestra conteniendo sólo metionina sulfóxido 0,7 mM.
- Ensayo con PMSR de fresa que contenía Met(O) 0,7 mM, DTT 15 mM, Tris 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 30 mM y 5µg de proteína PMSR purificada.

f) Ensayo con PMSR menos el DTT. Igual que la reacción anterior pero carece de DTT.

Todas las muestras se realizaron en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  y se incubaron a 30 °C durante 1 h. Después de la incubación, a cada muestra se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de etanol y se incubaron 10 min en hielo. Posteriormente, se centrifugaron 5 min a 13.000 rpm. Se recogieron 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante a los cuales se les añadió 300  $\mu\text{l}$  de  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  40 mM pH 9,4, 150  $\mu\text{l}$  de cloruro de dansilo (4 mg/ml en acetonitrilo). Esta mezcla se incubó en oscuridad a 30 °C durante 1 h. La reacción se detuvo añadiendo 40  $\mu\text{l}$  de trietanolamina al 2%. Las muestras, de esta manera preparadas, se analizaron en un HPLC. Se usó una columna de sílica c18 (spherisorb ods2; 5  $\mu\text{m}$ ; 15 x 0,44 cm).

El programa utilizado se describe en la Gráfica 1:



**Gráfica 1.** La gráfica muestra el porcentaje (%) del solvente (metanol) que pasa por el canal B a lo largo del tiempo.

Se emplearon dos soluciones, por el canal A se pasó la solución que contenía agua, ácido acético glacial 6 ml y trietanolamina 80  $\mu\text{l}$  y por el canal B se pasó metanol. Se mantuvo siempre un flujo constante de 1,5 ml/min. En la gráfica sólo se representa la concentración de metanol.

## **CAPÍTULO I**

**“Aislamiento y caracterización génica de una péptido metionina  
sulfóxido reductasa específica de frutos de fresa”**

## 1.1 INTRODUCCIÓN CAPÍTULO I

Algunos aminoácidos como cisteína, lisina, metionina, triptófano y tirosina, pueden oxidarse una vez que forman parte de una proteína. La mayoría de estas oxidaciones pueden ocurrir mediante mecanismos no enzimáticos. Estas oxidaciones no son reversibles, excepto para los aminoácidos cisteína y metionina, y provocan la pérdida de la actividad biológica de dicha proteína si el residuo es importante para la actividad de la misma.

Además, la metionina libre juega un papel clave en la bioquímica de la célula. Como precursor de S-adenosilmetionina, participa directamente en las reacciones de metilación, y sirve como precursor para la generación de etileno en todas las plantas estudiadas. Además, es un aminoácido incorporado en todas las proteínas. Por tanto, cualquier modificación de la estructura de la metionina o de los residuos metionilos en las proteínas puede alterar el equilibrio bioquímico en la célula.

Los residuos de metionina de las proteínas y péptidos pueden ser fácilmente oxidados a metionina sulfóxido por una gran variedad de agentes reactivos, como el anión superóxido, el ion hipoclorito, el peróxido de hidrógeno o los radicales hidróxilo. Existen numerosos ejemplos de proteínas que pierden su actividad biológica cuando determinados residuos específicos de metionina son oxidados a metionina sulfóxido. Un ejemplo lo constituye el inhibidor de proteinasa  $\alpha$ 1-PI (Carp et al., 1978), el principal inhibidor de las proteinasas séricas. Se ha propuesto que esta proteína juega un papel crítico en la modulación de la actividad de la proteinasa elastasa en el pulmón. La inactivación de  $\alpha$ 1-PI se ha implicado en la excesiva destrucción de tejido de pulmón que tiene lugar en enfermos afectados por enfisemas pulmonares. Hay evidencias de que la exposición de la  $\alpha$ 1-PI a agentes oxidantes tiene como resultado la oxidación de residuos de metionina a metionina sulfóxido, lo que provoca la inactivación de la función de dicha proteína. Una oxidación similar puede explicar la baja actividad de la  $\alpha$ 1-PI en los pulmones de personas fumadoras y en ratas que se han expuesto al humo de los cigarrillos. Además, se ha observado que los cristalinos de los pacientes afectados por cataratas contienen concentraciones extremadamente elevadas de metionina sulfóxido y más del 75% de las metioninas han sido oxidadas. Esto puede justificar, al menos en parte, las diferencias físicas que se observan entre los cristalinos normales y aquellos afectados por cataratas. Es conocida la producción de una serie de moléculas



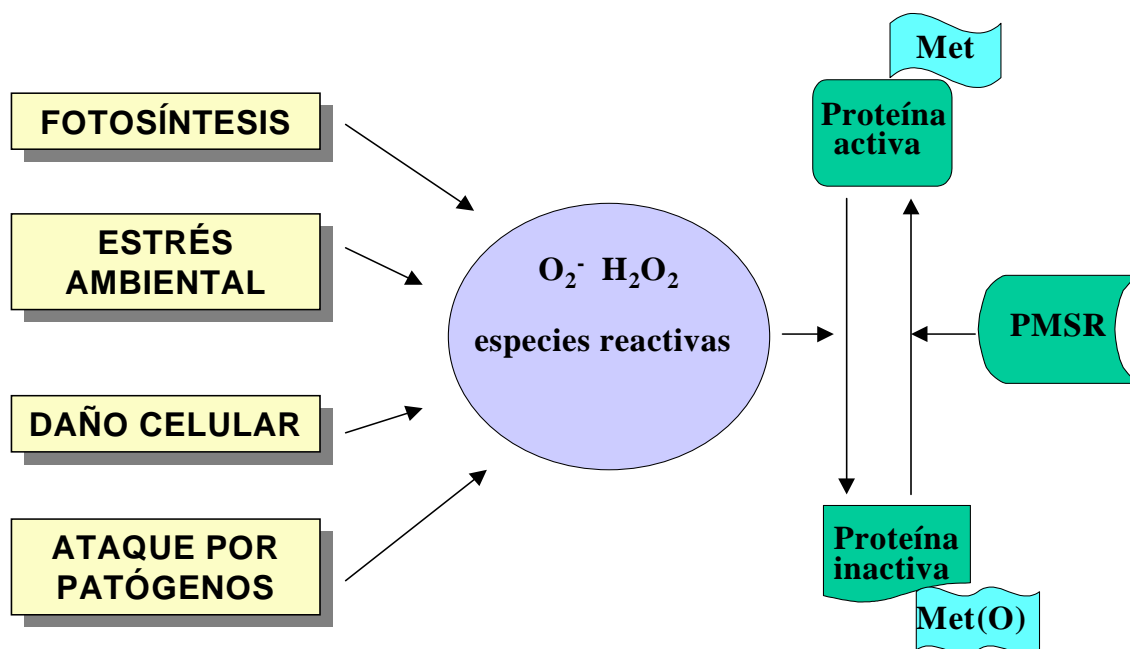
oxidativas transitorias, como el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, que se forman en la cadena de transporte electrónico, así como en otros sistemas enzimáticos que se conocen capaces de oxidar *in vitro* residuos de metionina presentes en proteínas. Estos compuestos oxidantes están presentes en los cristalinos. Las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa pueden convertir estos radicales oxigenados en compuestos inocuos en los cristalinos normales. Estas enzimas pueden estar inactivas en los cristalinos afectados por cataratas (Garner, 1980). Debido a que los cristalinos están normalmente bajo estrés fotoquímico, existe la posibilidad de que la oxidación observada proceda de reacciones fotoquímicas. Las flavinas y otros compuestos fotosensibles presentes en el cristalino causan la oxidación *in vitro* de proteínas azufradas en presencia de luz (Varma et al., 1979). Los cristalinos normales probablemente tienen mecanismos para proteger las proteínas estructurales del daño fotoquímico. La vitamina C o la superóxido dismutasa pueden proteger los cristalinos de ciertos daños oxidativos fotoquímicos y en la formación de cataratas dichos sistemas estarían inactivos.

Se postula que los residuos de metionina oxidados en proteínas están también implicados en patologías como el síndrome de estrés respiratorio en adultos y la artritis reumatoide (Wong, 1980). Como ya se ha mencionado anteriormente, la oxidación de residuos de metionina a metionina sulfóxido en las proteínas puede ser revertida. Inicialmente, una enzima capaz de reducir metionina sulfóxido libre (no ligada a péptidos) a metionina fue encontrada tanto en levaduras (Black, 1960) como en *E. coli* (Ejiri, 1979). Posteriormente se describió el gen *MsrA* que codifica una péptido metionina sulfóxido reductasa (PMSR) en *E. coli* que es capaz de reducir residuos de metionina sulfóxido en péptidos y proteínas a metionina. Sin embargo la metionina sulfóxido libre no es reconocida como sustrato por esta segunda enzima.

Estudios posteriores han mostrado que la PMSR está presente en una gran variedad de organismos entre los cuales se incluyen *Euglena gracilis*, *Tetrahymena pyriformis*, plantas, células HeLa, cristalinos de ojos humanos y bovinos, pulmones y en neutrófilos humanos. Una de las principales diferencias entre plantas y otros organismos es que las plantas tienen dos formas distintas de PMSR, localizadas en distintos orgánulos, que responden de manera diferente durante el desarrollo normal y el estrés medioambiental.

La presencia de la PMSR en una gran variedad de organismos sugiere que puede tener una función importante como enzima reparadora de proteínas que han sido inactivadas por la oxidación de residuos de metionina.

El mecanismo propuesto se muestra en la Figura 3.



**Figura 3:** Función fisiológica propuesta para las PMSRs. Procesos como la fotosíntesis, el estrés ambiental, el daño celular y el ataque por patógenos dan lugar a especies reactivas como  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ , etc., que dañarían e inactivarían las proteínas oxidando los grupos metionina a metionina sulfóxido. Las PMSRs pueden revertir el estado inactivo de estas proteínas.

En este capítulo se describe la clonación y secuenciación de un cDNA que codifica una péptido metionina sulfóxido reductasa (PMSR) de fresa que ha sido obtenido a partir de frutos maduros. La clonación de dicho cDNA nos ha permitido obtener dos clones genómicos de la PMSR en fresa. Se analiza la expresión de dichos genes mediante técnicas de RT-PCR y experimentos de northern blot. Finalmente se ha ensayado la transformación de frutos de fresa mediante biobalística.

## 1.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.2.1 Clonación del cDNA y análisis de la secuencia

Se escrutó una genoteca sustractiva de frutos rojos frente a frutos verdes realizada mediante la técnica MAST-PCR-SBDS (Medina-Escobar et al., 1997a).

Después de sucesivos escrutinios diferenciales se aislaron y purificaron una serie de

clones que eran expresados preferencialmente en los frutos maduros de la fresa. Algunos de ellos fueron posteriormente escindidos del vector λZAP para obtener copias de los insertos integrados en el plásmido pBluescript SK-, los cuales se digirieron con la enzima de restricción *EcoRI* para liberar los insertos de cDNA. Uno de estos clones de un tamaño aproximado de 0,9 kb, fue secuenciado en cada una de sus cadenas. Dicha secuencia se muestra en la Figura 4 y correspondió a un mRNA que codifica una posible péptido metionina sulfóxido reductasa de fresa (*Fragaria x ananassa*).

```

CGAAACAAAATCCCCAGTGAAGCTCACAATGGGCTTCTTCCACTACAAAACAACCCAGCTCT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
                                M A S S T T N N P A L

GGACCTAGATTCCGGACACTCCGGAAAACCCCGGTCACGAGCTTGCTCAGTTCGCTTCAGG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
    D L D S D T P E N P G H E L A Q F A S G

ATGCTTCTGGGGATCCGAGCTCAGGTTTCAGCGAGTCGTCGGCGTGATCAAGACCGAGGT
121  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
    C F W G S E L R F Q R V V G V I K T E V

CGGGTACTCCCAGGGCCACGTCCACGACCCGAATTACAGGCTGGTATGCTCCGGAACCAC
181  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
    G Y S Q G H V H D P N Y R L V C S G T T

CAACCACTCCGAGGTGGTTTCGGGTCCAGTTCGACCCACAAGTCTGCCCATATTCGGATCT
241  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
    N H S E V V R V Q F D P Q V C P Y S D L

TCTTTCGGTGTTTTGGTCTCGTCATGATCCAACACTACCCTCAATCGTCAGGGTGGAGATGT
301  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
    L S V F W S R H D P T T L N R Q G G D V

AGGAACTCAGTATCGATCTGGGATATACTACTACAATGAAGAGCAGGATTGTCTAGCCAA
361  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
    G T Q Y R S G I Y Y Y N E E Q D C L A K

GAAATCGAAGGAAGCAAAGCAAAAAGAGTTTAAGGACAAGAGGGTGGTGACAGAGATTCT
421  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
    K S K E A K Q K E F K D K R V V T E I L

ACCAGCAAAGAGGTTTTACAGGGCAGAGGAGTACCATCAGCAATATCTGGAAAAAGGAGG
481  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
    P A K R F Y R A E E Y H Q Q Y L E K G G

AGGTAATGGCAATAAACAATCTGCTCAAAAAGGGTTGTAATGATCCTATTAAATGCTATGG
541  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
    G N G N K Q S A Q K G C N D P I K C Y G

TTGAGTAACTAATGCATTGTGCCATGATTAGAACTCCTTTGCTGGTTTACTTTTCATGTGA
601  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
    *

AATAACCTATGCCAGTTCATTTATGCTCAAGGCACCAATATGTTTACTTGAATTATATGG
661  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

CAGTACTTTACTTGGTATAAATAAACTAGGTCTAAGTCGACTGATATGAAGTGATAAAAC

```

721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ATTGCCATTATAACTGGGATCCAGAATGTGGTCTATGATGCAATGTGTTTTGTATATCA  
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 AAAAGTTCTAGTTATACCTAGTTTGTGTTGAGTTTTCCAGTCT**AAAAAAAAAAAAAAAA**  
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

**Figura 4.** Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida del cDNA que codifica una posible PMSR de fresa. En negrita se señalan los posibles sitios de inicio y fin de traducción, la posible señal de poliadenilación y la cola poli (A). En rojo se muestra la secuencia aislada originalmente, que se completó realizando un RACE-PCR en su extremo 5'.

El análisis de la secuencia mediante los programas de ordenador fasta y tfasta del paquete informático GCG reveló una gran similitud de este cDNA con otros genes de plantas superiores que codifican posibles péptido metionina sulfóxido reductasas (Tablas 1 y 2).

	<i>Bos</i>	<i>Fragaria</i>	<i>Lycopersicon</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Brassica</i>	<i>Methanobacterium</i>
<i>Escherichia</i>	64,8	45,6	44,7	40,9	43,7	51,2
<i>Bos</i>		44,5	40,1	37,1	38,9	52,4
<i>Fragaria</i>			82,7	69,1	67,5	56,4
<i>Lycopersicon</i>				67,0	66,5	55,5
<i>Arabidopsis</i>					82,3	58,7
<i>Brassica</i>						57

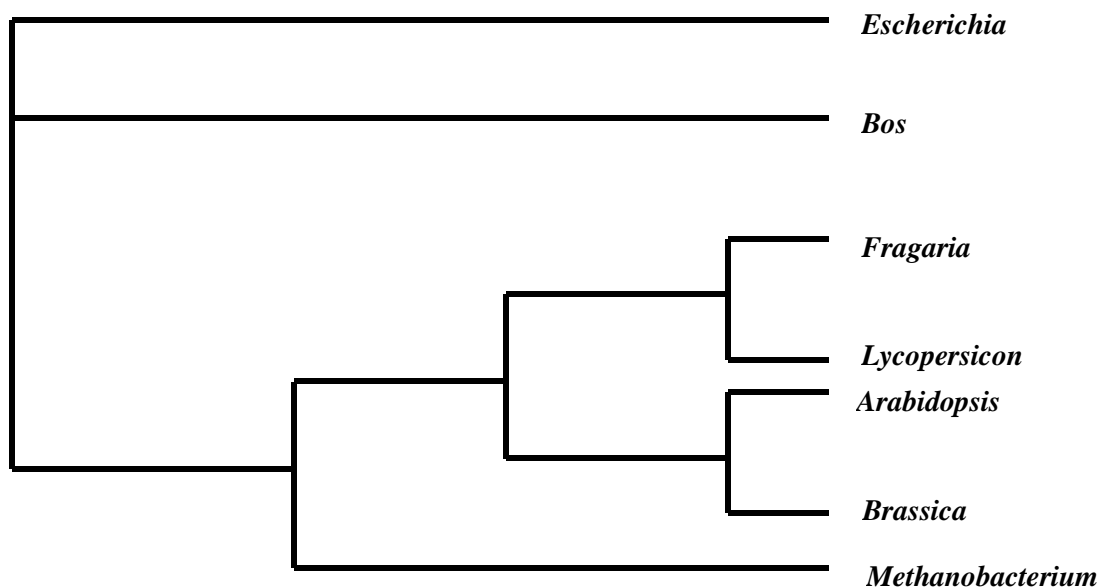
**Tabla 1.** Porcentaje de identidad de aminoácidos observado mediante comparación del cDNA de la PMSR de fresa con otras posibles PMSRs de diferentes organismos.

	<i>Bos</i>	<i>Fragaria</i>	<i>Lycopersicon</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Brassica</i>	<i>Methanobacterium</i>
<i>Escherichia</i>	58,7	45,9	46,0	45,0	43,7	46,1
<i>Bos</i>		47,0	46,9	43,7	46,0	49,0
<i>Fragaria</i>			70,0	62,0	59,2	53,1
<i>Lycopersicon</i>				59,9	60,2	53,7
<i>Arabidopsis</i>					84,0	53,9
<i>Brassica</i>						53,5

**Tabla 2.** Porcentaje de identidad de nucleótidos observado mediante comparación del cDNA de la PMSR de fresa con otras posibles PMSRs de diferentes organismos.

Como puede observarse en las tablas, el mayor porcentaje de identidad, tanto a nivel de aminoácidos como de nucleótidos, se obtiene con la posible PMSR de *Lycopersicon*. A continuación le seguirían las PMSRs de *Arabidopsis* y *Brassica*, estando más alejada la PMSR de *Escherichia coli*.

Estas diferencias de identidad se ponen de manifiesto de manera más clara cuando se representan las diferentes PMSRs de los distintos organismos mediante un árbol filogenético (Figura 5).



**Figura 5.** Árbol filogenético que representa las identidades desde un punto de vista evolutivo de las PMSRs de los diferentes organismos comparados. Para realizar esta comparación se utilizó el programa Paupdisplay del paquete informático GCG.

El análisis de la secuencia también indicaba que el cDNA clonado era incompleto, pudiendo estar ausentes aproximadamente 40-50 pares de bases del extremo 5' o amino terminal. Al mismo tiempo desconocíamos si poseía o no péptido líder. Para obtener el extremo 5' del cDNA se realizó una amplificación de extremos de cDNA (RACE) utilizando el kit comercial *Marathon<sup>TM</sup> cDNA Amplification (Clontech)* tal y como se describe en Materiales y Métodos en el apartado 12. El oligonucleótido específico empleado se diseñó a partir de la secuencia de cDNA y fue el siguiente:

5' CGA GAC CAA AAC ACG GAA AGA AG 3'

En la Figura 6 se presenta la comparación entre la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida del gen de la PMSR de fresa con otras PMSRs de plantas superiores presentes en la base de datos.

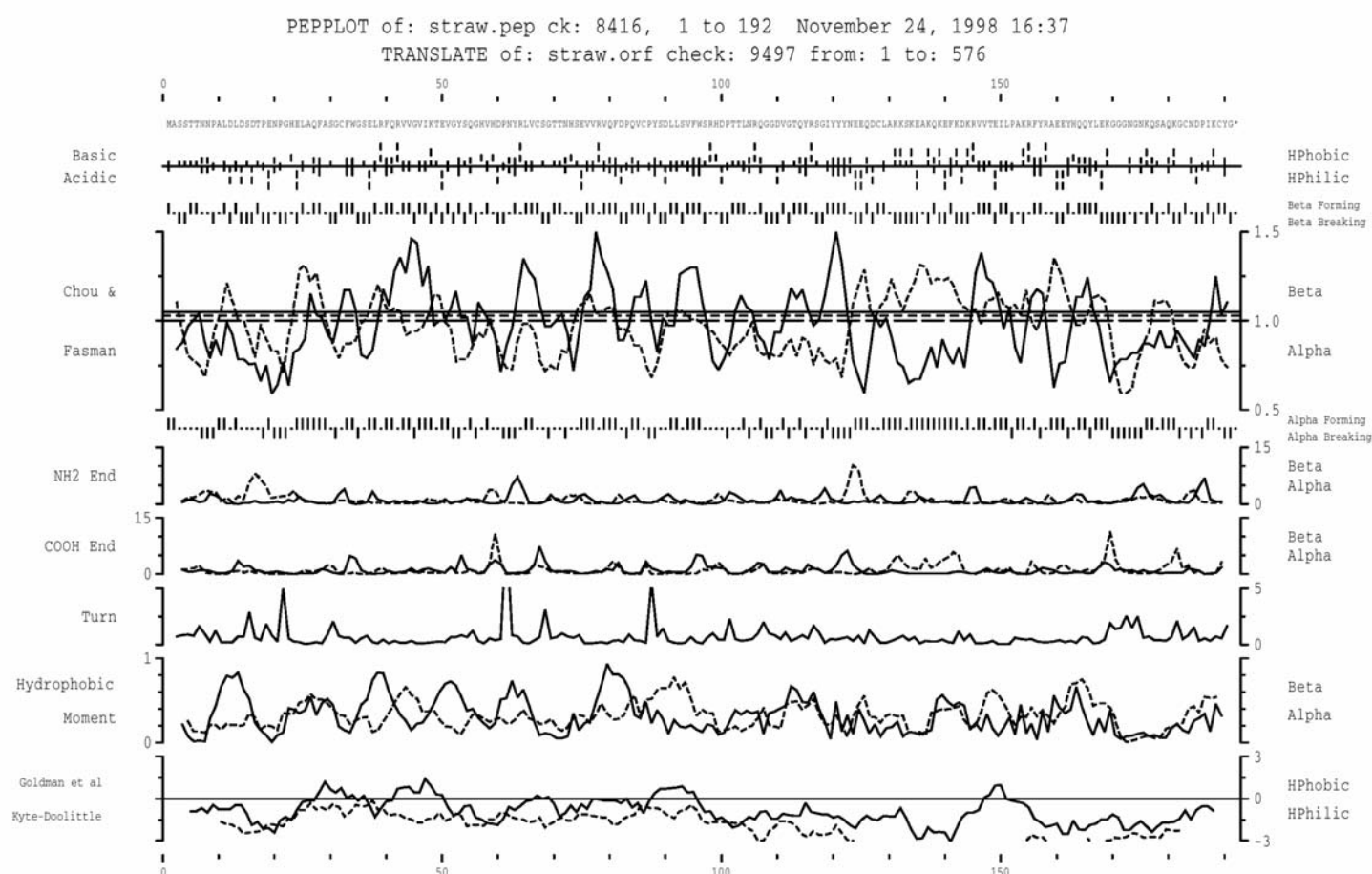
Lycopersic:	~~~~~	:	-
Fragaria :	~~~~~	:	-
Brassica :	MLSIVASPPVLSAVSLSKPLQSLAKAALSLSKRAKETSPPFKTA-RSI	:	47
Arabidopsi:	MQVLVVSPELLIAAASLSKPLNLSLSKAALSFS-RAKRICPFEPQTSRRPI	:	47
3 A pD D P pG 2fA			
Lycopersic:	~~~~~MEGNNSSSKSTTNB <del>ALDEDLDS</del> PDQPGLEFA	:	31
Fragaria :	~~~~~MASSTTNB <del>PALDLDSDT</del> PENEGHELA	:	26
Brassica :	SVYKSEPMNNLFTRLGFGSRPQPD-PAASSAIAQGE <del>DDVPE</del> SEGGQFA	:	93
Arabidopsi:	SVYKSEPMNNL <del>FNRLGFGSRPQAQADPSSAATAQGE</del> DDVPE-SSGQFA	:	94
QF aGCFWG ELA5QRV GV KTEVGYSG Vh1P y 6C3gTT H			
Lycopersic:	QFAAGCFWGV <del>ELAFQRVGGVVKTEVGYSGGNVHDPNFKLICSGTTEHA</del>	:	79
Fragaria :	QFASGCFWGS <del>ELRFQRVGVVIKTEVGYSGGHVHDPNRLVCSGTTNHS</del>	:	74
Brassica :	QFAGCFWGA <del>ELAYQRVPGVTKTEVGYSHGEVDNPTYEDVCSSETTGHN</del>	:	141
Arabidopsi:	QFAGCFWGV <del>ELAYQRVPGVTKTEVGYSHGIVHNPSS</del> EDVCTETTGHN	:	142
E 6R6Q5DP c 5 LL 6FW RHDPTTLNRQG DVGTQYRSGIY5Y			
Lycopersic:	EAIRIQFDENVCPY <del>SNLLSLFWSRHDPTTLNRQGN</del> DVGTQYRSGIY5Y	:	127
Fragaria :	EVVRVQFD <del>EQVCPYSDLLSVFWSRHDPTTLNRQGE</del> DVGTQYRSGIY5Y	:	122
Brassica :	EIVRVQYD <del>PKEVSFESLLDVFWKRHDPTTLNRQGN</del> DVGTQYRSGIY5Y	:	189
Arabidopsi:	EVVRVQYD <del>PKECSFESLLDVFWNRHDPTTLNRQGE</del> DVGTQYRSGIY5Y	:	190
deQ 6A4e E KQ 1446VTEILPA 4FYRAE YHQOYL KG			
Lycopersic:	NDACAQLARE <del>SLEAKQKEFMDKKIVTEILPAKREYRAE</del> EYHQOYLEKG	:	175
Fragaria :	NEEQDCLAK <del>KSKEAKQKEFKDKRVVTEILPAKREYRAE</del> EYHQOYLEKG	:	170
Brassica :	TDEQEKLARE <del>AEME-KQKILNRKIVTEILPATKREYRAE</del> NYHQOYLAKG	:	236
Arabidopsi:	TDEQERLARE <del>AEME-KQKILNRKIVTEILPATKREYRAE</del> NYHQOYLAKG	:	237
G G QSA KGCnDPI4CYG			
Lycopersic:	GGRGCKQSA <del>AKGCNDPIRCYG*</del>	:	196
Fragaria :	GGNCNRQSA <del>AKGCNDPIKCYG~</del>	:	191
Brassica :	GRMGLSQSA <del>EKGCNDPIRCYG~</del>	:	257
Arabidopsi:	GRMGLRQSA <del>EKGCNDPIRCYG*</del>	:	258

**Figura 6.** Comparación de la secuencia de aminoácidos de la posible péptido metionina sulfóxido reductasa de fresa con otras secuencias aminoacídicas de posibles PMSRs de plantas superiores. El consenso completo de aminoácidos se encuentra en negro y las homologías parciales de aminoácidos están sombreadas. La región inicial sombreada en *Brassica* y *Arabidopsis* corresponde al péptido líder que permite su importe a los cloroplastos en estas plantas.

Hay que destacar que en *Arabidopsis* y *Brassica* hay dos isoformas de la PMSR localizadas respectivamente en el citosol y en el cloroplasto. Los genes que codifican la PMSR cloroplástica contienen una secuencia inicial que codifica un péptido líder que es esencial para su translocación a través de las membranas del cloroplasto y que en *Brassica* da lugar a una forma madura de 29 kDa. En cambio las PMSRs de tomate y fresa carecen de dicho péptido líder. Esto sugiere que estas proteínas podrían estar localizadas en el citoplasma. La ausencia de otras secuencias como el dominio KDAL en el extremo carboxilo

terminal nos indica que dicha proteína puede no estar retenida en compartimentos celulares como el retículo endoplásmico.

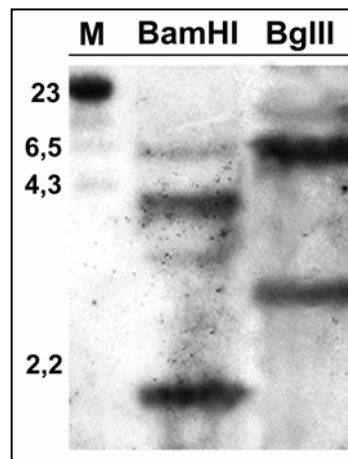
El gen de la PMSR de fresa codifica una proteína deducida de 21.566 daltons y tiene un punto isoeléctrico (pI) predicho de 7,02. Todos estos datos, junto con el hecho de que la PMSR de fresa posee un perfil netamente hidrofílico (Figura 7) sugieren que pudiera tratarse de una proteína localizada en el citoplasma que no está asociada a membranas.



**Figura 7.** Perfil de hidrofobicidad/hidrofilicidad y estructura secundaria predicha para la PMSR de fresa. Se utilizó el programa PEPLOT del paquete informático GCG.

### 1.2.2 Análisis mediante transferencia Southern del gen de la PMSR de fresa

Se digirieron 10 µg de DNA genómico extraído a partir de aquenios de fresa con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Bg*III. El producto de la digestión se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, se transfirió a membrana de nailon y se hibridó con la sonda del cDNA completo que codifica la PMSR. El patrón de bandas de hibridación obtenido (Figura 8) no se ajusta al esperado según el mapa de restricción deducido de la secuencia de cDNA, tanto para la enzima *Bam*HI como para *Bg*III. Por ejemplo, para la enzima *Bg*III, el cDNA clonado no tiene ningún sitio de corte para la misma. Esto podría explicarse con la existencia de un sitio de corte en el genómico o bien con la existencia de otro gen para poder explicar el patrón obtenido.



**Figura 8.** Análisis mediante transferencia Southern del gen de la PMSR de fresa. “M” representa el marcador de peso molecular utilizado, que en este caso fue el  $\lambda$ /*Hind*III. “*Bam*HI” y “*Bg*III” muestran la aparición de las bandas de hibridación obtenidas después de transferir el DNA digerido con dichas enzimas de restricción. Se usaron condiciones de hibridación de alta estringencia.

Por el contrario, el gen que codifica la PMSR en tomate está presente en una única copia por genoma haploide (Cordes et al., 1989). En *Brassica*, el correspondiente gen de PMSR está asociado a genes que codifican oleosinas y está presente en un número de cuatro copias por genoma (Sadanandom et al., 1996). La existencia de dos genes de PMSR en la fresa podría explicarse si consideramos el hecho de que *Fragaria x ananassa* es una planta híbrida resultado del cruce entre *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana*.



### 1.2.3 Clonación del gen que codifica la PMSR de fresa

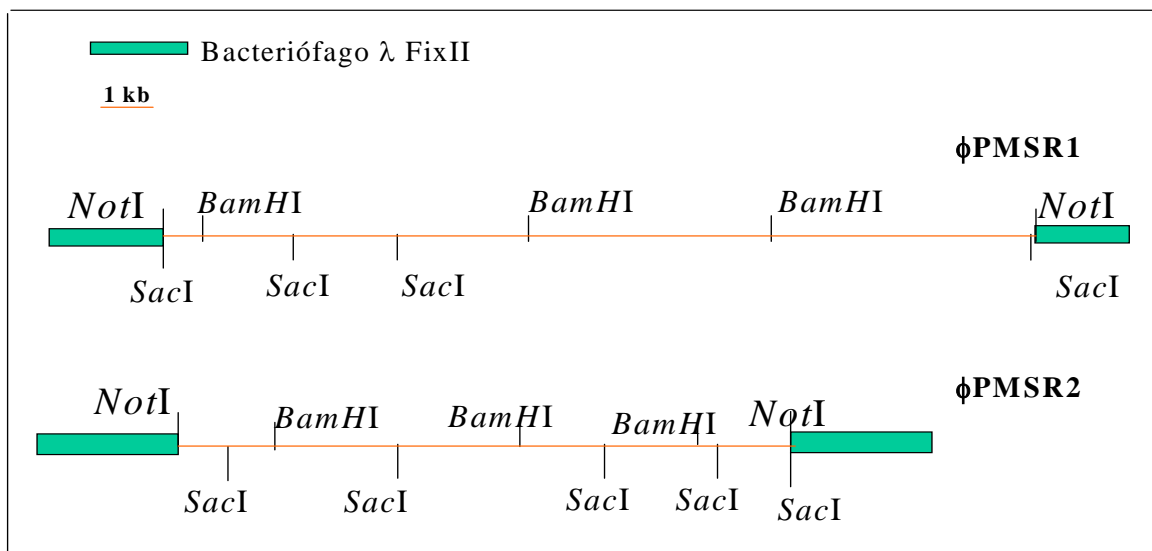
Se construyó una genoteca genómica en el vector  $\lambda$  FIXII (ver Materiales y Métodos, apartado 13) y se escrutaron 250.000 fagos recombinantes. Para llevar a cabo dichos escrutinios se utilizó como sonda el cDNA completo de la PMSR de fresa.

En un primer escrutinio se obtuvieron nueve fagos recombinantes positivos. Tras posterior purificación y caracterización sólo dos fagos fueron aislados y caracterizados. Estos fagos los hemos denominado  $\phi$ PMSR1 y  $\phi$ PMSR2.

### 1.2.4 Análisis de restricción de los fagos obtenidos

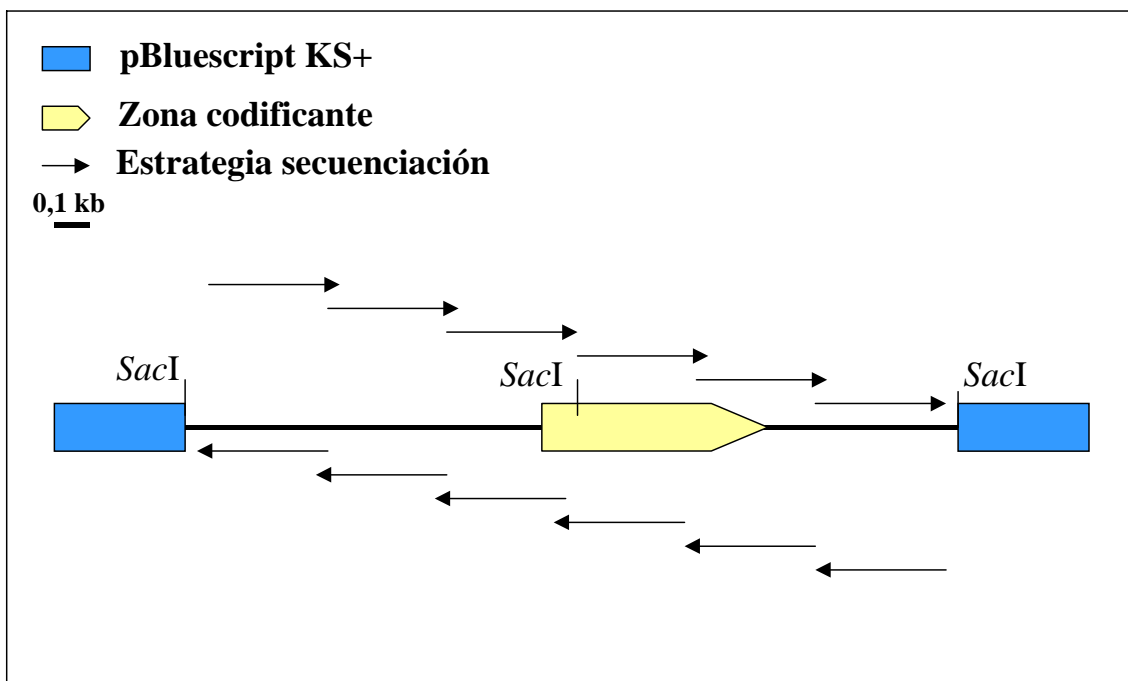
Se aisló el DNA de los fagos obtenidos que fue digerido con las enzimas de restricción *NotI*, *BamHI* y *SacI*. Los DNAs digeridos se fraccionaron en un gel de agarosa al 0,6%, se transfirieron a membranas de nailon y se hibridaron con la sonda del cDNA de la PMSR de fresa.

Los resultados de las digestiones y las hibridaciones (Figura 9) nos permitieron deducir que se trataba de dos clones genómicos diferentes. Los insertos clonados en los bacteriófagos recombinantes  $\phi$ PMSR1 y  $\phi$ PMSR2 se liberaron como fragmentos únicos al digerirlos con la enzima *NotI*, obteniéndose regiones cromosómicas de 17 y 12 kb respectivamente.



**Figura 9.** Mapas de restricción de los fragmentos de DNA genómico de fresa clonados en el vector  $\lambda$  Fix que resultaron positivos al hibridar con la sonda de cDNA correspondiente a la PMSR de frutos de fresa.

Se seleccionaron, tras el análisis de restricción, fragmentos que contenían la región estructural de cada uno de los genes que codifican las dos posibles PMSRs y se subclonaron en el vector pBluescript KS+, dando lugar a las construcciones plasmídicas pPMSR1 y pPMSR2. Para una correcta secuenciación se crearon fragmentos más pequeños mediante deleciones utilizando la *Exonucleasa III*. En la Figura 10 se representa de un modo esquemático la construcción plasmídica pPMSR2. Un sistema similar se utilizó para la construcción y secuenciación del plásmido pPMSR1.



**Figura 10.** Modelo de clonación y estrategia de secuenciación utilizado para las construcciones plasmídicas que contienen la región estructural de la PMSR1 y PMSR2

### 1.2.5 Análisis de la secuencia nucleotídica

La comparación del cDNA con las construcciones plasmídicas pPMSR1 y pPMSR2 nos reveló una identidad de dicho cDNA con la pPMSR1 de un 90%, mientras que con la pPMSR2 esta identidad es del 100%.

Deducimos que el cDNA clonado se corresponde con el gen genómico pPMSR2. La región estructural del gen que codifica la PMSR2 abarca desde el nucleótido 1372 al 2073 y comprende dos exones y un intrón. El primer exón tiene una longitud de 314 nucleótidos (nucleótido 1372 al 1686) y el segundo exón tiene 259 nucleótidos de longitud (nucleótido 1813 al 2073). Por otra parte y considerando la secuencia del cDNA del gen PMSR2, el genómico de la PMSR1 clonado en la construcción pPMSR1 estaría estructurado en un único exón de 566 pb (nucleótido 825 al 1391). Posibles señales de poliadenilación en el clon genómico que codifica la PMSR1 podrían estar localizadas 600 pb después del codón de fin de mensaje y en el genómico que codifica la PMSR2 estaría localizada a 137 pb de su codón de fin de mensaje.

El codón de inicio de la transcripción, tanto en pPMSR1 como en pPMSR2, mantiene el consenso óptimo conservado en plantas superiores (ATGGC), en el que la conservación del nucleótido G en posición +4 es importante (Gallie, 1993). El codón de fin de mensaje para ambos genómicos es TGA.

En la región promotora del genómico PMSR1 se han detectado varias secuencias que se ajustan en mayor o menor grado a la secuencia consenso para la caja TATA. Consideramos la situada en la posición 779 (TTATAA) como la más probable debido a su distancia al ATG inicial, situada a -46 nucleótidos del mismo. También se han encontrado secuencias semejantes a la consenso para la caja CCAAT en las posiciones 759 (CCAAT) y 765 (CCAAT), que podrían funcionar como elementos reguladores.

```

Región 5' promotora
AAGTACTGCAATCGGGATTTTCTTCAAACCCAAATTTTTTTCAAACCCATAATTTTCTTC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
                                     represor
ACACCCAAACTTTTTCACATGAAGAAACTCATATTAAACCTAAATATATAGGTATGGAAA
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGGGAAGTACCTACAATTGGGATTTTCTTCAAACCCAGATTTTCTTCAAATGCAGAAAC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCATATTAAATCCAAATTTTTTCAAACCAGATTTTCTGCTAATTAATCTCCAAACTAGAG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTTCCCAAATGCAGAAACCCAGATTTATCGTCCTTGTAGTCTGCTCATTACCCAAAACG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

```

**E4 / E8BP**

301 CAGAAAATCAAGAGCCTTGAGAGATAAAGAAATTGACGACGACGAGGAAGATCAGAAGAG  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 361 TGAAATCAATCTTAACTTGAGAGAGAAAATGAGAGAGGAAGGAGGAGAGATGGTGTTA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 421 GCAAAGGGAGCCAAAATGGAGTACCCACGCTAAGACCTCTAAGGAGGACAAAATGAAAAA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 481 ACAGATCTAACTTAACCCCATTTATATAAGTACACATTGACACCAAATAAAAAGATTAACC  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 541 AACTTGGACTCCTTATTTAACACAGTTCTAATTAGTACTAGGAAACAAACATGTGTAATA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 601 ACCTTAATTGCTAGCTAGTTCCTTTATGCTACTGGTTGTGATCGTATGAACAAAATGAAAAG  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 661 TTTGCCATCATAATTGGTGCTCATATGACGTATGCAGGTTGGTCAACTTTGGCCTGTATC  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 721 CCGGAGTAGCCTTTGGCGGGTGGAGTCAACTTGTACACCCAATCCAATTTCTCCCATTA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 781 **TAAAGCCAGCTTTGGACCCAAACAAAATCTCCGTCAAACCTCGCAATGGCTTCTTCCACCA**  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 M A S S T T  
 841 CAAACCCAAGCTCAGGACCCAGATTCCGACACTCCGGAAAACCCGGATCACCAGTTTGCT  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 N P S S G P R F R H S G K P G S P V C S  
 901 CAATTCGGGGCGGGTTGCTTCTGGGGAGCCGAGCTCAGGTTTCAGCGAGTCGTCGGCGTG  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 I R G G L L L G S R A Q V S A S R R R D  
 961 ATCAAGACCGAGGTTCCCTACTCCCAGGGCAACGCCACGACCCGAATTACGAGCTAGTC  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 Q D R G S L L P G Q R P R P E L R A S L  
 1021 TGCACAGGAACCACCAACCATTAAGAGGTGGTTTCGGCTCCACTTCGACCCGCAAGTCTGC  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 H R N H Q P L R G G S A P L R P A S L L  
 1081 **P1** →  
 TCATTCTCCGACCTACTAGCCGTATTTGGTCTCGTCATGATCCAACTACCTCAATCGGC  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 I L R P T S R I W S R H D P T T L N R Q

```

1141  AGGGTCGATATGTGGGACTCAATATGGATCTGGGATATATTACTACACTGGAGAGCAGGC
-----+-----+-----+-----+-----+
      G R Y V G L N M D L G Y I T T L E S R L

1201  TCGTCAGCCGAGGAATCCAAGGAAGCAACGCAAAGGAGTTGAAGGACAAGAGCGTGGTGA
-----+-----+-----+-----+-----+
      V S R G I Q G S N A K E L K D K S V V T

1261  CAGAGATTCTTCCGGCGAAGAGGTTTTACAGGTCGGAGGAGTACCACCAGCAATATCTGG
-----+-----+-----+-----+-----+
      E I L P A K R F Y R S E E Y H Q Q Y L E
      C2
      ←
1321  AAAAAGGAGGAGATCATGGCAATCAATCCGCTGAAAAGGGTTGCACTGATCCTATTAGAT
-----+-----+-----+-----+-----+
      K G G D H G N Q S A E K G C T D P I R C

      Fin
1381  GCTACGGTTGAGAAACTAATGCATTGTGCCTTGATTAAAACTCTATGCACACGTTTGACA
-----+-----+-----+-----+-----+
      Y G *

1441  CACAAGACTGCATTACATCTCCTTAATTTTAATACTGTACTTGCCTCATGTAGACTGTC
-----+-----+-----+-----+-----+

1501  TTAAATTGTACTAATACTGAGCCATGTTTGGTGTGCACTGGACTAACTTTCAACTTCATG
-----+-----+-----+-----+-----+

1561  ATAATTTCTTGTATCAATCTCTTCATGCTTCCTATTTATCAACCAGGAAACAATCATTGT
-----+-----+-----+-----+-----+

1621  AATTCTACAAGACATTAGACAAACACCAGGTCATATATTAATGTAGAATCAGCTAGCTTC
-----+-----+-----+-----+-----+

1681  TGAAATTCATCCTCCTACAGTAGTTGATATTAATACTATTATCAACGGCTCATCTAAAAAAA
-----+-----+-----+-----+-----+

1741  AAAACTATTATCAACGGTGTCTAAGAACAAAAAATTTGATTTCCACCATGAAACAATAAT
-----+-----+-----+-----+-----+

1801  TCTTAAATTTTCTTAGCCCATTAGCAACTAAAACAAATAAATTATACAGCAAAATGAAAG
-----+-----+-----+-----+-----+

1861  CTAAAACAAACAAGTTGATGCATATCATAACCATTTTCGTTTTAATTGTTTACATTTTCATGT
-----+-----+-----+-----+-----+

```

```

1921  GAAATAACATATGTCCGGTTCATTTCTGCTCAAGGCACCAATATGTTTACTTGAATTATA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
                Señal poliadenilación
1981  TGGTAGTACTTGGTATAAATAAACTTGGTCTAAGTCGACTGATATGAACTGATAAAACATT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2041  GCCATTATAACTGGGATCGAGTCGACTCCCTTTAGTGAGGGTTAATT                2087
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

```

**Figura 11.** Secuencia nucleotídica del gen de la PMSR1 de fresa y secuencia aminoacídica deducida de la región codificante. En negrita se señalan el codón de inicio de traducción, la posible caja TATA, el sitio de fin de mensaje y la probable señal de poliadenilación. En azul se muestra una posible caja CCAAT. En verde, aparece un sitio de unión E4/E8BP. E4/E8BP es un elemento regulador identificado en la zona promotora del gen de la PMSR en tomate. En púrpura, se representa un posible elemento represor, análogo al que se ha identificado en la zona promotora del gen de la PMSR de tomate. P1 y C1 representan los sitios de unión de los oligonucleótidos del mismo nombre que se han utilizado para los análisis de expresión mediante RT-PCR.

De la misma manera, en la región promotora del genómico PMSR2 (Figura 12) también se han detectado numerosas secuencias que se ajustan a la secuencia consenso TATA. De nuevo, consideramos la situada en la posición 1333 (TTATAA) como la más probable debido a que está situada a -39 nucleótidos del ATG de inicio. Finalmente, también se han encontrado algunas secuencias parecidas a la secuencia consenso CCAAT de plantas como la situada en el nucleótido 1268 (GCAAT).

Al realizar un análisis más detenido de las dos regiones promotoras encontramos algunas diferencias entre ambas. Así, por ejemplo, en la zona promotora de la PMSR2 encontramos secuencias consenso de posibles sitios de unión a factores de transcripción tipo c-myb situadas en las posiciones 550 y 1208, mientras que el promotor de la PMSR1 carece de dichas secuencias consenso. Otros genes que se expresan específicamente en frutos maduros, como por ejemplo la pectato liasa, también contienen secuencias consenso para factores de transcripción de tipo c-myb (Benítez, datos sin publicar). Este hecho podría llevarnos a pensar en la posibilidad de que factores de transcripción de este tipo estén controlando la expresión de genes en maduración de forma coordinada, ya que la pectato liasa también se expresa en los estadios finales de la maduración.

**Región 5' promotora**

1 TAATACGACTCACTATAGGGCGTCTGACTCGATCAGCTTGGTCTTGAACAACATAGCACAA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 61 CAATCAAATGGAGTACATACCGCGAGTAACAAAAACCATCATCAGAACAAAAGCCCGGCA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 121 GGGTTAGCCGATTGGCAAAGATAATCAAAAGAATTTAGACAAACGTGGTCGGCAGGATTC  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 181 GAAACTGCGCGGGCAAAGCCCACATGATTTCTAGTCATGCCCGATAAACCACTCCGGCACG  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 241 ACCACATTGATGTTCTTATACTTACTTTTTCTGTTTTGTTACATCACTTTGTTGGTTTTTC  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 301 CTTTTCTTTTCTCAGAAGCATGTATCTGTTTTTTCTTTTTCTTTTTCCCCGATGAATAGAA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

**E4/E8BP**

361 GCATGTATTTGTTGCTTGTACTAGTTATACGCTTTTCTTTATAATTTCCCTCTAATATCA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

**represor**

421 TCTTCGATTCAACTGGCAGCCTTGGAGATAGTGAGATGCACAAAACCGAAACTCTAGATAA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 481 GTGTTGAATAAGTATTCTTTCTTTTAAACACAATAACCAACTACCATCAAGATTTGAGATG  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

**c-myb**

541 GAAAGAAATGGGATTGAATGATTTGAATCCCCTCGCCAAAAGCAAGTCAGCTGCAGACTAA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 601 CTGATTGACAACGTGTACTTAGGTTTCATGGCCGTCTATCAGGGCGATGCCACTACGTGA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 661 ACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCT  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 721 AAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 781 GGGAAAGAAAGCGAAAGGAGCGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCG  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 841 TAACCACCACCCCGCCGCGTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCCATTCA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

901 GGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGG  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

961 CGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTCACGCCAGGGTTTTCCAGTCAC  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

1021 GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGG  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

1081 AGCTCTAATACGACTCACTATAGGGCCTCGACTCGATCAGCTTGGTTCTTGAACAACATA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

1141 ACTACGATACGGGAGTCAGGCAACTATTGTCTTCTTTGTTGCTGTTGTGGACATACTTAC  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

1201 AATATTCTCCTT**GAACACAT**TGAACCGCTGTGCTTCTCATCAAGGCTACTCCACCTCTCG  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

1261 TACTGCT**GCAAT**CCATGACGCAGCTCTGGAACAAAACCAGATTAACGACGCGTCGTTGGA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

1321 **Caja TATA** **Inicio**  
 ATCACTTCTCAATT**TATAAA**AGACCGAAACAAAATCCCCAGTGAAGCTCACA**ATGG**CTTCT  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

1381 **M A S**  
 TCCACTACAAACAACCCAGCTCTGGACCTAGATTCCGGACACTCCGGAAAACCCCGGTCAC  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

1441 **S T T N N P A L D L D S D T P E N P G H**  
 GAGCTTGCTCAGTTTCGCTTCAGGATGCTTCTGGGGATCCGAGCTCAGGTTTCAGCGAGTC  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

1501 **E L A Q F A S G C F W G S E L R F Q R V**  
 GTCGGCGTGATCAAGACCGAGGTTCGGTACTCCAGGGCCACGTCCACGACCCGAATTAC  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

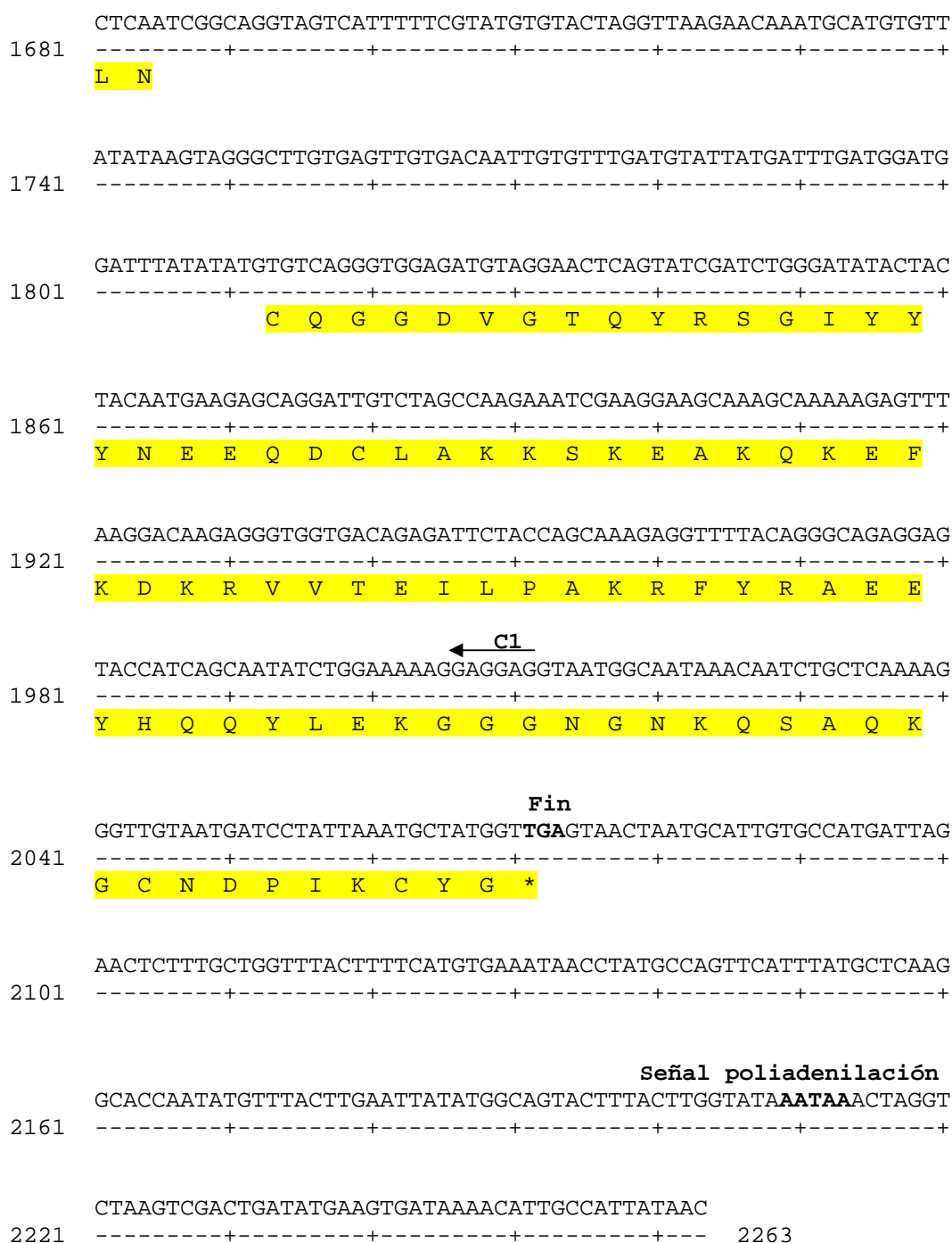
1561 **V G V I K T E V G Y S Q G H V H D P N Y**  
 AGGCTGGTATGCTCCGGAACCAACCAACTCCGAGGTGGTTCGGGTCCAGTTCGACCCA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

1621 **R L V C S G T T N H S E V V R V Q F D P**  
 CAAGTCTGCCATATTCCGATCTTCTTTCCGTGTTTTGGTCTCGTCATGATCCA**ACTACC**  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

1621 **Q V C P Y S D L L S V F W S R H D P T T**  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

→ **P2**





**Figura 12.** Secuencia nucleotídica del gen de la PMSR2 y secuencia aminoacídica deducida de la región codificante. En negrita se muestran el codón de inicio de traducción, la posible caja TATA, el sitio de fin de mensaje y la probable señal de poliadenilación. En azul se indican las posibles cajas CCAAT. En verde se muestra el sitio de unión E4/E8BP y en rojo probables sitios de unión de factores de transcripción de tipo c-myb. Finalmente, en púrpura se muestra la existencia de un posible represor. P2 y C1 representan los sitios de unión de los oligonucleótidos del mismo nombre que se han utilizado para los análisis de expresión mediante RT-PCR.

Se ha descrito la estructura y organización génica de una serie de genes que codifican PMSRs en plantas. En el caso del gen que codifica la PMSR de tomate, ha sido estudiada extensamente con el objetivo de comprender cómo se regula la expresión génica durante la maduración en los frutos climatéricos (Lincoln et al., 1987). Este gen, en concreto, es uno de los candidatos ideales para llevar a cabo dicho estudio. Esto es debido a que el mRNA de la PMSR es abundante en frutos de tomate maduros y no se detecta en frutos inmaduros ni en raíces, hojas y tallos. Su expresión génica es activada por etileno y la mutación rin (ripening inhibited) que bloquea muchos aspectos de la maduración, incluyendo reblandecimiento, producción de etileno y desarrollo de color, reduce la concentración de mRNA de la PMSR (Lincoln y Fischer, 1988a; 1988b).

Estos estudios han permitido la identificación en la región promotora del gen PMSR de tomate de dos elementos reguladores involucrados en el control de la transcripción del mismo.

Así, se han encontrado secuencias de DNA requeridas para la transcripción en respuesta al etileno en el promotor del gen PMSR durante la maduración de los frutos de tomate, localizándose en las posiciones de los nucleótidos -142 a -110 en relación con la caja TATA (Xu et al., 1996). Esta proteína de unión a DNA está presente a elevadas concentraciones en extractos nucleares de frutos inmaduros de tomate, pero dicha concentración se ve reducida cuando los frutos inmaduros se tratan con etileno, y no está presente en los frutos maduros. Por tanto, se ha sugerido que esta proteína podría ser un represor que interaccionara con secuencias relacionadas a sitios de unión de un regulador positivo que a su vez regula la transcripción génica de la PMSR.

Investigamos la existencia de dicho elemento represor descrito y encontramos en el gen de la PMSR1 una región (nucleótido -747 al -731) que tiene una identidad del 72% con la secuencia que contiene dicho elemento en la PMSR de tomate. En la zona promotora del gen de la PMSR2, la identidad es aún mayor, un 92%, que se extiende desde el nucleótido -945 al -934 respecto al ATG de inicio.

Se ha estudiado una segunda proteína de unión a DNA que interacciona con secuencias tanto del promotor de la PMSR de tomate como del promotor del gen E8 de tomate, un gen cuya expresión está coordinada con la expresión de la PMSR durante la maduración. La actividad de unión de esta proteína correlaciona la expresión de la PMSR y del E8, de tal manera que la actividad de unión de dicha proteína es mayor cuando se usan extractos de frutos maduros que cuando las proteínas nucleares se extraen de frutos

inmaduros. El sitio de unión para esta proteína ocupa la caja TATA (-33 a -12) de la PMSR de tomate pero en el E8 está localizada desde -936 a -920 en relación al sitio de inicio de la transcripción. Nos referiremos a esta proteína como E4/E8BP. En el caso de la PMSR de tomate se ha demostrado (Cordes et al., 1989) que son las regiones que flanquean y no la caja TATA las que poseen la actividad de unión a DNA.

Intentamos localizar dicha secuencia E4/E8BP en los dos promotores de los genes PMSR1 y PMSR2 de fresa y encontramos que en la PMSR1 existe una secuencia que mantiene un 90% de identidad con E4/E8BP (ver Figura 11). La PMSR2 de fresa también tiene una secuencia que tiene un 90% de identidad con la E4/E8BP (ver Figura 12).

La existencia de estas regiones de secuencias muy similares a las descritas para el gen de la PMSR de tomate que responden a la señal del etileno, y el hecho de que al menos el gen de la PMSR2 de fresa responde a la señal de ausencia de auxinas (ver apartado 1.2.8), nos plantea la necesidad de futuros experimentos de retardo en gel con el propósito de verificar la existencia real de dichos elementos y de nuevos que respondan a las auxinas.

Estos estudios podrían aclarar si los elementos que regulan genes de frutos climatéricos también regulan o no genes de frutos no climatéricos.

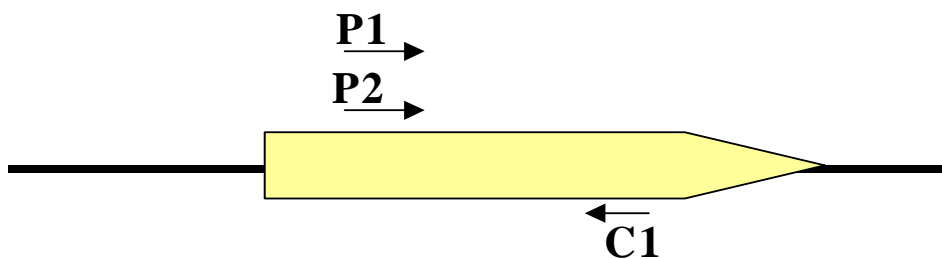
### **1.2.6 Análisis de la expresión de los genes de la PMSR de fresa mediante RT-PCR**

Con el objetivo de investigar la expresión de los genes que codifican la PMSR1 y la PMSR2 se llevó a cabo dicho estudio mediante la técnica de "RT-PCR". La comparación entre las dos secuencias genómicas nos puso de manifiesto una elevada identidad entre ambas. Este hecho dificultaba la obtención de sondas del extremo 3', que normalmente se usan para analizar la expresión entre genes muy parecidos, por lo que decidimos realizar una aproximación mediante la utilización del RT-PCR.

Disponíamos de una población de cDNA de frutos rojos obtenida cuando realizamos el experimento de RACE (Materiales y Métodos, apartado 12), con lo cual sólo teníamos que diseñar oligonucleótidos adecuados y realizar la PCR utilizando dicho cDNA.

Diseñamos oligonucleótidos específicos para cada uno de los dos genes de la zona 5' de los mismos y un oligonucleótido común de la zona 3'. Los oligonucleótidos fueron los siguientes:

- P1:** 5' GCTCATTCTCCGACCTACTAG 3' específico para la PMSR1  
**P2:** 5' GCCCATATTCGGATCTTCTTT 3' específico para la PMSR2  
**C1:** 5' TCCTCCTTTTCCAGATATTG 3' común para ambos genes



**Figura 13.** Estrategia desarrollada para llevar a cabo el RT-PCR con objeto de estudiar la expresión de los genes PMSR1 y PMSR2. P1 y P2 representan los oligonucleótidos específicos para la PMSR1 y PMSR2, respectivamente. C1 representa la posición donde hibrida el oligonucleótido común para ambas secuencias.

El programa de PCR que se empleó fue el siguiente:

96 °C 30 seg.

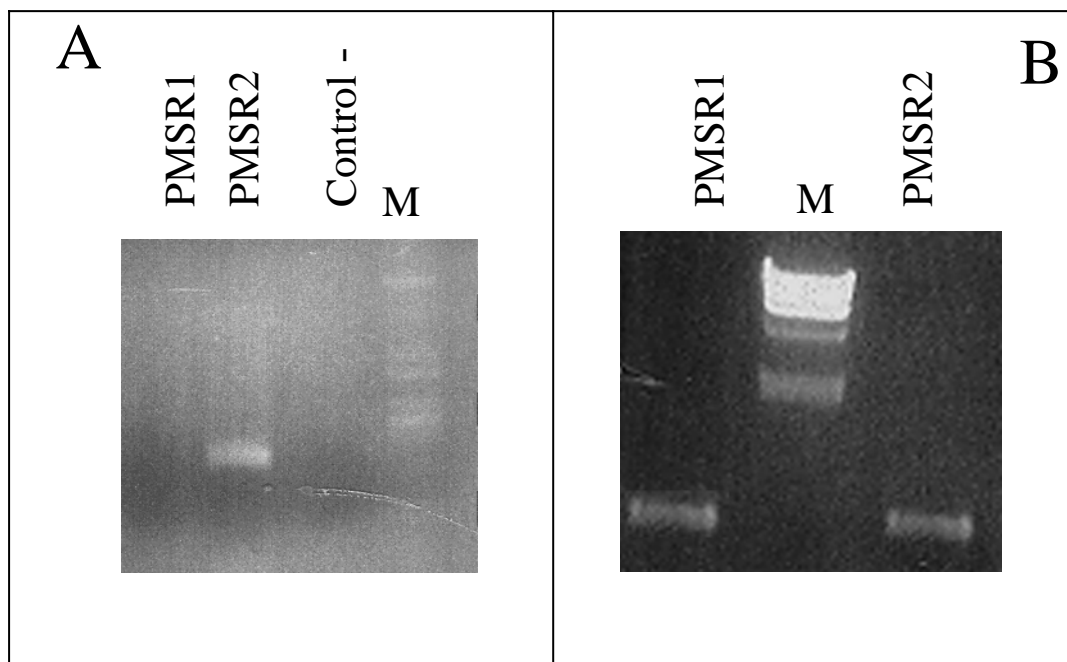
60 °C 1 min.

72 °C 1 min.

Este programa se repitió durante 25 ciclos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14. La aparición de un producto de PCR como resultado de la amplificación con los oligonucleótidos específicos de la PMSR2 y que además era del tamaño esperado, confirma que efectivamente este gen se está expresando en los frutos rojos de las fresas (Figura 14A). La ausencia de amplificación cuando se utilizan los oligonucleótidos para la PMSR1 indican que dicho gen no está expresándose en frutos rojos.

Como control se usó para la amplificación los mismos oligonucleótidos, utilizando como molde DNA genómico, obteniéndose una correcta amplificación (Figura 14B).

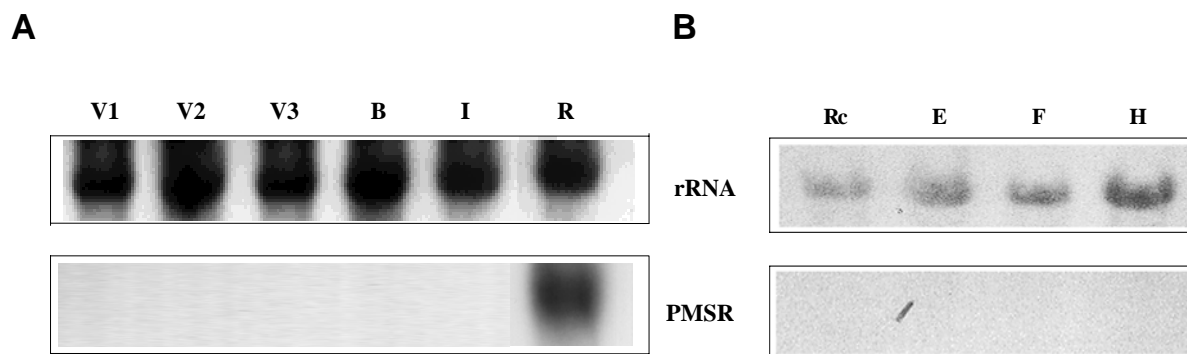


**Figura 14.** A) Imagen del gel de agarosa al 1,2% con el resultado del RT- PCR realizado con el cDNA de frutos rojos de fresa. “M” es el marcador 1kb ladder. “Control -“ indica una calle donde la PCR se hizo sin DNA. “PMSR1” muestra el resultado obtenido tras la PCR utilizando el oligonucleótido específico para el gen de la PMSR1 y el oligonucleótido común. “PMSR2” resultado obtenido tras la amplificación con su oligonucleótido específico y el común. B) Imagen del gel de agarosa al 1,2% después de las amplificaciones por PCR realizadas usando DNA genómico de fresa. “M” representa el marcador  $\lambda$ /HindIII. “PMSR1” es el resultado de la amplificación realizada con los oligonucleótidos específicos para el gen PMSR1. “PMSR2” indica la amplificación llevada a cabo para amplificar el gen PMSR2.

### 1.2.7 Análisis de la expresión génica mediante experimentos de northern

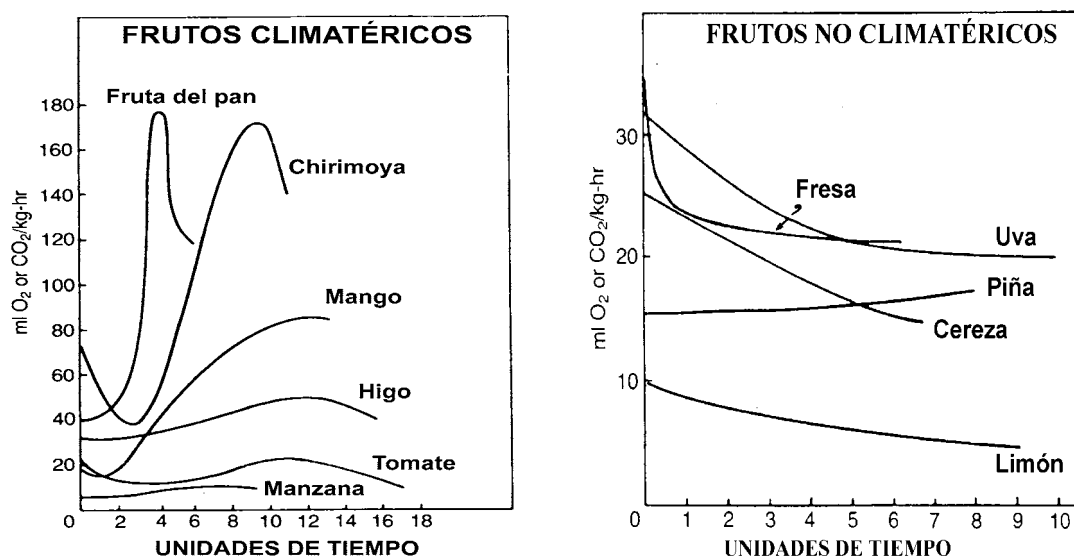
Una vez que se comprobó que el gen PMSR2 es el único que se expresa en frutos rojos, se procedió a analizar con más detalle su patrón de expresión temporal y espacial mediante experimentos de northern.

La Figura 15 muestra que en la fresa aparece un único transcrito con un tamaño estimado de 0,9 kb. La expresión de este gen tiene lugar únicamente en frutos en el estadio rojo de maduración. No se ha encontrado expresión en frutos en otros estadios de maduración más tempranos. Tampoco hay transcritos detectables de este gen en otros tejidos de fresa como raíces, estolones, hojas o flores.



**Figura 15.** Estudio de la expresión espacio-temporal mediante northern del gen que codifica la PMSR2 en frutos de fresa. En A se analizó la expresión de la PMSR2 en los diferentes estadios de maduración de frutos de fresa, verde 1(V1), verde 2(V2), verde 3(V3), blanco (B), intermedio (I) y rojo (R). En B se analizó su expresión en los tejidos de la fresa, raíces (Rc), estolones (E), hojas (H) y flores (F). Como sonda se utilizó el cDNA completo de la PMSR mostrado en la Figura 4. En cada calle se cargaron 25  $\mu$ g de RNA total. Como control de la cantidad de RNA usado se hibridaron los filtros con rRNA 18 S.

La expresión de la PMSR en los frutos de fresa es un hecho sorprendente si se considera la posible función de este gen en la reversión de la actividad de proteínas inactivadas mediante estrés oxidativo, ya que se ha descrito que en la fresa, fruto no climatérico, no se produce un aumento respiratorio a lo largo de la maduración sino que por el contrario, hay una disminución en el consumo de oxígeno a lo largo del desarrollo del fruto (Figura 16).



**Figura 16.** Consumo de oxígeno a lo largo del tiempo en frutos climatéricos y no climatéricos. Esta imagen ha sido obtenida de *Biochemistry of Fruit Ripening* (Seymour GB., Taylor JE., Tucker GA. Eds.).

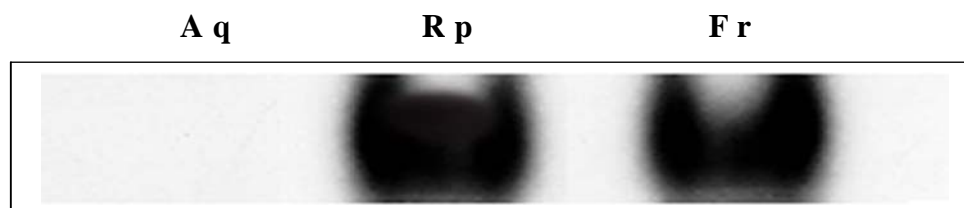
Por tanto, se podría postular que no habría un aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno en el estadio final de la maduración de la fresa que es la etapa donde tiene lugar la expresión de la PMSR2. Esta expresión nos sugirió que la PMSR en fresa pudiera tener otra funcionalidad diferente de la que se ha descrito hasta ahora. Hay que destacar que el patrón de expresión de la PMSR de tomate es muy parecido al de la PMSR de fresa, encontrándose su expresión en frutos de tomate maduros varios días después de haber tenido lugar el pico máximo de respiración típico de los frutos climatéricos. Esto quiere decir que la expresión de la PMSR de tomate no coincide con el momento de máxima actividad respiratoria donde se podría predecir que va a tener lugar la máxima producción de radicales oxigenados.

Sin embargo, el análisis de los patrones de expresión de los genes que codifican las dos PMSR en *Brassica* sugiere que tienen una función biológica relacionada con el estrés oxidativo. La expresión de la PMSR plastidial es extremadamente baja en tejidos no fotosintéticos, como las raíces y las hojas etioladas. Por el contrario, esta expresión aumenta mucho durante la de-etiolación. Estos datos sugieren que la PMSR tiene un papel protector durante el desarrollo de los tejidos fotosintéticos, ya que en el cloroplasto y debido a la fotosíntesis se forman grandes cantidades de radicales y especies reactivas de oxígeno. La correlación en la inducción de la PMSR plastidial de *Brassica* con la adquisición de la capacidad fotosintética justifica la presencia de actividad PMSR, que debiera estar implicada en la reparación de las proteínas que han sufrido daño oxidativo durante la fotosíntesis.

Sin embargo, la isoforma citosólica de la PMSR de *Brassica* tiene un patrón de expresión completamente diferente a la PMSR plastidial, encontrándose muy baja expresión en todos los tejidos probados y muy fuertemente inducida por daño celular. Sin embargo, otros tipos de estrés ambiental, como baja y alta temperatura o alta luminancia, no tienen efecto en la inducción de la PMSR citosólica de *Brassica*. El daño celular provoca un estrés oxidativo en las células alrededor del área dañada y esto forma parte de la respuesta de las plantas al ataque por bacterias y hongos. El daño celular también induce enzimas, como inhibidores de proteasas, que son importantes componentes de defensa de la planta frente al ataque de herbívoros, pero que potencialmente podrían estar inactivadas por la oxidación (Sadanandom, 1997).

Para determinar si la PMSR2 de fresa podría desempeñar alguna función en los aquenios a lo largo del proceso de la maduración, se ha analizado mediante northern la

posible presencia del mRNA de la PMSR en los mismos. En la Figura 17 se muestra que la expresión de la PMSR2 se encuentra localizada tanto en frutos completos como en los receptáculos, pero no en los aquenios. En consecuencia, se puede descartar la participación y expresión de esta PMSR en el metabolismo de los aquenios.



**Figura 17.** Análisis mediante northern de la expresión de la PMSR2 en aquenios (Aq), receptáculos (Rp) y frutos rojos completos (Fr). En cada calle se aplicaron 25  $\mu$ g de RNA total, que fue hibridado con el cDNA completo del gen PMSR2.

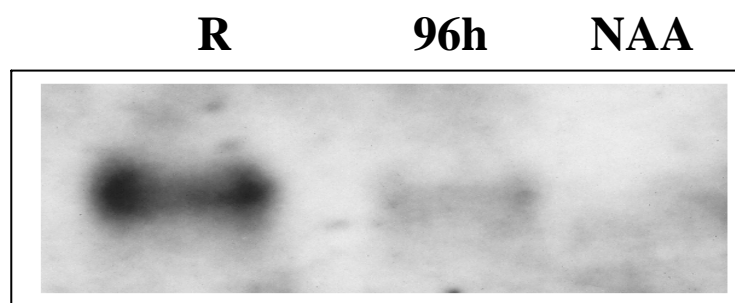
### 1.2.8 Regulación hormonal en la expresión de la PMSR de fresa

Se ha propuesto que los procesos de desarrollo y maduración de la fresa están regulados por la concentración de las auxinas, las cuales estimulan la expansión del receptáculo inhibiendo al mismo tiempo la maduración (Given et al., 1988b; Manning, 1993). Las auxinas son sintetizadas y liberadas por los aquenios promoviendo la elongación del fruto. Se conoce que la retirada de los aquenios de frutos inmaduros acelera la maduración del fruto de la fresa como consecuencia de la inducción y represión de poblaciones de mRNA específicos (Manning, 1994). Por el contrario, la aplicación de la auxina sintética NAA a frutos desaquenizados, produce un patrón de expresión similar al de un fruto verde maduro, sugiriendo que existe una relación entre la expresión génica en la maduración y la ausencia de auxinas. Al igual que otros genes de frutos de fresa (Reddy, 1990; Medina-Escobar et al., 1997b) el gen que codifica la PMSR2 de fresa parece estar bajo el control de las auxinas. En la Figura 18 se observa que tiene lugar un incremento en la expresión de la PMSR cuando a frutos del estadio verde 2 de maduración se le retiran los aquenios. Esta inducción no tiene lugar en frutos completos en este mismo estadio (ver Figura 15A). Por otro lado, no se observa expresión cuando se utilizan frutos desaquenizados en el mismo



estadio de maduración y tratados con la hormona NAA tal y como se describe en Materiales y Métodos en el apartado 2.1.3.

Todas estas observaciones nos indican que el gen PMSR2 está regulado por la ausencia de aquenios y como éstos son los principales responsables de la síntesis de las auxinas, es evidente que es la ausencia de las mismas la que controla la expresión de la PMSR y que la aplicación de la hormona sintética NAA inhibe dicha expresión. Sin embargo, en estos momentos desconocemos si las auxinas por sí mismas intervienen de una forma directa o indirecta en la maduración del fruto.



**Figura 18.** Efecto de la retirada de aquenios sobre la inducción de la PMSR2 de frutos de fresas. R) representa mRNA de frutos rojos maduros. 96h) mRNA extraído de frutos del estadio verde-2 desaquenizado y recogido de la planta a las 96 horas. NAA) mRNA de frutos del estadio verde-2 desaquenizados, tratados con la hormona sintética NAA (ver Materiales y Métodos, apartado 2.1.3) y recogidos de la planta a las 96 horas. En cada calle se aplicaron 25 µg de RNA total que fue hibridado con el cDNA completo del gen PMSR2.

Esta regulación hormonal de la PMSR de fresa, controlada al menos parcialmente por las auxinas, contrasta con la regulación de la PMSR observada en tomate. El etileno juega un papel esencial en la regulación de la expresión de la PMSR de tomate, induciendo claramente este gen tras su aplicación (Lincoln et al., 1987). Sin embargo, la aplicación exógena del etileno a plantas de tomate da lugar a la aparición de la expresión de la PMSR en otros tejidos, como las hojas. Sería necesario llevar a cabo estudios más detallados con el objetivo de averiguar si la PMSR de fresa responde al etileno.

### 1.2.9 Estudio de la expresión transitoria del gen PMSR2

Técnicas para la transferencia directa de DNA y la transformación transitoria son procedimientos establecidos para estudiar la regulación de la expresión génica. La rapidez del análisis es la principal ventaja de esta técnica comparada con la transformación estable de

plantas. Esta ventaja es especialmente notoria, en el caso de la fresa, ya que esta planta es bastante difícil de regenerar.

La transformación transiente de órganos de plantas intactos por bombardeo de partículas se ha probado como una alternativa muy poderosa para el estudio de la regulación transcripcional de determinados genes, ya que las células transformadas pueden ser monitorizadas en sus órganos nativos (Goff et al., 1991).

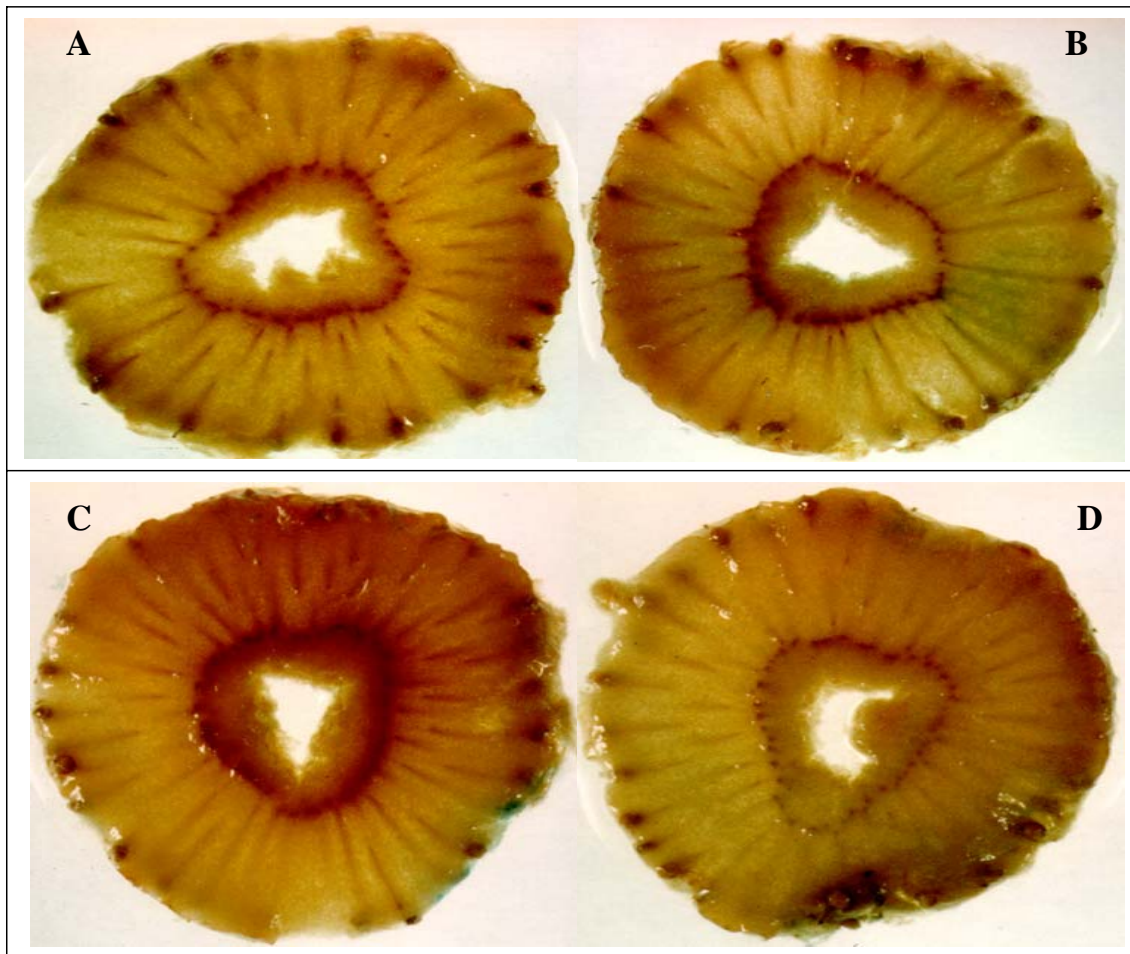
Se ha desarrollado un protocolo optimizado para la transformación transiente mediante biobalística de frutos jóvenes de tomate con el resultado de un incremento de 100 veces en la actividad génica observada. Esto es muy adecuado para el análisis de la especificidad en la expresión génica y cómo ésta se regula a través del desarrollo del fruto. Esta aproximación podría, al mismo tiempo, facilitar el análisis de promotores con baja actividad y con un patrón de expresión de un determinado tejido (Baum et al., 1997).

Para estudiar la expresión del gen PMSR2, se ha utilizado el plásmido que contiene el gen reportador *UidA* que codifica la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) al cual se le introdujo en fase de lectura adecuada toda la región promotora del gen de la PMSR2 de fresa (Figura 19). La construcción así realizada se llamó C2.



**Figura 19.** Construcción C2 que contiene el promotor completo del gen de la PMSR2 de fresa, clonado en el sitio de restricción para *Bam*HI presente en el plásmido pTAK1 que contiene el gen reportador que codifica la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) y una zona terminadora del gen que codifica la nopalina sintasa (NOS).

Los resultados se muestran en la Figura 20.



**Figura 20.** A) Corte de una fresa sin transformar. B, C y D) representan diferentes cortes de fresa transformados con la construcción C2.

Las señales obtenidas han sido siempre muy débiles, posiblemente debido a que las condiciones de bombardeo no fueron las más adecuadas o porque la expresión del gen PMSR2 es bastante débil. Dicha expresión parece estar limitada a las capas más externas del receptáculo de la fresa (Figura 20 C y D). También hemos encontrado actividad GUS (Figura 20 B) en el mesocarpo.

Se ha demostrado que un tratamiento osmótico previo a la transformación biobalística aumenta los niveles en suspensiones de cultivos celulares embriogénicos de maíz (Vain et al., 1993). Esto ha sido interpretado como el resultado de la plasmólisis de las células debido al tratamiento osmótico.

Baum et al. (1997) observaron que después de la combinación del tratamiento osmótico de los cortes de frutos de tomate antes, durante y después del bombardeo, aumentó en más de 70 veces la actividad luciferasa, que se usó como actividad reportadora. Estos resultados podrían ser explicados por una pérdida de presión de turgor en las células de la superficie de los frutos cortados que por tanto mejora la viabilidad de las células golpeadas por las partículas de oro.

En nuestro caso, usando el tratamiento osmótico combinado junto con unas condiciones óptimas de bombardeo nos conducirá a actividades génicas consistentes en los estadios de los frutos estudiados. Este protocolo facilitará aproximaciones para definir elementos o secuencias específicas que actuen en *cis* en los promotores de frutos y también para analizar promotores que tengan baja actividad.

## **CAPÍTULO II**

**“Expresión en *E. coli*, determinación de la actividad enzimática y papel fisiológico propuesto para la PMSR de fresa”**

## 2.1 INTRODUCCIÓN CAPÍTULO II

En general, los frutos se encuentran clasificados en dos grupos diferentes (ver Introducción) dependiendo de que tenga lugar un incremento en la respiración (frutos climatéricos) o no (frutos no climatéricos), al principio del proceso de maduración.

Un ejemplo de gen cuya expresión posiblemente podría estar restringida a frutos climatéricos sería la péptido metionina sulfóxido reductasa (PMSR). Esta enzima parece tener un papel implicado en la protección mediante la restauración de la actividad de proteínas que se han oxidado como consecuencia de la producción de radicales oxigenados formados cuando tiene lugar el incremento de la respiración. Por tanto, la expresión de la PMSR en frutos no climatéricos no sería esperable debido a que no ocurre este incremento respiratorio en esta clase de frutos. Esto nos lleva a plantearnos cuál es la función biológica de la PMSR en la fresa.

La actividad PMSR ha sido detectada en muchos sistemas eucarióticos. Poco se sabe de la enzima eucariótica y si ésta difiere de otros sistemas enzimáticos que se conoce que son capaces de reducir residuos sulfóxidos en compuestos que incluyen metionina sulfóxido. Analizando la especificidad de sustrato, se ha encontrado que la PMSR eucariótica (Moskovitz et al., 1996) puede usar como sustrato grupos metionina sulfóxido presentes en las proteínas y residuos libres de N-acetilmetionina sulfóxido, L- y D-metionina sulfóxido y una variedad de compuestos que contienen un grupo sulfóxido como el dimetil sulfóxido y la L-etionina sulfóxido. Parece que la enzima prefiere residuos metil sulfóxidos, mientras que, residuos más pesados unidos a la variedad de sulfóxidos tienden a inhibir la actividad. Por ejemplo, el difenil sulfóxido no es sustrato para la enzima mientras que la L-etionina sulfóxido si lo es pero menos activo que con otros compuestos.

Por otro lado, en *E. coli* hay dos enzimas que pueden reducir residuos de L-metionina sulfóxido libre. Una de ellas que tiene una amplia especificidad de sustrato y puede usar, además de L- y D-metionina sulfóxido libre, derivados de metionina sulfóxido con el extremo amino bloqueado, incluyendo residuos metionina sulfóxido en proteínas. La otra solamente usa L-metionina sulfóxido libre como sustrato pero no unida a péptidos.

Los ensayos de actividad PMSR que se han utilizado hasta ahora son difíciles de realizar y caros debido a la necesidad de sintetizar compuestos marcados radiactivamente. La actividad PMSR se determinó en primer lugar, siguiendo la

reparación de la proteína ribosomal L12 oxidada de *E. coli* que contenía un grupo metionina sulfóxido (Brot et al., 1981). Esta proteína L12 oxidada no es capaz de acetilarse como la proteína no alterada. Esta alteración permitió que la actividad PMSR pudiera ser determinada realizando un ensayo acoplado en presencia de acetilasa. Brot et al. (1982) desarrollaron un método para ensayar la actividad PMSR más accesible, usando N-acetilmetionina sulfóxido tritiada que sustituye a proteínas o péptidos con residuos metionina oxidados y el DTT que sustituye a la tiorredoxina reducida que es el donador fisiológico de la enzima. Este ensayo es sensible para detectar pequeñas cantidades de actividad PMSR y permitiría caracterizar la enzima mediante ensayos cromatográficos. Sin embargo, la N-acetilmetionina sulfóxido tritiada es un compuesto que no se vende comercialmente y además, en algunos ensayos, el 75% del sustrato fue consumido durante el tiempo inicial de ensayo. Por tanto, este método tiene el problema de un consumo excesivo del sustrato. Si se trata de incrementar la concentración de sustrato con la misma radiactividad específica se necesitaría demasiado marcaje radiactivo. Si por el contrario se aumenta la concentración del sustrato disponible disminuyendo la radiactividad específica el ensayo pierde mucha sensibilidad. Además, Sánchez et al. (1983) utilizaron este método para determinar la actividad PMSR en extractos de plantas y encontraron que no existía relación lineal entre la cantidad de enzima y la cantidad de producto formado.

Un nuevo método ha sido desarrollado por Ferguson et al. (1992), que permite determinar la actividad PMSR siguiendo la conversión de fluorenilmetoxicarbonil metionina sulfóxido al producto fluorescente fluorenilmetoxicarbonil metionina que puede medirse mediante el uso del HPLC. Sin embargo, este compuesto no está disponible comercialmente.

Con el fin de investigar la posible función de la PMSR de fresa decidimos expresar la proteína de manera heteróloga en *E. coli*. La construcción de la proteína de fusión nos ha posibilitado desarrollar un ensayo *in vivo* que permite valorar el posible papel de la PMSR en la protección frente a radicales oxigenados y al mismo tiempo nos ha hecho posible el análisis de la especificidad de sustrato para la PMSR de fresa.

Por otro lado, consideramos que un estrés oxidativo provocado por la presencia de radicales oxigenados puede ser debido principalmente a dos causas. En primer lugar, estos reactivos pueden aumentar su concentración como consecuencia de un aumento respiratorio. En segundo lugar, esta concentración puede aumentar

debido a un descenso o baja actividad de enzimas antioxidantes tales como catalasa, peroxidasa o superóxido dismutasa que permitiría que concentraciones basales de radicales oxigenados provocaran un estrés oxidativo, aunque no tenga lugar un incremento en el consumo de O<sub>2</sub>. Como ya hemos visto, parece claro que en la fresa no hay un incremento respiratorio que justifique un estrés oxidativo y al mismo tiempo la presencia de la PMSR en los frutos de fresa para reparar las proteínas oxidadas. Por tanto, con el objetivo de averiguar si era la baja actividad de las enzimas antioxidantes la responsable del hipotético estrés oxidativo que justificara la presencia de la PMSR, procedimos a analizar y determinar la actividad de las mismas en extractos de frutos de fresa en los diferentes estadios de maduración.

En este capítulo se describe la expresión del gen que codifica una PMSR de fresa en *E. coli*, la purificación de la proteína de fusión y la obtención de anticuerpos policlonales anti-PMSR a partir de la proteína purificada. Se determinó su actividad enzimática así como la actividad de otras enzimas antioxidantes. Finalmente se postula sobre el posible papel o función de la PMSR en los frutos de fresa.

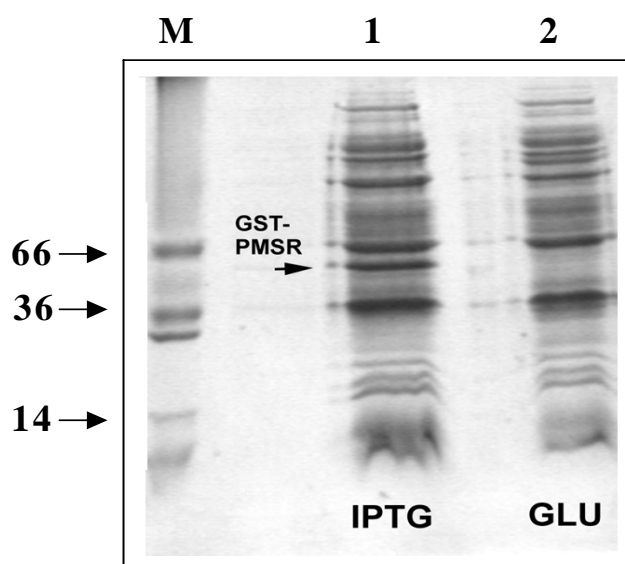


## 2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.2.1 Expresión y purificación de la PMSR de fresa en *E. coli*

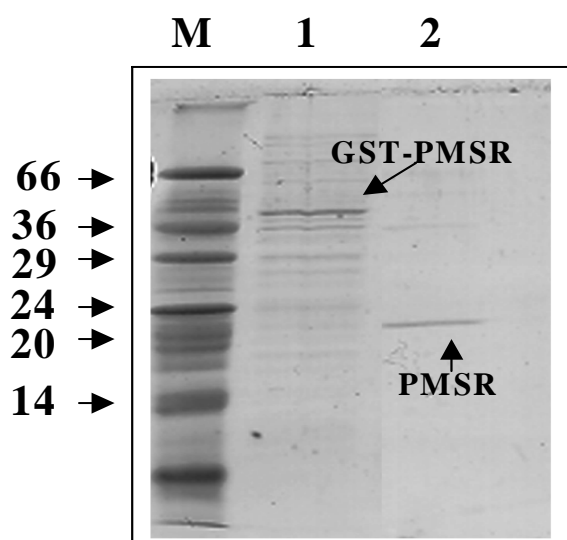
El cDNA correspondiente al gen que codifica la PMSR2 de fresa se ligó al gen que codifica la glutatión-S-transferasa (GST) contenida en el plásmido pGEX-KG (ver Materiales y Métodos, apartado 17.2). En el plásmido resultante, el gen de la PMSR está fusionado en el extremo carboxi-terminal del gen de la GST que está bajo el control del promotor pLAC que se induce en presencia de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) y se reprime en presencia de glucosa. Tanto el análisis por restricción como la determinación de la secuencia confirmaron que el gen de la PMSR2 de fresa está ligado en el sitio correcto y en la misma fase de lectura que el gen de la GST, originándose una proteína quimérica que denominamos GST-PMSR.

El análisis mediante electroforesis en gel SDS-PAGE de extractos de células XL1-blue transformadas con el plásmido pGEX-PMSR muestra la presencia de una nueva proteína de fusión soluble de 46 kDa que es altamente expresada cuando las células se incuban en presencia de 0,5 mM de IPTG. Sin embargo, esta proteína de fusión no aparece cuando las mismas células se incubaron en presencia de glucosa.



**Figura 21.** Electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de extractos de *E. coli* transformadas con el gen quimérico contenido en el plásmido pGEX-PMSR. M representa el marcador de peso molecular. En la calle 1 se muestra un extracto de células XL1-blue transformadas que fueron inducidas añadiendo 0,5 mM de IPTG. En la calle 2 se muestra un extracto de las mismas células que han sido incubadas en presencia de 0,5% de glucosa (Glu). El gel se tiñó con azul de coomassie. La flecha señala la localización de la proteína de fusión GST-PMSR. El tamaño de las proteínas se expresa en kDa.

Un extracto obtenido a partir de células transformadas con el plásmido pGEX-PMSR e inducidas con IPTG se sometió a una cromatografía de afinidad en una columna con glutatión-agarosa (Materiales y Métodos, apartado 13). El producto GST-PMSR, una vez eluída de la columna con glutatión, fue digerida con trombina (Figura 22). La mezcla digerida fue de nuevo sometida a cromatografía de afinidad, con lo que se eluyó de forma específica la fracción que contenía la PMSR.

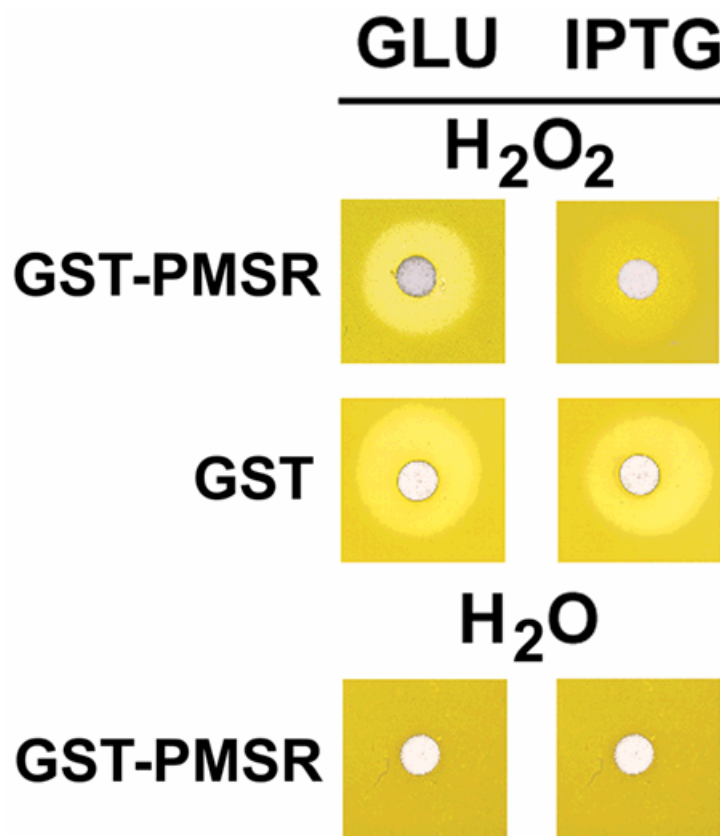


**Figura 22.** Electroforesis en gel de SDS-PAGE. M representa el marcador de peso molecular. En la calle 1 se muestra la proteína de fusión GST-PMSR liberada de la columna de glutatión-agarosa añadiendo 10 mM de glutatión. En la calle 2 se muestra un extracto de proteína GST-PMSR digerida durante 24 horas con 50 U de trombina y que posteriormente se pasó por la columna de glutatión-agarosa para retener de nuevo la proteína GST y eluir específicamente el producto PMSR. El gel se tiñó con azul de coomassie. El tamaño de las proteínas se expresa en kDa.

### 2.2.2 Ensayo de protección frente al peróxido de hidrógeno

Una vez comprobada la expresión diferencial de la PMSR en *E. coli* con IPTG y glucosa, nos planteamos determinar si la proteína de fusión GST-PMSR es o no capaz de proteger esta bacteria contra el daño oxidativo. Para ello desarrollamos el siguiente enfoque experimental:

Un cultivo líquido de LB con células de *E. coli* XL1-blue transformadas con el plásmido pGEX-PMSR se creció durante 12 h. Al mismo tiempo, se prepararon placas sólidas con medio LB, a unas se le añadió 0,5 mM de IPTG y a otras 0,5% de glucosa. Las bacterias transformadas se añadieron con top agar a las distintas placas, unas en IPTG y otras con glucosa e inmediatamente se dispuso en el centro de la placa un disco de papel whatman al cual se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>O (Figura 23).



**Figura 23.** Ensayo *in vivo* de protección de la proteína de fusión GST-PMSR. En la primera columna se encuentran placas con medio LB suplementadas con un 0,5% de glucosa (Glu). En la segunda columna se muestran placas con medio LB suplementadas con 0,5 mM de IPTG (IPTG). GST-PMSR indica células de *E. coli* transformadas con el plásmido pGEX-PMSR crecidas durante la noche y que fueron sembradas en placas de LB suplementadas con glucosa y con IPTG tanto en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de H<sub>2</sub>O añadidos en el centro del disco de papel. GST hace referencia a células de *E. coli* transformadas con el plásmido pGEX que sólo contiene la proteína GST. Se muestra en cada caso la extensión de la inhibición del crecimiento debido a la acción tóxica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se manifiesta con un halo.

La Figura 23 muestra un halo de inhibición de crecimiento cuando células transformadas con el plásmido que codifica la proteína de fusión GST-PMSR se sembraron en placas con medio LB suplementadas con glucosa y en cuyo centro se

dispuso el disco de papel con 10  $\mu$ l de una solución 250 mM de  $H_2O_2$ . Sin embargo, las mismas células cuando se sembraron en placas suplementadas con IPTG no mostraron el halo de inhibición de crecimiento bajo las mismas condiciones experimentales. Como control se sembraron células que contenían el plásmido que expresa sólo la GST. Bajo estas condiciones se volvió a observar un halo de inhibición de crecimiento tras la adición de  $H_2O_2$  tanto en las placas que contenían glucosa como en las que tenían IPTG. Finalmente y como segundo control, se muestra el crecimiento de estas células conteniendo la proteína de fusión GST-PMSR en medios LB que contenían tanto glucosa como IPTG cuando a los discos se añadió  $H_2O$ , no observándose inhibición del crecimiento en ningún caso.

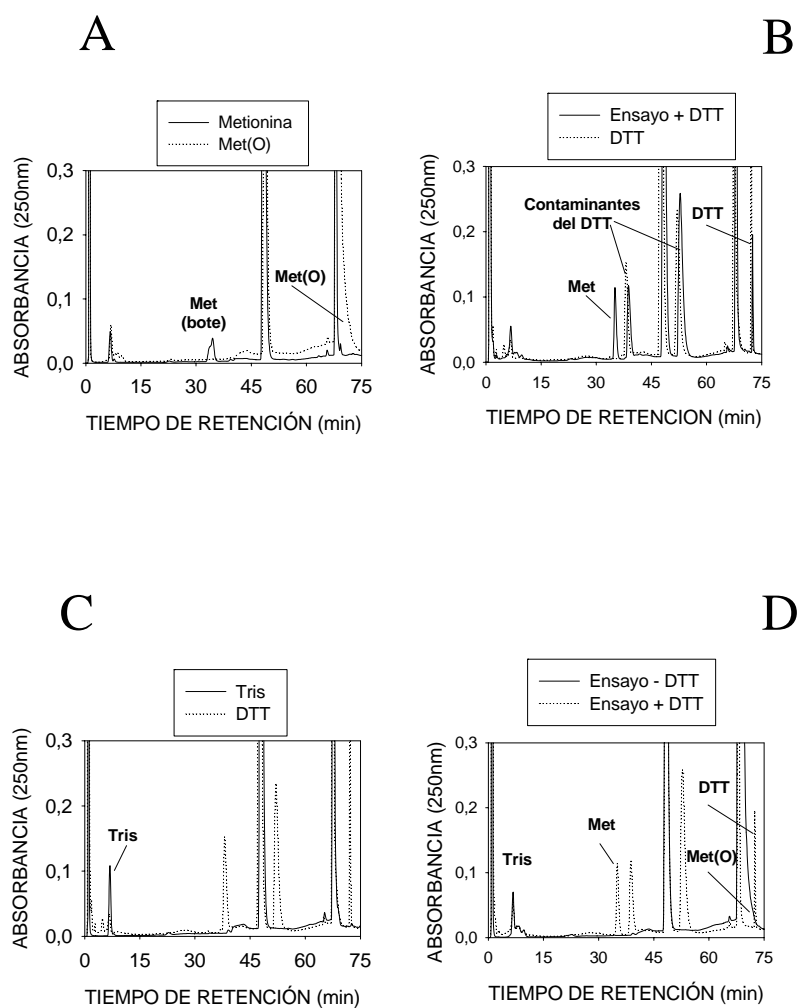
Estos resultados indican claramente que la proteína de fusión GST-PMSR es capaz de proteger frente al daño celular provocado por la presencia del radical peróxido de hidrógeno cuando las células expresan actividad PMSR. Estos experimentos confirman la participación de la PMSR de fresa en la protección frente a este tipo de radicales. Además ponen de manifiesto que la proteína de fusión GST-PMSR mantiene actividad PMSR aún cuando, tal y como se describe en Materiales y Métodos, a esta proteína se le ha eliminado los 30 primeros aminoácidos codificados por las primeras 100 bases del extremo amino terminal para poder clonarla en el plásmido pGEX. Este hecho indica que no existe ningún elemento esencial para la actividad de la misma y que la proteína admite fusiones traduccionales en su extremo amino terminal.

Por tanto hemos desarrollado un ensayo fácil de realizar, repetitivo y que refleja la capacidad de proteger *in vivo* cuando se induce la actividad PMSR.

### 2.2.3 Determinación enzimática de la actividad

#### a) Actividad péptido metionina sulfóxido reductasa

Para determinar si la proteína PMSR de fresa es capaz de utilizar como sustrato la L-metionina sulfóxido libre se analizó el consumo de dicho compuesto en presencia de la PMSR de fresa purificada, marcando los compuestos con cloruro de dansilo y monitorizando el ensayo mediante el uso del HPLC (ver Materiales y Métodos, apartado 21.4). Se procedió a identificar cada uno de los compuestos empleados en las diferentes reacciones según el tiempo de retención en el que aparecían (Figura 24).



**Figura 24.** Cromatogramas obtenidos después del análisis por HPLC de la actividad péptido metionina sulfóxido reductasa. A) muestra el patrón obtenido al analizar metionina y metionina sulfóxido comerciales. B) Muestra el tiempo de retención en el que aparecen el DTT y posibles contaminantes del DTT. C) Cromatograma que se obtiene cuando se analiza en el HPLC el Tris y el DTT, dos componentes utilizados en el ensayo. D) Cromatogramas obtenidos al realizar el ensayo con y sin DTT. El ensayo contiene Met(O) y 5µg de PMSR de fresa purificada.

El análisis que se puede hacer a la vista de los resultados obtenidos es el siguiente:

En primer lugar, aparecen siempre tres picos independientemente de la muestra que se analice mediante el HPLC a los tiempos de retención de 1, 47 y 67 min.

La metionina comercial tiene un tiempo de retención aproximado de 35 min y como se ve en la Figura 24A, la preparación comercial contiene un segundo pico indicando que dicha metionina no está pura. La metionina sulfóxido comercial posee un tiempo de retención de 68 min, que se solapa con el pico de 67 min

La deducción de que el pico aparecido a los 72 min corresponde al DTT la vemos en la Figura 24B al comparar el ensayo con DTT con el DTT sólo. Tras la inyección del DTT aparecen tres picos, de los cuales atribuimos el que sale a los 72 min al DTT y los que salen a los 38 y 51 minutos creemos que son contaminantes del DTT ya que su concentración no disminuye después del ensayo. Parece que en el ensayo hay un consumo claro de DTT que es necesario para llevar a cabo la reacción.

El Tris aparece (Figura 24C) a los 6 min.

Finalmente, en la Figura 24D se observa en el ensayo realizado con la adición del DTT como desaparece el pico de la metionina sulfóxido y aparece a los 35 min el correspondiente a la metionina. Esto no ocurre así cuando se realiza el ensayo sin el DTT, observándose que no hay degradación de metionina sulfóxido debido a que el pico sigue presente a los 68 min.

Todos estos resultados demuestran que, cuando se realiza el ensayo que consiste en añadir la metionina sulfóxido más la PMSR de fresa purificada y el DTT tiene lugar una reducción de la metionina sulfóxido a metionina y que dicha reacción necesita del poder reductor del DTT añadido a la reacción.

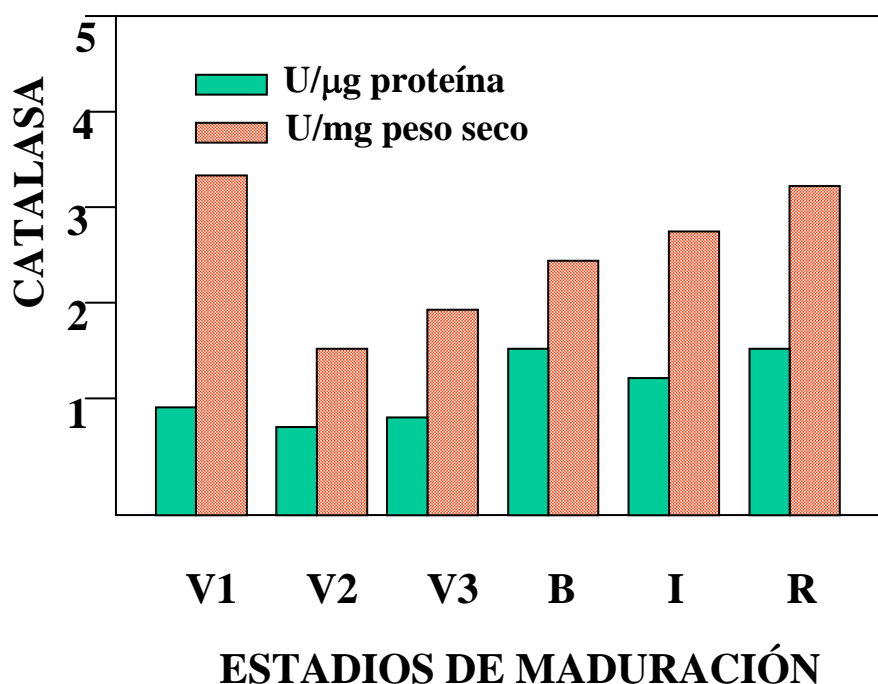
En los estudios de actividad PMSR llevados a cabo en diferentes organismos se ha descrito que no hay una reducción no enzimática debido al DTT y que este hecho podría ocurrir mínimamente solo si se utilizan concentraciones de DTT superiores a 50 mM (Sánchez et al., 1983). En nuestros ensayos se han utilizado concentraciones de DTT de 15 mM. Con lo cual descartamos una reducción directa debida al DTT.

Sánchez et al.(1983) analizaron la distribución de la acetilmetionina sulfóxido reductasa en una serie de plantas como en guisante, cebada, patatas y espinacas. Se encontró actividad en todas las especies de plantas estudiadas. Los estudios de su distribución se llevaron a cabo en protoplastos de cebada y se ha encontrado que aproximadamente el 63% de actividad PMSR se encuentra localizada en el cloroplasto y un 24% se encuentra como proteína soluble en el citoplasma. Sin embargo, las fresas rojas y maduras carecen de cloroplastos y esto justifica la presencia de la PMSR en el citoplasma en este estadio de maduración.

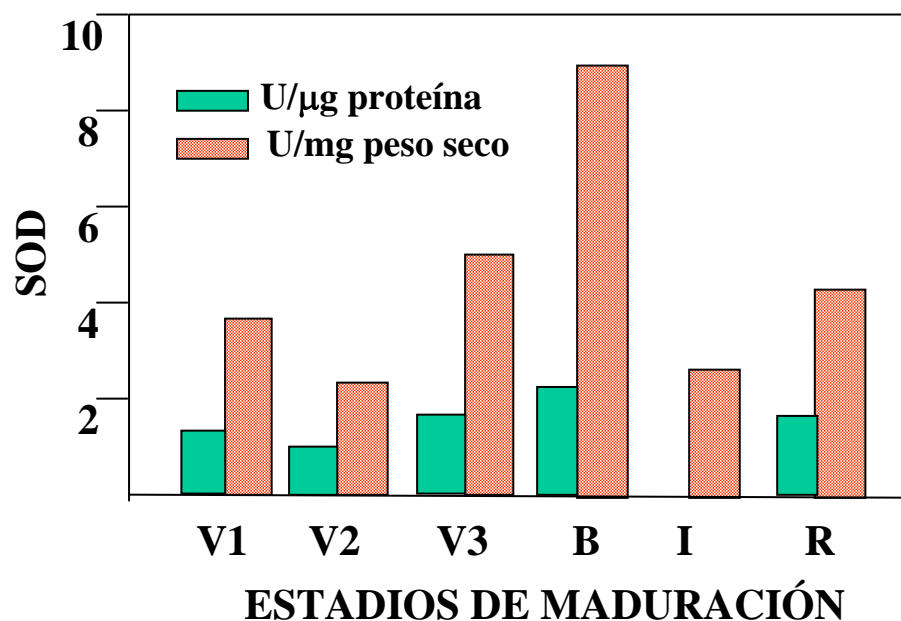
Se conoce que existe una gran variedad de agentes oxidantes producidos en los tejidos que pueden oxidar metionina unida a proteínas. Aunque los efectos deletéreos de estos agentes oxidantes es esperable que puedan ser neutralizados por varias enzimas celulares como catalasa, peroxidasa o superóxido dismutasa, es posible que la eficiencia de estos sistemas no sea suficiente para prevenir la oxidación de los residuos de metionina en proteínas. Para proteínas con bajo recambio, estas oxidaciones pueden ser cruciales si los residuos de proteínas estuvieran involucrados en la función de la proteína.

### b) Actividad de enzimas antioxidantes

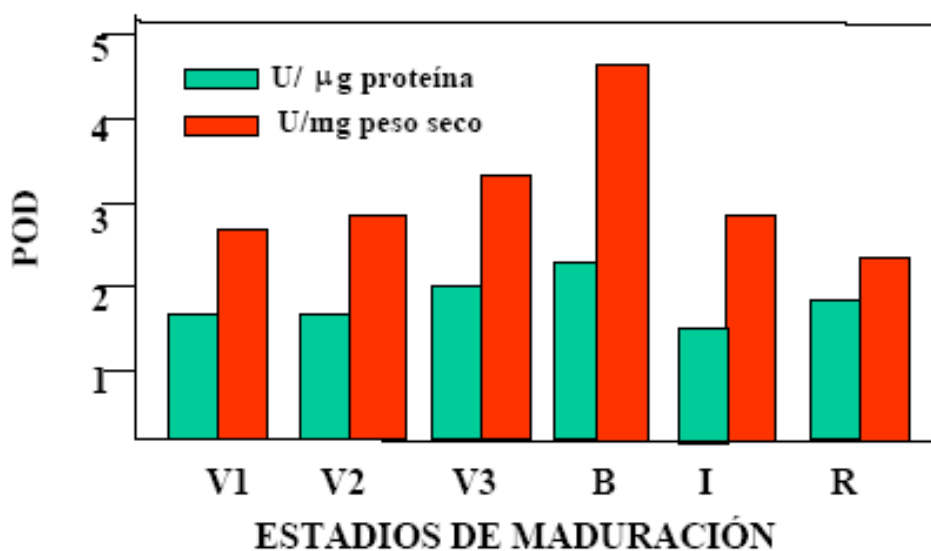
Con el propósito de averiguar si podría producirse un estrés oxidativo como consecuencia de la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa) procedimos a determinar la actividad de las mismas a lo largo de los diferentes estadios de maduración. Los resultados se muestran en las Gráficas 2, 3 y 4.



**Gráfica 2.** Medida de la actividad catalasa a lo largo de los diferentes estadios de maduración. En verde se representa la actividad medida como unidades por microgramo de proteínas y en barras como unidades por miligramo de peso seco. V1 frutos del estadio verde 1. V2 frutos del estadio verde 2. V3 frutos del estadio verde 3. B frutos del estadio blanco. I frutos del estadio intermedio. R frutos del estadio rojo.



**Gráfica 3.** Actividad superóxido dismutasa en los diferentes estadios de maduración. En las barras se representa la actividad medida en unidades por  $\mu\text{g}$  de proteína y en las barras ralladas por unidades por miligramo de peso seco. V1 frutos del estadio verde 1. V2 frutos del estadio verde 2. V3 frutos del estadio verde 3. B frutos del estadio blanco. I frutos del estadio intermedio. R frutos del estadio rojo.



**Gráfica 4.** Actividad peroxidasa en extractos de proteínas de frutos a lo largo de los diferentes estadios de maduración. V1 frutos del estadio verde 1. V2 frutos del estadio verde 2. V3 frutos del estadio verde 3. B frutos del estadio blanco. I frutos del estadio intermedio. R frutos del estadio rojo.



El valor máximo de actividad catalasa (Gráfica 2) se obtiene en frutos del estadio verde-1. Esta actividad disminuye de forma acusada en frutos del estadio verde-2 y aumentó finalmente a lo largo de los diferentes estadios de maduración hasta alcanzar en frutos del estadio rojo valores similares a los alcanzados en el estadio verde-1.

Los valores máximos de actividad superóxido dismutasa (Gráfica 3) se obtienen en frutos del estadio de maduración blanco. En particular, nos interesaba saber que ocurría en frutos del estadio de maduración rojo observándose valores de actividad superóxido dismutasa elevados aunque no tanto como los obtenidos en los frutos blancos.

Por último se trató de determinar la actividad peroxidasa (POD) mostrándose los resultados en la Gráfica 4.

La actividad peroxidasa mostró valores máximos en frutos del estadio de maduración blanco. Nuestros datos concuerdan con los obtenidos por Civello (1995), donde los valores más elevados se obtenían en frutos verdes grandes (blancos) y disminuían a lo largo de la maduración.

Estos resultados, junto con el hecho de que tiene lugar o bien un mantenimiento o incluso una disminución en el consumo de oxígeno indican que no debiera tener lugar un estrés oxidativo en los frutos rojos maduros. Por tanto, parece razonable proponer que no debe tener lugar una inducción de la PMSR en frutos del estadio de maduración rojo para prevenir el daño en los residuos de metionina por un hipotético estrés oxidativo generado por radicales oxigenados. Estas observaciones nos llevan a pensar que la PMSR de fresa podría estar cumpliendo otra función.

Está descrito que el metabolismo de los precursores aromáticos de los frutos de fresa puede ser modificado por cofactores, la temperatura y que el oxígeno puede ser esencial en el metabolismo de algunos precursores. Como ya se ha dicho anteriormente parece poco razonable esperar que exista una única enzima que catalice la formación de cada uno de los compuestos, porque requeriría un enorme gasto energético. La diversidad de sustancias aromáticas puede reflejar la pérdida de especificidad absoluta de enzimas como reductasas, esterasas, etc, implicadas en su formación. Es aquí donde creemos que la PMSR podría jugar un papel importante, formando parte de las enzimas relacionadas con la síntesis de compuestos aromáticos. La PMSR podría estar implicada en la formación de los compuestos azufrados que se ha observado (Dirinck, 1981) que

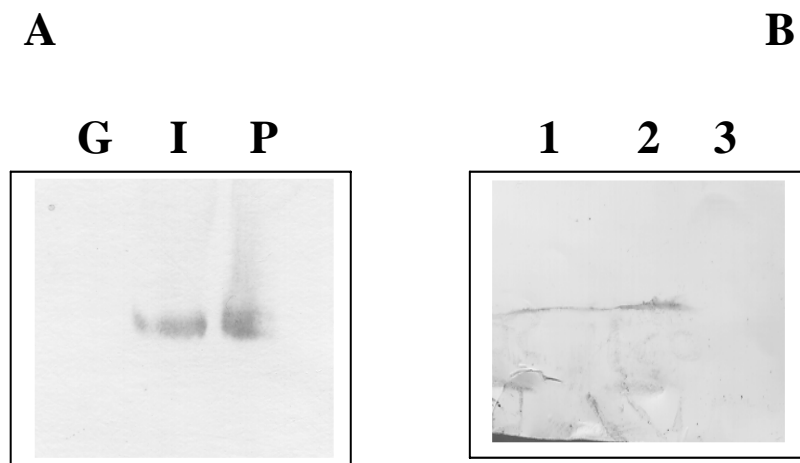
son importantes componentes del aroma aunque están en menor concentración que otros compuestos.

Se ha identificado (Mussinan, 1975) al ácido linoleico como uno de los ácidos grasos volátiles que forman parte de los compuestos constituyentes del aroma. También se ha demostrado (Mohensin, 1989) que el ácido linoleico oxidado es 40 veces más potente que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en su capacidad de oxidar los residuos de metionina de las proteínas a metionina sulfóxido. Por tanto creemos que es el ácido linoleico oxidado el agente capaz de inactivar las proteínas al oxidar sus grupos metionina. Por consiguiente podríamos justificar la presencia de la PMSR en los frutos de fresa rojos puesto que son estos en donde tiene lugar la formación del aroma.

Recientemente, Gao (1998) ha visto que la PMSR podría tener un papel fisiológico en el mantenimiento funcional de la calmodulina, actuando como un posible regulador de la calmodulina y transportadores de K<sup>+</sup> ya que estas proteínas poseen residuos de metioninas importantes para su actividad y que pueden modularse de forma reversible mediante la conversión a residuos metionina sulfóxido y viceversa. También Keller (comunicación personal, 1998) ha visto que la PMSR parece jugar un papel en un proceso bien controlado genéticamente como es la pérdida de los flagelos en *Chlamydomonas*. Todos estos estudios apoyan que la PMSR pueda estar implicada en importantes funciones reguladoras, además de protectoras..

#### **2.2.4 Análisis de la expresión de la PMSR mediante western blot**

La proteína PMSR purificada se ha usado para obtener anticuerpos policlonales anti-PMSR en ratones. La Figura 25 muestra el análisis mediante experimento de western blot de la purificación de la proteína PMSR. Los anticuerpos reconocen solamente la proteína de fusión GST-PMSR y PMSR, no encontrándose reactividad cruzada con la GST libre. Esto es indicativo de que son específicos para la proteína PMSR. Además, encontramos una banda en el extracto de proteínas totales de fresas en el estadio de maduración rojo dándonos un tamaño esperado y a la misma altura que la PMSR purificada y cortada de la GST.



**Figura 25.** En A se muestra el resultado de un experimento de western blot donde G representa extracto de células transformadas con la proteína de fusión pGEX-PMSR reprimidas por glucosa. I representa otro extracto de células inducidas por IPTG. P muestra extracto de proteínas GST-PMSR purificada y eluída de la columna de glutatión-agarosa. En la figura B muestra experimento de western blot con extracto de proteínas de fresa en la calle 1 y en la calle 2 se cargó proteína PMSR purificada y cortada con trombina, pasada y eluída por la columna de glutatión-agarosa. En la calle 3 se cargó proteína GST. Se usó como anticuerpo primario anticuerpos anti-PMSR y como secundario se utilizaron anticuerpos antiperoxidasa de ratón.

Estudios de hibridación *in situ* o de inmunolocalización mediante los anticuerpos anti-PMSR de fresa obtenidos no han sido posibles debido a que los frutos de fresa rojos tienen un alto contenido de agua y cuando se realizan cortes con el microtomo del fruto fijado, este aparece prácticamente roto.

## **CAPÍTULO III**

**“Clonación y caracterización parcial de un cDNA que codifica una proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP) de fresa”**

### 3.1 INTRODUCCIÓN CAPÍTULO III

La proteína tumoral cuya regulación está controlada traduccionalmente (Translationally Controlled Tumor Protein, TCTP) designada como proteína p23 por Bohm et al. (1989) y como proteína p21 por Chitpatima et al. (1988), ha sido descrita como una proteína tumoral relacionada con el crecimiento en tumores ascíticos y leucemias eritrocíticas de ratón. Está codificada por especies abundantes de mRNA controladas por procesos de represión traduccional (Yenofsky et al., 1983). Esta proteína TCTP es una proteína altamente conservada y su síntesis es rápidamente inducida después de una estimulación mitogénica de células de mamífero (Bohm et al., 1989). Se ha demostrado que el factor de iniciación de unión a cap (eIF-4E) está involucrado en su regulación (Bommer, 1994).

Proteínas homólogas han sido secuenciadas en varias especies de plantas, levaduras y se ha encontrado que se expresa en la mayoría de tejidos de mamíferos. Basándose en su secuencia, esta proteína TCTP no puede atribuirse a ninguna de las familias de proteínas conocidas y su función celular exacta está aún por descubrirse. El alto grado de homología encontrado desde plantas hasta humanos sugiere que puede jugar un papel importante en la función celular.

El correspondiente cDNA en humanos fue obtenido a partir de una genoteca de carcinoma mamario construida en el fago  $\lambda$ gt10 (Gross et al., 1989) y ha sido descrito por primera vez en el hígado humano por Hughes (1994). Se ha descrito como un polipéptido ácido, con una masa molecular aparente de 24 kDa y un punto isoelectrico (pI) de 4,9.

En este capítulo se describe la clonación, secuenciación y caracterización parcial de un cDNA que codifica una proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP) que ha sido aislada a partir de mRNA de frutos de fresa.

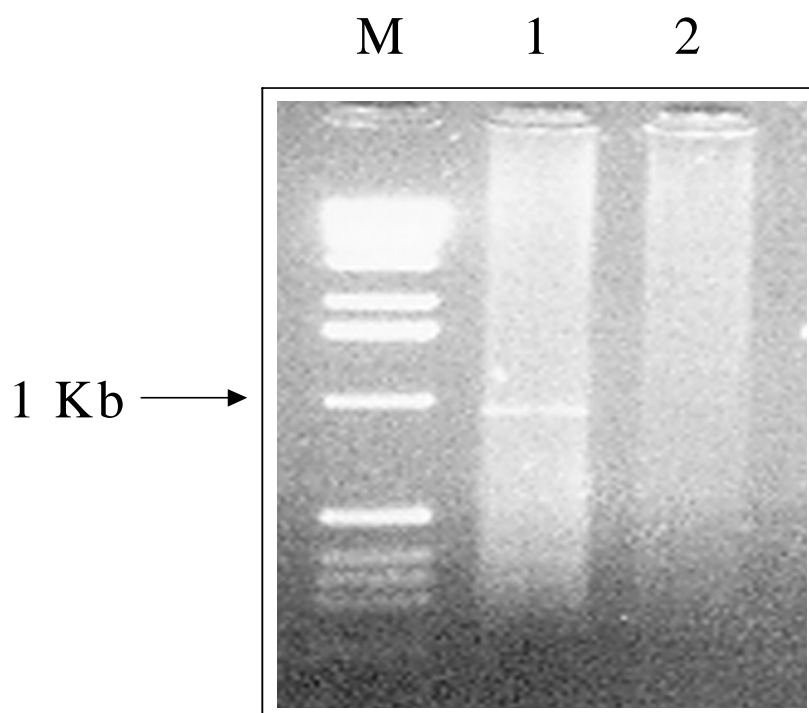
## 3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.2.1 Clonación del cDNA y análisis de la secuencia

El cDNA correspondiente al mRNA de una proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP) de fresa se obtuvo como resultado de la clonación de una banda obtenida tras amplificación por PCR sobre una población de cDNA de frutos rojos.

Uno de los oligonucleótidos utilizados fue diseñado (Capítulo I, apartado 1.2.1) para amplificar el extremo 5' del cDNA de la PMSR de fresa y el otro oligonucleótido que se empleó fue el propio del Kit Marathon de amplificación de cDNA.

Con el uso de estos oligonucleótidos y de forma accidental se obtuvo una banda de 0,8 kb (Figura 26), que se trató con la polimerasa Klenow en presencia de dNTPs para hacer extremos romos clonándose a continuación en el vector pBluescript KS+ que previamente había sido digerido con la enzima *EcoRV*.



**Figura 26.** Imagen del gel de agarosa al 1,2% con el resultado de la PCR. M es el marcador 1 kb ladder, indicándose con la flecha el tamaño de la banda de 1 kb. En la calle 1 se observa la banda de amplificación que corresponde al cDNA de la TCTP de fresa. En la calle 2 se realizó un control negativo.

Este hecho presenta cierta similitud con la forma en que fue clonada la TCTP de *Medicago sativa*, debido a que fue obtenida tras escrutar una genoteca de cDNA de esta planta usando como sonda un fragmento de PCR que guardaba similitud con una fosfatasa.

De esta manera se consiguió el clon completo cuya secuencia se muestra en la Figura 27.

```

1   CCGCTCTAGAACTTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCCTAATACGACTCA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
61  CTATAGGGCTCGAGCGGCCGCGGGCAGTCTCTCCTCCTCAAATCCCCTAATATCCCAATT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
121 TTGGGGGCGCGATCCGAGAGCTACTGCAATCATGTTGGTTTACCAAGACCTCCTCTCCGG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
                                     M L V Y Q D L L S G
181 TGATGAGCTTCTCTCGGACTCGTTTCCGTACAAAGAGATCCAGAATGGGGTATTGTGGGA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   D E L L S D S F P Y K E I Q N G V L W E
241 AGTTGATGGAAGTGGGTTGTTCAAGGAGCAGTTGATGTAGACATTGGTGCAAATCCTTC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   V D G K W V V Q G A V D V D I G A N P S
301 TGCTGAAGGTGCTGATGCTGATGCTGATGAGGGTGTGATGATCAAAGTTAAGGTGGT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   A E G A D A D A D E G V D D Q T V K V V
361 TGACATTGTTGACACCTTCAGACTCCAGGAGCAACCTCCATTTGATAAGAAGCAGTTTGT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   D I V D T F R L Q E Q P P F D K K Q F V
421 CACATGGGTTAAGAGGTACATCAAAGTTGACCCCAAAGCTTGAGGGAGAGCAGCAGGA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   T W V K R Y I K L L T P K L E G E Q Q E
481 GACATTTAAGAAGAACATTGAGGGAGCAACCAAGTTTCTGCTTTCCAAGCTCAGTGACCT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   T F K K N I E G A T K F L L S K L S D L
541 CCAATTCTTTGTGGGGGAGAGCATGGGTGATGATACATCTTTGGTCTTTGCCTCATAAA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   Q F F V G E S M G D D T S L V F A S Y K
601 AGAGGGTGCCACCGACCCAATCTTTATCTACTTCGCCCATGGTTTGAAGGAGGTCAAGTG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   E G A T D P I F I Y F A H G L K E V K C
661 CTAAGGAAGCGGCACAACCTGGCTTTGAGCAAAGTGTGCTTGGTGTAATATTAGTCTGTAAT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   *

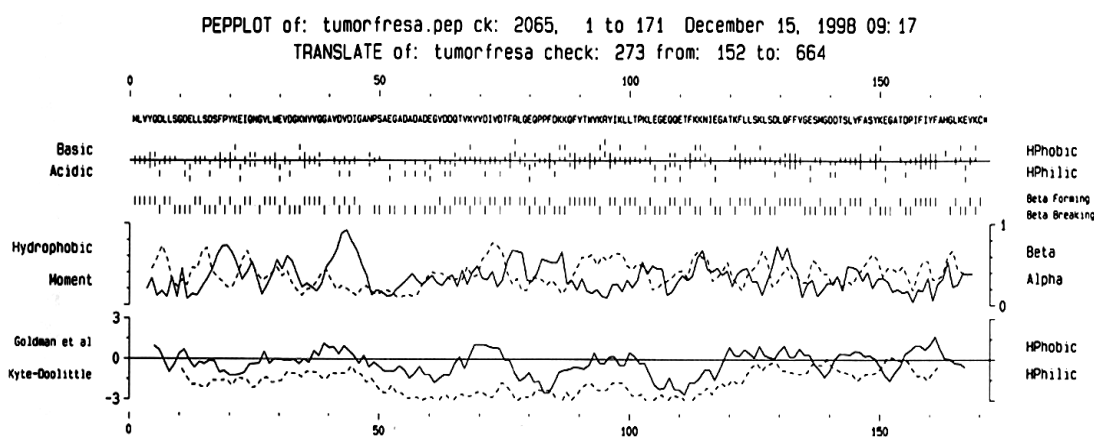
```

```

GCTTTTTGGATCAGGAGTCTATTTTTGCTTGTGGTTTCTTTAAGTATGTTCTGAATTGG
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CATCAAGCTTCTTTCCGTGTTTT
781 -----+-----+----- 803
    
```

**Figura 27.** Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida del cDNA que codifica una posible TCTP en la fresa. En negrita se señala el codón de inicio y de fin de mensaje. En rojo se indica la zona donde se une el oligonucleótido.

El gen de la TCTP de fresa codifica una proteína citosólica de aproximadamente 19 kDa que posee un punto isoeléctrico (pI) estimado de 4,21. La TCTP de fresa muestra un perfil netamente hidrofílico (Figura 28).



**Figura 28.** Perfil de hidrofobicidad/hidrofilicidad del cDNA que codifica una TCTP de fresa. Se utilizó el programa pepplot del paquete informático GCG.

El grado de identidad de aminoácidos entre las TCTPs de diferentes organismos se presenta en la Tabla 3.

	<i>Arabidopsis</i>	<i>Solanum</i>	<i>Fragaria</i>	<i>Medicago</i>	<i>Humanos</i>	<i>Rattus</i>
<i>Oryza</i>	92,5	85,1	87,5	87,4	48,2	47,6
<i>Arabidopsis</i>		88,7	90,6	88,7	47,2	47,2
<i>Solanum</i>			83,3	83,8	45,2	44,6
<i>Fragaria</i>				83,8	45,6	45,6
<i>Medicago</i>					49,1	48,5
<i>Humanos</i>						98,8

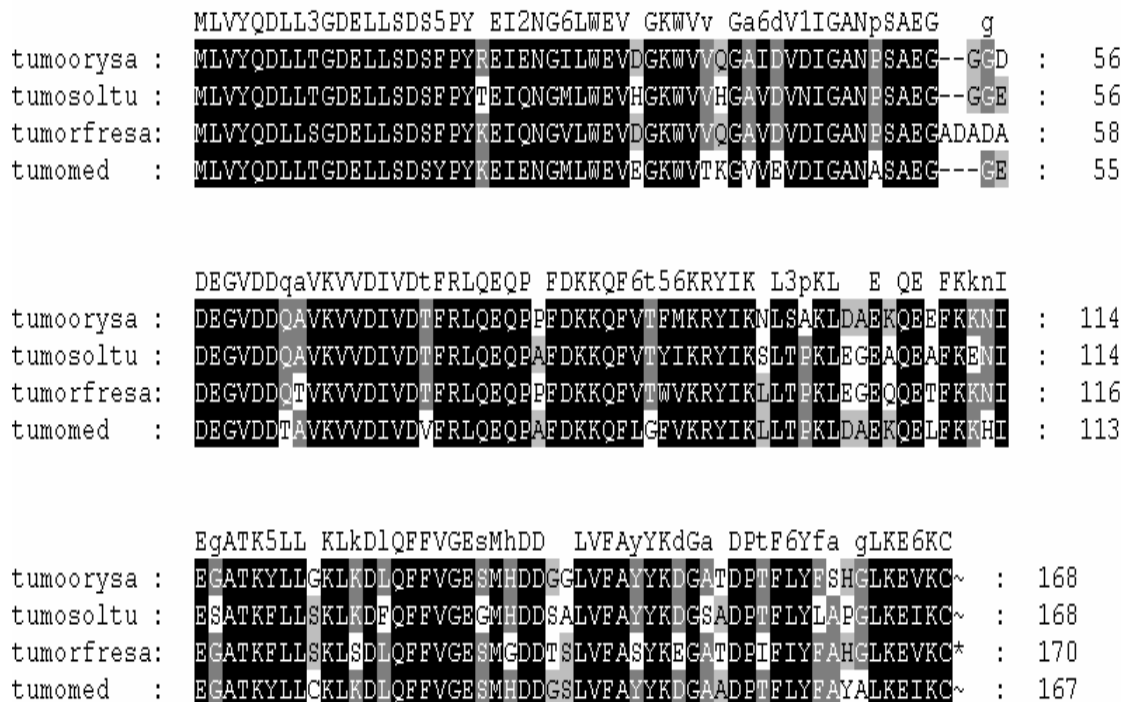
**Tabla 3.** Porcentaje de identidad de aminoácidos observado mediante comparación del cDNA de la TCTP de fresa con otras posibles TCTPs de diferentes organismos.



El mayor porcentaje de identidad de la TCTP de fresa aparece con la de *Arabidopsis*, siendo ésta de un 90,6%.

Analizando las identidades de las TCTPs entre organismos de diferentes Reinos, encontramos que entre organismos del mismo Reino (por ejemplo entre plantas, del Reino vegetal) las identidades son muy altas, superiores al 80%. Sin embargo, entre organismos de diferentes Reinos, las identidades disminuyen y no sobrepasan el 50%.

En la Figura 28 se presenta la comparación entre la secuencia de aminoácidos deducida del gen de la TCTP de fresa con otras TCTPs de plantas superiores presentes en la base de datos.

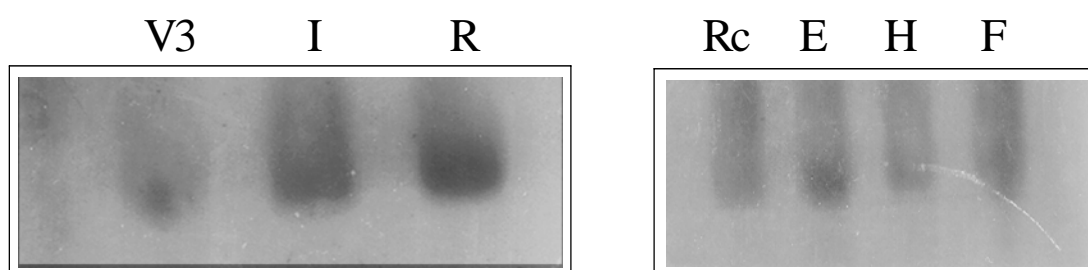


**Figura 28.** Comparación de la secuencia de aminoácidos de una posible TCTP de fresa con otras secuencias aminoacídicas de posibles TCTPs de plantas superiores. Secuencias consenso de aminoácidos se encuentran en negro y sustituciones de aminoácidos homólogos están sombreados.

### 3.2.2 Análisis de la expresión génica

Se ha estudiado el patrón de expresión temporal y espacial del gen que codifica la posible TCTP de fresa mediante análisis por northern blot.

La Figura 29 muestra la aparición de un único transcrito con un tamaño aproximado de 0,8 kb. Su expresión aumenta a lo largo de la maduración de los frutos. Sin embargo, su expresión en los tejidos vegetativos, tales como raíces, estolones, hojas y flores permanece constante con unos valores de expresión que podrían considerarse basales.



**Figura 29.** Estudio de la expresión del gen TCTP de fresa mediante experimento de northern blot. Se emplearon para el estudio frutos en tres estadios de maduración: verde-3 (V3), intermedio (I) y rojo (R). También se analizó la expresión en tejidos de la fresa como raíces (Rc), estolones (E), hojas (H) y flores (F).

Los estudios de expresión sobre la TCTP se han llevado a cabo principalmente en células de mamíferos. MacDonald et al. (1995) han sugerido que la TCTP es un factor de liberación de histamina dependiente de interacción con la inmunoglobulina E que es producido por linfocitos de niños y está presente en fluidos biológicos de pacientes alérgicos. En estudios anteriores, Bohm (1989) había demostrado que la expresión de la TCTP tiene lugar en diferentes tumores de ratón y que su síntesis estaba relacionada con el estadio proliferativo del tumor. Sin embargo, Sánchez et al. (1997) han demostrado la expresión de la TCTP en lisados de células tumorales y sanas, así como su presencia en eritrocitos. Este hecho implica que la TCTP no puede usarse como un marcador general de crecimiento de tumores en humanos. Es posible que el crecimiento del tumor altere la expresión de la TCTP de manera que su sobreexpresión esté asociada a estimulación mitogénica.

Estudios más detallados realizados por Sánchez et al. (1997) han demostrado la existencia de tres isoformas con una masa molecular similar pero con diferentes puntos isoeléctricos, sugiriendo la posibilidad de que pueda existir fosforilación en esta proteína. Estos autores han identificado en la TCTP potenciales sitios de fosforilación para protein kinasa C y casein kinasa II. Así mismo han observado que su expresión aumenta después de la adición de forbol miristato acetato (PMA), un agente que actúa a través de protein kinasa C.

De la misma manera, en la TCTP de fresa hemos encontrado una zona que presenta un 80% de identidad con aspartato-kinasa de *Arabidopsis thaliana*. Esto sugiere que la actividad TCTP de fresa pueda también modularse a través de la fosforilación.

Los autores citados anteriormente han demostrado que la TCTP es capaz de unir iones calcio y que es estable a altas temperaturas. Por otro lado, Gachet (1997) ha demostrado que la TCTP está asociada a los microtúbulos. Recientemente Sturzenbaum (1998) ha demostrado que la TCTP correspondiente en *Lumbricus rubellus* se induce por metales pesados y especialmente por el cobre.

La posible función de esta proteína aún se desconoce pero el hecho de que esté muy conservada entre diferentes especies sugiere que podría tener una función primaria básica como una actividad constitutiva necesaria para el sostenimiento de la mayoría de tipos celulares.

## **VI. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1.- Se ha clonado, secuenciado e identificado dos cDNAs que se corresponden con genes cuya expresión varía a lo largo del proceso de la maduración de los frutos de fresa. La comparación de las secuencias nos ha permitido deducir que uno de ellos se corresponde con una péptido metionina sulfóxido reductasa (PMSR) y el otro a una proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP).

2.- Se ha clonado y secuenciado dos genes genómicos que se corresponden con la PMSR de fresa y que hemos llamado PMSR1 y PMSR2.

3.- La PMSR1 no se expresa ni en frutos ni en tejidos de fresa. Por el contrario, la PMSR2 se expresa única y exclusivamente en frutos de fresa del estadio de maduración rojo, no detectándose concentración de transcrito apreciable en el resto de estadios de maduración ni en los diferentes tejidos de la fresa.

La expresión de la PMSR2 es específica de receptáculos de fresa y está regulada negativamente por las auxinas.

4.- La utilización del promotor de la PMSR2 con fines biotecnológicos permitirá dirigir la expresión de otros genes de interés en el estadio final de la maduración de los frutos de fresa.

5.- Se ha desarrollado un ensayo que refleja la capacidad de proteger *in vivo* frente al peróxido de hidrógeno cuando se induce la actividad PMSR.

6.- Proponemos que la PMSR de fresa es una proteína con múltiples papeles fisiológicos. En primer lugar puede intervenir en la restauración de la actividad de proteínas que poseen grupos metionina sulfóxidos. En segundo lugar, la capacidad de la PMSR de fresa de reconocer como sustrato grupos alquilados, la puede convertir en una enzima que intervenga en la síntesis de algunos derivados azufrados que son importantes componentes del aroma. En tercer lugar es probable que la PMSR pueda actuar como proteína reguladora que active importantes enzimas implicadas en la fase final de la maduración.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abeles F.B., Takeda F. (1990). Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits. *Scientia Horticulturae*, 42, 269-275.
- Aoki S., Araki C., Kaneko K., Katayama O. (1970). L-phenylalanine ammonia-lyase activities in Japanese chesnut, strawberry, apple fruit and bracken. *Journal of Food Science Technology*, 17, 507-511.
- Archbold D.D., Dennis F.G. (1984). Quantification of free ABA and free and conjugated IAA in strawberry achene and receptacle tissue during fruit development. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 109, 330-335.
- Baum K., Groning B., Meier I. (1997). Improved ballistic transient transformation conditions for tomato fruit allow identification of organ-specific contributions of I-box and G-box to the *RBCS2* promoter activity. *The Plant Journal*, 12, 463-469.
- Beauchamp C., Fridovich I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287.
- Bergmeyer. (1983). Catalase, superoxide dismutase and peroxidase activities. *Methods of Enzymatic Analysis*, 3, 273-302.
- Biale J.B., Young R.A. (1981). Respiration and ripening in fruit. Retrospect and prospect. In *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables*, Academic Press, London, 1-39.
- Black S., Harte E.M., Hudson B., Wartofski L. (1960). A specific enzymatic reduction of L-methionine sulfoxide and a related nonspecific reduction of disulfides. *Journal Biological Chemistry*, 235, 2910-2916.
- Bohm H., Benndorf R., Gaestel M., Gross B., Nurnberg P., Kraft R., Otto A., Bielka H. (1989). cDNA sequence coding for a translationally controlled growth-related mouse tumor protein p23. *Biochemistry International*, 19, 277-286.
- Bommer U., Lazaris-Karatzas A., De Benedetti A., Nurnberg P., Bielka H., Sonenberg N. (1994) Translational regulation of the mammalian growth-related protein p23-involment of eIF-4E. *Cellular Molecular Biology Research*, 40, 633-641.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brot N., Weissbach L., Werth J., Weissbach H. (1981). Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proceedings of National Academic of Science USA*, 78, 2155-2158.

- Brot N., Werth J., Koster D., Weissbach H. (1982). Reduction of N-acetyl methionine sulfoxide: A simple assay for peptide methionine sulfoxide reductase. *Analytical Biochemistry*, 122, 291-294.
- Carp H., Miller J., Hoidal R., Janoff A. (1982). Potencial mechanism of emphysema:  $\alpha$ 1 proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proceedings of National Academic of Science USA*, 79, 2041-2045.
- Chitpatima S.T., Makrides S., Bandyopadhyaya R., Brawerman G. (1988). Nucleotide sequence of a mayor messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 2350.
- Civello P.M., Martínez G.A., Chaves A.R., Anon M.C. (1995). Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*). Partial purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2596-2601.
- Cordes S., Deikman J., Margossian L.J., Fischer R.L. (1989). Interaction of a Developmentally regulates DNA-binding factor with sites flanking two different fruit-ripening genes from tomato. *The Plant Cell*, 1, 1025-1034.
- Deikman J., Fischer R.L. (1988). Interaction of a DNA binding factor with the 5' flanking region of an ethylene-responsive fruit ripening gene from tomato. *EMBO Journal*, 7, 3315-3320.
- Dhindsa R.S., Matowe W. (1981). Drought tolerance in two mosses: correlate with enzymatic defense against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*, 44, 276-287.
- Dirinck P.J. De Pooter H.L., Willaert G.A., Schamp N.M. (1981). Flavor quality of cultivated strawberries: The role of the sulphur compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 316-321.
- Drawert F., Berger R.G. (1983). On the biogenesis of aroma compounds in plants and fruits. Xxth Communication: Influence of exogenous parameters on aroma biosynthesis in strawberry fruit. *Lebensm.-Wiss. U.- Technol.*, 16, 209-214.
- Ejiri S.I., Weissbach H., Brot N. (1979). The conversion of methionine sulfoxide to methionine in *Escherichia coli* and rat tissue. *Federation of Proceedings of American Society of Experimental Biology*, 38, 329.
- Fergusson D.L., Burke J.J. (1992). A new method of measuring protein-methionine-S-oxide reductase activity. *Plant Physiology*, 100, 529-532.
- Foo L.Y., Porter L.J. (1980). The phytochemistry of proanthocyanidin polymers. *Phytochemistry*, 19, 1747-1754.



- Forney C.F., Breen P.J. (1985). Growth of strawberry fruit and sugar uptake of fruits discs at different inflorescence positios. *Scientia Horticulturae*, 27, 55-62.
- Gachet Y., Lee M., Sawitzki M., Tournier S., Poulton T., Bommer U. (1997). Intracellular colocalisation of the translationally controlled protein P23 with cytoskeletal estructures. *Biochemical Society Transactions*, 25, 269.
- Gallie D.R. (1993). Post-transcriptional regulation of gene expresion in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 44, 77-105.
- Gao J., Williams T., Brot N., Squier T. (1998). Physiological-role for methionine sulfoxide reductase in the maintenance of functional calmodulin. *Biophysical Journal*, 74, 63.
- Garner M.H., Spector A. (1980). Selective oxidation of cysteine and methionine in normal and senile cataractous lenses. *Proceedings of National Academic of Science USA*, 77, 1274-1277.
- Given N.K., Venis M.A., Grierson D. (1988a). Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit. *Journal of Plant Physiology*, 133, 25-30.
- Given N.K., Venis M.A., Grierson D. (1988b). Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climateric fruit. *Planta*, 174, 402-406.
- Given N.K., Venis M.A., Grierson D. (1988c). Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from strawberry fruit and its synthesis during ripening. *Journal of Plant Physiology*, 133, 31-37.
- Goff S.A., Cone K.C., Fromm M.E. (1991). Identification of functional domains in the maize transcriptional activator C1: Comparison of wild-type and dominant inhibitor proteins. *Genes Development*, 5, 298-309.
- Grierson D., Tucker G.A., Kean J., Ray J., Bird C.R., Schuch W. (1986). Sequencing and identification of a cDNA clone for tomato polygalacturonase. *Nucleic Acids Research*, 14, 8595-8603.
- Gross B., Gaestel M., Bohm H., Bielka H. (1989). cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor protein. *Nucleic Acids Research*, 17, 8367.
- Gross J. (1982). Changes of chlorophylls and carotenoids in developing strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* cv. Tenira). *Gartenbauwissenschaft*, 47, 142-144.
- Guan K., Dixon J.E. (1991). Eukaryotic proteins expressed in *E. coli*: An improved trombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutation-S-transferase. *Analytical Biochemistry*, 192, 262-267.

- Guttridge C.G., Nunns A. (1974). Promotion of redding in unripe strawberry fruits by fungal extracts. *Nature*, 247, 389.
- Hamilton A., Lycett G.W., Grierson D. (1990). Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*, 346, 284-287.
- Hamilton A., Bouzayen N., Grierson D. (1991). Identification of a tomato gene for the ethylene forming enzyme by expression in yeast. *Proceedings of National Academic of Science USA*, 88, 7434-7437.
- Harriman R.V., Hande A.K. (1990). Identification and characterization of three pectin methyl esterase genes in tomato. *American Society of Plant Physiology. Books of abstracts*.
- Henikoff S. (1984). Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene*, 28, 351-359.
- Hoad G.V., Anderson H.M., Guttridge C.G., Sparks T.R. (1971). Ethylene and ripening of strawberry fruits. In *Bristol University, Long Ashton Research Station Annual Report*, 33-34.
- Huber D.J. (1984). Strawberry fruit softening: the potencial roles of poliuronides and hemicelluloses. *Journal of the Food Science*, 49, 1310-1315.
- Hughes G.J. (1994). Human liver protein map-update. *Electroforesis*, 14, 1215-1222.
- Hulme A.C. (1971). The biochemistry of fruits and their products. *Academic Press, New York*, vol. II.
- Hyodo H. (1971). Phenylalanine ammonia-lyase in strawberry fruits. *Plant Cell Physiology*, 12, 989-991.
- Iwata T., Omata I., Ogata K. (1969a). Relationship between the ripening of harvested fruit and the respiratory pattern, II. Respiratory pattern of fruits and its clasification. *Journal of the Japanes Society of Horticultural Science*, 2, 73-80.
- Iwata T., Omata I., Ogata K. (1969b). Relationship between the ripening of harvested fruit and the respiratory pattern, III.Changes of ethylene concentration in fruits and responses to applied ethylene with relation to the respiratory. *Journal of the Japanes Society of Horticultural Science*, 7, 64-72
- Kano Y., Asahira T. (1978). Effect of some growth regulators on the development of strawberry fruits *in vitro* culture. *Journal of the Japanes Society of Horticultural Science*, 47, 195-202.
- Kano Y., Asahira T. (1979). Effect of the endogenous cytokinins in strawberry fruits on their maturing. . *Journal of the Japanes Society of Horticultural Science*, 47, 463-472.

- Knee M., Sargent J.A., Osborne D.J. (1977). Cell wall metabolism in developing strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany*, 28, 377-396.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lincoln J.E., Cordes S., Read E., Fischer R.L. (1987). Regulation of gene expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit ripening. *Proceedings of National Academic of Science USA*, 84, 2793-2797.
- Lincoln J.E., Fischer R.L. (1988a). Diverse mechanisms for the regulation of ethylene-inducible gene expression. *Molecular General Genetics*, 212, 71-75.
- Lincoln J.E., Fischer R.L. (1988b). Regulation of gene expression by ethylene in wild-type and rin tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *Plant Physiology*, 88, 370-374.
- Lis E.K., Borkowsks B., Antoszewski R. (1978). Growth regulators in the strawberry fruit. *Fruit Sciencie Report V*, 17-29.
- López-Aranda J.M., López-Montero R., Barceló-Muñoz M. (1992). *Fruticultura profesional*, 44, 46-53.
- MacDonald S.M., Rafnar T, Langdon J., Lichtenstein L. (1995). Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science*, 269, 688-690.
- Manning K. (1991). Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Analytical Biochemistry*, 195, 45-50.
- Manning K. (1993). Soft Fruits. In *Biochemistry of Fruit Ripening*. (Seymour G.B., Taylor J.E., Tucker G.A. eds.) 347-373.
- Manning K. (1994). Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta*, 194, 62-68.
- Mathews H., Wagoner W., Kellog J., Bestwick R. (1995). Genetic transformation of strawberry: Stable integration of a gene to control biosynthesis of ethylene. *In vitro Cellular Development Biology*, 31, 36-43.
- Medina-Escobar N., Cárdenas J., Valpuesta V., Muñoz-Blanco J., Caballero J.L. (1997a). Cloning and characterization of cDNAs from genes differentially expressed during the strawberry fruit ripening process by a MAST-PCR-SBDS method. *Analytical Biochemistry*, 248, 288-296.
- Medina-Escobar N., Cárdenas J., Moyano E., Caballero J.L., Muñoz-Blanco J. (1997b). Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Molecular Biology*, 34, 867-877.

- Medina-Escobar N., Cárdenas J., Muñoz-Blanco J., Caballero J.L. (1998). Cloning and molecular characterization of a strawberry fruit ripening-related cDNA corresponding a mRNA for a low-molecular-weight heat-shock protein. *Plant Molecular Biology*, 36, 33-42.
- Mohensin V., Lee J.B. (1989). Oxidation of  $\alpha 1$  proteinase inhibitor: role of lipid peroxidation products. *Journal of Applied Physiology*, 66, 2211-2215.
- Moskovitz J., Rahman M.A., Strassman J., Yancey S.O., Kushner S.R., Brot N., Weissbach H. (1995). *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene: Regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. *Journal of Bacteriology*, 502-507.
- Moskovitz J., Weissbach H., Brot N. (1996). Cloning and expression of a mammalian gene involve in reduction of methionine sulfoxide residues in protein. *Proceedings of National Academic of Science USA*, 73, 2095-2099.
- Mudge K.W., Narayanan K.R., Poovaiah B.W. (1981). Control of strawberry fruit set and development with auxins. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 106, 80-84.
- Mussinan C.J., Walradt J.P. (1975). Organic acids from fresh California strawberries. *Journal of the Agriculture and Food Chemistry*, 23, 482-484.
- Nitsch J.P. (1950). Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *American Journal of Botany*, 37, 211-215.
- Nitsch J.P. (1955). Free auxins and free tryptophane in the strawberry. *Plant Physiology*, 30, 33-39.
- Oeller P.W., Min-Wong L., Taylor L., Pike D.A., Theologis A. (1991). Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science*, 254, 437-439.
- Ozawa T., Lilley T.H., Haslam E. (1987). Polyphenol interactions: astringency and the lost of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry*, 26, 2937-2942.
- Pay A., Heberle-Bors E., Hirt H. (1992). An alfalfa cDNA encodes a protein with homology to translationally controlled human tumor protein. *Plant Molecular Biology*, 19, 501-503.
- Perkins-Veazie P., Huber D.J. (1987). Growth and ripening of strawberry fruit under field conditions. *Proceedings of Florida State Horticultural Society*, 100, 253-256.
- Poovaiah B.W., Veluthambi K. (1985). Auxin regulated invertase activity in strawberry fruits. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 110, 258-261.

- Reddy A.S.N., Jena P.K., Mukherjee S.K., Poovaiah B.W. (1990). Molecular cloning of cDNAs for auxin-induced mRNAs and developmental expression of the auxin-inducible genes. *Plant Molecular Biology*, 14, 643-653.
- Sadanandom A., Piffanelli T., Knott T., Robinson C., Sharpe A., Lydiate D., Murphy D., Fairbairn D.J. (1996). Identification of a peptide methionine sulfoxide reductase gene in an oleosin promoter from *B. napus*. *The Plant Journal*, 10, 235-242.
- Sadanandom A., Murphy DJ. (1997). A novel form of oxidative stress protection in plants. *Plant Development*. (John Innes Centre and Sainsbury Laboratory Annual Report), 41-42.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, New York.
- Sánchez J., Nikolau B.J., Stump P.K. (1983). Reduction of N-acetyl methionine sulfoxide in plants. *Plant Physiology*, 73, 619-623.
- Sánchez J.C., Schaller D., Ravier F., Golaz O., Jaccoud S., Belet M., Wilkins M.R., James R., Deshusses J., Hochstrasser D. (1997). Translationally controlled tumor protein: A protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes. *Electroforesis*, 18, 150-155.
- Schuster B., Herrmann K. (1985). Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. *Phytochemistry*, 24, 2761-2764.
- Smith C.J.S., Watson C.F., Ray J., Bird C.R., Morris P.C., Schuch W., Grierson D. (1988). Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature*, 334, 724-726.
- Smith C.J.S., Watson C.F., Morris P.C., Bird C.R., Saymour G.B., Gray J.E., Arnold C., Tucker G.A., Schuch W., Harding S., Grierson D. (1990). Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Molecular Biology*, 14, 369-379.
- Smith D.B., Johnson K.S. (1988). Single step purification of polypeptides expressed in *E. coli* as fusion with glutathion-S-transferase. *Gene*, 67, 31-40.
- Sturzenbaum S.R., Kille P., Morgan A.J. (1998). Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) in the Earthworm *Lumbricus rubellus*. *Biochimica et Biophysica acta-Gene structure and expression*, 3, 294-304.
- Vain P., McMullen M.D., Finer J.J. (1993). Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Report*, 12, 84-88.

- Varma S.D., Kumar S. Richards R.D. (1979). Light-induced damage to ocular lens cation pump: Prevention by vitamin C. *Proceedings of National Academic of Science USA*, 76, 3504-3506.
- Veluthambi K., Poovaiah B.W. (1984). Auxin-regulated polypeptide changes at differential stages of strawberry fruit development. *Plant Physiology*, 75, 349-353.
- Veluthambi K., Rhee J.K., Mizraki Y., Poovaiah B.W. (1985). Correlation between lack of receptacle growth in response to auxin accumulation of a specific polypeptide in a strawberry (*Fragaria x ananassa*) variant genotype. *Plant Cell Physiology*, 26, 317-324.
- Won P.S., Travis J. (1980). Isolation and properties of oxidied  $\alpha$ 1 proteinase inhibitor from human rheumatoid synovial fluid. *Biochemistry Biophysica Research Communication*, 96, 1449-1454.
- Wrolstad R.E., Shallenberger R.S. (1981). Free sugars and sorbitol in fruits- a compilation from the literature. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*, 64, 91-103.
- Xu R., Goldman S., Coupe S., Deikman J. (1996). Ethylene control of E4 transcription during tomato fruit ripening involves two cooperative *cis* elements. *Plant Molecular Biology*, 31, 1117-1127.
- Yamashita I., Iino K., Nemoto Y., Yoshikawa S. (1977). Studies on flavor development in strawberries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 25, 1165-1168.
- Yamashita I., Nemoto Y., Yoshikawa S. (1976). Formation of volatiles alcohols and esters from aldehydes in strawberries. *Phytochemistry*, 15, 1633-1637.
- Yenofsky R., Cereghini S., Krowczynska A., Brawerman G. (1983). Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide. *Molecular and Cellular Biology*, 3, 1197-1203.