

INDICE

ABSTRACT.....	V
RESUMEN.....	VII
1.INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Formulación del marco teórico	10
1.2. Antecedentes generales.....	12
1.2.1 Pared Celular Vegetal.....	12
1.2.2 Composición de la pared Celular.....	13
1.2.3 Xiloglucanos.....	16
1.2.3.1 Localización de los xiloglucanos	17
1.2.3.2 Complejo Celulosa-Xiloglucano	17
1.2.4 Remodelamiento de la pared celular.	19
1.2.4.1 Xiloglucano endo-transglicosilasa/hidrolasa (XTH).....	20
1.2.4.2 Estructura cristalográfica de XTH.....	23
1.2.4.3 Actividad enzimática endotransglicosilasa/hidrolasa.....	26
1.2.5 Regulación del remodelamiento de la pared celular.....	27
1.2.6 Estudio de inclinación en <i>P. radiata</i>	29
2.Formulación de Hipótesis.....	33
3.Objetivos Generales y específicos.....	33
3.1 Objetivo General.....	33
3.2 Objetivos específicos	33
4.MATERIALES Y METODOS.....	34
4.1 Obtención de muestras	35
4.1.1 Tratamiento hormonales	35
4.2 Electroforesis en gel de agarosa.....	37
4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida.	37
4.4 Purificación de templado desde gel agarosa.	38
4.5 Extracción de ARN total.....	39
4.6 Elongación de la secuencia con homología a <i>XTH</i>	40
4.6.1 Diseño de partidores para RACE.....	40
4.7 Clonamiento de la secuencia genómica correspondiente al gen <i>XTH</i>	41
4.8 Análisis bioinformático de la secuencia genómica del gen <i>XTH</i>	42

4.9 Expresión de la proteína recombinante de PrXTH1	43
4.9.3 Transformación de <i>Pichia pastoris</i>	44
4.9.4 Síntesis y purificación de la proteína recombinante PrXTH1	46
4.9.5 Actividad enzimática de PrXTH1	47
4.10 Modelo de la proteína PrXTH1	48
4.10.1 Docking molecular.	48
4.10.2 Dinámica Molecular.	49
4.10.3 MM-GBSA	50
4.11 Análisis Transcripcional de <i>Pr-XTH1</i>	51
4.12 Aislamiento y caracterización de la región promotora del gen <i>XTH</i>	52
4.12.1 Extracción de ADN	52
4.12.2 Aislamiento de la región río arriba de gen <i>XTH</i>	53
5.RESULTADOS	56
5.1 Elongación de la secuencia con homología a <i>XTH</i>	57
5.2 Análisis filogenético de PrXTH1	61
5.3 Actividad XET de la proteína recombinante.	63
5.4 Modelo por Homología de PrXTH1	66
5.5 Interacción Proteína–Ligando	67
5.6 Dinámica molecular de complejos	70
5.7 MM-GBSA, evaluación de energía libre de unión	71
5.8 Efecto de la inclinación en los niveles de transcritos de <i>PrXTH1</i>	73
5.9 Efecto modulador de etileno en la expresión del gen <i>PrXTH1</i>	75
5.10 Efecto modulador de auxina en la expresión del gen <i>PrXTH1</i>	76
5.11 Caracterización de la región promotora del gen <i>PrXTH1</i>	78
6.DISCUSIÓN	81
7.CONCLUSIONES	88
8.BIBLIOGRAFÍA	90

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Ultraestructura de las paredes celulares en células de xilema secundario en pino (<i>P. pinaster</i>):.....	12
Figura 2. Ilustración esquemática de los tipos de hemicelulosas que se encuentran en las paredes celulares de las plantas.....	14
Figura 3. Esquema de la disposición de los distintos componentes de la pared celular.....	15
Figura 4. Análisis filogenético de 130 XTHs de diferentes especies.....	21
Figura 5. Nomenclatura y estructura sistemática de genes de la familia de genes de <i>Arabidopsis</i> XTH.....	22
Figura 6. Características conservadas de los principales grupos de xiloglucano endo-transglucosilasa (XET) relacionados con las proteínas XET de <i>Arabidopsis</i>	23
Figura 7. Estructura molecular 3D de PttXET16A.....	24
Figura 8. Alineamiento de las secuencias de PttXET16A, TmNXG1 y TmNXG2.....	25
Figura 9. Esquema de la actividad enzimática de XTHs.....	27
Figura 10. Plántulas de <i>Pinus radiata</i> utilizadas en los ensayos.....	35
Figura 11. Esquema del tratamiento de inclinación en plántulas de <i>P. radiata</i>	36
Figura 12. Esquema del vector de expresión (pPICZ α) unido al <i>PrXTH1</i>	44
Figura 13. Gel de agarosa de amplicones de RACE.....	57
Figura 14. Secuencia nucleotídica y aminoácido deducida de <i>PrXTH1</i>	59
Figura 15. Alineamiento múltiple de secuencias aminocídicas de <i>PrXTH1</i> y diversas XTHs de plantas.....	60
Figura 16. Comparación de la estructura del gen <i>PrXTH1</i> y XTHs de <i>Arabidopsis</i> del grupo I.....	61
Figura 17. Análisis filogenéticos de <i>PrXTH1</i>	62
Figura 18. Análisis de PCR del clon recombinante 11 de <i>Pichia pastori</i>	64
Figura 19. Gel SDS/PAGE y Western blot de la proteína recombinante <i>PrXTH1</i> expresada en <i>P. pastori</i>	65
Figura 20. Alineamiento estructural entre <i>PrXTH1</i> y 1UMZ.....	66
Figura 21. Modelo por Homología de <i>PrXTH1</i> usando como templado 1UMZ de <i>Populus</i>	67
Figura 22. Resultado de las conformaciones de las interacciones proteína-ligando.....	69
Figura 23. Gráfico de dinámica molecular durante 10 ns.....	70
Figura 24. Efecto de la inclinación en los niveles de transcritos del gen <i>PrXTH1</i>	74
Figura 25. Efecto de etileno en los niveles de transcritos de <i>PrXTH1</i> en tallos inclinados de <i>P. radiata</i>	75
Figura 26. Abundancia relativa de transcritos de <i>PrXTH1</i> en tallo de <i>P. radiata</i> con tratamiento de IAA y NAA.....	76
Figura 27. Abundancia relativa de transcritos de <i>PrXTH1</i> en tallo inclinado con tratamiento de auxina.....	77
Figura 28. Amplificación de PCR de las bibliotecas de Genome Walker.....	78
Figura 29. Esquema de elementos cis presentes en la zona promotora de <i>PrXTH1</i>	79

Tabla I. Partidores utilizados en la obtención de la secuencia completa del transcrito del gen <i>PrXTH1</i> . UPM mezcla de partidores universales provisto por el Kit RACE	40
Tabla II. Partidores utilizados en el análisis de expresión por qRT-PCR.	52
Tabla III. Actividad Transglicosilasa de la proteína Pr-XTH1	65
Tabla IV. Energía de interacción entre las diferentes proteínas y los ligandos de xiloglucanos	68
Tabla V. ΔG de energías de interacción del complejo obtenido durante dinámica molecular de MM-GBSA.	72
Tabla VI. Elementos regulatorios identificados en las regiones promotoras de los gen <i>PrXTH1</i>	80