



# Identificació i caracterització de proteïnes relacionades en l'acumulació de carotenoides en el fruit del tomàquet

Francesc Hernández Gras

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

IDENTIFICACIÓ I  
CARACTERITZACIÓ  
DE PROTEÏNES  
RELACIONADES EN  
L'ACUMULACIÓ DE  
CAROTENOIDES EN  
EL FRUIT DEL  
TOMÀQUET.

Francesc Hernández Gras

Barcelona, 2012



Universitat de Barcelona  
Facultat de Biologia  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



Programa de doctorat de biotecnologia,  
Bienni 2005-2007

# Identificació i caracterització de proteïnes relacionades en l'acumulació de carotenoides en el fruit del tomàquet.

Memòria presentada per Francesc Hernández Gras, llicenciat en Bioquímica, per optar al  
Grau de doctor per la Universitat de Barcelona.

Aquest treball ha estat realitzat al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular,  
Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

Director de tesis

L'autor

Albert Boronat i Margosa

Francesc Hernández Gras

A la meva Família

En el fons, els científics som gent amb sort:  
podem jugar a allò que volem durant tota la vida.

Lee Smolin (Nascut en 1955)



# Índex

<b>Acrònims i Abreviatures .....</b>	<b>VII</b>
<b>Introducció .....</b>	<b>1</b>
1. El tomàquet i la seva rellevància agronòmica .....	3
2. El tomàquet com a sistema model en l'estudi de la maduració dels fruits .....	4
3. Maduració del fruit del tomàquet. ....	5
3.1 Efecte de l'etilè en la maduració .....	6
3.2 Biosíntesi de l'etilè en la maduració .....	7
4. El cromoplastes .....	8
5. Els carotenoides .....	10
5.1 Importància biològica i nutricional dels carotenoides .....	11
5.2 Principals carotenoides i altres isoprenoides presents en el fruit de tomàquet .....	12
5.3 Biosíntesi de carotenoides .....	13
5.4 Biosíntesi i acumulació de carotenoides durant la maduració del fruit del tomàquet .....	16
<b>Objectius .....</b>	<b>19</b>
<b>Resultats .....</b>	<b>23</b>
<b>Capítol I: Identificació de gens expressats diferencialment en RILs contrastants en el contingut de carotenoides i <math>\alpha</math>-tocoferol i estudi del seu possible paper en el desenvolupament i maduració del fruit. ....</b>	<b>25</b>
1. Anàlisi de RILs contrastants en el contingut de carotenoides i tocoferols. ....	25
1.1 Quantificació de carotenoides i tocoferols. ....	26
1.2 Anàlisi del contingut de carotenoides i $\alpha$ -tocoferol dels fruits de les RILs recol·lectats l'any 2005. ....	28
1.3 Caracterització histològica i citològica dels fruits de <i>S. pimpinellifolium</i> i <i>S. lycopersicum</i> cv Moneymaker. ....	30



1.4	Determinació de la relació pes sec / pes fresc de les mostres corresponents als fruits de les RILs recol·lectats l'any 2006. ....	32
1.5	Anàlisi del contingut de carotenoides i $\alpha$ -tocoferol dels fruits de les RILs recol·lectats l'any 2006. ....	33
2.	Anàlisi transcriptòmic de les RILS contrastants mitjançant microarrays. ....	37
3.	Caracterització de l'unigen sgn-U220026. ....	40
4.	Caracterització del gen i la proteïna corresponent a l'unigen sgn-U216160. ....	44
4.1	Estudi de l'expressió dels gens SISABP2A i SISABP2B. ....	49
4.2	Expressió i purificació de SISABP2A recombinant. ....	52
4.3	Anàlisi funcional de la proteïna SISABP2A recombinant. ....	54
<b>Capítol II: Caracterització de proteïnes relacionades amb complexos lipoproteics d'acumulació de carotenoides. ....</b>		
<b>56</b>		
1.	Caracterització de complexos lipoproteics d'acumulació de carotenoides. ....	56
1.1	Purificació i caracterització complexos proteïna-carotenoid mitjançant Colorless Native-PAGE a partir de mostres de cromoplastes purificats ....	56
1.2	Purificació i caracterització de complexos proteïna-carotenoid mitjançant cromatografia de gel filtració a partir de mostres de pericarp. ....	60
1.3	Aïllament i caracterització de la fracció lipoproteica a partir de cromoplastes purificats. ....	65
1.4	Anàlisi proteòmic de les proteïnes presents en les fraccions recol·lectades de les columnes de gel filtració. ....	67
1.5	Anàlisi de l'expressió dels mRNAs corresponent de les proteïnes d'interès seleccionades. ....	72
2.	Caracterització de les proteïnes Temperature-induced Lipocalin de tomàquet. ....	74
2.1	Caracterització in silico de les TIL de tomàquet ....	74
2.2	Estudi de l'expressió de SITIL1 i SITIL2. ....	79
2.3	Detecció dels nivells de proteïna TILs en la maduració del fruit del tomàquet. ....	81
2.4	Detecció de TILs en l'extracte de cromoplastes. ....	82

2.5	Estudi de la localització de les proteïnes SITIL1 i AtTIL .....	84
2.6	Estudis d'immunolocalització de la SITIL en mostres de pericarp de fruit de tomàquet.....	93
2.7	Caracterització del mecanisme d'unió a membranes de les proteïnes TIL.....	97
2.8	Expressió i caracterització de la proteïna SITIL1 .....	105
2.9	Caracterització de les proteïnes SITIL2 i AtTIL.....	109
2.10	Expressió de les proteïnes TIL en <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	112
<b>Discussió.....</b>		<b>117</b>
<b>Capítol I: Identificació de gens expressats diferencialment en RILs contrastants en el contingut de carotenoides i <math>\alpha</math>-tocoferol i estudi del seu possible paper en el desenvolupament i maduració del fruit.....</b>		
<b>119</b>		
1.	Caracterització de l'unigen SGN-U220026.....	123
2.	Caracterització de l'unigen SGN-U216160.....	124
<b>Capítol II Caracterització de proteïnes relacionades amb complexos lipoproteïcs d'acumulació de carotenoides.....</b>		
<b>134</b>		
1.	L'Absisic stress-ripening protein 1.....	136
2.	17,7 Class I small heat shock protein.....	137
3.	Fruit-Specific Protein.....	138
4.	Temperature-induced Lipocalin 1 i 2.....	140
 <b>Conclusions .....</b>		<b>149</b>
 <b>Materials i Mètodes .....</b>		<b>155</b>
1.	Material biològic, creixement i propagació.....	157
1.1	Línies de plantes utilitzades en aquest treball.....	157
1.2	Recol·lecció de llavors de tomàquet.....	157
1.3	Esterilització de llavors de tomàquet.....	157
1.4	Creixement de les plantes de tomàquet.....	158
1.5	Creixement de les plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	159
1.6	Creixement de les plantes de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	159
1.7	Soques bacterianes .....	159
1.8	Medis de creixement de bacteris.....	159

1.9	Medis de creixement d'Agrobacterium.....	160
1.10	Protocol de transformació de cèl·lules competents d'E. coli per xoc tèrmic.....	160
1.11	Protocol de preparació de cèl·lules competents d'Agrobacterium electrocompetents.....	161
1.12	Protocol de transformació de cèl·lules competents d'Agrobacterium per electroporació.....	162
2.	Tècniques de biologia molecular d'àcids nucleics. ....	162
2.1	Extracció d'RNA de tomàquet.....	162
2.2	Extracció de DNA genòmic de plantes.....	164
2.3	Separació electroforètica de DNA.....	165
2.4	Northern-blot.....	165
2.4.1	Sondes utilitzades en els experiments de Northern-blot.....	166
2.4.2	Preparació de les membranes Northern-blot.....	166
2.4.3	Tinció de la membrana.....	168
2.4.4	Hibridació i rentats de les membranes.....	168
2.4.5	Deshidratació de la membrana (stripping).....	168
2.5	Generació del cDNA a partir de RNA.....	169
2.6	La PCR.....	169
2.6.1	Generació dels primers.....	169
2.6.2	Reacció Taq.....	169
2.6.3	Reacció Pfu.....	170
2.7	SQ-PCR.....	170
2.8	Purificació del DNA des el gel.....	171
2.9	Digestió de DNA.....	171
2.10	Lligació de DNA.....	172
2.11	Mètode de lligació de plasmids de qualsevol mida.....	172
2.12	Mètode de Dig-Lig.....	172
2.13	Extracció del plasmid dels bacteris.....	173
2.14	Seqüenciació de DNA.....	173
2.15	Reacció de la TOPO isomerasa.....	173
2.16	Sistema Gateway.....	173
2.16.1	Vectors Gateway utilitzats.....	174

3. Tècniques de Proteïnes. ....	175
3.1 Extracció de proteïnes des de tomàquet total.....	175
3.2 Extracció de proteïnes de mostres de cromoplastes. ....	175
3.3 Deslipidització de mostres de proteïna amb acetona. ....	176
3.4 Protocol de preparació de mostra de Laemmli .....	176
3.4.1 Preparació del gel d'acrilamida segons el protocol de Laemmli....	177
3.4.2 Separació electroforètica de les proteïnes.....	178
3.5 Quantificació de proteïnes per Bradford.....	178
3.6 Clear Native-PAGE o electroforesis de proteïnes no desnaturalitzant .....	178
3.6.1 Extracció de mostra de CN Native-PAGE.....	179
3.6.2 Separació electroforètica de Blue Native-PAGE.....	179
3.6.3 Separació electroforètica del gel. ....	180
3.7 Blue native Native-PAGE.....	181
3.8 Electroelució.....	181
3.9 Tincions de coomassie .....	182
3.10 Tinció de proteïnes amb plata .....	182
3.11 Western-blot.....	183
3.11.1 Anticossos utilitzats.....	185
3.12 Expressió i purificació de proteïnes recombinats en E. coli.....	185
3.12.1 Optimització del mètode d'expressió de proteïnes.....	185
3.12.2 Determinació de la solubilitat de la proteïnes heteròloga.....	186
3.12.3 Extracció de les proteïnes recombinats des de E. coli. ....	186
3.12.4 Procés de purificació de proteïnes per la columna Histrap <sup>tm</sup> FF..	187
3.13 Expressió i purificació de proteïnes recombinats a partir de fulles Agroinfiltrades de <i>Nicotiana benthamiana</i> . ....	188
3.13.1 Detecció de l'expressió de proteïnes <i>N. benthamiana</i> . ....	188
3.13.2 Procés de purificació de proteïnes des de <i>N. benthamiana</i> . ....	188
3.14 Post tractament de les proteïnes purificades.....	189
4. Tècniques específiques de plantes.....	189
4.1 Liofilització de pericarp de tomàquet.....	189
4.2 Extracció de carotenoides de fruit de tomàquet.....	190
4.2.1 Preparació de cantaxantina. ....	190

4.2.2	Extracció de carotenoides. ....	190
4.3	Quantificació de carotenoides per HPLC.....	191
4.4	Aïllament i purificació de cromoplastes de fruit de tomàquet. ....	192
4.5	Agroinfiltració de plantes de <i>Nicotinana benthamiana</i> .....	193
4.5.1	<i>Agrobacterium</i> utilitzats.....	193
4.5.2	Protocol d'Agroinfiltració.....	194
4.5.3	Observació de les proteïnes fluorescents.....	194
5.	Tècniques específiques de la present tesis. ....	195
5.1	Determinació de l'activitat de SABP2.....	195
5.1.1	Reacció d'esterificació del àcid salicílic.....	195
5.1.2	Quantificació per HPLC dels extractes de SA.....	195
5.2	Optimització de l'extracció descrita per Zhou, per a cromoplastes fruit de tomàquet.....	196
5.3	Mètode d'extracció Zhou.....	197
5.3.1	Separació cromatogràfica.....	197
5.4	Efecte del ió cianur en les proteïnes TIL.....	198
5.5	Espectres EPR.....	198
6.	Bases de dades i programari associat. ....	198
6.1	Bioinformàtica.....	198
6.2	Bases de dades .....	199
6.3	Ofimàtica: .....	199
7.	Primers utilitzats en aquest treball.....	199
	<b><i>Bibliografia</i></b> .....	<b>203</b>
	<b><i>Annex</i></b> .....	<b>219</b>
	<b>Annex: Gens diferencialment expressats en els arrays de les Alt contingut de carotenoides (HC) respecte baix (LP).....</b>	<b>220</b>

## ***Acrònims i Abreviatures***

A	Ampers	CN-PAGE	Color-Less Native
AACT	Acetoacetyl-CoA Tiolasa		Polyacrylamide Gel
ABA	Àcid Abscísic		Electrophoresis
ACC	1-aminociclopropà-1-carboxilat	CrtISO	Carotè Isomerasa
ACO	1-aminociclopropà-1-carboxilat	DEPC:	DiEtilPyroCarbonat
	Oxidasa	DM	n-docecil- $\beta$ -d-maltòsid
ACS	1-aminociclopropà-1-carboxilat	DMAP	Dimetilalil Pirofosfat
	Sintasa	DMAPP	Dimetilalil Difosfat
AOX	Oxidasa Alternativa	DNA	Àcid Desoxiribonucleic
ApoD	Apolipoproteïna D	DTT	Ditritioterol
APS	Persulfat Amònic	DXP	1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfat
ATP	Adenosina Trifosfat	DXR	DXP Reductoisomerasa
<i>At</i> TIL	Temperature-induced	DXS	DXP Sintasa
	Lipocalin <i>d'Arabidopsis thaliana</i>	eCFP	Enhanced Cyan Fluorescent
BN-PAGE	Blue Native - Polyacrylamide		Protein
	Gel Electrophoresis	eGFP	Enhanced Green Fluorescent
C/M	Cloroform / Metanol		Protein
Car:	Carotenoides	EPR	Electron Paramagnetic
cDNA	Àcid desoxiribonucleic copia		Resonance Spectroscopy
	de mRNA	ER	Reticle Endoplasmàtic
CDP-ME	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-	ESI-QTOF	Electrospray Ionization-
	eritritol		Quadrupole Time-Of-Flight
CDP-MEP	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-	EST	Expressed Sequence Taq
	eritritol-2-fosfat	ETR	receptors de membrana amb
CDS	Coding DNA Sequence		resposta a etilè
CMK	CDP-ME Quinasa	eYFP	Enhanced Yellow Fluorescent
CMS	CDP-ME Sintasa		Protein
		FPP	Farnesil Difosfat
		FPS	FPP Sintasa

G3P	D-gliceraldeid-3-fosfat	MeJA	Metil Jasmonat
GA	Giberelines	MEP	2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat
GGPP	Geranil-Geranil Fosfat	MEP	Metileritritol 4-Fosfat
GGPS	Geranil-Geranil Fosfat Sintasa	MeSA	Metil Salicilat
GPP	Geranil Difosfat	MEV	Mevinolina
GPS	GPP Sintasa	MM	Varietat Moneymaker de <i>Solanum lycopersicum</i>
H/A/M	Hexà / Acetona / Metanol	mRNA	Àcid Ribonucleic Missatger
HDR	HMBPP Reductasa	MS	Mass Spectrometry
HDS	HMBPP Sintasa	MS-MS	Mass Spectrometry In Tandem
HMBPP	(E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enil difosfat	MVA	2-C-methyl-D-erythritol 4- phosphate ó Mevalonat
HMG-CoA	3-Hidroxi-3-Metilglutaril Coenzim A	MVK	MVA Quinasa
HMGR	HMG-CoA reductasa	MVP	5-fosfomevalonat
HMGS	HMG-CoA sintasa	MVPP	5-difosfomevalonat
HP	Alt contingut de carotenoides	NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleòtid Reduit
HSPs	High Sock Proteins	NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleòtid Fosfat Reduit
IAA	Àcid indol-3-acètic	NO	Òxid Nítric
IDI	IPP Isomerasa	NTP	Trinucleotodis
IEF	Isoelectric Focusing	<i>NtSABP2</i>	Salicylic Acid-Binding Protein 2 de <i>Nicotiana tabacum</i>
IPP	Isopentenil Difosfat	NXS	Neoxanthin Sintasa
JA	Àcid Jasmonic	PAL	Fenilalanina Amino Liasa
LC-MS	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry	PDS	Fitoè Desaturasa
LP	Baix contingut de carotenoides	PMD	MVPP Descarboxilasa
Lyc	Licopè	PMK	MVP Quinasa
mA	Mil·liamperi	PQ/PQH2	Plastoquinona
MALDI-QTOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Quadrupole Time-Of-Flight	PR	Pathogenic Related Genes
MCS	MEcPP Sintasa	PSY-1	Fitoè Sintasa 1
MEcPP	2-C-metil-D-eritritol-2,4- ciclodifosfat	PSY-2	Fitoè Sintasa 2
MeIAA	Metil Indol-3-acetat	PTOx	Oxidasa Alternativa Plastídica
		RBP	Retinol Binding Protein

RIL	Recombinant Inbred Line	SI/TIL	Temperature-induced
RNA	Àcid Ribonucleic		Lipocalin de <i>Solanum</i>
ROS	Especies Reactives D'oxigen		<i>lycopersicum</i>
rpm	Revolucions per minut	TEMED	Tetramethylethylenediamine
SA	Àcid Salicilic	TIL	Temperature-induced
SABP2	Salicylic Acid-Binding Protein 2		Lipocalin
S-AdoMet	S-Adenosil-Metionina	TO-937	<i>Solanum pimpinellifolium</i>
SAMT	Salicilic Acid Metil Transferasa	ToMV	Virus del Mosaic del Tomàquet
SAR	Resistència Sistèmica	V	Volts
	Adquirida	VDE	Violaxantina De-Epoxídida
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	xg	Gravetats
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate	ZDS	ζ-carotè Desaturasa
	Polyacrylamide Gel	ZEP	Zeaxantina Epoxidasa
	Electrophoresis	α1m	α1-microglobulina
SI17,7 HSP	17.7 Kd Class I Small Heat	α-toc	α-tocoferol
	Shock Protein de <i>Solanum</i>	β1-CrtR	Anell-B Hidroxilasa
	<i>lycopersicum</i>	β2-CrtR	Anell-B Hidroxilasa-2
SIASRP1	Abscisic Stress-Ripening	β-car	β-carotè
	Protein 1 de <i>Solanum</i>	β-Cyc	β-ciclasa Cromoplastica
	<i>lycopersicum</i>	β-Lcy	Licopè β-ciclasa
SIFSP	Fruit-Specific Protein de	ε-CrtR	Anell-E Hidroxilasa
	<i>Solanum lycopersicum</i>	ε-Lcy	Licopè ε-ciclasa
SISABP2	Salicylic Acid-Binding Protein 2	λ:	Longitud d'ona
	de <i>Solanum lycopersicum</i>		





# **Introducció**



## **Introducció**

### **1. El tomàquet i la seva rellevància agronòmica**

El tomàquet (*Solanum lycopersicum*) és una de les hortalisses més cultivades a nivell mundial (aproximadament 140 milions de tones anuals) i és troba també entre les de major producció de Espanya (aproximadament 4,8 milions de tones anuals) en la temporada 2009, segons dades de la FAO. La major part de la producció mundial es dona en l'hemisferi nord, sent la zona mediterrània, els Estats Units i la Xina els majors productors. El principal productor de tomàquet a l'hemisferi sud és el Brasil. Dins del àmbit europeu Espanya és el segon productor, darrera d'Itàlia, amb un 20,8% de l'activitat. A nivell mundial Espanya es troba en el vuitè lloc amb el 3,4 % de la producció.

Encara que el tomàquet es consumeixi majoritàriament fresc, una part important es destina a la indústria dels processats, que cobreix des de la producció de tomàquet triturat fins a la d'elaboració de salses o pastes. En el cas del tomàquet processat, a part de les característiques que es busquen en el tomàquet fresc (fermesa, color, sabor i aroma) se li afegeixen de complementaries depenent del tipus de processament industrial i del producte final. Les principals característiques organolèptiques del fruit de tomàquet són el contingut de pigments, sucres, àcids orgànics, oligoelements (fòsfor i calci, entre altres), antioxidants i la proporció de matèria seca. El fruit del tomàquet i els seus derivats constitueixen una font important de  $\beta$ -carotè (provitamina A) i representen la principal font de licopè (un potent antioxidant) en les dietes occidentals (veure més endavant).

## **2. El tomàquet com a sistema model en l'estudi de la maduració dels fruits**

La importància comercial del tomàquet, conjuntament amb la seva herència diploide, la fàcil propagació i el fet de presentar un període de creixement relativament curt, l'han convertit en el principal sistema model en l'estudi de la maduració dels fruits carnosos (Gillaspy *et al.* 1993, Giovannoni 2004, Klee i Giovannoni 2011).

A més, el tomàquet posseeix un genoma relativament petit (950 Mb) organitzat en 12 cromosomes en diploidia (encara que en algun teixit té tetraploidia). Actualment, el seu genoma ha estat seqüenciat i es troba en fase d'ordenació en dues formes: els *scaffolds* ("andamiatges") i els cromosomes (de forma encara provisional). Els *scaffolds* són muntatges de les regions contigües seqüenciades totalment (anomenades *contigs*) ordenades en el genoma gracies als mapes de marcadors moleculars realitzats prèviament. A dia d'avui les seqüències es troben encara en estat d' anotació en l'afany de cercar els diferents gens dins del genoma. Aquesta informació està disponible a la pàgina web de *Sol Genomics Network* (<http://solgenomics.net/>), on també es troba tota la informació dels ESTs (*Expressed Sequence Tags*) i dels Unigenes (conjunt de diferents EST que defineixen la seqüència d'un determinat mRNA), juntament amb els mapes genòmics. Està també accessible una base de dades de expressió de diferents gens en diferents etapes de desenvolupament i maduració del fruit gracies als treballs del grup del Dr. James Giovannoni (*Boyce Thompson Institut for Plant Research, Cornell University*) tant de la varietat de tomàquet *Ailsa Craig* com de diferents mutants de maduració (Alba *et al.* 2005). També es remarcable l'existència de la base de dades *Tomato Funcional Genomics Database* <http://ted.bti.cornell.edu/> on es troben les dades d'expressió de mRNAs en diferents parts i estadis de desenvolupament i maduració del fruit, generades a partir d'*arrays* i els diagrames d'expressió digital de diferents gens en les condicions estudiades. Finalment, indicar també l'existència de bancs de llavors, com ara el *Tomato Genetics Resource Center* (TGRC, <http://tgrc.ucdavis.edu/>), on es poden obtenir varietats i mutants de tomàquet amb característiques especials o bé afectades en una gran varietat de processos.

### 3. Maduració del fruit del tomàquet.

El tomàquet es considerat també el model clàssic per l'estudi de la maduració dels fruits climatèrics al requerir de la producció d'un pic d'etilè associat a un pic de respiració (producció de CO<sub>2</sub>) per a poder completar el conjunt de transformacions que es produeixen durant la maduració (Nath, et al. 2006).

Existeixen tres etapes en la maduració climatèrica. En la primera, denominada pre-climatèrica, el fruit es prepara acumulant tota una sèrie de precursors metabòlics. L'etapa central, coneguda com etapa climatèrica, es considera l'inici de la maduració pròpiament dita i és quan es produeixen els esmentats pics d'etilè i de respiració que indueixen tota una sèrie de canvis irreversibles. Aquests canvis condueixen a l'etapa post-climatèrica en la que es produeixen canvis en el color (síntesi de carotenoides), sabor (acumulació de sucres i àcids orgànics), aroma (producció de volàtils), textura i, finalment, la senescència del fruit. En la Figura I 1 es mostren els principals canvis que es produeixen durant la maduració del fruit del tomàquet.

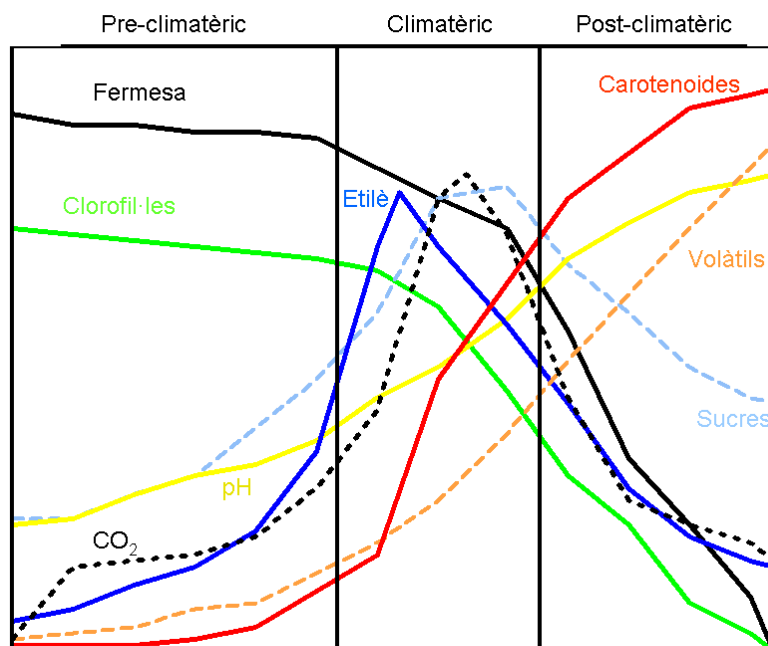


Figura I 1 Representació dels canvis en diferents paràmetres durant la maduració climatèrica, adaptat de Nath, et al. (2006).

### 3.1 Efecte de l'etilè en la maduració

Malgrat que està ben establert el paper essencial de l'etilè en la maduració del fruit del tomàquet, en l'actualitat es té encara un coneixement relativament limitat sobre les bases molecular de la resposta del fruit a aquesta hormona (Giovannoni 2007).

Si bé és en les etapes climatèrica i post-climatèrica quan s'observen els canvis més importants en la maduració, és en la fase final de l'etapa pre-climatèrica quant s'inicien els primers canvis que influiran de forma crítica en la maduració, entre ells l'expressió dels receptors de membrana de resposta a etilè *SlETR3* (o NR) i *SlETR4* (Tieman *et al.* 2000).

Les respostes generades per l'etilè són complexes i actualment es coneixen únicament les etapes clau. Dels dos receptors relacionats, *SlETR3* conté un seguit de canvis aminoacídics que provoquen que no sigui capaç de trasduir senyal al interaccionar amb etilè extracel·lular. A diferència de *ETR4* que al ser activat per etilè extracel·lular transdueix la senyal a través de cascades de fosforitzacions provocant la inhibició del factor de transcripció EIN2 (Ethylene insensitive 2) el que inhibeix les primeres etapes de la maduració.

Per altre costat, la interacció de l'etilè intracel·lular amb el receptor *SlETR3* promou l'activació d'una via de senyalització que afecta als factors de transcripció EIN2 i APETALA2a (Bapat *et al.* 2010, Karlova *et al.* 2011), els quals transloquen al nucli i promouen l'activació d'altres factors de transcripció com EIN3 (Ethylene insensitive 3), ERF1 (Ethylene response factor 1) i altres homòlegs (EIN3-like) (Leclercq *et al.* 2005, Lin *et al.* 2009) (Figura I 1) que indueixen l'expressió dels gens primerencs de maduració. Els productes d'aquests gens activen o inhibeixen a la seva vegada un conjunt de gens, que no necessàriament responen a l'etilè, que promouen ràpids canvis metabòlics i bioquímics en el fruit (Klee i Giovannoni 2011) (Figura I 2). El conjunt d'aquest canvis comporten que la maduració, un cop activada posteriorment al pic d'etilè, sigui un procés irreversible i segueixi fins a la senescència del fruit (Bapat, *et al.* 2010, Giovannoni 2007).

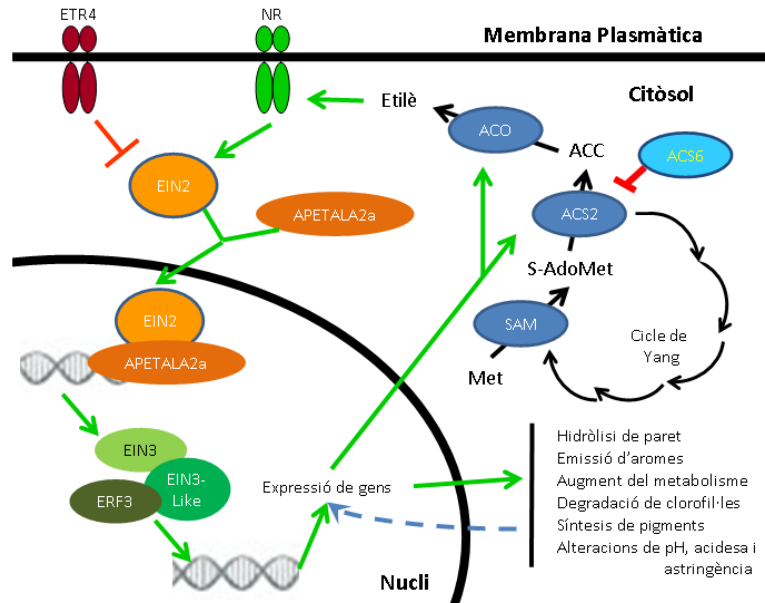


Figura I 2. Resum del model de senyalització en la maduració. Marcades en vermell les inhibicions; en fletxes verdes les activacions, en blaves les activacions indirectes i en negre les activitats catalítiques

### 3.2 Biosíntesis de l'etilè en la maduració

Un dels primers processos relacionats amb l'inici de la maduració del fruit és la inducció dels gens implicats amb la síntesi de l'etilè, procés en el qual s'ha proposat la participació de diferents factors de transcripció com HB-1, RIN i TAGL1 (Itkin *et al.* 2009, Ito *et al.* 2008, Lin, *et al.* 2009).

La síntesi d'etilè té lloc a través de tres reaccions enzimàtiques a partir de l'aminoàcid metionina. El primer intermediari és la S-adenosil-metionina (S-AdoMet) i es genera a través del cicle de Yang (Figura I 2). En la segona etapa, la S-AdoMet és transformada en 1-aminociclopropà-1-carboxilat (ACC) per l'enzim ACC sintasa (ACS). En l'etapa final es sintetitza l'etilè a partir d'ACC per acció de l'ACC oxidasa (ACO) (Nath, et al. 2006). Les diferents etapes de la síntesi d'etilè es mostren en la Figura I 2. En el tomàquet existeixen diferents isoformes de ACS i ACO. No obstant, en el fruit només s'expressen unes isoformes específiques, sent la ACS2 i la ACO2 les implicades principalment en la síntesi de l'etilè climatèric. No obstant, en l'etapa climatèrica s'expressa també la isoforma ACS6 que és considerada com un regulador *feedback* negatiu de la síntesi d'etilè (Nakatsuka *et al.* 1998).



Els enzims implicats en la síntesi de l'etilè estan fortament regulats (Nath, et al. 2006). Així, està descrit que mentre que reguladors del creixement com l'àcid jasmònic (JA) (Creelman i Mullet) i l'àcid abscísic (ABA) (Zhang et al. 2009) indueixen l'expressió de l'ACS i l'ACO, altres, com l'àcid salicílic (SA) (Leslie i Romani 1988) i l'òxid nítric (NO) (Manjunatha et al. 2010), la disminueixen. No obstant, en la regulació de la síntesi d'etilè semblen estar implicats també altres factors com cascades de fosforilació (Lin, et al. 2009) o la inhibició al·lostèrica per NO en els dominis de S-nitrosilació de la ACO (Manjunatha, et al. 2010). Un altre nivell de regulació sembla estar relacionat amb l'augment dels nivells de la isoforma ACS6 en resposta al SA (Ding i Wang 2003). Encara que no s'han relacionat directament en la síntesi d'etilè, les auxines i les citoquinines poden generar el bloqueig de la maduració (Srivastava i Handa 2005). Tanmateix, i encara que tampoc s'han relacionat amb la síntesi d'etilè, s'ha descrit que la maduració del fruit està també regulada per brassinoesteroides, poliamines i sucres (Nath, et al. 2006, Srivastava i Handa 2005).

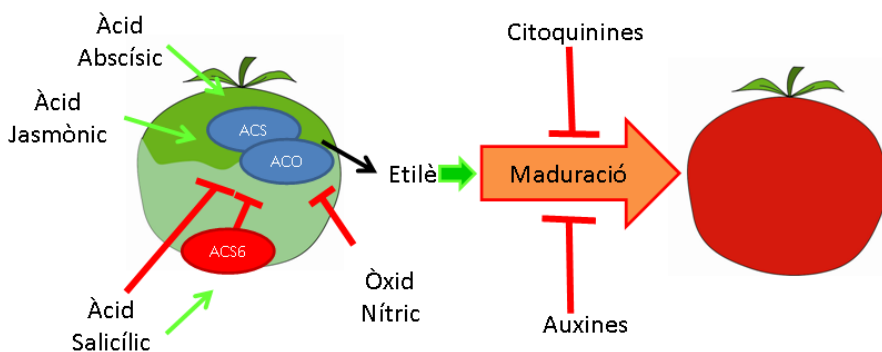


Figura 1.3. Representació esquemàtica de l'efecte de diferents fitohormones en la maduració. Les línies vermelles indiquen inhibició i les verdes activació.

#### 4. El cromoplastes

Els cromoplastes són plastidis especialitzats en la síntesi i acumulació de carotenoides i es troben generalment en fruits, flors, llavors i arrels. Els cromoplastes es formen a partir de plastidis preexistents tals com els cloroplasts o els amiloplasts (Thomson i Whatley 1980). Mostren una gran diversitat morfològica i s'han classificat en diferents

tipus segons la seva forma i tipus d'estructures suborgànul·lars (Camara *et al.* 1995). Els cromoplastes del fruit del tomàquet són de tipus cristal·lí i difereixen clarament dels del fruit del pebrot (de tipus globular) i dels de les flors de *Narcissus* (tipus membranós), sent aquests dos últims els millor estudiats.

Durant la maduració del fruit del tomàquet, els cloroplasts es diferencien en cromoplastes fotosintèticament inactius (Bathgate *et al.* 1985). La transformació dels cloroplasts en cromoplastes es caracteritza per una ràpida degradació de l'aparell fotosintètic i la síntesi i acumulació massiva de carotenoides (Cheung *et al.* 1993). Diversos estudis han demostrat que els cromoplastes, a l'igual que els cloroplasts, acumulen polipèptids sintetitzats *de novo*, indicant que la transició dels cloroplasts a cromoplastes constitueix un procés de desenvolupament actiu i no un mer procés de senescència (Bathgate, *et al.* 1985, Lawrence *et al.* 1993).

Juntament amb la síntesi de carotenoides s'ha descrit recentment que els cromoplastes mostren també una síntesi de lípids molt activa (Angaman *et al.* 2012) que podria estar relacionada amb la generació d'un gran nombre d'estructures globulars i membranoses. Una de les noves estructures membranoses del cromoplast són els sacs membranosos, on s'ha proposat que és el lloc on preferentment s'acumula el licopè. Està àmpliament acceptat que la gran quantitat de licopè acumulada en l'interior d'aquesta estructura promou que el licopè formi cristalls (Figura I 4). Aquesta hipòtesi es basa en les propietats fisicoquímiques del licopè que fan que sigui soluble en les solucions de fixació i de rentat dels protocols de fixació de les mostres de microscòpia electrònica i que, per tant, s'extregui durant el processament de les mostres de forma prèvia a la seva observació (Egea *et al.* 2010, Harris i Spurr 1969).

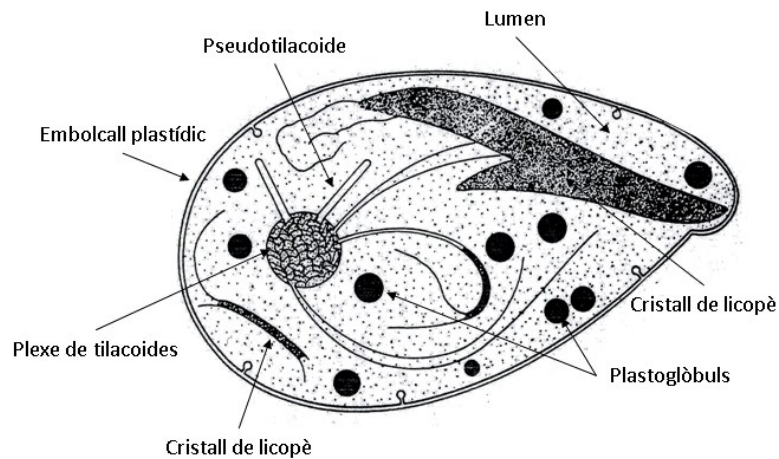


Figura I 4. Representació de la ultraestructura d'un cromoplast obtinguda per microscòpia electrònica. Figura adaptada de Harris i Spurr (1969).

Una altra estructura present en els cromoplastes en forma relativament abundant són els plastoglobuls (Figura I 4). La seva funció és la d'acumular diferents molècules de caràcter lipídic (Grennan 2008, Zbierzak *et al.* 2010). Malgrat que els plastoglobuls dels cromoplastes del fruit de tomàquet encara no han estat estudiats, en altres plastids s'ha descrit que acumulen  $\beta$ -carotè (Bréhélin *et al.* 2007) i en el cas d'*Arabidopsis thaliana* s'ha descrit l'acumulació de tocoferols i enzims implicats en la seva síntesi (Lundquist *et al.* 2012, Zbierzak, *et al.* 2010).

En l'actualitat es coneix molt poc sobre els senyals i els processos bioquímics subjacents a la diferenciació dels cloroplasts en cromoplastes.

## 5. Els carotenoides

Els carotenoides constitueixen el major grup de pigments presents en la naturalesa. Són molècules lipofíliques que pertanyen a la família dels tetraterpens (40C). La seva estructura bàsica és la d'una cadena hidrocarbonada amb múltiples dobles enllaços, podent o no estar ciclats en els seus extrems en forma d'anells de 6 carbonis. Les possibles ciclacions, saturacions o insaturacions d'enllaços, migracions de dobles enllaços,

isomeritzacions, oxidacions, epoxidacions, trencament de cadena o condensació, generen una immensa família de derivats.

La classificació dels carotenoides també es realitza en base a la seva estructura. Així, mentre que per un costat es troben els carotens, que no contenen oxigen, per altre hi han les xantofil·les que contenen d'almenys un àtom d'oxigen.

### **5.1 Importància biològica i nutricional dels carotenoides**

Els carotenoides tenen un paper essencial en la fotosíntesi com a pigments accessoris per a la captació de la llum, com estabilitzadors de la membrana dels tilacoides i com a fotoprotectors per prevenir el dany foto-oxidatiu. A més, proporcionen també coloració a flors i fruits, afavorint l'atracció d'animals per a la pol·linització i la dispersió de les llavors. En les plantes, els carotenoides actuen també com a precursors per a la síntesi de l'àcid abscísic i altres apocarotenoides amb activitat biològica (Bouvier *et al.* 2005). En els animals, es detecta la presència de carotenoides, com per exemple els que confereixen el color característic de molts ocells, insectes i invertebrats marins. Malgrat això, els animals no són capaços de sintetitzar-los i utilitzen els ingerits en la dieta.

Tenint en comte els seus colors, els carotenoides, tenen un gran interès com a colorants en la indústria alimentària. Però aquest no és l'únic interès dels carotenoides ja que, a més, tenen una àmplia i ben documentada gama d'activitats biològiques de gran rellevància per a la salut dels éssers humans (Fraser i Bramley 2004, Krinsky i Johnson 2005). Diversos carotenoides, incloent l' $\alpha$ -carotè, el  $\beta$ -carotè i la  $\beta$ -criptoxantina, tenen activitat provitamina-A en ser convertits en retinol pels mamífers. Degut a la seva intensa activitat antioxidant molts carotenoides tenen el potencial de prevenir certs tipus càncer, malalties cardiovasculars i processos degeneratius. Així, per exemple, la ingesta de licopè està associada amb la prevenció del càncer de pròstata i de malalties cardiovasculars (Arab i Steck 2000, Kelkel *et al.* 2011), mentre que el  $\beta$ -carotè es relaciona amb una menor incidència del càncer de pulmó i la prevenció de malalties (Fritz *et al.* 2011, Krinsky i Johnson 2005). S'ha descrit també que la luteïna i la zeaxantina són essencials per a la generació de la retina en mamífers i proporcionen protecció contra la degeneració macular relacionada amb l'edat (Lien i Hammond 2011, Wong *et al.* 2011). En el cas del licopè, s'ha suggerit recentment que el seu efecte beneficiós podria ser a causa dels licopenoides,

productes derivats de la seva metabolització en l'organisme i control reducció del estrès oxidatiu (Lindshield *et al.* 2007, Palozza *et al.* 2011).

El fruit del tomàquet i els seus derivats processats constitueixen la font principal de licopè a partir de la dieta ja que, en contrast amb la majoria de carotenoides, les fonts naturals d'aquest compost són limitades (Fraser i Bramley 2004). La concentració de licopè al fruit del tomàquet és per tant una característica important tant en la comercialització del tomàquet fresc com del processat. L'increment del contingut de licopè en el fruit representa per tant un objectiu important en els programes de millora del tomàquet.

## 5.2 Principals carotenoides i altres isoprenoides presents en el fruit de tomàquet

El licopè (Figura I 5) és el carotenoide més abundant en el fruit del tomàquet i representa el 85-90 % del contingut total (Fraser i Bramley 2004). La molècula, de quaranta àtoms de carboni, té un esquelet hidrocarbonat amb un alt grau d'insaturació, un característic color vermell i una gran activitat antioxidant, capaç de reaccionar de forma efectiva amb els radicals lliures i, d'aquesta manera, bloquejar el seu poder nociu (Rao i Rao 2007). A part, també se li atribueix la propietat de modular a diferents molècules implicades de la regulació del cicle cel·lular, fet que pot induir a la prevenció de determinades lesions canceroses (Rao *et al.* 2006).

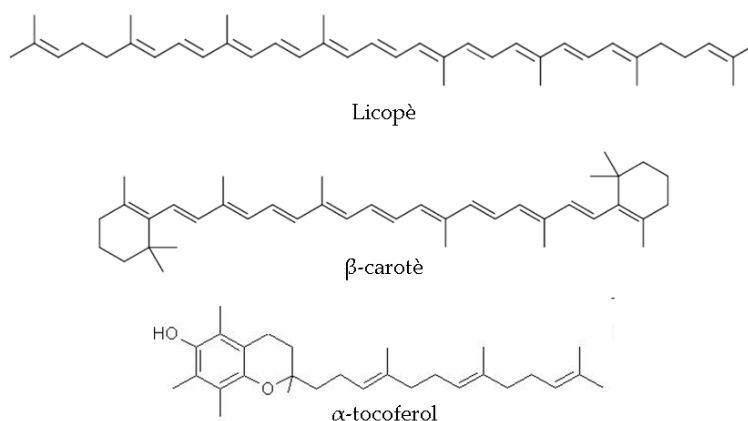


Figura I 5. Estructura química del licopè,  $\beta$ -carotè i  $\alpha$ -tocoferol.

El  $\beta$ -carotè, també conegut com a provitamina A (Figura I 5), és el segon carotenoide més abundant en el fruit del tomàquet, arribant a representar fins a un 10-15 % dels carotenoides totals. És beneficiós per l'organisme ja que pot ser metabolitzat a retinol (o vitamina A), un compost essencial per a determinats òrgans i de gran importància en el

procés de la visió (Ott i Lachance 1979). A part, el  $\beta$ -carotè s'ha relacionat també amb una menor incidència de càncer de pulmó i en la prevenció de malalties cardiovasculars (Fritz, *et al.* 2011, Krinsky i Johnson 2005).

Un altre compost important per la salut en el fruit del tomàquet és l' $\alpha$ -tocoferol, també conegut com a vitamina E (Figura I 5). La potent activitat antioxidant i el caràcter hidrofòbic doten a aquesta molècula de la capacitat d'acumular-se en zones lipídiques i, d'aquesta forma, aturar la progressió radicalària en llocs poc accessibles de la cèl·lula tals com les membranes (Cerecetto i Lopez 2007). En la sang es transporta amb els lípids, evitant la seva oxidació i, en conseqüència, prevenint la formació d'ateromes. A l'igual que el  $\beta$ -carotè també actua prevenint certs defectes oculars (Voutilainen *et al.* 2006).

### 5.3 Biosíntesi de carotenoides

A les plantes, totes les etapes de la biosíntesi de carotenoides tenen lloc en els plastidis mitjançant l'acció d'enzims importats des del citosol i codificats per gens nuclears (Hirschberg 2001). Igual que la resta dels isoprenoides, els carotenoides es sintetitzen a partir dels precursors de 5-carbonis isopentenil difosfat (IPP) i del dimetilal·lil difosfat (DMAPP) (Bouvier, *et al.* 2005).

Les plantes contenen dues vies metabòliques per a la síntesi d'IPP i DMAPP, la via del mevalonat (MVA), localitzada en el citosol i reticle endoplasmàtic, i la via del metileritritol 4-fosfat (MEP), localitzada en els plastidis (Rodríguez-Concepción i Boronat 2002) (Figura I 6). No obstant això, l'intercanvi d'IPP ("cross talk") entre les vies del MVA i del MEP ha estat descrit en diferents espècies vegetals i representa un nivell de complexitat addicional en l'organització i regulació de la biosíntesi d'isoprenoides en les plantes (Rodríguez-Concepción i Boronat 2002, Rohmer 2008, Tritsch *et al.* 2010) (Figura I 6).

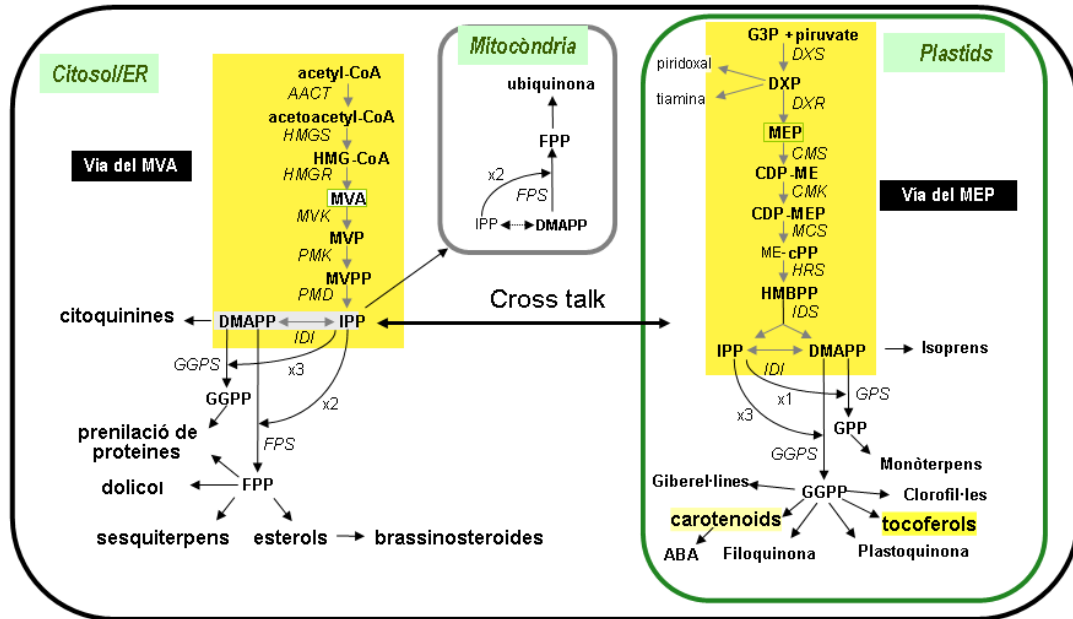


Figura I 6. Organització i compartimentació de la biosíntesi isoprenoides en les plantes. CDP-ME, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol; CDP-MEP, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfat; DMAP, dimetilalil pirofosfat; DXP, 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfat; FPP, farnesil difosfat; G3P, D-gliceraldeid-3-fosfat; GGPP, geranilgeranil difosfat; GPP, geranil difosfat; HMBPP, (E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enil difosfat; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim A; IPP, isopentenil pirofosfat; MEcPP, 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfat; MEP, 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat; MVA, mevalonat; MVP, 5-fosfomevalonat; MVPP, 5-difosfomevalonat. Els enzims són: AACT, acetoacetyl-CoA tiolasa; CMK, CDP-ME quinasa, CMS, CDP-ME sintasa; DXR, DXP reductoisomerasa; DXS, DXP sintasa; FPS, FPP sintasa; GGPS, GGPP sintasa; GPS, GPP sintasa; HDR, HMBPP reductasa. HDS, HMBPP sintasa; HMGR, HMG-CoA reductasa; HMGS, HMG-CoA sintasa; IDI, IPP isomerasa; MCS, MEcPP sintasa; MVK, MVA quinasa; PMD, MVPP descarboxilasa; PMK, MVP quinasa. ER, reticle endoplasmàtic. Adaptat de Rodríguez Concepción i Boronat (2002).

L'addició seqüencial de tres molècules d'IPP a una de DMAPP, catalitzada per l'enzim geranilgeranil difosfat (GGPP) sintasa (GGPS), resulta en la formació de GGPP (20-carbonis) (Figura I 7). En els plastids, el GGPP és el precursor d'una àmplia gama de isoprenoides a més dels carotenoides, incloent entre ells les gibberel·lines, i les cadenes laterals dels tocoferols, les clorofil·les i la plastoquinona (Bouvier, et al. 2005) (Figura I 6).

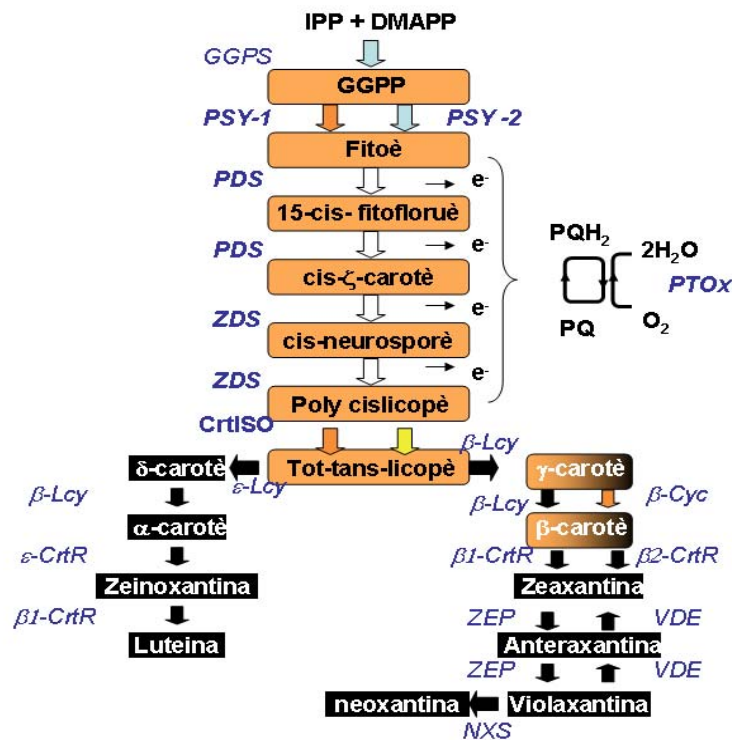


Figura 1 7. Biosíntesi de carotenoides en els teixits vegetatius i en el fruit de tomàquet. Els carotenoides presents a nivells detectables en el fruit tomàquet madur es mostren en color taronja i els que s'observen en els teixits vegetatius es mostren en color negre. Les fletxes taronges indiquen els enzims predominants en la maduració del fruit; les fletxes negres indiquen els enzims que predominen en els teixits vegetatius; les fletxes blanques indiquen els enzims presents en els dos casos; la fletxa groga indica una reacció no enzimàtica. GGPP, geranilgeranil difosfat ; GGPS, geranilgeranil difosfat sintasa; PSY-1, fitoè sintasa 1; PSY-2, fitoè sintasa 2; PDS, fitoè desaturasa; ZDS, ζ-carotè desaturasa; CrtISO, carotè isomerasa; β-Lcy, licopè β-ciclasa; β-Cyc, β-ciclasa cromoplastica; ε-Lcy, licopè ε-ciclasa; β1-CrtR, anell-β hidroxilasa; β2-CrtR, anell-β hidroxilasa-2; ε-CrtR, anell-ε hidroxilasa; NXS, neoxanthin sintasa; VDE, violaxantina de-epoxididasa; ZEP, zeaxantina epoxidasa; PQ/PQH2, Plastoquinona; PTOx, Oxidasa alternativa plastídica. Adaptat de Fraser i col·laboradors (2007)

El primer pas específic de la carotenogènesi és la conversió del GGPP en fitoé, un intermediari sense color de 40 àtoms de carboni, en l'estroma plastídica. Aquesta reacció, catalitzada per la fitoé sintasa (PSY) constitueix una de les principals etapes limitants de la via (Hirschberg 2001). Els carotenoides amb color deriven del fitoé mitjançant una sèrie de reaccions de dessaturació, ciclació i oxidació catalitzades per enzims localitzades en la membrana.

El fitoé és primàriament convertit en licopè mitjançant l'acció de dues desaturases (PDS i ZDS) i una isomerasa (CrtISO). Posteriorment, el licopè és convertit en α-carotè i β-



carotè per la  $\epsilon$ -licopè ciclasa ( $\epsilon$ -Lcy) i la  $\beta$ -licopè ciclasa ( $\beta$ -Lcy) (Figura I 7). A partir d'aquests compostos, la hidroxilació dels anells del  $\beta$ -carotè condueixen a la formació de zeaxantina, mentre que la hidroxilació dels anells  $\beta$ - o  $\epsilon$ -ionona de l' $\alpha$ -carotè resulten en la formació de luteïna (Figura I 7). Posteriors modificacions donen lloc a la formació de la gran diversitat de carotenoides presents a la naturalesa, amb més de 700 estructures identificades en l'actualitat (DellaPenna i Pogson 2006).

#### **5.4 Biosíntesi i acumulació de carotenoides durant la maduració del fruit del tomàquet**

Al inici de la maduració del tomàquet es comença a sintetitzar i acumular licopè i la seva concentració augmenta fins a 500 vegades en el fruit madur (Fraser *et al.* 1994). L'acumulació de licopè en el fruit del tomàquet es produeix com a conseqüència de la intensa activació de la PSY1 i la PDS associada a una forta disminució en l'activitat de les ciclasses que actuen sobre el licopè ( $\epsilon$ -Lcy i  $\beta$ -Lcy) (Hirschberg 2001) (Figura I 7). Com ja s'ha comentat anteriorment, a més del licopè, el fruit del tomàquet acumula també quantitats relativament menors de  $\beta$ -carotè. L'inici de la biosíntesi de carotenoides durant la maduració del fruit del tomàquet es correlaciona amb la inducció de gens que codifiquen enzims reguladores de la via del MEP com ara la desoxixilulosa 5-fosfat sintasa (DXS) (Lois *et al.* 2000) (Figura I 6).

Els mecanismes que regulen la biosíntesi de carotenoides durant la maduració del fruit del tomàquet difereixen dels que operen en els teixits fotosintètics (Hirschberg 2001). És per això que els coneixements adquirits en plantes model que no contenen cromoplastes, com *Arabidopsis*, són escassament aplicables a l'estudi de la regulació de la biosíntesi de carotenoides en el fruit del tomàquet. Tot i que està àmpliament acceptat que el control a nivell transcripcional és un dels mecanismes reguladors més importants en la biosíntesi del carotenoides en el fruit, s'ha proposat que la regulació post-transcripcional dels enzims carotenogènics es troba regulada per mecanismes feedback a través de productes finals de la via, jugant també un paper rellevant en aquest procés (Fraser i Bramley 2004). A part, està àmpliament acceptat que la via del MEP també juga un paper regulador important en la biosíntesi dels carotenoides (Astrakharchik *et al.* 2007, Boronat 2010, Botella-Pavia *et al.* 2004, Enfissi *et al.* 2005)

Un altre nivell de regulació en la síntesi de carotenoides es troba en les etapes on es produeixen dessaturacions, com les reaccions catalitzades per la PDS i la ZDS. Aquestes desaturases catalitzen la transferència de dos electrons a la plastoquinona. Aquest compost té la capacitat de desplaçar-se per la membrana i transferir els electrons a l'oxidasa terminal plastídica (PTOX) que, a la seva vegada, els transfereix a l'oxigen, el qual actua com acceptor final d'electrons (Figura I 7). Aquest procés, anomenat cromorespiració, es essencial per la síntesi de carotenoides (Barr *et al.* 2004). Aquest tipus de respiració es va detectar inicialment als cloroplasts on s'ha descrit la presència d'una activitat NAD(P)H deshidrogenasa que intervé en el procés i que, a més, sembla estar relacionada amb la PTOX i amb el complex de l'ATP sintasa (Peltier i Cournac 2002). També s'ha descrit que en vesícules de membrana aïllades de cromoplastes de flors de *Narcissus* el consum d'O<sub>2</sub> augmenta significativament en presència de NADPH, fet que indica l'existència de sistemes redox en els cromoplastes lligats al procés respiratori (Morstadt *et al.* 2002). Aquesta activitat sembla estar associada a la síntesi d'ATP (Angaman, *et al.* 2012).

Cal remarcar finalment, que l'estudi de l'emmagatzematge dels carotenoides en els plastidis ha rebut molt poca atenció en comparació amb els estudis metabòlics, bioquímics i moleculars relacionats amb la seva síntesi. No obstant això, aquest tema ha despertat un interès creixent en els darrers anys i s'han descrit algunes proteïnes que interaccionen amb carotenoides per formar estructures de tipus lipoproteic en cromoplastes de tipus fibril·lar i globular (Simkin *et al.* 2007, Vishnevetsky *et al.* 1999). D'altra banda és important ressaltar que hi ha molt pocs estudis que correlacionin la biosíntesi i l'acumulació dels carotenoides amb les estructures suborganelars presents als cromoplastes. Només recentment, s'ha descrit el paper dels plastoglòbuls en la biosíntesi de carotenoides en els cloroplasts de diverses espècies i en cromoplastes de fruit de pebrot (Bréhélin, *et al.* 2007, Lundquist, *et al.* 2012, Ytterberg *et al.* 2006, Zbierzak, *et al.* 2010). Malgrat tot, en el cas del tomàquet no es coneixen ni els mecanismes ni la naturalesa de les estructures implicades en l'acumulació dels carotenoides en els cromoplastes i en particular del licopè, el carotenoide majoritari en el fruit.



**Objectius**



## **Objectius**

Durant la maduració del fruit del tomàquet té lloc una síntesi molt activa de carotenoides, principalment licopè, que li confereixen la típica coloració vermella. En contrast amb els coneixements existents sobre la síntesi de carotenoides durant la maduració del fruit, en l'actualitat es coneix molt poc sobre els mecanismes implicades en la seva acumulació. Per aquest motiu en el present treball s'ha abordat la identificació i caracterització de proteïnes relacionades en l'acumulació de carotenoides en el fruit del tomàquet utilitzant dues aproximacions experimentals:

1. Identificació de RILs (derivades del creuament de *Solanum lycopersicum* amb *Solanum pimpinellifolium*) contrastants en el contingut en carotenoides i posterior anàlisi transcriptòmic dels gens expressats diferencialment.
2. Purificació de complexos proteïna-carotenoide a partir de cromoplastes de fruit de tomàquet i posterior identificació de les proteïnes associades mitjançant tècniques proteòmiques.



# Resultats





# ***Capítol I: Identificació de gens expressats diferencialment en RILs contrastants en el contingut de carotenoides i $\alpha$ -tocoferol i estudi del seu possible paper en el desenvolupament i maduració del fruit.***

## ***1. Anàlisi de RILs contrastants en el contingut de carotenoides i tocoferols.***

Part del treball desenvolupat en aquesta tesi s'emmarca en el context del Projecte ESP-SOL, finançat per Genoma España, i que tenia com a objectiu principal la identificació de factors, gens i mecanismes implicats en les característiques organolèptiques del tomàquet. Una de les tasques del nostre grup en el projecte va consistir en el perfilat dels nivells de licopè,  $\beta$ -carotè i  $\alpha$ -tocoferol del conjunt de les RILs ("Recombinant inbred lines") generades a partir del creuament de *Solanum lycopersicum* i *Solanum pimpinellifolium* en l'Estación Experimental "La Mayora" (CSIC).

Les RIL són organismes amb cromosomes que contenen de forma estable un conjunt de processos de recombinació entre cromosomes heretats de dos parents (Broman 2005). En el cas de les plantes el procés es realitza per autofecundació. En la primera etapa de la generació de les RILs es creuen dues línies parentals pures per obtenir la generació F1 totalment heterozigota. A partir de la generació F1 s'obtenen una sèrie de plantes filles (F2) que contenen cromosomes híbrids derivats de la recombinació meiótica dels cromosomes dels dos parents. A partir de les plantes de la F2 s'obtenen de forma seqüencial plantes filles de les generacions F3, F4, F5, etc. En cada generació incrementa el percentatge d'homozigosi. Així, seguint aquest procés, al cap de 6-8 generacions es pot arribar a l'homozigosi gairebé completa, obtenint-se plantes que presenten blocs d'al·lels alternatius derivats de cada un dels parents (Figura R 1) (Schneider 2005).

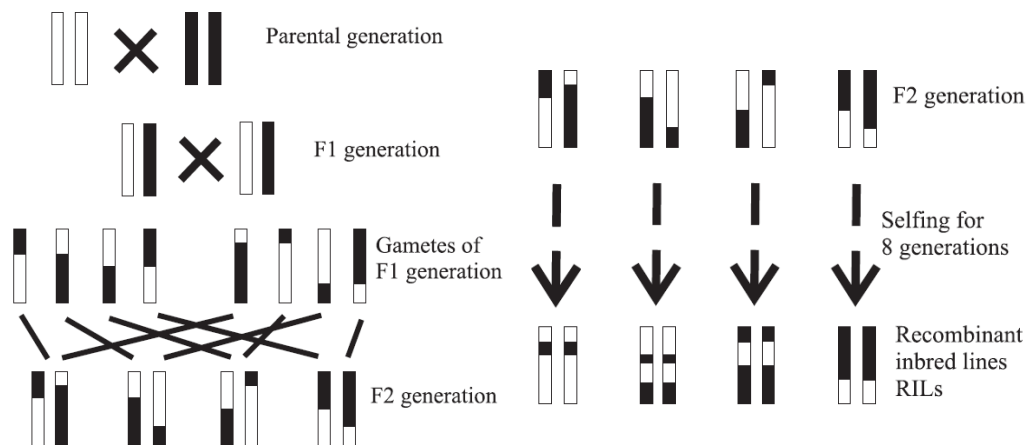


Figura R 1 Esquema de la generació de RILs. Al creuar els parents, els genotips dels quals són homocigots (representats per blanc i negre) es genera una població heterocigota F1. En la formació dels gàmits de la F1, el material genètic pateix meiosi donant lloc a esdeveniments de recombinació. En conseqüència, les plantes F2 varien en gran part en la seva constitució genètica. Per a la generació de les RILs, les plantes de la població F2 s'autofecunden de forma seqüencial. En cada nova generació es produeixen esdeveniments de recombinació meiótica fins a obtenir RILs homocigotes amb fragments alternatius del genoma dels dos parents (Schneider 2005).

Seguint aquest procés, en l'Estación Experimental "La Mayora" (CSIC) es va obtenir una col·lecció de 182 RILs independents propagades durant 8 generacions a partir de dues línies parentals de tomàquet amb característiques clarament diferenciades. Una de les línies parentals va ser la varietat comercial *MoneyMaker* (MM) de *Solanum lycopersicum*, que presenta una mida de fruit relativament gran i característiques organolèptiques agradables. A més, la planta és vigorosa i amb tiges gruixudes i resistents. L'altre línia parental utilitzada va ser *Solanum pimpinellifolium* (TO-937), que presenta uns fruits molt gustosos i intensament acolorits però de mida molt petita (veure més endavant). La planta presenta un creixement arbustiu amb tiges primes i molt ramificades.

### 1.1 Quantificació de carotenoides i tocoferols.

De forma prèvia al processament de les mostres de fruit de les RILs es va procedir a posar a punt el mètode d'extracció i quantificació de carotenoides i tocoferols descrit per Fraser *et al.* (2000). En quant a l'extracció dels carotenoides es va observar que la mescla cloroform-metanol (2:1) descrita per Fraser *et al.* (2000) no extreia completament els carotenoides de les nostres mostres. Alternativament es va provar la mescla hexà-acetona-metanol (2:1:1) descrita per Martínez-Valverde *et al.* (2002) que va permetre extreure un 40% més de licopè que la de cloroform-metanol indicada anteriorment (Figura R 2).

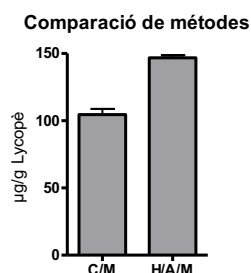


Figura R 2. Comparació dels dos mètodes d'extracció de carotenoides testats. C/M cloroform-metanol (2:1); H/A/M: hexà-acetona-metanol (2:1:1)

Un segon aspecte que es va optimitzar va ser el de l'eluent de càrrega de la mostra a l'HPLC. Així, després de comparar l'acetat d'etil, el metanol i el diclorometà es va observar que els millors resultats s'obtenien amb diclorometà (Figura R 3).

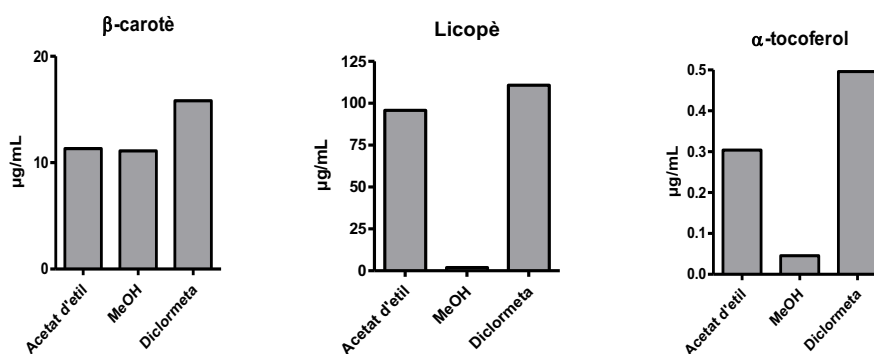


Figura R 3. Comparació dels solvents acetat d'etil, metanol i diclorometà com eluents de càrrega de mostra a la columna d'HPLC.

Un cop optimitzats el mètode d'extracció i l'eluent de càrrega de les mostres es va observar la detecció de licopè en mostres control que no en contenien. Es va comprovar que això era degut a una petita retenció de licopè en la columna a partir de les mostres analitzades prèviament. Per tal de solucionar aquest problema es va procedir a modificar la concentració final dels eluents durant gradient. Així, es va observar que l'augment de la concentració de metil ter-butil èter del 60% fins al 100% (Figura R 4) es va eliminar completament la retenció de licopè entre mostres.

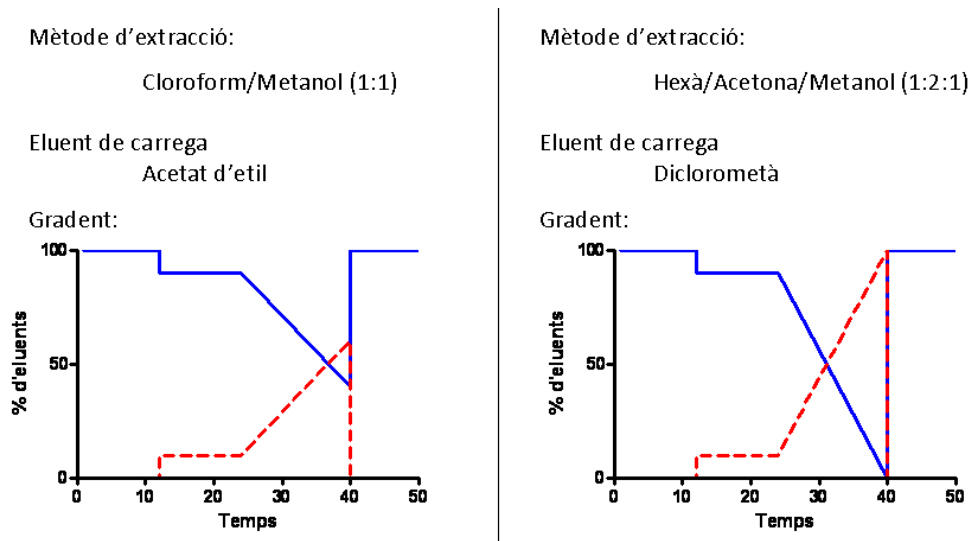


Figura R 4. Comparació del mètode d'extracció i anàlisi de carotenoides descrit per Fraser et al. (2000) (A) amb l'utilitzat en aquest treball (B). En blau es representa la Solució A [95:5 metanol/(0.2M acetat d'amoni en 20:80 aigua/metanol)] i en vermell la solució B (metil ter-butil èter).

Un cop optimitzats els paràmetres descrits anteriorment es va procedir a analitzar les mostres de fruit de les diferents línies RILs que es descriuen a continuació.

## 1.2 Anàlisi del contingut de carotenoides i $\alpha$ -tocoferol dels fruits de les RILs recol·lectats l'any 2005.

El material analitzat va correspondre a mostres de pericarp de les diferents RILs preparades en l'Estación Experimental "La Mayora" l'any 2005. També es van analitzar mostres corresponents als parentals *Solanum pimpinellifolium* (TO-937), *Solanum lycopersicum* varietat Moneymaker (MM) i l'híbrid F1. El material va ser enviat triturat i congelat en neu carbònica en vials individuals corresponents a 3-5 rèpliques biològiques per a cada RIL. Les mostres es van analitzar per duplicat utilitzant l'HPLC-PDA i seguint el protocol optimitzat segons s'ha indicat anteriorment i descrit en detall en l'apartat 4.2 i 4.3 de Materials i Mètodes.

Els resultats obtinguts van mostrar una gran variabilitat en el contingut de licopè,  $\beta$ -carotè,  $\alpha$ -tocoferol i de carotenoides totals en el conjunt de les mostres analitzades. Aquesta variabilitat va ser observada no només entre les diferents RILs sinó també, en alguns casos, entre les rèpliques biològiques corresponent a una determinada mostra.

En la Figura R 5 es mostren els histogrammes de distribució dels nivells de licopè,  $\beta$ -carotè, i  $\alpha$ -tocoferol de les diferents línies analitzades. Es pot observar que existeixen línies clarament contrastants per a tots els paràmetres analitzats.

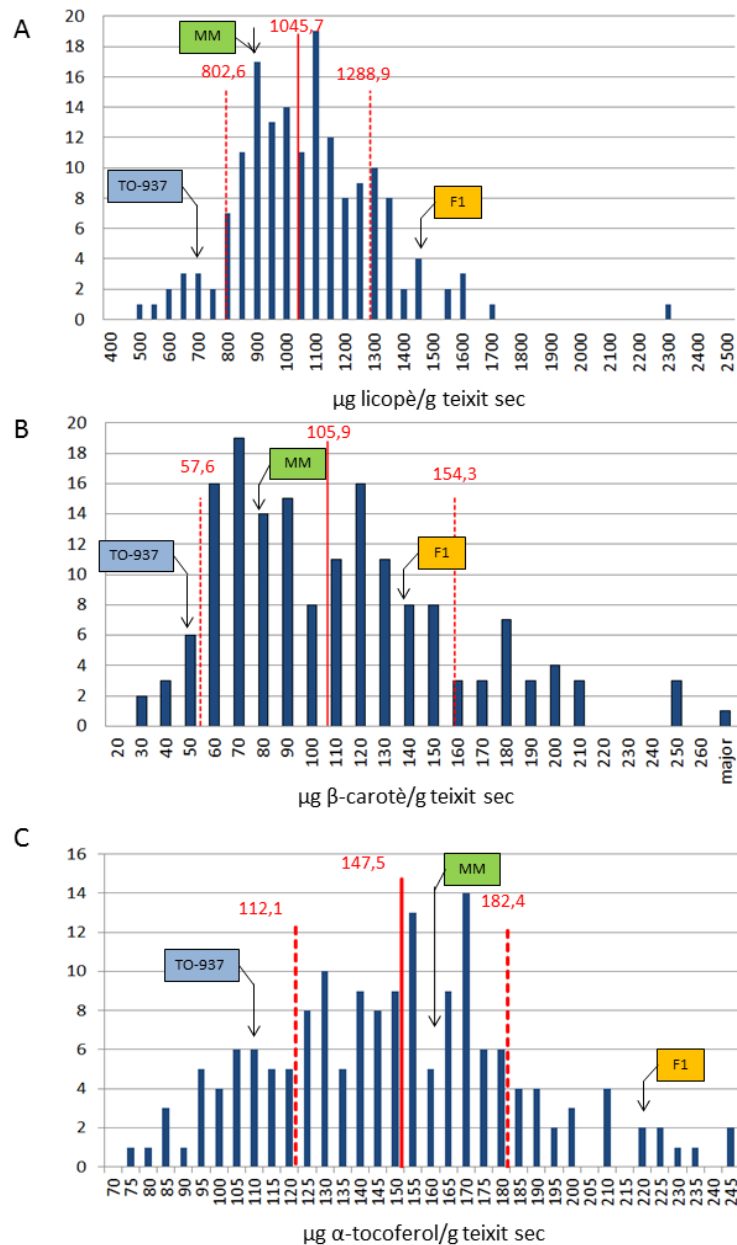


Figura R 5. Distribució de freqüència del contingut de licopè,  $\beta$ -carotè i  $\alpha$ -tocoferol de les línies analitzades. En l'eix de les Y s'indica el número de línies que presenten els nivells de licopè,  $\beta$ -carotè o  $\alpha$ -tocoferol corresponent als intervals de valors indicats en l'eix de les X. La línia vermella central indica el valor mig de tota la població. Les línies discontinue vermelles indiquen els límits dels valors  $\pm$  la desviació estàndard. S'indiquen també els valors dels parentals (MM i TO-937) i l'híbrid F1.

Els nivells de  $\beta$ -carotè van ser els que van mostrar una major variabilitat poblacional (diferències de fins a 9 vegades entre les línies més contrastants). Pel que fa al licopè i l' $\alpha$ -tocoferol, la variació dels nivells entre les línies més contrastats va ser significativament menor (3-4 vegades). Els nivells relatius de licopè obtinguts en la línia parental MM i en l'híbrid F1 va estar dins dels rangs previstos. Sorprenentment aquest no va ser el cas de TO-937, on els valors obtinguts van ser molt menors que els esperats. És interessant remarcar no obstant que la proporció relativa de licopè,  $\beta$ -carotè i  $\alpha$ -tocoferol va ser molt semblant entre aquestes línies (Taula R 1).

Línia	Licopè ( $\mu\text{g/g DW}$ )	$\beta$ -carotè ( $\mu\text{g/g DW}$ )	$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{g/g DW}$ )	Lyc/ $\beta$ car (%)	Lyc/ $\beta$ -car/ $\alpha$ -toc (%)
MM	981.3	95.8	163	91.1/8.9	79.1/7.7/13.1
TO-937	708.3	53.8	113.4	92.9/7.1	80.9/6.15/12.9
F1	1583.9	141.7	221	91.8/8.2	81.3/7.3/11.4

Taula R 1. Nivells de licopè,  $\beta$ -carotè i  $\alpha$ -tocoferol en fruits de *S. lycopersicum* var. Money maker (MM), *S. pimpinellifolium* (TO-937) i l'híbrid F1 (F1) en  $\mu\text{g/g}$  pes sec ( $\mu\text{g/g DW}$ ) en la campanya 2005.

### 1.3 **Caracterització histològica i citològica dels fruits de *S. pimpinellifolium* i *S. lycopersicum* cv *Money*maker.**

Tal com s'ha indicat anteriorment, els baixos nivells de carotenoides detectats en les mostres dels fruits de TO-937 van ser inesperats si es tenia en compte l'intens color vermell dels fruits. Aquest fet va fer pensar en la possibilitat que poguessin estar relacionats amb algun aspecte diferencial dels fruits de TO-937 respecte dels de MM i F1. Es per això que es va decidir fer un estudi histològic i citològic dels fruits de les varietats TO-937 i MM. Com s'ha indicat anteriorment, un dels aspectes diferencials més evidents entre els fruits de TO-937 i els de MM és la seva mida. Així, mentre que els de TO-937 tenen un diàmetre de 0,5 a 1,5 cm els de MM mostren un diàmetre de 5-8 cm.

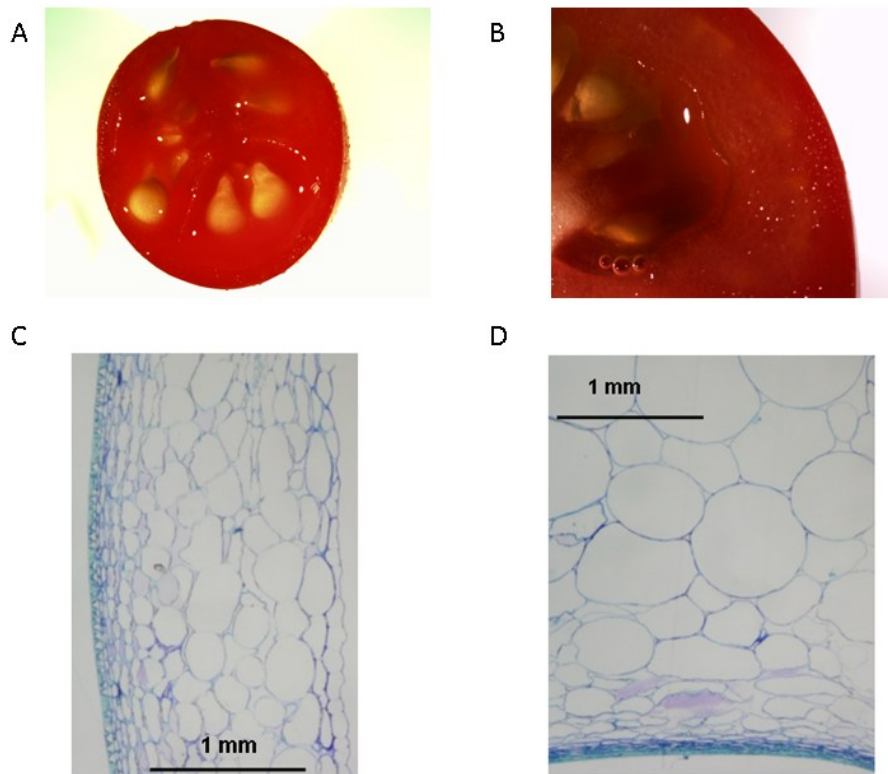


Figura R 6. Observació d'una secció dels fruits de TO-937 (A i C) i de MM (B i D). A i B, imatges obtingudes amb una lupa binocular. C i D, imatges de talls semifins tenyits amb blau de bromo fenol obtingudes amb un microscopi òptic.

L'observació al microscopi òptic de seccions de fruits de TO-937 i MM va mostrar una diferència molt gran en la mida de les cèl·lules del pericarp que es pot correlacionar clarament amb la mida del fruit (Figura R6). Tanmateix es va estudiar l'abundància i l'estructura dels cromoplastes en les cèl·lules del pericarp de les dues varietats mitjançant microscòpia electrònica. Els resultat obtinguts van indicar que els cromoplastes de TO-937 i de MM no mostren diferències significatives de mida, si bé, en el cas de TO-937 es freqüent observar que alguns cromoplastes es troben associats entre ells. No obstant, si es considerava la mida de les cèl·lules resultava evident que els cromoplasts de TO-937 ocupen un volum relatiu molt més gran.

En base a aquests resultats és va considerar que una de les raons que podria explicar els baixos nivells de carotenoides detectats en les mostres de TO-937 podria estar relacionada amb un menor contingut relatiu d'aigua dels fruits. De manera que la relació entre el pes sec i el pes fresc seria significativament més gran en TO-937 que en MM i F1.



Aquests resultats obrien, per tant, la possibilitat que els fruits de TO-937 tinguessin uns nivells de carotenoides superiors als de MM i F1 degut simplement al fet que el contingut de carotenoides s'havia calculat en relació al pes sec i no al pes fresc, fet que es va confirmar posteriorment tal com es descriu en l'apartat següent.

#### 1.4 Determinació de la relació pes sec / pes fresc de les mostres corresponents als fruits de les RILs recol·lectats l'any 2006.

A diferència de les mostres de l'any 2005, en les que els resultats es van calcular únicament en relació al pes sec (corresponent al material liofilitzat previ a l'extracció dels pigments), en les mostres del 2006 els nivells de carotenoides i tocoferol es van calcular tant en relació al pes sec com al pes fresc. L'estimació de la relació pes sec / pes fresc es va dur a terme mesurant (per triplicat) el pes d'alíquotes de les diferents mostres abans i després de la seva liofilització. Els resultats obtinguts van mostrar que els fruits de les línies parentals MM i TO-937 presentaven els valors extrems de la població, amb uns percentatges de pes sec del 6,0 % i del 16,4 %, respectivament (Figura R 7).

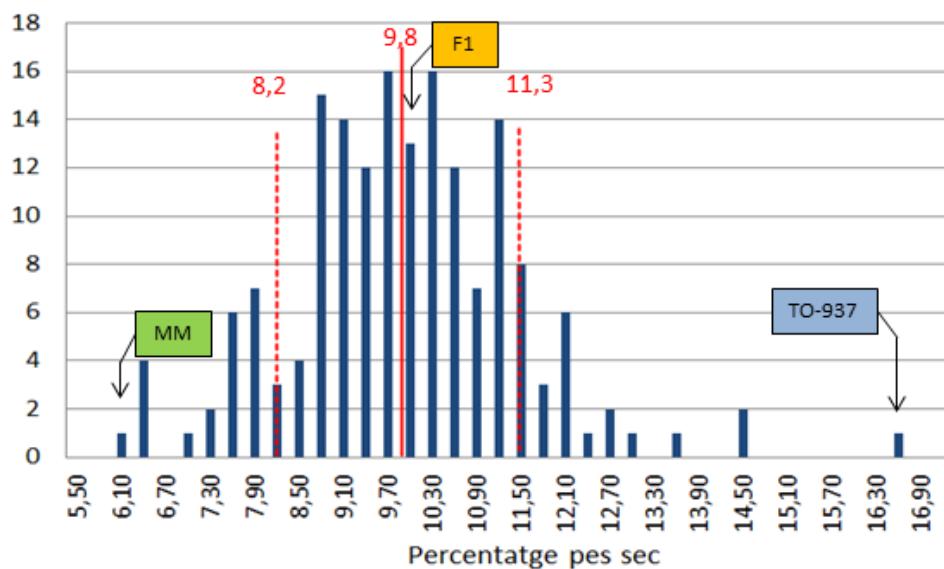


Figura R 7. Freqüència de distribució dels valors de pes sec (DW) de les línies analitzades en 2006. En l'eix de les X es representen els intervals de pes sec expressats com a percentatge (%). En l'eix de les Y s'indica el número de línies que nivells de pes sec corresponent als intervals de valors indicats en l'eix de les X. La línia vermella central indica el valor mig de tota la població. Las línies vermella discontinues indiquen los límits de los valores més/menys la desviació estàndard. Els requadres indiquen la posició de les línies parentals (MM i To-937) i de la F1 dins la distribució.

### 1.5 Anàlisi del contingut de carotenoides i $\alpha$ -tocoferol dels fruits de les RILs recol·lectats l'any 2006.

De forma similar a les mostres de l'any 2005, es van generar els histogrammes de la distribució dels nivells de licopè,  $\beta$ -carotè i  $\alpha$ -tocoferol de les diferents línies analitzades expressats però aquesta vegada en relació tant a pes sec com a pes fresc (Figura R 8). Els resultats obtinguts van mostrar una gran variabilitat en el contingut de licopè,  $\beta$ -carotè i  $\alpha$ -tocoferol en el conjunt de les mostres analitzades. De forma similar a les mostres del 2005, aquesta variabilitat no només es va detectar entre el conjunt de les línies sinó també en les replics biològiques de diverses línies.

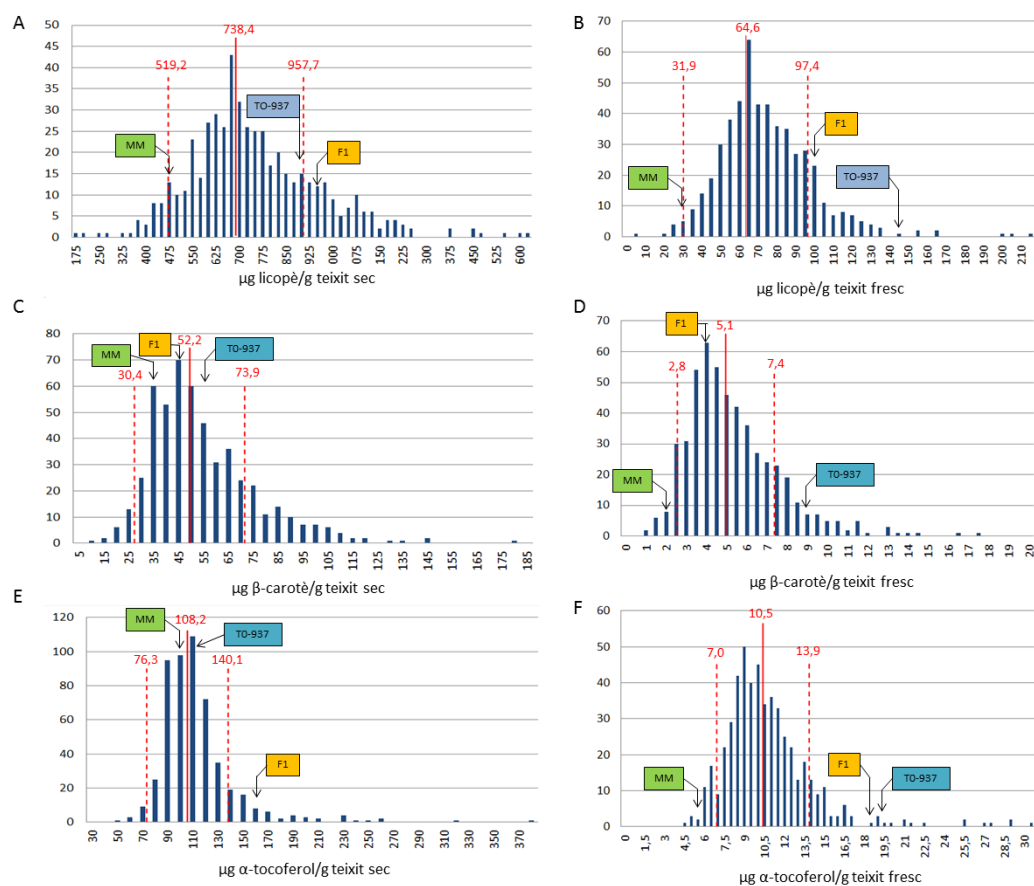


Figura R 8. Distribució de freqüència del contingut de licopè,  $\beta$ -carotè i  $\alpha$ -tocoferol de les línies analitzades en la temporada 2006 segons pes sec (A, C i E) i pes fresc (B, C i D). En l'eix de les Y s'indica el nombre de línies que presenten els nivells de licopè,  $\beta$ -carotè o  $\alpha$ -tocoferol corresponent als intervals de valors indicats en l'eix de les X. La línia vermella central indica el valor mig de tota la població. Les línies vermelles laterals indiquen els límits dels valors més/menys la desviació estàndard. S'indiquen també els valors dels parentals (MM i TO-937) i l'híbrid F1.

No obstant, per a tots els paràmetres analitzats es van detectar línies clarament contrastants respecte als valors mitjans de la població. Tal com s'ha indicat per les mostres del 2005, els nivells de  $\beta$ -carotè van presentar també major variabilitat que els de licopè i  $\alpha$ -tocoferol. En el cas particular de les línies parentals MM i TO-937 i de l'híbrid F1 els valors dels nivells de carotenoides i  $\alpha$ -tocoferol es mostren en la Taula R 2. Es pot observar que els nivells relatius de licopè,  $\beta$ -carotè i  $\alpha$ -tocoferol diferien significativament en funció de si els resultats s'expressaven en relació a pes sec o a pes fresc.

Línea	Pes fresc (FW)				Pes sec (DW)			
	Lyc	$\beta$ -car	$\alpha$ -toc	Total	Lyc	$\beta$ -car	$\alpha$ -toc	Total
To-937	145,3	9	19,7	174,1	917,6	55,3	124,4	1097,3
F1	103,5	5	17,6	126,1	992,6	47,9	169,3	1209
MM	29	2,2	5,9	37,2	482,9	36,8	98,8	618,6
Mitja poblacional	46,6	5,1	10,5	87,7	738,4	52,2	108,2	899,7

Taula R 2. Nivells de licopè,  $\beta$ -carotè i  $\alpha$ -tocoferol de les línies Parentals MM, To-937 i la corresponent F1 (mostres 2006). Valors expressats en  $\mu\text{g/g}$ .

Amb les dades obtingudes de les mostres del 2005 i del 2006 es van realitzar un conjunt d'anàlisis comparatives que van permetre identificar diferents línies contrastants per a un o més dels paràmetres avaluats. Per una part es van representar els valors (expressats en pes sec) obtinguts en les anàlisis del 2005 respecte de les del 2006. Per altre banda, es van representar també els valors de les anàlisis del 2006 en relació amb les del 2005 expressats en pes fresc extrapolant els valors de pes sec de les mostres del 2006. Excepte casos puntuals, les diferents representacions mostren un comportament molt similar del conjunt de les línies. La Figura R 9 mostra a nivell il·lustratiu els valors de carotenoides totals en les comparatives de pes sec i pes fresc.

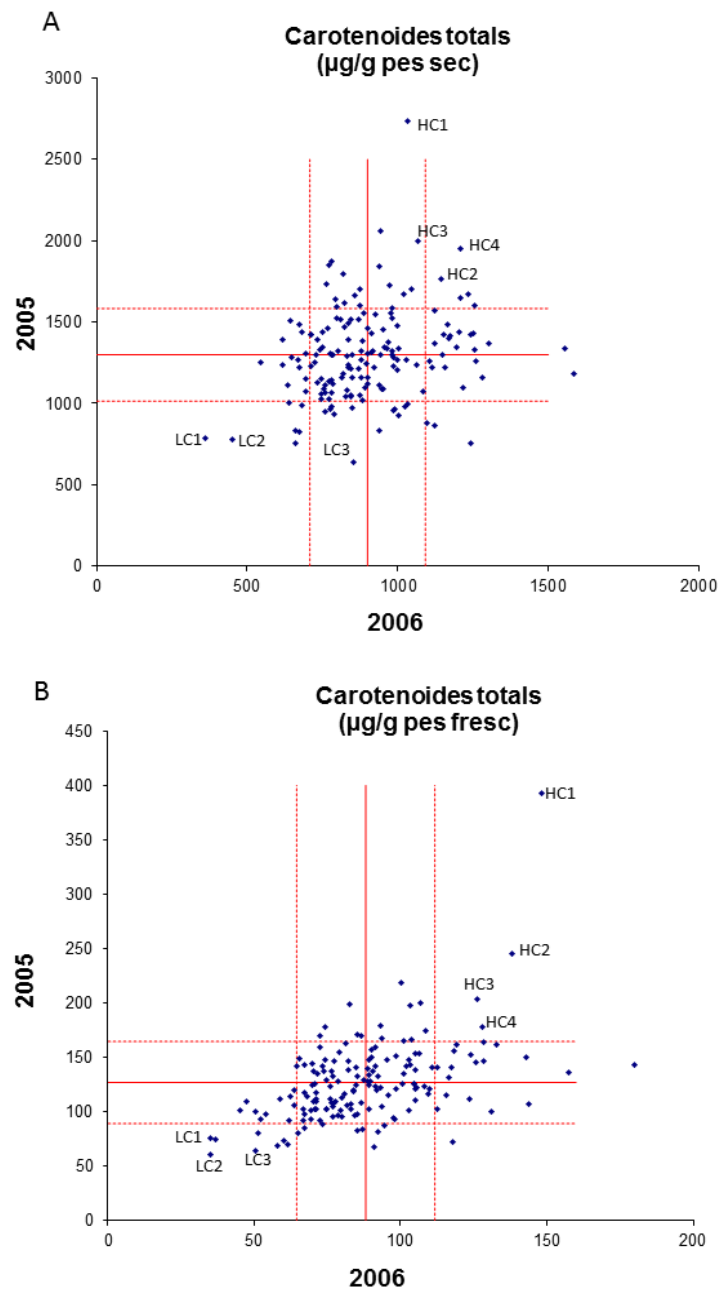


Figura R 9. Representació dels valors de carotenoides totals de les mostres de 2005 vs 2006. (A) Valors expressats en µg/g DW. (B) Valors expressats en µg/g FW extrapolant els valors de pes fresc de les mostres de 2006 a les de 2005. Les línies vermelles centrals indiquen el valor promig de cada població. Les línies vermelles discontinues indiquen els límits de les desviacions estàndard. Marcats en els gràfics la posició de les línies contrastants.

L'anàlisi de la distribució del conjunt de les RILs analitzades va permetre identificar una sèrie de RILs contrastants que, de forma consistent, presentaven nivells elevats o disminuïts de licopè,  $\beta$ -carotè i  $\alpha$ -tocoferol (Taula R 3 i Taula R 4). Totes aquestes línies estan incloses en els quadrants superior dret i inferior esquerre, externs als valors superior i inferior de les desviacions estàndard, respectivament (Figura R 9).

En base als resultats obtinguts, i per tal de seguir amb els experiments que es descriuen en el següent apartat, es van escollir com a RILs contrastants 4 línies d'alt contingut en carotenoides i 3 línies de baix contingut (Taula R 3 i Taula R 4, respectivament). El criteri utilitzat per a seleccionar aquestes línies va ser que fossin contrastants en els diferents caràcters estudiats en les dues temporades. Les línies escollides es van denominar HC1, HC2, HC 3 i HC4 (amb alt contingut de carotenoides) i LC1, LC2 i LC3 (baix contingut de carotenoides).

Línea	$\mu\text{g/g FW}$				$\mu\text{g/g DW}$				%DW
	Lyc	$\beta$ -car	$\alpha$ -toc	Total	Lyc	$\beta$ -car	$\alpha$ -toc	Total	
HC1	124,1	8,9	14,8	148	872,1	56,4	104	1032,8	14,37
HC2	113,9	10,3	13,7	138	801,9	72,5	96,6	970,9	14,22
HC3	79,4	12,4	13,4	105	631,3	98,8	107	836,5	12,56
HC4	78,9	9,3	11,9	100	742,7	87,1	113	953,4	10,64

Taula R 3. Línies RILs contrastants que presenten elevats nivells de licopè,  $\beta$ -carotè i/o  $\alpha$ -tocoferol respecte pes fresc (FW) i pes sec (DW).

Línea	$\mu\text{g/g FW}$				$\mu\text{g/g DW}$				%DW
	Lyc	$\beta$ -car	$\alpha$ -toc	Total	Lyc	$\beta$ -car	$\alpha$ -toc	Total	
LC1	22,2	3,6	9,3	35	230	37,2	96	362,8	9,67
LC2	27,6	1,45	5,9	35	355	18,8	74,9	448,8	7,82
LC3	41,1	2,75	6,3	50,2	678	45	103,3	826,5	6,11

Taula R 4. Línies RILs contrastants que presenten baixos nivells de licopè,  $\beta$ -carotè i/o  $\alpha$ -tocoferol respecte pes fresc (FW) i pes sec (DW).

## **2. Anàlisi transcriptòmic de les RILs contrastants mitjançant *microarrays*.**

Un cop seleccionades les RILs contrastants, i en col·laboració amb el grup del doctor Antoni Granell (*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas* del CSIC), es van realitzar anàlisis transcriptòmics de mostres de RNA de fruits d'aquestes línies utilitzant *microarrays*. Per aquestes anàlisis es va utilitzar l'*array* Tom2, constituït per 11.000 oligonucleòtids provinents de seqüències d'EST de la base de dades de *Sol Genomics Network* de la Universitat de Cornell (<http://solgenomics.net/>) i té associat la base de dades *Tomato Functional Genomics* (<http://ted.bti.cornell.edu/>) amb la informació de seqüències, anotacions i resultats d'expressió en diferents condicions.

Com a part del disseny experimental, i per tal de poder comparar el conjunt de les RILs seleccionades es va procedir a comparar els resultats obtinguts per a cada una de les RILs contrastants respecte del parental MM. L'avantatge d'utilitzar MM com a referència comú era que minimitzava la quantitat de *microarrays* a realitzar, ja que posteriorment permetia analitzar el conjunt de les possibles combinacions.

En base a aquest disseny experimental, es va procedir a determinar els trànscripats que es trobaven expressats diferencialment entre les línies contrastants amb elevats nivells de carotenoides (HC1, HC2, HC3 i HC4) i les que presentaven baixos nivells (LC1, LC2 i LC3). El valor de tall utilitzat per considerar els RNAs expressats diferencialment, ja fos a l'alça o a la baixa, va ser de 2,5 vegades.

Els perfil dels RNAs de les línies HC1, HC2, HC3 i HC4 van ser comparats de forma individual amb els de cada una de les línies LC1, LC2 i LC3. En el conjunt de gens expressats diferencialment entre cada RIL HC respecte cada LC es van detectar una població de 384 RNAs que presentaven una expressió diferencial de 2,5 vegades en una o més de les comparatives. En el conjunt de RNAs es van obtenir 137 mRNA implicats en metabolisme, 65 factors de transcripció i unió a DNA, 42 amb hormones, 30 amb defensa, 27 cinases, 13 transportadors de membrana, 9 estructurals i 4 de vesiculació. Desafortunadament, 57 mRNA actualment romanen sense identificar al no trobar-se

similitud de seqüència coneguda. Entre aquesta població sols es va detectar un gen relacionat amb la biosíntesis de carotenoides. Aquest gen, la geranyl-geranyl fosfat sintasa (GGPS), presentava una lleugera inducció en la RIL LC2 respecte totes les HC.

Davant de tota aquesta població de RNAs es va procedir a cercar quins d'ells presentaven una expressió més diferencial no solament entre cada parell de comparatives entre una HC i una LC, sinó en el conjunt de la població. Per aquest motiu es va procedir a comparar els nivells de trànscrips que s'expressaven diferencialment en cada una de les línies HC1, HC2, HC3 i HC4 respecte el conjunt de les línies LC1, LC2 i LC3. Això va permetre identificar conjunts de trànscrips que, tal com es mostra en els diagrames de Venn de la Figura R 10, s'expressaven diferencialment en cada cas.

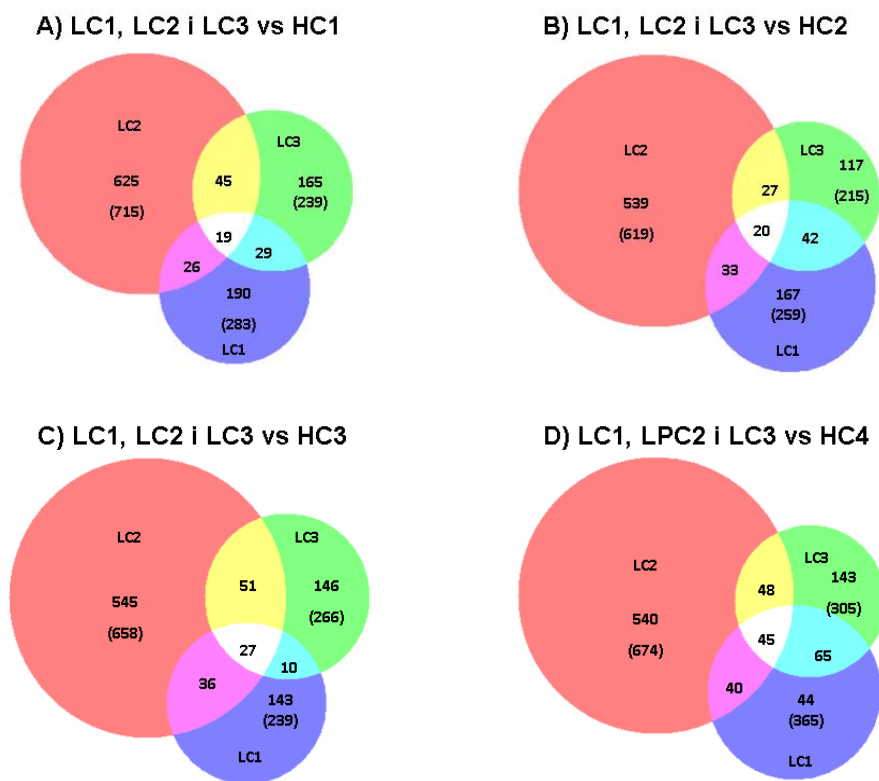


Figura R 10. Diagrames de Venn que mostren el nombre de trànscrips expressats de forma diferencial al comparar del conjunt de les tres línies contrastants amb baix contingut de carotenoides (LC1, LC2 i LC3) respecte de cada una de les línies d'alt contingut (HC1, HC2, HC3 i HC4). Cada cercle representa el número de trànscrips detectats en la comparativa de la línia d'alt contingut en relació amb cada una de les de baix contingut. Entre parèntesi s'indica el nombre total de trànscrips detectats en cada comparativa. Cada cercle es troba dividit en 4 sectors. En els sectors no solapants s'indiquen el nombre de trànscrips diferencials entre cada una de les línies d'alt contingut respecte de les de baix contingut (Blau, LC1 vs HC; Vermell, LC2 vs HC; i Verd, LC3 vs HC). En els sectors solapants entre dos cercles s'indica el nombre de trànscrips comuns entre dues línies de baix contingut respecte de la d'alt contingut (Lila, LC1 i LP2 vs la corresponent HC; Groc, LC1 i LC3 vs la corresponent HC; i Blau cel, LC1 i LC3 vs la corresponent HC). Finalment, en el sector blanc central s'indica el nombre de trànscrips comuns en les tres línies de baix contingut respecte de cada una d'alt contingut.

Seguidament es va analitzar si existien gens que s'expressessin diferencialment entre totes les línies amb alt contingut de carotenoides i totes les de baix contingut. Així, quan es van creuar els conjunts de gens corresponents als sectors blancs dels diagrames mostrats en la Figura R 10 i es van identificar dos transcrits amb aquestes característiques (Figura R11). Es tractava dels corresponents als unigens sgn-U216160 i sgn-U220026, que codifiquen per proteïnes anotades en la base de dades <http://solgenomics.net/> com "Salicylic Acid-Binding Protein 2 [*Nicotiana tabacum*] / Esterase, Putative Similar To Ethylene-Induced Esterase" i "Transducin Family Protein / WD-40 Repeat Family Protein [*Arabidopsis thaliana*]", respectivament,. Els dos transcrits mostraven menors nivells d'expressió en les línies d'alt contingut de carotenoides respecte de les de baix contingut, amb una variació de 4,6 vegades en el cas de l'unigen sgn-U216160 i de 3,7 vegades per l'unigen sgn-U220026.

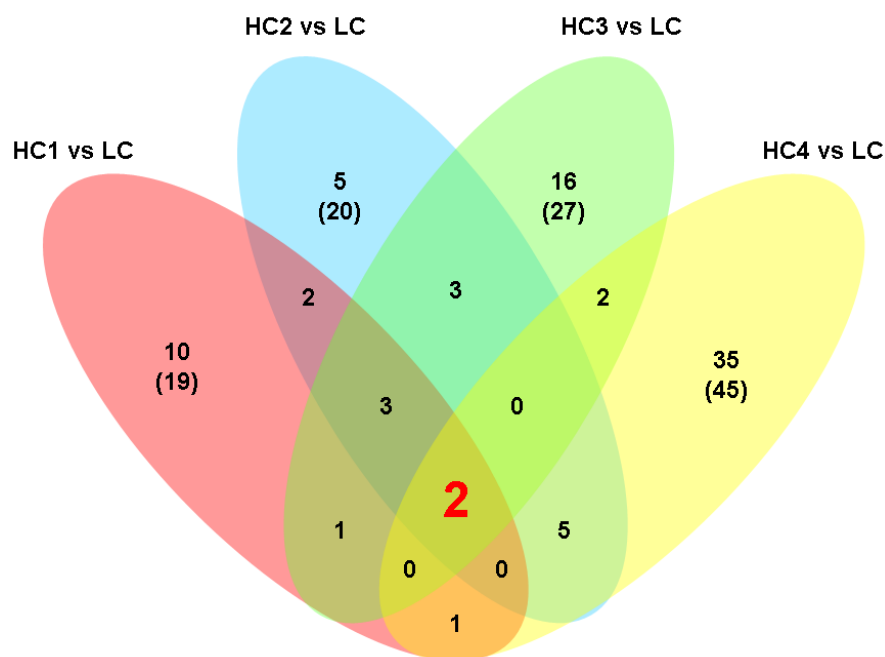


Figura R 11. Diagrama de Venn per a 4 variables representant el nombre de transcrits contrastants comuns entre els detectats en cada una de les comparacions de les línies amb alt contingut de carotenoides (HC1, HC2, HC3 i HC4) respecte de les de baix contingut (LC1, LC2 i LC3). Cada el·lipse representa el nombre de transcrits diferencials detectats en cada línia d'alt contingut respecte de totes les de baix contingut (Vermell, HC1 vs totes les LC; Blau, HC2 vs totes les LC; Verd, HC3 vs totes les LC; i Groc, HC4 vs totes les LC). Es presenta entre parèntesis el nombre total de transcrits detectats en les comparatives mostrades en la Figura R10. En cada solapament s'indica el nombre de transcrits comuns.



Es van detectar també alguns trànscrips que s'expressaven diferencialment entre tres de les línies d'alt contingut de carotenoides respecte de les de baix contingut. Aquest transcrits corresponen als següents unigens: sgn-U217449 (Putative Homology: p53), sgn-U214782 (Expressed Protein [*Arabidopsis thaliana*]) i sgn-U217177 (Proline Synthetase Associated Protein -Related). Per tal de no perdre possibles gens expressats diferencialment, es va realitzar el mateix procés però comparant les línies LP respecte HP. Com era d'esperar, es van obtenir els sgn-U220026 i sgn-U216160 expressats en totes les comparatives. Però també es van detectar els gens sgn-U215748 (Expansin-Related Protein 1-Like) i sgn-U227393 (Clathrin Coat Assembly Protein -Related) expressats en totes les HC respecte 2 línies LC. Malgrat l'interès potencial d'alguns d'aquests gens, en el present treball s'ha abordat únicament l'estudi dels unigens i sgn-U220026 i sgn-U216160 indicats anteriorment.

### **3. Caracterització de l'unigen sgn-U220026.**

En el moment d'analitzar els resultats del *microarray* Tom2, l'unigen sgn-U220026 estava anotat com a corresponent a la "Transducin Family Protein / WD-40 Repeat Family Protein [*Arabidopsis thaliana*]". Aquest unigen codifica per una proteïna de 161 aminoàcids que mostra similitud amb l'extrem C-terminal d'una sèrie de proteïnes d'*Arabidopsis*, arròs, raïm, ricí i pollancre (Taula R 5 i Figura R 12). Cal indicar però que totes les proteïnes indicades provenen de prediccions de gens a partir de la seqüenciació dels corresponents genomes. Excepte en el cas de pollancre, la resta de proteïnes predites semblen ser anormalment grans (entre 1546 i 1766 aminoàcids), fet que va fer pensar que l'unigen sgn-U220026 codificava per una versió truncada de les proteïnes homòlogues anotades en altres espècies.

Organisme	Nom	Proteïna (en aa)	Identitat	similitud
Tomàquet	SGN-U220026	161		
<i>Vitis vinifera</i>	PREDICTED: hypothetical protein (XP_002270469)	1766	61%	78%
<i>Vitis vinifera</i>	PREDICTED: hypothetical protein (XP_0022770600)	1756	55%	80%
<i>Ricinus communis</i>	D-repeat protein, putative (XP_002515288)	1546	52%	75%
<i>Populus trichocarpa</i>	predicted protein (XP_002311394)	338	52%	74%
<i>Oryza sativa</i>	expressed protein (BAB09913.1)	1601	50%	77%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	WD40/YVTN repeat and Bromo-WDR9 (AT5G49430)	1677	50%	72%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	WD-40 repeat protein-like (AT2G47410)	1591	48%	69%

Taula R 5. Proteïnes amb similitud a la codificada per l'unigen SGN-U220026.

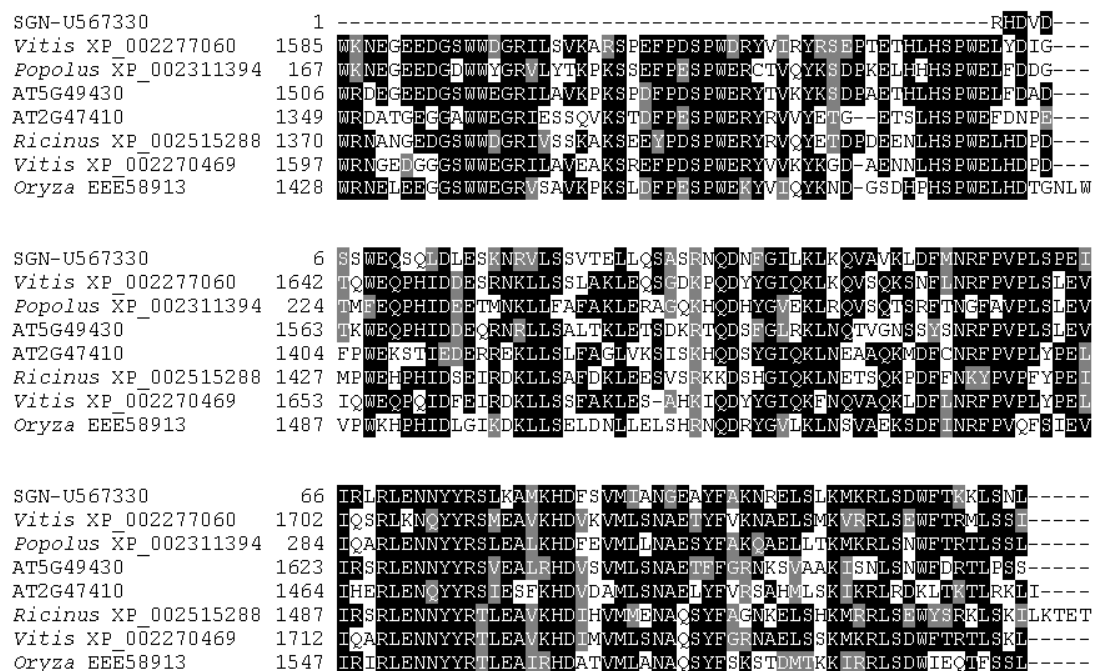


Figura R 12. Aliniament de la regió C-terminal de les proteïnes descrites en la Taula R5.

L'anàlisi de la seqüència de la proteïna codificada per l'unigen sgn-U220026 va mostrar la presència del domini *Bromodomain WDR9-I repeat* (*Prosite number* PS50014, *NCBI Conserved Domain: cd05529*) constituït per 110 aminoàcids i que es troba present en proteïnes de bacteris, plantes, i animals. Identificat prèviament en una proteïna relacionada amb la síndrome de Down (Ramos *et al.* 2002), la funció proposada per aquest domini es la d'interaccionar amb acetil-lisines de les histones i s'ha relacionat amb la regulació de diverses etapes en el procés de divisió cel·lular, inducció de l'activació transcripcional, silenciament transcripcional, remodelament de la cromatina, splicing de mRNA i replicació del DNA (Philipps *et al.* 2008). S'ha descrit també que el domini *Bromodomain* pot interaccionar amb complexos remodeladors de cromatina (Huang *et al.* 2003) i actuar com a silenciador global de la transcripció en ovòcits de ratolí i humans (Philipps, *et al.* 2008).

Encara que no es troba directament en la seqüència proteica de l'unigen sgn-U220026, el domini *Bromodomain WDR9-I repeat* es troba normalment associat al 40WD transducina (*Prosite number* PS00678, *NCBI Conserved Domain: cd00200*), com és el cas de les altres proteïnes de plantes detectades. El domini 40WD està format per tres lamines  $\beta$  i les proteïnes que el contenen acostumen a presentar de 5 a 8 repeticions. Les repeticions de 40WD interaccionen per a formar estructures de tipus cíclic. 40WD es troba involucrat en un ampli rang de funcions cel·lulars com transducció de senyal, tràfic vesicular, ensamblatge del citoesquelet, control del cicle cel·lular, apoptosi, dinàmica de la cromatina i regulació post-transcripcional (Xu i Min 2011).

Assumint que l'unigen sgn-U220026 pogués codificar per l'extrem C-terminal d'una proteïna més llarga homòloga a les codificades pels gens At5g49430 i At2g47410 d'*Arabidopsis*, i donat que la funció d'aquests gens és encara desconeguda, es va abordar la caracterització fenotípica de mutants d'*Arabidopsis* defectius en la funció d'aquest gens. Es van utilitzar diferents línies d'inserció de T-DNA de la col·lecció SALK que tenien disruptada la seqüència codificant d'aquest gen en diferents posicions (Figura R 14). En el cas d'At5g49430 es van analitzar les línies SALK 041067C, SALK 041345 i SALK 093473C, i el d'At2g47410 les línies SALK 020927, SALK 039583, SALK 142736 i SALK 1589.

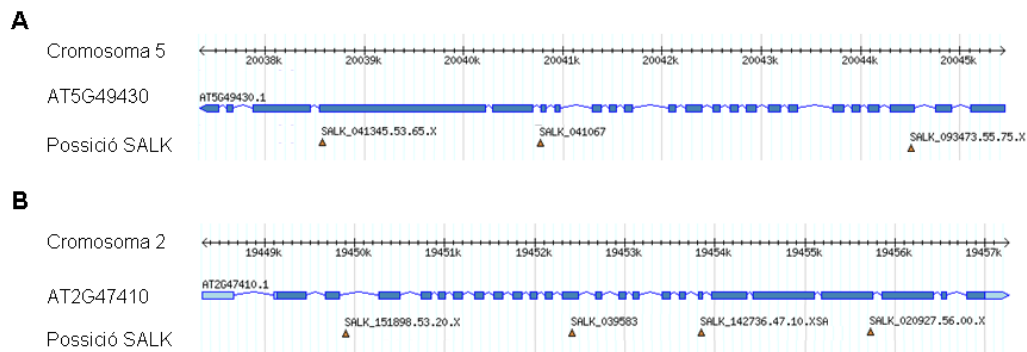


Figura R 14. Posició de les insercions de T-DNA en els gens At5g49430 (A) i At2g47410 (B) presents en les corresponents línies SALK d'Arabidopsis.

En totes les línies analitzades es va observar el fenotip mostrat en la Figura R 13. Així, mentre que en les línies homocigotes per la inserció del T-DNA el desenvolupament les plàntules s'aturava en estadis molt primerencs, les línies heterocigotes mostraven un retardament sever en el seu creixement. Es pot concloure per tant que, independentment de la funció que puguin desenvolupar les proteïnes codificades pels gens At5g49430 i At2g47410, aquesta és essencial pel creixement i desenvolupament de la planta. Per tant, és possible que la funció de la proteïna codificada per l'unigen sgn-U220026 pugui ser també essencial en el tomàquet. El possible paper de la proteïna codificada per l'unigen sgn-U220026 es la maduració del fruit romandrà desconeguda per tant fins que no es tingui més informació sobre la funció d'aquestes proteïnes en les plantes.

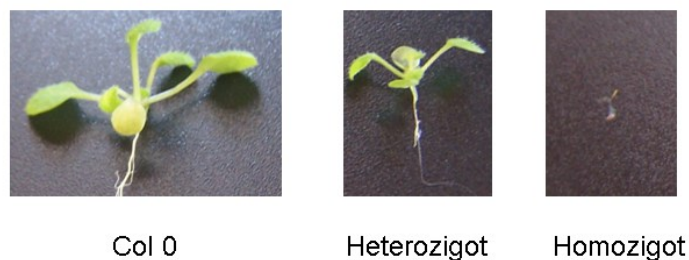


Figura R 13. Fenotip de les plantes de la línia SALK\_093473C crescudes durant 14 dies en medi MS crescudes en un règim de 8h de llum i 16 de fosc.

Recentment, l'alliberament de noves dades relatives al projecte de seqüenciació del genoma del tomàquet ha permès localitzar l'unigen sgn-U220026 en el *scaffold* SL1.00sc05189 del cromosoma 1. Malgrat tot, les anotacions alliberades prediuen un gen més petit que els descrits en *Arabidopsis*. No obstant, la seqüència predita per aquest gen

pot no ser correcta al mostrar una seqüència codificant que conté múltiples codons de parada que no mantenen la pauta de lectura de l'unigen sgn-U220026.

#### **4. Caracterització del gen i la proteïna corresponent a l'unigen *sgn-U216160*.**

Com s'ha indicat anteriorment, la seqüència predita per l'unigen sgn-U216160 codificava per una proteïna que mostrava similitud amb una proteïna de tabac anomenada "Salicylic acid-binding protein 2" (o SABP2). SABP2 ha estat caracteritzada com una proteïna amb activitat metil salicílic esterasa (Forouhar, *et al.* 2005) i pertany a la superfamília de les  $\alpha/\beta$ -hidrolases, que es caracteritzen per catalitzar la hidròlisi de determinats enllaços C-C, derivats d'àcids carboxílics (esters, amides i tioesters), epòxids, alquil al·lils, haloperòxids i hidroxinitrils (Holmquist 2000, Jochens *et al.* 2011). S'ha comprovat experimentalment que la SAPB2 de tabac catalitza la hidròlisi de metilsalicilat per formar salicilat (Forouhar, *et al.* 2005) i la seva expressió en la fulla s'ha implicat en l'inici de la recepció del senyal de la Resistència Sistèmica Adquirida (SAR) en plantes (Park *et al.* 2009)

Posteriorment a la identificació de l'unigen sgn-U216160 es van per públiques noves dades derivades del projecte de seqüenciació del genoma del tomàquet amb l'alliberament de la seqüència del clon C02HBa0044L14 corresponent al cromosoma 2 i que contenia la seqüència corresponent a l'unigen sgn-U216160. La disponibilitat d'aquesta nova informació va permetre comparar la seqüència assignada a aquest unigen amb la corresponent del genoma per tal de confirmar-la i, al mateix temps, definir l'organització del gen en exons i introns. Sorprenentment, quan es va fer l'alineament es va detectar una sèrie d'incongruències que van portar a concloure que l'unigen sgn-U216160 estava mal ensamblat i que realment corresponia a una seqüència híbrida derivada de dos gens que codifiquen per proteïnes amb similitud a SABP2 i que es van anomenar *S/SABP2A* i *S/SABP2B*.

En la Figura R 15 es mostra l'organització dels gens que codifiquen per *S/SABP2A* i *S/SABP2B* de tomàquet. Els gens es troben separats entre si per una distància de 24,8 kb i mostren una organització semblant pel que fa al nombre i posició del introns. Si bé la

longitud dels exons és semblant en els dos gens, la dels introns es molt diferent, en particular la del primer intró, que és de 342 pb en el cas del gen *SISABP2A* i de 3839 pb en el del gen *SISABP2B*.



Figura R 15. Organització dels gens *SISABP2A* i *SISABP2B* de tomàquet

Tal com es mostra en la Figura R 16, els mRNAs corresponents als gens *SISABP2A* (unigen sgn-U570479) i *SISABP2B* (unigen sgn-U570478) mostren una identitat del 86 % en la seva regió codificant i del 82% si es consideren també les regions 5'- i 3'-UTR. La gran similitud de seqüència de les regions codificants del mRNAs corresponents a *SISABP2A* i *SISABP2A*, juntament amb el fet que els dos gens estan localitzats molt pròxims entre si, suggereix que són el resultat d'un procés de duplicació gènica relativament recent.

```

SABP2A 1 TGGCTAT AATCTCCACAAAACCTCTATA-CTCTATATAACCCCTCATAGTTCTTAAAC
SABP2B 1 ----GATGATACCCACAAAATAACCATATACCCCTATCTTAGAGTTCTTCTGACTTAAAA

                                     ATG
SABP2A 60 ACTTAAACCAAAGTAAAGAAAA---TCACAAAGCCCTAAAAAATGGAAGCTTAAACAAGAAAC
SABP2B 57 AGAATGCTAAGCCAAAGGAAAAAGTTTACAAAGGCCTGAAAAATGGAACCTATCAAGAAAC

SABP2A 117 AAGGAAACACTTTTGTCTTGTACATGCTGCAGGCCATGGAGCTTGGTGTGGTACAAC
SABP2B 117 AAGGAAACACTTTTGTCTTGTACATGCTGCAGGCCATGGAGCTTGGTGTGGTACAAC

SABP2A 177 TAAAACCATTCCTAGAGGCTGCAGGCCACAAGGTCCTCTTGACTTAGCAGCCTCTG
SABP2B 177 TAAAACCCCTTCCTAGAGGTGCAGGCCACAAGGTCACAACCTCTTGATTTGGCAGCCTCTG

SABP2A 237 GCATTGATTTGAGAAAAATAGAGCAACTTCACACACTTCATGATTACACTTTGCCATTT
SABP2B 237 GTATTGATTTGAGAAAAATAGAGCAACTTCACACACTTCATGATTACACTTTGCCATTTGA

SABP2A 297 TGGAAATT AATGGAATCTCTCCACAAGAGGAGAAAGCCATATAGTTGGACATAGTCTTG
SABP2B 297 TGGAAATTGATGGAATCTCTCCACAAGAGGAGAAAGTCATAGTTAGTTGGACATAGTCTTG

SABP2A 357 GTGGTATGAATTTAGCACTTGCCTATGAAAAATACCCAAAAAGATCTATGCTGCTGTTT
SABP2B 357 GTGGTATGAATTTGGCACTTGTATGAAAAATACCCAAAAAGATCTATGCTGCTGTTT

SABP2A 417 TCTTGGCTGCTTTTATGCCGATTCTATTCACATATCTTCCTATGTTATGGATCAGTACA
SABP2B 417 TCTTGGCTGCTTTCATGCCGATTCTATTCACATCTCTTCCTATGTTATGGATCAGTATT

SABP2A 477 ATGAACGGACACCAACAGAAATGGTTAGTACTCAATTTTACCATATGGTACCCCTG
SABP2B 477 TTGAGAGGATCCAAACAATGAATGGTTGACACCCAATTTCTATCATATGGTACCCATG

SABP2A 537 AAGAGCCACTCACATCCATCACTTTTGGTCCCAAATTTTGGCTCATTAAGCTTTACCGGT
SABP2B 537 AAGAGCCCTGCCATCCATTTTGGTGGCCCAAATTCCTGGCTTACAACTTTTATCAAT

SABP2A 597 TAAGCCCTCCGAGGATGTGCATTAGGATATCATTAGTGAGAACAGTTCTCTTTTC
SABP2B 597 TATGCCCTCCGAGGATGTGCATTGCTATCATCATTGGGAGAGCAAGTTCTTTATTC

SABP2A 657 TGAAGATTTGTCAAACCCAACTATTTGACAGATGAAGGATATGGATCTGTGAAGACAG
SABP2B 657 TAGAAGATTTGTCAAATCCAACTATTTGACAGATGAAGGATATGGATCAGTGAAGAAAG

SABP2A 717 TTTATGTAGTGTGACAGAGGATAAAGGCATATCAAAGAATTTCAACAATGGCAATTC
SABP2B 717 TTTATATAGTATGCACAGATGATAAACTCTTACCAAAGAGTTTCAAAGAATGGCAATTC

SABP2A 777 ATAATATGGTC---TTACTGAAGCAAAGGAAATTAAGGTGCTGATCATATGGCAATGC
SABP2B 777 ACAACATTAATAGCATCATAGAAACAAAGGAAATTAAGGTGCTGATCATATGGCAATGC

                                     TGC
SABP2A 834 TATGTATGCCAAAAAACTTTGTGACACTCTCTGGAGATTGCAGATAAATACAATTGAT
SABP2B 837 TAAGTATGCCAAAAAACTTTGTGACACTCTCTGGAGATTGCAGATAAATACAATTGAT

SABP2A 894 CCATCTCATGTTGTCCATGTTAAATAATGATTGGAATAAATACTGTTGTAGCCTTCA
SABP2B 897 CCACCTTCT-----ACTCATTGGAATAAATAACTGTTGTAGCCTTCA

SABP2A 954 TCGCAGAAAAATAT-ACTGTATATGTTTGTGGTGTGTTATCTATGATGATCTA
SABP2B 939 ACTTGAAAAATAATTAAGTATGTTTGTGGTGTGTTATCTATGATGATCTA----TA

SABP2A 1013 AGACTGTGGTACATAATAAACTATATCACTTCTTGTAA
SABP2B 994 AGTGTGTTAACATAATTAAATCTTCAAAA-----

```

Figura R 16. Alineament de la seqüència de nucleòtids dels unigens corresponents a *SISABP2A* (SGN-U570479) i *SISABP2B* (SGN-U570478) de tomàquet. Els codons d'inici de traducció (ATG) i de parada (TGC) estan indicats en la seqüència.





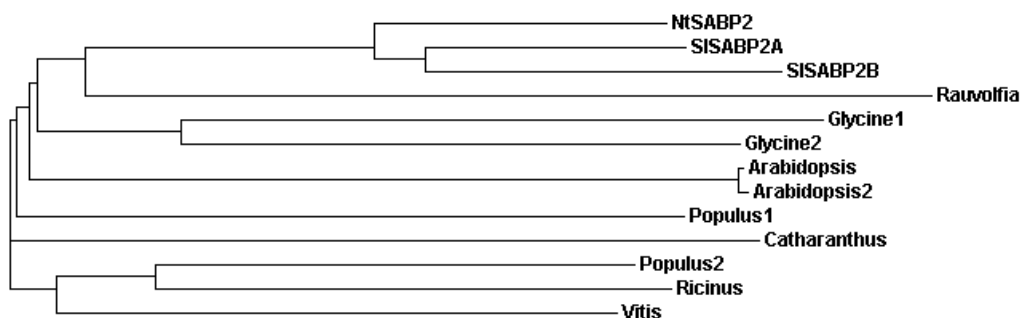


Figura R 18. Arbre filogenètic de les proteïnes amb similitud a *SISABP2A* i *SISABP2B*. *NtSABP2*, AAR87711.1 salicylic acid-binding protein 2 [*Nicotiana tabacum*]: *Glycine1*, ACU19012.1 unknown [*Glycine max*]: *Glycine2*, ACU16654.1 unknown [*Glycine max*]: *Catharanthus*gi, Protein S [*Catharanthus roseus*]: *Rauwolfia*, Polyneuridine A [*Rauwolfia Serpentina*]: *Arabidopsis1*, NP\_179943.1 methyl esterase 1 [*Arabidopsis thaliana*]: *Populus1*, XP\_002310756.1 predicted protein [*Populus trichocarpa*]: *Populus2*, XP\_002310756.1 predicted protein [*Populus trichocarpa*]: *Ricinus*, XP\_002522344.1 Polyneuridine-aldehyde esterase precursor, putative [*Ricinus communis*]: *Vitis*, XP\_002264450.1 PREDICTED: hypothetical protein [*Vitis vinifera*]: *Arabidopsis2*, AAO22676.1 putative acetone-cyanohydrin lyase [*Arabidopsis thaliana*].

Tal com s'ha indicat en el paràgraf anterior, les proteïnes *SISABP2A* i *SISABP2B* de tomàquet mostren una elevada similitud amb la SABP2 de tabac (*NtSABP2*), amb valors del 82 % respecte *SISABP2A* i 76 % per *SISABP2B*. En la Figura R 17 es mostra l'alineament de les proteïnes *SISABP2A* i *SISABP2B* amb la *NtSABP2*.

Les SABP van ser identificades per l'afinitat que presenten per l'àcid salicílic (SA). Així, en experiments realitzats amb extractes de tabac es van detectar tres proteïnes que quedaven retingudes en columnes d'afinitat: SABP1, SABP2 i SABP3 (Du i Klessig 1997, Slaymaker *et al.* 2002). Les tres proteïnes mostren però activitats diferents. Mentre que SABP1 té activitat catalasa, SABP2 actua com a metil esterasa i SABP3 presenta activitat anhidrasa carbònica. Tot i que presenten diversitat de funcions i estructures, totes tres proteïnes presenten almenys un lloc d'unió a SA (Du i Klessig 1997, Slaymaker, *et al.* 2002). En el cas concret de SABP2 s'ha demostrat que el SA actua com inhibidor al·lostèric del enzim (Forouhar, *et al.* 2005). Al determinar la presència del lloc d'inhibició per SA en les proteïnes de tomàquet es va observar que aquets només estava present en *SISABP2A* (Figura R 17).

Com s'ha comentat anteriorment, la *NtSABP2* forma part de la superfamília de les  $\alpha/\beta$ -hidrolases. Els membres d'aquesta superfamília es caracteritzen per tenir un barril  $\beta$

central rodejat per hèlixs  $\alpha$  i un segon domini central que actua com a tapa. Dins de la família existeixen proteïnes que, malgrat presenten un gran diversitat de seqüència, contenen una triada d'aminoàcids en posicions determinades i que estan considerats com a marcadors de funció. Aquesta triada consisteix en un aminoàcid nucleofílic (serina, aspàrtic o cisteïna), una histidina i, finalment, un aminoàcid catalític (aspàrtic o glutàmic). En el cas de *NtSABP2* aquests aminoàcids són la serina 82, l'aspàrtic 211 i la histidina 239 (Figura R4), els quals es corresponen amb els de proteïnes que tenen activitat esterasa (Forouhar, *et al.* 2005). Cal ressaltar que aquests residus estan conservats tant en *SISABP2A* com en *SISABP2B* (Figura R 17).

En el centre catalític dels membres d'aquesta família existeixen altres possibles llocs d'interacció i/o estabilització del substrat. En el cas de *NtSABP2*, caracteritzada com metilsalicílic esterasa, existeixen 10 aminoàcids que s'han implicat en aquesta funció (Forouhar *et al.*, 2005) (Figura R 17). Es de destacar que 9 d'aquests residus estan presents en *SISABP2A* i 8 en *SISABP2B*. En tots els casos però el canvis observats són conservatius (fenilalanina 121 per tirosina en el cas de *SISABP2B* i fenilalanina 121 per tirosina i isoleucina 217 per leucina en *SISABP2B*).

Malgrat que la conservació dels aminoàcids que interaccionen amb el substrat fa preveure que *SISABP2A* i *SISABP2B* podrien catalitzar la desmetilació de MeSA, s'ha descrit que les proteïnes de la superfamília de les  $\alpha/\beta$ -hydrolases presenten una peculiaritat anomenada "promiscuïtat catalítica" (Kourist *et al.* 2010). Aquesta "promiscuïtat catalítica" es refereix a la capacitat de les  $\alpha/\beta$ -hydrolases de realitzar més d'un tipus de transformació química. Així, per exemple, s'ha descrit que la *NtSABP2*, que s'ha caracteritzat com a MeSA esterasa, utilitza també, si bé amb una afinitat menor, altres substrats com el metiljasmonat. A més s'ha descrit que la *NtSABP2* presenta també activitat lipasa *in vitro* induïda per SA (Kumar i Klessig 2003). L'activitat lipasa està associada a la presència del motiu GX SXG (Figura R 17) present també en les proteïnes *SISABP2A* i *SISABP2B*.

#### **4.1 Estudi de l'expressió dels gens *SISABP2A* i *SISABP2B*.**

Degut a l'elevada similitud de seqüència dels trànscrips corresponents als gens *SISABP2A* i *SISABP2B* (Figura R 16) es va descartar la possibilitat d'utilitzar la tècnica de Northern blot per a quantificar els nivells d'expressió d'aquests gens. Alternativament es

optar per utilitzar la tècnica de PCR semi-quantitativa (SQ-PCR). Aquesta variant de la PCR es basa en utilitzar dos primers que amplifiquen seqüències curtes de DNA (preferentment menors de 500 pb) i un nombre de cicles més curt de l'habitual, de forma que la reacció d'amplificació finalitzi mentre es troba en la fase exponencial. Malgrat que la quantificació del nivells de transcrit utilitzant aquesta tècnica no dona valors exactes, si que es normalment suficient per donar una idea bastant fiable dels valors relatius d'expressió.

Tenint en compte l'elevada similitud de seqüència existent entre els mRNAs de *SISABP2A* i *SISABP2B* es va optar per utilitzar un *primer forward* comú amb un nucleòtid degenerat per a les dues seqüències (5'-CTT GTC GAC ATT GTA TTT ATC TGC AAT CTC CAM GAG AGT G-3', on M significa A i C) situat en el primer exó i un *primer revers* específic per a cada gen situat en la zona 5' UTR: 5'-GGC TAG CAT GGA AGC TAA CAA GAA ACA AGG AAA AC-3' per a *SISABP2A* i 5'-GGC TAG CAT GGA ACC TAT CAA GAA ACA AGG AAG AC-3' per *SISABP2B*.

Per tal de normalitzar els resultats obtinguts es va utilitzar el gen de l'actina, amb *primers* dissenyats en regions corresponents a dos exons a fi de detectar l'eventual presència de DNA genòmic en les mostres de cDNA (Materials i Mètodes 2.7).

L'anàlisi dels productes de PCR amplificats amb els primers indicats anteriorment va mostrar únicament les bandes corresponents a la mides esperades. Per determinar l'especificitat dels productes amplificats (*SISABP2A*, *SISABP2B* i actina) es va procedir a seqüenciar el DNA de les bandes després de retallar-les del gel i purificar-les. Els resultats obtinguts van mostrar que els fragments amplificats corresponien als productes esperats.

Un cop posat a punt el mètode d'amplificació específic dels mRNAs de *SISABP2A* i *SISABP2B* es va procedir a estudiar el seu patró d'expressió en mostres de RNA total de fulla i de fruit en diferents estadis de maduració. El resultats mostrats en la figura R5 indiquen que els nivells dels mRNAs de *SISABP2A* s'indueixen fortament en el pas de tomàquet verd madur (MG) a tomàquet *Breaker* (O) i vermell (R). Els nivells d'expressió en fulla són semblants als del fruits verd madur (MG). Pel que fa a *SISABP2B* es van observar uns nivells elevats d'expressió en fulla i també una clara inducció de l'expressió durant la

maduració del fruit (Figura R 19). A diferència de *SISABP2A*, el nivell del mRNA de *SISABP2B* disminueix lleugerament en la fase final del procés de maduració.

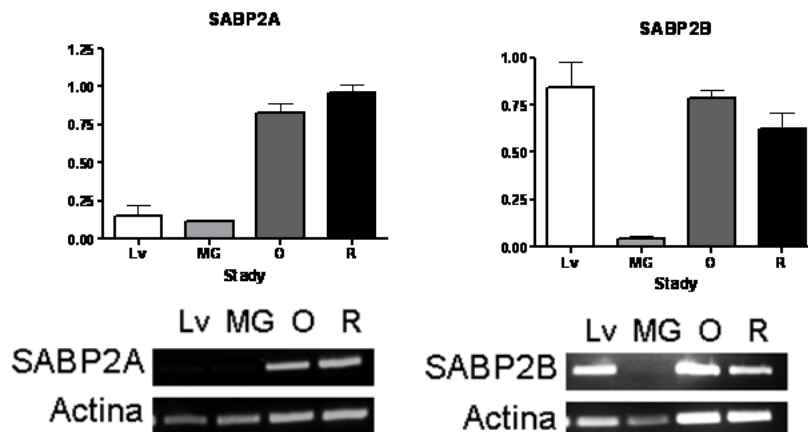


Figura R 19. Perfil d'expressió de *SISABP2A*, i *SISABP2B* a fulla (Lv), tomàquet verd madur (MG), tomàquet *Breaker* (O) i vermell (R). n=5

Posteriorment a l'obtenció d'aquests resultats es va fer públic a la base de dades de cDNA de tomàquet del *Kazusa DNA Research Institute* un clon de cDNA de fulla (LEFL1094DB05) corresponent a *SISABP2A* que no contenia l'exó 2. La resta de seqüència, incloses les regions 5'- i 3'-UTR, era idèntica a la del clon identificat i caracteritzat prèviament. Per tal determinar si en el fruit existien transcrits que poguessin presentar aquest *splicing* alternatiu es va realitzar una PCR amb els primers dissenyats per a la clonació de la regió codificant de *SISABP2A*. Els primers utilitzats amplifiquen un fragment de 819 bases. Si es produís el *splicing* alternatiu el producte amplificat seria de 681 pb. En la Figura R 20 s'observa que en tots els estadis de maduració del fruit analitzats només s'observa el producte de 819 pb. A menys que el seu nivell d'expressió fos molt baix, aquest resultat exclouria la presència de la variant de *splicing* del mRNA *SISABP2A* en el fruit.

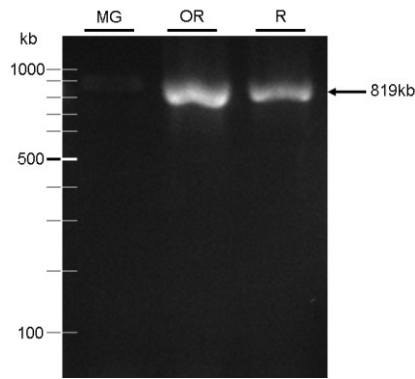


Figura R 20. Gel amb els productes de RT-PCR obtinguts amb els primers d'expressió de *SISABPA* i mostres de RNA total obtingudes de fruit verd madur (MG), taronja (O) i vermell (R).

#### 4.2 Expressió i purificació de *SISABP2A* recombinant.

Per a l'expressió de la *SISABP2A* es va escollir el vector pET-23b. La proteïna recombinant obtinguda presenta una cua d'histidines en l'extrem C-terminal. El criteri per incorporar la cua d'histidines a l'extrem C-terminal es va basar en els treballs descrits prèviament per l'expressió i caracterització de la proteïna NtSABP2 (Forouhar, *et al.* 2005). La seqüència codificant per *SISABP2A* es va clonar a partir de cDNA de fruit utilitzant primers específics en els que s'havien introduït les dianes *NheI* i *SmaI* (Materials i Mètodes apartat 2.8). El plàsmid recombinant obtingut, anomenat pET23-SABP2A, es va confirmar mitjançant seqüenciació. Un cop introduït el plàsmid pET23-SABP2A en la soca d'*E. coli* BL21(DE3) pLysS es va procedir a estudiar les condicions per expressar la proteïna *SISABP2A* en forma soluble (Materials i Mètodes, apartat 3.12).

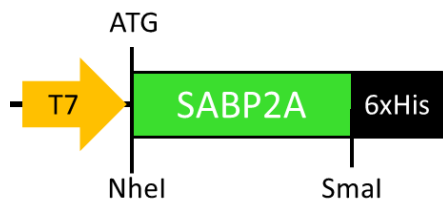


Figura R 21. Esquema del plàsmid pET23-SABP2A.

Es van realitzar estudis d'expressió a les 2, 4, 7 i 16 hores després de la inducció amb 1 mM d'IPTG a 28°C. D'acord amb els resultats que es mostren en la Figura R 22A, es va determinar que el temps òptim per a expressar la proteïna recombinant era de 16 h. Posteriorment es va realitzar un experiment a petita escala per determinar si la proteïna

expressada era soluble. Els resultats obtinguts (no mostrats) van indicar que la major part de proteïna recombinant es podia recuperar en forma soluble.

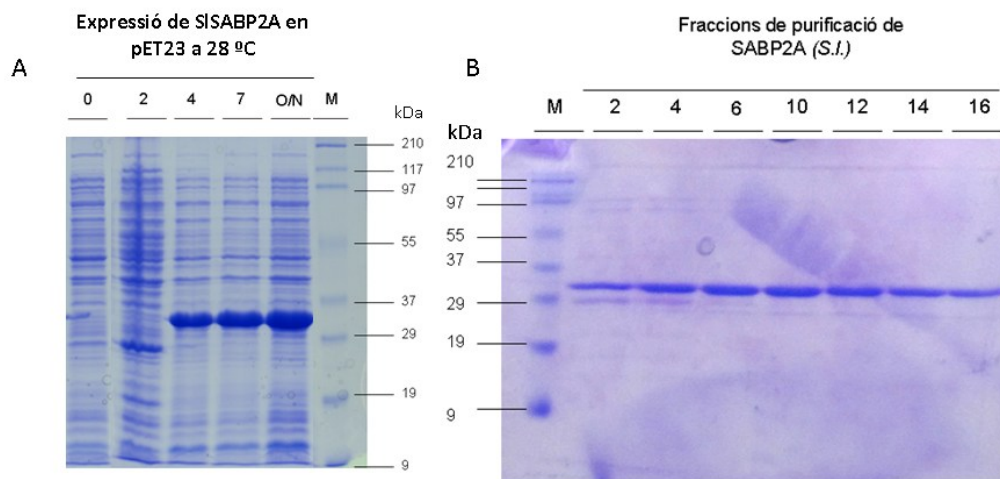


Figura R 22. A) Estudi de l'expressió de la proteïna *S/SABP2A* recombinant a diferents temps després de la inducció amb 1 mM IPTG a 28 °C. B) Gel de SDS-PAGE de les fraccions eluïdes de la columna *Histrap FF* amb un gradient d'imidazol.

Després d'expressar la proteïna *SISABP2A* recombinant en les condicions indicades anteriorment es va procedir la seva purificació mitjançant cromatografia d'afinitat utilitzant una columna de níquel *Histrap FF* (GE Healthcare). L'anàlisi per SDS-PAGE de les fraccions eluïdes de la columna després d'aplicar un gradient d'imidazol va mostrar que la *SISABP2A* recombinant estava especialment enriquida en la fracció 10 corresponent al pic de l'elució de la columna (Figura R 22B).

Com a control positiu en els assajos d'activitat que es descriuen en el següent apartat es va utilitzar la proteïna *NtSABP2* cedida pel grup del Dr. Klessig. La proteïna es va expressar utilitzant una construcció que contenia la regió codificant de *NtSABP2* clonada en el vector pET21. La proteïna expressada contenia una cua de poli-histidines en el seu extrem C-Terminal (Forouhar, *et al.* 2005). Per expressar la proteïna *NtSABP2* es van utilitzar les condicions descrites per Forouhar *et al.* (2005) i la seva purificació es va dur a terme de forma anàloga a la *SISABP2A* descrita anteriorment. Les fraccions corresponents a la *NtSABP2* purificada es van analitzar per SDS-PAGE, comprovant-se que en aquest cas la proteïna obtinguda tenia també un elevat grau de puresa (Figura R 23)

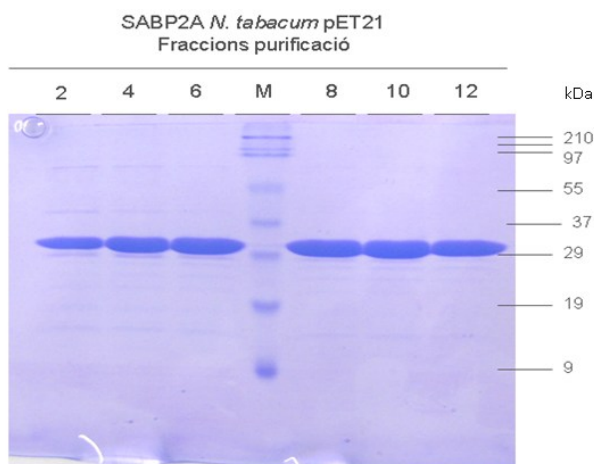


Figura R 23. Gel de SDS-PAGE de les fraccions de proteïna *NtSABP2* recol·lectades de la columna de níquel *Histrap FF* eluïdes amb un gradient d'imidazol.

#### 4.3 Anàlisi funcional de la proteïna *SISABP2A* recombinant.

Un cop purificada la proteïna *SISABP2A* es va procedir a estudiar si presentava activitat MeSA esterasa. Per a la posta a punt de l'assaig enzimàtic es va utilitzar la *NtSABP2* d'acord amb les condicions descrites per Forouhar *et al.* (2005). L'assaig enzimàtic es basa en la quantificació del SA format a partir de la hidròlisi de MeSA. Per a la detecció del SA format en l'assaig es va utilitzar HPLC seguint el mètode descrit per Parker *et al.* (2004) amb les petites modificacions descrites en Materials i Mètodes 5.1.

Com a pas previ a l'assaig es va preparar la recta patró de SA. Es va comprovar que el sistema de detecció emprat mostrava linealitat de resposta entre les concentracions de 0,3 nM i 1,25 nM de SA. Amb l'objectiu de facilitar la detecció i eliminar la proteïna i altres components de la mescla d'assaig de forma prèvia a la càrrega de les mostres a l'equip d'HPLC es va procedir a l'extracció del SA utilitzant cloroform i medi àcid. Els patrons de SA amprats van ser quantificats directament i després de ser extrets amb cloroform. Així es va estimar que el percentatge de recuperació de SA en tot el rang de concentracions de la recta patró era superior al 92 %.

Un cop optimitzat el mètode d'extracció i assaig del SA es va procedir a quantificar les activitats enzimàtiques utilitzant una concentració de 50  $\mu$ M MeSA en la mescla d'assaig. D'acord amb les dades mostrades en la Figura R 24 es pot concloure que la proteïna *SISABP2A* té activitat MeSA esterasa i que presenta una activitat específica de

87,44 nM s<sup>-1</sup> mgprot<sup>-1</sup>, un valor semblant a l'obtingut per la NtSABP2 (v= 78,35 nM s<sup>-1</sup> mgprot<sup>-1</sup>)

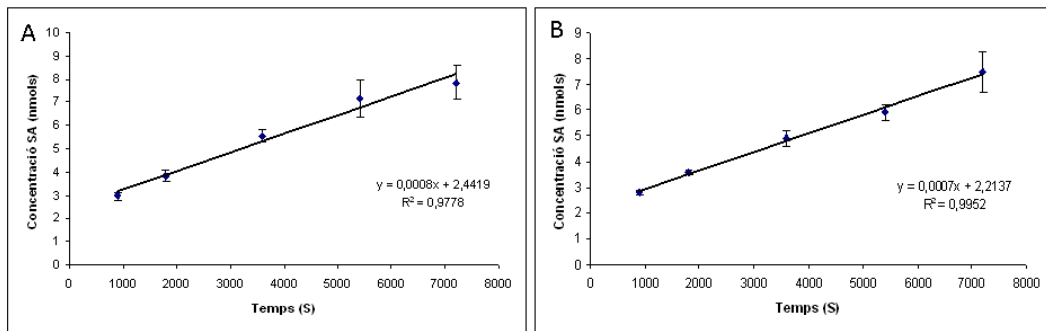


Figura R 24. Monitorització de la reacció MeSA esterasa. A) Activitat de 9.2 µg/mL de la proteïna SISABP2A i B) Activitat de 9.2 µg/mL la proteïna NtSABP2.

En conjunt, els resultats obtinguts indiquen que durant la maduració del fruit s'indueix l'expressió del gen que codifica per de la proteïna SISABP2A i que aquesta presenta l'activitat MeSA esterasa. Aquest fet que suggereix que les variacions en els nivells endògens de SA i/o MeSA podrien tenir un paper rellevant en control del procés de maduració del fruit.



## ***Capítol II: Caracterització de proteïnes relacionades amb complexos lipoproteïcs d'acumulació de carotenoides.***

### ***1. Caracterització de complexos lipoproteïcs d'acumulació de carotenoides.***

A diferència dels processos bioquímics i metabòlics relacionats amb la síntesi dels carotenoides, en l'actualitat es té un coneixement molt limitat dels aspectes relacionats amb la seva acumulació. Degut a la naturalesa hidrofòbica dels carotenoides es considera que s'han d'emmagatzemar en forma de complexos lipoproteïcs en estructures suborganelars encara no ben definides (Vishnevetski et al., 1999; Simkin et al., 2007). Per tal d'abordar la identificació de proteïnes relacionades amb complexos lipoproteïcs d'acumulació de carotenoides en el fruit del tomàquet es va plantejar l'abordatge d'estratègies dirigides a purificar complexos proteïcs associats a carotenoides per, posteriorment, identificar les proteïnes presents mitjançant la utilització de tècniques de proteòmica.

#### ***1.1 Purificació i caracterització complexos proteïna-carotenoid mitjançant Colorless Native-PAGE a partir de mostres de cromoplastes purificats***

Com a primera aproximació per abordar la identificació de complexos proteïna-carotenoid es va utilitzar la tècnica *Colorless Native-PAGE* (també coneguda com a *Clear Native-PAGE* o *CN-PAGE*). Aquesta tècnica, juntament amb la *Blue Native-PAGE* (*BN-PAGE*), consisteix en la separació de les proteïnes i complexos proteïcs en condicions no desnaturalitzats en gels amb gradient de poliacrilamida. En les tècniques *CN-PAGE* i *BN-PAGE* les mostres es solubilitzen mitjançant el tractament amb detergents no iònics, sent el més utilitzat el *n*-dodecil maltòsid (DM). L'ús de detergents no iònics afavoreix que l'estructura de les proteïnes dels complexos es mantingui durant el procés d'extracció. L'única diferència existent entre les dues tècniques és la presència del colorant Blau de Coomassie en la *BN-PAGE* per tal de visualitzar i afavorir la resolució dels complexos en el

gel durant l'electroforesi. El principal avantatge de la CN-PAGE en relació amb el present projecte era el fet que els complexos proteïna-carotenoid podien ser visualitzats en el gel degut al color dels carotenoides.

En les primeres proves que es van realitzar es van solubilitzar mostres de cromoplastes purificats. Degut a l'alta quantitat de lípids i de detergent presents en les mostres no va ser possible tenir una estimació real de quantitat de proteïna carregada en els gels. Malgrat això es van realitzar electroforesis en gradient de poliacrilamida (4 al 18%) amb mostres que permetessin observar zones colorejades en el gel.

En la Figura R 25A es mostra un gel amb concentracions creixents d'extractes de cromoplastes solubilitzats amb DM on s'observa un augment de la coloració deguda als carotenoides. Quan el gel es va tenyir amb blau de coomassie es va obtenir un patró molt distorsionat que no permetia diferenciar bandes de proteïna ben definides. (Figura R 25B). Això era degut possiblement a l'elevada quantitat de lípids presents en la mostra.

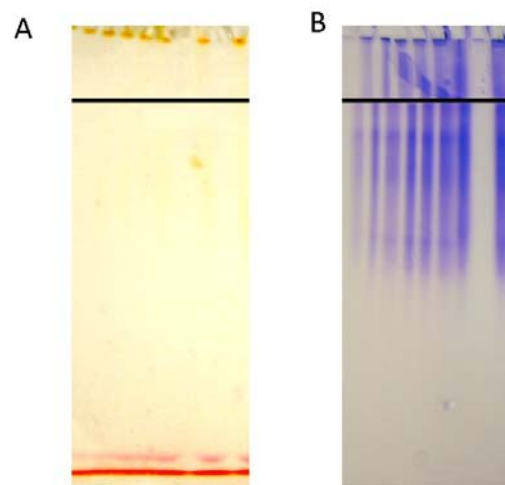


Figura R 25. Gel de CN-PAGE (gradient 4-18 % acrilamida) de mostres de cromoplastes de tomàquet solubilitzats amb DM i en quantitats creixents d'esquerra a dreta. A) Gel després de l'electroforesi. La banda vermella de migració més ràpida correspon al front de l'electroforesi (Ponceau S). B) El mateix gel tenyit amb blau de Coomassie.

Malgrat no poder obtenir un patró de bandes ben definit associades a carotenoides, es va procedir a realitzar un gel preparatiu amb una quantitat de mostra intermèdia per, posteriorment, retallar les zones colorejades d'interès i determinar quines proteïnes s'hi

trobaven associades. En la Figura R 26 es mostra un fragment d'un d'aquests gels preparatius on es poden observar diferents zones colorejades. En la part superior del gel, s'observava una regió groguenca d'aspecte difús (Zona 1). A la part inferior es van observar una banda de color vermellosa (anomenada banda 2) just per sobre d'una banda de color taronja intens (banda 3) situada immediatament per sobre de la banda vermella corresponent al colorant Ponceau S utilitzat com a marcador del front de l'electroforesi. Per a determinar la possible presència d'altres compostos d'interès, com per exemple l' $\alpha$ -tocoferol ( $\lambda$  de 290 nm), el gel es va observar sota llum ultraviolada detectant-se una banda de coloració blavosa (banda 4) situada per davant del front de l'electroforesi (Figura R 26B).

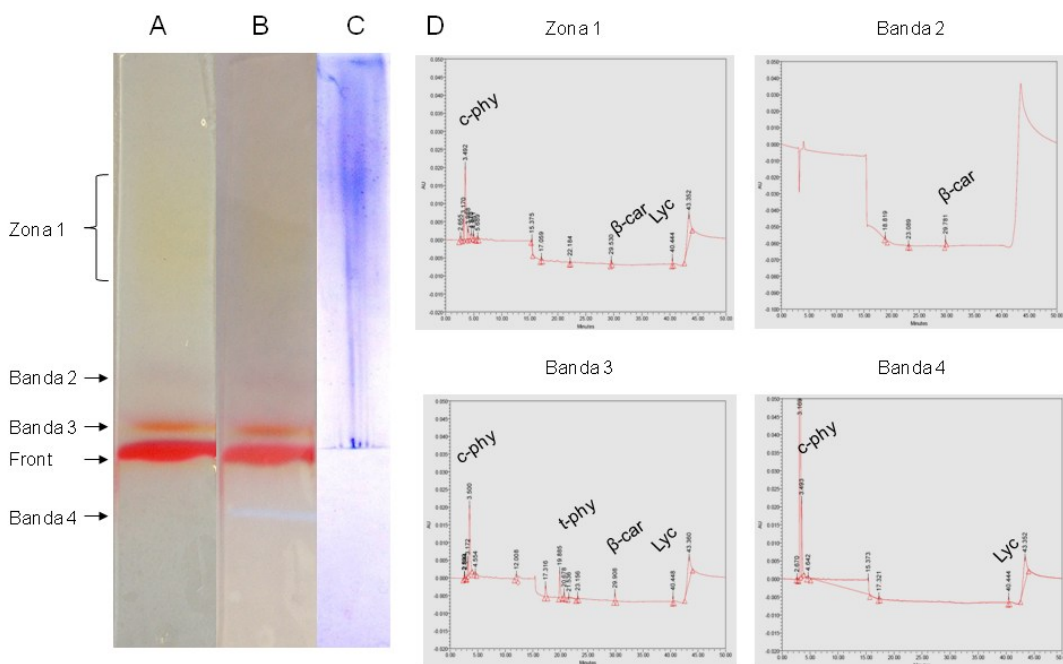


Figura R 26. A) Fragment d'un gel preparatiu CN-PAGE contenint uns mostra de cromoplastes de tomàquet solubilitzada amb DM; B) Observació sota llum ultraviolada a 312 nm; C) tinció del gel amb blau de Coomassie; D) Perfil de carotenoides de cada una de las bandes observades en el gel. Lyc: Licopè,  $\beta$ -car:  $\beta$ -carotè, c-phy: cis-fitoè i t-phy: trans-fitoè

Com era previsible, quan el gel es va tenyir amb blau de coomassie no es van observar bandes ben definides (Figura R 26C). Malgrat tot, si es comparaven les imatges del gel abans i després de tenyir amb blau de Coomassie s'observava que la banda gran difusa (Zona 1) corresponia a les zones del gel que contenien més proteïna. Pel contrari, no es va detectar presència de proteïna en les bandes colorejades 2 i 3.

Obviant el fet de si les bandes colorejades estaven o no associades a proteïna es va procedir a escindir-les del gel i analitzar la presència i composició de carotenoides. En la Figura R 26D es mostren els espectres obtinguts en les anàlisi cromatogràfiques mitjançant HPLC de les mostres extretes de les bandes del gel. En el cromatograma de la Zona 1 es va observar la presència de petites quantitats de licopè,  $\beta$ -carotè i fitoè. En el de la banda 2 es va detectar  $\beta$ -carotè. En el de la banda 3 es va detectar licopè,  $\beta$ -carotè i dues formes de fitoè. Per últim, en la banda 4 es va detectar majoritàriament fitoè.

Aprofitant que la Zona 1 contenia carotenoides i també proteïna es va procedir a recuperar les proteïnes presents mitjançant electroelució i analitzar-la mitjançant espectrometria de masses. La principal limitació de la tècnica va ser la gran dilució de mostra al final del procés d'electroelució. Degut a això va ser necessari procedir a la concentració de la mostra mitjançant liofilització i redissolució en un volum 1/10 en relació al seu volum inicial. En aquest procés es perdia però un gran part de la proteïna de la mostra. En la Figura R 27 es mostra la proteïna recuperada analitzada per SDS-PAGE. En les anàlisi mitjançant espectrometria de masses només va ser possible identificar una única proteïna anotada com a "Fruit-specific protein" (SIFSP). No es pot descartar però la presència d'altres proteïnes presents en forma minoritària.

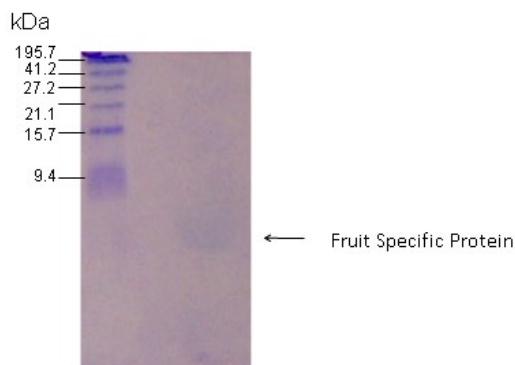


Figura R 27. Gel d'electroelució SDS-PAGE (18%) de mostres electroeluides de la zona 1 provinent del gel de CN-PAGE mostrat el la Figura R 26

## **1.2 Purificació i caracterització de complexes proteïna-carotenoide mitjançant cromatografia de gel filtració a partir de mostres de pericarp.**

Tenint en compte les limitacions descrites anteriorment utilitzant la tècnica de CN-PAGE es va decidir abordar la caracterització de complexes proteïna-carotenoid utilitzant tècniques alternatives.

A partir d'una recerca bibliogràfica orientada a identificar treballs anteriors orientats a la caracterització de complexes proteïna-carotenoid en altres plantes es va trobar l'article publicat per Zhou i col·laboradors (1994) en el que es descrivia la purificació d'un complex lipoproteic que contenia carotenoides a partir d'arrels de pastanaga. El mètode utilitzat consistia en la solubilització d'extractes de pastanaga amb Tween 20 al 0.5% seguida d'una precipitació amb sulfat amònic (35% saturació) i una cromatografia de gel filtració. Al final del procés s'obtenia una fracció d'alt pes molecular que, al ser analitzada per SDS-PAGE, contenia una proteïna de 18 kDa com a component majoritari. La identitat d'aquesta proteïna no va ser determinada.

De forma prèvia a l'adaptació del mètode descrit per Zhou i col·laboradors (1994) a mostres de fruit de tomàquet es va intentar reproduir el protocol experimental descrit en la pastanaga. Les etapes inicials del protocol descrit per Zhou i col·laboradors (1994) consistien en la disrupció mecànica d'arrels de pastanaga en una solució tampó, la filtració de l'extracte en gasa seguida d'una sèrie de centrifugacions selectives, per acabar precipitant el complex proteïna-carotenoid amb l'addició de sulfat amònic al 35% de saturació. El precipitat de sulfat amònic es recuperava per centrifugació a 10.000xg durant 15 min. Curiosament, en l'intent de reproduir els resultats fins a aquest punt es va observar que després de la centrifugació per recuperar el precipitat de sulfat amònic no s'obtenia cap precipitat sinó una fracció de color taronja intens i aspecte oliós que flotava en la part superior del tub de centrífuga.

Tot i la discrepància que existia en aquest punt es va procedir a realitzar la columna de gel-filtració utilitzant la fracció oliosa, a la que es va denominar fracció lipoproteica. Cal indicar que, degut a que la matriu de gel filtració utilitzada per Zhou i col·laboradors (1994) (Superose 6, Sigma) es trobava descatalogada es va utilitzar Sepharose® CL-6B (Sigma),

que té característiques similars. D'acord amb l'article de i col·laboradors (1994), després de l'etapa cromatogràfica s'havia d'obtenir un únic complex que contenia  $\beta$ -carotè, el principal carotenoid present en la pastanaga, i una proteïna de 18 kDa. Seguint amb les discrepàncies, al realitzar la separació cromatogràfica és van obtenir dos pics (en comptes d'un) que corresponien a complexos proteïna-carotenoid d'alt pes molecular (Figura R 28A). El primer corresponia a un component(s) de pes molecular igual o superior a 1.000 kDa, ja que eluïa amb el front de blau de dextrà. La monitorització de l'absorbància a 280 nm (proteïna) i a 472 nm (carotenoides) mostrava una bona correlació entre les dues, fet que suggeria que realment s'havien purificat complexos proteïna-carotenoid.

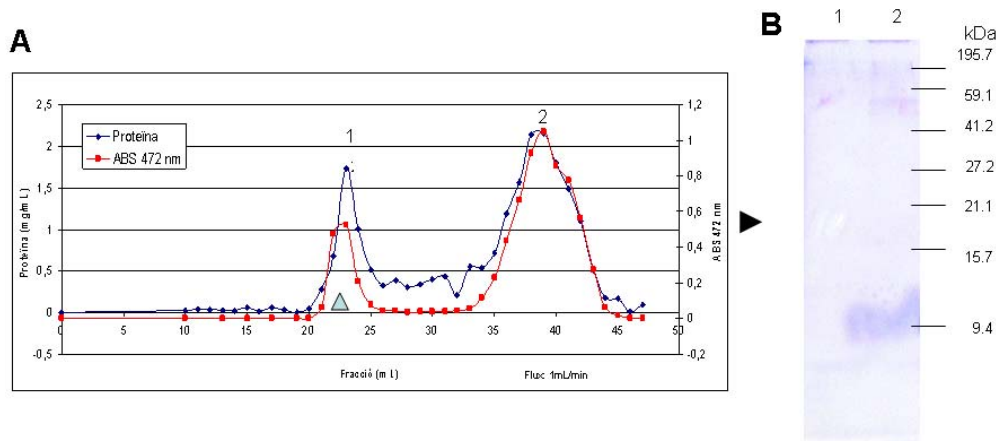


Figura R 28. A) Perfil d'elució de la columna de gel filtració (Sephacrose CL-6B) de la mostra d'extracte de pastanaga. La fletxa indica l'elució del blau de dextrà (PM 1000 kDa). B) Perfil de proteïnes en un gel SDS-PAGE de les fraccions corresponents als màxims dels pics de la columna de gel filtració en un gel de 18% d'acrilamida.

Les fraccions corresponent a cada un dels dos pics es van analitzar mitjançant SDS-PAGE. El resultat tampoc fou l'esperat ja que no es va detectar la citada proteïna de 18 kDa, sinó una proteïna de molt baix pes molecular que migrava prop del marcador de 9,4 kDa (Figura R 28B). Malgrat tot, l'extracció de les fraccions corresponents als dos pics amb solvents orgànics i la seva posterior anàlisi mitjançant HPLC va mostrar la presència de  $\beta$ -carotè i luteïna, els principals pigments presents en la pastanaga (resultats no mostrats).

Malgrat el fet de no poder reproduir els resultats descrits en la pastanaga es va procedir a adaptar aquest protocol al fruit del tomàquet. Les mostres de pericarp es van homogeneïtzar de forma més suau que les de pastanaga degut a que la seva estructura no es tan fibrosa. També es va modificar l'etapa de filtració de l'homogenat degut a que els

filtres convencionals s'obturaven fàcilment (Materials i Mètodes 5.2). A partir d'aquest punt l'extracció es va fer d'acord amb el protocol descrit anteriorment fins a l'etapa de precipitació amb sulfat amònic. Sorprenentment, després de la centrifugació es van obtenir dues fraccions: un sobrenedant oliós colorejat equivalent al de la pastanaga, que es va anomenar també fracció lipoproteica, i un precipitat de color blanc groguenc (Figura R 29 A).

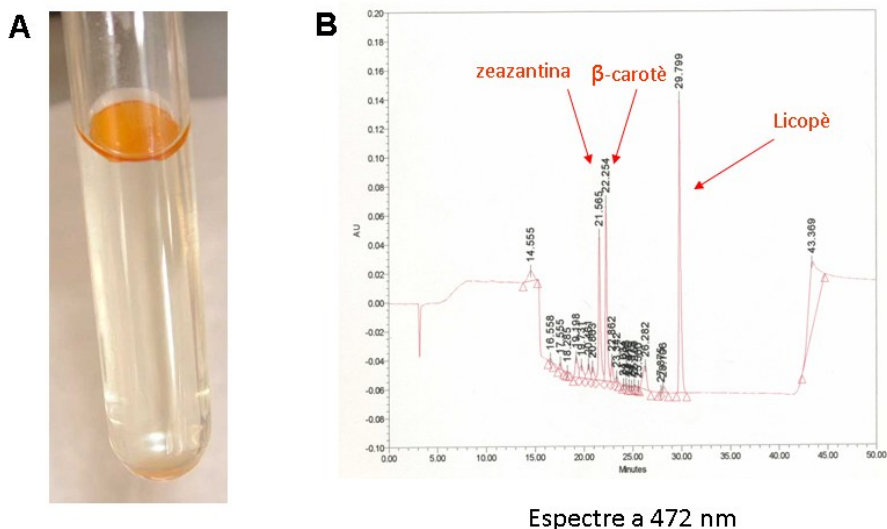


Figura R 29. A) Fracció lipoproteica obtinguda després de la precipitació amb sulfat amònic al 35% de saturació. B) Perfil de carotenoides de la fracció lipoproteica. S'indiquen els compostos corresponent a cada pic en el cromatograma d'HPLC.

Per a la caracterització de la fracció lipoproteica del tomàquet es va procedir inicialment a l'extracció dels carotenoides amb solvents orgànics i anàlisi mitjançant HPLC. Es va determinar la presència de quantitats relativament elevades de licopè, beta-carotè i zeaxantina (Figura R 29 B). Per contra, en el precipitat de sulfat amònic no es van detectar quantitats significatives de carotenoides.

A continuació es va procedir amb l'etapa de cromatografia de gel-filtració utilitzant tant la fracció lipoproteica com la fracció corresponent al precipitat de sulfat amònic. En el cas de la fracció lipoproteica es va detectar l'elució d'un únic pic corresponent a un complex(es) amb un pes molecular considerablement menor que l'obtingut en el cas de la pastanaga (Figura R 30A). En el cas del precipitat de sulfat amònic es va observar també l'elució d'un únic pic amb molt poc contingut de proteïna i sense una clara associació a carotenoides (resultats no mostrats). Cal destacar que el perfil de carotenoides associat a la

fracció lipoproteica eluïda de la columna era el mateix que el descrit anteriorment per la fracció lipoproteica recuperada després de la centrifugació posterior a la precipitació amb sulfat amònic.

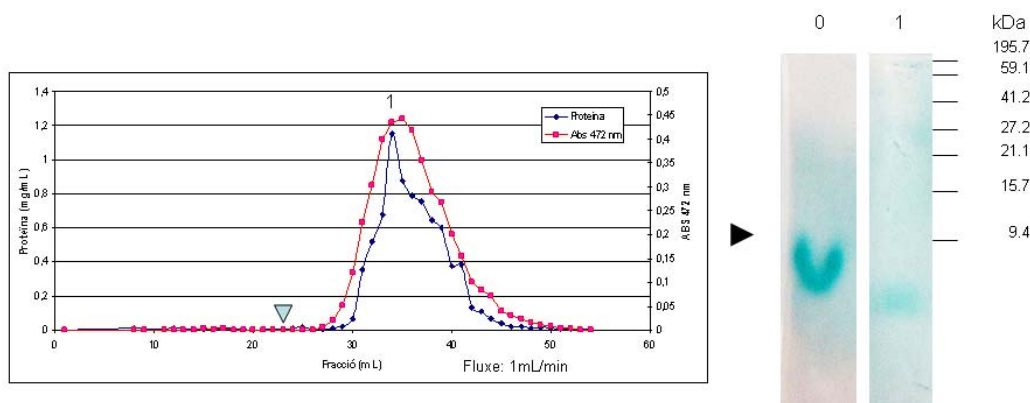


Figura R 30. A) Perfil d'elució de la columna de gel filtració (Separose CL-6B) corresponent a la fracció lipoproteica de tomàquet. La fletxa indica el pic d'elució del blau de dextrans (PM 1000 kDa). B) Anàlisi mitjançant SDS-PAGE de les fracció carregada a la columna (0) i a la corresponent al pic d'elució de la columna de gel filtració (1). Gel al 18 % d'acrilamida. Tinció amb Blau de Comassie Col-loïdal

L'anàlisi mitjançant SDS-PAGE de les diferents fraccions corresponents al pic d'elució de la fracció lipoproteica va mostrar l'existència d'una banda poc intensa de baix pes molecular, en aquest cas inferior al marcador de 9,4 kDa (Figura R 30B). Per tal d'obtenir mostres més concentrades es va procedir a la liofilització de les fraccions eluïdes de la columna i a la seva resuspensió en un volum 10 vegades menor d'aigua Milli-Q. Per una part les fraccions concentrades van ser analitzades per SDS-PAGE i, per altre, es va determinar el perfil de pigments mitjançant HPLC.

Quan les mostres concentrades es van separar per SDS-PAGE es va observar un única banda de proteïna que corria de forma distorsionada i aparentment associada a pigments (Figura R 31A). Degut a que el complex proteïna-carotenoid semblava estable en condicions desnaturalitzants (1% SDS i 1% 2- $\beta$ -mercaptoetanol a 100°C) es va a procedir a la deslipidització i precipitació de la mostra per tractament amb acetona/àcid tricloroacètic/DTT (descriu en la secció 3.3 de Materials i Mètodes). Quan les mostres deslipiditzades es van analitzar per SDS-PAGE es va poder observar l'existència de dues bandes majoritàries : una de molt baix pes molecular (inferior al marcador de 6,4 kDa) i una altra d'aproximadament 18 kDa i altres molt més minoritàries (Figura R 31.B). Cal destacar que aquestes dues bandes s'observaven també en les mostres corresponents al precipitat de



sulfat amònic, si bé la proteïna de 18 kDa era la majoritària en aquesta fracció (Figura R 31.B).

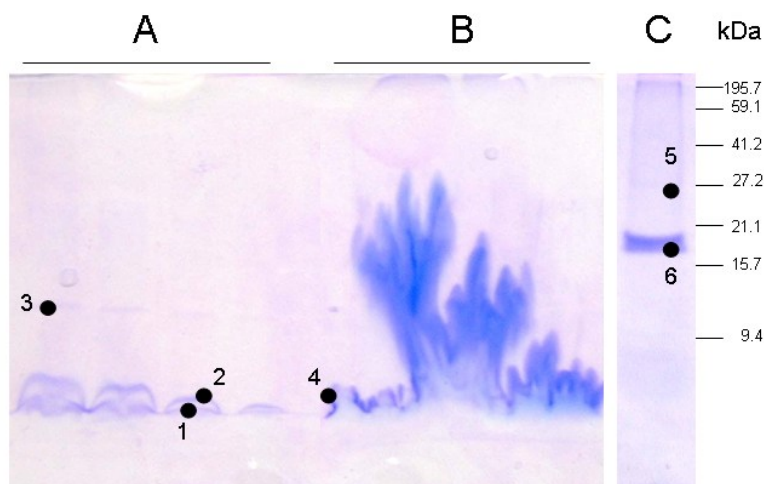


Figura R 31. Perfil SDS-PAGE de la fracció lipoproteica deslipiditzada (A) i la fracció lipoproteica de la columna de gel-filtració (B), i del precipitat de sulfat amònic (C). Els punts negres marquen les bandes escindides per a realitzar la tripsinització i posterior identificació per espectrometria de masses MALDI-QTOF. Els resultats obtinguts van determinar que en les bandes escindides de la fracció lipoproteica 1, s'obtenia la Fruit-specific protein, en el Pellet, 5, 6 i la fracció lipoproteica 3 la càpside del virus del mosaic del tomàquet (ToMV) i la fracció lipoproteica 2 i 4 no van aportar resultats.

Un cop realitzats els gels de les mostres corresponents al pic de la columna de gel filtració i de la fracció lipoproteica resultant de la precipitació amb sulfat amònic (Figura R 31) es va procedir a escindir les bandes corresponents a les proteïnes identificades, digerir-les amb tripsina i els pèptids resultants analitzats mitjançant MALDI-QTOF.

Per una part es va determinar que la proteïna majoritària de 18 kDa present en el precipitat de sulfat amònic corresponia a la de la càpside del virus del mosaic del tomàquet (ToMV). Malgrat que aquest resultat va resultar totalment inesperat està documentat que aquest virus pot estar present en plantes que no presenten cap simptomatologia. Així, la presència del ToMV pot ser fenotípicament inapreciable fins que la planta pateix una situació d'estrès, en la que el virus aprofita per replicar-se. Així doncs, aquest resultat indicava que les plantes del hivernacle de les que s'havien recollit els fruits es trobaven infectades per ToMV. Aquest virus està molt estès i fins i tot es troba en molts dels tomàquets comercials (Broadbent 1976, Roger 2009).

Per treballs anteriors es coneixia que la proteïna de la càpside del ToMV precipita a baixes concentracions de sal (Šindelářová i Šindelář 2005). Per tant, es va procedir a una precipitació fraccionada amb sulfat amònic per tal d'eliminar la seva presència en les mostres finals. Així, es va determinar que la proteïna de la càpside del ToMV precipitava a una concentració al 20% de saturació de sulfat amònic i que la fracció lipoproteica s'obtenia posteriorment al incrementar la concentració de sulfat amònic al 35% de saturació. A partir d'aquestes dades, totes les noves mostres de la fracció lipoproteica es van obtenir realitzant aquesta precipitació selectiva prèvia de la proteïna viral.

Pel que fa referència a la proteïna majoritària de baix pes molecular present en la fase lipoproteica es va identificar com la proteïna anotada com a "Fruit-specific protein" en les bases de dades. Curiosament es tractava de la mateixa proteïna detectada en els experiments CN-PAGE descrits anteriorment.

Tenint en compte que sols s'havia detectat una única proteïna potencialment interessant, es va abordar la identificació de proteïnes mitjançant l'estratègia de *shot-gun* directament a partir de la fracció lipoproteica. El *shot-gun*, o cromatografia líquida associada a espectrometria de masses, separa els diferents pèptids generats per la tripsinització de la mostra, els quals són posteriorment identificats mitjançant espectrometria de masses.

Els resultats obtinguts al aplicar aquesta tècnica van tornar a mostrar la presència majoritària de la proteïna de la càpside del ToMV (malgrat la precipitació selectiva amb sulfat amònic) i de la "Fruit-specific protein". Malgrat que també es van identificar altres proteïnes, aquestes estaven relacionades principalment amb el metabolisme del sofre i indicaven la possible contaminació de la mostra amb proteïnes no relacionades amb l'acumulació de carotenoides

### **1.3 Aïllament i caracterització de la fracció lipoproteica a partir de cromoplastes purificats.**

Tenint en compte que els complexos proteïna-carotenoide han d'estar presents en els cromoplastes es va decidir aplicar les estratègies descrites anteriorment però a partir de cromoplastes de tomàquet purificats. Els resultats obtinguts van ser equivalents als

obtinguts amb les mostres de pericarp. En la Figura R 32A es mostra el perfil d'elució de proteïna i carotenoides. Les fraccions corresponents a cada un dels pics van ser concentrades mitjançant liofilització, tal com s'ha descrit anteriorment, i analitzades mitjançant SDS-PAGE. En aquest cas es va obtenir, però, un patró de bandes més complex que l'obtingut a partir de la fracció lipoproteica de pericarp i que, a més, diferia lleugerament entre el pic 1 i el pic 2 (Figura R 32B). El perfil de carotenoides determinat per HPLC va mostrar la presència de licopè,  $\beta$ -carotè i zeaxantina.

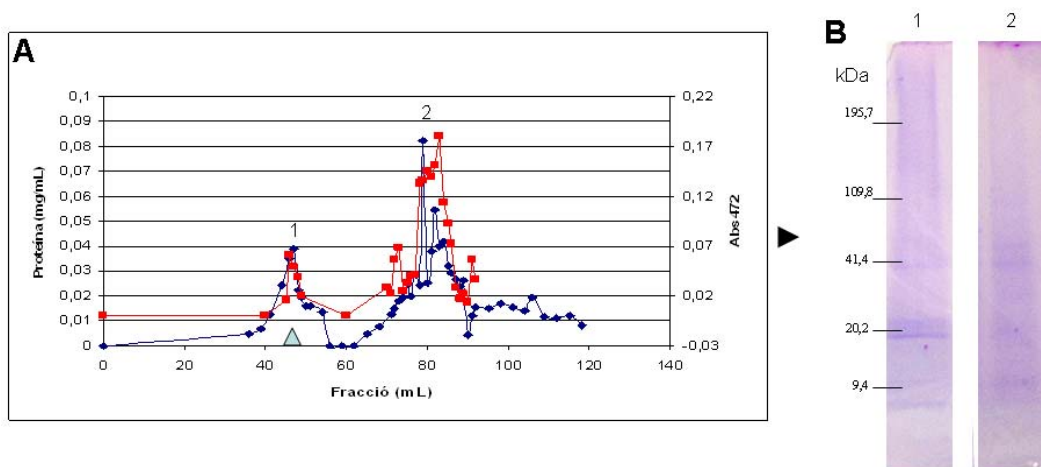


Figura R 32. A ) Perfil d'elució de la columna de gel filtració (Sepharose CL-6B) corresponent a la fracció lipoproteica de cromoplast de tomàquet aïllada segons el mètode de Zhou i col·laboradors (1994). La fletxa indica el pic d'elució del blau de dextrà (PM 1000 kDa). B) Perfil de proteïnes en un gel SDS-PAGE de els màxims de proteïna-carotenoid de la columna de gel filtració en un gel de 18 cm amb una concentració d'acrilamida del 12,5 %.

Encara que el mètode de CN-PAGE no va resultar satisfactori per a la identificació de complexos proteïna-carotenoides si que va permetre evidenciar la possibilitat de poder solubilitzar aquests tipus de complexos utilitzant dodecil-maltòsid (DM). Per tant, es va decidir abordar la possibilitat de combinar les dues estratègies per intentar purificar els complexos solubilitzats amb DM mitjançant l'ús de cromatografia de gel filtració.

En concordança amb els resultat obtinguts en la caracterització de la fracció lipoproteica de cromoplastes de fruit de tomàquet descrita anteriorment, en aquest cas es van obtenir també dos pics de proteïna que contenen carotenoides (Figura R 33A). Els patrons de bandes obtinguts al analitzar les fraccions corresponents als dos pics mitjançant

SDS-PAGE van mostrar la presència de diverses bandes relativament intenses i ben definides que, en aquest cas, eren bastant semblants entre els dos pics (Figura R 33B).

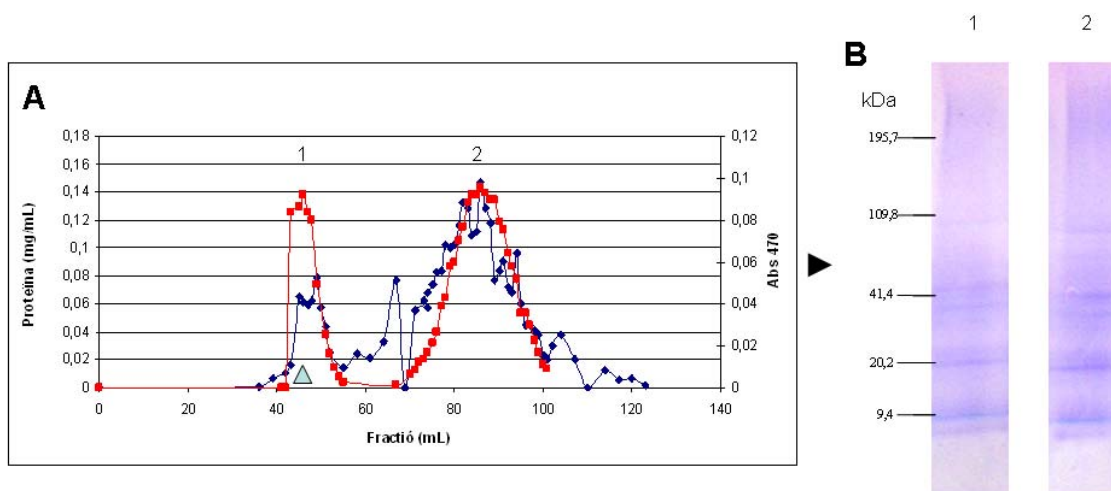


Figura R 33. Perfil d'elució de la columna de gel filtració (Separose CL-6B) corresponent a la fracció lipoproteica cromoplast de tomàquet solubilitzada amb DM. La fletxa indica el pic d'elució del blau de dextrà (PM 1000 kDa). B) Perfil de proteïnes en un gel SDS-PAGE dels màxims de proteïna-carotenoid de la columna de gel filtració en un gel de 18 cm amb una concentració d'acrilamida del 12,5 %.

#### 1.4 Anàlisi proteòmic de les proteïnes presents en les fraccions recol·lectades de les columnes de gel filtració.

Dels gels corresponents a les fraccions de les columnes de gel filtració descrites en l'apartat anterior es van escindir un total de 31 bandes per tal de procedir a la seva identificació mitjançant espectrometria de masses. En la Figura R 34 s'indiquen les bandes escindides (que corresponen als gels mostrats prèviament en les Figura R 32B i Figura R 33B). D'aquestes bandes, 11 corresponien als pics de les columnes de gel filtració obtinguts a l'aplicar del protocol adaptat de Zhou i col·laboradors (1994) (Taula R 6), i les 20 restants al pic de la columna corresponent a les mostres solubilitzades amb DM (Taula R 7)

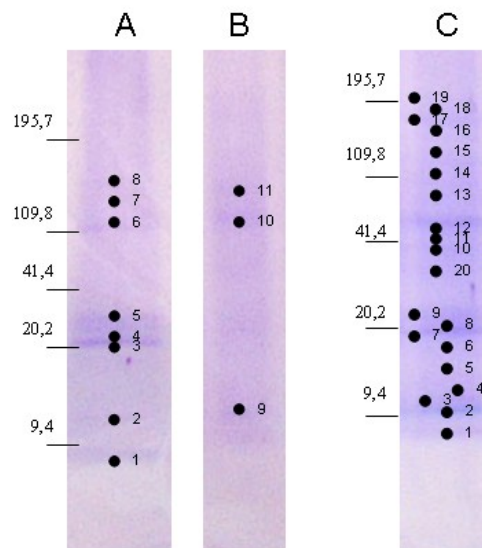


Figura R 34. Bandes escindides dels gels SDS-PAGE per a seva identificació mitjançant espectrometria de masses. A) Bandes escindides del gel corresponent a la fracció del Pic 1 de l'extracció amb Tween 20 (mètode de Zhou et al.); B) Bandes escindides del gel corresponent a la fracció del Pic 2 de l'extracció amb Tween 20 (mètode de Zhou et al. 1994); C) Bandes escindides del gel corresponent a la fracció del pic de les mostres solubilitzades amb DM.

Banda	Proteïna identificada
Zhou-1	Fruit Specific Protein [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
Zhou-2	17.7 Kd Class I Small Heat Shock Protein [ <i>Solanum lycopersicum</i> ] Temperature-Induced Lipocalin / Temperature-Induced Lipocalin' [ <i>Solanum lycopersicum</i> ] 18.1 Kda Class I Heat Shock Protein Abscisic Stress-Ripening Protein 1
Zhou-3	ADP, ATP Carrier Protein, (Adenine Nucleotide Translocator) (ANT)
Zhou-4	34 kDa Outer Mitochondrial Membrane Protein Porin (Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Protein) (VDAC) (POM 34)
Zhou-5	Unknown [ <i>Solanum tuberosum</i> ] 36kda Porin I [ <i>Solanum tuberosum</i> ]
Zhou-6	Ubiquinol-Cytochrome-C Reductase Subunit II H <sup>+</sup> -Atpase B Subunit [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
Zhou-7	ATP Synthase Subunit Alpha (Atpase Subunit Alpha) (ATP Synthase F1 Sector Subunit Alpha) Tomato Ripening Associated Membrane Protein [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]*
Zhou-8	H <sup>+</sup> -Atpase A1 Subunit Isoform / V-Atpase A1 Subunit Isoform [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
Zhou-9	Abscisic Stress-Ripening Protein 1
Zhou-10	NR
Zhou-11	NR

Taula R 6. Resultat de la identificació de les bandes marcades en la Figura R 34 corresponents al pic d'elució de proteïna-carotenoid de la columna amb l'extracció realitzada amb Tween 20. Es mostren subratllades les proteïnes comunes amb la columna de gel filtració amb l'extracció realitzada amb DM.

\*Proteïna de pes molecular detectat inferior al teòric. Pot ser derivat per una mala identificació.

Bandes	Proteïna identificada
DM1	Fruit-Specific Protein [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
DM2	17,7 Class I Small Heat Shock Protein Le-Hsp17.7 [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
DM3	Cytosolic Class II Small Heat Shock Protein HCT2
DM4	ADP-Ribosylation Factor 1 Small Heat Shock Protein [ <i>Solanum lycopersicum</i> ] Abscisic Stress-Ripening Protein 1
DM5	Temperature-Induced Lipocalin / Temperature-Induced Lipocalin' [ <i>Solanum lycopersicum</i> ] Ras-Related Protein Rab7 Small Heat Shock Protein [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
DM6	Tomato Ripening Associated Membrane Protein [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
DM7	ADP/ATP Translocator [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
DM8	ADP,ATP Carrier Protein (Adenine Nucleotide Translocator) (ANT)
DM9	Pectin Methylesterase PME1.9 [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
DM10	Polygalacturonase-2 Precursor (PG) (PG-2A) (PG-2B) (Pectinase)
DM11	Elongation Factor 1-Alpha (EF-1-Alpha)
DM12	ATP synthase subunit beta (ATPase subunit beta)
DM13	ATP Synthase CF1 Alpha Chain [ <i>Solanum tuberosum</i> ] Carotenoid Cleavage Oxygenase [ <i>Solanum lycopersicum</i> ] Zeta-Carotene Desaturase Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1B [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
DM14	NR
DM15	Hsc70 [ <i>Solanum lycopersicum</i> ] Calnexin-Like Protein [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
DM16	Heat Shock Protein 83
DM17	Lipoxygenase A
DM18	Lipoxygenase
DM19	NR
DM20	NADH2 Dehydrogenase (Ubiquinone)* Tomato Ripening Associated Membrane Protein [ <i>Solanum lycopersicum</i> ] 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase Homolog (Protein E8)

Taula R 7. Resultat de la identificació de les bandes marcades en la Figura R 34 corresponents al pic d'elució de proteïna-carotenoid de la columna amb l'extracció realitzada amb DM. Es mostren subratllades les proteïnes comunes amb la columna de gel filtració amb l'extracció realitzada amb Tween 20.

\*Proteïna de pes molecular detectat major al teòric. Pot ser derivat de una possible modificació posttranscricional o una mala identificació.

Si es té en compte les possibles funcions o característiques de les proteïnes identificades, i considerant que algunes d'elles podrien incloure's en més d'un grup, aquestes es poden agrupar de la següent manera :

#### Proteïnes de membrana

- *36kda Porin I [Solanum tuberosum]*
- *Tomato Ripening Associated Membrane Protein [Solanum lycopersicum]*
- *34 kDa Outer Mitochondrial Membrane Protein Porin (Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Protein) (VDAC) (POM 34)*
- *Calnexin-Like Protein [Solanum lycopersicum]*

#### Proteïnes relacionades amb estrès :

- *Abscisic Stress-Ripening Protein 1*
- *Temperature-Induced Lipocalin / Temperature-Induced Lipocalin' [Solanum lycopersicum]*
- *Cytosolic Class II Small Heat Shock Protein HCT2*
- *17,7 Class I Small Heat Shock Protein Le-Hsp17.7 [Solanum lycopersicum]*
- *18.1 Kda Class I Heat Shock Protein*
- *Hsc70 [Lycopersicon esculentum]*
- *Small Heat Shock Protein [Solanum lycopersicum]*
- *Heat Shock Protein 83*

Proteïnes relacionades amb processos energètics / transport electrònic (algunes són proteïnes de membrana):

- *ADP,ATP Carrier Protein (Adenine Nucleotide Translocator) (ANT)*
- *ADP/ATP Translocator [Solanum lycopersicum]*
- *ATP Synthase CF1 Alpha Chain [Solanum tuberosum] †*
- *ATP synthase subunit beta (ATPase subunit beta)*
- *H<sup>+</sup>-Atpase A1 Subunit Isoform / V-Atpase A1 Subunit Isoform [Solanum lycopersicum]*
- *H<sup>+</sup>-Atpase B Subunit [Nicotiana tabacum]*
- *NADH2 Dehydrogenase (Ubiquinone) †*
- *Ubiquinol-Cytochrome-C Reductase Subunit II*

Enzims:

- *1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase Homolog (Protein E8)*
- *Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1B [Solanum lycopersicum] †*
- *Carotenoid Cleavage Oxygenase [Solanum lycopersicum] †*
- *Zeta-Carotene Desaturase†*
- *Lipoxygenase †*
- *Lipoxygenase A †*

Proteïnes relacionades amb paret cel·lular

- *Pectin Methylesterase PME1.9 [Solanum lycopersicum]*
- *Polygalacturonase-2 Precursor (PG) (PG-2A) (PG-2B) (Pectinase)*

Proteïnes relacionades amb vesiculació

- *Ras-Related Protein Rab7 transport vacuole/lysosome*
- *ADP-Ribosylation Factor 1*

Proteïnes de funció desconeguda

- *Unknown [Solanum tuberosum]*
- *Fruit-Specific Protein [Solanum lycopersicum]*

Proteïnes relacionades amb síntesi de proteïnes

- *Elongation Factor 1-Alpha (EF-1-Alpha)*

†: Proteïnes anotades com de localització plastídica



Cal ressaltar que les proteïnes identificades són molt heterogènies pel que fa a la seva possible funció i amb predicció de localitzacions subcel·lulars sorprenents en alguns casos (per exemple proteïnes vacuolars, mitocondrials o de reticle endoplasmàtic), fet que no permetia integrar-les fàcilment en el context de possibles complexos proteïna-carotenoides. Es possible però que les fraccions solubilitzades i purificades continguessin altres complexos no relacionats que co-purifiquessin amb els que contenien carotenoides. A falta d'altres criteris per determinar quines de les proteïnes identificades en les Taula R 6 i Taula R 7 podien tenir un interès potencial en ser estudiades en més detall es va optar inicialment per considerar aquelles proteïnes comunes en els dos llistats, les quals van resultar ser les següents: *Fruit-specific protein* (FSP), *Abscisic stress-ripening protein 1* (ARSP1), *17,7 Class I small heat shock protein* (17,7 HSP) i *Temperature-induced lipocalin* (TIL) / *Temperature-induced lipocalin'* (TIL'). Si bé algunes d'aquestes proteïnes s'havien relacionat amb el procés de maduració del fruit la seva funció no era ben coneguda.

### **1.5 Anàlisi de l'expressió dels mRNAs corresponent de les proteïnes d'interès seleccionades**

Per tal de conèixer, o en el seu cas validar, el patró d'expressió del gens corresponents a les quatre proteïnes seleccionades es van realitzar anàlisis mitjançant Northern blot de mostres d'RNA obtingudes d'inflorescències, fulles i fruits en diferents estadis de desenvolupament i maduració.

Per tal de poder preparar les sondes per a cada gen es van obtenir els clons de cDNA corresponents de FSP (FC17DB05), ASRP1 (FC19AB12), 17,7 HSP (FC06BB07), i TIL' (LEFL2006M03) disponibles en el *Kazusa DNA Research Institute* ([www.kazusa.or.jp](http://www.kazusa.or.jp)). El cDNA de TIL no es trobava accessible en aquell moment de manera que es va utilitzar com a sonda la seqüència de TIL' i que presenta una elevada similitud amb TIL (veure més endavant, en l'apartat 2.1, Figura R 36). No obstant, aquest fet feia que no es pogués determinar a priori si el transcrit detectat corresponia a TIL i/o TIL'.

Els resultats del Northern blot, presentats en la Figura R 35, van indicar que l'expressió de FSP, 17,7-HSP i ASRP era específica de fruit ja que els seus transcrits no es detectaven ni en flors ni en fulles. En el cas de TIL/TIL' es va detectar expressió en fruit i

també en flors i en fulles, si bé, tal com s'ha indicat anteriorment, no es podia determinar si el(s) transcrit(s) detectat(s) corresponien a TIL, TIL' o bé a una mescla dels dos. Cal ressaltar que en tots el casos però, l'expressió en fruit s'induïa fortament durant el procés de maduració, indicant que aquestes proteïnes tenen possiblement un paper rellevant en el procés de maduració del fruit.

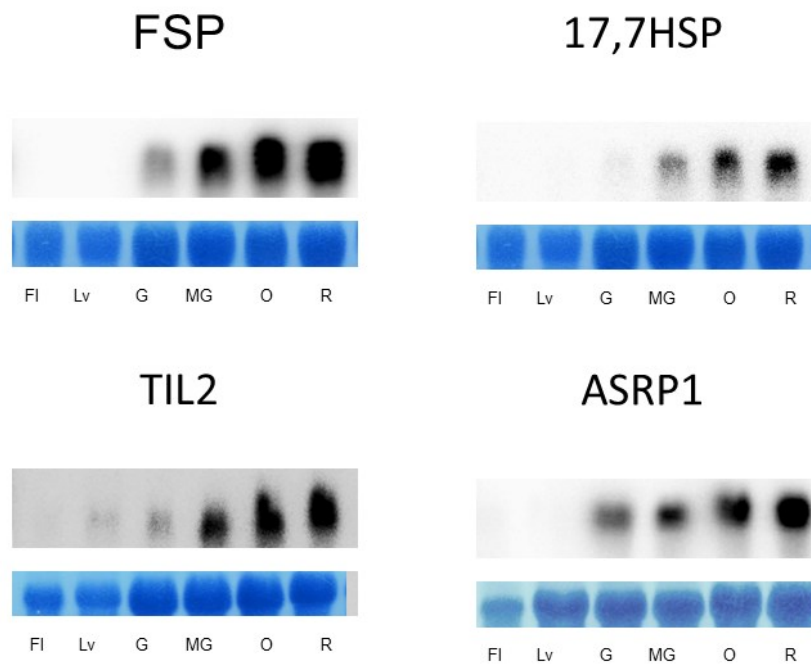


Figura R 35. Anàlisi de l'expressió del transcrits corresponents a les proteïnes FSP, 17,7-HSP, TIL/TIL' i ASRP mitjançant northern blot. En el cas de TIL/TIL' es va utilitzar com sonda seqüència de TIL'. FSP (Fruit-specific protein), 17,7-HSP (17,7 Class I small heat shock protein), ASRP (Abscisic stress-ripening protein 1), TIL/TIL' (Temperature-induced lipocalin/Temperature induced lipocalin'). FI, flor; Lv, fulla; G, tomàquet verd; MG, verd madur ; O, tomàquet Breaker (Orange); R, Vermell madur

## **2. Caracterització de les proteïnes *Temperature-induced***

### ***Lipocalin de tomàquet.***

Una de les proteïnes identificades en la caracterització dels complexos proteïna-carotenoid descrits en l'apartat anterior era la proteïna anotada com *Temperature-induced Lipocalin* (TIL). Tenint en compte que una de les característiques que haurien de tenir les proteïnes que formessin part d'aquests complexos és la capacitat d'unir-se a carotenoides, la TIL era d'interès potencial ja que les lipocalines engloba una família de proteïnes que participen en la unió i transport de molècules hidrofòbiques. Les lipocalines estan presents en tots els dominis taxonòmics, i es caracteritzen per posseir una elevada similitud de caire estructural que no sempre es reflecteix en la seva seqüència primària (Flower 1996, Grzyb *et al.* 2006).

#### **2.1 Caracterització *in silico* de les TIL de tomàquet**

En el tomàquet s'han descrit dos unigens (SGN-U581468 i SGN-U578306) que codifiquen per dues variants de TIL que presenten una elevada similitud entre elles i que en el seu moment van ser anomenades TiL i TiL' (Charron *et al.* 2005). En el present treball, i partir d'aquí, les proteïnes TIL i TiL' de tomàquet s'anomenaran *S/TIL1* i *S/TIL2* respectivament. La seqüència dels cDNAs i la de les proteïnes corresponents a *S/TIL1* i *S/TIL2* es mostren en les Figura R 36. Els cDNA codifiquen per a les proteïnes *S/TIL1* i *S/TIL2*, que, tal com s'observa en la Figura R 37, contenen 185 aminoàcids i tenen masses moleculars predites de 21,5 kDa i 21,3 kDa respectivament. Les dues proteïnes mostren una identitat del 84,3 % i una similitud del 90,3 % entre elles.

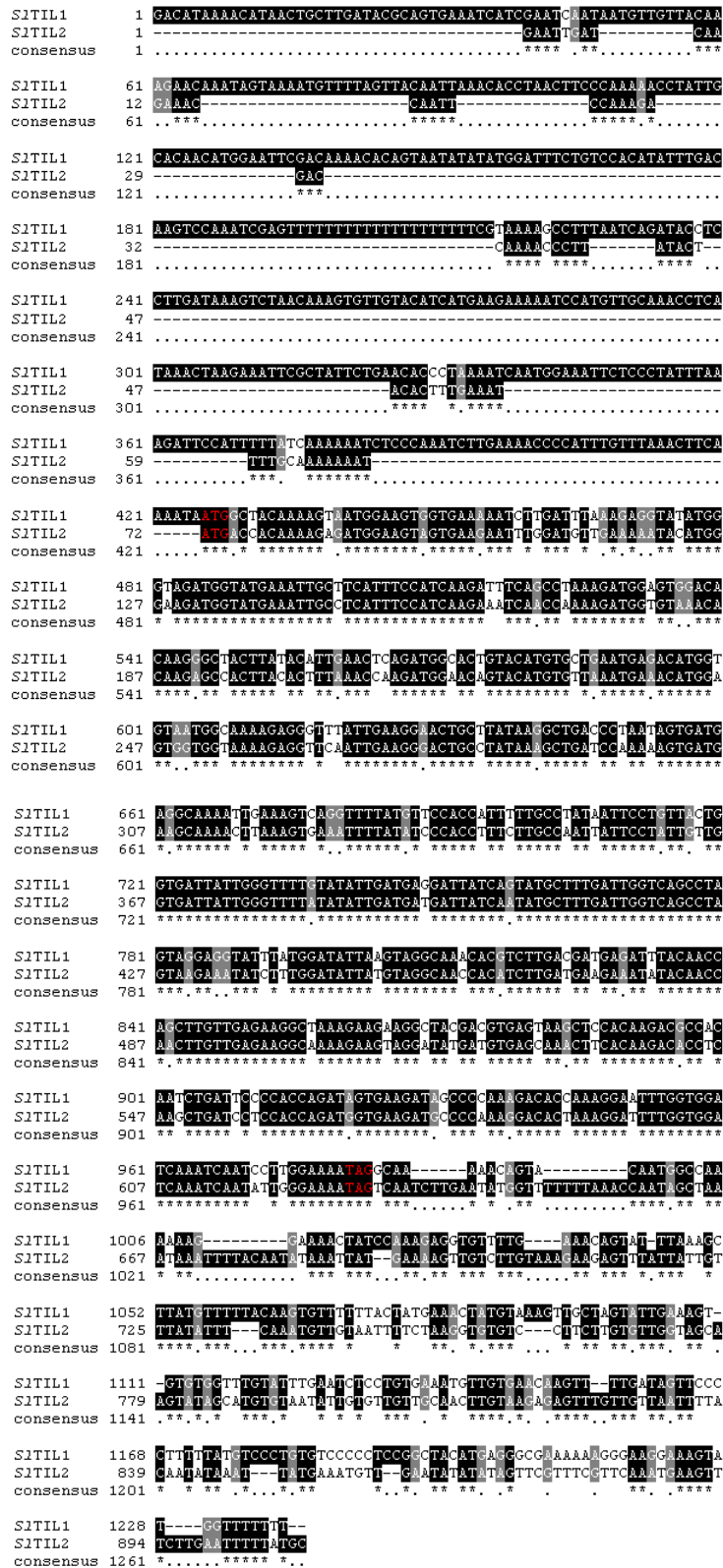


Figura R 36 Alineament de la seqüència de nucleòtids dels unigens SGN-U581468 i SGN-U578306 que codifiquen per a les proteïnes de *S1TIL1* i *S1TIL2* respectivament. Els codons d'inici de traducció (ATG) i de parada (TAG) s'indiquen en vermell.

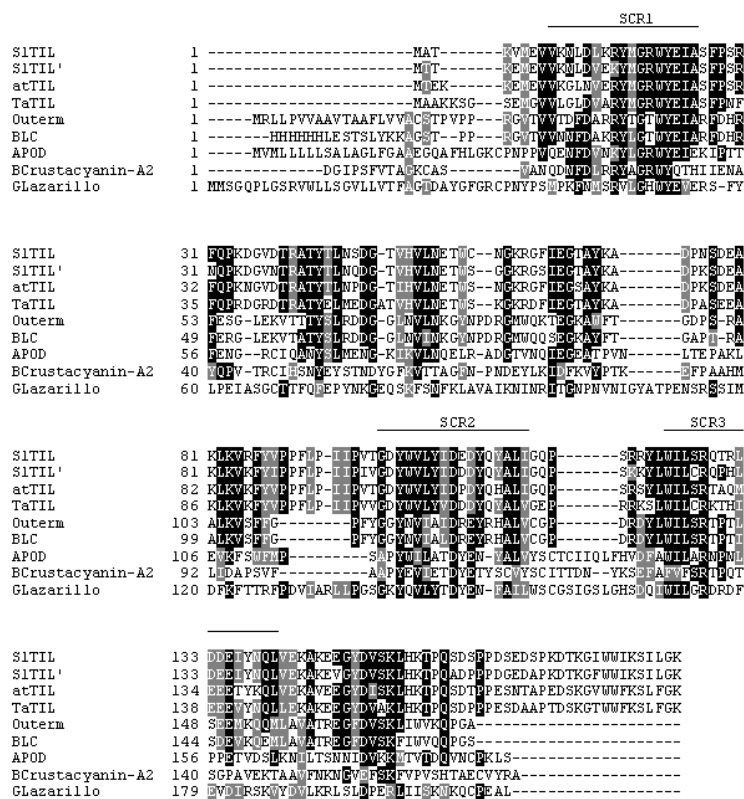


Figura R 37 Predicció d'estructura secundària de les proteïnes Temperature-induced Lipocalin (*S/TIL*), Temperature-induced Lipocalin' (*S/TIL'*) i Temperature-induced Lipocalin d'*Arabidopsis thaliana* (*AtTIL*). Fletxes blaves, lamines β, numerades segons el consens de la família lipocalina; requadres taronges, hèlix-α. Seqüència de lletres verdes lloc predit de N-glicolització; **T** i **S**, llocs predits de O-GlcNAc; **FLPII**, seqüència hidrofòbica en un loop; **G**, possible lloc d'unió a glicosil fosfatidil inositol

*S/TIL1* i *S/TIL2* presenten una elevada similitud amb la TIL d'*Arabidopsis thaliana* (*AtTIL*) (Figura R 37). Aquesta proteïna va ser identificada durant estudis relacionats amb la resposta d'aquesta planta de xoc tèrmic (Charron et al. 2002) i més recentment ha estat implicada en la resposta a estrès oxidatiu i adaptació a termotolerància (Charron et al. 2008, Chi et al. 2009). *AtTIL* mostra una similitud del 78,5% i del 75,8 % amb *S/TIL1* i *S/TIL2*, respectivament (Figura R 37). La predicció de motius per a *S/TIL1* i *S/TIL2* coincideixen amb als descrits per la seqüència secundària de l'*AtTIL* (Charron, et al. 2005). Tal com es mostra en la Figura R 37, les TIL de tomàquet i la d'*Arabidopsis* mostren els motius estructurals que les defineixen com a membres de la família de les lipocalines. En la Figura R 37 es pot observar la disposició de les 8 làmines-β, que estructuralment formen un barril amb un nucli molt hidrofòbic al seu interior, i que estan flanquejades per una curta hèlix 3<sup>10</sup> a l'extrem N-terminal i dues hèlix α al extrem C-terminal. A més, les tres proteïnes posseeixen una novena lamina-β en la regió C-terminal que també es troba descrita en altres membres de la família de les lipocalines (Grzyb, et al. 2006).

En la Figura R 38 es mostra l'alineament de *SITIL1* i *SITIL2* amb altres lipocalines i el corresponent arbre filogenètic. Es pot observar que la proteïna més pròxima a *SITIL1* i *SITIL2* és *AtTIL*. Per tant, és possible que aquestes proteïnes puguin desenvolupar una funció semblant. Encara que no es coneix la funció concreta d'*AtTIL* es pot pensar que de forma semblant a la resta de les lipocalines aquesta podria estar relacionada amb la unió a lligants amb caràcter hidrofòbic.

A



B

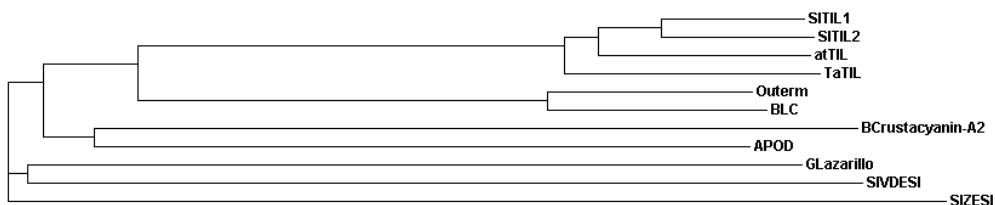


Figura R 38. A) Comparació d'estructura primària de les proteïnes Temperature-induced Lipocalin 1 (*SITIL1*) i Temperature-induced Lipocalin 2 (*SITIL2*) amb representants de la família lipocalina. Marcat a la figura els tres marcadors de seqüència de la família lipocalines anomenats SCR (short conserved regions). B) Arbre filogenètic de les proteïnes. *AtTIL*, Temperature-induced Lipocalin, *Arabidopsis thaliana*; *Outerm*, Outer membrane Lipocalin, *E. coli*; *BLC*, Bacterial membrane bound bacterial *E. coli*; *APOD*, Apoproteïna D, *Homo sapiens*; *BCrustacyanin*, *Homarus gammarus*; *GLazarillo*, *Schistocerca americana*; *ZESI*, Zeaxanthin Epoxisase, *Solanum lycopersicum*; i *VDES* Violaxantin Epoxidase, *S. lycopersicum*.

Es coneix que moltes lipocalines tenen tendència a estar unides o associades a membranes cel·lulars (Grzyb, *et al.* 2006). En el cas de *AtTIL* s'ha descrit la seva associació a la membrana plasmàtica (Charron, *et al.* 2005, Chi, *et al.* 2009). Malgrat que no es coneix de quina manera *AtTIL* s'associaria amb la membrana plasmàtica, si que s'han descrit diferents mecanismes d'interacció d'algunes lipocalines eucariòtiques amb membranes (Grzyb, *et al.* 2006). D'acord amb aquests mecanismes, l'anàlisi de la seqüència aminoacídica d'*AtTIL*, *STIL1* i *STIL2* mostra dos possibles tipus d'associació a la membrana. Un d'ells podria estar mediat per una petita regió hidrofòbica (FLPII) localitzada entre les lamines  $\beta$  5 i 6 equivalent a la present en l'ApoD humana (Figura R 37). Per tal d'avaluar aquesta possibilitat es va realitzar un estudi de modelització de les proteïnes *STIL1* i *STIL2*. Els resultats obtinguts (Figura R 39) van indicar que aquest domini hidrofòbic quedava també exposat en aquestes proteïnes i que, per tant, podria representar un domini d'interacció amb la membrana equivalent al postulat en la ApoD humana.

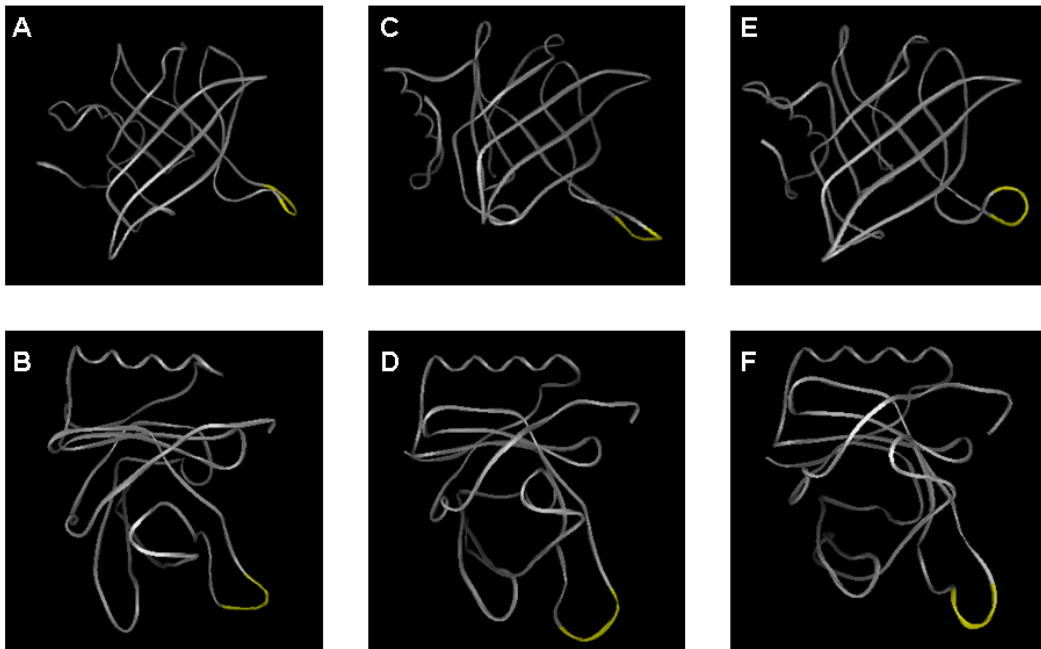


Figura R 39. Prediccions estructurals de *STIL1* (A i B), *STIL2* (C i D) i *AtTIL* (E i F) per el programa ESyPred3D. La posició del domini FLPII s'indica en color groc.

L'altra possible mecanisme d'interacció de les TIL amb membranes podria ser a través de l'addició d'un residu de glicosil fosfatidil inositol, de forma equivalent al que s'ha descrit en la proteïna lazarillo del insecte *Schistocerca americana*. En la Figura R 37 es pot observar que SITIL1 i SITIL2 posseeixen un residu d'àcid aspàrtic 168 potencialment capaç de patir aquesta modificació post-traduccional en base a la predicció donada pel programa de localització de modificacions GPI "*big-PI Plant Predictor*" (Materials i Mètodes 6.1). En el cas d'AtTIL, tot i que no posseeix el residu àcid aspàrtic homòleg a les SITIL, el programa assigna amb més probabilitat la possible modificació d'un aminoàcid proper: la serina 167. Curiosament aquest aminoàcid es conserva en SITIL1 (serina 166), però no en SITIL2.

Independent de la seva possible associació a la membrana plasmàtica, els nostres resultats indicaven la presència de SITIL1 i/o SITIL2 en els cromoplastes. Aquests resultats contrasten amb el fet que tant SITIL1 com SITIL2 no presenten cap pèptid de trànsit als plastids. S'ha descrit recentment però que algunes proteïnes importades als cloroplasts no contenen pèptids de transit, fet que està d'acord amb l'existència de mecanismes alternatius de translocació proteïnes al interior d'aquest orgànul. En aquest sentit, el fet que s'hagin descrit proteïnes glicosilades al interior del cloroplasts indicaria que aquestes proteïnes s'incorporarien als plàstids posteriorment al seu pas pel reticle endoplasmàtic o al sistema de Golgi (Jarvis 2008). És interessant ressaltar que tant AtTIL com SITIL1 i SITIL2 contenen llocs potencials de glicosilació. Un d'ells és l'asparagina 56, que es troba en un context de marcador de N-glicosilació (NETW) d'acord amb la predicció del programa "*Motif Scan*" (Materials i Mètodes 6.1) (Figura R 37). A més, el programa "*YinOYang 1.2*" que determina llocs de glicosilació de tipus O-linked N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) prediu diversos residus de serina i treonina com a possibles dianes de glicosilació (Materials i Mètodes 6.1). Entre ells la serina 141 i la treonina 99 són els que presenten una major probabilitat de ser glicosilats (Figura R 37).

## **2.2 Estudi de l'expressió de SITIL1 i SITIL2.**

L'anàlisi de l'expressió de les TIL mostrat en l'apartat 1.5 no permet discriminar si la inducció observada durant la maduració del fruit era deguda a SITIL1 o SITIL2, o bé si s'expressaven conjuntament. Per tal d'estudiar l'expressió individual de SITIL1 i SITIL2 es va utilitzar la tècnica de SQ-PCR aplicada anteriorment en els estudis de les SABP2 (Apartat 4.1 del capítol I)



En aquest cas també, i tenint en compte la gran similitud entre la seqüències dels transcrits de *S/TIL1* i *S/TIL2*, es va utilitzar un primer *forward* comú i un segon primer *reverse* específic per a cada TIL. El disseny dels primers en l'extrem 5' dels gens va ser determinat per la falta d'informació de la 3'UTR de *S/TIL2*. Durant el procés de selecció de primers es van realitzar un total de 2 primers *forward*, 4 primers *reverse* de *S/TIL1* i 2 primers *reverse* de *S/TIL2* degut que en la 5' UTR d'aquests gens existeixen una gran quantitat de A-T i la seqüència conté petites zones duplicades que provocaven el mal alineament de certs primers amb l'aparició de dobles fragments per cada gen (Figura R 36).

Després de provar totes les combinacions possibles, es va optar per utilitzar el primer *forward* comú TILFRT (5'-ATG CTT TGA TTG GTC AGC CTA G-3') i com a primers *reverse* el *S/TIL1RT4* per a *S/TIL1* (5'-TTG TTC ACA ACA TTT CAC AGG AG-3') i *S/TIL2RTR2* per a *S/TIL2* (5'-CAA CAA ACT CTC TTA CAA GTT GC-3'). Les seqüències amplificades amb cada parella de primers va ser seqüenciada utilitzant el primer TILFRT. Els resultats obtinguts van mostrar que els fragments amplificats eren específics de cada TIL. Es van utilitzar mostres de RNA total de fulla (L) i de fruits en 4 estadis de desenvolupament i maduració: verd immadur (G), verd madur (MG), *breaker* (O) i vermell madur (R). Els resultats obtinguts es mostren en la Figura R 40. Es pot observar que *S/TIL1* s'expressa a nivells relativament baixos en la fulla i en el fruit ver immadur, mentre que s'indueix fortament i de forma progressiva durant el procés de maduració del fruit. Pel contrari, *S/TIL2* s'expressa a nivells relativament alts en la fulla i mostra només una lleugera inducció durant la maduració. Aquests resultats suggereixen per tant que *S/TIL1* pot tenir un paper rellevant durant la maduració del fruit.

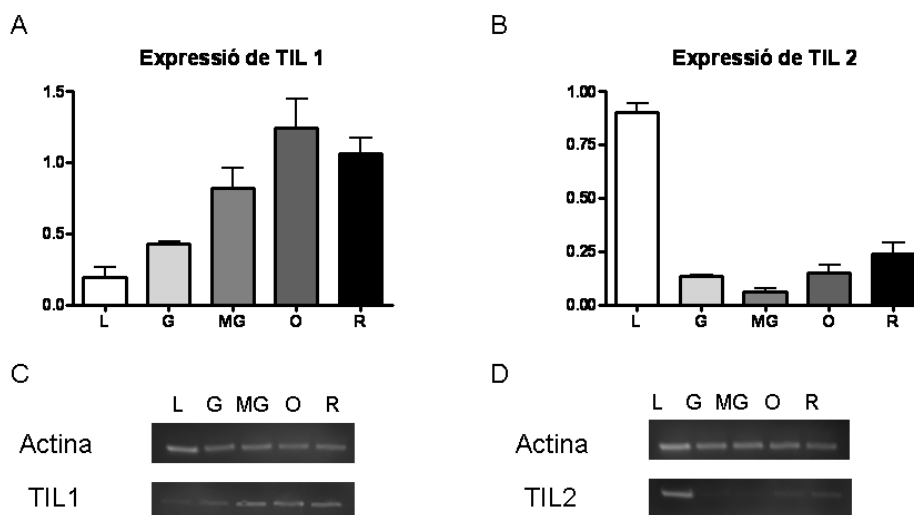


Figura R 40. Nivells d'expressió de *S/TIL1* i *S/Til2* per SQ-PCR. A) valors relatius a l'expressió de *S/TIL1*. B) valors relatius a l'expressió de *S/TIL2*. C) exemple de l'expressió de *S/TIL1* respecte el control actina. D) exemple de l'expressió de *S/TIL2* respecte el control actina. L; fulla, G; Verd immadur, MG; Verd madur, O; tomàquets breaker s, R. n=4

### 2.3 Detecció dels nivells de proteïna TILs en la maduració del fruit del tomàquet.

Per tal de comprovar si l'increment dels nivells de l'mRNA de *S/TIL1* correlacionava amb un increment paral·lel dels nivells de proteïna es va utilitzar la tècnica de western blot emprant un anticòs generat contra la proteïna *AtTIL* i cedit pel grup del doctor Charng (Chi, *et al.* 2009). Malgrat que *S/TIL1* presenta una similitud amb *AtTIL* més gran que *S/TIL2*, es possible que aquest anticòs pugui reconèixer simultàniament *S/TIL1* i *S/TIL2*. Per tal de realitzar aquestes anàlisi es van preparar mostres de proteïna de fulla i de fruits en diferents estadis de desenvolupament i maduració.

En la Figura R 41 es mostren els resultats obtinguts. Es pot observar que la intensitat de la banda corresponent a una mida 22-23 kDa (compatible amb la massa molecular teòrica predita per *S/TIL1* i *S/TIL2*) es escassament detectable en fulla i en fruit verd però incrementa notablement durant la maduració del fruit. A mida que augmenta la intensitat de la banda de 22-23 kDa s'observa l'aparició d'una segona banda de 20-21 kDa. Si es considera que la banda de 22-23 kDa correspon a *S/TIL1/2* es possible que la banda de 20-21 kDa pugui correspondre a una altra proteïna detectada de forma inespecífica o be a un fragment de degradació. Tanmateix, en el cas de la mostra de fulla es detecta una banda

de massa molecular més gran (aproximadament 36 kDa) que possiblement es tracti d'una banda inespecífica.

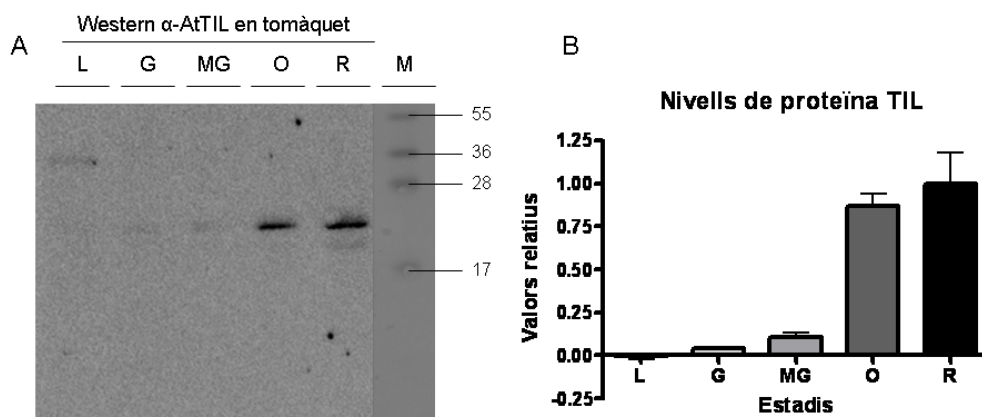


Figura R 41. A) Western blot de fulla i diferents estadis de desenvolupament de tomàquet realitzat amb l'anticòs  $\alpha$ -A $t$ TIL utilitzant 15  $\mu$ g de proteïna per carril. B) Nivells de proteïna en el western blot (n=3). L; fulla, G; Verd immadur, MG; Verd madur, O; tomàquets breaker s, R.

Considerant en conjunt els resultats obtinguts en l'estudi de l'expressió de *S/TIL1* i *S/TIL2* a nivell d'mRNA i de proteïna confirma la hipòtesi que *S/TIL1* pugui tenir un paper important durant la maduració del fruit.

#### 2.4 **Detecció de TILs en l'extracte de cromoplastes.**

Tal com s'ha comentat anteriorment, *S/TIL1* no presenta cap pèptid de transit a plastids. Malgrat tot, *S/TIL1/2* s'ha detectat reiteradament en aquest orgànul en diferents estudis de proteòmica de cromoplastes de tomàquet (Barsan *et al.* 2010) (Petruzzo i Boronat, resultats no publicats). Aquest fet indica que malgrat l'absència d'un pèptid de trànsit a plastids *S/TIL1/2* podria translocar o associar-se al cromoplastes. Per tal de confirmar la presència de *S/TIL1/2* en cromoplastes aïllats es va procedir a detectar-la en diferents etapes del procés d'extracció i purificació mitjançant western blot i l'anticòs anti-A $t$ TIL utilitzat en l'apartat anterior.

El protocol per a la purificació de cromoplastes es descriu en detall en l'apartat 4.4 de Materials i Mètodes. Per tal de poder identificar les mostres analitzades a continuació es descriu tot seguit i de forma breu les principals etapes del procés de purificació de cromoplastes de fruit de tomàquet. Primerament es procedeix a l'homogeneïtzació del pericarp seguit d'un pas de filtració en gasa per eliminar les restes de teixit no trencat. A

continuació, aquest filtrat (F) es centrifugat a 500xg per recuperar la fracció orgànul·lar (FO) que conté els cromoplastes. Després d'una etapa de rentat, la fracció orgànul·lar es carrega en un tub d'ultracentrífuga que conté blocs de sacarosa al 15, 30, 40 i 50%. Finalment es procedeix a una etapa de centrifugació a 28.000xg i els cromoplastes es recuperen en les interfases 15/30%, 30/40% i 40/50% (Figura R 42A).

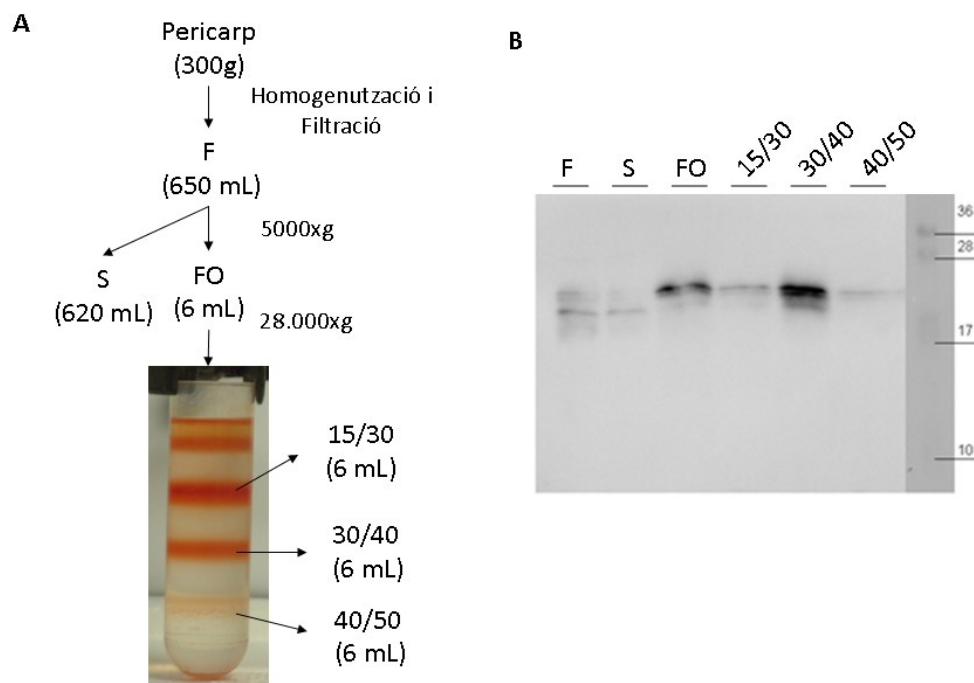


Figura R 42. A) Esquema experimental. 300g de tomàquet van ser homogeneïtzats per tal d'extreure els cromoplastes. F és l'homogenat filtrat. S i Fo corresponen respectivament al sobrenedant i a la fracció organelar obtinguts després de la centrifugació a 5000xg. 15/30, 30/40 i 40/50 indiquen les fraccions de cromoplastes presents en les interfases corresponents (Materials i Mètodes 4.4). B) Anàlisi mitjançant western blot de les diferents indicades en A. El gel utilitzat contenia un 18 % d'acrilamida.

En la fracció orgànul·lar i en les corresponents als cromoplastes purificats s'observa un patró de bandes semblants, sent més intensa la corresponent a una mida de 22-23 kDa (Figura R 42B). Aquests resultats contrasten amb els obtinguts en les mostres corresponents a l'homogenat filtrat i al sobrenedant de la fracció orgànul·lar, on la banda més intensa correspon a la de 20-21 kDa. En aquestes mostres es detecta també una banda addicional de 18-19 kDa, que possiblement es tracti d'una banda inespecífica o d'un fragment de degradació de TIL. És interessant ressaltar que la banda de 22-23 kDa, que possiblement correspon a la TIL intacta, s'enriqueix considerablement tant en la fracció orgànul·lar com en les fraccions de cromoplastes purificats, i molt especialment en la corresponent a

30/40%. Si es té en compte que l'homogenat filtrat pot contenir productes de degradació de la *S/TIL*, el patró de bandes obtingut en la fracció orgànul·lar i en els cromoplastes purificats indicaria que els cromoplastes contenen una proporció important de *S/TIL* intacta.

## 2.5 **Estudi de la localització de les proteïnes *S/TIL1* i *AtTIL***

Per tal d'estudiar la localització subcel·lular detallada de *S/TIL1* i *AtTIL* es va procedir a expressar variants d'aquestes proteïnes fusionades a la proteïna fluorescent groga (Yellow Fluorescent Protein, eYFP ) de forma transitòria en fulles de *Nicotiana benthamiana* i observar la distribució intracel·lular de la fluorescència mitjançant microscopia làser confocal.

Per a l'expressió transitòria en *N. benthamiana* es va utilitzar la tècnica d'agroinfiltració, basada en posar en contacte cultius d'*Agrobacterium tumefaciens* que contenen un plàsmid Ti en el qual es troba la regió codificant del gen d'interès sota el control d'un promotor que s'expressi activament en els teixit infectat (en aquest cas la fulla). Per augmentar l'eficiència d'expressió del transgen es coinfestat amb una soca d'*A. tumefaciens helper* que expressa la proteïna de potivirus anomenada *Helper Component-Proteinase* (HC-PRO) (Llave *et al.* 2000). Aquesta proteïna interfereix en el silenciament posttranscriptional de gens (*posttranscriptional gene silencing* o PTGS) de *N. benthamiana*.

De forma prèvia a l'agroinfiltració es va procedir a preparar una sèrie de construccions en les que la regió codificant de *S/TIL1* i *AtTIL* es fusionava en fase amb la regió codificant de la proteïna eYFP. La regió codificant de *S/TIL1* i *AtTIL* es va amplificar mitjançant PCR i el producte obtingut es va clonar inicialment en el vector pENTR-D-TOPO mitjançant la reacció de la topoisomerasa. Posteriorment els clons positius es van recombinar amb vectors que contenen la seqüència codificant de la eYFP. Els vectors utilitzats van ser el pEarlyGate 101 (CD3-683) que permet la fusió amb eYFP en posició C-terminal i pEarlyGate 104 (CD3-684) en el que la eYFP queda en posició N-terminal (Earley *et al.* 2006).

Per una part, la regió codificant de *S/TIL1* va ser amplificada mantenint el codó de parada i clonada en el vector pEarleyGate 104 per obtenir la construcció eYFP:*S/TIL1*. Per altra part, la regió codificant de *S/TIL1* es va amplificar eliminant el codó de parada per a poder clonar-la en fase amb la regió codificant de eYFP en el vector pEarleyGate 101 per obtenir la construcció *S/TIL1*:eYFP (Figura R20). Les construccions equivalents per *AfTIL* es van obtenir de la mateixa forma i van ser anomenades eYFP:*AfTIL* i *AfTIL*:eYFP, respectivament. Un cop confirmades per seqüenciació, les construccions obtingudes van ser introduïdes en la soca d'*A. tumefaciens* C58 GV2260.

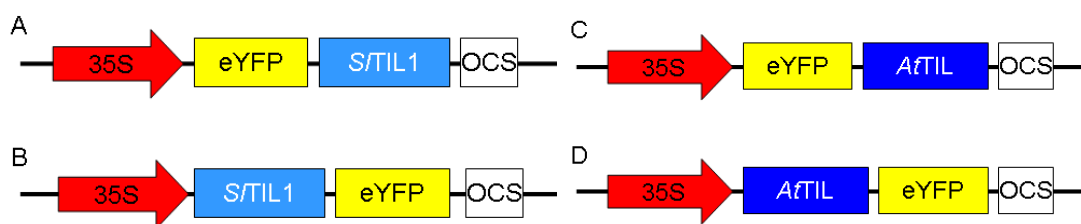


Figura R 43. Estructura de les construccions de Localització en *N. benthamiana*. A) eYFP:*S/TIL1*; B) *S/TIL1*:eYFP; C) eYFP:*AfTIL*; i D) *AfTIL*:eYFP.

Els cultius de les soques d'*A. tumefaciens* contenint les construccions d'interès van ser utilitzats per infiltrar fulles de *N. benthamiana* de plantes de 4-6 setmanes conjuntament amb un cultiu d'*A. tumefaciens* helper HC-PRO. Les plantes infiltrades es van mantenir en un regim de 16 h de llum 8 h de fosc en un hivernacle amb alta humitat fins al moment de la presa de mostres per a l'observació al microscopi confocal.

En la Figura R 44 es presenten els perfils de localitzacions dels diferents plans de cèl·lules que expressen les construccions eYFP:*S/TIL1* i *S/TIL1*:eYFP. En la Figura R 45 es mostren les localitzacions de les proteïnes eYFP:*AfTIL*, *AfTIL*:eYFP.

Com es pot observar en les imatges mostrades en la Figura R 44 i la Figura R 45 el patró de localització de les variants de les proteïnes TIL analitzades és clarament de membrana i presenta també una acumulació característica en petites estructures globulars. El patró amb les proteïnes TIL és clarament diferent del de la eYFP, que, tal com està descrit, es localitza al citosol i al nucli (Figura R 46). La localització subcel·lular de les variants de les proteïnes TIL estudiades és independent de la presència de eYFP en posició N- o C-terminal.

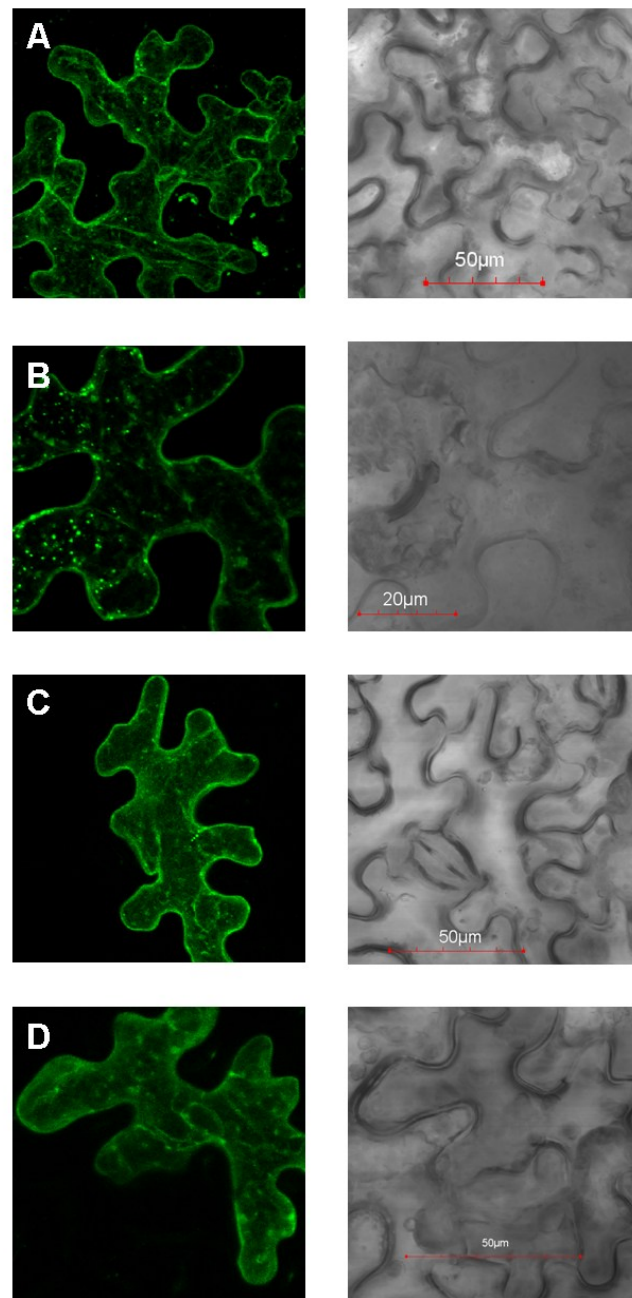


Figura R 44 Projeccions de diferents plans de de la fluorescència detectada en cèl·lules epitelials de *N. benthamiana* en fulles agroinfiltrades amb soques d'*A. tumefaciens* portadores de les següents construccions: A i B) eYFP:SITIL1; C i D) *SITIL1*:eYFP al cap de 3 dies post-infiltració.

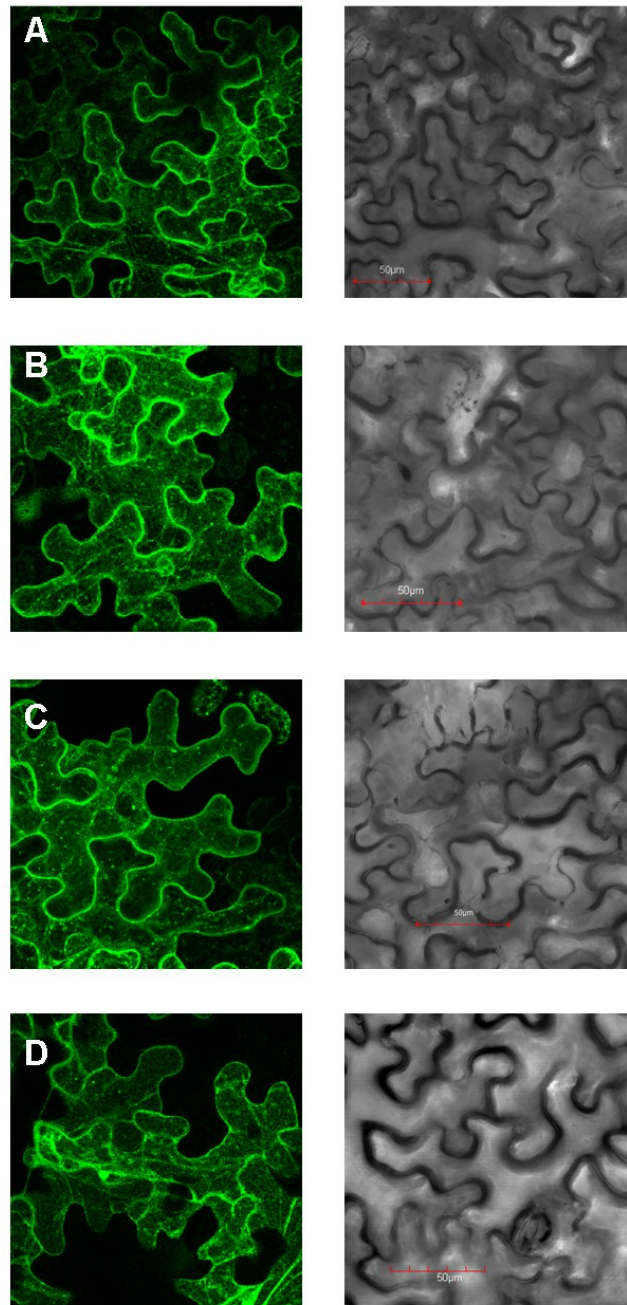


Figura R 45 Projeccions de diferents plans de la fluorescència detectada en cèl·lules epitelials de fulles de *N. benthamiana* agroinfiltrades amb soques d'*A. tumefaciens* portadores de les següents construccions: A i B) eYFP:AtTIL; C i D) AtTIL:eYFP al cap de 3 dies post-infiltració.



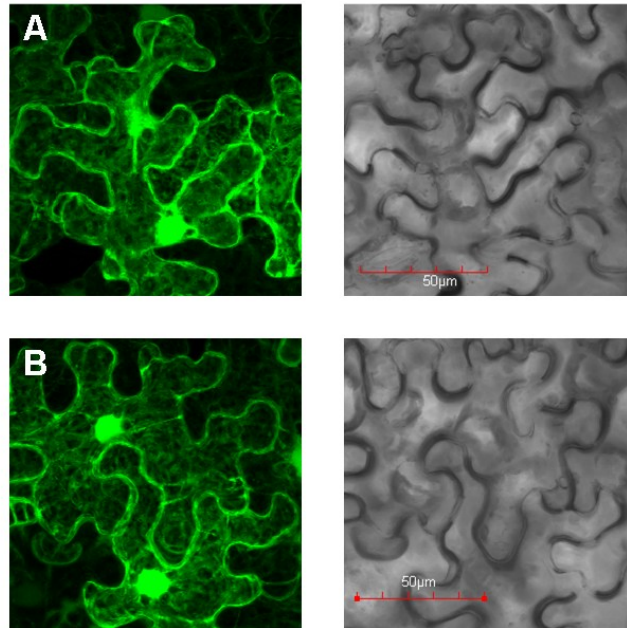


Figura R 46 Projeccions de diferents plans de la fluorescència detectada en cèl·lules epitelials de fulles de *N. benthamiana* agroinfiltrades amb una soca d'*A. tumefaciens* portadora de la construcció eYFP (A i B) ( 3 dies post-infiltració).

Per tal d'estudiar amb més detall el patró de localització intracel·lular de les proteïnes eYFP:*S/TIL1*, *S/TIL1*:eYFP, eYFP:*AtTIL* i *AtTIL*:eYFP es va procedir a co-expressar-les amb marcadors subcel·lulars de la família Nelson-Nebenführ (Nelson, *et al.* 2007). Els marcadors escollits es trobaven units a la proteïna eCFP. Les co-expressions amb *S/TIL1* (Figura R 47 i la Figura R 48) i *AtTIL* (Figura R 49 i Figura R 50) mostren el mateix patró i de forma general els resultat obtinguts indicarien que les proteïnes quimèriques analitzades colocalitzen amb tonoplast, reticle endoplasmàtic, mitocondris, aparell de golgi, peroxisomes i membrana plasmàtica. De forma sorprenent, no es va detectar localització directa en els cloroplasts, però sí una associació d'aquests a vesícules.

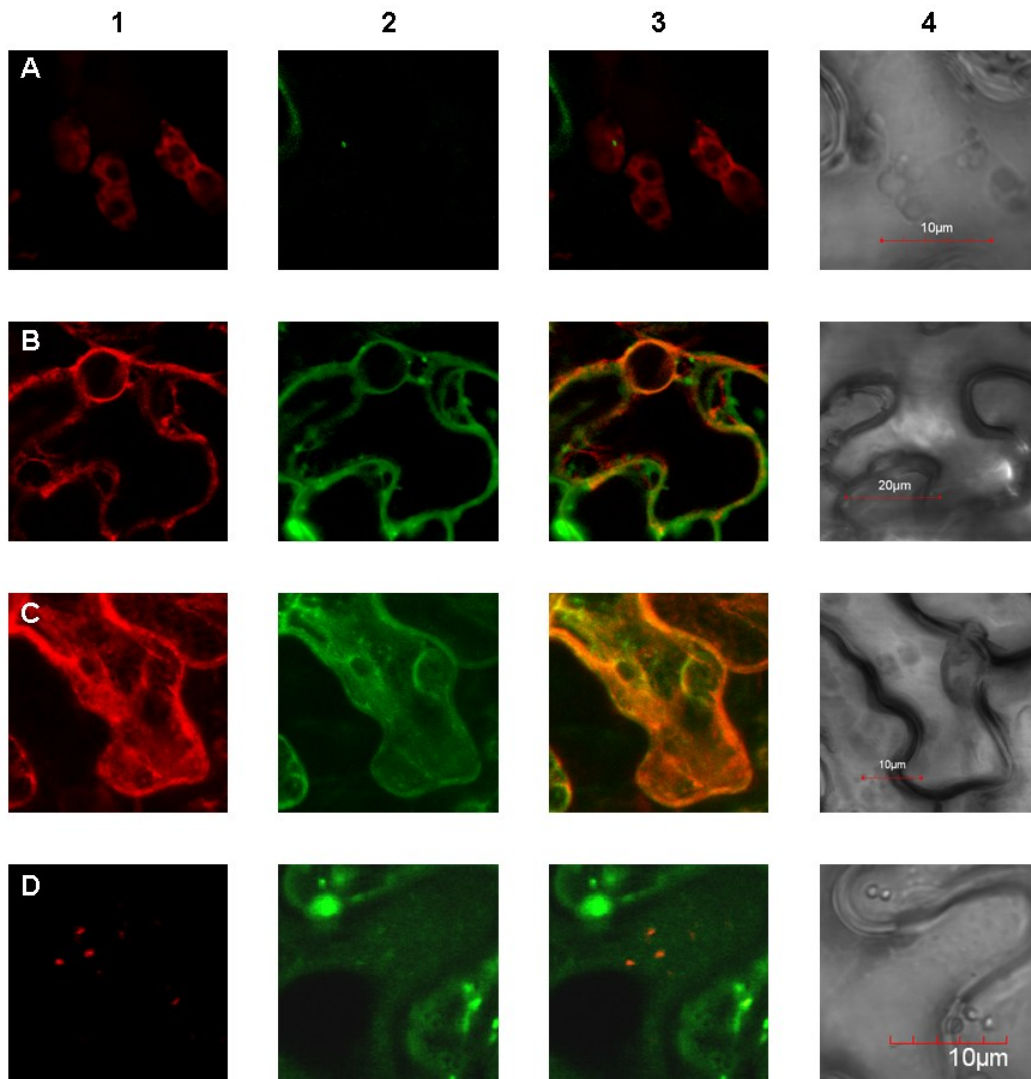


Figura R 47 Co-localització de *STIL1:eYFP* amb diferents marcadors intracel·lulars en cèl·lules epitelials de fulles de *N. benthamiana* agroinfiltrades. 1. Marcadors de localització units a eCFP pertanyents a la família Nelson-Nebenführ (Nelson *et al.* 2007) de cloroplasts (A); Tonoplast (B), Reticle endoplasmàtic (C) i mitocondris (D). 2. Localització de la proteïna *STIL1:eYFP*. 3 sobreexposició dels Canals 1 i 2. 4. Il·lum transmesa. En les imatges B i C es mostra la projecció de diferents plans.

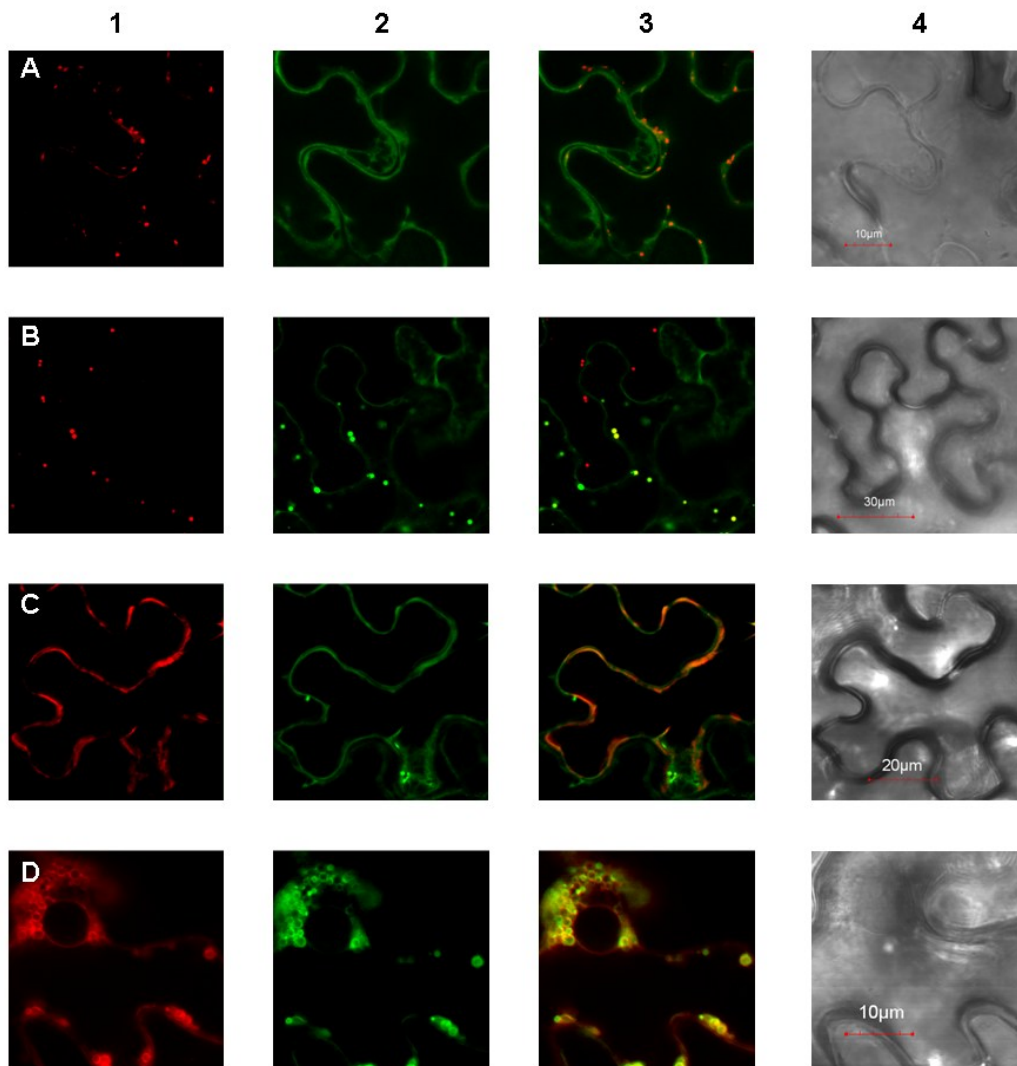


Figura R 48 Co-localitzacions de *STIL1:eYFP* amb diferents marcadors intracel·lulars en cèl·lules epitelials de fulles de *N. benthamiana* agroinfiltrades. 1. Fluorescència associada als marcadors de localització units a eCFP pertanyents a la família Nelson-Nebenführ (Nelson, *et al.* 2007) d'Aparell de Golgi (A); Peroxisoma (B), Membrana plasmàtica tres dies post infecció (C) i Membrana plasmàtica vuit dies post infecció (D). 2. Localització de la proteïna *STIL1:eYFP*. 3 sobreexposició dels Canals 1 i 2. 4. Il·lum transmesa.

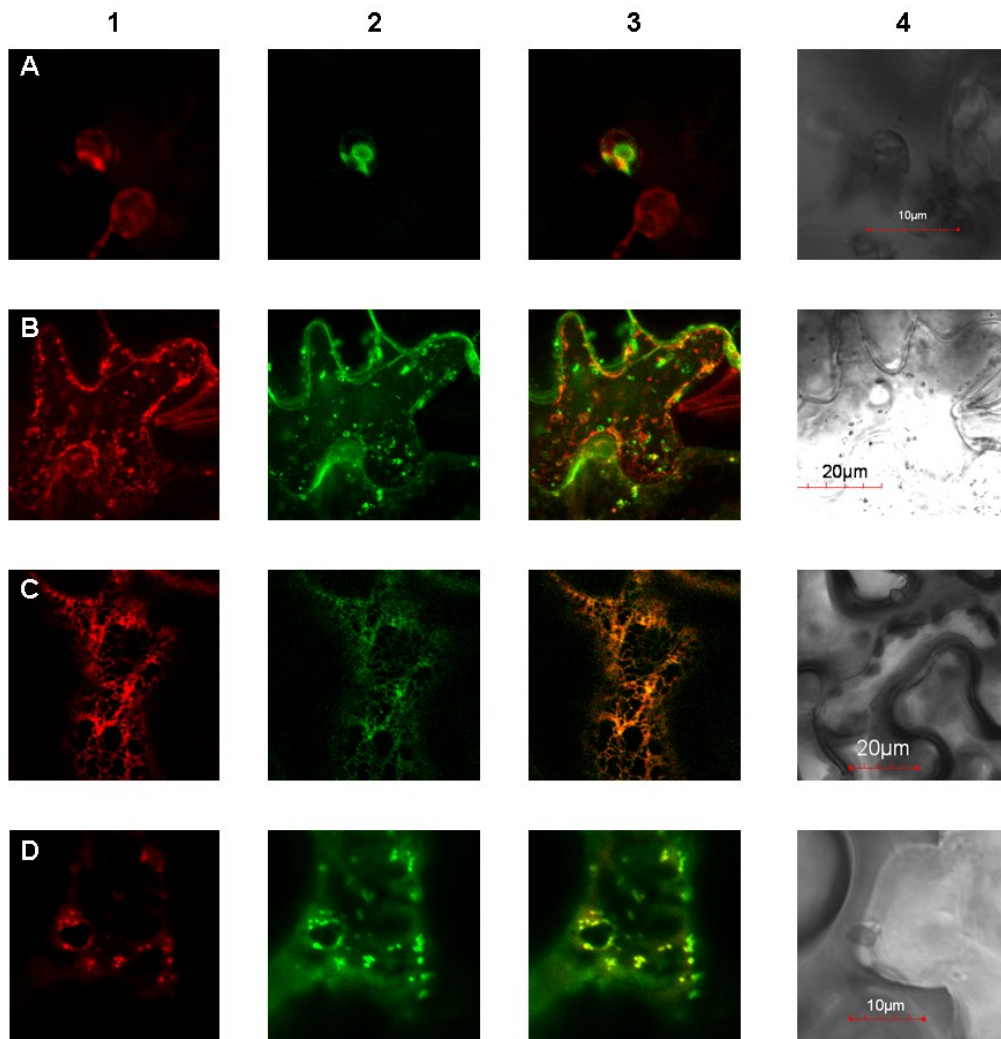


Figura R 49 Co-localitzacions de eYFP:AtTIL amb diferents marcadors intracel·lulars en cèl·lules epitelials de fulles de *N. benthamiana* agroinfiltrades. 1. Marcadors de localització units a eCFP pertanyents a la família Nelson- Nebenführ (Nelson, *et al.* 2007) de cloroplasts (A); Tonoplast (B), Reticle endoplasmàtic (C) i mitocondris (D). 2. Localització de la proteïna eYFP:AtTIL. 3 sobreexposició dels Canals 1 i 2. 4. Il·lum transmesa. En les imatges B i C es mostra la projecció de diferents plans.

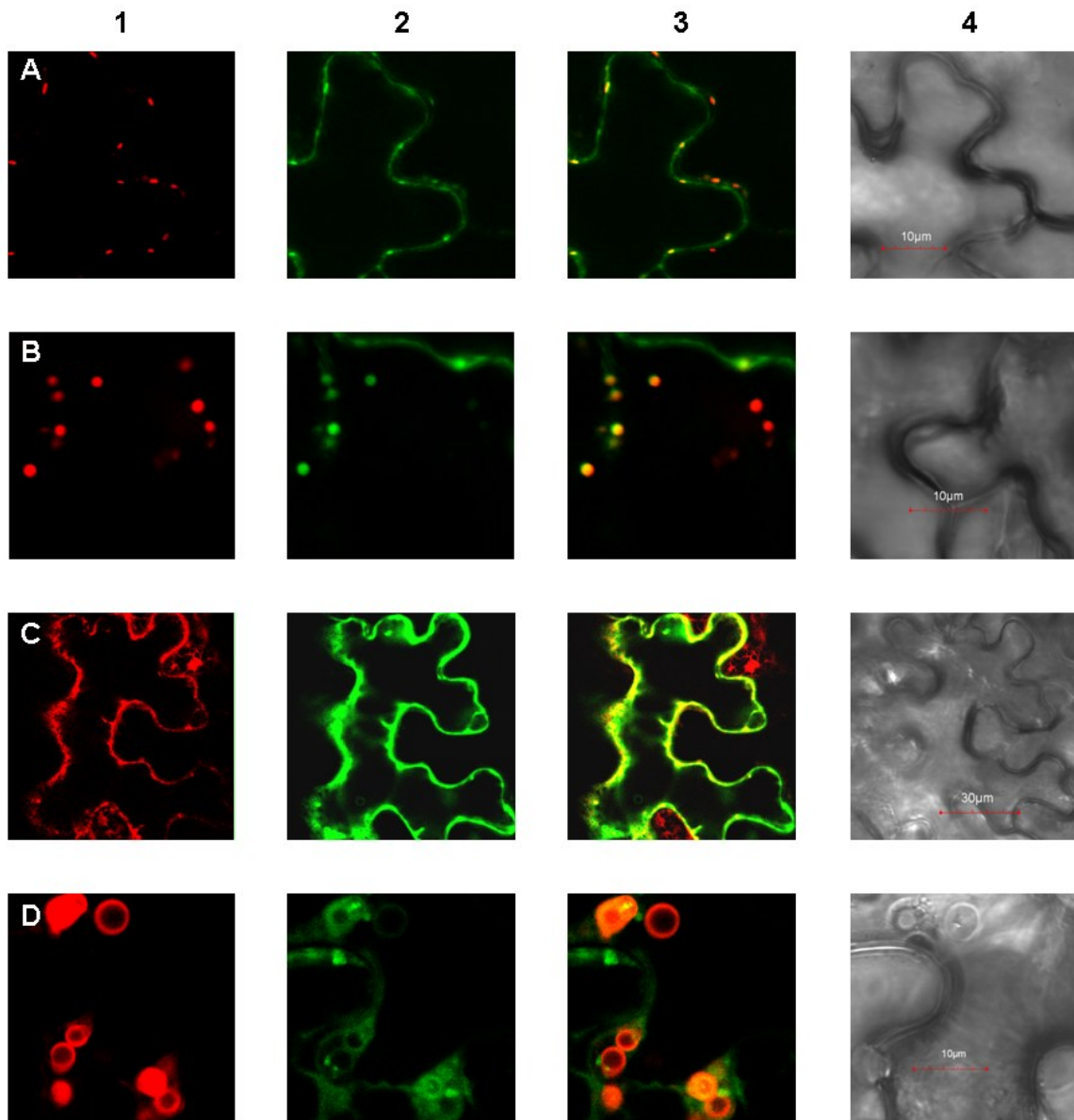


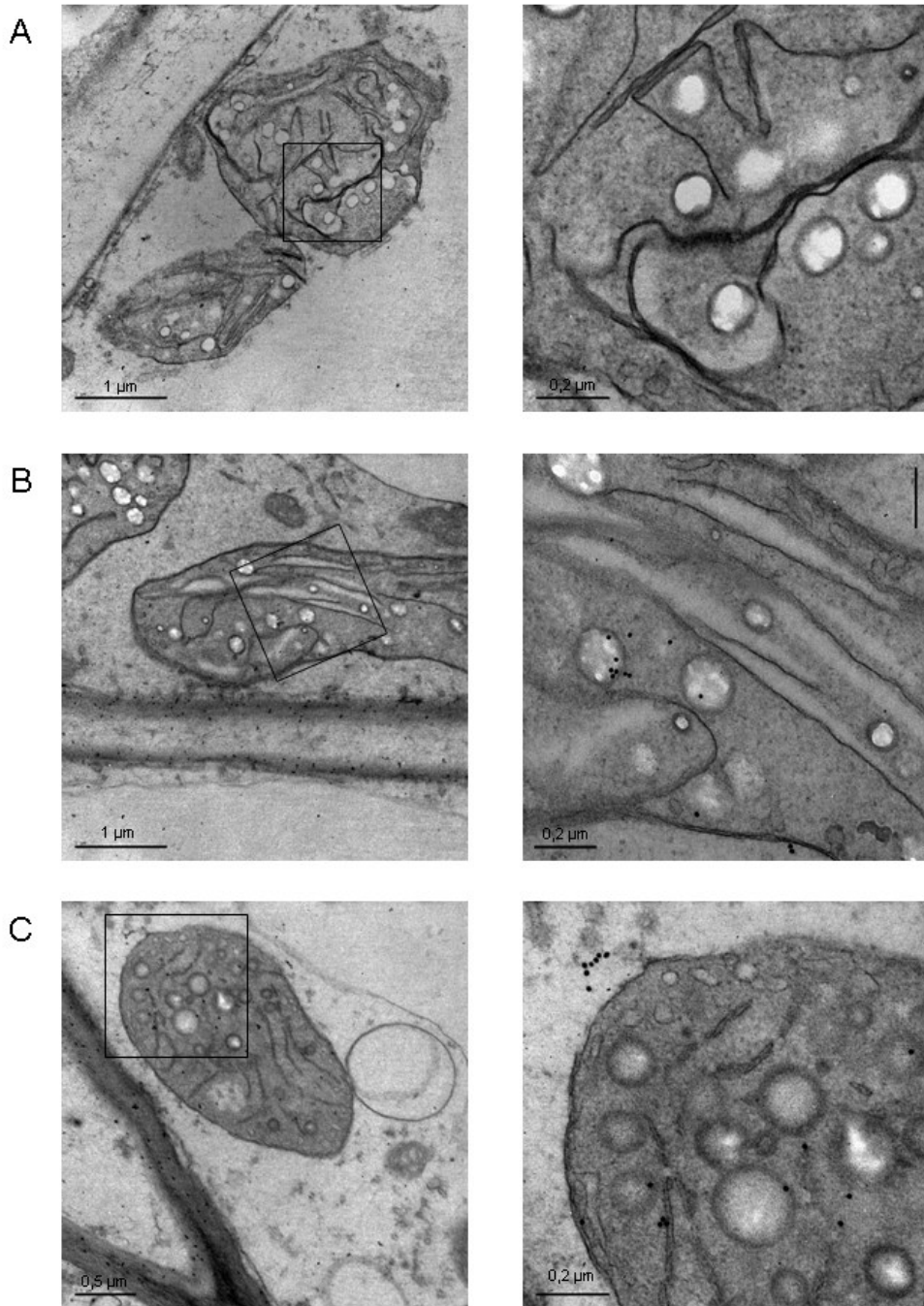
Figura R 50 Co-localitzacions de eYFP:AtTIL amb diferents marcadors intracel·lulars en cèl·lules epitelials de fulles de *N. benthamiana* agroinfiltrades. 1 Fluorescència associada als marcadors de localització units a eCFP pertanyents a la família Nelson- Nebenführ (Nelson, *et al.* 2007) d'aparell de Golgi (A); Peroxisoma (B), Membrana plasmàtica tres dies post infecció (C) i Membrana plasmàtica vuit dies post infecció (D). 2. Localització de la proteïna eYFP:AtTIL. 3 sobreexposició dels Canals 1 i 2.

En tot el conjunt d'imatges es va detectar que les proteïnes TIL presenten també una localització en certs tipus de vesícules d'origen desconegut quan l'expressió del transgen es manté durant períodes de temps llargs (8 dies). Aquestes vesícules co-localitzen principalment amb peroxisomes i membrana plasmàtica (Figura R 48D i Figura R 50D). A part, s'observa també que el marcador de membrana plasmàtica co-localitza també en les vesícules, fet que pot ser interpretat com que *S/TIL1* com i *AtTIL* s'acumularien en endosomes derivats de la membrana plasmàtica.

## **2.6 *Estudis d'inmunolocalització de la SITIL en mostres de pericarp de fruit de tomàquet***

El fet que els estudis descrits en l'apartat anterior no hagin mostrat localització de *S/TIL1* en els cloroplasts contrasta amb el fet que aquesta proteïna hagi estat detectada reiteradament en els cromoplastes. Una possible explicació podria ser que l'entorn intracel·lular de les cèl·lules del pericarp del fruit del tomàquet, o més en particular el dels cromoplastes, fos diferent al de les fulles i dels cloroplasts. Amb l'objectiu de poder confirmar la presència de *SITIL* en els cromoplastes es va procedir a realitzar estudis d'inmunocitoquímica en mostres de pericarp de fruit de tomàquet utilitzant l'anticòs  $\alpha$ -*AtTIL* descrit anteriorment (Chi, *et al.* 2009) i un anticòs secundari anti-conill conjugat amb partícules d'or col·loïdal.

En la Figura R 52 es mostren els resultat obtinguts en els experiments d'inmunolocalització. Un dels aspectes més rellevants és el d'observar immunodetecció de *S/TIL1* en els cromoplastes. Es de destacar també que les partícules d'or col·loïdal es troben associades principalment als platoglòbuls i a les estructures membranoses dels cromoplastes (Figura R 52 B, C, D i F).



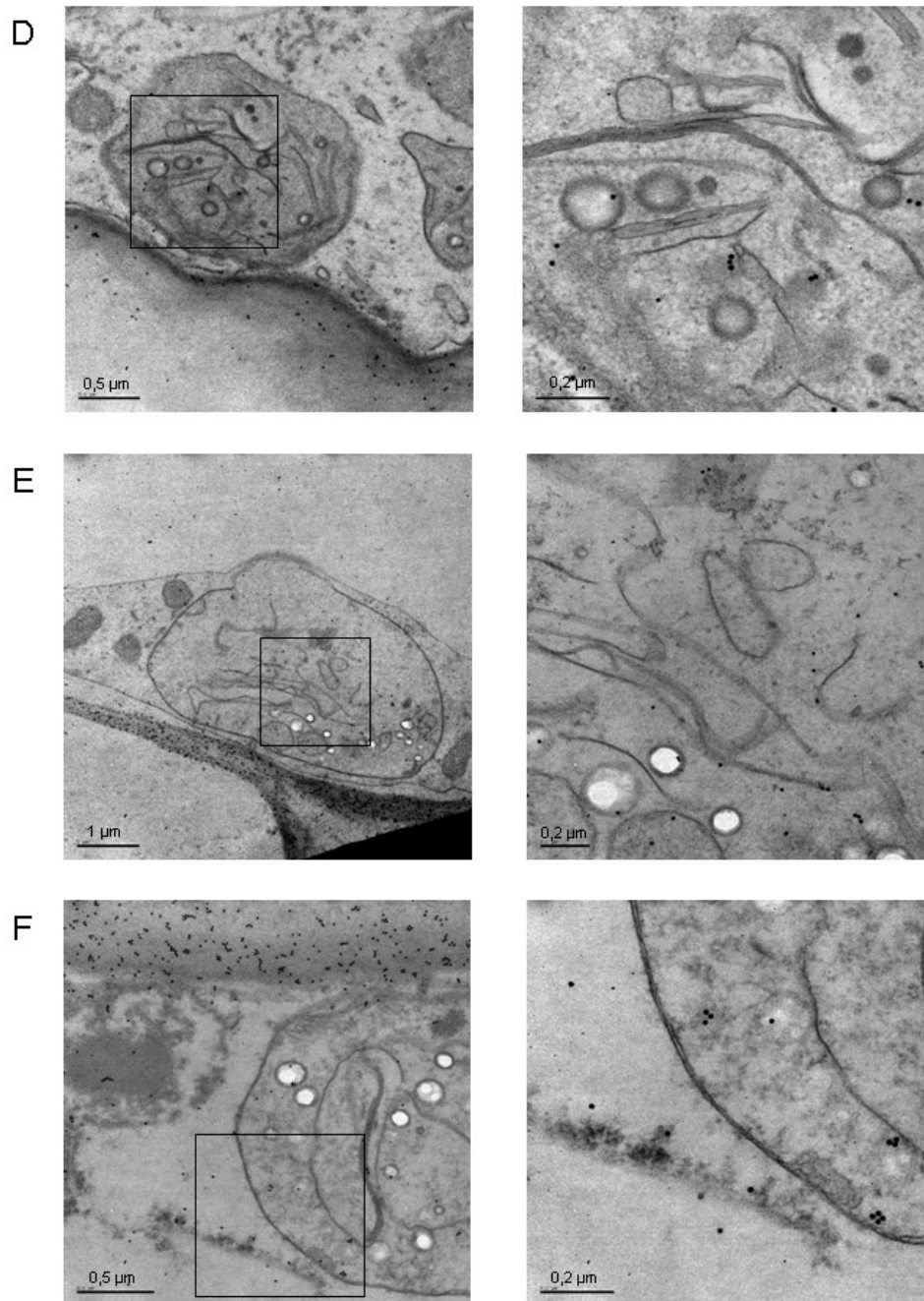


Figura R 51 Imatges de l'immunolocalització en microscòpia electrònica de la proteïna *S/TIL* en mostres de pericarp de tomàquet de la varietat AC. A: control de immunolocalització sense anticòs primari; B-D immunolocalitzacions de TIL.



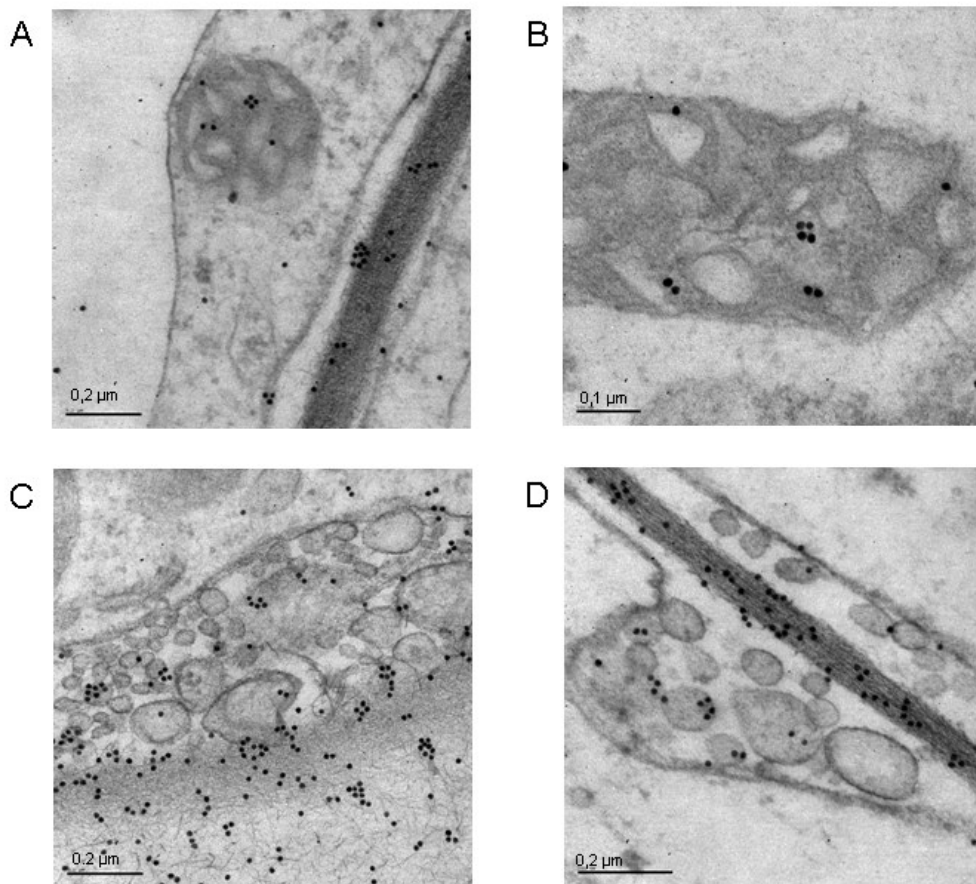


Figura R 52 Imatges de l'immunolocalització en microscòpia electrònica de la proteïna *SITIL* en mostres de pericarp de tomàquet de la varietat AC. A i B: Mitocondris C i D vesícules de membrana.

Els resultats obtinguts mostren immunodetecció de *SITIL* en altres parts de les cèl·lules del pericarp com són els mitocondris, la membrana plasmàtica, el reticle endoplasmàtic i les vacuoles (Figures 28F i 29). Es de ressaltar l'elevada densitat de partícules d'or col·loïdal en la paret cel·lular i en un sistema de vesícules aparentment secretades a l'exterior de la cèl·lula (Figura R 52C i D). La naturalesa d'aquestes vesícules i la funció associada a la secreció de *SITIL* a l'entorn extracel·lular es desconeguda.

## 2.7 **Caracterització del mecanisme d'unió a membranes de les proteïnes TIL**

Els resultats mostrats en els apartats anteriors mostren que les proteïnes TIL estudiades es localitzen en un gran varietat de membranes cel·lulars i orgànuls. Aquest fet es remarcable si es té en compte que, tal com ja s'ha comentat, les proteïnes TIL no mostren cap senyal conegut de localització subcel·lular. Aquest fet planteja aspectes interessants en relació amb el mecanisme(s) que utilitzen les proteïnes TIL per interaccionar amb les membranes i translocar a diferents compartiments subcel·lulars. Es conegut que les lipocalines utilitzen diferents mecanismes per interaccionar amb les membranes i que aquests estan associats principalment a diferents tipus de modificacions post-traduccionals (Grzyb, *et al.* 2006). El fet que cap d'aquestes modificacions semblin tenir lloc en les proteïnes *S/TIL1* i *A/TIL* (veure més endavant) va obrir la possibilitat que sigui el curt domini hidrofòbic constituït per la seqüència aminoacídica FLPII, present tant en *S/TIL1* com en *A/TIL* (Figura R 37), qui participi en aquest procés, de forma semblant al que s'ha descrit per la lipocalina ApoD humana (Peitsch i Boguski 1990).

Per avaluar el possible paper del domini hidrofòbic FLPII en la localització subcel·lular de *S/TIL1* i d'*A/TIL* es va decidir generar versions d'aquestes proteïnes en les que s'havia mutagenizat aquesta seqüència per eliminar la seva característica hidrofòbica. Al hora de realitzar les mutacions es va tenir en compte que el domini i la regió immediatament flanquejant conté quatre residus de prolina (Figura R 37). Si es té en compte que les prolines presenten menys flexibilitat estructural que la resta d'aminoàcids, aquest fet indicaria que aquest domini podria tenir una conformació particular. Per aquest motiu es va procedir a mutar inicialment els aminoàcids hidrofòbics, que van ser substituïts per altres amb un perfil hidrofílic (Figura R 53). Les modificacions escollides van ser el canvi de la fenilalanina per serina, leucina per alanina i les isoleucines per alanina i àcid aspàrtic. Tal com es mostra en la Figura R 53, el canvi del domini FLPII a SAPAR li confereix in caràcter netament hidrofílic (Figura R 53 C i D)

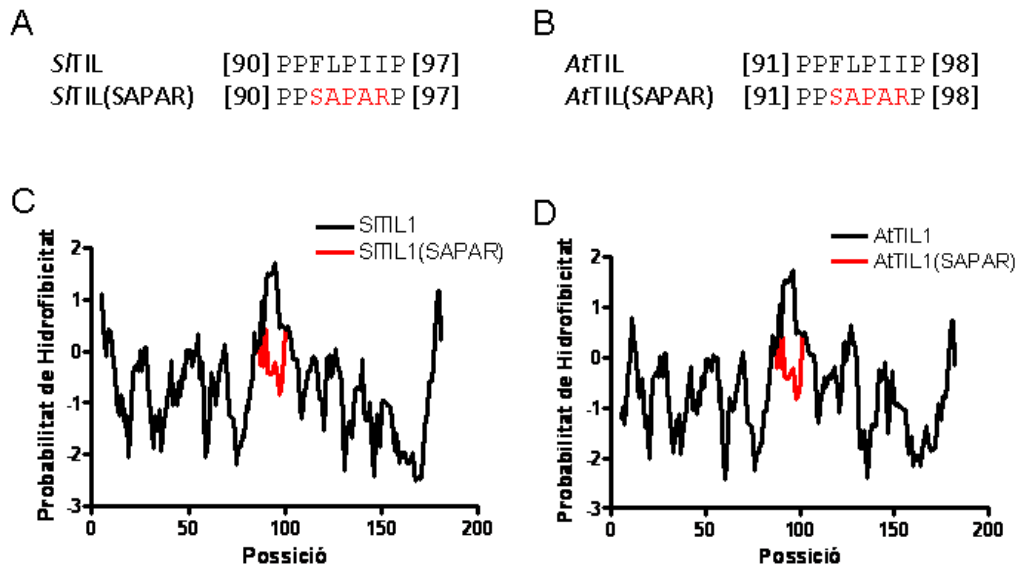


Figura R 53 Seqüències de les proteïnes *S/TIL1* i *A/TIL1* i de les seves versions mutades. A) seqüències de *S/TIL1* i *S/TIL1(SAPAR)* B) *A/TIL1* i *A/TIL1(SAPAR)* En vermell es remarca el domini hidrofòbic detectat i en verd les mutacions realitzades. C) Canvi de la predicció de la hidrofobicitat de *S/TIL1* per el programa protscale amb els paràmetres Kyte & Doolittle; D) Canvi de la predicció de la hidrofobicitat de *A/TIL1* amb el programa anterior.

La seqüència codificant de *S/TIL1* i *A/TIL1* es va mutagenitzar (canvi de FLPII a SAPAR) mitjançant PCR de fusió. Les versions mutagenitzades es van clonar en els vectors pEarleyGate 101 (CD3-683) i pEarleyGate 104 (CD3-684) tal com s’ha descrit anteriorment. Un cop confirmades per seqüenciació, les construccions obtingudes (eYFP-*S/TIL1(SAPAR)*, *S/TIL1(SAPAR)*-eYFP, eYFP-*A/TIL1(SAPAR)* i *A/TIL1(SAPAR)*-eYFP; Figura R 54) van ser introduïdes en la soca d’*A. tumefaciens* C58 GV2260 per tal de procedir als experiments d’agroinfiltració de fulles de *N. benthamiana* tal com s’ha descrit anteriorment. Les observacions mitjançant microscòpia làser confocal van mostrar que les proteïnes *S/TIL1(SAPAR)* i *A/TIL1(SAPAR)* presenten un patró de localització citosòlic-nuclear equivalent al de eYFP (Figura R 55). Aquests resultats indiquen que el petit *loop* hidrofòbic FLPII tindria un paper rellevant en la localització subcel·lular de *S/TIL1* i *A/TIL1*.

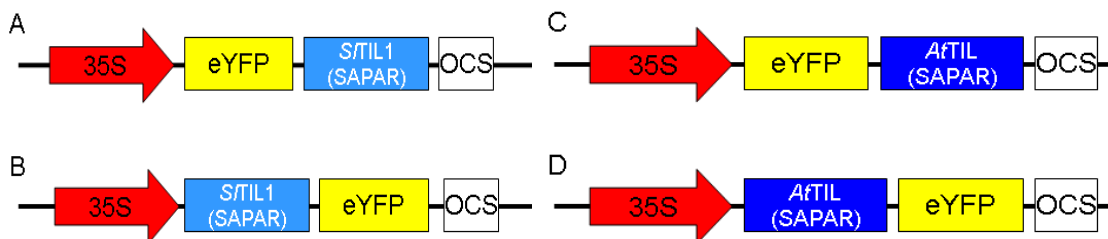


Figura R 54 Estructura de les construccions de Localització en *N. benthamiana*. A) eYFP:*S/TIL1(SAPAR)*; B) *S/TIL1(SAPAR)*:eYFP; C) eYFP:*A/TIL1(SAPAR)*; i D) *A/TIL1(SAPAR)*:eYFP.

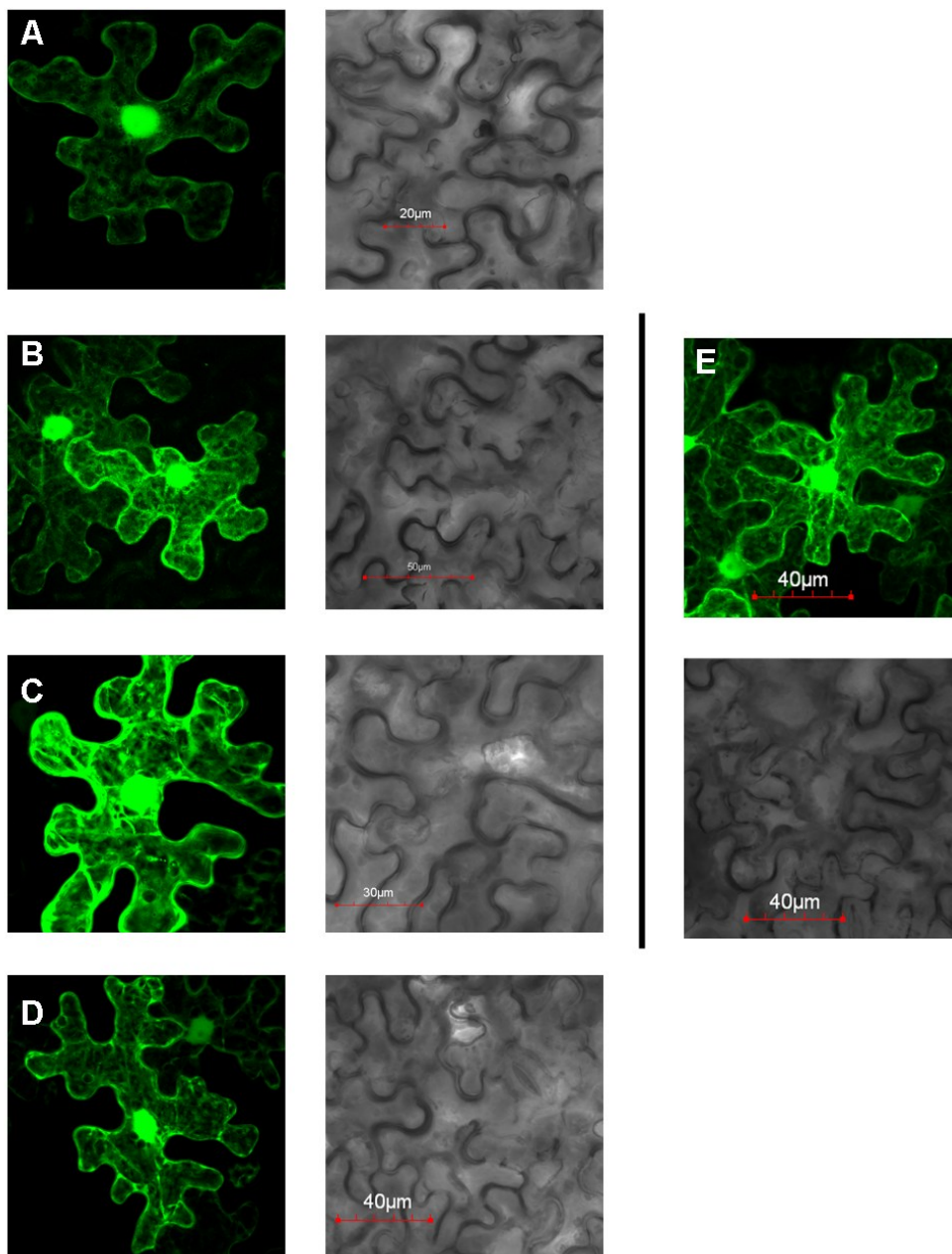


Figura R 55 Projeccions de diferents plans de cèl·lules epitelials de *N. benthamiana* transformades per agroinfiltració amb les següents construccions: A) eYFP:*SITIL1*(SAPAR); B) *SITIL1*(SAPAR):eYFP C) eYFP:*AtTIL*(SAPAR); D) *AtTIL*(SAPAR):eYFP; i E) eYFP.

Per tal de determinar si el domini hidrofòbic FLPII es no només necessari sinó també suficient per a la localització subcel·lular de les proteïnes SITIL1 i AtTIL es va procedir a introduir aquest domini en la proteïna marcador fluorescent eYFP (de localització citosòlica i nuclear) i estudiar possibles canvis en la seva localització subcel·lular. A l'hora de dissenyar l'experiment es va decidir a introduir no només la seqüència hidrofòbica FLPII sinó també els residus de prolina adjacents per tal d'intentar

mantenir una conformació d'aquest domini el més semblant possible a la que es dona en les proteïnes TIL (Figura R 39). Amb aquests condicionants es va decidir introduir la seqüència VPPFPLPIIPV, presents tant en *S/TIL1* com en *AtTIL*, en la proteïna eYFP.

Tenint en compte que la localització del domini FLPII en l'estructura terciària de les TILs queda exposada en forma d'un *loop* localitzat en la superfície de la proteïna es va decidir clonar-lo de forma similar dins de la eYFP. És per això que es va avaluar quin podria ser el lloc més adequat. En el treball de Wilson i col·laboradors (2004) es descriu el lloc que permet escindir la proteïna GFP en dos fragments no fluorescents que poden regenerar el cromòfor, i així recuperar la fluorescència, quan interaccionen entre ells. Aquest fet és la base d'una potent eina per comprovar la interacció de proteïnes fusionades als fragments de GFP (Wilson, *et al.* 2004). L'escissió de la GFP en dos fragments té lloc a nivell del residu glutamina 157. Aprofitant que el lloc de trencament caracteritzat forma part d'un *loop* en la eYFP es va procedir a substituir la glutamina 157 pel fragment VPPFPLPIIPV que conté el petit domini hidrofòbic de les TIL descrit anteriorment (Figura R 56).

```

eYFP          MGKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKF SVSGEGEGDATYGKLTTLKFICTTGKLPVFWPTL 60
eYFP_VPPFPLPIIPV_ MGKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKF SVSGEGEGDATYGKLTTLKFICTTGKLPVFWPTL 60

eYFP          VTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTLV 120
eYFP_VPPFPLPIIPV_ VTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTLV 120

eYFP          NRIELKGIIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADK----Q-----KNGIKVNFKIRHNI 171
eYFP_VPPFPLPIIPV_ NRIELKGIIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKVPPFPLPIIPVKNGIKVNFKIRHNI 180

eYFP          EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSYQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITL 231
eYFP_VPPFPLPIIPV_ EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSYQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITL 240

eYFP          GMDELYKSGLR SRAQASNSAVDGTAGPGS 260
eYFP_VPPFPLPIIPV_ GMDELYKSGLR SRAQASNSAVDGTAGPGS 269
    
```

Figura R 56 Seqüències de la proteïna eYFP i de la versió mutada eYFP(VPPFPLPIIPV). En vermell es remarca el domini hidrofòbic corresponent a les proteïnes TIL i en verd la seqüència flanquejant.

Estudis de modalització de la versió de eYFP que contenia la seqüència VPPFPLPIIPV van mostrar que formava un *loop* amb els residus hidrofòbics exposats (Figura R 57).

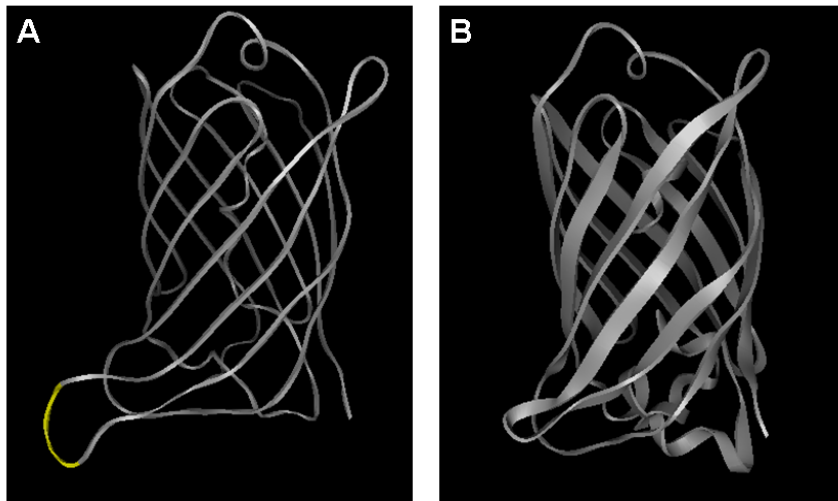


Figura R 57 Modalització de la proteïna eYFP(VPPFLPIIPV) (A i B) per el programa ESyPred3D respecte a la eYFP (C i D). Marcats en grog els aminoàcids VPPFLPIIPV

La regió codificant de la proteïna eYFP(VPPFLPIIPV) es va amplificar mitjançant PCR de fusió i va ser introduïda en el plasmid pEarleyGate 100 (CD3-724) per a la seva expressió transitòria en fulles de *N. benthamiana*. Tal com es mostra en la (Figura R 58) el patró de localització intracel·lular de la proteïna eYFP(VPPFLPIIPV) és similar al descrit anteriorment per les proteïnes *S/TIL1* i *A/TIL*. A més a més, la colocalització de eYFP(VPPFLPIIPV) amb els diferents marcadors subcel·lulars de la família Nelson-Nebenführ (Nelson, *et al.* 2007) presentaven un patró de localització molt similar al obtingut per les proteïnes TIL (Figura R 59 i Figura R 60).

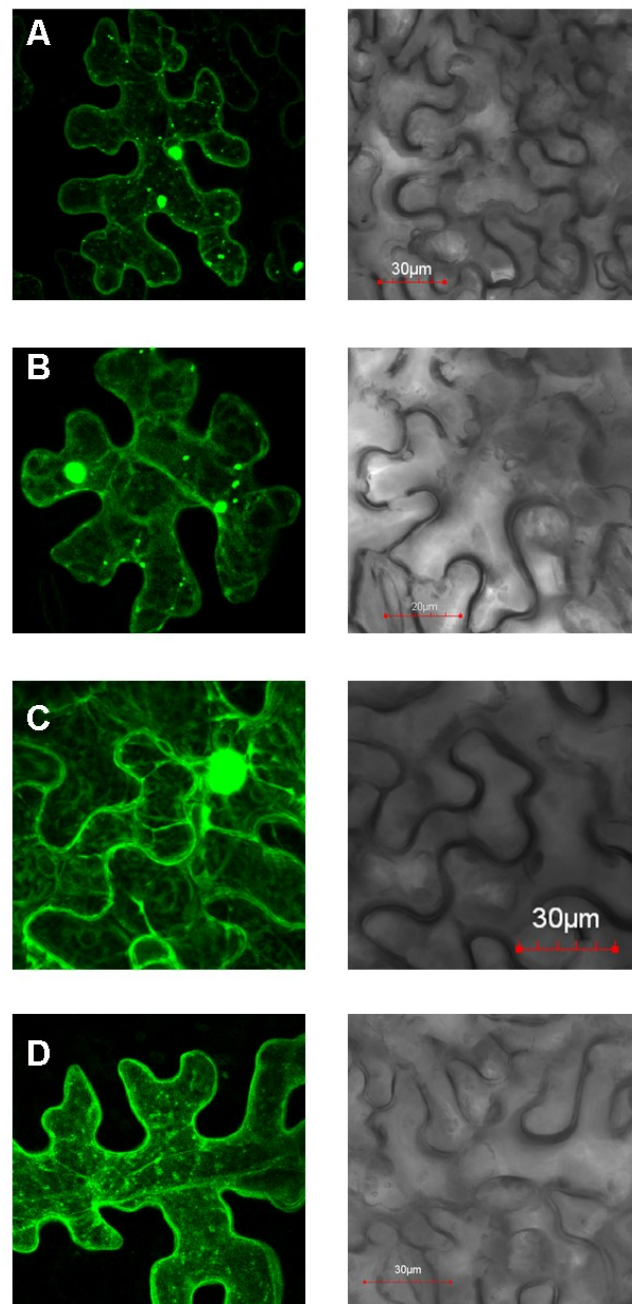


Figura R 58 Projeccions de diferents plans de cèl·lules epitelials de *N. Benthamiana* transformades per agroinfiltració amb les següents construccions: A i B) eYFP(VPPFLPIIPV); C) eYFP; i D) *S/TIL1*-eYFP.

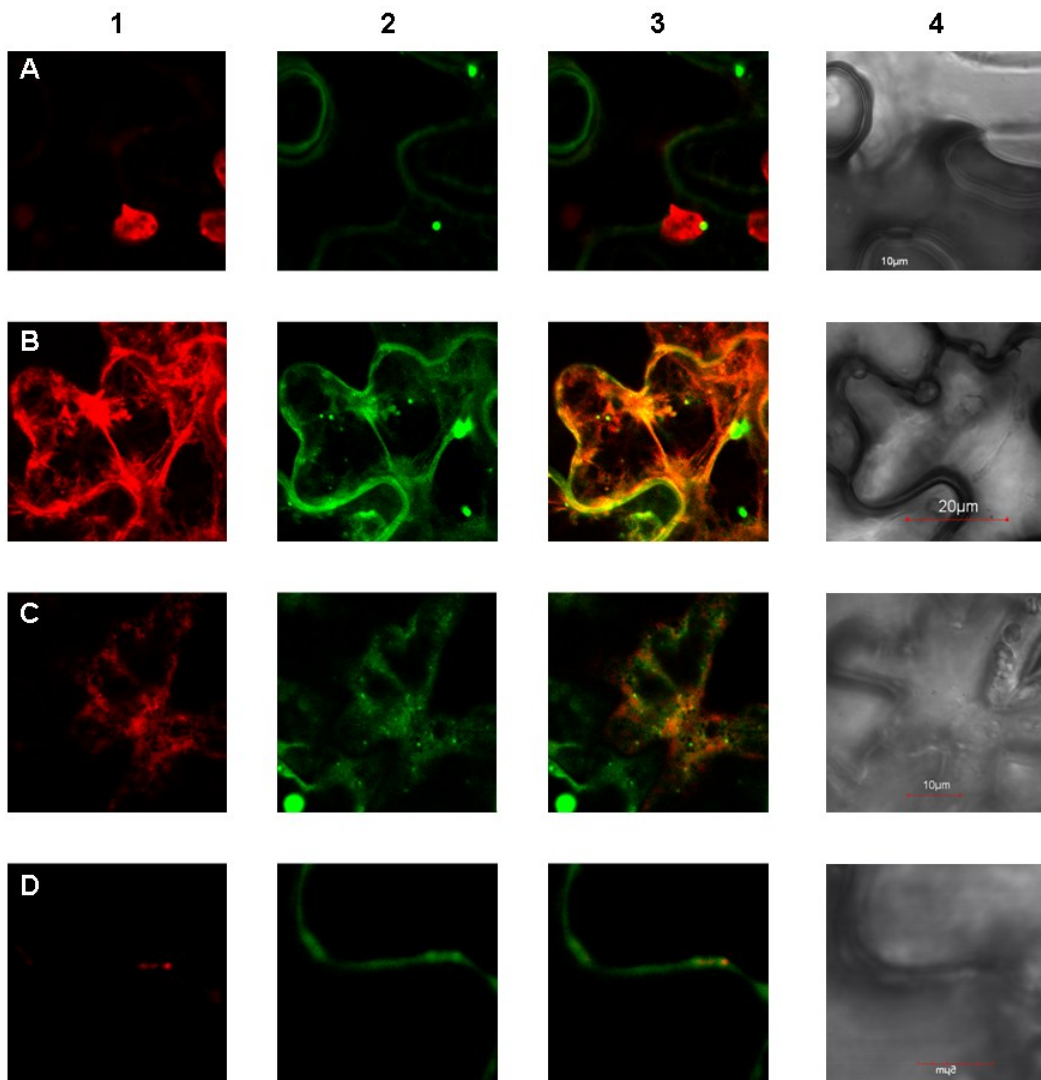


Figura R 59 Co-localització de eYFP(VPPFLIIPV) amb diferents marcadors intracel·lulars en cèl·lules epitelials de fulles de *N. benthamiana* agroinfiltrades. 1. Marcadors de localització units a eCFP pertanyents a la família Nelson- Nebenführ (Nelson, *et al.* 2007) de cloroplasts (A); Tonoplast (B), Reticle endoplasmàtic (C) i mitocondris (D). 2. Localització de la proteïna eYFP(VPPFLIIPV). 3 sobreexposició dels Canals 1 i 2. 4. llum transmesa. En les imatges B i C es mostra la projecció de diferents plans.



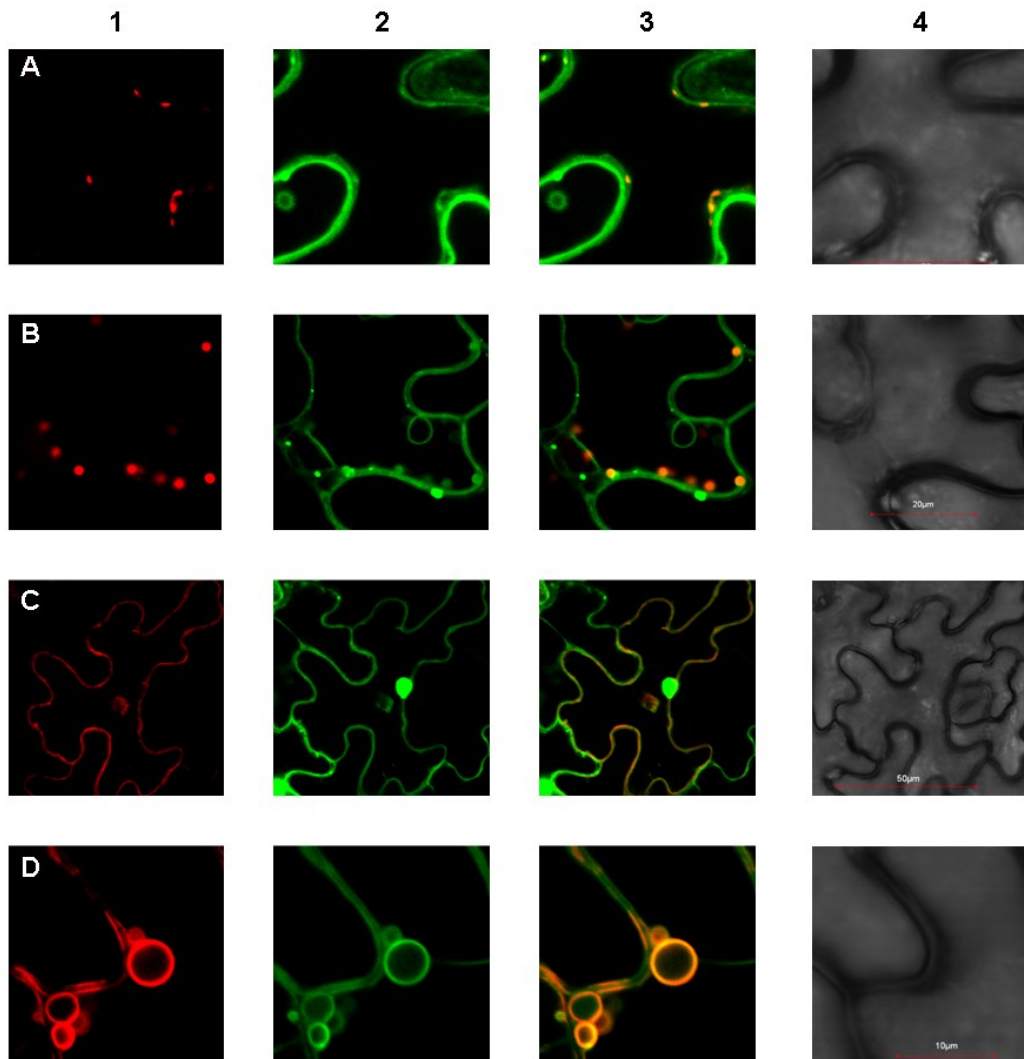


Figura R 60 Co-localitzacions de eYFP(VPPFLPIIPV) amb diferents marcadors intracel·lulars en cèl·lules epitelials de fulles de *N. benthamiana* agroinfiltrades. 1. Fluorescència associada als marcadors de localització units a eCFP pertanyents a la família Nelson- Nebenführ (Nelson, *et al.* 2007). Aparell de Golgi (A); Peroxisoma (B), Membrana plasmàtica tres dies post infecció (C) i Membrana plasmàtica vuit dies post infecció (D). 2. Localització de la proteïna eYFP(VPPFLPIIPV). 3 sobreexposició dels Canals 1 i 2. 4. llum transmesa.

Considerats en conjunt, els resultats obtinguts anteriorment indiquen que la seqüència VPPFLPIIPV, que inclou el curt domini hidrofòbic conservat en les TIL, és necessari i suficient per conferir la complexa localització subcel·lular d'aquestes proteïnes.

## 2.8 Expressió i caracterització de la proteïna *S/TIL1*

Per tal de poder caracteritzar la proteïna *S/TIL1* amb més detall es va procedir a la seva expressió heteròloga en *E. coli*. Tenint en compte que la proteïna *A/TIL* recombinant havia estat expressada a *E. coli* per (Chi, *et al.* 2009) es va procedir a generar una construcció equivalent en la que s'incorporava una cua d'histidines a l'extrem C-Terminal. Amb aquest propòsit es va procedir a amplificar la regió codificant de *S/TIL1* incorporant dianes *NdeI* i *XbaI* en els seus extrems i a clonar el fragment resultant en el vector pET23b tallat amb els mateixos enzims de restricció (Figura R 61). Un cop generada la construcció *S/TIL1*-pET23 i validada mitjançant seqüenciació es va procedir a realitzar proves d'expressió en la soca d'*E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Es van provar diferents diferent concentracions d'IPTG (1 mM, 200 nM i 1 nM) combinades amb diferents temps d'inducció (2, 4, 6, 24h) i temperatura (28 i 37 °C). Si bé es van detectar diferents condicions on s'obtenia una bona expressió de la proteïna recombinant (Figura R 62) en cap cas es va obtenir la proteïna de forma soluble (resultats no mostrats).

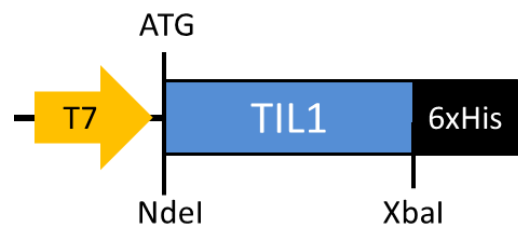


Figura R 61. Representació esquemàtica de la construcció *S/TIL1*- pET23

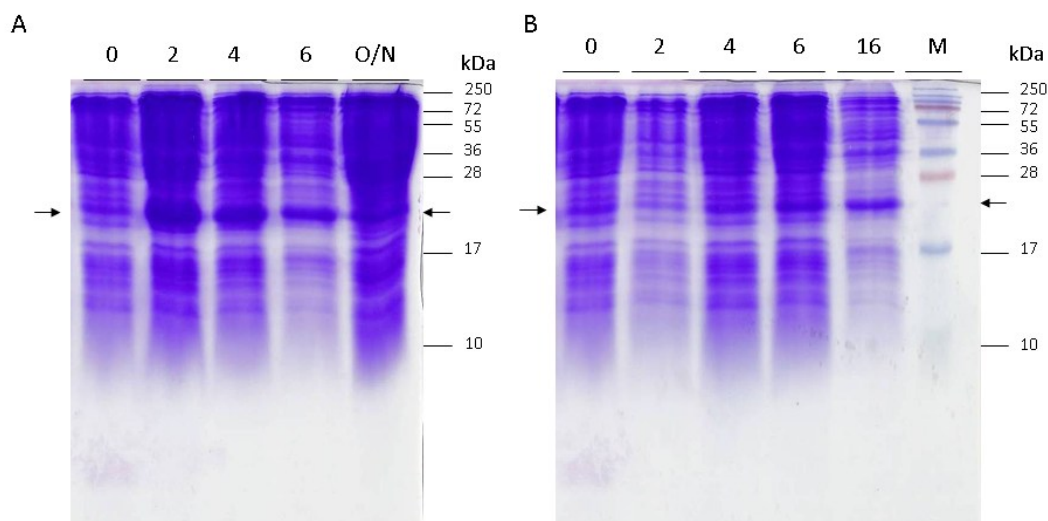


Figura R 62. Proves d'expressió de la proteïna pET23-*S/TIL1* A) expressió a 37°C i 200 mM d'IPTG B) expressió a 28°C i 200 mM d'IPTG. Marcada la sobreexpressió de pET23-*S/TIL1* amb fletxes. Gels del 18 % d'acrilamida. Els números en la part superior dels carrils corresponen a les hores d'inducció.

Davant la impossibilitat de purificar *S/TIL1* amb la cua de d'histidines en posició C-terminal es va procedir a generar una nova construcció en el vector pET28c, el qual permet expressar proteïnes amb la cua d'histidines en l'extrem N-terminal. En aquest cas es van utilitzar primers per introduir les dianes de restricció *NheI* i *XhoI* en els extrems del fragment amplificat per clonar-lo posteriorment en el plàsmid pET28c i generar la construcció pET28-*S/TIL1* (Figura R 63). Després de comprovar la construcció generada es va procedir a transformar la soca d'*E. coli* BL21 (DE3) pLysS i a realitzar les proves d'expressió.

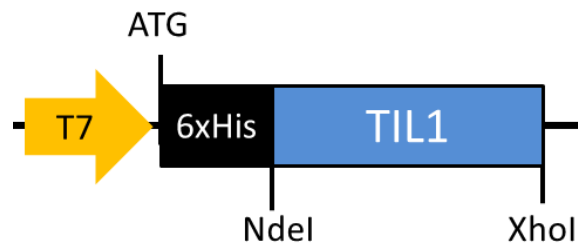


Figura R 63. Representació esquemàtica de la construcció pET28-*S/TIL1*

Després de realitzar proves d'inducció a diferents temps (2, 4, 6, 24h), temperatures (28 i 37°C) i concentracions d'IPTG (0.2 mM i 1 mM) es va detectar la presència de proteïna recombinat en tots els casos. No obstant, la millor expressió s'obtenia a 37°C, temps d'inducció curts (4h) i baixes concentracions d'IPTG (0,2 mM) (Figura R 64A). A més, en aquestes condicions una part important de la proteïna expressada era soluble (resultats no mostrats).

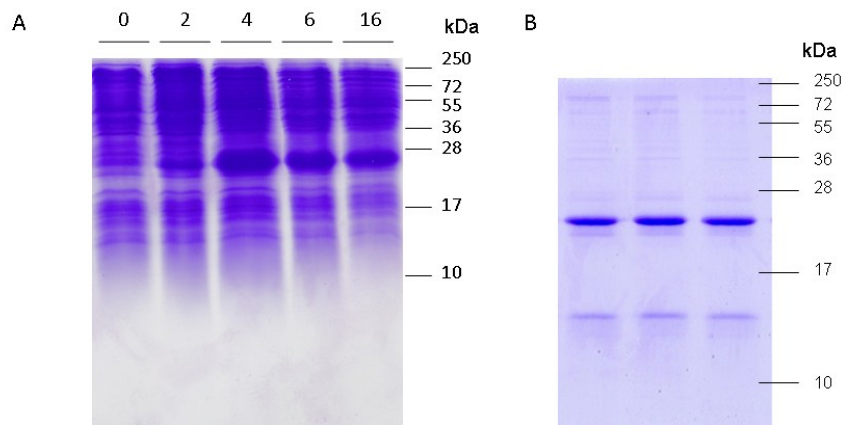


Figura R 64. Probes d'expressió i purificació de la proteïna pET28-*S/TIL1* A) expressió a 37°C i 200 mM d'IPTG. En la part superior de cada carril es mostren les hores d'inducció. B) Fraccions corresponents pic de purificació de la proteïna pET28-*S/TIL1*. En els dos casos els gels contenen un 18 % d'acrilamida.

Sorprenentment, els cultius que expressaven la proteïna *S/TIL1* recombinant van mostrar una coloració marronosa. Tal com s'observa en la Figura R 65 les cèl·lules transformades amb el plàsmid pET28-*S/TIL1* mostren un lleuger color marró després de la inducció amb IPTG, mentre que les cèl·lules control transformades amb el vector buit (pET28c) no en tenen. Aquests resultats indicaven que l'aparició de color devia estar relacionada amb l'expressió de la proteïna recombinant. Aquest fet es va comprovar al purificar la proteïna *S/TIL1* recombinant utilitzant cromatografia d'afinitat tal com s'indica en l'apartat corresponent de Materials i Mètodes (apartat 3.12). L'anàlisi de les fraccions corresponents al pic de purificació de *S/TIL1* recombinant es mostra en la Figura R 64B.

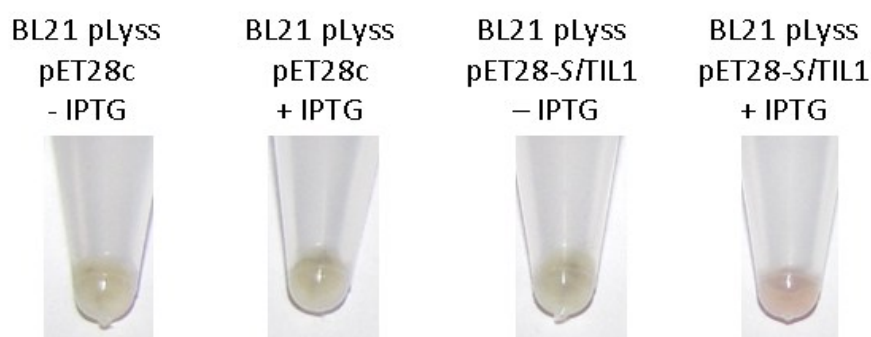


Figura R 65. Sediment de cultius de les soques de BL21 pLysS pET28c i BL21 pLysS pET28-*S/TIL1* cultivades en absència i presència de 200 nM IPTG.

La proteïna purificada va mostrar un pes molecular aparent de 24-25 kDa. La diferència de mida respecte de la proteïna nativa detectada anteriorment (22-24 kDa) està d'acord amb l'addició de la seqüència que conté la cua d'histidines. A part d'altres bandes minoritàries, s'observa també una banda d'intensitat més notable d'una mida aproximada de 14 kDa que es podria tractar d'un possible producte de degradació.

Com era d'esperar la proteïna purificada presentava un color vermell-marronós. Al ser analitzada per espectrofotometria (rang de longitud d'ona de 200 a 700 nm) va mostrar un espectre d'absorció característic amb un pic a 406,7 nm (Figura R 66A). Aquest espectre d'absorbància amb un pic al voltant de 406 nm és característic de proteïnes que contenen el grup hemo, com és el cas de les catalases. El grup hemo és un grup prostètic, altament hidrofòbic, capaç d'interaccionar amb petits electròfils com l'oxigen gas o l'ió cianur. El cianur està descrit com l'electròfil més hàbil per unir-se del grup hemo. A més, es coneix que la interacció amb el cianur induïx un canvi en l'espectre d'absorció associat al grup

hemo (Sinclair *et al.* 2001). Per tal determinar si el pic de 406,7 nm observat en la *S/TIL1* recombinant estava relacionat amb la presència del grup hemo es va analitzar l'efecte del cianur en l'espectre de la proteïna. El resultats mostrats en la Figura R 66A mostren un desplaçament d'aproximadament 20 nm del valor del màxim d'absorbància del pic associat al grup hemo en la *S/TIL1* recombinant. Aquest canvi està d'acord amb els valors descrits per altres proteïnes relatius a la interacció del cianur amb el grup hemo (Ardissone *et al.* 2004).

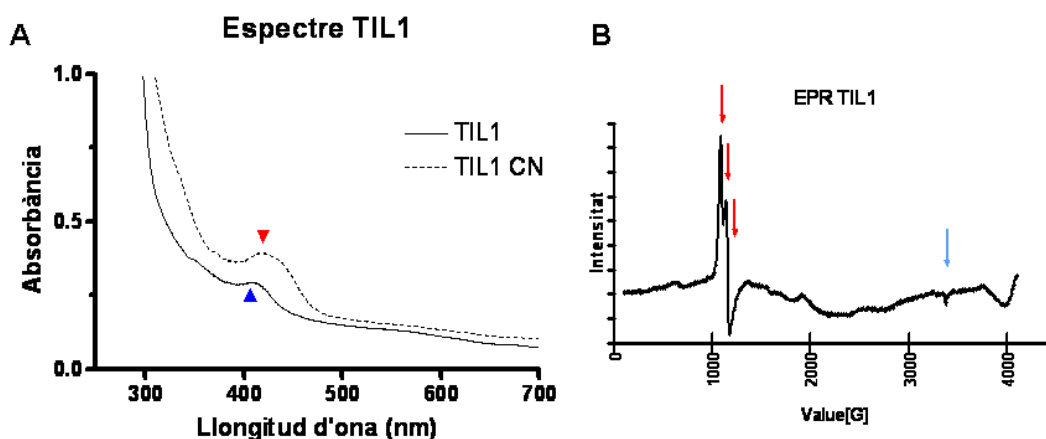


Figura R 66. A) Espectre de la proteïna *S/TIL1* en Tris-Cl 40mM 100mM NaCl en absència i presència de 0.2 M de KCN. El màxim d'absorció a 406.7 (fletxes negres) queda desplaçat a 430 en presència de cianur (fletxes vermelles). B) Espectre EPR de  $1,61 \cdot 10^{-4}$  M de la proteïna *S/TIL1* en tampó fosfat 10 mM i 25% de glicerol. Les condicions utilitzades van ser la freqüència de microones 9.6456 GHz amb una intensitat de 10 mW, i una modulació de 5G a 4K. El ferro coordinat en el grup hemo s'indica amb fletxes vermelles i el Ferro lliure amb la fletxa blava.

Finalment i per tal de detectar la presència del ió ferro en la *S/TIL1* recombinant es va procedir a realitzar anàlisi mitjançant Espectroscòpia de Ressonància Paramagnètica Electrònica (*Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy*, EPR). L'EPR consisteix en determinar la presència d'electrons desaparellats mitjançant radiacions microones a baixes temperatures, al provocar-li's un canvi d'espín. Per tant, en condicions adequades es pot detectar la presència d'electrons desaparellats del ferro del grup hemo. El resultats obtinguts al analitzar la *S/TIL1* recombinant van mostrar un espectre EPR similar als publicats per altres proteïnes amb grup hemo (Ardissone, *et al.* 2004). En la Figura R 66B es poden observar els senyals corresponents al ferro coordinat i al ferro lliure. De l'espectre EPR es pot determinar que el grup hemo es troba estabilitzat dins de la proteïna per la

coordinació d'un dels dos enllaços lliures del ferro, mostrant lliure un l'altre lloc (Kakar *et al.* 2010).

En el seu conjunt, els resultats obtinguts mostren que la *S/TIL1* recombinant expressada a *E. coli* és una proteïna amb capacitat d'unir grup hemo.

## 2.9 Caracterització de les proteïnes *S/TIL2* i *AtTIL*

El fet que la *S/TIL1* contingués el grup hemo va ser sorprenent en bona part pel fet que la proteïna homologa d'*Arabidopsis thaliana* (*AtTIL*) havia estat expressada i caracteritzada prèviament i en cap moment s'havia descrit aquesta característica (Charron, *et al.* 2002, Charron, *et al.* 2008, Charron, *et al.* 2005, Chi, *et al.* 2009), per altra part molt evident degut al color dels cultius i de la proteïna. Com ja s'ha comentat anteriorment, les construccions d'*AtTIL* utilitzades per la seva expressió s'havien realitzat en vectors d'expressió que afegien la cua d'histidines en l'extrem C-terminal. Per contra, el vector d'expressió utilitzat per l'expressió de *S/TIL1* incorporava la cua d'histidines a l'extrem N-terminal. Considerant la possibilitat que l'addició de la cua d'histines en posició C-terminal pogués afectar la interacció amb el grup hemo es va procedir a expressar la proteïna *AtTIL* amb la cua d'histidines en posició N-terminal. Tanmateix es va voler estudiar si *S/TIL2* també presentava la propietat d'unir-se al grup hemo. Així es va procedir inicialment a clonar el cDNA d'*AtTIL* a partir de RNA total obtingut de plantes d'*Arabidopsis* a les que s'havia aplicat un xoc tèrmic de 37°C durant una hora. En el cas de *S/TIL2* es disposava del clon de cDNA corresponent. La regió codificant d'*AtTIL* i de *S/TIL2* va ser amplificada mitjançant PCR utilitzant primers que incorporaven les dianes *NdeI* i *XhoI* en els extrems 5' i 3 respectivament i clonada en el vector pBluescript. Posteriorment els fragments van ser escindits amb *NdeI* i *XhoI* i clonades en el vector pET28c digerit amb els mateixos enzims de restricció utilitzats per clonar *S/TIL1* (Figura R 67). Les construccions generades, *AtTIL*-pET28 i *S/TIL2*-pET28, van ser confirmades per seqüenciació i introduïdes en la soca d'*E. coli* BL21 (DE3) pLysS.

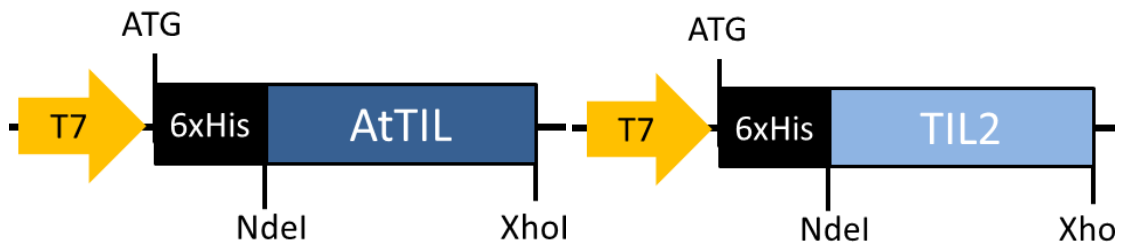


Figura R 67. Estructura de les construccions de *S/TIL2* i *AtTIL* en el vector pET28c

Després de realitzar diverses proves es va determinar que les condicions òptimes per a l'expressió *S/TIL2* i d'*AtTIL* en forma soluble eren les mateixes que per *S/TIL1* (3 hores i 0,2 mM d'IPTG) (Figura R 69 i Figura R 68). Les condicions d'expressió es van escollir no tant per la quantitat de la proteïna detectada, sinó per la major proporció de proteïna soluble.

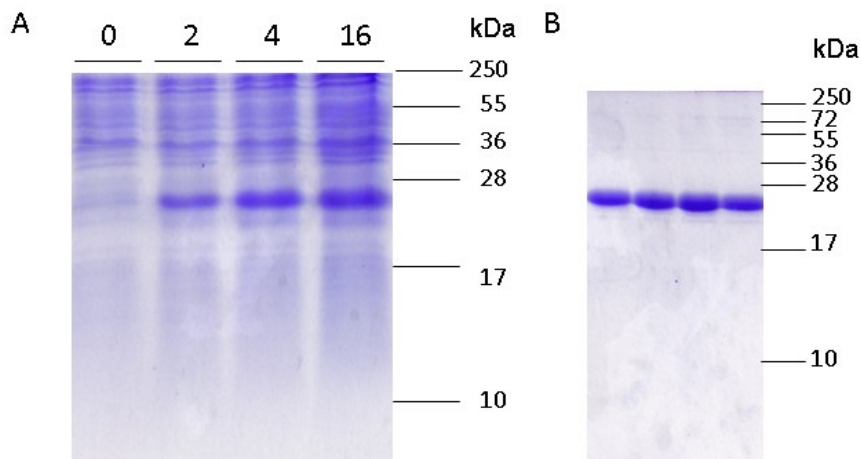


Figura R 69. Probes d'expressió i purificació de la proteïna pET28-*AtTIL* A) expressió a 37°C i 200 mM d'IPTG. En la part superior dels carrils s'indiquen les hores d'inducció. B) Fraccions corresponents al pic de purificació de la proteïna. En els dos casos els gels tenien 18 % d'acrilamida.

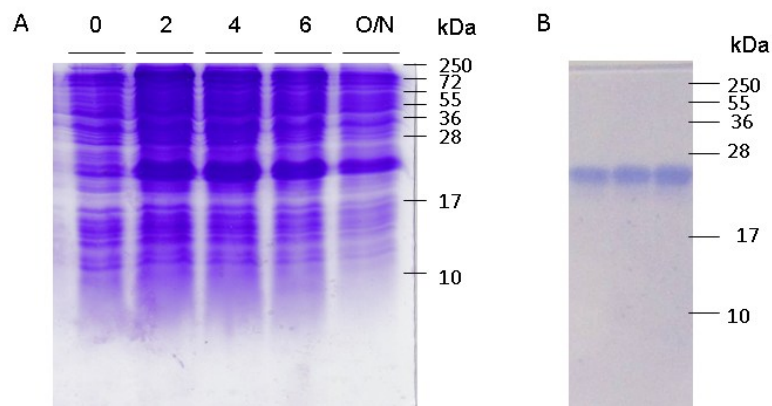


Figura R 68 Probes d'expressió i purificació de la proteïna pET28-*S/TIL2*. A) expressió a 37°C i 200 mM d'IPTG. En la part superior dels carrils s'indiquen les hores d'inducció. B) Fraccions corresponents al pic de purificació de la proteïna. En els dos casos els gels tenien 18 % d'acrilamida.

Anàlogament a *S/TIL1* els cultius que expressaven *S/TIL2* i d'*A/tIL* mostraven la presència de coloració. En la Figura R 70 es pot observar clarament com les cèl·lules dels cultius induïts mostren coloració vermellosa en relació amb les dels corresponents controls no induïts.

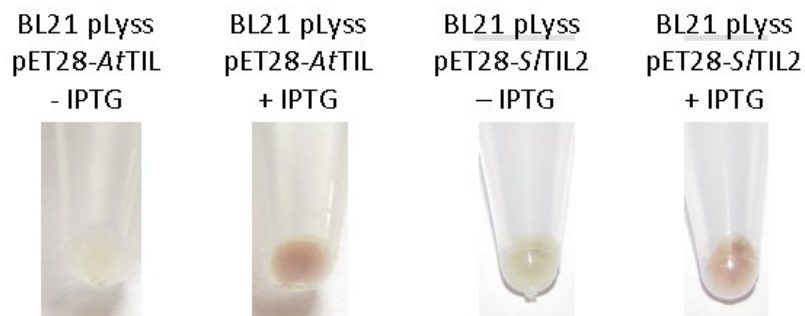


Figura R 70. Comparació entre les soques BL21 pLyss pET28-A/tIL i BL21 pLyss pET28-TIL2, amb absència i presència de 200 nM del inductor IPTG.

Després de purificar les proteïnes *S/TIL2* i *A/tIL* recombinants de forma anàloga a *S/TIL1* (Figura R 69 i Figura R 68) es va procedir de comprovar la presència del grup hemo mitjançant la determinació dels espectres d'absorbància, la modificació de l'espectre després de la interacció amb cianur i els espectres d'EPR. Els resultats obtinguts es mostren en la Figura R 71. Es pot observar que tant *A/tIL* com *S/TIL2* mostren un pic d'absorció a 406,7 nM que es desplaça a valors més alts com a resultat de la interacció amb cianur (Figura R 71A i C). Els espectres d'EPR van resultar ser similar també als de *S/TIL1*, confirmant-se per tant també la presència del grup hemo en les proteïnes *A/tIL* i *S/TIL2* (Figura R 71B i D).



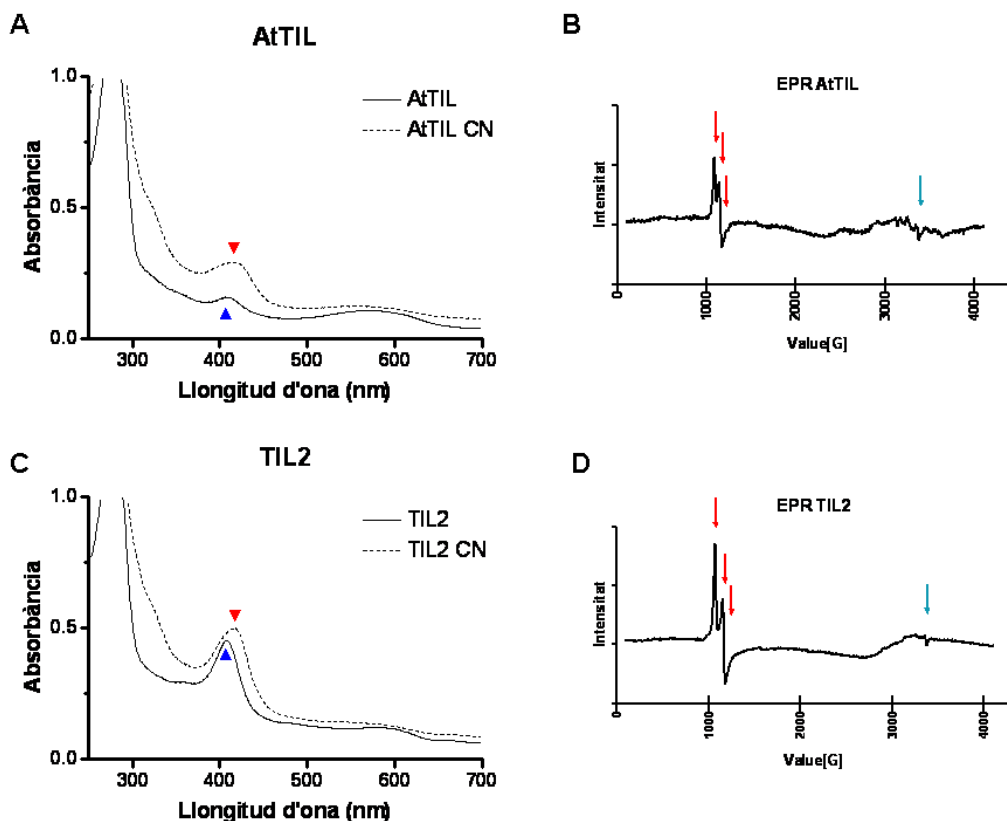


Figura R 71. A) Espectre d'absorció de la proteïna AtTIL en Tris-Cl 40mM 100mM NaCl en absència i presència de 0.2 M de KCN. El màxim d'absorció a 406.7 (fletxes negres) queda desplaçat a 430 en presència de cianur (fletxes vermelles) B) Espectre EPR de  $9,71 \cdot 10^{-5}$  M de la proteïna AtTIL en tampó fosfat 10mM i 25% de glicerol. Les condicions utilitzades van ser la freqüència de microones 9.6456 GHz amb una intensitat de 10mW, i una modulació de 5G a 4K. El ferro coordinat en el grup hemo es presenta sota les fletxes vermelles i el Ferro lliure sota la fletxa blava. C) Espectre d'absorció de la proteïna S/TIL2 en les mateixes condicions que A. D) Espectre EPR de  $9,57 \cdot 10^{-5}$  M de la proteïna S/TIL2 en les mateixes condicions que B.

Aquests resultats indiquen que la capacitat interaccionar amb el grup hemo seria una característica general de les proteïnes TIL de plantes. La rellevància d'aquest interacció en relació amb la possible funció del les TIL es per ara desconeguda.

## 2.10 Expressió de les proteïnes TIL en *Nicotiana benthamiana*.

Amb les evidències que en el sistema d'*E. coli* tant S/TIL1 com AtTIL es purifiquen unides a el grup hemo va aparèixer el dubte si realment són hemoproteïnes o com altres lipocalines com Lazarillo capten el grup hemo en determinades condicions (Sanchez *et al.* 2008). Per poder elucidar aquesta qüestió es va procedir a expressar i purificar les proteïnes

des de un sistema de plantes. L'escollit va ser el sistema transformació transitòria de *Nicotiana Benthamiana* per agroinfiltració.

Per realitzar l'agroinfiltració es va procedir a preparar les construccions d'expressió clonant les proteïnes *S/TIL1* i *A/TIL* des de la cua de poli histidines N-terminal del vector pET28c fins al final de la seqüència codificant amb primes dissenyats per a tal efecte. Les amplificacions es van clonar en el vector pENTR-D-TOPO mitjançant la reacció de la Topoisomerasa. Posteriorment els clons positius es van recombinar en el vector pEarlyGate 100 (Tair N<sup>o</sup> CD3-724) (Earley, *et al.* 2006) mitjançant el sistema Gateway.

El vector pEarlyGate 100 presenta una seqüència gateway flanquejada per un promotor 35S i el terminador de l'octopina sintetasa (OCS) per a tal de poder expressar les proteïnes en *N. Benthamiana* per agroinfiltració. Les construccions obtingudes de la recombinació que presentaven l'estructura 35S:HIS:*S/TIL1*:OCS i 35S:HIS:*A/TIL*:OCS, van ser introduïdes en la soca d'*Agrobacterium* C58 GV2260 (Figura R 72).

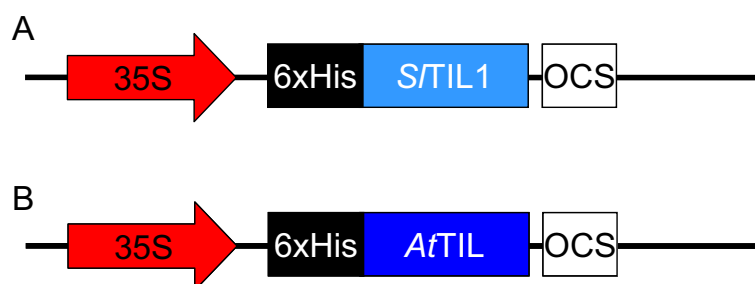


Figura R 72. Representació esquemàtica de la construccions HIS:*S/TIL1* (A) i HIS:*A/TIL* (B) en el vector pEarlyGate 100.

Les construccions es van infiltrar en fulles de *N. Benthamiana* de plantes amb 4-6 setmanes d'edat juntament amb la presència de un agrobacteri *Helper* HC-PRO. Les plantes que contenien les fulles infiltrades es van mantenir a regim de 16 h de llum 8 h de foscor en un hivernacle amb alta humitat. Passats 2-3 dies les zones infiltrades es van congelar ràpidament en nitrogen líquid i homogeneïtzar mitjançant l'ús d'un morter. Al hora de purificar, 1 g de teixit va ser re-homogeneïtzat en el tizzulaiser i resuspès en 10 mL de la solució tampó contenia imidazol complementada amb inhibidors de proteases (Materials i mètodes 3.12). Després d'una sonicació es va realitzar una centrifugació a 14.000xg per

descartar la fracció insoluble del extracte. Tot seguit es va clarificar l'extracte per una filtració 0,2  $\mu\text{m}$  previ pas a columna.

Tot i que en els estudis previs es va detectar que la proteïnes TIL s'expressaven i es detectaven en el sobrenedant del sonicat, no es van poder obtenir grans quantitats de proteïna purificada en cap purificació de TILs.

Per poder determinar en quin punt es perdia la proteïna es va realitzar un western de les diferents etapes d'extracció (Figura R 73). Es va detectar que una gran proporció de la proteïna expressada de forma heteròloga de l'extracte inicial (Figura R 73 E) té una gran tendència a precipitar en la clarificació del sonicat (P14). Tot i això s'obté una quantitat raonable en el sobrenedant del sonicat (S14).

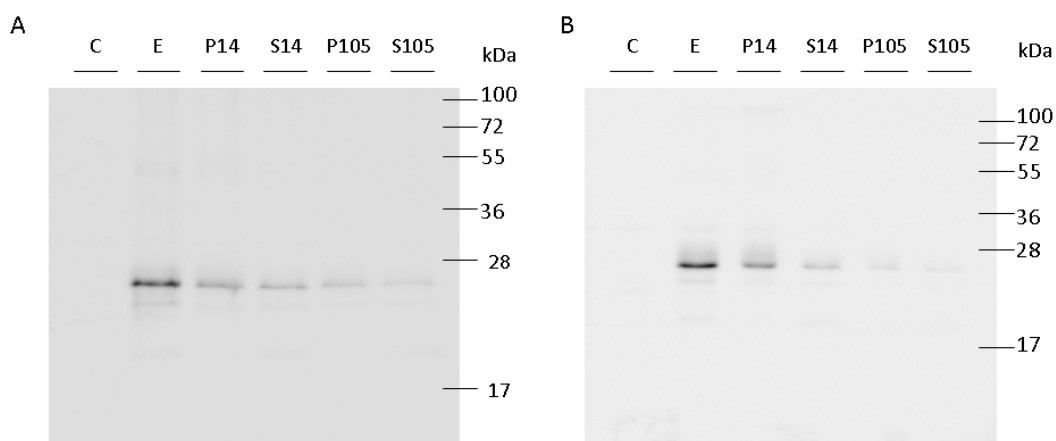


Figura R 73. Western de les etapes de purificació de HIS:S/TIL1 (A) i HIS:AtTIL (B). C: Extracte de fulla de *N. benthamiana* infiltrada amb eGFP utilitzat com a control negatiu; E: Extracte de fulla de *N. benthamiana* infiltrada amb la proteïna TIL en qüestió; S14 i P14 Sobrenedant i precipitat, respectivament, d'una centrifugació de 15 min a 14.000xg de l'extracte E; S105 i P105 sobrenedant i precipitat, respectivament, d'una centrifugació una 1 h a 105.000xg de la fracció S14.

El següent pas de la purificació és la filtració amb el cutoff de 0,2  $\mu\text{m}$ . Tenint en conta la dificultat de recuperar les restes del filtre es va procedir a emular el procés precipitant les membranes per una ultracentrifugació a 105.000xg durant una hora. Com s'observa en la Figura R 73 la major part de la proteïna de el sobrenedant (S14) es concentra en la fracció de membranes de la centrifugació (P105) deixant una petitíssima part de la proteïna al Sobrenedant (S105).

La presència de tant poca proteïna després de la centrifugació suggereix una associació de les proteïnes *S/TIL1* i *A/TIL* a membranes i explica la dificultat per purificar-les des de l'extracte de *N. benthamiana*.

Per a poder superar aquesta problemàtica es va procedir a purificar les proteïnes des de una quantitat de 10 g de fulles infiltrades de *N. benthamiana*. Per aconseguir un major rendiment es va eluir la proteïna de la columna de níquel una solució amb 270 mM d'imidazol. Aquesta concentració d'imidazol és la màxima on s'elueix proteïna TIL de la columna de níquel en la purificació des de *E. coli*.

Realitzant aquests canvis es va poder obtenir 1 mL de cada proteïna a concentracions no molt altes (0,3 mg/mL per HIS:*S/TIL1* i 0,25 mg/mL per HIS:*A/TIL*), no obstant, suficients per a poder realitzar un espectre per a comprovar la presència de grup hemo (Figura R 74). Com s'observen en els espectres d'absorció, *S/TIL1* i *A/TIL* no presenten el pic 406 nm associat al grup hemo.

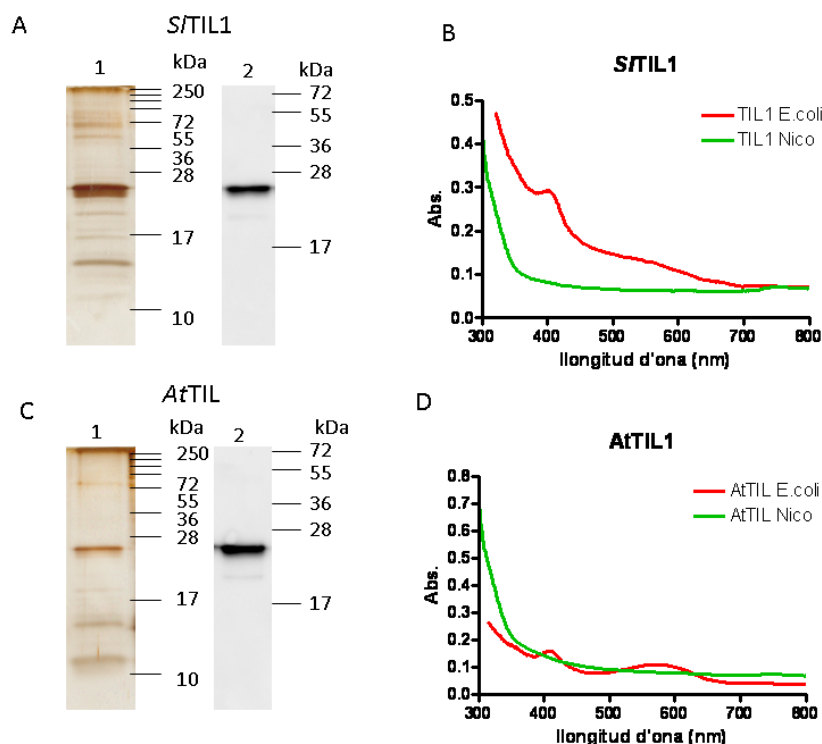


Figura R 74. Espectres d'absorció de les proteïnes HIS:*S/TIL1* i HIS:*A/TIL1*. A) Gel tenyit en plata (1) i western (2) de la fracció purificada de HIS:*S/TIL1* a partir de fulles de *N. benthamiana*. B) Espectre d'absorció de 0,3 mg/mL de la proteïna HIS:*S/TIL1* purificada des de fulles de *N. benthamiana* respecte l'obté a partir de l'expressió en *E. Coli*. C) Gel tenyit en plata (1) i western (2) de la fracció purificada de HIS:*A/TIL1* a partir de fulles de *N. benthamiana*. D) Espectre d'absorció de 0,25 mg/mL de la proteïna HIS:*A/TIL1* purificada des de fulles de *N. benthamiana* respecte l'obtes a partir de l'expressió en *E. Coli*.



# Discussió



**Capítol I: Identificació de gens expressats diferencialment en RILs contrastants en el contingut de carotenoides i  $\alpha$ -tocoferol i estudi del seu possible paper en el desenvolupament i maduració del fruit.**

En el capítol I de Resultats s'ha abordat el perfilat de carotenoides i  $\alpha$ -tocoferol de mostres de fruits de la col·lecció de 182 RILs independents de tomàquet generades a partir dels parentals *S. lycopersicum* var. Money Maker (MM) i *S. pimpinellipholium* TO-937. L'objectiu d'aquesta activitat va ser el d'identificar línies contrastants en el contingut i/o perfil de carotenoides i  $\alpha$ -tocoferol. Posteriorment, es va procedir a les anàlisi transcriptòmiques dels fruits de les línies contrastants identificades per tal d'identificar gens expressats diferencialment i que estiguessin potencialment implicats en la síntesi i acumulació dels metabòlits indicats anteriorment.

Com es descriu en l'Apartat 1 de Resultats es va analitzar el contingut de carotenoides i d' $\alpha$ -tocoferol en mostres de fruit de les RILs corresponents a dues temporades consecutives (2005 i 2006). Les mostres analitzades van incloure tant repliques biològiques com experimentals. Els resultats obtinguts van mostrar una gran variabilitat en el contingut de licopè,  $\beta$ -carotè,  $\alpha$ -tocoferol i carotenoides totals en el conjunt de les mostres analitzades, tant en la temporada 2005 com en la 2006. Aquesta variabilitat va ser observada no només entre les diferents RILs sinó també, en alguns casos, entre les repliques biològiques corresponent a una determinada mostra.

Un resultat inesperat fou que en les mostres de 2005 la línia parental TO-937 presentava un baix contingut de pigments (Taula R1 /Figura R 5). Cal indicar que aquesta línia parental havia estat escollida pel seu alt contingut de carotenoides. Com a primera interpretació es va proposar que el resultat podria ser degut al contingut diferencial d'aigua en els fruits de les línies parentals. Tot i que es cert que els fruits de TO-937



mostren un pes sec superior als de MM, aquesta no pot ser considerada com a causa dels baixos nivells de carotenoides observats. Com s'observa en la Taula R2, els fruits de la línia parental TO-937 recol·lectats en el 2006 mostren uns nivells superiors de licopè,  $\beta$ -carotè,  $\alpha$ -tocoferol i de carotenoides totals tant si s'expressa en relació al pes sec o com al pes fresc. Tenint en compte aquest resultat es pot pensar que el resultat obtingut en el 2005 es trobarien afectats per les condicions de creixement, presència de malalties o requeriments nutricionals.

Al marge d'aquest fet, i un cop conegudes les dades del contingut i perfil de pigments de les dues temporades, es va determinar si existien RILs que de forma consistent presentaven nivells elevats disminuïts de licopè,  $\beta$ -carotè i/o  $\alpha$ -tocoferol (Figura R 9). D'aquesta forma es van poder identificar quatre línies que es van catalogar com d'elevat contingut de carotenoides (HC1, HC2, HC 3 i HC4) i tres línies que mostraven un contingut de carotenoides molt baix (LC1, LC2 i LC3) (Taules R3 i R4).

A partir de mostres de RNA de fruits de les RILs contrastants indicades anteriorment es van realitzar els estudis transcryptòmics descrits en l'Apartat 2 del present treball. Tal com es descriu en aquest apartat, els resultat obtinguts van mostrar un gran nombre de gens expressats de forma diferencial entre les línies d'alt contingut de carotenoides en relació amb les de baix contingut de carotenoides (Figura R 9). Tenint en compte l'elevat nombre de gens identificats (384 gens) i el fet que la seva possible funció no es podia relacionar de forma evident amb la síntesi i acumulació de carotenoides es va procedir a restringir la selecció de gens candidats utilitzant altres tipus de criteris més restrictius. Un d'ells va ser el de centrar-se en els grups de gens que s'expressaven de forma diferencial entre les línies d'alt contingut de carotenoides amb en conjunt de línies a baix contingut. D'aquesta manera el nombre de candidats es va restringir a 111 (suma dels sectors blancs mostrats en la Figura R 10) que corresponien a 85 gens candidats. Malgrat tot, el nombre de gens era encara relativament elevat i molt heterogeni en el relatiu a la seva possible funció. Una observació interessant va ser la identificació en aquests 4 subgrups de dos gens que estaven expressats de forma diferencial en tots ells. El contigs corresponents a aquest dos gens corresponien als codis SGN-U220026 i SGN-U216160 i codificaven per proteïnes amb similitud a transducines i proteïnes d'unió a àcid salicílic, respectivament (veure més endavant).

Es van identificar 5 gens addicionals que estaven expressats de forma diferencial entre les línies de baix contingut de carotenoides i les d'alt contingut. Aquests gens estaven representats pels unigenes SGN-U215748, SGN-U227393, SGN-U217177, SGN-U217449 i SGN-U214782. Les proteïnes codificades per aquests gens estaven relacionades amb creixement cel·lular (SGN-U215748 *Expansin-related protein 1-like*), vesiculació (SGN-U227393 *Clathrin Coat Assembly Protein-Related [Arabidopsis thaliana]*), metabolisme d'aminoàcids (SGN-U217177 *Alanina racemase [Arabidopsis thaliana]*) i de funció desconeguda (SGN-U217449 *Putative Homology: p53* i SGN-U214782 *Expressed protein [Arabidopsis thaliana]*). Tal com s'ha indicat anteriorment, cap d'aquests gens mostren una relació clara amb la síntesi o acumulació de carotenoides.

No es pot perdre la perspectiva que les mostres de RNA utilitzades per realitzar els *arrays* prové d'un grup de plantes amb un genoma mosaic entre els parentals MM i To-937. Curiosament les RILs HC1, HC2 i en menor mesura HC3 mostraven fruits de tomàquets relativament petits amb un major contingut en pes sec i un creixement vegetatiu molt ramificat i similar al de To-937. Cal indicar també que les línies LC1 i LC2 presentaven fruits més grans, de menor contingut de pes fresc i una planta robusta amb tiges gruixudes similars a MM. Com s'indica en l'apartat 1.3 del capítol I, TO-937 i MM van mostrar una diferència molt gran en la mida de les cèl·lules del pericarp. En contraposició no semblen presentar però una diferència significativa en la grandària dels cromoplasts. La diferència relativa de la mida dels fruits i el contingut de carotenoides podria estar relacionat amb el volum cel·lular ocupat pels cromoplastes. En aquest sentit, s'han publicat treballs on es demostra que l'augment del nombre de cromoplasts en el fruit promou un augment del contingut de carotenoides (Galpaz *et al.* 2008, Kolotilin *et al.* 2007). Per tant, es possible que la diferència de grandària entre els tomàquets de les línies HC i les LC, i en conseqüència l'abundància relativa dels cromoplastes respecte del volum cel·lular, pugui constituir un dels aspectes més rellevants en l'acumulació de carotenoides en el fruit. Un aspecte que reforçaria aquesta hipòtesi és el d'haver identificat una *Expansin-related protein 1-like* menys expressada en línies HC en relació amb les LC.

Tenint en compte que les diferències fenotípiques entre les RILs poden representar un factor clau, no es d'estranyar que en els diagrames de Venn mostrats en la Figura R 10

es mostri un nombre de gens expressats diferencialment dues vegades superior a la resta de comparatives entre cada una de les línies HC respecte la línia LC2. La gran quantitat de diferències observades en les comparatives entre la línia LC2 i el conjunt les línies HC podria explicar-se per la presència en aquesta línia d'una major part de genoma de MM en relació a la resta de línies LC o podria indicar una diferent regulació en el procés global de maduració.

Tot i que el relació entre la grandària cel·lular i el volum ocupat per els cromoplastes pot explicar en part l'alta concentració de carotenoides en To-937 respecte de MM, aquest no seria l'únic factor que es trobaria implicat en aquest procés. Com es pot observar en la Figura R 7, tant To-937 com MM presenten els màxims valors contrastants en relació al percentatge de pes sec, malgrat que no ho són en els seu contingut de carotenoides. A part, les diferències pel que fa a la mida del fruit i percentatge de pes sec de les RILs menys contrastants del grup, la HC4 i la LC3, no són pas tant diferents (10,64 i 9,67, respectivament Taules R3 i R4). Aquesta observació, recolzaria l'existència d'altres mecanismes que afavoririen l'augment del contingut de carotenoides, com per exemple l'augment d'estructures intra-cromoplastídiques (Liu *et al.* 2004). Això obriria la possibilitat a que alguns dels gens expressats diferencialment detectats en l'array podrien estar relacionats en processos que influeixen la carotenogènesi o el procés acumulatiu.

Tanmateix, la detecció d'únicament dos gens que s'expressaven de forma diferencial entre les RILs contrastants estudiades va ser sorprenent i a la vegada interessant, ja que apuntava a la possible existència de mecanismes de regulació diferencials en el procés de maduració entre les línies parentals. Com s'ha comentat en la introducció, el procés de maduració en el fruit del tomàquet s'inicia en resposta a un petit nombre de efectors que activen l'expressió de diferents cascades gèniques que, a la vegada, promouen importants canvis bioquímics en el fruit. Per tant, es possible que la modificació de pocs gens pugui provocar canvis importants en el procés de maduració i en l'acumulació de carotenoides. La presència d'un genoma mosaic determinat en cada RIL podria influir en la regulació del procés global de maduració, generant en cada cas un contingut i perfil de pigments diferent. Així, la regulació de pocs gens explicaria la variabilitat que existeix no solament entre les línies d'alt i baix contingut de carotenoides, sinó també les diferències dins dels dos grups. Per aquest motiu es podria pensar que els

unigens SGN-U220026 i SGN-U216160 formen part de passos comuns en els diferents processos de maduració entre les RILs identificades. Per altre banda, l'absència de gens relacionats directament amb la síntesis de carotenoides en les RILs contrastants que presenten valors superiors i inferiors als parentals suggereix que els gens identificats presenten un caràcter epistàtic, aspecte que estat anteriorment postulat en la regulació de la maduració del fruit del tomàquet (Hochholdinger i Hoecker 2007).

## 1. Caracterització de l'unigen SGN-U220026.

Com s'ha descrit en l'Apartat 4, l'unigen SGN-U220026 codifica per un petit fragment amb homologia amb proteïnes d'alt pes molecular de diferents espècies que conté un domini *Bromodomain WDR9-I repeat*. Malgrat que no s'ha pogut identificar la totalitat de la seqüència proteica, es pot postular la presència d'almenys un domini *Transducin family protein / WD-40 repeat family protein*. Aquest aspecte vindria reforçat pel fet que totes les proteïnes que contenen el domini *Bromodomain WDR9-I repeat* mostren també la presència d'aquest segon domini, a excepció de la "*predicted protein (XP\_002311394)*" que prové de la predicció de gens en el genoma de *Populus trichocarpa* (Taula R5 i Figura R 12).

La presència d'aquests dos dominis es detecten en proteïnes amb capacitat d'interacció amb acetil-lisines de les histones i pot estar implicada en multitud de processos tals com la regulació transcripcional, el silenciament post-transcripcional, el remodelament de la cromatina, el splicing del RNA, la replicació de DNA, la transducció de senyal, control del cicle cel·lular i apòdosis (Philipps, *et al.* 2008, Xu i Min 2011). Aquestes proteïnes són també essencials per processos tan dispars com el desenvolupament dels oòcits i espermatogènesi en humans (Philipps, *et al.* 2008) o la formació larval i ocular en *Drosophila melanogaster* (D'Costa *et al.* 2006).

Malgrat que s'han identificat gens que codifiquen proteïnes amb aquestes dominis en plantes es desconeix completament la seva funció, fins i tot en la planta model *A. thaliana*. Per tal d'esbrinar la possible funció de la proteïna codificada per l'unigen SGN-U220026 es va procedir a caracteritzar de forma preliminar el fenotip de dos mutants d'*Arabidopsis* afectats en la funció del gens homòlegs At5g49430 i At2g47410

Desgraciadament les insercions del T-DNA en les línies mutants d'*Arabidopsis* estudiades presenten un fenotip letal en homozigosi que afecten el desenvolupament de la plàntula en etapes molt primerenques. Aquests fenotip tan sever indica que les proteïnes codificades pels gens At5g49430 i At2g47410 juguen un paper important en la regulació d'algun procés essencial pel creixement i/o desenvolupament de la planta.

Tot i que no s'ha estudiat l'efecte en el tomàquet, l'extrapolació d'aquestes dades suggereix que l'unigen SGN-U220026 pot trobar-se relacionat amb la regulació d'algun procés important durant el desenvolupament i la maduració del fruit. S'ha descrit que la maduració del fruit porta associat un canvi del patró de metilació de certs gens (Seymour *et al.* 2008). Degut als efectes estudiats en altres organismes, se possible que la proteïna codificada per l'unigen SGN-U220026 pugui estar relacionada amb aquests procés. Relacionat amb la maduració, es possible que l'unigen SGN-U220026 pugui regular gens implicats amb la síntesis i/o acumulació de carotenoides, sent un dels possibles gens epistàtics comentats anteriorment.

Malgrat que l'unigen SGN-U220026 s'ha identificat en relació amb la maduració del fruit no es pot descartar que el seu producte gènic estigui també implicat en altres processos de creixement i desenvolupament de la planta. Per tal de poder elucidar el paper d'aquest gen s'hauria de aconseguir la informació completa de la seqüència del gen recolzant-se en les dades del genoma malauradament no disponibles per aquest gen. Un cop s'hagués confirmat l'estructura del gen, o si més no un fragment prou raonable, es podria realitzar un silenciament per RNAi (Barampuram i Zhang 2011). En el cas que SGN-U220026 fos essencial pel desenvolupament de la planta, el silenciament mitjançant RNAi es podria realitzar amb promotors específics de fruit per tal d'observar en el procés de maduració.

## **2. Caracterització de l'unigen SGN-U216160.**

En les etapes inicials de l'estudi de l'unigen SGN-U216160 es va detectar que aquest estava mal ensamblat i que realment contenia seqüències corresponents a dos mRNA diferents. Malgrat això, aquests dos mRNAs codificaven per dues proteïnes que mostraven

elevada similitud amb la proteïna SABP2 de *N. tabaccum*, i que de forma arbitrària es van anomenar *SISABP2A* i *SISABP2B*. Com ja s'ha indicat anteriorment la SABP2 de *N. tabaccum* és una proteïna relacionada amb defensa que catalitza la reacció de desmetilació de l'àcid metilsalicílic (MeSA) per formar àcid salicílic (SA).

L'elevada similitud en la seqüència de nucleòtids dels mRNAs *SISABP2A* i *SISABP2B* suggereix que els gens corresponents podrien haver derivat d'una duplicació gènica relativament recent. S'ha postulat la hipòtesis que les duplicacions de gens relacionats en estrès i defensa (com podria ser el cas de *SISABP2A* i *SISABP2B*) afavoreixen la supervivència de les plantes al generar noves proteïnes capaces d'evolucionar cap a la neofuncionalitat, amb diferent especificat en el patró d'expressió o tipus d'estrès (Zou *et al.* 2009). Aquest cas no sembla ser únic del tomàquet ja que en altres espècies com *Populus trichocarpa* (pollancre) (Zhao *et al.* 2009) i *Arabidopsis thaliana* (Vlot *et al.* 2008) s'han detectat també diferents versions de SABP2.

Per tal aprofundir en la possible duplicació dels gens que codifiquen per *SISABP2A* i *SISABP2B* es van buscar regions homologues dins del genoma de tomàquet. D'aquesta manera es van delectant dues noves seqüències codificants amb elevada similitud (85 al 92 %) situades entre els dos gens *SISABP2* i que es van denominar CDS1 i CDS2 (Figura D 1). També es van detectar zones amb elevada homologia distribuïdes al llarg del cromosoma 2, malgrat que cap d'elles mostrava el patró de tres exons trobat en els gens que codifiquen per les proteïnes *SISABP2A* i *SISABP2B* (resultats no mostrats). Malgrat la presència d'aquestes seqüències en el genoma no s'ha descrit l'expressió de transcrits relacionats en bases de dades públiques consultades.

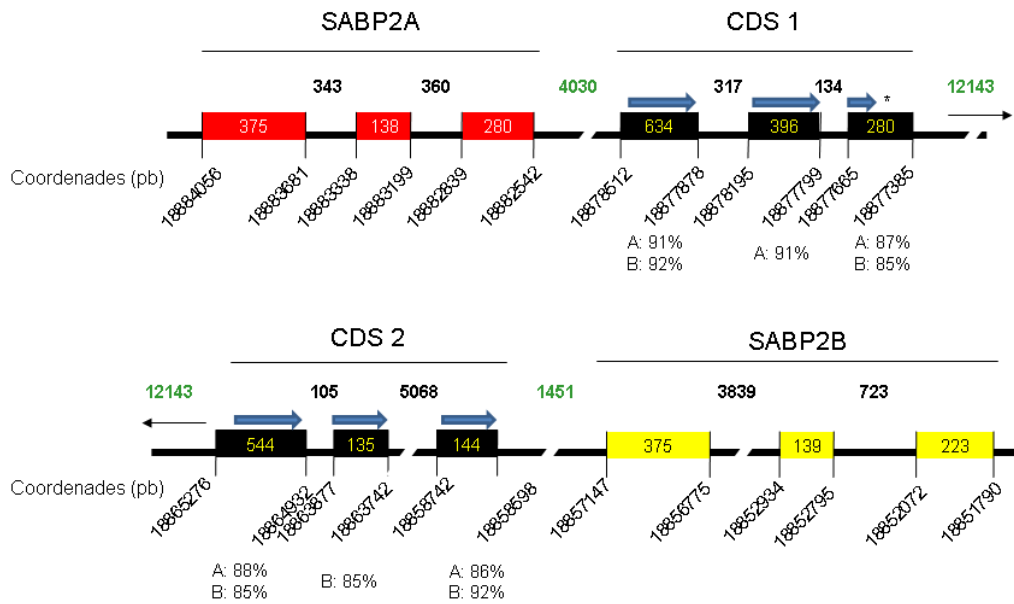


Figura D 1. Seqüències relacionades amb *S/SABP2A* i *S/SABP2B* dins el clon genòmic C02HBa0044L14 del cromosoma 2 de *Solanum lycopersicum* (SL2). Els gens *S/SABP2A* i *S/SABP2B* es mostren en color vermell i grog, respectivament. Els possibles gens relacionats (CDS1 i CDS2) es mostren en negre. En cada possible exó es mostra la seva grandària, en negre s'indica el número de nucleòtids entre introns i en verd la distància en pb entre seqüències codificants. La imatge no es troba a escala. Sobre cada exó dels gens CDS s'indiquen en fletxes blaves possibles pautes de lectura, l'asterisc representa un codó stop prematur i a la part inferior es mostra la similitud amb *S/SABP2A* (A) i *S/SABP2B* (B).

Després d'identificar els gens corresponent a *S/SABP2A* i *S/SABP2B* es van realitzar estudis per establir el patró d'expressió dels transcrits corresponents durant el desenvolupament i maduració del fruit. Encara que els dos gens s'expressen en el fruit, el transcrit que presenta uns majors nivells és el codificat per *S/SABP2A*. Aquesta observació, sumada als fets que la proteïna *S/SABP2B* no presenta el lloc d'unió al·lostèric a SA i que aquesta mostra una major divergència de seqüència respecte *NtSABP2*, van ser els principals motius per centrar-se principalment en la caracterització funcional del *S/SABP2A*. Per aquest propòsit es va procedir a clonar la seqüència codificant de la isoforma *S/SABP2A* en el vector pET23 i expressar-la en *E. coli*. Com a control es va expressar també la *NtSABP2*. Els resultats descrits en l'Apartat 3.4 van mostrar que la *S/SABP2A* i la *NtSABP2* recombinants són capaces de catalitzar la conversió de MeSA en SA amb una eficiència ( $V_{max}$ ) molt similar. Aquest fet suggereix l'existència d'activitat MeSA metilesterasa en el fruit durant la maduració. No obstant, cal comentar que aquestes dues proteïnes formen part de la família de les  $\alpha/\beta$ -hidrolases, els membres de la qual presenten una alta "promiscuïtat catalítica" al poder catalitzar més d'una reacció (Kourist, *et al.* 2010). En el cas de *NtSABP2* s'ha descrit que pot reaccionar també amb MeIAA i metil-

acibenzolar-S-metil (anàleg estructural del SA), si bé amb menor afinitat (Forouhar *et al.* 2005, Tripathi *et al.* 2010). Per tant, no es pot descartar *a priori* que la proteïna *SISABP2A*, o fins i tot *SISABP2B*, de tomàquet puguin mostrar també aquestes activitats.

El fet que durant la maduració del fruit de tomàquet s'indueixi l'expressió de *SISABP2A*, i per tant possiblement els nivells d'activitat MeSA esterasa, i es pugui correlacionar amb una disminució del nivell de carotenoides, permet postular que aquest efecte podria venir determinat per l'activació dels mecanismes relacionats amb la senyalització per SA.

El metabolisme del SA s'ha estudiat en diverses plantes. Es coneix que la via de síntesis s'inicia amb la conversió de fenilalanina a cinnamat per acció de l'enzim fenilalanina amonio liasa (PAL). El cinnamat es convertit posteriorment a àcid benzoic i SA a àcid benzoic mitjançant l'acció de dos enzims no caracteritzats encara (Figura D 2) (Chen *et al.* 2009, Hayat *et al.* 2010), La síntesis de SA normalment va associada a la seva acumulació en la vacuola en forma de diferents glucosilconjugats (Dempsey *et al.* 2011, Loake i Grant 2007, Rivas-San Vicente i Plasencia 2011).

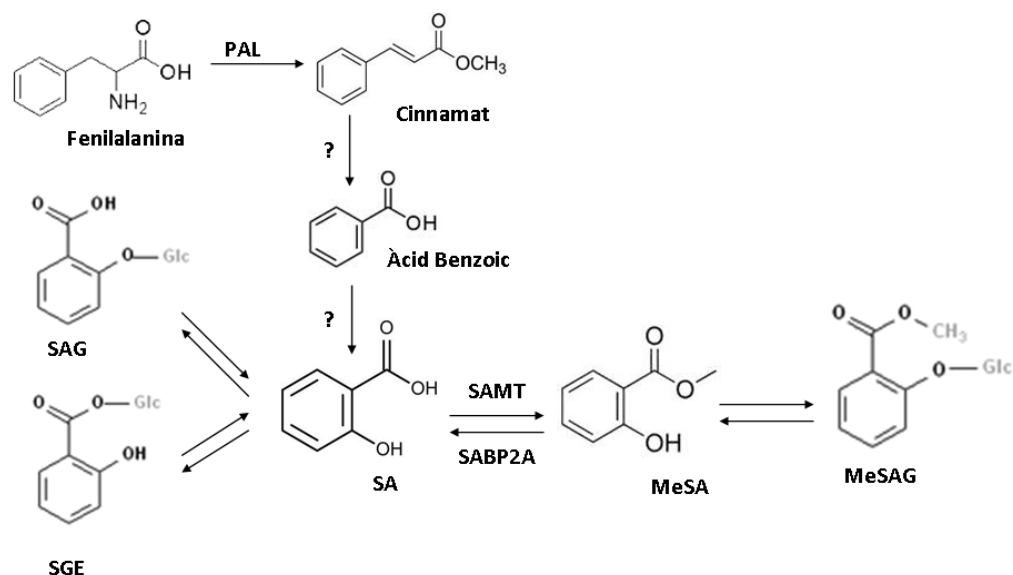


Figura D 2. Esquema de la síntesis de SA en les plantes. La síntesis d' àcid salicílic s'inicia de l'aminoàcid Fenilalanina. Es coneix que en tomàquet es realitza amb els intermediaris cinnamat i àcid benzoic. Per evitar que el SA sintetitzat en la cèl·lula presenti activitat normalment es conjuga amb altres compostos com glúcids. SA, àcid salicílic; SAG, SA 2-O-β-D-glucòsid; SGE, SA éster de glucosa; MeSA, metil salicilat; MeSAG, metil salicilat 2-O-β-D-glucòsid; PAL, fenilalanina amino liasa.



Tenint en compte que els nivells d'expressió de PAL semblen mantenir-se durant la maduració en les bases de dades d'expressió en fruit (Fei et al. 2004) i que es detecta tan cinnamat com l'àcid benzoic en el fruit madur (Dal Cin *et al.* 2011) es pot assumir que la síntesis de SA i dels seus conjugats es manté activa durant la maduració.

A part de les etapes implicades en síntesi de SA es coneix un altre enzim relacionat amb la metabolització d'aquest compost. Es tracta de la *Salicylic acid methyl transferase* (SAMT) que catalitza la metilació de SA utilitzant S-AdoMet per a formar el MeSA (Tieman, et al. 2010).

Es de ressaltar que a més de catalitzar la reacció contrària a la de la *SISABP2A*, la SAMT mostra uns nivells d'expressió complementaris, augmentant en els en el fruit verd madur i disminuint a partir de l'inici de la maduració (Tieman, et al. 2010) (Figura D 3).

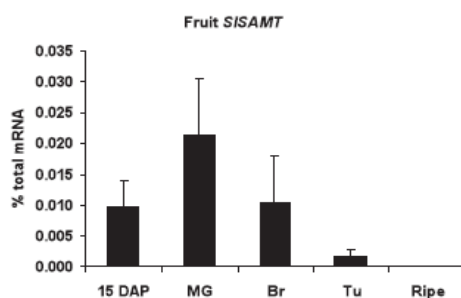


Figura D 3. Nivells d'expressió de SISAMT en diferents teixits i estadis de maduració del tomàquet per TagMan Real-Time RT-PCR. 15 DAP:Dies després de la pol·linització, (G); MG: verd madur; Tu: turning Virant (O); Ripe Vermell madur. Extret de Tieman i col·laboradors (2010)

En el treball de caracterització de la SAMT de tomàquet descrits per Tieman (2010) es van mesurar també els nivells de SA i MeSA en el fruit durant el desenvolupament i la maduració, i que per facilitar aquesta discussió, es mostren en la Figura D 4. Es pot observar que els nivells de SA lliure es mantenen relativament elevats en tots els estadi, però amb una marcada disminució (aproximadament un 40 %) en les etapes inicials del procés de maduració. Aquestes etapes es correspon amb el l'etapa climatèrica de la maduració. L'augment dels nivells de SA lliure en les etapes finals del procés de maduració es podria correlacionar, per tant, amb l'activació de l'expressió de la *SISABP2A*.

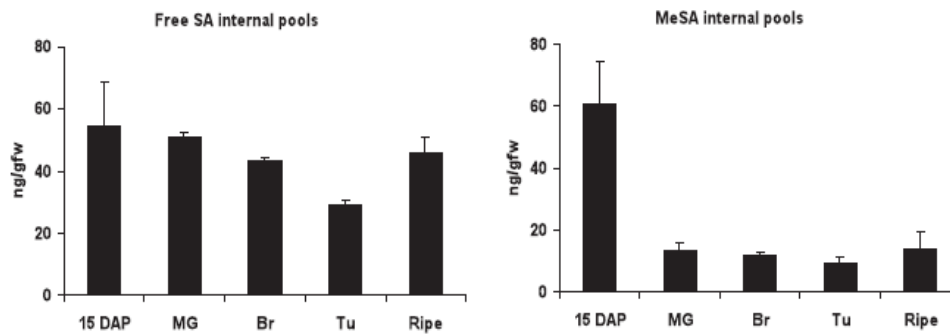


Figura D 4. Nivells de SA i MeSA al llarg el desenvolupament i maduració del fruit del tomàquet. 15 DAP: fruit verd en fase de creixement; MG: fruit verd madur; Br: fruit en estadi “breaker”; Tu: fruit en les fases inicials de la maduració (“Turning”); Ripe: Fruit vermell madur. Extret de Tieman i col·laboradors (2010)

La presència en el fruit de dos enzims amb activitats antagòniques i l’existència de patrons d’expressió complementaris podria indicar que el paper del SA és diferent abans i després del pic climatèric. Conforme aquestes dades, en els estadis de desenvolupament de fruit i el pre-climatèric el fruit sintetitza SA i el transforma a MeSA, tanmateix, en les etapes posteriors realitza la reacció contrària.

S’ha descrit que la forma àcida del SA no pot mobilitzar-se fàcilment entre membranes i que és necessària la seva metilació per permetre la difusió per la planta (Park, *et al.* 2009). El principal efecte del SA, i a la vegada el més estudiat, es l’activació del procés conegut com Resistència Sistèmica Adquirida (SAR) (Grant i Lamb 2006). La SAR es defineix com la sensibilització de parts sanes de la planta a partir de senyals generades en les zones on es pateix un estrès o un atac per patògens. La principal proteïna relacionada amb la SAR en *N. tabacum* es la *NtSABP2*, que genera un augment intracel·lular de SA que és l’iniciador de l’expressió dels gens anomenats *Pathogenesis-Related* (PR) que condicionen a la planta a preparar-se per respondre a l’estrès (Hayat, *et al.* 2010, Park, *et al.* 2009).

En el cas del fruit del tomàquet s’ha descrit que l’activació de la SAR per l’addició exògena d’espècies de SA inhibeixen la maduració de tomàquets verds madurs (Leslie i Romani 1988). S’ha descrit també que aquests tractaments afectaven principalment la síntesis d’etilè com a conseqüència de la inhibició dels enzims ACS i ACO (Ding i Wang 2003).

S'ha descrit que en fruits de tomàquet sotmesos a condicions d'estrès per baixes temperatures el SA estaria implicat en la inducció dels gens PR (Ding *et al.* 2002) i de proteïnes relacionades amb el xoc tèrmic (HSPs; *High Sock Proteins*) (Ding *et al.* 2001), així com, l'increment de la termogènesis a través de l'activació de l'AOX (Oxidasa Alternativa) mitocondrial (Fung *et al.* 2006). Malgrat que no es coneixen més estudis en el fruit tomàquet apart dels indicats anteriorment, s'ha descrit recentment que en altres fruits climatèrics com el kiwi i el plàtan el SA pot disminuir la degradació de la paret cel·lular i la reducció de sòlids solubles i sucres a més de promoure inducció de la síntesi d'òxid nítric (NO) (Asghari i Aghdam 2010, Manjunatha, *et al.* 2010).

Tot i que s'han descrit diferents efectes relacionats amb respostes a condicions d'estrès, aquestes són difícilment extrapolables a la regulació de la maduració del fruit del tomàquet. Suposadament, les RILs es van créixer i mantenir en condicions de cultiu controlades i, per tant, sense estrès. Així, l'efecte de SABP2A en els nivells de carotenoides i  $\alpha$ -tocoferol observat en les RILs contrastants hauria de ser independent de la resposta a estrès. Recolzant aquestes dades, s'ha descrit que l'efecte en el retardament de la maduració en tomàquet succeeix en etapes anteriors al pic climatèric (Ding i Wang 2003), però l'expressió de *SISABP2A* és major en les etapes post-climatèriques. El que indica que el retardament de la maduració per la presència de SA no es correlaciona amb l'expressió de *SISABP2A*.

En el treball publicat per Tieman i col·laboradors (2010) es mostren també els nivells de MeSA durant el desenvolupament i la maduració del fruit (Figura D 4). Tal com s'ha comentat anteriorment cal ressaltar que la quantificació d'aquest metabòlit pot ser difícil al tractar-se d'un compost volàtil i fàcilment difusible cap a altres parts de la planta. Com es pot observar en la figura D4, els nivells de MeSA són molt elevats en fruits en creixement (15 DAP) en relació als detectats en el fruit verd madur i durant la maduració. És possible que el MeSA produït per el fruit pugui provocar canvis fisiològics a les fulles. Així, s'ha descrit que en absència d'estrès el SA pot regular el creixement (induint l'elongació al inhibir la divisió cel·lular), provocar el tancament d'estomes, modular la fotosíntesis (modificació de l'estructura cloroplastídica foliar, augment de la taxa de captació de CO<sub>2</sub>, del contingut de clorofil·la, de les activitats de l'anhidrasa carbònica i la

nitrat reductasa), i també augmentar l'eficiència de la respiració, germinació, floració, i mort cel·lular (Rivas-San Vicente i Plasencia 2011).

En relació amb el fruit es podria pensar que el MeSA produït activament durant les etapes creixement podrien actuar com a senyal per tal que la planta modifiqués el seu metabolisme. Aquest canvi metabòlic modularia la captació de precursors i energia cap al fruit per tal de promoure el seu desenvolupament i mantenir un estat hídric adequat. L'estat hídric del fruit sembla ser essencial per el posterior desenvolupament de les llavors (Srivastava i Handa 2005), i per aquest motiu el tancament d'estomes mediat per SA (Rivas-San Vicente i Plasencia 2011) podria ser clau en l'etapa pre-climatèrica.

Els arguments que suggereixen que el SA pot actuar com a hormona de senyalització fruit-planta es poden recolzar amb els resultats obtinguts en els tests de resposta a patògens de fruits realitzats en plantes transgèniques sobreexpressores de SAMT, on es va demostrar que no incrementaven significativament el nivell de la resistència a patògens (Tieman, *et al.* 2010).

Malgrat les hipòtesis considerades anteriorment, sembla clar que un cop arriba el pic climatèric el fruit deixaria de ser productor de MeSA per transformar-se en receptor. Aquesta proposta és consistent amb la capacitat del fruit de madurar sense estar unit a planta, el que fa pensar que la majoria de nutrients necessaris es troben emmagatzemats o s'obtenen de la degradació d'estructures cel·lulars del pericarp. Per tant, la reducció de requeriments del fruit provinents de la planta estaria relacionada amb el canvi d'emissió a percepció de MeSA.

Es possible que l'activació de l'expressió de *SISABP2A* durant l'inici de la maduració pugui provocar també un augment a la sensibilitat del fruit al SA. Així, l'eventual augment dels nivells de SA a partir de MeSA produït en la resta de la planta podria modular diferents processos. En primera instància, com ja s'ha indicat anteriorment, podria modular l'inici de la maduració al provocar la inhibició dels gens implicats en la inducció autocatàlitica d'etilè. A més, el SA podria actuar també inhibint la divisió cel·lular del fruit i promovent l'elongació cel·lular (Rivas-San Vicente i Plasencia 2011). D'aquesta manera, la menor grandària dels fruits de les RILS amb alts nivells de carotenoides podria

estar relacionada amb aquests fets. Malgrat tot, no es pot descartar que l'augment dels nivells de la proteïna *SISABP2A* en els estadis finals de maduració estigui relacionada amb els efectes coneguts de la SAR en l'eventual resposta dels fruit a condicions d'estrès biòtic o abiòtic que es puguin donar en la planta. En aquest context, és interessant senyalar que durant la transició dels cloroplasts a cromoplastes en el fruit del pebrot s'ha detectat una activació de mecanismes antioxidants. Així, la inducció d'enzims com la superòxid dismutasa o el cicle de l'ascorbat-glutatió ha permès suggerir que durant la diferenciació dels cromoplastes es produeixen nivells elevats d'espècies reactives d'oxigen (Marti *et al.* 2009). Com s'ha comentat anteriorment, el SA podria mediatitzar aquest tipus de resposta en el fruit (Hayat *et al.* 2010).

Un altre nivell de regulació potencialment associat a la inducció de *SISABP2A* durant la maduració podria estar relacionat amb la presència de la signatura de seqüència GX SXG associada a activitat lipasa i que està conservada en el centre catalític de *NtSABP2*, *SISABP2A* i *SISABP2B* (Figura R 17). Proves realitzades amb la *NtSABP2* van mostrar certa activitat lipasa en aquesta proteïna que és induïda per la presència de SA en la mescla de reacció (Kumar i Klessig 2003). Malgrat que l'activat lipasa dependent de SA no està ben estudiada, s'ha proposat que podria estar relacionada amb l'activació de certes vies de regulació a través de substàncies lipòfiles (Kumar i Klessig 2003). Recentment s'ha determinat que la presència de SA en la varietat de pebrot *Capsicum chinense* i *Arabidopsis* pot induir l'activació de senyalització per fosfolípids i Ca<sup>+</sup> (Altuzar-Molina *et al.* 2011, Krinke *et al.* 2007). La senyalització per fosfolípids és complexa i regula una gran quantitat de processos, entre ells la resposta a estressos abiòtics i biòtics, el desenvolupament cel·lular i el metabolisme lipídic (Testerink i Munnik 2011). En aquest context s'han descrit diversos exemples en els quals els fosfolípids poden modular el metabolisme secundari com la síntesi de capsantina i fitoalexines en pebrot (Sudha i Ravishankar 2003, Zhao *et al.* 2004) i en la síntesi d'isoprenoides en *Arabidopsis* (Cairó Calzada 2009)

Finalment, tenint en compte que s'ha descrit que el SA pot induir la mort cel·lular (Hayat, *et al.* 2010), es podria relacionar l'activació de la *SISABP2* en el fruit amb les etapes finals de la maduració en les que s'inicia un procés de senescència en el fruit relacionat amb la dispersió final de llavors.

Per tal de resumir i il·lustrar els possibles efectes del SA en el desenvolupament i la maduració del fruit del tomàquet descrits anteriorment s'han preparat els esquemes que es mostren en la Figura D 5.

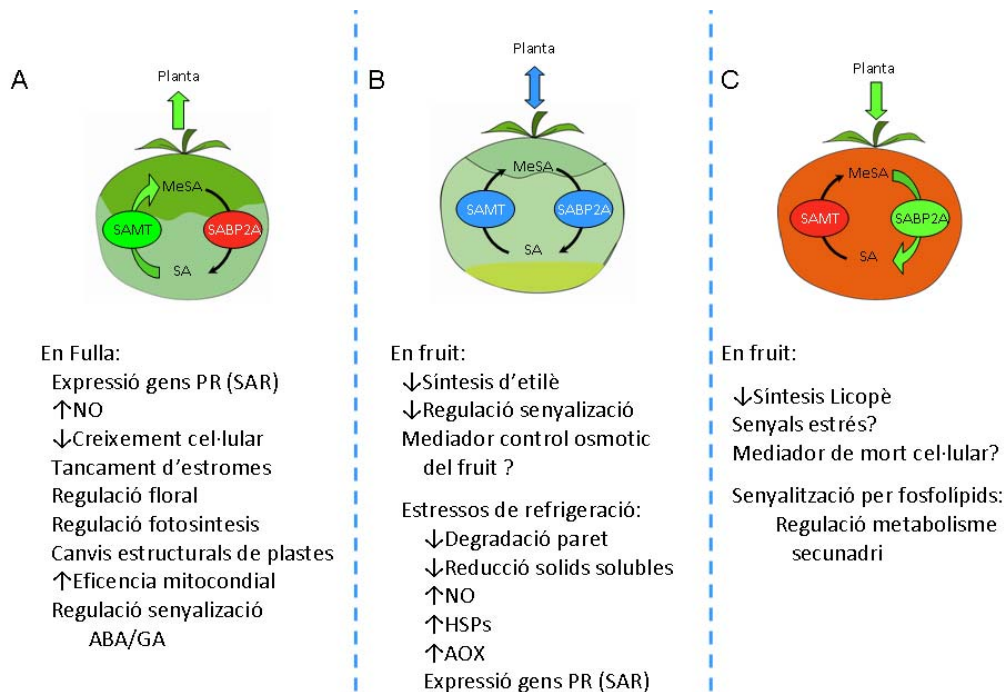


Figura D 5. Resum dels possibles efectes del SA en el desenvolupament i maduració del fruit del tomàquet. En l'etapa pre-climatèrica (A) el fruit del tomàquet presenta la producció de MeSA gracies a l'expressió de l'enzim SAMT. El MeSA produït pot influir en la part vegetativa de la planta en els processos anomenats. Un cop s'inicia l'etapa climatèrica (B) l'enzim SAMT deixa d'expressar-se i en contraposició s'inicia la expressió de SABP2. Per tant, el fruit deixa de ser productor de MeSA per transformar-se en receptor, podent ser susceptible als canvis mostrats en B. Finalment el fruit post-climatèric manté l'expressió de SABP2 podent ser mediador dels processos mencionats.

En resum, es podria concloure que el SA no sols actua com un senyal de resposta a estrès, tal com s'ha descrit fins al moment, sinó que podria trobar-se implicat també, juntament amb altres hormones, en el procés global de maduració del fruit del tomàquet participant com a via de comunicació entre el fruit i la planta. Els processos d'insensibilitat/sensibilitat al MeSA per part del fruit de tomàquet es un aspecte que no s'ha descrit prèviament i podria constituir nou aspecte per comprendre el procés global de maduració.

## ***Capítol II Caracterització de proteïnes relacionades amb complexos lipoproteïcs d'acumulació de carotenoides.***

Per a tal d'identificar proteïnes potencialment involucrades en l'acumulació de carotenoides en el fruit de tomàquet s'han abordat diferents aproximacions de caire proteòmic. Entre les diferents opcions considerades han estat la utilització de la tècnica electroforètica CN-PAGE, la tècnica cromatogràfica descrita per Zhou i col·laboradors (1994) i un mètode mixt utilitzant la part de solubilització de la CN-PAGE i la separació cromatogràfica d'acord amb mètode de Zhou i col·laboradors (1994) (capítol II, apartat 1).

En els cas de la CN-PAGE no es van obtenir bons resultats degut a l'obtenció d'un patró de bandes de proteïnes molt difús que s'ha atribuït a la gran quantitat de lípids presents en la mostra. Quan es va utilitzar el mètode de Zhou i col·laboradors (1994) posat a punt en pastanaga, es va obtenir un patró de bandes (SDS-PAGE) relativament complex associat a fraccions que contenen complexos proteïna-carotenoid. Anàlogament, la separació cromatogràfica de la fracció solubilitzada d'acord amb el protocol de CN-PAGE va permetre obtenir fraccions enriquides en complexos proteïna-carotenoid que presentaven un patró de bandes també relativament complex al analitzar-les per SDS-PAGE.

La major part de les proteïnes majoritàries presents en les fraccions enriquides en complexos proteïna-carotenoid van se identificar mitjançant tècniques espectrometria de masses (ESI-MS-MS) (Taula R 6 i Taula R 7). Cal indicar però que en aquesta tècnica es detecten pèptids derivats del diferents pics de fragmentació que són comparats amb les diferents bases de dades de proteïnes per a la seva identificació. Per tant, la detecció d'un pèptid d'una zona conservada entre diferents proteïnes comporta no es pugui determinar quina d'aquestes és la que realment s'està detectant. Aquest fet és important per la detecció proteïnes que a priori no són plastídiques, es pot suposar que el pèptid detectat correspon a una zona comú entre versions.

A més que, tal com s'acaba de comentar, els pèptids identificats poden correspondre a més d'una proteïna, en aquest cas es van detectar també diversos pèptids que no van poder se assignats a cap proteïna coneguda. Encara que aquest es un problema greu en aquest tipus d'estudi, es d'esperar que aquests problemes es minimitzaran a mida que es vaguin completant les anotacions del genoma del tomàquet.

Entre proteïnes identificades es van detectar proteïnes de membrana, proteïnes relacionades amb processos energètics / transport electrònic, proteïnes relacionades amb la paret cel·lular, en vesiculació, enzims i també proteïnes de funció desconeguda (Taula R 6 i Taula R 7). Tot i que a priori la major d'aquestes proteïnes no mostren relació directa amb la síntesis o acumulació de carotenoides, si que es va detectar que una d'elles estava implicada en la seva síntesis. Es tracta de la *Zeta-Carotè Desaturasa (ZDS)*, l'enzim que transforma el *cis- $\xi$ -carotè* a licopè. A més, es van detectar dues oxigenases de carotenoides que s'han relacionat amb la formació d'aromes i altres productes derivats dels carotenoides. La presència d'aquest enzims reforça la possibilitat altres de les proteïnes identificades puguin estar relacionades amb la síntesi o l'acumulació de carotenoides.

A falta d'un criteri clar poder establir quines de les proteïnes identificades tenien més possibilitats de trobar-se associades a complexes amb carotenoides, es va optar per seleccionar aquelles que de forma reiterada van ser detectades en les diferents mostres analitzades. Així es van seleccionar les proteïnes anotades com *Abcisic stress-ripening protein 1 (SLASRP 1)*, *17,7 Class I small heat shock protein (Sl17,7 HSP)*, *Fruit-specific protein (SIFSP)* i *Temperature-induced lipocalin (SITIL) 1 i 2* per la seva caracterització eventual. Malgrat no tenir cap relació directe amb la síntesi i acumulació de carotenoides, totes elles presentaven un augment d'expressió del mRNAs corresponents durant la maduració del fruit (Figura R 35), mostrant nivells d'expressió que es poden correlacionar amb les etapes en que té lloc l'acumulació de carotenoides en fruit. Per tal d'avaluar la possible funció d'aquestes proteïnes durant la maduració del fruit a continuació s'enumeren els aspecte més rellevants que es coneixen de cada una d'elles.



## 1. L'Absisic stress-ripening protein 1.

L'Absisic stress-ripening protein 1 (SIASRP1) va ser identificada com una proteïna de petita grandària (6,81 kDa) que s'indueix en les fulles del tomàquet en condicions d'estrès (Iusem *et al.* 1993) i va ser caracteritzada posteriorment com a un factor de transcripció induïble en resposta a estrès hídric, salí o a ABA (Amitai-Zeigerson *et al.* 1995). Aquesta proteïna es localitza al citosol i al nucli (Kalifa *et al.* 2004).

SIASRP1 és una proteïna extremadament hidrofílica al contenir 19 lisines, 18 histidines, 5 residus d'àcid aspàrtic i 18 d'àcid glutàmic (Figura D 6). A part, conté un domini ABA/WDS induced Protein que és comú a proteïnes de resposta a estrès hídric i a la fitohormona ABA.



Figura D 6. Seqüència de la l'Absisic stress-ripening protein 1 de tomàquet. Marcat el domini ABA/WDS amb les claus.

El mecanisme d'acció proposat per la SIASRP1 en relació amb l'estrès és curiosa. S'ha proposat que es manté inactiva i desestructurada en el citosol en condicions normals. Quan la planta es sotmesa a estrès per dessecació o salinitat la proteïna capta  $Zn^{+2}$  intracel·lular, es renaturalitza i dimeritza per constituir un factor de transcripció transloca al nucli on activa o inhibeix determinats gens (Goldgur *et al.* 2007, Kalifa, *et al.* 2004, Maskin *et al.* 2007, Rom *et al.* 2006). En sistemes heteròlegs com *Arabidopsis*, s'ha descrit que la funció pot ser la de regular el metabolisme glucídic, podent ser inductor o repressor dels promotors de diferents gens (Shkolnik i Bar-Zvi 2008). Al presentar una localització citosòlica/nuclear i ser un factor de transcripció a priori a priori cap relació amb els carotenoides es va decidir no continuar amb l'estudi d'aquesta proteïna.

## 2. 17,7 Class I small heat shock protein.

Les *heat shock protein* són una gran família de proteïnes relacionades amb reparació, emmagatzematge i estabilització de proteïnes en condicions d'estrès. Van ser detectada en estudis realitzats en resposta a xoc tèrmic, però es poden relacionar també amb altres tipus d'estrès. En les plantes existeixen entre 20 i 40 HSPs implicades en la resposta a diferents tipus d'estrès i senyals de desenvolupament (Ahn i Zimmerman 2006).

La seqüència de la 17,7 Class I small heat shock protein (*Sl17.7HSP*) identificada en aquest estudi mostra, de forma anàloga a la *SlARSP1*, una gran varietat d'aminoàcids carregats al llarg de la seqüència, tal com es mostra en la Figura D 7.

```

1  MSLIPRIFGD RRSSSMFDPF SIDVDFPFRE LGFPGTNSGE TSAFANTRID WKETPEAHVF
61  KADLPGLKLE EVKVEVEEDR VLQISGERNM EKEDKNDKWQ RVERSSGKFM RRRLPENAK
121 MDQVKASMEN GVLTVTVPKE EMKKPDVКСI EISG

```

Figura D 7. Seqüència de la 17,7 Class I small heat shock protein de tomàquet.

Els estudis de localització van mostrar que aquesta proteïna és citosòlica i que s'expressa en tots els teixits de la planta en resposta a xoc tèrmic (Low *et al.* 2000). Es va descriure no obstant que el fruit mostra una expressió constitutiva, de forma coherentment amb els resultat obtinguts en aquesta tesi. Això podria indicar que la seva funció en el fruit podria ser important en el desenvolupament i la maduració i no tant en resposta a estrès.

El paper associat a la *Sl17,7-HSP* en condicions de xoc tèrmic és de xaperona. S'ha demostrat que en la fulla de tomàquet es conjuga amb les proteïnes desnaturalitzades durant el xoc tèrmic per renaturalitzar-les. I s'ha descrit que en condicions extremes d'estrès és capaç d'agrupar-se amb les proteïnes desnaturalitzades i altres *heat shock proteins* com la HSP 70 per a formar el grànuls de xoc tèrmic (Low, *et al.* 2000).

En aquest cas també s'estava també davant d'una proteïna sense relació directa amb carotenoides i, com en el cas anterior, no es va seguir amb la seva caracterització.

### 3. *Fruit-Specific Protein.*

La *Fruit-Specific Protein* (*SIFSP*) és una proteïna petita (7,54 kDa) que va ser descrita inicialment a partir d'un banc de cDNAs en base a mostrar un patró d'expressió específic en el fruit del tomàquet (Pear *et al.* 1989). El promotor del gen que codifica per la *SIFSP*, conegut com a promotor 2A11, va ser uns dels primers promotors específics de fruit descrits en tomàquet. Malgrat que tant el cDNA com la regió promotora del gen de la *SIFSP* es coneixen des de fa molts anys (NCBI X13743.1 GI:19243) la seqüència del gen no ha estat anotada en el genoma del tomàquet alliberat recentment.

La proteïna *SIFSP* presenta una elevada similitud amb la de l'inhibidor de la metalocarboxipeptidasa de patata (GI:2257605) (*Solanum tuberosum*). Desgraciadament l'anotació d'aquets primer inhibidor prové de la seva similitud amb un segon inhibidor de carboxipeptidasa A de patata (PCI) (Rees i Lipscomb 1980). S'han detectat diferents proteïnes PCI a patata i no totes han estat caracteritzades. Tot i això s'han detectat algunes PCI induïdes per estrès (Villanueva *et al.* 1998) i existeixen estudis que han detectat que a part de la inhibició de proteases aquestes proteïnes poden afectar altres processos tals com la dimerització i inhibició dels factor de creixement epidermal (EGF) i alfa (TGF- $\alpha$ ) en humans (Sitja-Arnau *et al.* 2005).

Les PCI es sintetitzen en una forma immadura que requereix d'una proteòlisis de l'extrem N-terminal per poder ser actives. La major similitud entre les PCIs i *SIFSP* és en la part N-terminal de les PCI. Existeixen diferents estudis sobre les PCI, però la majoria d'ells es refereixen principalment a l'estructura i a la formació dels ponts disulfur en el principal domini de la proteïna *disulfide through disulfide knot* o *Knottin domain* (Figura D 8). Aquest domini presenta un conjunt de cisteïnes que adopten una disposició on un pont disulfur s'enllaça a través dels altres dos (Cheek *et al.* 2006) i que també es detecta en *SIFSP* (Figura D 9). El domini es relaciona amb inhibidors de proteases, *cyclotides* i toxines de serps, aranyes, insectes, xifosurs, escorpins, i alguns pèptids antimicrobians (Arolas *et al.* 2006, Cheek, *et al.* 2006).

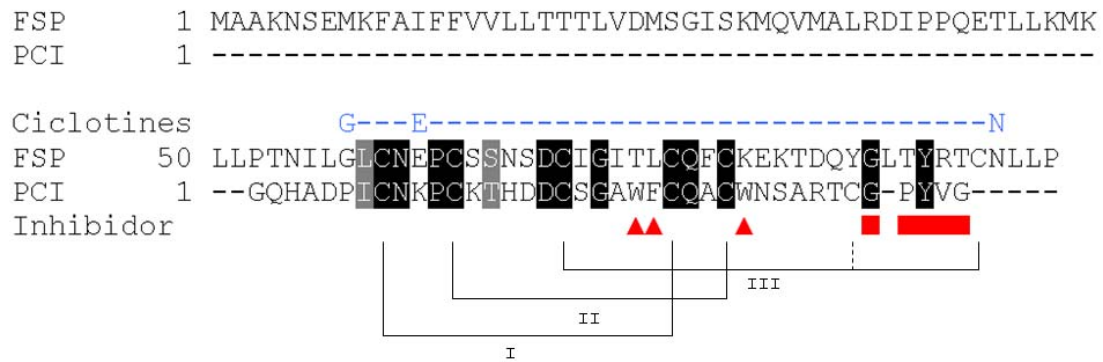


Figura D 8. Alineament de la *SIFSP* amb la forma activa de l’Inhibidor de carboxipeptidases A (PCI) (Rees i Lipscomb 1980). Els quadrats vermells mostren els aminoàcids responsables de la inhibició directa del centre actiu de les carboxipeptidases A per PCI. Els triangles representen els aminoàcids responsables de la interacció de PCI amb la superfície de carboxipeptidases A. En blau marcat la seqüència de la possible *cyclotides* amb els aminoàcids clau per a la formació. I, II i III ponts disulfur característics del domini *disulfide through disulfide knot*.

El mecanisme d’acció de PCI com a inhibidor de proteases és el boqueix del centre actiu per associació directa amb dos residus de triptòfan i un de fenilalanina de la superfície de la carboxipeptidasa i introduint el fragment C-terminal en el centre actiu (Arolas *et al.* 2004, Rees i Lipscomb 1980). Curiosament cap d’aquests aminoàcids es troben conservats entre la *SIFSP* i la PCI (Figura D 8), fet que podria fer pensar que la proteïna *SIFSP* no es un inhibidor de carboxipeptidases o, si més no, no inhibeix el mateix tipus de proteasa que la PCI.

Per altre costat, com s’acaba de comentar, el *Knottin domain* també es troba present en les *cyclotides*. Les *cyclotides* que són mini-proteïnes cícliques que són sintetitzades al reticle endoplasmàtic a partir d’un precursor lineal. El precursor és processat eliminant un fragment N-terminal i uns pocs aminoàcids de l’extrem C-terminal. La ciclació es duu a terme unint una glicina amb una asparagina situades en els extrems d’un domini *disulfide through disulfide knot*. Un altre requeriment per a la ciclació es la presència d’un residu d’àcid glutàmic o àcid aspàrtic separat una posició de la primera cisteïna del *Knottin domain* (Craik 2012). La *SIFSP* presenta tots els aminoàcids claus del procés (glicina [G57], àcid glutàmic [E61] i l’asparagina [E93], Figura D 8). Un eventual paper de la *SIFSP* com a precursor d’una *cyclotide* podria ser interessant ja que la funció descrita per aquest tipus de proteïnes és la d’unir-se a determinades membranes i generar estructures que les permeabilitzen (Craik 2012) sent un sistema defensiu contra diversos paràsits (Craik 2009).

Independentment que la *SIFSP* sigui inhibidor de proteases o un precursor d'una *cyclotide*, sembla ser que podria patir algun tipus de modificació posttraduccional per trencament i que la seva estructura terciària conté un gran nombre d'aminoàcids hidrofòbics situats en els *loops* de la mateixa cara, com es pot observar en la Figura D 9. Això podria permetre que la *SIFSP* es pugui trobar unida a membranes o, si més no, associada amb algun domini hidrofòbic. La reiterada detecció de *SIFSP* en fraccions enriquides en complexos proteïna-carotenoide podria tenir un cert sentit si es té en compte la presència d'aquests aminoàcids hidrofòbics en la seva seqüència. També es podria especular amb el fet que la *SIFSP* pugui tenir la capacitat de generar canvis en les membranes per tal de modificar la seva permeabilitat i així afavorir l'acumulació dels carotenoides o, alternativament, inhibir l'eventual acció de proteases en els complexos proteïna-carotenoid.

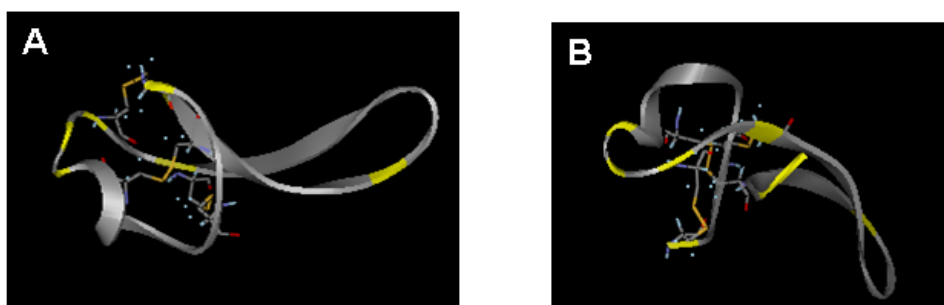


Figura D 9. Estructura del fragment C-terminal de la *SIFSP* (Uribe *et al.* 2008). S'han remarcat en grog els aminoàcids hidrofòbics de la seqüència.

#### **4. Temperature-induced Lipocalin 1 i 2.**

Com s'ha comentat en l'apartat 2.1 de Resultats, les lipocalines són proteïnes que es caracteritzen per la seva capacitat d'interaccionar amb lligands hidrofòbics, sent una de les més característiques les de la família el retinol (*Retinol Binding Protein*; RBP) (Flower 1996, Grzyb, *et al.* 2006). Tenint en compte que el retinol es un compost derivat de la degradació del  $\beta$ -carotè i que altres lipocalines, com la crustacianina, uneixen astaxantina (Cianci *et al.* 2002, Zagalsky 2003), es va pensar en la possibilitat que la SITIL pogués interaccionar d'alguna manera amb els carotenoides en el fruit del tomàquet. A part de la seva capacitat d'unió a lligands hidrofòbics, s'han descrit lipocalines amb altres funcions. Aquest seria el cas de violoxantina epoxidasa i la zeaxantina epoxidasa (amb activitat enzimàtica), la

Apolipoproteïna D (implicada amb el transport de lípids), feromones (*Murine urine pheromone*, MUP), la  $\alpha_1$ -microglobulina (implicada en la resposta immunològica o la proteïna Lazarillo (que participa en processos de desenvolupament), per citar només alguns exemples (Flower 1996). En base a tots aquests antecedents es va decidir abordar un estudi més detallat de les TIL de tomàquet.

Inicialment es va procedir a estudiar el patró d'expressió de les dues TILs identificades en el tomàquet, *S/TIL1* i *S/TIL2*. Aquests estudis van ser especialment complicats degut a la gran similitud de seqüència existent entre *S/TIL1* i *S/TIL2* i van ser abordats mitjançant Northern blot i PCR semi-quantitativa tal com s'ha descrit en l'Apartat 1.5 i 2.2 del Capítol 2 de Resultats. Els resultats obtinguts van mostrar que l'expressió de *S/TIL1* s'indueix fortament en el fruit a partir del estadi verd madur (MG) i al llarg de tot el procés de maduració (Figura R 40). És interessant remarcar que els transcripts corresponents a *S/TIL1* no es detecten en la fulla. Per contra, el gen que codifica per *S/TIL2* s'expressa predominantment en fulla en les condicions utilitzades (Figura R 40). No es pot descartar que *S/TIL1* i/o *S/TIL2* s'indueixin en resposta a estrès tal com ho fa la proteïna homòloga d'*Arabidopsis* (*AtTIL*). Considerats de forma conjunta, els resultats obtinguts de les anàlisi mitjançant Northern blot i PCR semi-quantitativa indicarien que *S/TIL1* és la isoforma que s'indueix durant la maduració i la que, per tant, podria tenir algun paper rellevant en l'acumulació de carotenoides.

En concordança amb el patró d'expressió del mRNA de *S/TIL1* s'observa un increment dels nivells de proteïna TIL durant les diferents etapes de maduració del fruit (Figura R 41). A més, també es detecta TIL a nivells relativament elevats en la fracció de cromoplastes aïllats utilitzats en aquest treball (Figura R 42), confirmant la presència d'aquesta proteïna en aquests orgànuls.

La proteïna TIL detectada en les anàlisi de western blot en mostres de tomàquet van mostrar un pes molecular aparentment superior a l'esperat en funció de la seva seqüència primària. En un primer moment es va pensar en que aquest fet fos degut a alguna possible modificació post-traducciona de la proteïna (p. ex. glicosilació). No obstant, aquesta diferència de grandària també s'ha observat en les proteïnes TIL expressades en *E. coli* (Figura R 64, Figura R 69 i Figura R 68). El fet que *E. coli* no disposi

dels mecanismes per glicosilar proteïnes permet descartar la presència d'aquest tipus de modificació posttraduccional en la TIL present en el fruit.

Amb l'evidència experimental que *STIL1* es relaciona amb els cromoplasts es va abordar l'estudi de la seva localització intracel·lular per determinar si també es trobava associada a altres estructures cel·lulars. En els experiments d'expressió transitòria realitzats en *N. benthamiana* s'ha observat que tant *STIL1* com *AtTIL* presenten localització en diferents tipus de membrana donant la impressió que la seva localització és promiscua ja que sembla unir-se inespecíficament a tots el tipus de membranes cel·lulars (de la Figura R 45 a la Figura R 48). No obstant, és possible que l'ús d'un promotor fort, com és el CaMV35S, pugui afectar el seu patró de localització. Durant el procés d'afinament de les condicions d'expressió transitòria es van observar que l'agroinfiltració d'elevades concentracions d'*Agrobacterium* contenint les construccions d'interès resultava en la mort de les zones infiltrades. Tanmateix, en experiments d'optimització de l'expressió en *N. benthamiana* es va comprovar que per sobre una D.O. d'*Agrobacterium* de 0,1 es detectava un gran nombre d'agregats de la proteïna fluorescent associada a membrana que possiblement comprometia la viabilitat cel·lular. Per tant, es molt probable que el nivell de les proteïnes TIL recombinants expressades en les fulles de *N. benthamiana* estigui molt per sobre de que es pugui trobar en condicions d'estres tèrmic. Per aquest motiu, la co-localització en aparell de Golgi, reticle endoplasmàtic, membrana plasmàtica, mitocondris, peroxisomes i parts de cloroplasts podria ser derivada a la sobreexpressió i no tenir un rellevància fisiològica. Tot i això, crida l'atenció l'alt nombre de vesícules que normalment co-localitzen amb la membrana plasmàtica i els peroxisomes, les quals que semblen generar-se i establir-se en presència de la sobreexpressió de les TIL.

Malgrat haver-se detectat de forma clara la presència de proteïna TIL en els cromoplastes de tomàquet mitjançant la tècnica de western blot, els experiments de localització en fulla basats en l'expressió transitòria de proteïnes quimèriques fluorescents indicaven una preferència per interaccionar amb altres tipus d'estructures subcel·lulars. Per tal de confirmar la presència de TIL en els cromoplastes i avaluar la possible interacció de TIL amb altres membranes i estructures subcel·lulars en cèl·lules de pericarp es va procedir a realitzar experiments d'immunolocalització utilitzant els anticossos generats contra la proteïna *AtTIL* que havien mostrat una bona especificitat en els experiments de western

blot realitzats mostres de fruit de tomàquet i cromoplastes aïllats. Els resultats obtinguts van mostrar la presència de material immunorectiu en el interior dels cromoplastes, mostrant una preferència per estructures membranoses internes tals com els plastoglobuls i els pseudotilacoides (Figura R 51). És interessant remarcar que també es va detectar *S/TIL* en altres parts de la cèl·lula com mitocondris, sistemes de vesícules i molt especialment en la paret cel·lular (Figura R 52). La presència de marca immunoreactiva en aquestes altres parts de la cèl·lula ha de ser presa amb certa precaució ja que tal com es mostra en la Figura R 41 i Figura R 42 l'anticòs  $\alpha$ -*A/TIL* podria reconèixer altres proteïnes de forma inespecífica. Per tant, existeix la possibilitat que la immunoreactivitat observada en la paret o altres estructures pugui no ser deguda a la presència de TIL. Tot i això, el fet d'haver detectat *S/TIL* també en els cromoplastes aïllats permet proposar que la major part del senyal observat en les immunolocalitzacions en el interior d'aquest orgànul és produïda per la presència aquesta proteïna.

Com s'ha comentat anteriorment les proteïnes TIL no tenen cap pèptid de transit a plàstids (capítol II, apartat 2.1). Per tant, la presència de TIL en els cromoplasts implica la seva entrada en aquest orgànul a través d'algun mecanisme desconegut. Una possibilitat és que la proteïna TIL pogués translocar als plàstids a través de la seva associació amb reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi i vesícules. Es considera que en la diferenciació dels cloroplasts en cromoplastes el principal sistema d'import de proteïnes, el TIC/TOC, és degradat (Bian *et al.* 2011). Per tant, s'ha proposat que l'entrada de proteïnes als cromoplastes es realitzaria principalment mitjançant l'ús de pèptids de transit no canònics o bé un sistema de transport vesicular (Bian, *et al.* 2011, Jarvis 2008). A més, en els cloroplasts s'ha detectat l'intercanvi de lípids entre la membrana de l'embolcall i els tilacoides mitjançant un sistema vesicular (Andersson i Sandelius 2004, Westphal *et al.* 2003), i també la presència de proteïnes glicosilades (Jarvis 2008). Es pot proposar, per tant, que la proteïna TIL podria entrar a l'interior dels cromoplastes a partir de la seva associació amb les membranes de l'embolcall.

En relació amb aquest aspecte va ser important avaluar els possibles mecanismes a través dels quals la TIL s'associaria amb els sistemes membranosos intracel·lulars. Com ja s'ha comentat anteriorment, el procés d'unió a membranes no semblava produir-se a través de modificacions post-traducionals. Com s'ha indicat anteriorment les TIL presenten un



petit domini hidrofòbic, format pels aminoàcids FLPII, que està exposat en la seva superfície d'acord amb les prediccions de la seva estructura terciària (Figura R 39). S'ha descrit que l'associació d'AtTIL a les membranes és manté en un ampli ventall de condicions de força iònica o pH baix, (1 M NaCl i 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), però és làbil a agents caotrópics i detergents (2 M Urea i 1 % Triton X100) (Chi, *et al.* 2009), fets que són compatibles amb que aquest petit domini hidrofòbic pugui ser el responsable de la interacció amb les membranes.

La mutació d'alguns aminoàcids hidrofòbics d'aquest domini per altres de caràcter hidrofílic provoca la pèrdua de la interacció de les TIL amb les membranes modificant, així, el seu patró subcel·lular cap a un d'exclusivament citosòlic (Figura R 55). Aquest resultat suggereix fortament que aquest domini és necessari per a la seva interacció amb les membranes. Si es té en compte que la introducció del domini VPPFLPIIPV en la superfície de l'eYFP li confereix la capacitat d'interaccionar amb membranes, es pot concloure que aquest domini de les TIL és necessari i suficient per la seva unió a les membranes (de la Figura R 58 a la Figura R 60).

Un altre aspecte que s'ha abordat en el present treball ha estat l'estudi de la funció de les proteïnes TIL. Per aquest propòsit es va procedir inicialment a la seva expressió en *E. coli*. En els experiments de posta a punt de les condicions d'expressió de la proteïna *STIL1* es van observar dos fets interessants. Un d'ells és que la proteïna *STIL1* amb la cua d'histidines en posició C-terminal s'expressava en forma insoluble mentre que la contenia la cua d'histidines en l'extrem N-terminal era soluble (Figura R 62). El segon és que la proteïna *STIL1* amb la cua d'histidines fusionada a l'extrem N-terminal era colorjada degut a la unió al cofactor hemo (Figura R 66 i Figura R 71). Donat que la presència del grup hemo i la solubilitat de la proteïna són dos aspectes que semblen estar associats, és possible pensar en el requeriment de la presència de lligand (grup hemo) per tal que la proteïna pugui expressar-se en forma soluble a *E. coli*.

El grup hemo és un grup prostètic altament hidrofòbic capaç d'interaccionar amb petits electròfils essencial per a la vida. S'ha descrit com a catalitzador de reaccions redox en tots els tipus cel·lulars sent considerat un poderós catalitzador en reaccions implicades amb radicals lliures, que poden afectar l'estructura i la funció de lípids, proteïnes i DNA

(Lara *et al.* 2005). El grup hemo es necessari per a l'activitat de les conegudes com hemoproteïnes. El grup requereix d'un nucleòfil capaç d'acomplexar el ferro en posició central pels enllaços de coordinació que queden lliures, trobant-se descrits per a tal efecte, la histidina, lisina, metionina, cisteïna, tirosina o el propi extrem N-terminal (Zoppellaro *et al.* 2009). Les hemoproteïnes es poden classificar en dos tipus depenent del nombre de coordinació, els pentacoordinats i els hexacoordinats. Coneixent el tipus d'espectre EPR obtinguts per a les TILs expressades a *E. coli* es pot deduir que formen part de la família dels pentacoordinats (Figura R 66 i Figura R 71) (Kakar, *et al.* 2010).

Malgrat que les funcions de les hemoproteïnes són molt diverses, la més remarcable és la relacionada amb el transport d'oxigen (hemoglobina, mioglobina). El grup hemo està implicat també amb altres funcions tals com la catàlisi (peroxidases, citocrom C oxidasa, ligniases), transport electrònic (citocroms) o eliminació de radicals lliures (citocrom C, catalasa) (Ponka 1999).

La cerca de lipocalines amb descrites amb afinitat pel grup hemo van mostrar proteïnes com Lazarillo, les nitroforines i l' $\alpha_1$ -microglobulina. D'aquestes tres hemolipocalines, el grup hemo ha mostrat ser essencial per la seva funció només en les nitroforines. En aquest cas, la funció descrita ha estat la generació de òxid nítric a partir de nitrils en *Trypanosoma cruzi*, sent aquesta reacció clau per a la patogènesi del protozou (Ascenzi *et al.* 2002, Knipp i He 2011)

La proteïna lazarillo, tot i presentar capacitat d'unió a grup hemo (Kwasek *et al.* 2007), també pot unir-se a àcid araquidònic, linoleic i palmític (Sanchez, *et al.* 2008). Pel que fa a l' $\alpha_1$ -microglobulina, s'expressa en *E. coli* BL21(DE3) unida a grup hemo. Malgrat això aquesta proteïna està implicada amb la reducció de grups hemo, citocroms C i dany oxidatiu produït per radicals lliures, i s'ha descrit la seva interacció amb altres compostos (Akerstrom *et al.* 2007, Allhorn *et al.* 2005, Olsson *et al.* 2008).

Tot i que les TILs purificades a partir d'*E. coli* presenten associació al grup hemo, aquest no ha estat els cas en les TILs purificades a partir de *N. benthamiana* (Figura R 74). És possible que les TILs captin el grup hemo en *E. coli* al no trobar el seu lligand preferent. De tota manera, cal tenir en compte que la d'un lligand aparent en *N. benthamiana* podria ser

deguda al baix rendiment de proteïna purificada obtinguda. Com es mostra en la Figura R 73 les TILs precipiten durant procés extractiu, fet que no es d'estranyar tenint en compte que quan aquestes proteïnes s'expressen en *N. benthamiana* mostren una forta d'associació a les membranes (Figura R 45 a Figura R 50).

Malgrat els coneixements adquirits en la caracterització de la proteïna SITIL1 encara es desconeix la seva possible funció en la maduració del fruit. Degut a l'elevada similitud amb AtTIL es possible que SITIL1 pugui compartir alguna característica amb la proteïna homòloga a Arabidopsis. A partir dels estudis realitzats en la proteïna AtTIL (Charron, *et al.* 2002, Charron, *et al.* 2008, Charron, *et al.* 2005, Chi, *et al.* 2009) s'ha proposat que d'AtTIL es troba relacionada amb l'eliminació de radicals lliures provocats en condicions d'estrès abiòtic o bé per compostos com el paraquat. Aquesta hipòtesi està recolzada pel fet que les plantes defectives en la funció del gen que codifica per AtTIL són marcadament més sensible a l'efecte dels radicals lliures, en contrast amb les plantes sobreexpressores d'AtTIL que no mostren cap fenotip particular.

L'increment en els nivells d'una proteïna amb una funció com la proposada per AtTIL durant la maduració es podria relacionar amb la detoxificació de l'activitat radicalària proposada en el fruit i que s'ha relacionat amb l'activació de diversos enzims amb aquestes característiques (Marti, *et al.* 2009). Es possible que el fet que SITIL1 estigui associada a entorns membranosos del cromoplast permeti una l'estabilització i acumulació de carotenoides.

Intentant conèixer el possible de SITIL1 en la neutralització de l'activitat radicalària, en aquest treball s'han realitzat una sèrie d'experiment in vitro per intentar posar en evidència aquesta. Malauradament, cap de les proves de detoxificació de radicals lliures realitzades han mostrat clars i suggereixen que les proteïnes TIL no presenten activitat enzimàtica. No obstant això, i tenint en compte que les proteïnes TIL mostren una forta associació a membranes cel·lular i a vesícules, es podria pensar que part de l'activitat antiradicalària atribuïda a les TIL podria derivar-se a la contenció de productes tòxics i radicals en progressió al aïllar-la en vesícules. D'aquesta forma s'evitaria que productes lipofílics tòxics es puguin acumular i, en conseqüència, provoquin un deteriorament generalitzat de membranes que pugui afectar la viabilitat cel·lular. Tampoc es pot descartar

el fet que una eventual activitat enzimàtica de les proteïnes TIL requereixi d'altres proteïnes. En aquest sentit s'ha de ressaltar el fet que *S/TIL* s'ha detectat en complexos d'alt pes molecular i que s'han descrit diferents lipocalines que requereixen formar heterodímers per ser actives (Cianci, *et al.* 2002, Flower 1996).

En evident que fan falta més experiments per conèixer el paper de *SITIL* durant la maduració. En aquest sentit es considera que la generació i caracterització de línies de tomàquet transgèniques en les que es sobreexpressi o inhibeixi el nivells d'aquesta proteïna en el fruit podria ser una estratègia adequada. Per altra banda també es podrien generar línies transgèniques d'*Arabidopsis thaliana* en un fons genètic de pèrdua de funció d'*AtTIL* per estudiar si *SITIL* és capaç de complementar el fenotip de sensibilitat a l'estrés oxidatiu del mutant.



# Conclusions



## Conclusions

- I. De l'anàlisi de la col·lecció de 182 RILs generades del creuament de *Solanum lycopersicum* (cv Money Maker) i *Solanum pimpinellifolium* (TO-937) s'ha identificat 7 línies que de forma consistent mostraven nivells contrastants de carotenoides i a-tocoferol. Quatre d'aquestes RILs (HC1, HC2, HC3, i HC4) presentaven alts nivells de carotenoides i tres (LC1, LC2 i LC3) mostraven nivells molt baixos de pigments.
- II. S'ha observat que les línies parentals *Solanum lycopersicum* (cv Money Maker) i *Solanum pimpinellifolium* (TO-937), així com també les RILs HC i HL, mostren nivells contrastants de carotenoides i a-tocoferol quan els valors s'expressen en relació a pes fresc però no a pes sec. Les anàlisi morfològiques i histològiques dels fruits suggereixen que el contingut de carotenoides es troba principalment influenciat per la relació de grandària cel·lular i el volum ocupat pels cromoplastes.
- III. Els experiments de microarrays ha permès identificar els unigens SGN-U220026 (*Transducin family protein*) i SGN-U216160 (*Salicylic Acid Binding Protein 2, SISABP2*) com a principals gens candidats responsables de canvis bioquímics causants de l'acumulació diferencial de carotenoides entre les RILs HC i les LC. L'expressió d'aquests dos gens s'indueix durant la maduració del fruit. Es possible que les proteïnes codificades per aquests gens puguin estar implicades en diferents processos relacionats amb maduració del fruit.
- IV. Les línies d'*Arabidopsis thaliana* (Col-0) homozigotes per la inserció del T-DNA en la seqüència codificant dels gens homòlegs a SGN-U220026 (At5g49430 i At2g47410) presenten una aturada el desenvolupament de les plàntules en estadis molt primerencs. Altrament, les línies heterozigotes per a la inserció mostren un retardament sever en el seu creixement. Es pot concloure, per tant, que independentment de la funció que puguin desenvolupar les proteïnes codificades pels gens At5g49430 i At2g47410, aquesta és essencial pel creixement i desenvolupament de la planta. Així doncs, és possible que la funció de la proteïna



codificada per l'unigen sgn-U220026 en el fruit pugui ser també essencial en el desenvolupament i maduració del tomàquet.

- V. La proteïna *S/SABP2* (relacionada amb l'unigen SGN-U216160) expressada a *E. coli* és capaç de catalitzar la conversió de metil salicilat (MeSA) en àcid salicílic (SA) amb una eficiència ( $V_{max}$ ) molt similar a la de la proteïna homòloga SABP2 de *N. tabacum*. Aquest fet suggereix que les variacions en els nivells endògens de SA i/o MeSA podrien tenir un paper rellevant en control del procés de maduració del fruit.
- VI. L'augment dels nivells d'expressió *S/SABP2* en el fruit posterior al pic climàtic, juntament amb la pèrdua d'expressió del gel SAMT (que codifica per l'enzim àcid salicílic metil transferasa), suggereix un canvi de la sensibilitat al MeSA per part del fruit al llarg de la maduració. Aquest fet obre possibilitat d'una comunicació fruit-planta, un aspecte que no s'ha descrit prèviament i podria constituir nou mecanisme implicat en el control del procés global de maduració.
- VII. La combinació de diferents estratègies de solubilització amb tècniques de separació electroforètiques i cromatogràfiques ha possibilitat l'obtenció de fraccions enriquides en complexos proteïna-carotenoide a partir de cromoplastes aïllats. Les posteriors anàlisi proteòmiques d'aquestes fraccions ha permès identificar proteïnes potencialment associades a aquest complexos.
- VIII. Els transcrits de les proteïnes *Absisic stress-ripening protein 1 (SIASPR1)*, *17,7 Class I small heat shock protein (SI17,7HSP)*, *Fruit-Specific Protein (SIFSP)* i *Temperature-induced Lipocalin (SITIL)* augmenten la seva expressió al llarg de la maduració en fruit de tomàquet i possiblement formen part de complexos proteics associats a carotenoides.
- IX. En el tomàquet existeixen dues isoformes de la proteïna *SITIL*, *SITIL1* i *SITIL2*. Les anàlisi de Northern blot i RT-PCR han mostrat que l'expressió de *SITIL1* és específica de fruit i que els nivells del transcrit augmenten durant la maduració.

- X. Els estudis de la localització subcel·lular de versions de la *S/TIL1* i *AtTIL* fusionades amb la proteïna fluorescent eYFP, i expressades de forma transitòria en fulles de *N. benthamiana*, han demostrat que aquestes proteïnes interaccionen amb diferents tipus de membranes i orgànuls. Aquesta interacció està mediada per un petit domini hidrofòbic (FLPII) localitzat en la superfície d'aquestes proteïnes
- XI. El canvi dels aminoàcids FLPII, situats en un loop hidrofòbic d'*AtTIL* i *S/TIL1*, per residus hidrofílics generen la pèrdua de l'associació a membranes d'aquestes proteïnes en estudis d'expressió transitòria en fulles de *N. benthamiana*. A més, la introducció del fragment VPPFLPIIPV en la proteïna eYFP genera el mateix patró d'associació a membranes observat per *AtTIL* i *S/TIL1*, demostrant que el domini VPPFLPIIPV és necessari i suficient per provocar unió a les membranes d'aquestes proteïnes.
- XII. Experiments de western blot en cromoplastes aïllats i d'inmunolocalització en mostres de pericarp utilitzant microscòpia electrònica han demostrat que la proteïna *S/TIL1* és localitzada en l'interior dels cromoplastes associada a plastoglòbuls i estructures membranoses internes.
- XIII. L'expressió heteròloga d'*AtTIL*, *S/TIL1* i *S/TIL2* en *E. coli* ha mostrat la capacitat d'aquestes proteïnes d'unir-se al grup hemo. Es desconeix si la unió al grup hemo és específica i necessària per a la seva funció. És possible que la proteïna *S/TIL1* jugui un paper important en atenuar els efectes associats a l'estrès oxidatiu durant la maduració.



# **Materials i Mètodes**



# Materials i Mètodes

## 1. Material biològic, creixement i propagació.

### 1.1 Línies de plantes utilitzades en aquest treball

En el curs del present treball s'han utilitzat les següents línies i varietats de tomàquet.

- *Solanum lycopersicum* cv Ailsa Craig (Wt-AC)
- *Solanum lycopersicum* cv Moneymaker (MM),
- *Solanum lycopersicum* cv microtom
- *Solanum pimpinellifolium* cv To-937·15
- RILs (generació F8) procedents del creuament de *Solanum lycopersicum* x *Solanum pimpinellifolium*

També s'han utilitzat les següents línies d'*Arabidopsis thaliana*:

- SALK 041067C, SALK 041345 i SALK 093473C (mutants de pèrdua de funció del gen At5g49430.1)
- SALK 020927, SALK 039583, SALK 142736 i SALK 15898 (mutants de pèrdua de funció del gen At2g47410).

I Plantes de *Nicotiana Benthamiana*.

### 1.2 Recol·lecció de llavors de tomàquet.

Mètode

1. Extreure les llavors de les varietats de tomàquet utilitzades.
2. Estendre les llavors sobre paper de filtre.
3. Deixar assecar a temperatura ambient 24h-48h.
4. Recollir les llavors es un tub de 15 ml.
5. Emmagatzemar les llavors a temperatura ambient.

### 1.3 Esterilització de llavors de tomàquet.

Per a tots els cultius de plantes, siguin *in vitro* o no, es va procedir a esterilitzar les llavors per evitar contaminacions de virus i bacteries.

Solucions:

Lleixiu al 50%.

Aigua destil·lada estèril.

Mètode:

1. Introduir un el nombre de llavors superior necessari en un tub net i sec de 15 ml. (s'ha de tenir en conta que un 10% de les llavors, en el cas del tomàquet, no germinen).
2. Afegir en 5 mL lleixiu al 50%.
3. Mantenir en agitació orbital 15 min.
4. Descartar la solució de lleixiu i introduir en el tub 5 mL d'aigua destil·lada estèril.
5. Mantenir en agitació orbital 15 min.
6. En una campana de lux laminar introduir un paper de filtre i esterilitzar-lo amb etanol al 70%.
7. Un cop sec, estendre les llavors sobre el paper.
8. Deixar assecar 24 h sobre flux laminar constant.
9. Recollir les llavors en un tub estèril.

#### **1.4 Creixement de les plantes de tomàquet.**

Mètode:

1. Introduir paper adsorbent en l'interior de plaques de petri 6 i humitejar-lo amb aigua evitant-ne l'acumulació (per casos de grans nombres de llavors utilitzar plaques de 20 cm).
2. Dipositar les llavors sobre el paper deixant aproximadament 1 cm de separació entre elles.
3. Segellar les plaques amb cinta adhesiva transpirable Leucopor.
4. Mantenir en una cambra de cultiu a un regim de 8 hores de llum i 16 de foscor durant 4-7 dies.
5. Un cop germinades Transferir les plantes a un test de 125 mL i cobrir amb film transparent per tal d'evitar la deshidratació.
6. Transferir a una cambra en regim de 16 hores de llum 8 de foscor.
7. Al cap de dues setmanes eliminar el film transparent.
8. Passats dos-tres mesos o quan les plantes mesurin 30-50 cm trasplantar-les a testos de 5 L i traslladar a regim d'hivernacle.

### 1.5 Creixement de les plantes d'*Arabidopsis thaliana*

Materials:

Plaques MS

4,4 g Murashige & Skoog [MS] i 0,5 g MES, ajustat a pH a 5.7 amb KOH 1M, per litre. Un cop ajustat el pH complementar amb 8 g Agar i autoclavar.

Mètode:

1. Sembrar les llavors en plaques MS.
2. Mantenir les plaques cobertes amb paper d'estany a 4<sup>o</sup> tres dies.
3. Créixer les plaques a regim de 8 hores de llum i 16 de fosc i 22 °C fins presentar les primeres fulles veritables.

### 1.6 Creixement de les plantes de *Nicotiana benthamiana*.

Les plantes de *Nicotiana benthamiana* es van créixer en terra en règim d'hivernacle de dia 16 hores de llum i 8 de fosc.

### 1.7 Soques bacterianes

En el curs del present treball s'han utilitzat les següents soques bacterianes.

- *Escherichia coli* **DH5 $\alpha$**  (*supe44*,  $\Delta$ *lac*, U169, ( $\Phi$ 80, *lacZ* $\Delta$ m15), *hsd* R17, *recA*1, *gyra*96, *thi*-1, *relA*1) (*Invitrogen*).
- *Escherichia coli* **TOP10** (*F*- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *nupG* *recA*1 *araD*139  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galE*15 *galK*16 *rpsL*(*Str*<sup>R</sup>) *endA*1  $\lambda$ ).
- *Escherichia coli* **BL-21 (DE3)** [*F*- *ompt* *hsdsb* (*r<sup>v</sup>* *m<sup>v</sup>*) *gal* *dcm*] (*Invitrogen*).
- *Escherichia coli* **BL-21 (DE3)** pLyss [*F*- *ompt* *hsdsb* (*r<sup>b</sup>* *m<sup>b</sup>*) *gal* *dcm*] pLyss (*Invitrogen*).
- *Agrobacterium tumefaciens* **C58** (resistència a rifampicina) amb la presència del vector *helper* pGV2260 (resistència a ampicil·lina).

### 1.8 Medis de creixement de bacteris.

Materials:

Medi líquid LB\*:

5 g NaCl, 5 g d'extracte de llevat i 10g Bacto-Triptona en aigua destil·lada.

Medi sòlid LB\*:

1L de medi líquid LB complementat amb l'1,5% d'agar.

\*En els dos casos prèvia utilització dels medis autoclavar a 121 °C durant 20 min.



Antibiòtics: (afegits a temperatura ambient en medis líquids i a 50°C en sòlids)

Ampicil·lina (Na+) [Amp].

Concentració final de 100 µg/mL a partir de l'estoc a 100 mg/ml.

Kanamicina (Kn).

Concentració final de 50 µg/mL a partir de l'estoc a 50 mg/ml.

Cloramfenicol.

Concentració final de 17 µg/mL a partir de l'estoc a 34 mg/ml.

Complements: (afegits a temperatura ambient en medis líquids i a 50°C en sòlids).

X-gal (per el cas de vectors amb el sistema β-galactosidasa).

Concentració final de 40 µg/mL a partir de l'estoc a 20 mg/ml.

IPTG (per el cas de vectors induïbles).

Concentració final de 1 mM a partir de l'estoc a 1M.

Les *E. coli* es creixen a 37°C durant 16-18 hores.

### 1.9 Medis de creixement d'*Agrobacterium*.

Materials:

Medi líquid YEB\*:

5 g Extracte de Bou, 1 g d'extracte de llevat i 5 g Bacto-Peptona 5g sacarosa en 1 litre aigua destil·lada.

Medi sòlid YEB\*:

1L de medi líquid YEB complementat amb l'1,5% d'agar.

\*En els dos casos prèvia utilització dels medis autoclavar a 121 °C durant 20 min.

Antibiòtics: (afegits a temperatura ambient en medis líquids i a 50°C en sòlids)

Ampicil·lina (Na+) [Amp].

Concentració final de 50 µg/mL a partir de l'estoc a 100 mg/ml.

Kanamicina (Kn).

Concentració final de 100 µg/mL a partir de l'estoc a 50 mg/ml.

Rifampicina (Rif).

Concentració final de 150 µg/mL a partir de l'estoc a 100 mg/ml.

Els *Agrobacterium* es creixer durant 48h a 35-48°C.

### 1.10 Protocol de transformació de cèl·lules competents d'*E. coli* per xoc tèrmic.

Mètode:

1. Introduir 5 µL de lligació (o 50 µg de DNA) en 100 µL de cèl·lules competents i mantenir en gel durant 30 min.
2. Realitzar el xoc tèrmic al mantenir les cèl·lules a 42°C durant 1:30 min.
3. Mantenir les cèl·lules competents a 4°C durant 2 min.
4. Diluir fins amb 900 µL de LB i mantenir a 37°C amb agitació durant 1 hora.

5. Sembrar les cèl·lules en una placa amb medi LB/agar complementada amb l'antibiòtic de selecció adient (i X-gal en el cas que el vector tingues el gen de la  $\beta$ -galactosidasa).
6. Incubar les plaques a 37°C durant tota una nit.
7. Seleccionar els clons obtinguts mitjançant PCR amb primers específics del vector (T3 i T7 en el cas de pET28c i la mateixa parella o M13Fw i M13Rv per a pBluescript).

### **1.11 Protocol de preparació de cèl·lules competents d'*Agrobacterium electrocompetents*.**

Solucions:

- YEB.
- Aigua Milli-Q estèril.
- 10% Glicerol.

Mètode:

1. Inocular 1 mL d'un pre-cultiu d'*Agrobacterium* C-58 crescut 48 h en medi YEB en 100 mL de medi YEB en les concentracions adequades de Rifampicina i Ampicil·lina.
2. Incubar el cultiu 9-12 h hores a 28°C fins obtenir una densitat òptica de 0,4-0,5 a 600 nm.
3. Incubar 15-30 min en gel.
4. Centrifugar a 4.000 rpm en el rotor JA-14 durant 15 min a 4°C.
5. Retirar el sobrenedant.
6. Resuspendre el precipitat amb 10 mL de Aigua Milli-Q estèril.
7. Centrifugar a 4.000 rpm en el rotor JA-14 durant 15 min a 4°C.
8. Retirar el sobrenedant.
9. Resuspendre el precipitat amb 1 mL de 10% de glicerol.
10. Aliquotar 40  $\mu$ L de les cèl·lules en tubs eppendorf i congelar ràpidament en N<sub>2</sub> líquid.
11. Mantenir les cèl·lules a -80°C fins a utilització.

### **1.12 Protocol de transformació de cèl·lules competents d'*Agrobacterium* per electroporació.**

Mètode:

8. Introduir 1  $\mu$ L de plasmid (o 50  $\mu$ g de DNA) resuspesa en Aigua Milli-Q en 40  $\mu$ L de cèl·lules competents.
9. Refredar medi YEB.
10. Introduir les cèl·lules en una cubeta d'electroporador.
11. Realitzar l'electroporació a 2.00 V i 25 $\mu$ F de capacítancia.
12. Ràpidament resuspendre les cèl·lules amb 1 mL de YEB fred i mantenir en gel 2 minuts.
13. Comprovar que el temps de electroporació es trobi compres entre 3 i 5 *ps*.
14. Mantenir les cèl·lules competents a 28°C durant 2-4 hores.
15. Sembrar les cèl·lules en una placa amb medi YEB/agar complementada amb els antibiòtic de selecció adients (en el nostre cas rifampicina, kanamicina i ampicil·lina).
16. Incubar les plaques a 28°C durant 40h.
17. Seleccionar els clons obtinguts mitjançant PCR amb primers específics del vector.

## **2. Tècniques de biologia molecular d'àcids nucleics.**

### **2.1 Extracció d'RNA de tomàquet.**

Adaptat de Bugos i col·laboradors (1995) per Esther Mayda i Miguel Perez Amador (*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Valencia*).

Solucions:

Solució d'extracció:

100 mM Tris-HCl pH 9.0, 200 mM NaCl, 15 mM EDTA, 0,5% sarkosyl en aigua DEPC.

Fenol (pre-saturat en Tris-HCl pH 7,9).

Fenol:cloroform:alcohol isoamílic (25:24:1).

3 M d'acetat de sodi pH 5,5 en aigua DEPC.

8 M clorur de liti.

Etanol 80% amb aigua DEPC.

Aigua DEPC.

Mètode:

1. Congelar el teixit de tomàquet amb nitrogen líquid i triturar amb un morter.
2. Recollir 1 gram de teixit en d'un tub de centrifuga Sarsted de 13 ml.
3. Resuspendre en 4 mL de la solució d'extracció.
4. Afegir 100 µL 2-β-mercaptoetanol i mesclar vigorosament.
5. Afegir 4 mL de fenol i mesclar vigorosament.
6. Afegir 0,8 mL de cloroform i mesclar vigorosament.
7. Afegir 280 µL d'acetat de sodi i mesclar vigorosament.
8. Incubar 15 min en gel.
9. Centrifugar durant 10 min a 10000 rpm a 4°C en el rotor JA-25.5 amb els adaptadors precisos.
10. Col·lectar el sobrenedant aquós superior en un tub que contingui 4 mL de fenol:cloroform:alcohol isoamílic i agitar vigorosament.
11. Incubar 15 min en gel durant 10 min a 10000 rpm.
12. Centrifugar durant 10 min a 10000 rpm a 4°C en el rotor JA-25.5.
13. Col·lectar el sobrenedant aquós superior en un tub i afegir un volum d'isopropanol.
14. Precipitar el RNA de 30 min a tota una nit a -20 °C.
15. Centrifugar durant 10 min a 10000 rpm a 4°C en el rotor JA-25.5.
16. Descartar el sobrenedant i transferir el sediment en tub eppendorf mitjançant d'1 mL d'etanol 80%.
17. Centrifugar durant 10 min a 10000 rpm.
18. Descartar el sobrenedant i assecar el precipitat sota un corrent de nitrogen gas.
19. Resuspendre el sediment amb 1 mL d'aigua DEPC.
20. Centrifugar durant 5 min a 10000 rpm, per tal d'eliminar substàncies insolubles.
21. Transferir el sobrenedant a un tub eppendorf net i sec i afegir 0,5 mL de clorur de liti.
22. Precipitar el RNA de 3 h a tota una nit a 4°C.
23. Centrifugar durant 10 min a 10000 rpm.
24. Descartar el sobrenedant i rentar amb etanol 80%.
25. Centrifugar 5 min a 10000 rpm.
26. Descartar el sobrenedant i assecar el precipitat sota un corrent de nitrogen gas.
27. Resupende en un volum de 100 µL d'aigua DEPC.

28. Quantificar la quantitat per nanodrop i confirmar la seva puresa en un gel d'agarosa realitzat amb aigua DEPC, havent rentat la cubeta d'electroforesis prèviament amb etanol. (Materials i Mètodes 2.3).

## 2.2 *Extracció de DNA genòmic de plantes.*

Solucions:

Tampó d'extracció de DNA:

50 mM Tris HCl i 20 mM EDTA, pH 8,0.

10% SDS.

3 M acetat sòdic, pH 5.2.

Solució de CTAB:

2% Bromur d'hexadeciltrimetilamoni [CTAB], 2 M clorur sòdic, 0,2 M Tris-HCl i 0,05 M EDTA, pH 8,0.

10 mM Tris-HCl, pH 8,0.

Tampó EB.

Tris-HCl 10 mM i 0,05 M EDTA a pH 8,0.

Mètode:

1. Congelar el teixit de tomàquet amb nitrogen líquid i triturar amb un morter.
2. Recollir 1 gram de teixit en d'un tub de centrifuga de 30 ml.
3. Afegir 15 mL de tampó d'extracció de DNA i agitar vigorosament durant dos min.
4. Afegir 2 mL de 10% SDS i agitar vigorosament.
5. Afegir 1 mg de polivinil polipirrolidona (PVPP) i agitar vigorosament.
6. Incubar el teixit 15 min a temperatura ambient.
7. Afegir 4,5 mL d'acetat sòdic i agitar vigorosament durant dos min.
8. Centrifugar a 10000 rpm durant 15 min a 4°C
9. Recollir el sobrenedant en un tub net.
10. Afegir un volum d'isopropanol.
11. Incubar 15 min en gel.
12. Centrifugar a 10000 rpm durant 15 min a 4 °C.
13. Descartar el sobrenedant i resuspendre el precipitat en 500 µL de Tris HCl 10 mM a pH 8,0
14. Transferir a un tub eppendorff de 2 ml.
15. Afegir 500 µL de la solució de CTAB.
16. Incubar 15 min a 65°C.
17. Afegir un volum de cloroform.

18. Centrifugar 5 min a 1600xg.
19. Transferir la fase aquosa superior a un nou tub.
20. Precipitar amb un volum d'isopropanol a 4 °C.
21. Resuspendre el DNA en 100 µL de tampó.

### **2.3 Separació electroforètica de DNA.**

Solucions:

TAE 50x

242 g Tris, 100 mL EDTA 0,5 M (pH 8) i 57,1 mL àcid acètic, pH 8,2 per litre.

Solució de carrega 6x.

0,25 % blau de bromofenol i 30 % glicerol en H<sub>2</sub>O.

Mètode:

1. Bullir 1% d'agarosa (o 2% d'agarosa si es volen separar fragments de DNA menors a 500pb) en la solució TAE 1x en un microones.
2. Afegir l'agarosa dissolta en la cubeta d'electroforesis.
3. Deixar temperar uns minuts fins que s'aturi l'emissió de vapor.
4. Afegir 5 µL bromur d'etidi, mesclar bé l'agarosa i col·locar una pinta per formar els pouets de carrega.
5. Deixar solidificar 20 min.
6. Introduir el gel en la cubeta d'electroforesis i omplir de tampó TAE 1x fins que es trobi completament submergit.
7. Tractar les mostres amb el volum adient de la solució de carrega 6x adient.
8. Carregar les mostres de DNA, juntament a un marcador de pes molecular de DNA.
9. Separar a 100V durant 20 min.
10. Exposar sota llum ultraviolada sobre el trans-il·luminador i captar imatge.

### **2.4 Northern-blot**

El Northern-blot requereix una sonda radioactiva ( $P^{32}$ ) complementaria al transcrit estudiat. El treball amb isòtops radioactius d'aquest tipus requereix extremar les precaucions, per tal d'evitar, en el que sigui possible, l'exposició directa a les partícules  $\beta$  emeses, altament penetrants. Tenir la precaució de treballar sempre vestint dos parells de guants i bata, protegint-se de la font de radioactivitat mitjançant mampares de metacrilat. Així mateix, controlar periòdicament la zona amb un comptador Geiger, respectant les normes de tractament de residus marcats radioactivament amb isòtops del P.

Solucions:

MOPS 10x

0,2 M MOPS, 80 mM acetat sòdic 10 mM EDTA en H<sub>2</sub>O DEPC, fins a pH 7,00, ajustat amb NaOH a 4°C.

Solució de desnaturalització

3 3µL formamida, 10 µL formaldehid i 7 µL MOPS 10x.

Solució colorant

0,04% de blau de metilè amb 0,3 M d'acetat sòdic pH 5,4.

SSC 20x

3 M NaCl i 0,3 M citrat sòdic en H<sub>2</sub>O DEPC pH 7,00, ajustat amb HCl.

Aigua DEPC

1 % SDS en aigua DEPC.

Solució de tinció

0,04% de blau de metilè amb 0,3 M d'acetat sòdic pH 5,4.

Solució d'hibridació

0,3 M Tampó fosfat, 7% SDS, 1 mM EDTA en H<sub>2</sub>O DEPC pH 7,4.

Solució de rentat

1x SSC, 0,1% SDS en H<sub>2</sub>O DEPC.

Solució de *stripping*

0,1x SSC, 0,1% SDS en H<sub>2</sub>O DEPC.

#### **2.4.1 Sondes utilitzades en els experiments de Northern-blot**

Per a realitzar el marcatge de la sonda utilitzar el kit "*Ready-To-Go DNA labelling beads*" (*-dCTP*) (*GE-Healthcare*) sobre els fragments amplificats per PCR de les seqüències codificants dels gens ASRP1 (FC19AB12), 17,7 HSP (FC06BB07), FSP (FC17DB05) i TIL' (LEFL2006M03) segons instruccions del fabricant.

Tot seguit determinar la quantitat de sonda marcada utilitzant la següent fórmula:

$$\text{Vol. Sonda (en } \mu\text{l)} = [1-2 \times 10^6 \text{ c.p.m./ml}] \times [\text{vol (en ml) de sol d'hibridació} / \text{activitat sonda (en c.p.m./}\mu\text{l)}].$$

#### **2.4.2 Preparació de les membranes Northern-blot.**

Mètode:

1. Dissoldre 1,2% d'agarosa en aigua DEPC amb l'ajut d'un microones.
2. Temperar a 50 °C i afegir MOPS fins a la concentració de 1x.
3. Afegir formaldehid fins a un 2,2 %. (El formaldehid és un al·lergen fort i convé evitar la inhalació de vapors fortament irritants, per la qual cosa cal preparar el gel dintre d'una campana d'extracció de gasos).
4. Introduir el gel en la cubeta d'electroforesis, cobrir amb MOPS 1x i tractar el gel amb un voltatge de 2-3 V/cm 2 minuts.

5. Quantificar 10-20  $\mu\text{g}$  d'RNA obtinguts segons Materials i Mètodes 2.1 i portar a un volum 10  $\mu\text{l}$ .
6. Tractar l'RNA amb 16 $\mu\text{L}$  de la solució de desnaturalització i incubar 10 min a 65°C.
7. Refredar la mostra en gel i afegir 4  $\mu\text{L}$  de colorant.
8. Carregar les mostres i marcador de pesos moleculars en el gel.
9. Aplicar un voltatge de 3 V/cm de gel durant 15 min.
10. Passat aquest temps augmentar el voltatge a 5-7 V/cm durant 2 -3 h, fins que el front de migració arribi a 2/3 de la longitud del gel.
11. Un cop acabada la separació submergir el gel un min amb SSC 2x.
12. Realitzar el muntatge de transferència. Representada esquemàticament en la Figura M 1.
  - a. Col·locar una cubeta de gel d'electroforesis en posició invertida en un recipient prèviament rentat i assecat a 200°C.
  - b. Cobrir la superfície de la cubeta amb un paper Whatmann 3MM d'unes dimensions superiors (40 x 15 cm) humitejat amb SSC 2X.
  - c. Col·locar el gel, boca avall, i amb la zona de pouets del gel escindida.
  - d. Mullar la superfície del gel amb unes gotes de SSC 2x i cobrir-lo amb una membrana de nylon retallada amb les dimensions del gel evitant la formació de bombolles.
  - e. Afegir 2-3 papers Whatmann 3MM mullats en SSC 2x en la part superior.
  - f. Cobrir el muntatge amb una pila de papers de filtre de 3-4 cm secs.
  - g. Omplir a la cubeta amb SSC 20X fins cobrir el pont de paper Whatmann, però sense submergir-lo.
  - h. Cobrir tota la superfície del muntatge amb plàstic Saram-Wrap.
  - i. Premsar el muntatge amb un pes.

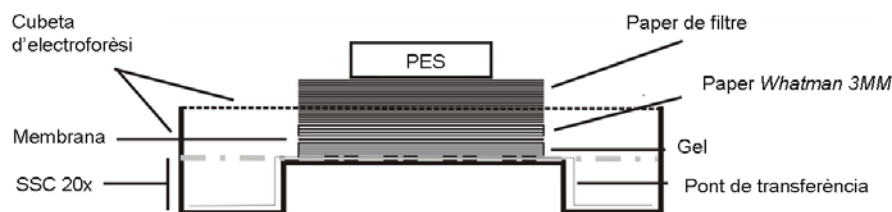


Figura M 1: Representació esquemàtica del muntatge de la transferència del *Northern-blot*.

13. Mantenir el muntatge una nit a temperatura ambient.
14. Recuperar la membrana i rentar 3 min en SSC 2x.
15. Eixugant breument sobre un paper *Whatmann 3MM*.
16. Lligar l'RNA a la membrana utilitzant un croslinkador ultravioleta (*Spectrolinker XL-1000 UV crosslinker de Spectronics Co*) a 254 nm durant uns segons.



#### **2.4.3 Tinció de la membrana**

Mètode:

1. Incubar 30 min en SDS 1 % a temperatura ambient.
2. Rentar 3 vegades en aigua DEPC a temperatura ambient.
3. Tenyir amb solució de tinció durant 5-10 min.
4. Rentar 2-3 vegades amb aigua per períodes de diversos min fins observar correctament les bandes de RNA ribosòmic.
5. Captar la imatge amb un regle al costat per a poder tenir la referència amb distància de les bandes.
6. Destenyir amb una solució al SDS 1 % a temperatura ambient.

#### **2.4.4 Hibridació i rentats de les membranes.**

Mètode:

1. Incubar durant 10 min la membrana a temperatura ambient i agitació en la solució SSC 2x.
2. Preparar un tub d'hibridació amb un volum de 1-2 ml/10 cm<sup>2</sup> de membrana de solució d'hibridació.
3. Introduir la membrana en el tub i incubar la membrana 1 hora a 65 °C.
4. Preparar la solució de la sonda al diluir-la en el mateix volum de solució d'hibridació.
5. Substituir la solució no marcada per la marcada.
6. Incubar durant tota una nit a 65 °C en un forn giratori.
7. Rentar tres cops la membrana 15 min a 60°C amb solució de rentat.
8. Segellar la membrana en una bossa de plàstic termosegellat.
9. Introduir en un cassette d'exposició juntament amb una pantalla fosforimager.

En el nostre cas 30 min d'exposició varen ser suficients per a observar les bandes en el densitòmetre *Molecular Imager FX (Biorad)*, i es varen quantificar les intensitats de banda utilitzant el software *Quantity One (bioRad)*.

#### **2.4.5 Deshidratació de la membrana (stripping).**

Al hora de reutilitzar les membranes per a posterior hibridacions deshibridar les membranes amb la sonda radioactiva amb el protocol següent.

Mètode:

1. Incubar amb la solució de *stripping* bullint.
2. Mantenir 15 min en l'agitador a 65°C.
3. Realitzar 2-3 rentats la membrana amb solució de *stripping* amb anàlogues condicions.
4. Incubar-la amb solució d'hibridació no marcada durant una hora i reutilitzar.

## 2.5 Generació del cDNA a partir de RNA

El RNA obtingut segons Materials i Mètodes 2.1 va ser processat per el *RETROscript* de la casa *Ambion*. El protocol utilitzat contenia una desnaturalització i el primer Oligo dT.

En el cas que sigui crítica la puresa del cDNA a utilitzar es recomanable fer un pas amb DNAsa a partir del kit el *RNAsse Free DNAsse Set* que la casa comercial *Qiagen*.

## 2.6 La PCR.

### 2.6.1 Generació dels primers.

La llargada del Primer es crucial per a la seva especificitat. Teòricament un primer de 22 parells de bases ha de ser específic ja que la possibilitat de que es trobi una seqüència exactament igual es remota però per evitar que això passi en aquest estudi s'han utilitzat primers de 25 pb. Es necessari que el primers tinguin una temperatura de melting ( $T_m$ ) molt similar per a la correcta amplificació d'un fragment de DNA per la PCR. Per aquest motiu calcular la  $T_m$  teòrica dels primers amb la formula:

$$n(A+T) \times 2 + n(G+C) \times 4 = T_m$$

### 2.6.2 Reacció Taq.

La polimerasa Taq utilitzada va ser la *Geen Taq Master Mix* de *Promega*. Aquesta preparació duu la Taq els nucleòtids i la solució tampó en la mateixa preparació. Realitzar la reacció amb les condicions següents:

PCR Taq		Reacció			
		Pas	Procés	T (°C)	Temps
Green Taq mm	5 µl	1	Desnaturalització inicial	94	1 min
DNA motlle	1-2µg	2	Desnaturalització	94	30 seg
Primer directe	0,3 mM	3	Anellament	Ta	1:30 min
Primer revers	0,3 mM	4	Extensió green Taq	72	1Kb/min
Volum total	10 µl	5	Anar al pas 2		25-30 cicles
		6	Extensió final	94	Pas 4 + 1min

### 2.6.3 Reacció Pfu.

La polimerasa Pfu utilitzada va ser la *Pfu DNA polimerase* de *Promega* amb les condicions següents:

PCR Pfu		Reacció			
DNA motlle	1-2µg	Pas	Procés	T (°C)	Temps
Primer directe	0,3 mM	1	Desnaturalització inicial	94	1 min
Primer revers	0,3 mM	2	Desnaturalització	94	30 seg
Tampó d'activitat	1x	3	Anellament	Ta	1:30 min
Nucleòtids	0,4 mM	4	Extensió green Taq	72	0,5 Kb/min
Pfu	0,75u	5	Anar al pas 2		25-30 cicles
Volum total	10 µl	6	Extensió final	94	Pas 4 + 1min

## 2.7 SQ-PCR

La PCR semi-quantitativa (SQ-PCR) és una tècnica que permet conèixer els nivells d'expressió relatius d'un gen en diferents teixits i estadis d'aquests dins d'un mateix organisme.

La teoria consisteix en que en la fase exponencial on el nivell de DNA respon a la formula matemàtica de nombre de molècules = molec. Inicials  $\times 2^{n^{\text{e}}}$  cicles. Per tant, si es finalitza la PCR en un cicle on la reacció és exponencial la quantitat de DNA sols depèn del nombre de molècules inicials en el cDNA de partida. Així que a igual concentració d'un gen de referència i igual nombre de cicles es pot comparar els nivells d'uns determinat transcrypt entre diferents mostres.

La base de la tècnica és la de referir els nivells d'expressió del gen problema als de un gen control d'estabilitat coneguda. També és crític que els fragments a amplificar siguin inferiors a 500 pb, ja que per cinètica de PCR es poden amplificar sense gaires complicacions. I per a descartar contaminacions de DNA genòmic convé col·locar els primers entre dos exons. En el nostre cas el gen control utilitzat va ser el d'actina amb primers col·locats entre dos exons.

1. Obtenir cDNA tractat amb DNAsa dels teixits i estadis a estudiar (Materials i Mètodes 2.4).
2. Realitzar PCR amb el gen de l'actina a diferents concentracions i nombre de cicles.
3. Determinar a quina concentració de DNA i nombre de cicles la reacció no es troba saturada i el gen de l'actina mostra intensitat de senyals comparable entre mostres.

4. Un cop estandarditzades les bandes d'actina determinar el nombre de cicles per a els gens a detectar a la concentració estable.
5. Realitzar totes les PCR per almenys triplicat.
6. Obtenir fotografies dels gels amb les mateixes condicions d'il·luminació i temps d'exposició.
7. Detectar les intensitats de bandes amb el programa ImageJ.
8. Realitzar els càlculs dividint les intensitats del gen problema per les de l'actina corresponent de l'estadi o teixit.

Els valors es presenten relativitzats a l'estadi amb més intensitat de senyal.

### 2.8 Purificació del DNA des el gel

La banda de DNA retallada amb una fulla d'estilet es tracta amb el kit de GE Healthcare Ilusytatm GFXtm PCR DNA and Gel Band Purification Kit o el nucleospin Extract II de Macherey-Nagel.

### 2.9 Digestió de DNA

Per tal de realitzar una digestió seleccionar els enzims, procurant que els tampons de reacció siguin compatibles (a la web de Promega [www.promega.com](http://www.promega.com), o la de *New England Biolabs* <http://www.neb.com/>). Tot seguit calcular les condicions per el tall per la següent recepta:

DNA	Per 1 µg
Buffer	1x
E1	3-5 u /µg DNA
E2	3-5 u /µg DNA
H2o	Fins a 20µl

S'ha de tenir en conta que alguns enzims de restricció requereixen BSA, que actua com a estabilitzador l'estoc és 100X (cal fer una alíquota a 10X) i que el volum d'enzims introduïts a la reacció no pot superar el 10% del volum, degut a les concentracions de glicerol que duen associats.

Incubar les digestions a 37°C (o 25°C per SmaI) durant 2-3 hores i finalment separar amb un gel d'agarosa.

### 2.10 Lligació de DNA.

La lligació del DNA és un procés pel que dues molècules de DNA poden ser unides entre elles si posseeixen extrems cohesius compatibles entre elles o extrems roms gracies a l'activitat del enzim viral T4 DNA polimerasa. L'enzim es especialment inestable, s'utilitza entre 14-25°C però es desnatura molt fàcilment. Per aquest motiu per augmentar l'eficiència treballar a 4°C i temps d'incubació O/N.

### 2.11 Mètode de lligació de plasmids de qualsevol mida.

En el tub posem:

Vector:	X ng
Insert	Y ng
Buffer lligasa	1 µl
T4 DNA lligasa	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	A 10 µL finals

En aquest cas volem una reacció de 10 µL amb 200 ng totals de DNA. Llavors sabem que Y són els ng d'insert i y són les Kb del insert, X són els ng de vector, x les kb i fm el factor molar que necessitem.

Sabem que  $X + Y = 200 \text{ ng}$ , i definirem Z com  $Z = 200 / (fm \times y + x)$  i d'aquí calculem  $X \text{ ng} = Z \times x$  i  $Y \text{ ng} = Z \times fm \times y$

### 2.12 Mètode de Dig-Lig

Aquest mètode s'utilitza per tal de clonar fragments de PCR de forma ràpida.

El mètode es basa de que en el vector pBluscript te en la seqüència un zona de polidanes de restricció on es troben un parell de dianes romes, SmaI o EcoRV. Els dos enzims són compatibles amb el tampó de la lligasa.

Per a realitzar la reacció utilitzar 40 ng vector, un factor molar de 2. Amb aquest paràmetres calcular la concentració d'insert segons la concentració següent:

$$Yng = 2 \frac{40ng \times yKb}{xKb}$$

On si Y són els ng d'insert i y són les Kb del insert, X són els ng de vector i x les kb. Mantenir la reacció a 25°C de 3 hores.

Un cop finalitzada la reacció 5 µL van ser transformats en plaques amb ampicil·lina X-gal. Passada la incubació O/N, seleccionar les colònies blanques que són les que han incorporat l'insert.

### **2.13 Extracció del plasmid dels bacteris.**

El mètode d'extracció dels plasmids va ser el kit comercial de *Quiagen, qiuperp Spin Miniprep Kit* o l'equivalent *Nucleospin Plasmid* de *Macherey-Nagel*.

### **2.14 Seqüenciació de DNA.**

Per a realitzar la seqüenciació de DNA es va utilitzar el kit *bigdye Terminator 3.1* de *Applied Biosystems*.

### **2.15 Reacció de la TOPO isomerasa.**

Per a realitzar la reacció de la TOPO isomerasa es requereixen fragments de DNA clonats amb la seqüència CACC en l'extrem 5' del *Forward* per tal de aconseguir l'orientació adequada.

Un cop clonats els fragments d'interès que contenen la seqüència CACC es va utilitzar el Kit *pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit with One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli (Invitrogene)* segons instruccions del fabricant.

### **2.16 Sistema Gateway.**

El sistema Gateway consisteix en l'habilitat de dues clonases en reconvinar certes seqüències.

En el cas de la *Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix (Invitrogene)* reconeix les seqüències AttL1 i la recombina amb AttR1 per acabar formant unes seqüències mixtes de les anteriors que s'anomenen AttP1 i AttB1. El mateix enzim recombina AttL2 amb AttR2 per a formar AttP2 i AttB2 (Figura M 2).

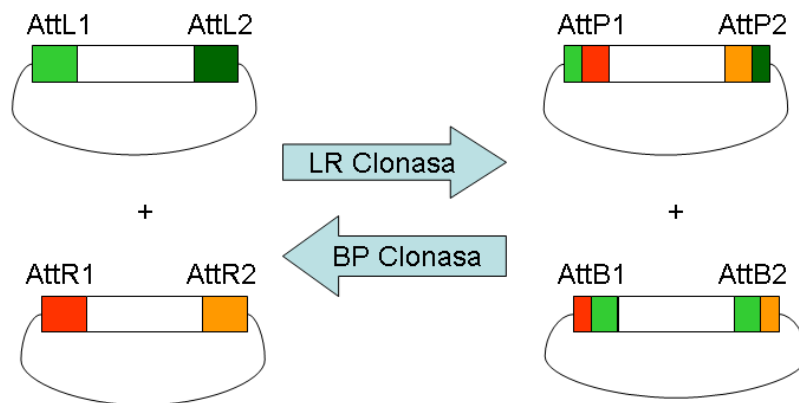


Figura M 2: Representació esquemàtica de les recombinacions dels enzims *LR Clonase* i la *BP Clonase*

Per altre cantó l'enzim *Gateway® BP Clonase® II Enzyme mix (Invitrogene)* es capaç de recombinar la reacció contrària.

El vectors utilitzats en les reaccions contenen els enzims *ccdB* i resistència a cloramfenicol entre les seqüències *Att*. L'enzim *ccdB* actua com a toxina en les cèl·lules *E. coli* utilitzades en aquest treball. D'aquesta manera s'eliminen les soques no positives.

En el nostre cas *AttL1* i *AttL2* eren presents en el vector *ENTR™/D-TOPO* i *AttR1* i *AttR2* juntament amb els enzims *ccdB* i cloramfenicol en els vectors binaris utilitzats.

En tots els casos es van realitzar les reaccions segons instruccions de fabricant.

### 2.16.1 Vectors Gateway utilitzats.

Vectors amb *AttL1* –*AttL2*

pENTR/D-TOPO- gen d'interès

Vectors amb *AttR1* –*AttR2*

pEarleyGate 100 35S-Gateway-OCS 3'(Tair stock number CD3-724)

pEarleyGate 101 35S-Gateway-YFP-HA tag-OCS (CD3-683)

pEarleyGate 102 35S-Gateway-CFP-HA tag-OCS 3' (CD3-684)

pEarleyGate 104 35S-YFP-Gateway-OCS 3' (CD3-686)

Família de vectors pEarleyGate (Earley, *et al.* 2006)

### **3. Tècniques de Proteïnes.**

#### **3.1 Extracció de proteïnes des de tomàquet total.**

Solucions:

Tampó d'homogeneïtzació:

1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 10 % Sacarosa (p/v) i 0,1 M tricina, pH=7,5 a 4°C.

10 % de triton X100.

1M de DTT.

1 mg/mL de PMSF en etanol.

Mètode:

1. Congelar el teixit de tomàquet amb nitrogen líquid i triturar amb un morter.
2. Recollir 1 gram de teixit en un tub de centrifuga.
3. Tractar el material amb 2 mL de tampó d'homogeneïtzació complementat amb 0,2 % de triton X100, 1mM de DTT i 100 µg/mL de PMSF.
4. Agitar 10 min a 4 °C.
5. Centrifugar 5 min a 1000xg.
6. Recollir 1 mL del sobrenedant amb cura.
7. Quantificar per Bradford (Materials i Mètodes 3.6).

#### **3.2 Extracció de proteïnes de mostres de cromoplastes.**

Solucions:

1% SDS.

Metanol.

Cloroform.

Mètode:

1. Resuspendre un precipitat de cromoplastes amb 1% SDS.
2. Tractar 100 µL del resuspès de cromoplastes amb 400 µL de metanol i agitar vigorosament.
3. Afegir 200µL de cloroform i agitar vigorosament.
4. Centrifugar 1 min a 9000xg.
5. Descartar la fase aquosa superior, evitant afectar la interfase proteica.
6. Tractar la fase orgànica amb 300 µL de metanol i agitar vigorosament.



7. Centrifugar 2 min a 9000xg.
8. Descartar la fase orgànica evitant aixecar el precipitat del fons del tub.
9. Assecar precipitat amb N<sub>2</sub> gas.
10. Resuspendre el precipitat en Laemmli sample buffer 1x (Materials i Mètodes 3.4)
11. Utilitzar el mètode de quantificació de proteïnes per a mostres amb compostos interferents (Materials i Mètodes 3.6) per obtenir la concentració proteica.

### **3.3 Deslipidització de mostres de proteïna amb acetona.**

Solucions:

Solució d'acetona TCA:

Acetona amb DTT 20 mM 10% d'àcid tricloroacètic (TCA), -20°C.

Solució d'acetona:

Acetona amb DTT 20 mM, -20 °C.

Mètode:

1. Afegir 1 volum d'una solució freda d'acetona a -20°C a la mostra a deslipiditzar.
2. Incubar 30 min a -20°C.
3. Centrifugar a 13000 rpm durant 5 min.
4. Rentar el precipitat amb una solució d'acetona DTT sense TCA.
5. Incubar 30 min a -20°C.
6. Repetir pas 4 i 5.
7. Assecar el precipitat sota un corrent de nitrogen gas.
8. Resuspendre amb la solució de carrega de Laemmli 1X (apartat següent).

### **3.4 Protocol de preparació de mostra de Laemmli**

Solucions:

Laemmli sample buffer 2x:

0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol, 4% SDS, traces de Blau de bromo fenol i 0,2% β-mercaptoetanol o 0,2 mM de DTT.

Mètode:

1. Tractar les mostres proteiques amb un volum de la solució de carrega de Laemmli 2X.
2. Bullir 2 min a 100 °C.
3. Temperar en gel un min.

- Carregar de l'ordre de 10-15  $\mu\text{L}$  en gels 0,75 mm de gruix i 20-25  $\mu\text{L}$  en gels de 1,5 mm.

### 3.4.1 Preparació del gel d'acrilamida segons el protocol de Laemmli

Solucions:

30% Acrilamida (BioRad).

Tampó Separador:

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

Tampó Concentrador:

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

10% SDS.

10% APS (preparat al moment).

Running Buffer 10x:

144,14 g Glicina, 10 g SDS i 30,28 g Tris.

Mètode:

- Preparar les solucions per a realitzar els gels sense introduir el TEMED (les receptes presentades són vàlides per a 2 gels de 0,75 mm de gruix i o un gel de 1,5 mm).

Gel:	Separador					Concentrador
	10%	12%	12,5%	15%	18%	4%
30% acrilamida	3,33mL	4,00mL	4,17mL	5,00mL	6,00mL	390 $\mu\text{L}$
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,50mL	2,50mL	2,50mL	2,50mL	2,50mL	
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8						750 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O Milli-Q	4,13mL	3,47mL	3,30mL	2,47mL	1,47mL	1,83 $\mu\text{L}$
SDS	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L}$
10% APS	33,33 $\mu\text{L}$	33,33 $\mu\text{L}$	33,33 $\mu\text{L}$	33,33 $\mu\text{L}$	33,33 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L}$
Total	10mL	10mL	10mL	10mL	10mL	3 mL
TEMED (Afegir al polimeritzar)	6,67 $\mu\text{L}$	6,67 $\mu\text{L}$	6,67 $\mu\text{L}$	6,67 $\mu\text{L}$	6,67 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$

- Muntar els dos vidres en el formador de gels de l'equip *miniprotean 2* de *Bio-Rad*.
- Introduir el TEMED necessari per el gel separador i immediatament omplir entre els vidres fins a 2 cm de la part superior.
- Cobrir el gel amb 0.5 mL d'isopropanol.
- Esperar fins a polimerització.
- Rentar la part superior del gel amb aigua destil·lada, assecant la part superior amb paper de filtre.
- Mesclar el TEMED adequat al gel concentrador.
- Introduir el gel concentrador a sobre del separador i cobrir el muntatge amb una pinta adequada.
- Esperar fins a completa polimerització.

### **3.4.2 Separació electroforètica de les proteïnes.**

Mètode:

1. Col·locar els gels en l'equip *miniprotean 2* de *Bio-Rad*.
2. Omplir l'equip amb Running Buffer 1x.
3. Carregar les mostres i marcador.
4. Separar les proteïnes a un amperatge de 10 mA per gel fins que les mostres superin el gel concentrador.
5. Un cop les proteïnes hagin penetrat al gel separador augmentar l'amperatge fins els 20 mA per gel.
6. Aturar l'amperatge quan el blau de bromofenol arribi a la part inferior del gel.

### **3.5 Quantificació de proteïnes per Bradford.**

Mètode:

1. Preparar dilucions d'albumina de concentracions compreses entre 1,5 i 0 mg/mL amb la mateixa solució tampó que les mostres.
2. Carregar 5 µL de les solucions i mostres en pouets d'una placa de 96, per duplicat.
3. Afegir 200 µL de la solució de Bradford (*Bio-Rad*).
4. Incubar 10 minuts.
5. Llegir la placa a 595 nm.
6. Realitzar el càlcul de la recta patró generada pels punts de l'albumina, eliminant els que mostrin un patró fora de la linealitat.
7. Extrapolar el valor de la mostra en la recta.

Per els casos on la proteïna contigües algun component interferent amb el Bradford (SDS, triton X-100, carotenoides, poliamines, entre altres) es va utilitzar el mètode *RC DC Protein Assay* de *Bio-Rad*.

### **3.6 Clear Native-PAGE o electroforesis de proteïnes no desnaturalitzant**

La tècnica del Clear Native-PAGE, també coneguda coma a CN-PAGE, s'utilitza per a separar complexos de proteïna per la seva pròpia estructura quaternària. I consisteix en solubilitzar les proteïnes amb detergents no iònics, per tal de no eliminar les interaccions proteiques.

Solucions:

10 % *n*-dodecil mastòcit [DM].

75% sacarosa.

2xBisTrisACA.

200 mM Tris-HCl 1 M àcid 6-amino-caproic a pH 7.0 a 4°C.

50BTH40G.

50 mM Tris-HCl, 40 % (p/v) glicerol, pH 7,0 a 4°C

Solució d'homogeneïtzació.

Mesclar en una proporció 5/3/2 50BTH40G /10 % DM /aigua.

Sample buffer.

5% Ponceau dissolts en la solució 5/4/1 de 2xBisTrisACA /75% sacarosa /Aigua.

Acrilamida per gradients:

49.5 % T i 3 % C.

4 x Gel buffer.

200 mM Tris-HCl i 2 M àcid 6-amino-caproic a pH 7.0 a 4°C.

Tampó càtode.

50 mM de tricina i 15 mM Tris-HCl, 7.0 a 4°C.

Tampó ànode.

25 mM Tris-HCl, pH 7.0 a 4°C.

### **3.6.1 Extracció de mostra de CN Native-PAGE**

Mètode:

Començant el protocol a partir de cromoplastes sencers (Materials i Mètodes 4.4).

1. Resuspendre un precipitat de cromoplasts amb la solució tampó ½-50BTH40G fins ajustar la proteïna aproximadament a 2 mg/ml.
2. Afegir un volum de solució d'homogeneïtzació.
3. Incubar en agitació 30 min. a 4 °C.
4. Ultracentrifugar a 105.000xg durant 30 min. a 4 °C.
5. Afegir al sobrenedant un 10% de BN Sample Buffer.

### **3.6.2 Separació electroforètica de Blue Native-PAGE.**

Mètode:

Per realitzar la BN-Native, utilitzar l'equip *Protean II XI Cell* de *Bio-Rad* amb gels de 24 centímetres i grossor 1,5 mm. Amb un gel en gradient des del 4 fins el 18% d'acrilamida.

1. Preparar les solucions del gel, sense afegir el TEMED.

	Concentrador (4%)	Separador (4%)	Separador (18%)
Acrilamida	2,00 mL	2,00 mL	9,60 mL
4 x Gel buffer	5,00 mL	5,00 mL	5,00 mL
100% glicerol		1,00 mL	4,00 mL
H <sub>2</sub> O	12,87 mL	11,88 mL	1,28 mL
TEMED	30,00 µL	20,00 µL	20,00 µL
10% APS	100,00 µL	100,00 µL	100,00 µL
Total	20,00 mL	20,00 mL	20,00 mL

2. Introduir la solució per a formar el gel en un sistema de vasos comunicants (Hoefel G50).
  - a. Preparar el muntatge del equip *Protean II XI Cell* i en una posició més elevada col·locar els vasos comunicants sobre d'un agitador magnètic.
  - b. Introduir la solució Separador del 18% juntament amb un nucli magnètic en el vas que conté la sortida del tub i situar l'agitador.
  - c. Afegir el TEMED en la solució Separador del 4%, mesclar i afegir en el segon vas.
  - d. Afegir el TEMED a la solució Separador del 18% i iniciar agitació moderada.
  - e. Obrir la clau de comunicació entre tubs.
  - f. Iniciar l'emplenament dels vidres obrin la clau de pas.
  - g. Deixar fluir per gravetat.
3. Un cop finalitzada l'addició d'acrilamida: afegir isopropanol necessari per a cobrir la part superior del gel.
4. Esperar fins a polimerització.
5. Rentar la part superior del gel amb aigua destil·lada, assecant la part superior amb paper de filtre.
6. Mesclar el TEMED adequat al gel concentrador.
7. Introduir el gel concentrador a sobre del separador i cobrir el muntatge amb una pinta adequada.
8. Esperar fins a completa polimerització.

### 3.6.3 Separació electroforètica del gel.

Mètode:

1. Col·locar el gel segons instruccions en l'equip *Protean II XI Cell* de *Bio-Rad*.
2. Introduir la solució tampó del càtode i del ànode.
3. Carregar mostres.

4. Separar les proteïnes a 6 mA durant una nit a 4 °C.

### 3.7 *Blue native Native-PAGE.*

La tècnica és la mateixa que la de CN-PAGE però complementant la solució tampó del càtode i el Sample Buffer amb Serva brilliant blue G.

Solucions a reemplaçar respecte el protocol Clear Native-PAGE:

Tampó del càtode BN:

0,01 % Serva brilliant blue G, 50 mM de tricina i 15 mM Tris-HCl.

Sample buffer BN:

5% Serva brilliant blue G dissolts en la solució 5/4/1 de 2xBisTrisACA /75% sacarosa /Aigua.

### 3.8 *Electroelució*

Per l'electroelució utilitzar una sistema d'elució de DNA de la casa ISCO. El sistema consisteix en dues càmeres separades per una paret de plàstic que contenen els elèctrodes.

Mètode:

1. Hidratar segons fabricant la membrana *Dialysis tubing cellulose membrane 0,4 in (Sigma)*.
2. Preparar la cubeta d'electroporació utilitzant la membrana *Dialysis tubing cellulose membrane 0,4 in (Sigma)* i la *Mini Dialysis cell 1 KDa Cutoff (GE healthcare)* en la del ànode.
3. Submergir el muntatge en el buffer de carrega utilitzat en l'electroforesis en els gels a electroeluir.
4. Escindir les bandes proteiques desitjades del gel i introduir-les en la cubeta.
5. Separar a 100V 2-5 h.
6. Recollir la proteïna extraient 200 µL de solució directament de sobre la membrana del ànode amb una pipeta automàtica.

En el nostre cas la proteïna ser tractats amb tampó de Laemmli (Materials i Mètodes 3.4) o la solució d'extracció de pigments (Materials i Mètodes 4.3), depenent del experiments a realitzar. Per a baixos rendiments liofilitzar la mostra i resuspendre amb aigua Milli-Q.

### 3.9 *Tincions de coomassie*

Solucions:

Solució de fixació.

25% Isopropanol, 10% àcid acètic en aigua Milli-Q.

Solució de Tinció.

Phastgel blue R, GE Healthcare al 0,1%.

Solució de destinció.

5% Metanol, 7% Àcid Acètic, en aigua Milli-Q.

Mètode:

1. Fixar la proteïna cobrint-la amb la Solució de fixació durant dues hores (Solament en el cas de gels de 18 cm).
2. Tenyir el gel cobrint-lo amb solució de Tinció de 30 min a O/N
3. Destenyir el gel cobrint-lo amb solució de destinció.
4. Realitzar canvis de la solució cada 30 min-1h fins observar les bandes proteiques sense tinció en el fons.

Per a destincions ràpides introduir un paper absorbent dins la cubeta. Cal comentar que aquest mètode no es adequat per a determinacions proteòmiques subsegüents.

### 3.10 *Tinció de proteïnes amb plata*

Solucions:

Solució de fixació.

Per 100 ml: 50 ml de MeOH, 12 ml Hac i 50 µl Formaldehid 37%

EtOH al 30 %.

0,02 % de tiosulfat sòdic pentahidratat (5·H<sub>2</sub>O).

Solució de plata.

Per 100 ml: 0,2 g AgNO<sub>3</sub> i 74,8 µl Formaldehid 37%.

Solució de revelat.

Per 100 ml: 6 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,4 mg tiosulfat sòdic (5·H<sub>2</sub>O) i 50 µl Formaldehid 37%.

Solució de parada.

50 ml MeOH i 15 ml Àcid Acètic Glacial.

Mètode:

1. Fixar el gel 15 min en 100 ml de Solució de fixació:
2. Rentar 3 vegades 3 min amb 30 ml d'EtOH al 30 %.
3. Realitzar el Pretractament mantenint el gel en 0,02 % de tiosulfat sòdic 1 min just.

4. Rentar 3 vegades 20 s amb 100 ml H<sub>2</sub>O Mili-Q.
5. Realitzar la Impregnació durant 20 min en 100 ml de la solució de plata.
6. Rentar 2 vegades 20 s amb 100 ml H<sub>2</sub>O Mili-Q.
7. Realitzar el revelat durant amb 100 ml de la solució de revelat fins observació de bandes proteiques.
8. Rentar 2 vegades 2 min amb 100 ml H<sub>2</sub>O Mili-Q.
9. Parar la tinció durant 10 min amb 100 ml de la solució de parada.
10. Mantenir e gel en 100 ml H<sub>2</sub>O Mili-Q.

### 3.11 Western-blot.

La tècnica de *western-blot* permet detectar la proteïna a estudi en els diferents extractes de proteïna resolts mitjançant *SDS-PAGE*, utilitzant anticossos específicament dirigits contra ella. Per tal de realitzar-lo, es transfereix la proteïna del gel a membranes de PVDF.

Solucions:

Solució de transferència.

3g Trizma Base, 14 g Glicina i 200mL Etanol per litre.

Tampó TBS 10x.

24,24 g Tris, 40,03 g NaCl pH 7,6 per litre.

Solució de bloqueig.

0,5 % Tween 20 en TBS 1X amb un 5% de llet en pols.

TBS-Tween.

0,5% Tween 20 en TBS 1X.

Pre-ECL A.

2,5 mM luminol i 396 nM àcid p-cumaric 100 mM Tris-HCl pH8.5, a 4 °C (Estabilitat 15 dies a 4°C).

Pre-ECL B.

5,6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM Tris-HCl pH8.5, a partir d'aigua oxigenada al 30%, a 4°C (Estabilitat 15 dies a 4°C).

Solució de detecció ECL.

Mescla Pre-ECL A i B a 1:1. (Preparar al moment).

Mètode:

1. Preparar la solució de transferència al iniciar la separació electroforètica SDS-PAGE (Materials i Mètodes 3.5) i mantenir a 4°C.
2. Retallar la membrana de PVDF i sis papers Whatmann de 3 mm d'espessor amb unes dimensions de 5'5 cm per 8'5 cm.



3. Un cop finalitzada l'electroforesi, activar la membrana de PVDF submergint-la 5 segons en etanol i mantenir humida amb solució de transferència.
4. Preparar transferència:
  - a. Submergir el casset de transferència del equip *BioRad Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* en tampó de transferència amb la part de color negre en el fons.
  - b. Col·locar una espongeta humida de tampó de transferència i tres papers Whatmann mullats del mateix tampó.
  - c. Col·locar el gel SDS-PAGE amb els pouets escindits, tot evitant la formació de bombolles d'aire atrapades.
  - d. Amb la mateixa precaució, cobrir el gel amb la membrana.
  - e. Amb molt de conte cobrir seqüencialment la membrana amb els altres tres papers Whatmann i una segona espongeta humida amb la solució de transferència.
  - f. Tancar el casset.
5. Introduir el casset en el suport de la cubeta *biorad Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell*, juntament amb un bloc de gel i cobrir amb la solució de transferència a 4°C, en la cambra freda.
6. Realitzar la transferència a 100V constants (aproximadament 250 mA) durant una hora per a gels de 0,75 mm (en el cas de gels de 1,5 mm d'espessor mitja hora més).
7. Recuperar la membrana i introduir-la en una petita cubeta de plàstic amb la cara amb contacte en el gel en la part superior.
8. Submergir la membrana amb 5 mL de solució de bloqueig
9. Mantenir en agitació durant una hora a temperatura ambient.
10. Incubar la membrana durant tota una nit a 4°C amb la dilució adequada d'anticòs primari en solució bloqueig.
11. Rentar la membrana amb 3 rentats de 5 min amb 5 mL del tampó TBS-Tween.
12. Incubar l'anticòs secundari diluït amb la solució de bloqueig durant 1h.
13. Rentar la membrana 4 vegades durant 5 min amb 5 mL de la solució TBS-Tween.
14. Realitzar un rentat final amb TBS i mantenir la membrana en aquesta solució fins a lectura.
15. Descartar el TBS i eliminar l'excés de TBS posant en contacte la membrana 1 s per la part posterior amb paper de filtre.
16. Mullar ràpidament la membrana amb 2 mL de la Solució de detecció ECL recent preparat.
17. Col·locar la membrana dins d'una bossa de plàstic i a continuació visualitzar la quimioluminescència amb l'aparell "*LAS-3000 luminescent image analyser*" (*Fujifilm*) a diferents temps (normalment entre uns pocs segons fins a 30 min). Cal considerar que el substrat quimoluminiscent de la peroxidasa present en la solució de detecció ECL té una estabilitat al voltant d'una hora.

### 3.11.1 *Anticossos utilitzats.*

Per a realitzar westerns per a detectar les TIL es van utilitzar:

L'anticòs primari va ser el mouse anti-AtTIL una dilució 1/4000. (Chi, *et al.* 2009).

L'anticòs secundari va ser anti-igg de conill units a la peroxidasa de rave a una dilució de 1/5000.

### 3.12 *Expressió i purificació de proteïnes recombinats en E. coli.*

Solucions:

Solució de Lisi d'*E. Coli*.

40 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 40 mM imidazol, 0,5 mM EDTA, 0,1% Lisozim i 1 mM PMSF pH 8, 00.

Sulfat de protamina.

40 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 40 mM Imidazol i 1% sulfat de protamina, pH 8,00.

Solució A.

40 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl i 40 mM imidazol, pH 8,0.

Solució B.

40 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl i 500 mM imidazol, pH 8,0.

0,1 M Sulfat de níquel.

0,5 M EDTA, pH 8,0.

#### 3.12.1 *Optimització del mètode d'expressió de proteïnes.*

Mètode:

Les seqüències codificants de proteïnes un cop amplificades i clonades en el vector pbluescript van ser tallades i reclonades en els vectors específics, pET23b o pET28c, segons el cas. Un cop obtingut el plasmid amb la proteïna clonada i en pauta, introduir en la soca bacteriana BL21-plyss.

Realitzar el primer estudi d'expressió per a determinar el temps d'inducció adient per obtenir la major quantitat possible de proteïna recombinant.

1. Inocular un cultiu de 20 mL de LB per condició a testar amb un 10 % de pre-cultiu crescut tota una nit.
2. Créixer el cultiu fins a una densitat òptica de 0,7-0,8.
3. Recollir 1-2 mL del cultiu en tubs nets, secs i tarats.
4. Induir el cultiu amb la quantitat d'IPTG a testar.
5. Col·lectar 1-2 mL de cada fracció a determinats temps post inducció.

6. Cada cop s'obté una tub cal centrifugar-lo a 13.000 rpm durant un min.
7. Descartar el sobrenedant i tornar-lo a centrifugar.
8. Descartar el sobrenedant i pesar el tub.
9. Calcular els mg de cèl·lules que conté cada tub.
10. Afegir en cada tub el doble de  $\mu\text{L}$  de Laemmli Sample Buffer 1x que els mg que conté (Materials i Mètodes 3.4).
11. Congelar les mostres fins la carrega en un gel.  
En els gels resultants comprovar quines eren les fraccions on s'obtenia més proteïna.

### **3.12.2 Determinació de la solubilitat de la proteïnes heteròloga**

Mètode:

1. Realitzar un cultiu en les condicions de màxima expressió.
2. Centrifugar 10-15 mL de cultiu a 10 min a 6000 rpm (rotor JA 25.5).
3. Resuspendre el precipitat en 5 mL de la solució de Lisi.
4. Sonicar en 3 polsos 1 min a 60 W.
5. Centrifugar la mostra a 12.500 rpm 15 min (rotor JA 25.5).
6. Tractar el sobrenedant amb un volum Laemmli Sample Buffer 2x.
7. Pesar part del precipitat i resuspendre'l en dos volums de Laemmli Sample Buffer 1x.
8. Carregar en el gel per parelles Sobrenedant – Precipitat. Posant com a control la soca sense induir.
9. Observar on es trobava la proteïna si a la fracció soluble o a la fracció del insoluble.
10. En el cas que la proteïna es trobés en la fracció insoluble, procedir a determinar quines són les millors condicions per a aconseguir la major quantitat de proteïna en la fracció soluble.

Les condicions d'expressió de les proteïnes es troben especificades en l'apartat de Resultats corresponent: Capítol I, Apartat 4.2 per a la *S/SABP2A*, Capítol II, Apartat 2.8 per a la *S/TIL1* i 2.9 per a *AtTIL* i *S/TIL2*.

### **3.12.3 Extracció de les proteïnes recombinats des de *E. coli*.**

Un cop conegudes les condicions òptimes, procedir a realitzar-les per a tal d'obtenir la proteïna.

Mètode:

1. Realitzar 1 L cultiu en les condicions de màxima expressió.
2. Centrifugar tot el cultiu en tubs de 500 mL a 6000 rpm en el rotor JA 10.
3. Resuspendre el precipitat amb 20 mL de la solució de lisi i transferir en un tub de 30 ml.
4. Sonicar amb 5 polsos 1 min a 60 W.
5. Centrifugar a 12.500 rpm 30 min en el rotor JA 25.5.
6. Recollir el sobrenedant en un nou tub i clarificar-lo amb 2,5 mL sulfat de protamina
7. Incubar el tub a 4°C durant 10 min.
8. Centrifugar amb el rotor JA 25.5 a 15.500 rpm, durant 30 min.
9. recuperar el sobrenedant i filtrar-lo amb una membrana de 0,2 µm.

#### **3.12.4 Procés de purificació de proteïnes per la columna *Histrap<sup>tm</sup> FF*.**

1. Acondicionar la columna *Histrap<sup>tm</sup> FF* d'1 mL (GE *Healthcare*) eluint 5 mL d'una solució de Sulfat de níquel al 0,1 M.
2. Introduir en l'equip *FPLC Biologic* de *Bio-Rad*.
3. Eluir 5 mL de la solució A a un flux de 1 ml/min.
4. Realitzar un zero en l'aparell per els paràmetres conductivitat i Abs a 280 nm.
5. Desconnectar la columna i amb l'ajuda d'una xeringa carregar l'extracte proteic.
6. Netejar la columna de proteïna no unida amb 15 mL de la solució A o el volum que faci falta per que absorbància i conductivitat s'estabilitzin a un valor de 0.
7. Iniciar un gradient 40 mL fins el 100% de solució B.
8. Recollir les fraccions on s'observa un augment de la conductivitat i Abs a 280 nm.
9. Al finalitzar l'elució l'equip es neteja amb H<sub>2</sub>O Milli-Q.
10. S'elueix per la columna 5 mL de 70% etanol i es conserva en fred.
  - a. Per a guardar la columna llargs períodes de temps es pot eliminar el Ni<sup>+</sup> acomplexat eluint 2,5 mL d'EDTA abans d'eluir l'etanol al 70 %.

Determinar la puresa mitjançant l'observació de les bandes associades a la proteïna purificada. Si no s'observaven impureses en posteriors purificacions, procedir a reduir el gradient a 20 ml, per així obtenir major concentració de proteïna.

### **3.13 Expressió i purificació de proteïnes recombinats a partir de fulles Agroinfiltrades de *Nicotiana benthamiana*.**

Solucions:

Solució de Lisi *N. benthamiana*.

40 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 40 mM imidazol, 0,5 mM EDTA, 1 mg/mL Aprotinina, 210 µM Leupeptina, 146 µM Pepstatina, 100 µg/mL E-64 i 1 mM PMSF pH 8, 00.

Solució A.

40 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl i 40 mM imidazol, pH 8,0.

Solució B.

40 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl i 500 mM imidazol, pH 8,0.

0,1 M Sulfat de níquel.

0,5 M EDTA, pH 8,0.

#### **3.13.1 Detecció de l'expressió de proteïnes *N. benthamiana*.**

Mètode:

Les seqüències codificants de proteïnes clonades en un primer específic de la cua de polihistidines i el reverse utilitzat en la clonació van amplificades des de pEt28b per en el vector pENTR/D-TOPO mitjançant el sistema de la TOPO isomerasa. Un cop seleccionats els clons per seqüenciació es va realitzar la LR reconvinció amb el vector pEeryGate 100 (CD3-724).

Les construccions es van introduir el la soca d'*Agrobacterium* C56 GV2260 i agroinfiltrades en plantes sota diferents condicions de concentració de bacteri i temps de post infiltració amb l'objectiu obtenir la major quantitat possible de proteïna recombinant.

1. Escindir les Zones infiltrades de les fulles de *Nicotiana Benthamiana* i congelar-les immediatament en N<sub>2</sub> líquid.
2. Homogeneïtzar la mostra amb l'ajut d'un morter.
3. Col·lectar 100 mg de mostra i homogeneïtzar per tissulaiser.
4. Extreure la proteïna total per el mètode descrit en l'apartat 3.1 de Materials i Mètodes.
5. Realitzar un western contra la proteïna tal com s'exposa en l'apartat 3.11.
6. Seleccionar les millors concentracions de proteïna reconvinant.

#### **3.13.2 Procés de purificació de proteïnes des de *N. benthamiana*.**

En el cas de l'expressió de les proteïnes en *Nicotiana benthamiana* no es van realitzar proves de solubilitat ja que es coneixia que les proteïnes testades es purificaven en *E. coli* de forma soluble. Així que es va procedir a la purificació.

Mètode:

1. 1 g de l'extracte de *N. benthamiana* homogeneïtzat va ser col·lectat en un tub de 2 mL i re-homogeneïtzat per Tissulaiser.
2. Transferir l'extracte a un tub de 30 mL.
3. Resuspendre en 20 mL de la solució de lisi a 4°C.
4. Mantenir 5-10 minuts en gel agitant per vòrtex fins observar la total descongelació de la mostra.
5. Sonicar amb 5 polsos 1 min a 40 W.
6. Centrifugar a 12.500 rpm 30 min en el rotor JA 25.5.
7. Recollir el sobrenedant en un nou tub amb cura i si es precis repetir la centrifugació anterior.
8. Recuperar el sobrenedant i filtrar-lo amb una membrana de 0,2 µm.
9. Finalment realitzar la purificació amb el mateix protocol que el mostrat per *E. coli* (Materials i mètodes 3.13.4.).

### **3.14 Post tractament de les proteïnes purificades**

Per tal de dessalar proteïnes utilitzar la columna de gel-filtració *PD-10* de *GE-Healthcare* capaç de substituir el buffer de purificació per a el buffer d'interès.

En cas de necessitar una concentrador major de proteïna concentrar diferents fraccions amb l'ajut dels filtres *Centrifugal Filter Units Amicon® Ultracel-10k* de la casa *Millipore*.

## **4. Tècniques específiques de plantes.**

### **4.1 Liofilització de pericarp de tomàquet.**

Mètode:

1. Tallar el teixit i extreure les llavors i zones gelatinoses.
2. Congelar el teixit de tomàquet amb nitrogen líquid i triturar amb un morter.
3. Recollir 1-2 grams de teixit en un tub dos centímetres de diàmetre per a 5 d'alçada tarats. (Mantenir les mostres en neu carbònica durant el procés de pesat).
4. Realitzar el procés per triplicat per cada mostra diferent.
5. Introduir els tubs en nitrogen líquid.
6. Engegar el liofilitzador.

7. Liofilitzar els tubs a -50 °C a una pressió inferior a 0,001 atm. durant 24-48h fins que observar la sequedat total en la mostra.
8. Pesar els tubs liofilitzats.
9. Calcular el percentatge de pes sec segons formula:  
$$\text{percentatge de pes sec} = \frac{(\text{pes tub liofilitzat}) - (\text{pes tara})}{(\text{pes fresc}) - (\text{pes tara})} \times 100$$

## 4.2 Extracció de carotenoides de fruit de tomàquet.

### 4.2.1 Preparació de cantaxantina.

Com a pas previ, procedeix a preparar una solució de Cantaxantina. Actualment es pot comprar cantaxantina a *Sigma*, i es soluble en cloroform, per tant no cal realitzar la següent preparació.

Mètode:

1. Pesar 1 g de *Canthaxanthin*, de la casa comercial *Extrasynthese* i dissoldre'l en 10 mL en aigua Milli-Q. (El producte és un colorant alimentari, es presenta acompanyat amb un producte hifrofílic no compatible amb la columna).
2. Extreure amb 25 mL de cloroform agitant protegit de la llum a 4°C.
3. Reposar la solució 10 min en fred.
4. Extreure amb cura la fase orgànica inferior i afegir a un baló de rotavapor cobert amb paper de estany.
5. Reextreure la part aquosa amb 25 mL de cloroform de la manera anterior dos cops més.
6. Rotavaporar el cloroform fins a sequedat total.
7. Resuspendre la cantaxantina amb 20 mL de cloroform.

### 4.2.2 Extracció de carotenoides.

Solucions:

Mescla d'hexà:acetona:metanol (H/A/M) 2:1:1.

Mètode:

1. Pesar 50 mg de teixit liofilitzat en un tub eppendorf de 2 ml.
2. Afegir tants µL de patró intern de cantaxantina com mg de teixit pesat.
3. Afegir 1 mL de la mescla H/A/M.
4. Incubar 15 min a 4 °C, en fosc en un agitador vòrtex multitup.

5. Afegir 100 µL d'aigua destil·lada i agitar vigorosament.
6. Centrifugar 3 min a 3000xg i 4 °C.
7. Extreure la fase orgànica superior i introduir-la en un tub d'1,5 mL net i sec.
8. Reextreure la fase aquosa amb 1 mL d'H/A/M.
9. Incubar 15 min en fred i fosc.
10. Centrifugar 3 min, a 3000xg i 4 °C.
11. Col·lectar la fase orgànica amb l'anterior.
12. Assecar la fase orgànica sota un corrent de nitrogen gas, fins a sequedat.
13. Resuspendre directament 150 µL de diclormetà o en el cas que es requereixi emmagatzemar l'extracte mantenir-lo sec a -80°C.

### 4.3 Quantificació de carotenoides per HPLC

Solucions:

0,2 % d'acetat d'amoni en aigua/metanol (80/20).

Eluent A:

95 % de Metanol amb un 5 % de la solució de 0,2 % d'acetat d'amoni anterior.

Eluent B:

Tert-metil butil èter.

Mètode:

1. Carregar 75 µL de l'extracte de carotenoides dins dels vials d'HPLC.
2. Punxar 10 µL mostra en la columna de fase reversa de 30 Carbonis (YMC30, YMC) en l'aparell d'HPLC Acquity de Waters equipat amb el detector "photodiode d'array". Amb el següent programa:
  - a. 12 min de eluent A.
  - b. 12 min on hi havia un 85 % de eluent A i un 15 % de tert-metil butil èter.
  - c. Augmentant el tert-metil butil èter fins arribar al 100 % durant 16 min en gradient.
3. Quantificar els pics per fotodiode d'Array a 472 nm: Licopè (temps de retenció 40 min), β-carotè (23 min); a 290 nm α-tocoferol (11 min).
4. Els carotenoides es quantifiquen a través d'una recta patró amb els licopè, β-carotè i α-tocofetol obtinguts de l'empresa *Sigma*. I per la cantaxantina, es realitza una recta patró respecte el pes de mostra: Coneixent que 50 µL inicials de cantaxantina diluïts a 150 µL era la quantitat corresponent a 50 mg de teixit. D'aquesta manera realitzar els càlculs amb la següent formula.



$$\frac{150 \mu\text{L Extracte} \cdot \text{Concentració licopè ng}}{10 \mu\text{L punxats} \cdot \text{Area obtinguda cantaxantina}} = \frac{\text{Area teòrica cantaxantina}}{\text{mg teixit liofilitzat}} = \frac{\text{ng licopè}}{\text{mg teixit}}$$

#### 4.4 Aïllament i purificació de cromoplastes de fruit de tomàquet.

El protocol utilitzat ha estat el descrit per Angaman i col·laboradors (2012).

Solucions:

Tampó d'extracció.

100 mM Tris-HCl, 330 mM sorbitol, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 mM EDTA, 10 mM KCl, 4 mM cisteïna, 10 mM àcid ascòrbic, 1mM PMSF, pH 8.2.

Solucions de sacarosa: 15, 30, 40 i 50% (w/v) en buffer:

1 mM DTT, 100mM Tris pH 7,6.

Mètode:

1. Netejar els tomàquets amb aigua destil·lada.
2. Tallar el pericarp en trossos eliminat llavors i zones gelatinoses.
3. En un homogeneïtzador waring blender introduir aproximadament 200 g de pericarp de fruit de tomàquet amb 400 mL del tampó d'extracció complementat amb 1% (w/v) PVPP.
4. Homogeneïtzar per tres polsos d'un segon.
5. Filtrar l'extracte per dues capes de gasa i altres dues de miracloth.
6. Rehomogeneïtzar el residu del filtrat diluït en 200 mL de tampó d'extracció complementat amb PVPP.
7. Centrifugar el filtrat a 300xg durant 2 min, per eliminar les restes de PVPP i els nuclis.
8. Centrifugar el sobrenedant anterior a 5000xg durant 10 min.
9. Rentar el precipitat amb 50 mL de buffer d'extracció.
10. Centrifugar el sobrenedant anterior a 5000xg durant 10 min.
11. Resuspendre el precipitat en 4 mL de buffer d'extracció.
12. Carregar 2 mL de extracte en gradient discontinu de sacarosa (format per blocs de 8 mL amb les concentracions de 15, 30, 40 i 50% (w/v)).
13. Ultracentrifugar els gradients amb el rotor SW-28 a 28.000xg durant 1 h i fre suau.
14. Recollir en la interfase 30/40%. Els cromoplastes immadurs (amb la possible contaminació amb mitocondris) bandegen a la interfase 40/50% i els més diferenciats (ultra membranosos) conjuntament amb membranes trencades s'acumulen en la interfase 15/30%.
15. Diluir els cromoplastes amb un volum de tampó d'extracció sense PVPP.

16. Centrifugar a 5000xg durant 10 min.
17. Els cromoplastes purificats es resuspenen en els tampons adequats a les etapes posteriors.  
Tot el procés de purificació és va realitzar a 4°C.

#### 4.5 Agroinfiltració de plantes de *Nicotinana benthamiana*.

##### 4.5.1 *Agrobacterium utilitzats*.

1. HcPro (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>): HcPro es un vector que codifica per una proteasa que inhibeix el sistema de silenciament en *Nicotinana benthamiana*.

Construccions generades amb els vectors de la família pEarleyGate (Earley, *et al.* 2006).

2. 35S::HIS:TIL1 en pEarleyGate 100 (CD3-724) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
3. 35S::HIS:AtTIL en pEarleyGate 100 (CD3-724) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
4. 35S::TIL1:eYFP en pEarleyGate 101 (CD3-683) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
5. 35S::AtTIL:eYFP en pEarleyGate 101 (CD3-683) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
6. 35S::eYFP:TIL1 en pEarleyGate 104 (CD3-686) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
7. 35S::eYFP:AtTIL en pEarleyGate 104 (CD3-686) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
8. 35S::TIL1Mut:eYFP en pEarleyGate 101 (CD3-683) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
9. 35S::AtTILMut:eYFP en pEarleyGate 101 (CD3-683) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
10. 35S::eYFP:TIL1Mut en pEarleyGate 104 (CD3-686) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
11. 35S::eYFP:AtTILMut en pEarleyGate 104 (CD3-686) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
12. 35S::eYFPMut pEarleyGate 100 (CD3-724) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
13. 35S::eYFP pEarleyGate 100 (CD3-724) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).

Família de Marcadors de laboratori de Nebenfüh (Nelson, *et al.* 2007)

14. Marcador eCFP-Reticle endoplasmàtic (ER-CK pBIN20 CD3-953) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
15. Marcador eCFP-Golgi (G-CB pBIN20 CD3-962) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
16. Marcador eCFP-Mitocondris (MT-CK pBIN20 CD3-985) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
17. Marcador eCFP-tonoplast (VAC-CK pBIN20 CD3-969) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
18. Marcador eCFP-membrana plasmàtica (PM-CK pBIN20 CD3-1001) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
19. Marcador eCFP-peroxisomes (PX-CK pBIN20 CD3-977) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).
20. Marcador eCFP-plastids (PT-CK pBIN20 CD3-993) (Rif<sup>+</sup>, Kn<sup>+</sup>, Amp<sup>+</sup>).

#### **4.5.2 Protocol d'Agroinfiltració.**

Solucions:

Solució d'infiltració.

10 mM MES, 10 mM MgCl<sub>2</sub>. pH 7,5.

Solucions Acetosiringona (preparat al moment).

1 mM Acetosiringona dissolta en EtOH al 70%.

Mètode:

1. Créixer un precultiu els *Agrobacterium* durant 32-48h a 28°C.
2. Realitzar un segon cultiu inoculant amb l'anterior i créixer 16-20h a 28°C.
3. Centrifugar 15 min a 5000xg.
4. Complementar la solució d'infiltració fins a 200 µM d'Acetosiringona.
5. Resuspendre els *Agrobacterium* a una D.O. adequada (veure al final del protocol).
6. Incubar a temperatura ambient sense agitació 3-5h.
7. Mesclar D.O. iguals de la soca *Agrobacterium* a amb el cultiu de HcPro.
8. Amb l'ajuda d'una xeringa de 1 mL (sense agulla) infiltrar la mescla d'*Agrobacterium* pressionant suaument la xeringa contra el revers de la fulla.
9. Marcar amb un retolador permanent la zona infiltrada.

Per a les soques TIL1:eYFP, AtTIL:eYFP, eYFP:TIL1 i eYFP:AtTIL es va ajustar el cultiu a una D.O. de 0,1. Per a les soques HIS:TIL1, HIS:AtTIL, TIL1Mut:eYFP, AtTILMut:eYFP, eYFP:TIL1Mut, eYFP:AtTILMut, eYFPMut, eCFP, Marcador eCFP-Reticle endoplasmàtic, eCFP-Golgi, eCFP-Mitocondris, eCFP-tonoplast, eCFP-membrana plasmàtica, eCFP-peroxisomes i eCFP-plastids es va ajustar el cultiu a una D.O. de 0,25.

Per el cas de Co-infiltracions es van ajustar els cultius al doble i es van mesclar les solucions HcPro+marcador i HcPro+Proteïna en una concentració 1:1.

#### **4.5.3 Observació de les proteïnes fluorescentes.**

Es van detectar les fluorescències per els programes pre establerts en el microscopi confocal Olympus FV1000.

## 5. Tècniques específiques de la present tesis.

### 5.1 Determinació de l'activitat de SABP2.

#### 5.1.1 Reacció d'esterificació del àcid salílic.

El mètode és descrit per Forouhart, i col·laboradors (2005) amb modificacions.

Solucions:

1M Tris-HCl pH 7,00.

50 mM MeSA en etanol.

Solució d'extracció SA

5% de TCA contingut en  $\text{HCCl}_3$ :MeOH 1:1.

Cloroform.

Mètode:

1. Expressar i purificar SABP2 en *E. coli* (Materials i Mètodes 3.12).
2. Preparar la mescla de reacció per triplicat:
  - a. 1 mL de Tris-HCl.
  - b. 100  $\mu\text{L}$  MeSA.
  - c. Fins a 4 mL d'aigua MQ.
3. Els tubs van ser temperats 10 min a 25°C en un bany.
4. Un cop temperat, afegir 1 mL de la proteïna (5 mg/ml).
5. Esperar el temps de reacció (0, 5, 15, 30, 60, 90 i 120 min).
6. Extreure 500  $\mu\text{L}$  de cada tub i afegir en tub eppendorf amb 500  $\mu\text{L}$  de la solució d'extracció SA.
7. Agitar vigorosament i incubar en gel 5 min.
8. Mesclar els tubs amb un agitador vòrtex multitub a 4°C durant 15 min.
9. Centrifugar 1 min a 13000 rpm.
10. Recollir la fase orgànica inferior en un tub net i sec.
11. Tractar la fase aquosa amb 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{HCCl}_3$  i repetir l'extracció.
12. Assecar sota un corrent de  $\text{N}_2$  gas fins a sequedat, per ser resuspesos en 500  $\mu\text{L}$  de MeOH prèvia injecció a columna.

#### 5.1.2 Quantificació per HPLC dels extractes de SA.

La separació cromatogràfica per HPLC es realitza segons el mètode descrit en Parker, *et al.* (2004) amb algunes modificacions. El mètode és adequat per separar mostres

de SA i MeSA. Tenint en conta que el MeSA és un gas i s'evapora en la fase d'eixutament de cloroform es va procedir a reduir el mètode dels 32 min inicials a 24. La columna utilitzada va ser la ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6X250 mm, 5 micron).

Solucions:

- Eluent canal A:  
20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_3$ .
- Eluent canal B:  
Acetonitril.

Mètode:

1. Resuspendre les mostres de SA en 150  $\mu\text{L}$  de metanol.
2. Carregar 25  $\mu\text{L}$  en l'HPLC sota el següent programa:
  - a. 1 min isocràtic amb un 95 % de A.
  - b. 9 min en gradient de fins arribar al 65 % de A.
  - c. 9 min en gradient de fins arribar al 95 % de A.
  - d. 5 min isocràtic amb un 95 % de A.
3. Quantificar els pics d'absorció amb un espectrofotòmetre de flux a 220 nm coneixent que el SA elueix als 9:30 min.  
Per a quantificar l'extracció, dissoldre en el mateix tampó de reacció 10  $\mu\text{L}$  del patró 50 mM de SA en metanol. A partir d'aquesta solució realitzar una recta patró amb diferents concentracions. Per determinar el percentatge de recuperació: extreure 500  $\mu\text{L}$  de cada patró de forma anàloga a les reaccions.

## **5.2 Optimització de l'extracció descrita per Zhou, per a cromoplastes fruit de tomàquet**

Solucions:

- Solució Zhou:  
2 mM EDTA i 5 mM àcid ascòrbic.
- Tween 20.
- Tampó de Zhou.  
0,05 M Tris pH 8,0, 0,02 M NaCl, 1 mM EDTA i 0,01% Tween 20.
- Tampó amb DM.  
0,05 M Tris pH 8,0, 0,02 M NaCl, 1 mM EDTA i 0,01% DM.

### 5.3 Mètode d'extracció Zhou.

Mètode adaptat de Zhou i col·laboradors (1994).

Mètode:

1. Extracció de mostra:
  - a. Des de pericarp:
    - i. Tractar 200g de pericarp de tomàquet 200 mL de la solució Zhou.
    - ii. Homogeneïtzar amb 3 polsos de 1 min en un homogeneïtzador waring blender.
    - iii. Filtrar el sobrenedant amb 4 capes de gasa.
  - b. Des de cromoplastes:
    - i. Resuspendre els cromoplastes purificats a partir de 300g pericarp del fruit del tomàquet en 10 mL de la solució Zhou (Materials i Mètodes 4.4)
2. Afegir Tween 20 fins al 0,5 %.
3. Incubar 1 h a 4°C.
4. Centrifugar a 20000xg durant 40 min.
5. Tractar el sobrenedant amb un 20 % de saturació de sulfat amònic a 4°C.
6. Incubar 15 min a 4°C.
7. Centrifugar a 10000xg durant 15 min.
8. Afegir sulfat amònic al sobrenedant per arribar a un 35 % de saturació a 4°C.
9. Centrifugar a 10000xg durant 15 min.
10. Recuperar la fase lipoproteica flotant i rentar-la amb un 35% de saturació de sulfat amònic.
11. Centrifugar a 29000xg durant 30 min.
12. Resuspendre la fase lipoproteica en 3 volums de tampó de Zhou.

#### 5.3.1 Separació cromatogràfica

Mètode:

1. Compactar la columna amb 50 mL de la resina *Separose*® CL-6B reconstituïda amb tampó adient (Tampó de Zhou/Tampó amb DM).
2. Filtrar els extractes de forma seqüencial per filtres de 0,45 i 0,22 µM prèvia carrega a una columna.
3. Carregar les mostres.
4. Separar comatogràficament a 1 ml/min.
5. Recollir les fraccions colorejades.

6. Realitzar un Bradford i mesura d'absorbància a 472 nm.
7. Congelar les fraccions amb més contingut de proteïna-carotenoide en N<sub>2</sub> líquid.
8. Liofilitzar totalment de les fraccions.
9. Resuspendre cada fracció en un 10 % del volum original amb Aigua MQ
10. Carregar una alíquota en cada gel.

#### **5.4 Efecte del ió cianur en les proteïnes TIL.**

Solucions:

Proteïnes TIL resuspeses en 10 mM de tampó fosfat.

Solució de CN<sup>-</sup>

0,4 M de KCN en 10 mM de tampó fosfat.

Mètode:

1. Diluir 0,5 mL d'una concentració coneguda de proteïna TIL en 0,5 mL de 10 mM de tampó fosfat i llegir l'espectre entre unes longituds d'ona 250 a 700 nm.
2. Diluir altres 0,5 mL d'una concentració coneguda de proteïna TIL en 0,5 mL de solució de CN<sup>-</sup> i llegir l'espectre al moment entre unes longituds d'ona 250 a 700 nm.

#### **5.5 Espectres EPR.**

Eluir a proteïna purificada en una columna de gel filtració *P10* (*GE Healthcare*) amb el tampó (10 mM tampó fosfat pH 7). Un cop quantificada la proteïna, afegir un 25% de glicerol. Introduir 200 µL en un capil·lar de quars. L'espectre EPR realitza amb una freqüència de microones de 9.6456 GHz, una intensitat de 10mW, i una modulació de 5G a 4K. (*Ardissone, et al. 2004*).

## **6. Bases de dades i programari associat.**

### **6.1 Bioinformàtica.**

Inagej: programa de quantificació d'imatges <http://rsbweb.nih.gov/ij/>

Vector NTI: Programa de visualització d'àcids nucleics.

Crustalw2: Programa d'alineament de seqüències de DNA i proteïna

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

Boxshade 3.21: Programa de visualització de alineaments de seqüències de DNA i proteïna [http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

ESyPred3D: Programa de modelatge de proteïnes <http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>.

3D-JIGSAW: Programa de modelatge de proteïnes a partir de seqüències existents <http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>.

Expasy: conjunt d'eines referents a la biologia molecular. <http://expasy.org/tools/>.

Olimpus FV10-ASW 2.0 Viewer. Programa visualització imatges de microscopia confocal.

Euler Venn Applet: <http://www.cs.kent.ac.uk/people/staff/pjr/EulerVennCircles/EulerVennApplet.html>.

big-PI Plant Predictor [http://mendel.imp.ac.at/gpi/plant\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/plant_server.html).

Motif Scan ([http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)).

YinOYang 1.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>).

## 6.2 Bases de dades

NCBI: *National Center for Biotechnology Information* conjunt de bases de dades generals enfocades a la ciència <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

SGN: *Sol Genomics Network* bases de dades de solanàcies <http://solgenomics.net/>.

## 6.3 Ofimàtica:

Paquet d'ofimàtica *Microsoft Office*.

ENDNOTE: programa de formació de bibliografia.

Photoshop: Programa de tractament d'imatges.

## 7. Primers utilitzats en aquest treball.

Primers generals		
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sentit
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGA	Anti-sentit
M13 FW	GTAAAACGACGGCCAG	Sentit
M13 RV	CAGGAAACAGCTATGAC	Anti-sentit



Primers SQ-PCR		
Actin FW	GTCAGCAACTGGGATGATATGG	Sentit
Actin RV	CACCAGAGTCCAACACAATACC	Anti-sentit
SABPA FW	TGATCCATCTCATGTTGTTCCATG	Sentit
SABPA RV	ACTGATATAGTTTTATTATCTCACC	Anti-sentit
SABPB FW	TGACAACATTAATAGCATCATAG	Sentit
SABPB RV	ACACACTTAATGTATAGAAAGGC	Anti-sentit
SABP2ARTE1	GTCTATATAACCCACCTCATAGTTC	Sentit
SABP2ARTE2	CCTCTATAGTCTATATAACCCACCT	Sentit
SABP2BRTE1	AACCCTATCTTAGAGTTCTTCTGAC	Sentit
SABP2 RTE2	TTCTCCTCTTGTTGGAAGAGATTCC	Anti-sentit
TILFRT	ATGCTTTGATTGGTCAGCCTAG	Sentit
TIL1RT4	TTGTTCAACAACATTTACAGGAG	Anti-sentit
TIL2RTR2	CAACAACTCTCTTACAAGTTGC	Anti-sentit
Primers Northern-blot		
TIL FW	TAGGCAAAAACAGTACAATGGCC	Sentit
TIL RV	TTCACGCTTCAGTGCCCTCTTGGC	Anti-sentit
FEP FW	ATGGCTGCCAAAAATTCAGAGATG	Sentit
FEP RV	GGAAAAGGATCAAAAATCTACGCG	Anti-sentit
HSP-17,7F	CACTGAAAATGTCTCTGACC	Sentit
HSP-17,7R	TACTACAGGTTTGTTCACC	Anti-sentit
ASRP1R	TCAGATGGAGGAGGACAAAC	Sentit
ARP1F	AGGTAATCAACAGTAGATTGCG	Anti-sentit
Expressió SABP		
SF	CTTGTCGACATTGTATTTATC TGCAATCTCCAMGAGAGTG	Sentit
SA	GGCTAGCATGGAAGCTAACA AGAAACAAGGAAAAC	Anti-sentit
SB	GGCTAGCATGGAACCTATCA AGAAACAAGGAAGAC	Anti-sentit
Expressió TIL en <i>E. coli</i> .		
TIL2EX F	CATATGACCACAAAAGAGATGGAAGTAG	Sentit
TIL2EXSR	GTCGACCATATTCAAGATTGACTATTTTCCC	Anti-sentit
TIL2EXOR	CTCGAGTTTTCCAATATTGATTTGATCCAC	Anti-sentit
TIL1 EX F	CATATGGCTACAAAAGTAATGGAAGTGG	Sentit
TIL1 EXSR	GTCGACGTTTTTGCCTATTTTCCAAGGATTG	Anti-sentit
TIL1 EXOR	CTCGAGTTTTTCCAAGGATTGATTTGATCCAC	Anti-sentit

Expressió TIL en <i>Nicotiana benthamiana</i> .		
Primers Sentit amb seqüència de reconeixement TOPO		
AttilGW	CACCATGACAGAGAAGAAAGAGATGGAAG	Sentit
Til1GW	CACCATGGCTACAAAAGTAATGGAAGTG	Sentit
HisGW	CACCATGGGCAGCAGCCATCATCATC	Sentit
YFP <sub>TopoF</sub>	CACCATGGGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC	Sentit
Primers Anti-sentit		
ATTIL OP TOPO	TTTGCCGAAGAGAGATTGAACCACC	Anti-sentit
TIL1 OP TOPO	TTTTCCAAGGATTGATTTGATCCAC	Anti-sentit
Primers Realitzats per la mutagènesis		
AtTil mut1	CAAGTTCTATGTCCCTCCTTCTGCGC CTGCTCGACCCGTCACCGGAGAC	Sentit
AtTil mut2	GTCTCCGGTGACGGGTCGAGCAGGC GCAGAAGGAGGGACATAGAAC	Anti-sentit
TIL1 mut1	GGTTTTATGTICCAACCATCTGCGCCT GCTCGACCTGTTACTGGTG	Sentit
TIL1 mut2	CACCAGTAACAGGTTCGAGCAGGCG CAGATGGTGAACATAAAACC	Anti-sentit
GFP MutFw	TCCACCATTTTTGCCTATAATTCCTGTT AAGAACGGCATCAAGGTGAAC	Sentit
GFP MutRV	CAGGAATTATAGGCAAAAATGGTGGGA ACCTTGTCGGCCATGATATAGACG	Anti-sentit



# **Bibliografia**



## **Bibliografía**

- Ahn, Y.J. and Zimmerman, J.L.** (2006) Introduction of the carrot HSP17.7 into potato (*Solanum tuberosum* L.) enhances cellular membrane stability and tuberization in vitro. *Plant Cell Environ*, **29**, 95-104.
- Akerstrom, B., Maghzal, G.J., Winterbourn, C.C. and Kettle, A.J.** (2007) The lipocalin alpha1-microglobulin has radical scavenging activity. *J Biol Chem*, **282**, 31493-31503.
- Alba, R., Payton, P., Fei, Z., McQuinn, R., Debbie, P., Martin, G.B., Tanksley, S.D. and Giovannoni, J.J.** (2005) Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell*, **17**, 2954-2965.
- Allhorn, M., Klapysa, A. and Akerstrom, B.** (2005) Redox properties of the lipocalin alpha1-microglobulin: reduction of cytochrome c, hemoglobin, and free iron. *Free Radic Biol Med*, **38**, 557-567.
- Altuzar-Molina, A.R., Munoz-Sanchez, J.A., Vazquez-Flota, F., Monforte-Gonzalez, M., Racagni-Di Palma, G. and Hernandez-Sotomayor, S.M.** (2011) Phospholipidic signaling and vanillin production in response to salicylic acid and methyl jasmonate in *Capsicum chinense* J. cells. *Plant Physiol Biochem*, **49**, 151-158.
- Amitai-Zeigerson, H., Scolnik, P.A. and Bar-Zvi, D.** (1995) Tomato Asr1 mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid. *Plant Science*, **110**, 205-213.
- Andersson, M.X. and Sandelius, A.S.** (2004) A chloroplast-localized vesicular transport system: a bio-informatics approach. *BMC Genomics*, **5**, 40.
- Angaman, D.M., Petrizzo, R., Hernandez-Gras, F., Romero-Segura, C., Pateraki, I., Busquets, M. and Boronat, A.** (2012) Precursor uptake assays and metabolic analyses in isolated tomato fruit chromoplasts. *Plant Methods*, **8**, 1.
- Arab, L. and Steck, S.** (2000) Lycopene and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, **71**, 1691S-1695S; discussion 1696S-1697S.
- Ardissone, S., Frendo, P., Laurenti, E., Jantschko, W., Obinger, C., Puppo, A. and Ferrari, R.P.** (2004) Purification and physical-chemical characterization of the three hydroperoxidases from the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Biochemistry*, **43**, 12692-12699.
- Arolas, J.L., Aviles, F.X., Chang, J.Y. and Ventura, S.** (2006) Folding of small disulfide-rich proteins: clarifying the puzzle. *Trends Biochem Sci*, **31**, 292-301.

- Arolas, J.L., Lorenzo, J., Rovira, A., Vendrell, J., Aviles, F.X. and Ventura, S.** (2004) Secondary binding site of the potato carboxypeptidase inhibitor. Contribution to its structure, folding, and biological properties. *Biochemistry*, **43**, 7973-7982.
- Ascenzi, P., Nardini, M., Bolognesi, M. and Montfort, W.R.** (2002) Nitrophorins: Lipocalin-based heme proteins transporting nitric oxide. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, **30**, 68-71.
- Asghari, M. and Aghdam, M.S.** (2010) Impact of salicylic acid on post-harvest physiology of horticultural crops. *Trends in Food Science & Technology*, **21**, 502-509.
- Astrakharchik, G.E., Boronat, J., Kurbakov, I.L. and Lozovik, Y.E.** (2007) Quantum phase transition in a two-dimensional system of dipoles. *Phys Rev Lett*, **98**, 060405.
- Bapat, V.A., Trivedi, P.K., Ghosh, A., Sane, V.A., Ganapathi, T.R. and Nath, P.** (2010) Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnol Adv*, **28**, 94-107.
- Barampuram, S. and Zhang, Z.J.** (2011) Recent advances in plant transformation. *Methods Mol Biol*, **701**, 1-35.
- Barr, J., White, W.S., Chen, L., Bae, H. and Rodermel, S.** (2004) The GHOST terminal oxidase regulates developmental programming in tomato fruit. *Plant, Cell and Environment*, **27**, 804-852.
- Barsan, C., Sanchez-Bel, P., Rombaldi, C., Egea, I., Rossignol, M., Kuntz, M., Zouine, M., Latche, A., Bouzayen, M. and Pech, J.C.** (2010) Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. *J Exp Bot*, **61**, 2413-2431.
- Bathgate, B., Purton, M., Grierson, D. and Goodenough, P.** (1985) Plastid changes during the conversion of chloroplasts to chromoplasts in ripening tomatoes. *Planta*, **165**, 197-204.
- Bian, W., Barsan, C., Egea, I., Purgatto, E., Chervin, C., Zouine, M., Latché, A., Bouzayen, M. and Pech, J.C.** (2011) Metabolic and Molecular Events Occurring during Chromoplast Biogenesis. *Journal of Botany*, **2011**.
- Boronat, A.** (2010) Chapter 8 The Methylerythritol 4-Phosphate Pathway: Regulatory Role in Plastid Isoprenoid Biosynthesis. In *The Chloroplast Basics and Applications* (Rebeiz, C.A., Benning, C., Bohnert, H.J., Daniell, H., Hooper, J.K., Lichtenthaler, H.K., Portis, A.R. and Tripathy, B.C. eds): Springer Netherlands, pp. 119-126.
- Botella-Pavia, P., Besumbes, O., Phillips, M.A., Carretero-Paulet, L., Boronat, A. and Rodriguez-Concepcion, M.** (2004) Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J*, **40**, 188-199.
- Bouvier, F., Rahier, A. and Camara, B.** (2005) Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res*, **44**, 357-429.

- Bréhélin, C., Kessler, F. and van Wijk, K.J.** (2007) Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends Plant Sci*, **12**, 260-266.
- Broadbent, L.** (1976) Epidemiology and Control of Tomato Mosaic Virus. *Annual Review of Phytopathology*, **14**, 75-96.
- Broman, K.W.** (2005) The genomes of recombinant inbred lines. *Genetics*, **169**, 1133-1146.
- Bugos, R.C., Chiang, V.L., Zhang, X.H., Campbell, E.R., Podila, G.K. and Campbell, W.H.** (1995) RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. *Biotechniques*, **19**, 734-737.
- Cairó Calzada, A.** (2009) Anàlisi molecular de la biosíntesi d'isoprenoides a Arabidopsis In *Departament de Biologia i Bioquímica Molecular, Facultat de Biologia*. Barcelona: Universitat de Barcelona.
- Camara, B., Hugueney, P., Bouvier, F., Kuntz, M. and Moneger, R.** (1995) Biochemistry and molecular biology of chromoplast development. *Int Rev Cytol*, **163**, 175-247.
- Cerecetto, H. and Lopez, G.V.** (2007) Antioxidants derived from vitamin E: an overview. *Mini Rev Med Chem*, **7**, 315-338.
- Charron, J.B., Breton, G., Danyluk, J., Muzac, I., Ibrahim, R.K. and Sarhan, F.** (2002) Molecular and biochemical characterization of a cold-regulated phosphoethanolamine N-methyltransferase from wheat. *Plant Physiol*, **129**, 363-373.
- Charron, J.B., Ouellet, F., Houde, M. and Sarhan, F.** (2008) The plant Apolipoprotein D ortholog protects Arabidopsis against oxidative stress. *BMC Plant Biol*, **8**, 86.
- Charron, J.B., Ouellet, F., Pelletier, M., Danyluk, J., Chauve, C. and Sarhan, F.** (2005) Identification, expression, and evolutionary analyses of plant lipocalins. *Plant Physiol*, **139**, 2017-2028.
- Cheek, S., Krishna, S.S. and Grishin, N.V.** (2006) Structural classification of small, disulfide-rich protein domains. *J Mol Biol*, **359**, 215-237.
- Cheung, A.Y., McNellis, T. and Piekos, B.** (1993) Maintenance of Chloroplast Components during Chromoplast Differentiation in the Tomato Mutant Green Flesh. *Plant Physiol*, **101**, 1223-1229.
- Chi, W.T., Fung, R.W., Liu, H.C., Hsu, C.C. and Charng, Y.Y.** (2009) Temperature-induced lipocalin is required for basal and acquired thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell Environ*, **32**, 917-927.
- Cianci, M., Rizkallah, P.J., Olczak, A., Raftery, J., Chayen, N.E., Zagalsky, P.F. and Helliwell, J.R.** (2002) The molecular basis of the coloration mechanism in lobster shell: beta-crustacyanin at 3.2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9795-9800.



- Craik, D.J.** (2009) Circling the enemy: cyclic proteins in plant defence. *Trends Plant Sci*, **14**, 328-335.
- Craik, D.J.** (2012) Host-defense activities of cyclotides. *Toxins (Basel)*, **4**, 139-156.
- Creelman, R.A. and Mullet, J.E.** (1997) Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **48**, 355-381.
- D'Costa, A., Reifegerste, R., Sierra, S. and Moses, K.** (2006) The *Drosophila* ramshackle gene encodes a chromatin-associated protein required for cell morphology in the developing eye. *Mech Dev*, **123**, 591-604.
- Dal Cin, V., Tieman, D.M., Tohge, T., McQuinn, R., de Vos, R.C., Osorio, S., Schmelz, E.A., Taylor, M.G., Smits-Kroon, M.T., Schuurink, R.C., Haring, M.A., Giovannoni, J., Fernie, A.R. and Klee, H.J.** (2011) Identification of Genes in the Phenylalanine Metabolic Pathway by Ectopic Expression of a MYB Transcription Factor in Tomato Fruit. *Plant Cell*.
- DellaPenna, D. and Pogson, B.J.** (2006) Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu Rev Plant Biol*, **57**, 711-738.
- Ding, C.-K. and Wang, C.Y.** (2003) The dual effects of methyl salicylate on ripening and expression of ethylene biosynthetic genes in tomato fruit. *Plant Science*, **164**, 589-596.
- Ding, C.-K., Wang, C.Y., Gross, K.C. and Smith, D.L.** (2001) Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. *Plant Science*, **161**, 1153-1159.
- Ding, C.K., Wang, C.Y., Gross, K.C. and Smith, D.L.** (2002) Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta*, **214**, 895-901.
- Du, H. and Klessig, D.F.** (1997) Identification of a Soluble, High-Affinity Salicylic Acid-Binding Protein in Tobacco. *Plant Physiol*, **113**, 1319-1327.
- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K. and Pikaard, C.S.** (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J*, **45**, 616-629.
- Egea, I., Barsan, C., Bian, W., Purgatto, E., Latche, A., Chervin, C., Bouzayen, M. and Pech, J.C.** (2010) Chromoplast differentiation: current status and perspectives. *Plant Cell Physiol*, **51**, 1601-1611.
- Enfissi, E.M., Fraser, P.D., Lois, L.M., Boronat, A., Schuch, W. and Bramley, P.M.** (2005) Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnol J*, **3**, 17-27.

- Fei, Z., Tang, X., Alba, R.M., White, J.A., Ronning, C.M., Martin, G.B., Tanksley, S.D. and Giovannoni, J.J. (2004) Comprehensive EST analysis of tomato and comparative genomics of fruit ripening. *Plant J*, **40**, 47-59.
- Flower, D.R. (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*, 1-14.
- Forouhar, F., Yang, Y., Kumar, D., Chen, Y., Fridman, E., Park, S.W., Chiang, Y., Acton, T.B., Montelione, G.T., Pichersky, E., Klessig, D.F. and Tong, L. (2005) Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1773-1778.
- Fraser, P.D. and Bramley, P.M. (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res*, **43**, 228-265.
- Fraser, P.D., Enfissi, E.M., Halket, J.M., Truesdale, M.R., Yu, D., Gerrish, C. and Bramley, P.M. (2007) Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell*, **19**, 3194-3211.
- Fraser, P.D., Pinto, M.E., Holloway, D.E. and Bramley, P.M. (2000) Technical advance: application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *Plant J*, **24**, 551-558.
- Fraser, P.D., Truesdale, M.R., Bird, C.R., Schuch, W. and Bramley, P.M. (1994) Carotenoid Biosynthesis during Tomato Fruit Development (Evidence for Tissue-Specific Gene Expression). *Plant Physiol*, **105**, 405-413.
- Fritz, H., Kennedy, D., Fergusson, D., Fernandes, R., Doucette, S., Cooley, K., Seely, A., Sagar, S., Wong, R. and Seely, D. (2011) Vitamin A and retinoid derivatives for lung cancer: a systematic review and meta analysis. *PLoS One*, **6**, e21107.
- Fung, R.W.M., Wang, C.Y., Smith, D.L., Gross, K.C., Tao, Y. and Tian, M. (2006) Characterization of alternative oxidase (AOX) gene expression in response to methyl salicylate and methyl jasmonate pre-treatment and low temperature in tomatoes. *Journal of Plant Physiology*, **163**, 1049-1060.
- Galpaz, N., Wang, Q., Menda, N., Zamir, D. and Hirschberg, J. (2008) Abscisic acid deficiency in the tomato mutant high-pigment 3 leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content. *Plant J*, **53**, 717-730.
- Gillaspy, G., Ben-David, H. and Gruissem, W. (1993) Fruits: A Developmental Perspective. *Plant Cell*, **5**, 1439-1451.
- Giovannoni, J.J. (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*, **16 Suppl**, S170-180.
- Giovannoni, J.J. (2007) Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Curr Opin Plant Biol*, **10**, 283-289.

- Goldgur, Y., Rom, S., Ghirlando, R., Shkolnik, D., Shadrin, N., Konrad, Z. and Bar-Zvi, D.** (2007) Desiccation and zinc binding induce transition of tomato abscisic acid stress ripening 1, a water stress- and salt stress-regulated plant-specific protein, from unfolded to folded state. *Plant Physiol*, **143**, 617-628.
- Grant, M. and Lamb, C.** (2006) Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol*, **9**, 414-420.
- Grennan, A.K.** (2008) Plastoglobule proteome. *Plant Physiol*, **147**, 443-445.
- Grzyb, J., Latowski, D. and Strzalka, K.** (2006) Lipocalins - a family portrait. *J Plant Physiol*, **163**, 895-915.
- Harris, W.M. and Spurr, A.R.** (1969) Chromoplasts of Tomato Fruits. II. The Red Tomato. *American Journal of Botany*, **56**, 380-389.
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. and Ahmad, A.** (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany*, **68**, 14-25.
- Hirschberg, J.** (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol*, **4**, 210-218.
- Hochholdinger, F. and Hoecker, N.** (2007) Towards the molecular basis of heterosis. *Trends Plant Sci*, **12**, 427-432.
- Holmquist, M.** (2000) Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr Protein Pept Sci*, **1**, 209-235.
- Huang, H., Rambaldi, I., Daniels, E. and Featherstone, M.** (2003) Expression of the Wdr9 gene and protein products during mouse development. *Dev Dyn*, **227**, 608-614.
- Itkin, M., Seybold, H., Breitel, D., Rogachev, I., Meir, S. and Aharoni, A.** (2009) TOMATO AGAMOUS-LIKE 1 is a component of the fruit ripening regulatory network. *Plant J*, **60**, 1081-1095.
- Ito, Y., Kitagawa, M., Ihashi, N., Yabe, K., Kimbara, J., Yasuda, J., Ito, H., Inakuma, T., Hiroi, S. and Kasumi, T.** (2008) DNA-binding specificity, transcriptional activation potential, and the rin mutation effect for the tomato fruit-ripening regulator RIN. *Plant J*, **55**, 212-223.
- Iusem, N.D., Bartholomew, D.M., Hitz, W.D. and Scolnik, P.A.** (1993) Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant Physiol*, **102**, 1353-1354.
- Jarvis, P.** (2008) Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol*, **179**, 257-285.

- Jochens, H., Hesseler, M., Stiba, K., Padhi, S.K., Kazlauskas, R.J. and Bornscheuer, U.T. (2011) Protein Engineering of  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Fold Enzymes. *ChemBiochem*, **12**, 1508-1517.
- Kakar, S., Hoffman, F.G., Storz, J.F., Fabian, M. and Hargrove, M.S. (2010) Structure and reactivity of hexacoordinate hemoglobins. *Biophys Chem*, **152**, 1-14.
- Kalifa, Y., Gilad, A., Konrad, Z., Zaccai, M., Scolnik, P.A. and Bar-Zvi, D. (2004) The water- and salt-stress-regulated Asr1 (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. *Biochem J*, **381**, 373-378.
- Karlova, R., Rosin, F.M., Busscher-Lange, J., Parapunova, V., Do, P.T., Fernie, A.R., Fraser, P.D., Baxter, C., Angenent, G.C. and de Maagd, R.A. (2011) Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. *Plant Cell*, **23**, 923-941.
- Kelkel, M., Schumacher, M., Dicato, M. and Diederich, M. (2011) Antioxidant and anti-proliferative properties of lycopene. *Free Radic Res*, **45**, 925-940.
- Klee, H.J. and Giovannoni, J.J. (2011) Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annu Rev Genet*, **45**, 41-59.
- Knipp, M. and He, C. (2011) Nitrophorins: Nitrite disproportionation reaction and other novel functionalities of insect heme-based nitric oxide transport proteins. *IUBMB Life*, **63**, 304-312.
- Kolotilin, I., Koltai, H., Tadmor, Y., Bar-Or, C., Reuveni, M., Meir, A., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L. and Levin, I. (2007) Transcriptional profiling of high pigment-2dg tomato mutant links early fruit plastid biogenesis with its overproduction of phytonutrients. *Plant Physiol*, **145**, 389-401.
- Kourist, R., Jochens, H., Bartsch, S., Kuipers, R., Padhi, S.K., Gall, M., Böttcher, D., Joosten, H.-J. and Bornscheuer, U.T. (2010) The  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Fold 3DM Database (ABHDB) as a Tool for Protein Engineering. *ChemBiochem*, **11**, 1635-1643.
- Krinke, O., Ruelland, E., Valentova, O., Vergnolle, C., Renou, J.P., Tacconnat, L., Flemr, M., Burketova, L. and Zachowski, A. (2007) Phosphatidylinositol 4-kinase activation is an early response to salicylic acid in Arabidopsis suspension cells. *Plant Physiol*, **144**, 1347-1359.
- Krinsky, N.I. and Johnson, E.J. (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med*, **26**, 459-516.
- Kumar, D. and Klessig, D.F. (2003) High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 16101-16106.

- Kwasek, A., Osmark, P., Allhorn, M., Lindqvist, A., Akerstrom, B. and Wasylewski, Z.** (2007) Production of recombinant human alpha1-microglobulin and mutant forms involved in chromophore formation. *Protein Expr Purif*, **53**, 145-152.
- Lara, F.A., Lins, U., Bechara, G.H. and Oliveira, P.L.** (2005) Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *J Exp Biol*, **208**, 3093-3101.
- Lawrence, S.D., Cline, K. and Moore, G.A.** (1993) Chromoplast-Targeted Proteins in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Fruit. *Plant Physiol*, **102**, 789-794.
- Leclercq, J., Ranty, B., Sanchez-Ballesta, M.T., Li, Z., Jones, B., Jauneau, A., Pech, J.C., Latche, A., Ranjeva, R. and Bouzayen, M.** (2005) Molecular and biochemical characterization of LeCRK1, a ripening-associated tomato CDPK-related kinase. *J Exp Bot*, **56**, 25-35.
- Leslie, C.A. and Romani, R.J.** (1988) Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic Acid. *Plant Physiol*, **88**, 833-837.
- Lien, E.L. and Hammond, B.R.** (2011) Nutritional influences on visual development and function. *Prog Retin Eye Res*, **30**, 188-203.
- Lin, Z., Zhong, S. and Grierson, D.** (2009) Recent advances in ethylene research. *J Exp Bot*, **60**, 3311-3336.
- Lindshield, B.L., Canene-Adams, K. and Erdman, J.W., Jr.** (2007) Lycopeneoids: are lycopene metabolites bioactive? *Arch Biochem Biophys*, **458**, 136-140.
- Liu, Y., Roof, S., Ye, Z., Barry, C., van Tuinen, A., Vrebalov, J., Bowler, C. and Giovannoni, J.** (2004) Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9897-9902.
- Llave, C., Kasschau, K.D. and Carrington, J.C.** (2000) Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13401-13406.
- Lois, L.M., Rodriguez-Concepcion, M., Gallego, F., Campos, N. and Boronat, A.** (2000) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J*, **22**, 503-513.
- Low, D., Brandle, K., Nover, L. and Forreiter, C.** (2000) Cytosolic heat-stress proteins Hsp17.7 class I and Hsp17.3 class II of tomato act as molecular chaperones in vivo. *Planta*, **211**, 575-582.
- Lundquist, P., Poliakov, A., Bhuiyan, N.H., Zybailov, B., Sun, Q. and van Wijk, K.J.** (2012) The functional network of the *Arabidopsis thaliana* plastoglobule proteome based on quantitative proteomics and genome-wide co-expression analysis. *Plant Physiol*.

- Manjunatha, G., Lokesh, V. and Neelwarne, B.** (2010) Nitric oxide in fruit ripening: trends and opportunities. *Biotechnol Adv*, **28**, 489-499.
- Marti, M.C., Camejo, D., Olmos, E., Sandalio, L.M., Fernandez-Garcia, N., Jimenez, A. and Sevilla, F.** (2009) Characterisation and changes in the antioxidant system of chloroplasts and chromoplasts isolated from green and mature pepper fruits. *Plant Biol (Stuttg)*, **11**, 613-624.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M.J., Provan, G. and Chesson, A.** (2002) Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**, 323-330.
- Maskin, L., Frankel, N., Gudesblat, G., Demergasso, M.J., Pietrasanta, L.I. and Iusem, N.D.** (2007) Dimerization and DNA-binding of ASR1, a small hydrophilic protein abundant in plant tissues suffering from water loss. *Biochem Biophys Res Commun*, **352**, 831-835.
- Morstadt, L., Graber, P., De Pascalis, L., Kleinig, H., Speth, V. and Beyer, P.** (2002) Chemiosmotic ATP synthesis in photosynthetically inactive chromoplasts from *Narcissus pseudonarcissus* L. linked to a redox pathway potentially also involved in carotene desaturation. *Planta*, **215**, 134-140.
- Nakatsuka, A., Murachi, S., Okunishi, H., Shiomi, S., Nakano, R., Kubo, Y. and Inaba, A.** (1998) Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol*, **118**, 1295-1305.
- Nath, P., Prabodh, T.K., Sane, V.A. and Sane, A.P.** (2006) *Role of Ethylene in Fruit Ripening* Berlin Heidelberg: Springer-Verlog.
- Nelson, B.K., Cai, X. and Nebenfuhr, A.** (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J*, **51**, 1126-1136.
- Olsson, M.G., Olofsson, T., Tapper, H. and Akerstrom, B.** (2008) The lipocalin alpha1-microglobulin protects erythroid K562 cells against oxidative damage induced by heme and reactive oxygen species. *Free Radic Res*, **42**, 725-736.
- Ott, D.B. and Lachance, P.A.** (1979) Retinoic acid--a review. *Am J Clin Nutr*, **32**, 2522-2531.
- Palozza, P., Parrone, N., Simone, R. and Catalano, A.** (2011) Role of lycopene in the control of ROS-mediated cell growth: implications in cancer prevention. *Curr Med Chem*, **18**, 1846-1860.
- Park, S.W., Liu, P.P., Forouhar, F., Vlot, A.C., Tong, L., Tietjen, K. and Klessig, D.F.** (2009) Use of a synthetic salicylic acid analog to investigate the roles of methyl salicylate and its esterases in plant disease resistance. *J Biol Chem*, **284**, 7307-7317.

- Parker, D., Martinez, C., Stanley, C., Simmons, J. and McIntyre, I.M.** (2004) The analysis of methyl salicylate and salicylic acid from Chinese herbal medicine ingestion. *J Anal Toxicol*, **28**, 214-216.
- Pear, J.R., Ridge, N., Rasmussen, R., Rose, R.E. and Houck, C.M.** (1989) Isolation and characterization of a fruit-specific cDNA and the corresponding genomic clone from tomato. *Plant Mol Biol*, **13**, 639-651.
- Peitsch, M.C. and Boguski, M.S.** (1990) Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein? *New Biol*, **2**, 197-206.
- Peltier, G. and Cournac, L.** (2002) Chlororespiration. *Annu Rev Plant Biol*, **53**, 523-550.
- Philipps, D.L., Wigglesworth, K., Hartford, S.A., Sun, F., Pattabiraman, S., Schimenti, K., Handel, M., Eppig, J.J. and Schimenti, J.C.** (2008) The dual bromodomain and WD repeat-containing mouse protein BRWD1 is required for normal spermiogenesis and the oocyte-embryo transition. *Dev Biol*, **317**, 72-82.
- Ponka, P.** (1999) Cell biology of heme. *Am J Med Sci*, **318**, 241-256.
- Ramos, V.C., Vidal-Taboada, J., Bergonon, S., Egeo, A., Fisher, E.M., Scartezzini, P. and Oliva, R.** (2002) Characterisation and expression analysis of the WDR9 gene, located in the Down critical region-2 of the human chromosome 21. *Biochim Biophys Acta*, **1577**, 377-383.
- Rao, A.V. and Rao, L.G.** (2007) Carotenoids and human health. *Pharmacol Res*, **55**, 207-216.
- Rao, A.V., Ray, M.R. and Rao, L.G.** (2006) Lycopene. *Adv Food Nutr Res*, **51**, 99-164.
- Rees, D.C. and Lipscomb, W.N.** (1980) Structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 4633-4637.
- Rivas-San Vicente, M. and Plasencia, J.** (2011) Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J Exp Bot*, **62**, 3321-3338.
- Rodríguez-Concepción, M. and Boronat, A.** (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol*, **130**, 1079-1089.
- Roger, H.** (2009) *Comparative Plant Virology*: Academic Press.
- Rohmer, M.** (2008) From molecular fossils of bacterial hopanoids to the formation of isoprene units: discovery and elucidation of the methylerythritol phosphate pathway. *Lipids*, **43**, 1095-1107.

- Rom, S., Gilad, A., Kalifa, Y., Konrad, Z., Karpasas, M.M., Goldgur, Y. and Bar-Zvi, D.** (2006) Mapping the DNA- and zinc-binding domains of ASR1 (abscisic acid stress ripening), an abiotic-stress regulated plant specific protein. *Biochimie*, **88**, 621-628.
- Sanchez, D., Ortega-Cubero, S., Akerstrom, B., Herrera, M., Bastiani, M.J. and Ganfornina, M.D.** (2008) Molecular interactions of the neuronal GPI-anchored lipocalin Lazarillo. *J Mol Recognit*, **21**, 313-323.
- Schneider, K.** (2005) Mapping Populations and Principles of Genetic Mapping. In *The Handbook of Plant Genome Mapping: Genetic and Physical Mapping* (Meksem, K. and Kahl, G. eds), pp. 7-11.
- Seymour, G., Poole, M., Manning, K. and King, G.J.** (2008) Genetics and epigenetics of fruit development and ripening. *Curr Opin Plant Biol*, **11**, 58-63.
- Shkolnik, D. and Bar-Zvi, D.** (2008) Tomato ASR1 abrogates the response to abscisic acid and glucose in Arabidopsis by competing with ABI4 for DNA binding. *Plant Biotechnol J*, **6**, 368-378.
- Simkin, A.J., Gaffe, J., Alcaraz, J.P., Carde, J.P., Bramley, P.M., Fraser, P.D. and Kuntz, M.** (2007) Fibrillin influence on plastid ultrastructure and pigment content in tomato fruit. *Phytochemistry*, **68**, 1545-1556.
- Sinclair, P.R., Gorman, N. and Jacobs, J.M.** (2001) Measurement of heme concentration. *Curr Protoc Toxicol*, **Chapter 8**, Unit 8 3.
- Šindelářová, M. and Šindelář, L.** (2005) Isolation of pathogenesis-related proteins from TMV-Infected tobacco and their influence on infectivity of TMV. *Plant Protect. Sci.*, **41**, 52-57.
- Sitja-Arnau, M., Molina, M.A., Blanco-Aparicio, C., Ferrer-Soler, L., Lorenzo, J., Aviles, F.X., Querol, E. and de Llorens, R.** (2005) Mechanism of action of potato carboxypeptidase inhibitor (PCI) as an EGF blocker. *Cancer Lett*, **226**, 169-184.
- Slaymaker, D.H., Navarre, D.A., Clark, D., del Pozo, O., Martin, G.B. and Klessig, D.F.** (2002) The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11640-11645.
- Srivastava, A. and Handa, A.K.** (2005) Hormonal regulation of fruit development: A Molecular perspective. *Journal of Plant Growth Regulation*, **24**, 67-82.
- Sudha, G.A. and Ravishankar, G.A.** (2003) Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens* Mill. *Cur. Sci.*, **85**, 1212-1217.
- Testerink, C. and Munnik, T.** (2011) Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *J Exp Bot*, **62**, 2349-2361.



- Thomson, W. and Whatley, J.** (1980) Development of nongreen plastids. *Ann Rev Plant Physiol*, **31**, 375-394.
- Tieman, D., Zeigler, M., Schmelz, E., Taylor, M.G., Rushing, S., Jones, J.B. and Klee, H.J.** (2010) Functional analysis of a tomato salicylic acid methyl transferase and its role in synthesis of the flavor volatile methyl salicylate. *Plant J*, **62**, 113-123.
- Tieman, D.M., Taylor, M.G., Ciardi, J.A. and Klee, H.J.** (2000) The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5663-5668.
- Tritsch, D., Hemmerlin, A., Bach, T.J. and Rohmer, M.** (2010) Plant isoprenoid biosynthesis via the MEP pathway: in vivo IPP/DMAPP ratio produced by (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase in tobacco BY-2 cell cultures. *FEBS Lett*, **584**, 129-134.
- Uribe, M.I.C., Mendez, B.L., Vicinay, F.J.C. and Barbero, J.J.** (2008) NMR solution structure of a new tomato peptide: Fruit-specific protein *To be Published*, **PDB: 2HLG**.
- Villanueva, J., Canals, F., Prat, S., Ludevid, D., Querol, E. and Aviles, F.X.** (1998) Characterization of the wound-induced metallocarboxypeptidase inhibitor from potato. cDNA sequence, induction of gene expression, subcellular immunolocalization and potential roles of the C-terminal propeptide. *FEBS Lett*, **440**, 175-182.
- Vishnevetsky, M., Ovadis, M. and Vainstein, A.** (1999) Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci*, **4**, 232-235.
- Vlot, A.C., Liu, P.P., Cameron, R.K., Park, S.W., Yang, Y., Kumar, D., Zhou, F., Padukkavidana, T., Gustafsson, C., Pichersky, E. and Klessig, D.F.** (2008) Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **56**, 445-456.
- Voutilainen, S., Nurmi, T., Mursu, J. and Rissanen, T.H.** (2006) Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr*, **83**, 1265-1271.
- Westphal, S., Soll, J. and Vothknecht, U.C.** (2003) Evolution of chloroplast vesicle transport. *Plant Cell Physiol*, **44**, 217-222.
- Wilson, C.G., Magliery, T.J. and Regan, L.** (2004) Detecting protein-protein interactions with GFP-fragment reassembly. *Nat Methods*, **1**, 255-262.
- Wong, I.Y., Koo, S.C. and Chan, C.W.** (2011) Prevention of age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol*, **31**, 73-82.
- Xu, C. and Min, J.** (2011) Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein Cell*, **2**, 202-214.

- Ytterberg, A.J., Peltier, J.B. and van Wijk, K.J.** (2006) Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiol*, **140**, 984-997.
- Zagalsky, P.F.** (2003) beta-Crustacyanin, the blue-purple carotenoprotein of lobster carapace: consideration of the bathochromic shift of the protein-bound astaxanthin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **59**, 1529-1531.
- Zbierzak, A.M., Kanwischer, M., Wille, C., Vidi, P.A., Giavalisco, P., Lohmann, A., Briesen, I., Porfirova, S., Brehelin, C., Kessler, F. and Dormann, P.** (2010) Intersection of the tocopherol and plastoquinol metabolic pathways at the plastoglobule. *Biochem J*, **425**, 389-399.
- Zhang, M., Yuan, B. and Leng, P.** (2009) The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *J Exp Bot*, **60**, 1579-1588.
- Zhao, J., Guo, Y., Kosaihira, A. and Sakai, K.** (2004) Rapid accumulation and metabolism of polyphosphoinositol and its possible role in phytoalexin biosynthesis in yeast elicitor-treated *Cupressus lusitanica* cell cultures. *Planta*, **219**, 121-131.
- Zhao, N., Guan, J., Forouhar, F., Tschaplinski, T.J., Cheng, Z.M., Tong, L. and Chen, F.** (2009) Two poplar methyl salicylate esterases display comparable biochemical properties but divergent expression patterns. *Phytochemistry*, **70**, 32-39.
- Zhou, J.R., Gugger, E.T. and Erdman, J.W.** (1994) Isolation and Partial Characterization of an 18 kDa Carotenoid-Protein Complex from Carrot Roots. **42**, 2386 - 2390.
- Zoppellaro, G., Bren, K.L., Ensign, A.A., Harbitz, E., Kaur, R., Hersleth, H.P., Ryde, U., Hederstedt, L. and Andersson, K.K.** (2009) Review: studies of ferric heme proteins with highly anisotropic/highly axial low spin ( $S = 1/2$ ) electron paramagnetic resonance signals with bis-histidine and histidine-methionine axial iron coordination. *Biopolymers*, **91**, 1064-1082.
- Zou, C., Lehti-Shiu, M.D., Thomashow, M. and Shiu, S.H.** (2009) Evolution of stress-regulated gene expression in duplicate genes of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics*, **5**, e1000581. Epub 1002009 Jul 1000531.



# **Annex**

## **Annex: Gens diferencialment expressats en els arrays de les Alt contingut de carotenoides (HC) respecte baix (LP).**

Codi de colors, per a els gens diferencialment expressats X vegades

>9	8,00 a 7,01	7,00 a 5,01	5,00 a 3,01	2,99 a 2,50	2,49 a -2,49	-2,50 a -2,99	-3,01 a -5,00	-5,01 a -7,00	-7,01-8,00	<-9
----	-------------	-------------	-------------	-------------	--------------	---------------	---------------	---------------	------------	-----

HC1 vs LC1	HC1 vs LC2	HC1 vs LC3	HC2 vs LC1	HC2 vs LC2	HC2 vs LC3	HC3 vs LC1	HC3 vs LC2	HC3 vs LC3	HC4 vs LC1	HC4 vs LC2	HC4 vs LC3	Anotació
-3,0	-4,2	-2,8	-3,0	-4,2	-2,8	-4,1	-5,3	-3,9	-3,6	-4,8	-3,4	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-3,8	-4,5	-5,5	-3,4	-4,2	-5,2	-4,1	-4,8	-5,8	-4,0	-4,7	-5,7	Salicylic acid-binding protein 2 [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
-1,7	-3,8	-4,3	-4,3	-6,4	-6,9	-1,5	-3,6	-4,1	-2,8	-4,9	-5,4	Expansin-related protein 1-like [ <i>Oryza sativa</i> ]
-2,9	-3,3	-3,5	-2,7	-3,2	-3,3	-2,7	-3,2	-3,3	0,3	-0,2	-0,4	Proline synthetase associated protein -related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-4,3	-3,7	-4,0	-3,8	-3,1	-3,4	-3,7	-3,1	-3,4	-1,8	-1,1	-1,5	Putative Homology: p53
-7,4	-5,9	-7,6	-7,4	-6,0	-7,6	-4,6	-3,1	-4,8				Expressed protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,7	-5,4	-4,9	2,7	-3,4	-2,8	3,3	-2,9	-2,3	3,3	-2,8	-2,3	Clathrin coat assembly protein -related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-3,2	-3,0	-3,7	-2,6	-2,3	-3,1	-1,1	-0,9	-1,6	-3,4	-3,1	-3,9	Unknown
-3,3	-4,3	-2,3	-5,1	-6,0	-4,1	-1,3	-2,3	-0,4	-5,9	-6,8	-4,9	AT5g02160 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ], Expressed protein
1,7	4,6	2,8	2,1	5,0	3,2	2,8	5,8	3,9	0,2	3,1	1,3	Putative Homology: "ripening-related protein, DDTFR18"

3,6		2,6	5,3		4,3	4,6		3,6	3,8		2,7	m03745 tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein
4,5	5,7	-0,9	4,3	5,5	-1,1	1,6	2,8	-3,8	6,0	7,1	0,6	Ribulose biphosphate carboxylase small chain 2A, chloroplast
-0,6	-4,9	-2,9	-0,6	-4,9	-2,9	-0,6	-5,0	-2,9	-0,5	-4,8	-2,8	Xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase XTH9
-0,3	-5,7	-6,1	1,4	-4,1	-4,5	0,8	-4,6	-5,0	0,5	-5,0	-5,4	Insulina degrading enzyme [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
4,1	-0,8	4,2	1,7	-3,2	1,8	7,4	2,6	7,6	5,9	1,0	6,1	Putative Homology: inositol-1-phosphate synthase
0,8	-3,2	-1,6	-1,6	-5,7	-4,0	-0,1	-4,2	-2,5	-3,6	-7,6	-6,0	GAST1 protein precursor
-0,9	-3,4	-1,9	-1,0	-3,6	-2,1	-2,6	-5,2	-3,7	-2,9	-5,5	-4,0	RGC2 resistance protein K [ <i>Lactuca serriola</i> ]
0,9	-0,1	0,4	3,6	2,6	3,0	4,1	3,1	3,5	3,4	2,4	2,8	Esterase/lipase/thioesterase family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
1,1	2,0	0,4	3,8	4,7	3,1	4,2	5,1	3,5	2,8	3,7	2,1	Esterase/lipase/thioesterase family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,8	-3,1	3,1	0,4	-3,5	2,8	0,7	-3,2	3,1	1,7	-2,3	4,0	Expressed protein
-7,5	-3,2	1,1	-6,9	-2,6	1,7	-4,9	-0,6	3,8	-6,4	-2,1	2,2	AT-hook DNA-binding protein -related
2,7	-3,8	-1,7	2,8	-3,7	-1,6	0,6	-5,8	-3,8	4,1	-2,4	-0,4	Small heat shock protein, chloroplast precursor
0,3	-3,0	-2,9	0,2	-3,1	-3,0	-0,1	-3,4	-3,3	0,7	-2,6	-2,5	Diacylglycerol kinase (EC 2.7.1.107) ATDGK1 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
3,6	3,9	-2,2	3,6	3,8	-2,2	4,3	4,5	-1,5	1,8	2,0	-4,0	Putative Homology: "protease; cysteine protease, cathepsin B-like"
1,2	4,2	-2,8	-0,5	2,5	-4,5	0,1	3,1	-3,9	-1,4	1,6	-5,4	Cytochrome P450, putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,5	5,1	-3,3	-1,2	4,5	-3,9	0,5	6,1	-2,2	-1,0	4,7	-3,7	Putative Homology: "transcription factor, bZIP, BZI-2"
1,0	-4,7	-3,0	-2,5	-8,2	-6,5	1,7	-4,1	-2,3	-1,7	-7,5	-5,7	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative similar to 2A6
0,2	3,4	5,8	-1,8	1,3	3,7	-0,6	2,6	5,0	-2,6	0,6	3,0	Putative Homology: "kinase, receptor kinase, S-receptor kinase"
2,9	-2,8	-1,5	2,4	-3,3	-1,9	0,6	-5,1	-3,7	2,9	-2,8	-1,4	Calmodulin-like protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,8	-3,6	-2,8	0,2	-2,6	-1,8	-1,5	-4,3	-3,5	-2,0	-4,8	-4,0	m04208 proline oxidase, mitochondrial precursor
0,0	-7,3	-4,3	2,3	-5,1	-2,1	1,8	-5,6	-2,6	-0,1	-7,4	-4,4	Putative Homology: keratin
-3,0		-4,1	-1,8		-3,0	-3,9		-5,0	-3,8		-4,9	T16995 probable cinnamyl-alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.195) [ <i>Malus domestica</i> ]
1,9	-5,2	-4,0	5,3	-1,8	-0,5	-0,9	-8,0	-6,7	-0,2	-7,3	-6,0	4 hypothetical protein predicted protein, [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-1,6	-4,0	-2,3	-2,6	-5,0	-3,2	-2,9	-5,3	-3,5	0,2	-2,2	-0,4	Putative Homology: glucosyl transferase
1,2	3,2	1,7	2,9	4,9	3,4	-0,7	1,3	-0,2	3,0	5,0	3,5	Expressed protein
2,9		2,5	3,6		3,2	3,2		2,8	4,3		3,9	Putative 7-transmembrane G-protein-coupled receptor [ <i>Solanum chacoense</i> ]
4,7	-1,2	2,0	2,6	-3,3	-0,1	-1,1	-7,0	-3,8	5,3	-0,5	2,7	Putative holology: DEAD/DEAH box helicase carpel factory-related similar to RNA helicase
0,8	-3,3	-2,1	-0,1	-4,1	-2,9	-2,0	-6,0	-4,8	-2,0	-6,0	-4,8	Hypothetical protein // protein with similarity to RCD1 but without the WWE domain

-2,1	-2,8	0,0	-3,9	-4,5	-1,8	-2,1	-2,7	0,1	-6,1	-6,7	-4,0	Putative Homology: "methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, MTD1"
-1,1	-2,2	5,0	-1,3	-2,4	4,8	-3,0	-4,0	3,1	-4,4	-5,5	1,7	PEA 18.1 KD CLASS I HEAT SHOCK PROTEIN (HSP)
-5,3	-5,1	-8,4	-4,2	-4,0	-7,4							Salicylic acid-binding protein 2 [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
-4,8	-7,0	-5,7	-1,4	-3,6	-2,3	-2,3	-4,4	-3,1	0,4	-1,8	-0,5	Transcription factor jumonji (jmiC) domain-containing protein
-2,6	-2,9	-2,7	-0,2	-0,4	-0,2	-2,5	-2,8	-2,6	-1,9	-2,2	-2,0	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta-subunit; PheHB -related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
5,2		-4,5	6,3		-3,4	4,3		-5,4				Putative Homology: arbutin synthase
3,1	1,2	4,0	3,2	1,4	4,2	2,0	0,2	3,0	-0,7	-2,6	0,3	Unknown
0,0	-2,9	-4,3	-1,3	-4,1	-5,6	4,3	1,4	0,0	1,0	-1,8	-3,3	Unknown
2,7	4,7	-0,7	2,8	4,8	-0,6	1,6	3,6	-1,8	-1,3	0,8	-4,7	Putative Homology: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
-4,3		-8,9	-3,3		-7,9	-0,3		-4,9	-1,4		-6,0	CB23_LYCES Chlorophyll A-B binding protein 13, chloroplast precursor
2,7	-3,7		3,5	-2,9		4,3	-2,1		5,4	-1,0		Early light inducible protein [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
-5,4	-6,1	-1,8	-6,0	-6,7	-2,4				-3,7	-4,3	0,0	Lectin [ <i>Glycine max</i> ]
-2,5	-4,1	-4,5	-1,5	-3,1	-3,5	-0,4	-1,9	-2,4	-2,0	-3,6	-4,0	Copper-binding protein family similar to copper homeostasis
3,6	4,7	0,2	2,5	3,6	-1,0	3,6	4,6	0,1	1,7	2,8	-1,7	Mitochondrial carrier protein family similar to peroxisomal Ca-dependent transport
-4,2	4,0		-5,8	2,4		-4,2	4,0		-9,2	-0,9		Similar to PREDICTED: metalloendopeptidase/ protein binding; similar to S2P [ <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> ]
-3,6	-5,9	-1,5	-1,2	-3,4	1,0	-1,6	-3,8	0,6	-2,6	-4,8	-0,5	Tonoplast intrinsic protein, alpha (alpha-TIP) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-3,8	-4,9	-1,2	-1,7	-2,8	0,9	-0,1	-1,2	2,5	-4,3	-5,4	-1,7	Cytochrome P450 family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-1,4	-5,4	-3,7	-0,2	-4,1	-2,5	0,6	-3,4	-1,7	-0,5	-4,4	-2,8	Putative cytochrome P450 [ <i>Populus x canescens</i> ]
-0,2	-3,4	-2,9	1,5	-1,8	-1,3	-0,2	-3,5	-2,9	-0,4	-3,7	-3,2	CONSTANS B-box zinc finger family protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,7	2,5	1,9	0,3	3,5	2,9	0,0	3,3	2,7	-0,4	2,9	2,3	Expressed protein hypothetical protein
3,9	2,0	-1,5	4,5	2,6	-0,9	4,7	2,7	-0,7	3,4	1,5	-2,0	Cytochrome P450, putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
1,7	3,2	-2,2	2,5	4,0	-1,3	1,3	2,8	-2,6	0,9	2,4	-3,0	C2 domain-containing protein similar to cold-regulated gene SRC2 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
1,7	-2,9	1,8	3,0	-1,6	3,1	1,2	-3,3	1,4	3,1	-1,5	3,2	RNA recognition motif (RRM)-containing protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
2,1		2,6	-9,1		-8,6	2,4		2,9	-3,0		-2,6	Delta12 fatty acid desaturase (EC 1.14.99.-) // omega-6 fatty acid desaturase, endoplasmic reticulum
-1,2		-3,2	-3,3		-5,3	-1,6		-3,5	-5,9		-7,9	Nitrate transporter NRT1-2 [ <i>Glycine max</i> ]
0,0	-4,3	0,3	-0,8	-5,1	-0,6	-3,1	-7,4	-2,8	-0,6	-4,9	-0,4	T17461 disease resistance protein D [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
1,3	-2,8	0,4	-0,2	-4,3	-1,1	-3,0	-7,1	-3,9	-0,5	-4,6	-1,4	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family

-3,5	-2,4	-2,0	-3,6	-2,5	-2,1	-4,8	-3,7	-3,4	-3,1	-2,0	-1,6	No apical meristem (NAM) protein family
1,7	0,2	5,6	1,5	0,0	5,4	3,0	1,5	6,9	2,8	1,3	6,7	DnaJ protein family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
4,1		0,4	2,8		-0,9	7,1		3,4	8,1		4,4	Receptor-like kinase Xa21-binding protein 3 [ <i>Oryza sativa</i> ] //RING zinc finger ankyrin protein -related
1,1	-2,7	2,4	0,9	-2,8	2,2	4,0	0,2	5,3	2,9	-0,8	4,2	Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family
0,7	-2,9	-0,1	0,9	-2,6	0,2	4,2	0,6	3,4	3,7	0,2	3,0	Expressed protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-2,4	-4,2	-0,9	1,9	0,2	3,5	-2,7	-4,4	-1,1	-2,8	-4,5	-1,2	Copper-binding protein family similar to copper homeostasis factor
0,5	-3,1	-1,8	0,7	-2,9	-1,6	-0,7	-4,3	-3,0	-1,9	-5,5	-4,2	Enolase -related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,6	3,5	0,1	1,9	4,7	1,3	1,6	4,4	1,0	3,9	6,7	3,3	Inner membrane protein PPF-1, chloroplast precursor
-0,3	6,5	0,0	0,7	7,5	1,0	1,7	8,4	2,0	2,6	9,3	2,9	FENR_TOBAC Ferredoxin--NADP reductase, leaf-type isozyme, chloroplast precursor
1,1	8,9	-1,2	1,2	9,1	-1,0	2,2	10,0	-0,1	-3,0	4,9	-5,2	Pseudo-response regulator APRRI (TOC1) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-2,9	0,6	-1,4	0,7	4,2	2,3	0,3	3,8	1,8	-7,0	-3,5	-5,4	m08592 glyoxalase family protein (lactoylglutathione lyase family protein)
-5,7	-2,1	-1,3				-8,4	-4,8	-4,0	-1,0	2,6	3,4	Serine carboxypeptidase -related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,4	0,4	0,3	-4,3	-4,2	-4,3	-4,3	-4,3	-4,4				Dof zinc finger protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-1,9	-1,4	-1,5	-3,4	-2,9	-3,0	-0,4	0,2	0,1	-3,7	-3,1	-3,2	Hypothetical protein [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
0,0	0,4	-0,6	-3,0	-2,6	-3,6				-4,3	-3,8	-4,9	AP2 domain transcription factor RAP2, putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
1,9	1,4	-0,9	3,9	3,3	1,0	3,9	3,3	1,0	4,0	3,4	1,1	Chitinase (EC 3.2.1.14) class II precursor - [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
0,9	2,4	-2,5	3,5	5,0	0,1	3,8	5,4	0,4	3,5	5,0	0,1	Transmembrane protein [ <i>Solanum tuberosum</i> ]
0,0	-2,0	-1,9	-1,6	-3,5	-3,5	-1,7	-3,6	-3,6	-1,9	-3,8	-3,8	Glutamate decarboxylase [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
			-5,5	-7,6		-5,0	-7,1		-6,4	-8,5		B12D protein [ <i>Ipomoea batatas</i> ]
-1,4	-1,2	-1,2	-1,1	-1,0	-0,9	-2,8	-2,6	-2,6	-2,9	-2,7	-2,7	Aldehyde dehydrogenase 1 precursor [ <i>Lotus corniculatus</i> ]
-4,7	-4,5	-5,2	-2,5	-2,4	-3,0	-1,7	-1,6	-2,3	0,8	1,0	0,3	Putative receptor-like serine-threonine protein kinase [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
-3,2	-4,2	-1,1	-2,9	-3,9	-0,9	0,7	-0,3	2,8	-0,5	-1,5	1,6	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase
-0,6	-4,5	2,7	0,3	-3,5	3,7	-1,1	-5,0	2,3				Pectinesterase family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
4,0		-4,1	3,5		-4,6	6,8		-1,3				Tryptophan/tyrosine permease family protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-2,6		-4,2	-3,6		-5,3	-1,3		-3,0				Putative coat protein COP [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
-1,4	-3,6	-4,3	-1,5	-3,8	-4,4	2,1	-0,2	-0,8	0,2	-2,1	-2,7	S00443 chlorophyll a/b-binding protein type I precursor (cab-6A) - [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
-2,4	-6,0	-3,9	-0,9	-4,5	-2,4	-2,3	-5,8	-3,8				Gamma-thionin [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
-0,2	-4,1	-2,9	0,7	-3,3	-2,0	-1,7	-5,6	-4,3				Putative Homology: "glutathione-S-transferase/peroxidase"



-3,9	-6,1		-2,1	-4,2		-2,7	-4,9					Putative Homology: "galactosidase, beta-galactosidase "
-3,2	-6,7		-0,3	-3,8		-2,9	-6,4					Expressed protein dihydrofolate reductase - [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]
-2,8	-5,9		-2,0	-5,1		-3,9	-7,0					T09745 myb-related protein [ <i>Gossypium hirsutum</i> ]
-2,6	-3,2	0,4	-1,6	-2,2	1,4	-2,6	-3,2	0,3	-2,3	-2,9	0,7	Esterase/lipase/thioesterase family protein; similar to hydrolase, alpha/beta fold family protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
2,7	3,2	0,3	1,9	2,4	-0,5	-1,4	-0,9	-3,8	3,4	3,9	1,0	Xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase XTH3 [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
-3,9	-1,1	-3,1	-0,7	2,0	0,1	0,6	3,3	1,4	-4,8	-2,1	-4,1	PHD finger transcription factor, putative
-2,7	-3,4	-2,3	-0,8	-1,4	-0,3	-0,1	-0,7	0,4	-4,9	-5,5	-4,4	Aux/IAA protein [ <i>Populus tremula x Populus tremuloides</i> ]
-1,9	-3,6	-3,1	1,6	-0,1	0,3	2,3	0,6	1,0	-4,0	-5,7	-5,3	Putative Homology: aldehyde dehydrogenase
	-2,7	-2,3		-4,8	-4,4		-5,0	-4,6		-1,8	-1,4	Putative gamma TIP [ <i>Nicotiana glauca</i> ]
-2,6		-1,2	-4,7		-3,3	-4,2		-2,7				P-rich protein EIG-I30 [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
-1,6		-3,6	-4,3		-6,2	-2,6		-4,6				Nitrate transporter NRT1-1 [ <i>Glycine max</i> ]
6,7		-1,6	3,8		-4,4	3,3		-5,0				Putative Homology: "transcription factor, AP2"
-2,2	-5,3		-3,8	-6,9		-2,8	-5,9					Xyloglucan endotransglycosylase LeXET2 [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
-2,4	-5,4	0,5	-0,2	-3,2	2,7	-0,7	-3,7	2,2	-1,0	-4,0	1,9	Putative Homology: "aldehyde decarboxylase, CER1"
0,3	-4,1	0,3	2,5	-1,8	2,5	0,2	-4,2	0,2	1,3	-3,0	1,3	Decoy [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,7	-3,5	2,4	-0,3	-3,2	2,8	-0,8	-3,6	2,3	-2,4	-5,3	0,7	Expressed protein
0,4	4,3	-0,8	-3,1	0,7	-4,3	1,1	5,0	0,0	0,2	4,1	-1,0	Putative Homology: epoxide hydrolase
2,1	5,4	-1,1	0,6	3,9	-2,6	1,5	4,9	-1,6	1,0	4,3	-2,2	Putative cytochrome P450 [ <i>Oryza sativa</i> ]
-0,8		-4,8	-3,9		-7,9	3,6		-0,3	1,2		-2,8	Chlorophyll a/b binding protein CP24 10A
-0,3	-5,6		2,7	-2,6		0,6	-4,7		2,2	-3,1		Integral membrane HPP family protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-2,4		-4,1	-2,9		-4,7	-0,7		-2,4	-2,8		-4,6	Unknown
1,6	3,7	1,9	1,8	4,0	2,1	2,6	4,8	2,9	-0,1	2,0	0,2	Putative Homology: "ripening-related protein, DDTFR18"
-0,8	-4,9	0,0	-0,4	-4,5	0,4	-2,8	-6,9	-2,0	1,2	-2,9	2,0	Unknown
-0,7	5,7	1,1	-0,7	5,7	1,1	-7,1	-0,7	-5,3	-0,8	5,6	1,0	Unknown
0,4	-5,9	-1,0	0,5	-5,9	-1,0	4,9	-1,5	3,4	0,7	-5,7	-0,8	Lipase-like protein [ <i>Oryza sativa</i> ]
-1,1	-3,6	-0,5	-0,7	-3,2	-0,1	-2,8	-5,3	-2,2	-1,4	-3,9	-0,8	Unknown
3,6	-1,3	-0,6	3,0	-1,9	-1,2	0,5	-4,4	-3,7	3,4	-1,5	-0,8	Hsp20.1 protein [ <i>Lycopersicon peruvianum</i> ]
3,3	-0,8	-0,8	2,8	-1,2	-1,2	0,1	-3,9	-3,9	3,0	-1,0	-1,0	myb DNA-binding protein (MYB17) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]

	-0,6	-6,3		4,2	-1,5		2,9	-2,9		4,1	-1,6	Putative glutathione S-transferase T3 [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
-2,5		-1,7	2,4		3,2	-7,0		-6,3	-2,5		-1,8	Putative cytochrome P450 [ <i>Oryza sativa</i> ]
-0,1	-3,5	-0,5	-0,1	-3,5	-0,5	-2,4	-5,8	-2,8	-1,6	-5,0	-2,0	Expressed protein
-1,4	-3,0		-2,3	-3,8		-3,0	-4,6		-1,5	-3,1		Putative Homology: heat shock protein
1,2		5,1	0,6		4,4	0,6		4,4	3,1		6,9	m01277 chloroplast lumen pentapeptide protein, putative
-2,8	-0,8	0,6	-3,2	-1,1	0,2	-2,8	-0,8	0,5	1,2	3,2	4,5	putative chloroplast thiazole biosynthetic protein [ <i>Nicotiana tabacum</i> ] // abc transporter
-3,6	1,5	-1,0	-2,8	2,3	-0,2	-2,1	3,0	0,5	0,4	5,4	3,0	Putative Homology: "sterol C-methyltransferase, 24-sterol C-methyltransferase"
0,4	2,5	0,6	1,2	3,4	1,4	1,9	4,0	2,0	2,5	4,6	2,6	Unknown
-1,8	-0,8	3,4	-3,3	-2,3	1,8	-1,4	-0,4	3,7	-2,5	-1,5	2,6	Oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
1,4	2,6	-0,3	1,7	2,9	0,0	1,3	2,5	-0,4	2,7	4,0	1,1	AtMinE protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,1	-0,5	2,8	0,7	0,2	3,5	0,6	0,1	3,4	-3,2	-3,7	-0,5	putative non-specific lipid transfer protein StnsLTP [ <i>Solanum tuberosum</i> ]
0,0	0,0	3,6	-0,3	-0,3	3,3	-0,7	-0,6	3,0	-4,9	-4,9	-1,3	Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase [ <i>Petunia x hybrida</i> ]
-0,1	0,7	3,0	0,3	1,1	3,3	0,1	1,0	3,2	-4,4	-3,6	-1,4	Putative beta-ketoacyl-CoA synthase [ <i>Antirrhinum majus</i> ]
5,5		-1,2	4,6		-2,1	1,6		-5,1	4,2		-2,5	Papain-like cysteine proteinase isoform I [ <i>Ipomoea batatas</i> ]
-0,1	-3,8	-1,5	0,6	-3,2	-0,9	-0,7	-4,5	-2,2	-1,1	-4,8	-2,6	Expressed protein similar to hypothetical protein GB:AAF24564
-0,8	3,5	0,1	-1,0	3,3	-0,1	-0,5	3,8	0,4	-4,5	-0,2	-3,6	myb family transcription factor [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-3,7		-2,2	-3,2		-1,7	-3,3		-1,8	-5,3		-3,7	Putative acetyl-CoA C-acyltransferase [ <i>Oryza sativa</i> ]
0,4	4,4	-1,0	-0,6	3,5	-2,0	-0,3	3,7	-1,7	-2,6	1,4	-4,0	Glycosyltransferase 10 [ <i>Ipomoea trifida</i> ]
-1,4		-4,4	-0,6		-3,6	-0,7		-3,7	-4,2		-7,1	Unknown
-1,1	-3,4	-0,7	1,5	-0,8	1,9	-1,2	-3,4	-0,7	-3,8	-6,0	-3,3	Hypothetical protein [ <i>Linum usitatissimum</i> ]
1,0	2,5	3,7	-1,2	0,3	1,5	0,8	2,4	3,6	-9,7	-8,2	-7,0	Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase nearly identical to GI:2960356
-2,1	1,3	0,2	0,7	4,2	3,0	1,3	4,7	3,6	-0,8	2,7	1,5	Putative Homology: UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase
1,5	0,7	-1,2	3,7	2,9	1,0	2,7	1,9	0,0	4,6	3,7	1,8	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPS1)(farnesyltranstransferase)
-1,0	1,9	-1,9	-2,8	0,1	-3,7	-2,1	0,8	-3,0	-4,2	-1,3	-5,1	Unknown
-2,3	-1,8	-0,2	-3,5	-3,0	-1,4	-1,0	-0,5	1,1	-5,6	-5,1	-3,5	Senescence-associated protein -related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-1,8	-1,0	0,4	-3,8	-2,9	-1,6	-2,5	-1,6	-0,3	-5,8	-4,9	-3,6	P-rich protein EIG-I30 [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
0,8	1,8	-1,3	1,6	2,6	-0,5	2,5	3,5	0,4	3,1	4,1	1,0	Transaldolase ToTAL2 [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
-0,2	-1,3	-1,0	-1,3	-2,3	-2,1	-2,9	-4,0	-3,7	-1,8	-2,8	-2,6	Putative Homology: glutamate permease

0,2	2,2	-1,3	-0,7	1,4	-2,1	-3,3	-1,2	-4,7	-5,0	-2,9	-6,4	Pepper esterase [ <i>Capsicum annuum</i> ]
-1,4	-3,1	-3,0	-1,6	-3,3	-3,2	0,2	-1,5	-1,4	2,3	0,6	0,7	mrp protein -related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-3,4		-4,1	-3,0		-3,7	0,1		-0,6	0,3		-0,4	m05349 chlorophyll a/b binding protein harvesting-organelle specific CAO
-3,3		-3,6	-4,9		-5,2				-0,8		-1,2	Putative protein kinase Xa21 [ <i>Oryza sativa</i> ] // leucine-rich repeat transmembrane protein kinase
-2,5	-3,2		-2,6	-3,3		-0,6	-1,3		-1,4	-2,1		Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family
2,8	1,6	3,7	2,6	1,4	3,5	0,8	-0,5	1,7				Unknown
-2,9		-2,9	-5,2		-5,2	-1,1		-1,1				Putative translation transactivator/inclusion body protein [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
	-3,3	-2,8		-3,5	-3,0							Disease resistance response protein-related/ dirigent protein protein-related
-1,7	-5,0	-3,8	-2,3	-5,6	-4,5							Cyclic nucleotide-regulated ion channel, putative (CNGC18) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-2,6		-3,8	-4,3		-5,5							Transcription factor [ <i>Vicia faba</i> ]
-2,9	-2,9	-1,5	-1,3	-1,3	0,1	-2,9	-2,9	-1,5	-1,1	-1,1	0,4	Acetyl-coA dehydrogenase -related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
	-3,2	-2,9		-1,1	-0,8		-3,5	-3,2		-0,5	-0,2	Carbonate dehydratase - like protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
3,9	3,5	1,7	2,2	1,8	-0,1	3,8	3,5	1,6	1,8	1,4	-0,4	Acidic 26 kDa endochitinase precursor
-0,6	-2,9	-2,5	0,9	-1,4	-1,1	-1,1	-3,3	-3,0	0,7	-1,5	-1,2	Calcium binding protein [ <i>Sesbania rostrata</i> ]
-2,7	-3,0	-1,0	-0,2	-0,5	1,6	2,8	2,5	4,5				Phytochrome A signal transduction 1 (PAT1)
3,7	-3,3	-1,0				3,0	-4,0	-1,7				Ca <sup>2+</sup> -binding EF-hand common family protein, putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-5,7	-1,9	-4,1	-2,1	1,7	-0,5	-2,0	1,8	-0,4	-4,1	-0,4	-2,6	Outer membrane lipo protein - like //embryo abundance protein (EMB20) -related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,3	-2,6	-3,7							0,3	-2,7	-3,8	Auxin-induced beta-glucosidase [ <i>Chenopodium rubrum</i> ]
0,9		-3,5	-3,5		-7,8	1,4		-2,9				NAD(P)H:quinone oxidoreductase [ <i>Solanum tuberosum</i> ]
-1,4		-4,6	-3,5		-6,8	-2,0		-5,2				Glutaminy-peptide cyclotransferase (EC 2.3.2.5) precursor [ <i>Carica papaya</i> ]
-1,7	-4,2		-2,8	-5,3		-2,1	-4,5					Putative Homology: pyruvate kinase
0,3	-2,8	-2,0	0,5	-2,6	-1,8	-1,0	-4,1	-3,3	2,1	-0,9	-0,1	3-dehydroquinate dehydratase / shikimate dehydrogenase isoform 2 [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
-1,9	-3,6	-2,4	-1,7	-3,4	-2,2	-2,4	-4,2	-2,9	-0,1	-1,9	-0,6	SH3 domain-containing protein 3 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
5,6	1,0	2,1	1,4	-3,2	-2,1	-1,3	-5,9	-4,8				Putative Homology: "glutathione-S-transferase, pathogenesis-related"
5,9	-0,5		5,7	-0,7		3,9	-2,5					Unknown
-1,7	4,2	1,1	-1,6	4,3	1,1	-0,3	5,7	2,5	-0,9	5,0	1,9	bZIP protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
5,8	-2,5	-0,9	6,2	-2,1	-0,5	6,6	-1,7	-0,1	6,2	-2,1	-0,6	Putative Homology: malonyl CoA:anthocyanin 5-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase

0,7	6,5	0,3	0,4	6,2	0,0	0,2	6,1	-0,1	-2,2	3,7	-2,5	Probable protein kinase [imported] - [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,4	-3,4	-0,9	-1,4	-4,4	-1,9	2,0	-1,0	1,5	3,0	0,1	2,6	Transketolase, chloroplast precursor (TK)
-1,9	-2,7	0,0	-1,7	-2,5	0,2	-0,1	-1,0	1,7	-2,8	-3,6	-0,9	OSJNBa0093F12.14 [ <i>Oryza sativa</i> ]
-1,2	-2,8	0,0	-1,4	-3,1	-0,3	0,3	-1,4	1,5	-3,0	-4,6	-1,8	Expressed protein
-3,0	-0,8	-2,3	-2,7	-0,5	-2,0	-1,1	1,1	-0,5	-4,6	-2,4	-3,9	Putative dehydration responsive element binding protein 2D
-1,5		-2,7	-1,7		-2,9				-3,0		-4,2	F-box protein family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,6	-3,4	-0,1	0,5	-2,3	1,0	-3,0	-5,7	-2,5	-0,6	-3,3	-0,1	Histone H3 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
2,2	-2,3	-3,1				1,6	-2,9	-3,6	3,7	-0,8	-1,6	Expressed protein
-1,9	-2,5		-0,9	-1,5		-3,4	-4,1		-2,1	-2,7		Putative myosin heavy chain-like protein [ <i>Solanum demissum</i> ]
2,8	2,1	0,5	1,5	0,9	-0,7	2,9	2,3	0,7	3,2	2,6	1,0	Calcium-binding protein [ <i>Lotus corniculatus</i> var. <i>japonicus</i> ]
-0,6	0,5	-3,8				2,1	3,2	-1,1	4,0	5,0	0,8	Putative Homology: "aldolase, plastidic aldolase"
0,3	0,1	3,2	-1,0	-1,2	2,0	-0,3	-0,5	2,6	-2,9	-3,1	0,1	Unknown
-2,0	-2,8	-0,1	0,0	-0,8	1,9	-2,1	-2,8	-0,2	-3,9	-4,7	-2,0	Flavonol synthase (FLS)
1,5	3,3	1,4	0,4	2,3	0,4	0,5	2,4	0,5	2,6	4,4	2,5	Expressed protein
-0,8	-0,9	0,3	-3,5	-3,6	-2,5	-2,8	-2,9	-1,7	-1,7	-1,8	-0,6	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative domain
			6,5	-2,6	1,1	6,3	-2,7	0,9				Unknown
2,0	-1,5	-1,6	0,5	-3,0	-3,1	1,0	-2,5	-2,6	3,4	-0,1	-0,2	Methionine S-methyltransferase [ <i>Wollastonia biflora</i> ]
1,5		-1,7	-2,7		-5,9	-1,5		-4,7	0,1		-3,1	Putative Myb-like DNA-binding protein [ <i>Solanum demissum</i> ]
2,0	-1,7	-1,0	0,0	-3,6	-3,0	2,1	-1,6	-0,9	-1,3	-4,9	-4,3	Aldo/keto reductase family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,1	-0,9	1,4	1,2	0,2	2,5	-3,8	-4,8	-2,6	0,6	-0,4	1,9	Expressed protein
2,3		1,3	2,6		1,5	3,8		2,7	3,5		2,4	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (3-PGDH), putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
			6,8		-0,9	3,4		-4,3	7,6		-0,1	Actin related protein -related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,8	-2,0	0,6	-1,7	-2,9	-0,4	-2,7	-4,0	-1,4	-2,2	-3,4	-0,9	Putative Homology: "glucan hydrolase, beta-D-glucan exohydrolase"
1,7		-0,7	4,1		1,7	3,3		0,8	5,1		2,7	Expressed protein
1,7	-0,9	-1,1	4,1	1,5	1,4	3,2	0,6	0,4	5,1	2,5	2,4	Putative Homology: geranylgeranyl pyrophosphate synthetase
0,3	1,8	-1,8	1,6	3,2	-0,4	1,2	2,8	-0,8	2,5	4,1	0,5	Calcineurin-like phosphoesterase
-1,6	-1,7	2,1	-0,7	-0,8	3,0	0,7	0,6	4,4	-3,8	-3,9	-0,2	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) protein family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,7		-2,0	-0,7		-3,4	-1,7		-4,4	-2,6		-5,4	Glutamate decarboxylase (EC 4.1.1.15) 2, calmodulin-binding [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]

Francesc Hernández Gras

-1,3	-0,7	0,9	-2,7	-2,2	-0,5	-1,5	-0,9	0,7	-4,8	-4,2	-2,5	Calcium-dependent protein kinase [ <i>Solanum tuberosum</i> ]
-1,8	-2,2	1,0	-2,3	-2,7	0,5	-1,9	-2,2	0,9	-5,9	-6,3	-3,1	Unknown
-1,2	-2,2	-0,5	-1,1	-2,1	-0,4	-5,5	-6,5	-4,8	-2,3	-3,3	-1,6	Unknown
0,9	-1,3	0,9	2,1	-0,1	2,1	3,1	0,9	3,1	3,6	1,4	3,5	Peroxiredoxin Q [ <i>Populus balsamifera</i> ]
1,4	-2,3	1,2	1,8	-2,0	1,6	3,2	-0,5	3,0	2,8	-1,0	2,6	Auxin-regulated protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-1,2	-1,4	1,0	-0,1	-0,4	2,0	-3,2	-3,4	-1,0	-4,2	-4,4	-2,1	Heat stress transcription factor A3 [ <i>Lycopersicon peruvianum</i> ]
0,3	2,5	0,1	-2,1	0,1	-2,3	-3,6	-1,5	-3,8	-3,3	-1,1	-3,5	Wound-induced protein (clone TAB7) (fragment) [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
-1,2		-1,2	-1,7		-1,7	-3,3		-3,3	-4,6		-4,7	Mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK), putative
-0,2		-0,8	-0,9		-1,6	-3,2		-3,8	-5,9		-6,5	Orcinol O-methyltransferase [ <i>Rosa hybrid cultivar</i> ]
-0,1	0,7	0,1	-0,2	0,5	0,0	2,3	3,0	2,5	3,1	3,8	3,3	Plastocyanin, chloroplast precursor
-0,5	-2,0	1,0	-0,6	-2,1	1,0	-1,4	-2,9	0,1	-4,3	-5,8	-2,7	Very-long-chain fatty acid condensing enzyme (CUT1)
-0,7	-2,5	-1,2	0,4	-1,4	-0,1	-0,8	-2,6	-1,3	-3,2	-5,0	-3,7	Putative Homology: DNA-directed RNA polymerase
-1,3		-4,2	-3,3		-6,2	1,1		-1,8	0,7		-2,2	Photosystem I reaction center subunit X psaK [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
3,1		1,0	4,9		2,8							Putative 6-phosphogluconolactonase [ <i>Elaeis guineensis</i> ]
	-0,5	-4,1		-3,4	-7,0							m03159 C2H2-type zinc finger protein -related likely a nucleic acid binding protein // ZPT2-14 [ <i>Petunia x hybrida</i> ]
1,4	-2,7	-2,3	1,7	-2,4	-2,0	-0,1	-4,2	-3,8	2,3	-1,9	-1,4	Expressed protein
-1,1	-1,0	3,4	-2,2	-2,0	2,3	-3,2	-3,1	1,3				Unknown [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
1,1		-2,9	2,5		-1,5	-2,7		-6,6				Putative translocation transactivator [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
2,6	0,5	1,9	1,9	-0,2	1,2	0,2	-1,9	-0,5	3,3	1,2	2,6	Putative Homology: "kinase, serine/threonine receptor kinase"
-2,6	-2,0	0,2	-1,7	-1,0	1,1	-1,8	-1,1	1,0	-3,5	-2,8	-0,7	Expressed protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-3,0	-2,1	-1,5	0,7	1,7	2,3	0,3	1,3	1,9	-3,5	-2,6	-2,0	Glyoxalase family protein (lactoylglutathione lyase family protein)
-2,3	-3,4	-1,9	-1,3	-2,4	-0,9	-0,5	-1,6	-0,1	-2,8	-3,9	-2,4	Invertase inhibitor precursor - [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
1,1	3,0	2,3	-0,3	1,6	0,9	0,1	2,0	1,3	-3,8	-1,8	-2,5	TSI-1 protein - [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
-2,1		-2,9	-0,7		-1,5				-2,7		-3,6	Unknown
1,5	2,5	0,9	-0,9	0,2	-1,5	0,1	1,2	-0,5	-3,5	-2,4	-4,1	AP2-domain DNA-binding protein [ <i>Catharanthus roseus</i> ]
-3,2		-2,2	-0,8		0,2	0,3		1,3	-7,8		-6,8	PHD finger transcription factor, putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,3	-2,6		1,2	-1,7		0,9	-2,0		-4,0	-6,8		Isoleucine-tRNA ligase - like protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-1,5	-2,1	-1,8	3,2	2,6	2,9	-0,4	-1,0	-0,7	1,2	0,6	0,9	Lipoxygenase (EC 1.13.11.12) loxC, chloroplast - [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]

-1,1	-0,3	-0,9	-3,6	-2,9	-3,5	-2,5	-1,7	-2,3	0,5	1,3	0,7	Steroid sulfotransferase, putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,1	0,5	0,1	3,3	3,7	3,3	0,5	1,0	0,6	0,6	1,1	0,7	X-Pro dipeptidase-like protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-1,0	-0,9	-1,0	-5,2	-5,1	-5,2	-0,4	-0,4	-0,5	-0,5	-0,5	-0,5	C2 domain-containing protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-1,3	-0,7	1,8	-3,6	-3,0	-0,5	-0,5	0,1	2,7	-1,8	-1,2	1,3	OSJNBa0093F12.14 [ <i>Oryza sativa</i> ]
			9,3		5,1	1,4		-2,8				Expressed protein predicted proteins - different species
-0,6		-2,5	-3,0		-4,8	-1,8		-3,7				TPA: putative phyto-sulfokine peptide precursor [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
1,6		2,5	3,0		3,9	1,4		2,3	2,2		3,2	Protein kinase family contains protein kinase domain, Pfam:PF00069
1,2		-0,9	-2,5		-4,5	1,5		-0,6	3,0		1,0	Expressed protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
			2,8	-3,0					2,4	-3,4		Beta-fructofuranosidase [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
-0,7	-1,6	0,1	-1,6	-2,5	-0,8	-2,8	-3,7	-2,0	-0,2	-1,1	0,6	Expressed protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,9	-1,8	-0,6	-0,3	-3,0	-1,8	-1,3	-3,9	-2,7	1,0	-1,7	-0,5	Putative Homology: "lipid transfer protein, phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer"
0,0	-1,6	-1,4	-0,9	-2,5	-2,3	-2,1	-3,8	-3,6	0,5	-1,2	-1,0	Putative Homology: "PR protein, leaf protein 6, ethylene-induced"
0,7	-2,5	-2,0	0,3	-2,9	-2,4	-0,6	-3,8	-3,3	1,7	-1,5	-1,0	RNA helicase -related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-1,3	0,1	-1,8	-2,5	-1,1	-3,0	-3,3	-2,0	-3,8				Unknown
2,3	0,7	-1,0	0,2	-1,5	-3,1	-1,5	-3,1	-4,7				Probable glutathione S-transferase (Pathogenesis-related protein 1)
-1,3		-2,3	-1,9		-2,9	-4,3		-5,3				N-hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-hydroxycinnamoyl transferase THT7-1
0,3		-0,4	-2,0		-2,7	-0,6		-1,3	-3,1		-3,9	Putative Homology: "kinase, serine/threonine receptor kinase"
-1,1		-2,1	-1,8		-2,7	-1,2		-2,2	-3,6		-4,5	Unknown
-1,9		-1,1	-2,6		-1,8	-2,2		-1,3	-6,1		-5,3	BAC19.12 [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
0,5	-0,5	0,9	-0,3	-1,4	0,1	-3,4	-4,5	-3,0	2,0	0,9	2,4	Transporter-related protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-1,1	-2,0	-0,9	-1,1	-2,1	-1,0	-2,9	-3,9	-2,8	0,6	-0,4	0,7	Putative glycine-rich protein [ <i>Oryza sativa</i> ]
0,9	-1,1	-1,0	0,6	-1,4	-1,3	-3,6	-5,5	-5,5	0,7	-1,3	-1,3	Putative Homology: elastin
0,3	-2,4	-0,4	0,8	-1,9	0,1	-3,4	-6,2	-4,2				Unknown
0,5	1,9	2,2	0,4	1,8	2,1	1,5	2,9	3,2	0,8	2,2	2,5	Putative Homology: elastin
1,2		-1,1	1,6		-0,7	-3,8		-6,0	3,5		1,3	Expressed protein similar to unknown protein
0,9	-1,9	-1,4	1,2	-1,6	-1,1	-0,2	-3,0	-2,5	0,2	-2,6	-2,2	Transducin / WD-40 repeat protein family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
1,5	0,0	-1,4	0,5	-1,0	-2,4	-1,8	-3,2	-4,6	0,1	-1,4	-2,8	Probable glutathione transferase (EC 2.5.1.18), 2,4-D inducible - [ <i>Glycine max</i> ]
	-1,0	-1,9		-0,8	-1,8		-4,0	-4,9		-2,4	-3,3	Transcription factor BZI-2 [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]

Francesc Hernández Gras

0,8	-1,9	1,2	0,9	-1,7	1,3	-2,2	-4,9	-1,8	3,4	0,7	3,8	Terpenoid synthetase [ <i>Vitis vinifera</i> ]
0,4	-0,8	1,4	1,5	0,3	2,5	1,8	0,6	2,8	2,7	1,5	3,7	Unknown
-0,5	1,1	0,4	-1,6	0,0	-0,7	0,9	2,5	1,9	1,8	3,4	2,7	Putative Homology: "transport protein, ATPase, delta chain, chloroplast"
1,2	-1,2	0,7	2,0	-0,4	1,5	2,8	0,4	2,3	3,1	0,7	2,5	Elongation factor P (EF-P) -related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,6	-1,4	0,4	1,2	0,4	2,2	1,8	1,0	2,8	-2,7	-3,5	-1,6	Expressed protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,2	-1,6	-1,2	0,4	-1,4	-1,0	-0,9	-2,7	-2,3	-1,2	-3,0	-2,6	Probable phloem-specific lectin [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
1,2	-1,7	-1,8	0,7	-2,2	-2,3	0,5	-2,4	-2,5	0,2	-2,7	-2,8	Unknown
1,1	-1,6	-0,3	1,5	-1,2	0,0	-0,7	-3,4	-2,1	-1,6	-4,3	-3,1	Putative Homology: "anthocyanin 5-aromatic acyltransferase"
0,6		-0,1	1,5		0,8	-1,9		-2,6	-2,6		-3,3	Flavonoid 1-2 rhamnosyltransferase [ <i>Citrus maxima</i> ]
-1,0	-0,8	-1,9	-0,7	-0,4	-1,6	-2,3	-2,1	-3,2	-2,5	-2,3	-3,4	Putative Homology: elastin
-0,1	1,9	-0,7	-0,3	1,7	-0,8	0,7	2,6	0,1	-2,9	-0,9	-3,5	NAC domain protein NAC2 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,5		-1,6	-1,1		-2,1	-2,0		-3,1	-2,7		-3,8	Putative protein kinase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,3		-0,7	-1,3		-1,7	-2,4		-2,8	-3,9		-4,3	Patatin-like protein 3 [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
-1,7	-2,0	-1,7	-0,6	-0,8	-0,6	-0,4	-0,7	-0,5	-2,5	-2,8	-2,6	Senescence-associated protein, SENU5, senescence up-regulated
-1,5	-1,5	-1,6	-0,9	-0,8	-0,9	0,0	0,0	-0,1	-2,7	-2,6	-2,7	Pyruvate kinase, cytosolic isozyme
-0,1	-0,2	-0,2	-0,3	-0,4	-0,4	0,6	0,5	0,5	-2,8	-2,9	-2,8	Expressed protein acyl-CoA binding protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-2,4	0,3	0,3	-2,1	0,5	0,5	-0,8	1,9	1,9	-5,7	-3,0	-3,0	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) protein family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-1,2	-0,9	-1,4	-1,2	-0,8	-1,3	-1,6	-1,2	-1,7	-2,9	-2,5	-3,0	Senescence-associated protein -related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-1,0	-1,2	-1,5	-0,7	-0,9	-1,2	-0,9	-1,0	-1,4	-2,5	-2,7	-3,0	Unknown
-0,5	-1,7	-0,6	0,5	-0,7	0,4	0,6	-0,7	0,5	-3,0	-4,3	-3,1	NAC domain protein NAC2 [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]
-1,0	-0,7	-0,6	-1,0	-0,8	-0,6	-1,1	-0,9	-0,7	-3,7	-3,4	-3,2	Expressed protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,3	0,0	0,0	-1,0	-1,3	-1,3	-0,5	-0,9	-0,8	-2,9	-3,3	-3,2	Putative MYB protein [ <i>Solanum demissum</i> ]
-0,1	-0,5	-0,8	-1,6	-2,1	-2,3	-0,9	-1,3	-1,5	-2,7	-3,1	-3,4	WRKY-type DNA binding protein [ <i>Solanum tuberosum</i> ]
-1,3	-0,8	1,5	-1,3	-0,7	1,6	-0,9	-0,3	2,0	-6,4	-5,8	-3,5	Putative Homology: glutamate permease
-1,2	-0,1	-0,3	-1,9	-0,7	-1,0	-0,3	0,9	0,6	-4,5	-3,3	-3,6	LeAux=Arabidopsis auxin-regulated protein homolog [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
0,5	0,7	1,3	0,5	0,6	1,3	0,1	0,2	0,9	-4,9	-4,8	-4,1	Membrane protein common family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,3	-0,1	-0,4	-1,2	-1,0	-1,3	-1,1	-1,0	-1,3	-4,0	-3,8	-4,1	Unknown protein [ <i>Oryza sativa</i> ]
0,1	-1,9	-0,6	1,3	-0,7	0,6	0,7	-1,3	0,0	-3,8	-5,8	-4,5	Cytochrome P450 [ <i>Panax ginseng</i> ]

1,4	-2,5	-0,3	1,7	-2,2	0,0	1,8	-2,1	0,0	-3,3	-7,2	-5,1	Putative Homology: protease P27
-1,2	0,7	-0,5	-1,0	0,9	-0,3	-1,1	0,8	-0,4	-6,2	-4,3	-5,5	Putative Homology: glutamate permease
0,3	-1,4	0,8	2,5	0,8	3,0	1,5	-0,2	1,9	1,6	-0,1	2,1	Putative thioredoxin peroxidase [ <i>Oryza sativa</i> ]
1,6	-0,2	1,8	2,9	1,1	3,1	1,3	-0,5	1,5	0,6	-1,2	0,8	Amino acid transporter family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-1,8		-2,3	3,1		2,6	-0,8		-1,2	1,0		0,6	Unknown
1,1	0,3	0,5	-2,1	-2,9	-2,7	-0,6	-1,4	-1,2	0,8	0,1	0,3	Protein phosphatase 2C [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
-0,9	-2,3	-2,4	-1,2	-2,7	-2,7	2,0	0,5	0,5	-0,1	-1,5	-1,6	Putative Homology: "chlorophyll a/b binding protein 1B, LHCII type I"
-0,8		-0,9	-2,9		-3,0	-0,9		-1,0	-2,2		-2,4	Protein kinase family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,3	-2,2	-2,3	-0,2	-2,6	-2,8	0,1	-2,4	-2,5	0,1	-2,3	-2,5	Contains similarity to myosin heavy chain-gene_id:K2A18.10 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
1,1		1,2	4,7		4,7	0,7		0,8				RING zinc finger ankyrin protein -related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-1,9		-2,1	-2,6		-2,7	-0,3		-0,4				PHAP2A protein [ <i>Petunia x hybrida</i> ]
-2,3		-2,4	-5,2		-5,2	-1,6		-1,7				Unknown
-0,9		-0,7	-5,1		-4,9	-2,3		-2,1				Expressed protein contains Zinc finger,C2H2 type,domain
1,4	-2,1	-1,9	0,6	-2,9	-2,7							Unknown
-0,7		0,5	-4,1		-2,9							Ascorbate oxidase, SRG1 // oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
			-4,3	-1,7	-3,1							Calcium/calmodulin-dependent protein kinase CaMK2 [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
				-3,4	-5,1							Sulphate transporter [ <i>Brassica napus</i> ]
0,2		-1,3	-5,3		-6,8							NDRI-like protein [ <i>Nicotiana benthamiana</i> ]
				-9,9	-10,9							Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,8		0,7	2,4		2,3	2,7		2,6	1,7		1,6	Unknown
0,2	0,1	1,0	-0,7	-0,8	0,1	-2,7	-2,8	-1,9	-0,2	-0,3	0,6	Expressed protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-2,0		-1,0	-1,6		-0,7	-3,8		-2,8	-0,5		0,4	Serine/threonine protein kinase (EC 2.7.1.-), nonphototropic hypocotyl protein
1,1		0,9	-0,1		-0,3	-5,5		-5,7	0,6		0,4	cf-9 protein precursor - [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
0,3		-0,2				-3,3		-3,7	0,7		0,2	S-locus protein kinase, putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,8		-0,4	1,3		0,0	-2,7		-4,0	1,0		-0,2	Expressed protein [ <i>Solanum demissum</i> ]
0,3		-0,3	-0,7		-1,3	-6,5		-7,1	0,3		-0,3	Early flowering 3 [ <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> ]
1,4	-1,7	-1,1	1,1	-2,0	-1,3	-0,3	-3,5	-2,8	1,9	-1,2	-0,6	elongation factor-1 alpha [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
0,9		-0,8	0,4		-1,3	-3,6		-5,3	0,8		-0,9	Expressed protein



0,2		-0,5	0,4		-0,3	-3,7		-4,4	-0,7		-1,4	Fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase [ <i>Bruguiera gymnorhiza</i> ]
-0,3	1,1	-0,9	-1,2	0,2	-1,7	-2,9	-1,5	-3,4	-0,9	0,5	-1,4	Putative bHLH transcription factor [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
1,0	-2,5	-2,2	1,1	-2,4	-2,1	-0,2	-3,6	-3,4	1,7	-1,7	-1,5	Putative Homology: "rubisco, small subunit 2A"
1,9	1,8	-0,9	2,1	2,1	-0,7	2,9	2,9	0,1	0,9	0,9	-1,9	ABC transporter family protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,6	-1,3	-1,3	-1,3	-1,9	-2,0	-2,3	-2,9	-2,9	-1,5	-2,1	-2,2	Rac-like GTP-binding protein (ARAC1)
-0,2		-0,7	-1,6		-2,1	-2,9		-3,4	-1,7		-2,2	LSTK-1-like kinase [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
0,1		-1,5	0,0		-1,6	-5,4		-7,0	-0,7		-2,3	Unnamed protein product [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,6		-0,4	1,1		0,1	8,6		7,6				PWWP domain protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
1,6		0,6				3,6		2,5				SPY protein [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
-1,7	-2,0	-1,4	-2,2	-2,4	-1,9	-2,6	-2,8	-2,3				Receptor protein kinase-like protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
						-2,6		-3,2				Putative Homology: BYJ6
				0,3	-0,3		-2,8	-3,4				Hypothetical protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
1,5	-1,5	0,0	0,9	-2,1	-0,6	-2,0	-4,9	-3,5				AUX/IAA family
-1,0	-2,1					-5,1	-6,2					Receptor protein kinase-like protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,3		0,7	-0,8		0,2	1,3		2,3	2,6		3,6	Malate dehydrogenase [NADP], chloroplast precursor (NADP-MDH)
2,0	-0,4	1,4	1,9	-0,4	1,3	1,2	-1,2	0,6	3,8	1,5	3,2	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase [ <i>Nolana albescens</i> ]
0,1		0,4	0,3		0,6	1,0		1,3	2,6		2,9	Proline-rich protein family
0,8		-0,1	0,7		-0,2	1,2		0,3	3,5		2,5	Heavy-metal-associated domain-containing protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,2	-0,4	-0,2	0,4	-0,2	0,1	1,3	0,7	1,0	2,8	2,3	2,5	Chloroplast elongation factor TuB(EF-TuB) [ <i>Nicotiana sylvestris</i> ]
-0,3		-1,1	1,3		0,6				3,3		2,5	Ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
1,3	1,6	-0,9	2,1	2,4	-0,1	1,8	2,1	-0,4	2,8	3,1	0,6	Pectinesterase (pectin methylesterase), putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-2,0	-1,9	0,5	-1,7	-1,6	0,8	-1,0	-0,8	1,5	-3,1	-2,9	-0,6	Histidine-containing phosphotransfer protein [ <i>Catharanthus roseus</i> ]
-1,2	-1,0	0,3	-2,1	-1,9	-0,7	-1,9	-1,7	-0,5	-2,9	-2,6	-1,4	Zinc-finger protein [ <i>Petunia x hybrida</i> ]
-0,2	-0,8	1,4	-0,3	-0,9	1,3	-0,5	-1,1	1,1	-3,0	-3,6	-1,4	Putative lipid transfer protein GPI-anchored [ <i>Cicer arietinum</i> ]
-1,3	-0,8	1,3	-1,6	-1,1	1,0	-0,7	-0,2	1,9	-4,1	-3,6	-1,4	Expressed protein
0,3	-0,6	2,4	0,2	-0,7	2,3	0,0	-0,9	2,1	-3,5	-4,5	-1,5	Nonspecific lipid-transfer protein 1 precursor (LTP 1)
-1,2	-1,4	1,1	0,0	-0,1	2,4	-1,2	-1,3	1,1	-3,9	-4,0	-1,6	Prephenate dehydratase [ <i>Ipomoea trifida</i> ]
-1,3	-0,8	0,3	-2,0	-1,6	-0,5	-1,5	-1,1	0,0	-3,1	-2,7	-1,6	Patatin family similar to patatin-like latex allergen [ <i>Hevea brasiliensis</i> ]

-0,5	-1,4	1,6	0,0	-0,8	2,1	-0,2	-1,0	1,9	-3,8	-4,6	-1,7	Dehydration-induced protein RD22-like protein [ <i>Gossypium hirsutum</i> ]
-0,4	-0,4	0,6	-1,5	-1,5	-0,5	0,1	0,1	1,1	-3,1	-3,0	-2,0	Hypothetical protein T31B5.60 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,9	-0,7	-0,1	-0,9	-0,7	-0,1	1,0	1,2	1,7	-2,9	-2,7	-2,1	DnaJ protein family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,8	-1,1	-0,3	-1,4	-1,7	-0,9	-0,1	-0,4	0,5	-2,7	-3,0	-2,2	Unknown
0,2	0,3	0,7	-1,1	-1,0	-0,6	-1,2	-1,1	-0,7	-2,8	-2,7	-2,3	TPA: putative phytosulfokine peptide precursor [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
-0,4	-0,4	0,2	-1,7	-1,7	-1,1	-0,2	-0,2	0,4	-3,0	-3,1	-2,4	bZIP transcription factor BZI-4 [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
-1,1	-2,0	-1,9	-0,7	-1,5	-1,4	-1,0	-1,8	-1,8	-1,8	-2,6	-2,5	Heavy-metal-associated domain-containing protein
0,8	-1,3	-1,1	0,6	-1,5	-1,3	0,3	-1,8	-1,6	-0,7	-2,8	-2,6	Putative Homology: BYJ15
1,3	-0,5	0,9	0,9	-0,9	0,5	0,8	-1,0	0,4	-2,2	-4,0	-2,7	K+ channel protein [ <i>Solanum tuberosum</i> ]
-2,0		-1,3	-2,0		-1,3	-0,9		-0,2	-3,4		-2,7	Proline-rich protein family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
1,9	-0,7	-0,1	0,4	-2,2	-1,5	0,3	-2,3	-1,7	-0,7	-3,3	-2,7	Cytochrome P450 (EC 1.14.-.-) 81B1c – [ <i>Helianthus tuberosus</i> ]
0,4	0,9	0,6	0,9	1,4	1,1	1,3	1,8	1,5	-2,9	-2,4	-2,7	Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase
0,9	-0,2	0,2	0,6	-0,5	0,0	-0,5	-1,6	-1,2	-2,1	-3,1	-2,7	Heat shock factor [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
-1,7		-0,5	-1,1		0,2	-0,5		0,7	-3,9		-2,7	Aldehyde dehydrogenase (NAD) (EC 1.2.1.3) 2A precursor, mitochondrial
-2,1	0,9	-1,4	-2,4	0,6	-1,7	-1,5	1,5	-0,8	-3,5	-0,6	-2,8	Putative Homology: "glucosidase, glucan 1,3-beta-glucosidase"
-0,2	-1,7	-1,9	0,5	-0,9	-1,1	0,1	-1,3	-1,5	-1,2	-2,6	-2,8	Putative glutathione S-transferase T4 [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
-0,3	0,7	-0,1	-0,7	0,2	-0,5	-0,2	0,8	0,1	-3,0	-2,1	-2,8	Glycosyltransferase family 20 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] // Putative Homology: trehalose-6-phosphate phosphatase
0,0		0,2	-0,5		-0,3	-0,6		-0,4	-3,1		-2,9	MYB transcription factor R3 type [ <i>Populus tremula x Populus tremuloides</i> ]
-1,5		-0,8	-1,6		-0,9	-0,4		0,3	-3,7		-2,9	Ascorbate oxidase promoter-binding protein AOBP [ <i>Cucurbita maxima</i> ]
-1,6		-1,7	-2,5		-2,5	-2,1		-2,1	-3,0		-3,0	Auxin-regulated dual specificity cytosolic kinase [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
1,6	0,4	0,4	0,7	-0,5	-0,4	0,0	-1,2	-1,1	-1,9	-3,1	-3,0	Inhibitor of apoptosis-like protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-1,0	0,1	-0,9	-0,7	0,4	-0,5	-0,1	1,0	0,0	-3,2	-2,1	-3,1	Zinc finger protein 2 (ZFP2) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
	0,1	-0,2		-2,0	-2,3		-2,1	-2,4		-2,9	-3,1	Tuberisation-related protein
1,2		0,5	-0,3		-0,9	-1,7		-2,4	-2,6		-3,2	Hypothetical protein T26M18.70 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,6		0,0	-1,2		-1,7	-0,7		-1,2	-2,7		-3,2	Peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,8	-0,1	-1,0	-1,2	-0,5	-1,4	-0,4	0,3	-0,6	-3,1	-2,4	-3,3	Putative Homology: "lectin, phloem-specific lectin"
-0,2		0,3	0,7		1,2	0,2		0,7	-3,8		-3,3	Auxin-induced (indole-3-acetic acid induced) protein family
	-0,8	-1,3		-1,4	-1,8					-3,0	-3,4	Putative Homology: tubulin beta-8 chain

Francesc Hernández Gras

1,9	-1,3	-0,8	2,4	-0,8	-0,2	1,3	-1,9	-1,3	-0,8	-4,0	-3,4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase -related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,8	-1,5	-2,1	-0,4	-1,2	-1,8	-1,1	-1,8	-2,4	-2,1	-2,8	-3,4	Putative Homology: extensin
1,3	-0,6	-1,4	1,6	-0,3	-1,1	1,9	0,1	-0,8	-0,8	-2,6	-3,5	Pathogenesis-related protein P2 precursor
-0,6		-0,1	-0,6		-0,1	-1,4		-1,0	-4,0		-3,6	Aldehyde dehydrogenase, putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,6		0,0	-0,2		-0,8	0,6		0,1	-3,0		-3,6	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) protein family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-1,6		-1,6	-1,9		-2,0	-1,1		-1,2	-3,6		-3,7	Expressed protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
1,3	0,8	0,0	0,5	0,0	-0,8	-0,3	-0,8	-1,6	-2,4	-3,0	-3,8	Unknown
-0,6		-1,2	-0,6		-1,3	-0,6		-1,3	-3,2		-3,8	Sucrose transporter [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]
0,3	-1,7	-1,1	0,3	-1,7	-1,1	0,4	-1,6	-1,0	-2,4	-4,4	-3,8	Hipotetical protein //protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)
1,1		0,0	0,3		-0,8	1,0		-0,1	-2,9		-4,0	Receptor-like protein kinase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
0,1		0,1	-1,2		-1,2	-1,6		-1,6	-4,1		-4,0	Peroxidase [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
-0,4		0,2	-1,0		-0,4				-4,8		-4,2	S46306 cytochrome b5 - common tobacco gi-296386
-0,7		-1,0	0,6		0,4	-1,2		-1,4	-4,2		-4,4	m04208 proline oxidase, mitochondrial precursor //1- CIG1 [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
-2,0		-1,4	-2,2		-1,6	-1,6		-0,9	-5,2		-4,6	Putative Homology: elastin
0,1		-0,7	-0,1		-1,0	0,0		-0,9	-3,8		-4,6	Tousled-like protein kinase [ <i>Nicotiana glutinosa</i> ]
-0,6		-0,7	-0,1		-0,2	-1,1		-1,3	-4,5		-4,6	Serine/threonine specific protein kinase -related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
-0,3		-2,2	0,1		-1,8	0,4		-1,5	-3,3		-5,2	Cytochrome P450
1,2		-1,1	1,8		-0,4				-3,3		-5,5	Expressed protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
1,8		-1,7	2,1		-1,5				-2,8		-6,4	Putative Homology: "GTPase activator protein, rac1"
-0,1		-0,9	-0,4		-1,2	-1,3		-2,1	-11,2		-12,1	14-3-3 protein 7 gi-15637114