



**Título:** MODIFICACIONES METABÓLICAS Y ESTRUCTURALES DE LA PARED CELULAR ASOCIADAS A LA HABITUACIÓN INCIPIENTE DE SUSPENSIONES CELULARES DE MAÍZ A DICLOBENIL

**Nombre:** DE CASTRO RODRÍGUEZ, MARÍA BEATRIZ

**Universidad:** Universidad de León

**Departamento:** Biología molecular

**Fecha de lectura:** 30/01/2014

**Mención a doctor europeo:** concedido

**Programa de doctorado:** Biología molecular y biotecnología, plan 2007

**Dirección:**

- > **Director:** PENELOPE GARCÍA ANGULO
- > **Codirector:** JOSÉ LUIS ACEBES ARRANZ

**Tribunal:**

- > **presidente:** ANTONIO ESTEBAN ENCINA GARCÍA
- > **secretario:** Hugo Mélida Martínez
- > **vocal:** SAMI IRAR MARTINEZ

**Descriptores:**

- > ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR

**El fichero de tesis** ya ha sido incorporado al sistema

- > 2014de\_camodif.pdf

**Localización:** BIBLIOTECA CENTRAL SAN ISIDORO

**Resumen:** INTRODUCCIÓN

La pared celular de las plantas

Los protoplastos de las células de las plantas terrestres están rodeados por una capa semirrígida: la pared celular. A pesar de que el término para designarla induzca a pensar en una estructura impenetrable y estática, se trata de un compartimento celular muy dinámico con importantes funciones tanto estructurales como fisiológicas. Las paredes celulares guían, restringen y determinan el crecimiento celular y tienen un papel crucial en la especialización funcional de los diferentes tipos celulares. Al constituir la barrera externa entre la célula y el medio se encuentran implicadas en la señalización de respuestas a situaciones de estrés (Roberts, 2001; Hückelhoven, 2007; Driouch y col., 2012) y procesos de reconocimiento célula-célula así como célula-patógeno (Vorwerk y col., 2004; Seifert y Blaukopf, 2010; Wolf y col., 2012). Además, presentan una elevada plasticidad estructural y de composición, que permite a las células adaptarse a condiciones de estrés, tanto abióticos como bióticos (Hamann y col., 2009). A parte de sus funciones fisiológicas, las paredes celulares también tienen un



importante valor económico, ya que influyen en la textura y el valor nutricional de la mayor parte de los productos que se obtienen de plantas, son un factor clave en su procesamiento, y se consideran fuente y reservorio de energía en plantas para la producción de biocombustibles (Burton y Fincher, 2012).

La pared celular primaria es exclusiva de células que aún mantienen la capacidad de dividirse y/o elongarse. Finalmente, en algunas células especializadas aparece una estructura multicapa, que es la pared secundaria, de mayor espesor y ordenación más regular de las microfibrillas de celulosa y que suele presentar depósitos de lignina y suberina.

La síntesis de los diferentes componentes de la pared celular ocurre en distintos compartimentos celulares. Las microfibrillas de celulosa se sintetizan en la membrana plasmática por acción del complejo enzimático celulosa sintasa (CSC), y se depositan directamente en la pared. Los polisacáridos no celulósicos (hemicelulosas y pectinas) se sintetizan en el aparato de Golgi, y las diferentes proteínas, tanto estructurales como enzimáticas, se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso, aunque con frecuencia las proteínas estructurales sufren glicosilaciones y otras modificaciones en el Golgi. Los distintos componentes no celulósicos de la pared celular se empaquetan en vesículas secretoras y se transportan a la superficie celular, donde se integran con las microfibrillas de celulosa sintetizadas de novo (Carpita y McCann, 2000).

#### Arquitectura de la pared celular primaria

La pared celular primaria se compone de tres redes estructuralmente independientes pero interconectadas (Carpita y McCann, 2000). La primera de estas redes está conformada por un armazón de celulosa-hemicelulosas, la segunda red está constituida por polisacáridos pécticos, y la tercera red consiste en proteínas estructurales y compuestos fenólicos.

En las plantas superiores se distinguen dos tipos de paredes celulares primarias (Carpita y Gibeau, 1993) que difieren en la composición química y en la asociación a diferentes taxones: la pared celular primaria tipo I, que es característica de dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas (no commelinoides), y la pared celular tipo II presente en algunas monocotiledóneas (commelinoides) (Popper, 2008).

#### Composición de la pared celular tipo II

##### Celulosa

El contenido de celulosa en las paredes celulares primarias, tanto tipo I como tipo II, varía entre el 15 % y el 30 %, siendo este porcentaje mayor en la pared celular secundaria (Carpita y McCann, 2000). En el caso de células cultivadas *in vitro*, la proporción de celulosa se sitúa en torno a un 20% (Blaschek y col., 1981).

La celulosa en las paredes celulares primarias se dispone formando microfibrillas, que son estructuras insolubles compuestas por 36 cadenas de  $\beta$ -1,4-glucano dispuestas en paralelo (Delmer, 1999; Saxena y Brown, 2000; Lerouxel y col., 2006). Las cadenas de  $\beta$ -1,4-glucano adquieren una estructura espacial plana que permite la interacción de unas con otras mediante la formación de puentes de hidrogeno intra e intercatenarios, que dan lugar a una estructura cristalina muy estable (Somerville, 2006).

La síntesis de la celulosa ocurre en la membrana plasmática, siendo depositada en la pared celular (Guerriero y col., 2010). La maquinaria encargada de su síntesis es un complejo proteico CSC o rosetas (Brown, 1996; Kimura y col., 1999). En plantas, los CSCs se encuentran organizados en hexámeros constituido por proteínas denominadas celulosa sintasa (CESA).

Las proteínas CESA son codificadas por familias multigénicas, con un número variable de genes dependiendo de la especie. En *Arabidopsis* se han identificado 10 genes CESA, mientras que en maíz han sido 12 (Holland y



col., 2000; Appenzeller y col., 2004). En maíz los genes ZmCESA1 al 9 se encuentran implicados en la síntesis de celulosa en paredes primarias y ZmCESA10, 11 y 12 en la correspondiente a las secundarias. Sin embargo debido a su homología con el gen ZmCESA12 más que con ZmCESA10 y 11, se ha propuesto que están implicados en la síntesis de celulosa en paredes celulares primarias durante los estadios tardíos del desarrollo (Appenzeller y col., 2004).

Además de las CESA, existen otras proteínas implicadas en la síntesis de celulosa, como la sacarosa sintasa (Amor y col., 1995), la proteína KORRIGAN (Nicol y col., 1998) o las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) (Sedbrook, 2004).

Polisacáridos no celulósicos: pectinas y hemicelulosas

Las pectinas son polisacáridos matriciales ricos en ácido galacturónico. Las paredes tipo II presentan menor contenido en pectinas que las paredes tipo I. Aun siendo un componente minoritario, las pectinas juegan un importante papel en la retención de agua, transporte de iones, adhesión celular y determinación de tamaño de poro de la pared. Además, están implicadas en mecanismos de defensa frente a patógenos, heridas y estreses abióticos (Ridley y col., 2001; Jarvis y col., 2003; Verhertbruggen y Knox, 2007). Entre los polisacáridos pécticos se encuentran el homogalacturonano, el ramnogalacturonano I y el ramnogalacturonano II.

El homogalacturonano es un homopolímero de restos de ácido galacturónico que puede presentar diferentes grados de metilesterificación. En principio, se deposita en la pared celular con un alto grado de metilesterificación, y una vez allí sufre la pérdida de restos metilo por la acción de pectin metilesterasas. Esta pérdida de metilaciones es necesaria para que se establezcan puentes de calcio entre cadenas antiparalelas de homogalacturonano (Liners y col., 1989). La cadena principal del homogalacturonano se encuentra covalentemente unida a ambos tipos de ramnogalacturonano, y además se cree que también puede interactuar in situ con el xiloglucano (Popper y Fry, 2008).

El ramnogalacturonano tipo I se compone de una cadena formada por la repetición del disacárido  $\beta$ -1,4-ácido galacturónico- $\beta$ -1,2-ramnosa (Carpita y McCann, 2000). Los restos de ramnosa pueden tener unidas cadenas laterales de galactano, arabinano o arabinogalactano.

El ramnogalacturonano tipo II es un galacturonano con una gran diversidad de sustituciones. Las moléculas de ramnogalacturonano tipo II se pueden asociar entre sí formando dímeros mediante el enlace a través de restos borato (Albersheim y col., 2011).

Las hemicelulosas son un grupo de polisacáridos neutros constituidos por una cadena lineal de monosacáridos, principalmente xilosa, glucosa o manosa, en general con ramificaciones cortas y estructura no cristalina. La pared celular tipo II contiene como principales polisacáridos hemicelulósicos xilanos, y glucano mixto. Además, aparece una pequeña proporción de xiloglucano (Carpita y McCann, 2000).

Los xilanos y el glucano mixto unen microfibrillas de celulosa adyacentes mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno, y las mantienen en su disposición espacial correcta, asumiendo las funciones que el xiloglucano desempeña en las paredes celulares tipo I.

Los xilanos son los principales polisacáridos hemicelulósicos en paredes celulares tipo II (Fincher, 2009) constituyendo alrededor del 20-40% del peso de la pared (Vogel, 2008). Su estructura se basa en una cadena principal de  $\beta$ -1,4-xilosas, y pueden presentar sustituciones de arabinosa (arabinoxilanos) y en menor medida de ácido glucurónico (glucuronoarabinoxilanos). En paredes celulares tipo II muy frecuentemente las unidades de arabinosa del arabinoxilano/glucurono-arabinoxilano pueden encontrarse sustituidas por ácidos



hidroxicinámicos (principalmente ácido ferúlico y en menor medida ácido cumárico) unidos mediante enlace éster (Wende y Fry, 1997). Estos restos de ácidos hidroxicinámicos, mediante acoplamiento oxidativo mediado por peroxidasas (Geissmann y Neukom, 1971), son susceptibles de unirse de manera que entrecruzan las cadenas de arabinoxilanos sobre las que se encuentran esterificados (Fry, 2004).

El xiloglucano es un  $\beta$ -1,4-glucano con numerosas ramificaciones de  $\zeta$ -1,6-xilosa que presentan a su vez sustituciones de arabinosa, galactosa y/o fucosa (Hayashi, 1989). En paredes celulares tipo II es un polisacárido minoritario, en el que la fucosa no está presente (Carpita, 1996).

La biosíntesis así como el ensamblaje de los polisacáridos no celulósicos tiene lugar en el aparato de Golgi. Posteriormente, son transportados en vesículas derivadas de este orgánulo hasta la membrana plasmática, donde se produce la fusión de las vesículas y el consecuente vertido de su contenido hacia la pared celular (Driouich y col., 1993; 2012; Lerouxel y col., 2006; Day y col., 2013). Su síntesis corre a cargo de una serie de enzimas denominadas glicosiltransferasas (GTs), clasificadas en 92 familias en la base de datos CAZY.

#### Proteínas

En la pared primaria se pueden encontrar tanto proteínas estructurales como solubles. En cuanto a las proteínas estructurales, las paredes tipo II presentan también contenidos reducidos (1%) en comparación con las tipo I (10%) (Vogel, 2008). Este tipo de proteínas se encuentran inmovilizadas en la pared, y frecuentemente son glicoproteínas con secuencias repetidas de uno o dos aminoácidos.

Respecto a las proteínas solubles, la mayor parte de ellas son enzimas relacionadas con la extensión de la pared celular, el transporte molecular, el reconocimiento celular o la resistencia a patógenos (Rose y col., 2002). Dentro de ellas encontramos hidrolasas, transglicosilasas, peroxidasas, expansinas y kinasas.

#### Fenoles

Los ácidos ferúlico y p-cumárico son los principales fenilpropanoides o hidroxicinamatos de la pared celular (Wallace y Fry, 1994) y, aunque son cuantitativamente minoritarios, son importantes. Las cadenas de arabinoxilano pueden entrecruzarse gracias a la polimerización oxidativa de estos restos de ácido ferúlico, generando dímeros (dehidroferulatos) o incluso trímeros u oligómeros, unidos por enlace fenil-fenil o fenil-éter. El proceso de esterificación y entrecruzamiento se produce de manera mayoritaria en el Golgi pero también puede realizarse in muro. Estas uniones conducen a un reforzamiento de la estructura de la pared celular, promueven la cohesión celular, restringen la expansión celular, contribuyen al ensamblaje de la pared y participan en el reforzamiento de esta estructura en respuesta a factores abióticos y bióticos (Buanafina, 2009).

#### Plasticidad estructural de la pared celular

Las células pueden modificar la composición y estructura de sus paredes celulares en condiciones de estrés, tanto abióticos como bióticos. El grado de flexibilidad de las paredes depende de la especie de que se trate, del tipo de tejido e incluso del grado de diferenciación del tipo celular dado. El estudio de la plasticidad estructural de la pared celular adquiere una gran importancia, no sólo desde un punto de vista de investigación básica con el fin de conocer cómo se regula la síntesis y el ensamblaje de sus componentes, sino también en investigación aplicada, con el fin de obtener productos de interés en las industrias textil, papelera, maderera, o de biocombustibles.

En los últimos años el empleo de técnicas de cultivo in vitro de células, tejidos y órganos vegetales ha permitido avanzar considerablemente en la caracterización de paredes celulares alteradas por modificaciones genéticas



(mutaciones) y por adaptaciones a estreses abióticos, como salinos (Binzel y col., 1988), metales pesados (Carpena y col., 2000), bajas temperaturas (Yamada y col., 2002) o desecación (Moore y col., 2013), así como por la habituación a inhibidores de la biosíntesis de la pared celular (Satiat-Jeunemaitre y Darzens, 1986; Suzuki y col., 1992; Vaughn y Turley, 1999; Encina y col., 2001; García-Angulo y col., 2006; 2009; Mérida y col., 2009).

#### Habituación a herbicidas inhibidores de la biosíntesis de celulosa

La habituación de cultivos celulares a inhibidores de la biosíntesis de la pared celular refleja la capacidad de las células de sobrevivir con una pared celular modificada, siendo por tanto un sistema muy útil para avanzar en el conocimiento de la plasticidad estructural de la pared celular. Varios compuestos han sido descritos como inhibidores de algunos de los componentes de la pared celular primaria (Acebes y col., 2010; García-Angulo y col., 2012), entre los que se encuentra el diclobenil (2,6-diclorobenzonitrilo o DCB), que inhibe específicamente la síntesis de celulosa en plantas superiores (Vaughn, 2002), sin afectar a otros procesos fisiológicos como la síntesis de ADN o proteínas (Galbraith y Shields, 1982), la respiración (Montezinos y Delmer, 1980) o el mantenimiento de los niveles de UDP-Glucosa, fosfolípidos o nucleósidos mono o trifosfato (Delmer, 1987). Aunque la diana del DCB aún permanece desconocida, parece tratarse de una proteína MAP, en concreto la MAP20 (Rajangam y col., 2008). Estos autores postularon que el DCB interaccionaría con MAP20, bloqueando el ensamblaje de las proteínas CESA a los microtúbulos y por tanto la síntesis de celulosa.

En las dos últimas décadas se ha demostrado que es posible habitar cultivos de células indiferenciadas (callos y suspensiones celulares) a concentraciones letales de DCB aumentando paulatinamente su concentración en el medio de cultivo (Shedletzky y col., 1992; Wells y col., 1994; Nakagawa y Sakurai, 1998; Sabba y col., 1999; Encina y col., 2001; 2002; Alonso-Simón y col., 2004; García-Angulo y col., 2006; 2009; Mérida y col., 2009; 2010a; 2010b; 2011).

La habituación a DCB reside en la capacidad que las células tienen de dividirse y crecer con un contenido reducido en celulosa en la pared celular. En este proceso se produce una serie de cambios estables, que difieren en cuanto al tipo de pared celular que presentan las células. En el caso de cultivos de maíz habituados a concentraciones letales de DCB, los cambios que acompañan a la habituación residen, sobre todo, en la compensación de la pérdida de celulosa con incrementos en el contenido de ácidos fenólicos y arabinoxilanos. Además estos arabinoxilanos difieren de los que presentan las células no habituadas, ya que tienen mayor masa molecular, se unen más fuertemente a la pared y se encuentran más entrelazados por dehidroferulatos (Mérida y col., 2009; 2010a; 2010b y 2011). Los cambios asociados a la habituación a altas concentraciones de DCB son muy drásticos y se han observado tras largos periodos en presencia del inhibidor. Sin embargo, es posible que estas modificaciones tengan lugar de manera paulatina y que por lo tanto estemos perdiendo valiosa información acerca del mecanismo de habituación durante los primeros estadios. Además, ha sido previamente demostrado en cultivos celulares de alubia que los cambios producidos por la habituación a DCB difieren (tanto cualitativamente como cuantitativamente) dependiendo de su concentración en el medio como del periodo de tiempo que las células permanecen expuestas a él (Alonso-Simón y col., 2004; Mérida y col., 2009). Por otro lado, el hecho de que altas concentraciones del inhibidor provoquen importantes modificaciones celulares podría limitar la realización de determinados tipos de análisis, como los estudios metabólicos in vivo, entre otros. Por tanto, el empleo de suspensiones celulares de maíz habituadas a bajas concentraciones de DCB es una valiosa herramienta para estudiar en profundidad la plasticidad estructural de las paredes celulares tipo II, particularmente desde un punto de vista metabólico.



## OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis es esclarecer los mecanismos subyacentes a la plasticidad estructural de las paredes celulares primarias tipo II, haciendo énfasis en las estrategias metabólicas. Para llevarlo a cabo, se utilizarán cultivos celulares de maíz habituados a bajos niveles de DCB. Este objetivo principal se divide a su vez en cuatro sub-objetivos parciales, enumerados a continuación:

### Objetivo I

Monitorización y caracterización de las modificaciones que suceden durante los primeros pasos del proceso de habituación a DCB

Las células habituadas a DCB son capaces de desarrollar estrategias para sobrevivir en presencia del inhibidor, que varían dependiendo del tipo de pared celular, la concentración de DCB o el periodo de tiempo en el cual las células se encuentran creciendo en contacto con el (Alonso-Simón y col., 2004). Las modificaciones producidas en las paredes de células de maíz habituadas a DCB han sido previamente estudiadas mediante el empleo de concentraciones letales del inhibidor y tiempos prolongados de habituación (Mélida y col., 2009). Sin embargo, se desconocen los cambios que acontecen durante los primeros momentos del proceso de habituación. Por este motivo, el primer objetivo del presente estudio es a) la monitorización de las modificaciones que tienen lugar durante la habituación temprana a DCB, b) la selección de una línea celular que muestre tanto características de esta habituación incipiente, como una reducción moderada en el contenido en celulosa y, c) la consiguiente caracterización de sus patrones de crecimiento y composición de sus paredes celulares. Para acometerlo, se emplearán técnicas tanto espectrofotométricas como cromatográficas y de inmunoanálisis.

### Objetivo II

Análisis del metabolismo hemicelulósico de células con niveles incipientes de habituación a DCB

Las suspensiones celulares de maíz habituadas a DCB son capaces de contrarrestar el empobrecimiento en celulosa presente en sus paredes mediante la adquisición de una red modificada de arabinoxilanos tanto a nivel cuantitativo como cualitativo (Mélida y col., 2009; 2010a; 2010b; 2011). A raíz de estos antecedentes, surge el segundo objetivo de este trabajo, que será el estudio del metabolismo de polisacáridos en células de maíz con una reducción moderada en el contenido en celulosa. Este estudio se realizará a lo largo del ciclo de cultivo a través experimentos de radio-marcaje in vivo, suministrando a las células [3H]arabinosa como precursor metabólico en fase de acomodación, exponencial y estacionaria. Posteriormente, se rastreará tanto la síntesis como el destino celular de hemicelulosas y polímeros marcados radioactivamente, en varios compartimentos celulares durante 5 h.

### Objetivo III

Estudio de la distribución de masas moleculares de polisacáridos y metabolismo fenólico en células de maíz con una reducción moderada en el contenido en celulosa

En estudios previos realizados en células de maíz habituadas a DCB, se han descrito paredes celulares reforzadas a través del desarrollo de una red de arabinoxilanos con mayores masas moleculares y más entrecruzados, que además presentaban un menor grado de extractabilidad de la pared (Mélida y col., 2009;



2011). Sin embargo, estos estudios fueron realizados en arabinosilanos aislados únicamente de la pared celular y en una fase final del ciclo de cultivo. Por esta razón, el tercer objetivo del presente trabajo será el análisis, en células de maíz con una reducción leve en el contenido en celulosa, de la distribución de masas moleculares de polisacáridos en varios compartimentos celulares a lo largo del ciclo de cultivo. Para llevarlo a cabo, empleando como metodología experimentos de radio-marcaje in vivo, se administrará a las suspensiones celulares  $[3H]$ arabinosa y ácido  $[14C]$ cinámico como precursores metabólicos para hemicelulosas e hidroxicinamatos, respectivamente.

#### Objetivo IV

##### Análisis del proteoma de Golgi en células de maíz habituadas a DCB

La plasticidad estructural mostrada por las paredes de células de maíz cuando son habituadas a DCB innegablemente incurre en su metabolismo y por ende, en las proteínas responsables de las respuestas exhibidas. Teniendo en cuenta que importantes enzimas metabólicas son proteínas residentes en el aparato de Golgi, se obtendrán fracciones enriquecidas en dicho orgánulo tanto de células de maíz no habituadas como habituadas a diferentes niveles de DCB. En primer lugar, se realizará un análisis comparativo del proteoma de Golgi de las diferentes líneas celulares mediante electroforesis bidimensional. Posteriormente, aquellas proteínas de interés que se acumulen diferencialmente entre líneas se secuenciarán mediante MALDI-TOF/MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) o ESI-MS/MS (electrospray ionization with tandem mass spectrometry).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivos celulares

Las suspensiones celulares se obtuvieron a partir de callos de maíz (*Zea mays* L., Black Mexican) procedentes de embriones inmaduros, en medio líquido Murashige y Skoog que contenía 2,4-D 9  $\mu$ M, sacarosa 20 g L<sup>-1</sup> (pH 5,6). Las suspensiones se mantuvieron en agitación orbital, a 25°C, fotoperiodo de 16 h y fueron subcultivadas cada 15 días.

### Habitación a DCB

El proceso de habitación a DCB se realizó cultivando suspensiones celulares de maíz no habituadas (Snh) en presencia del inhibidor. En el caso de suspensiones habituadas a bajos niveles de DCB, células Snh se subcultivaron y fueron mantenidas en tres concentraciones iniciales de DCB: 0,3  $\mu$ M (Sh0,3), 0,5  $\mu$ M (Sh0,5) y 1  $\mu$ M (Sh1). Después de varios subcultivos, parte de las células procedentes de las suspensiones mantenidas en DCB 1  $\mu$ M se transfirieron a un medio que contenía DCB 1,5  $\mu$ M (Sh1,5).

Las células de maíz habituadas a altas concentraciones de DCB se obtuvieron a partir de callos de maíz habituados a DCB 12  $\mu$ M, que se transfirieron a medio líquido conteniendo DCB 6  $\mu$ M (Sh6).



#### Caracterización de los cultivos celulares

Se realizó una cinética de crecimiento de las suspensiones celulares de maíz midiendo el incremento en peso seco para cada intervalo de tiempo a lo largo de todo el ciclo de cultivo, y se estimaron varios parámetros de crecimiento como el tiempo de duplicación, la tasa relativa y la tasa máxima de crecimiento.

Para la determinación del tamaño de agregado, las suspensiones celulares de maíz se filtraron a través de filtros de nylon de diferente tamaño de poro, expresando el resultado final como porcentaje de peso seco retenido en cada filtro respecto al total.

Aislamiento de fracciones de diversos compartimentos celulares de suspensiones celulares de maíz

Obtención del medio extracelular y extracción del contenido protoplasmático

Alícuotas de suspensiones celulares se filtraron a través de columnas Poly-Prep. El filtrado resultante libre de células, se recogió y consideró la fracción correspondiente al medio extracelular (CFM). En los estudios llevados a cabo con [3H]arabinosa como precursor metabólico, las células que quedaron retenidas en el filtro de la columna Poly-Prep se resuspendieron en un tampón de extracción del contenido protoplasmático y fueron homogeneizadas. A continuación, el homogeneizado resultante se hizo pasar a través de una segunda columna Poly-Prep para recoger el filtrado correspondiente, que fue centrifugado varias veces hasta que el sobrenadante se tornó transparente, momento en el cual se consideró como la fracción protoplásmica.

En el caso de los estudios realizados con ácido [14C]cinámico como precursor metabólico, se tomaron alícuotas de suspensiones celulares que se filtraron a través de columnas Poly-Prep o, alternativamente, se sometieron a centrifugación. El filtrado o sobrenadante se descartó, y las células se incubaron con etanol al 80%.

Posteriormente, las células se filtraron o centrifugaron y el filtrado o sobrenadante se recogió y se consideró como contenido similar al protoplásmico.

#### Obtención de fracciones enriquecidas en Golgi

Células procedentes de suspensiones celulares de maíz se pulverizaron en nitrógeno líquido y se homogeneizaron en tampón de extracción (Zeng y col., 2008). El homogeneizado se centrifugó y se recogió el sobrenadante. Este sobrenadante se cargó encima de tampón de sacarosa 2 M y fue sometido a ultracentrifugación para la obtención de la fracción microsomal. Después de esta primera ultracentrifugación, los microsomas quedaron localizados en una banda definida inmediatamente por encima de la fase correspondiente al tampón de sacarosa 2 M. La fracción superior a esta banda fue retirada y sobre la fracción microsomal se añadieron superpuestos una serie de tampones de sacarosa de concentraciones 1,3 M, 1,1 M y 0,25 M, con objeto de crear un gradiente discontinuo. Este gradiente discontinuo se sometió de nuevo a ultracentrifugación, y la interfase generada entre los tampones de concentraciones 0,25 M y 1,1 M se recogió como fracción enriquecida en Golgi.

#### Extracción y fraccionamiento de paredes celulares

Dependiendo del enfoque experimental, se siguieron dos metodologías diferentes para la obtención de las paredes celulares y su posterior fraccionamiento. De esta manera, cuando los experimentos realizados no incluían el uso de compuestos radio-marcados, se llevó a cabo un protocolo más exhaustivo (protocolo A). En cambio, cuando la metodología incluía el uso y manejo de compuestos radioactivos, se empleó una versión simplificada por razones de seguridad (protocolos B1 y B2).

#### Protocolo A





Para la obtención de paredes celulares, las suspensiones celulares de maíz se sometieron a una homogeneización con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, y el homogeneizado se trató con etanol al 70% durante 5 días. El residuo resultante se trató con etanol al 70% y acetona y se dejó secar a temperatura ambiente para obtener el residuo insoluble en alcohol (AIR). Posteriormente el AIR fue tratado con dimetilsulfóxido y el residuo obtenido se incubó con  $\alpha$ -amilasa de páncreas porcino disuelta en tampón fosfato. Tras retirar la solución enzimática, el residuo se lavó con etanol al 70% y acetona y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se trató con fenol/acético/agua y finalmente se lavó con etanol al 70% y acetona y se dejó secar a temperatura ambiente. Se consideró que este residuo eran las paredes celulares. Las paredes celulares fueron sometidas a una serie de tratamientos para extraer de manera secuencial distintos tipos de polímeros. Primeramente, fueron tratadas con ácido t-1,2-diaminociclohexano-N,N,N $\epsilon$ ,N $\epsilon$ -tetra-acético (CDTA) y el residuo insoluble obtenido se incubó con KOH 0,1 M. Al residuo resistente a esta extracción se le añadió KOH 4 M y de nuevo, el residuo obtenido de la fracción anterior fue sometido a un último tratamiento con KOH 6 M. Los sobrenadantes de cada uno de los tratamientos constituyeron las fracciones CDTA; KOH 0,1 M; KOH 4 M y KOH 6 M.

Protocolo B1: estudios que implicaron el uso de [3H]arabinosa como precursor metabólico. En este caso, células procedentes de las suspensiones celulares de maíz se homogeneizaron y el homogeneizado resultante se filtró a través de una columna Poly-Prep. A los fragmentos celulares retenidos en el filtro se les trató con una solución de NaOH 0,1 M que contenía NaBH<sub>4</sub>. El residuo insoluble fue sometido a un segundo tratamiento con NaOH 6 M conteniendo NaBH<sub>4</sub>, y al material resistente se le consideró como polímeros fuertemente unidos a la celulosa.

Protocolo B2: estudios que implicaron el uso de ácido [14C]cinámico como precursor metabólico. Las células de suspensiones de maíz se re-suspendieron e incubaron en etanol al 80%. Posteriormente, se filtraron o, alternativamente, centrifugaron y el correspondiente filtrado o sobrenadante se descartó, considerando a los fragmentos celulares residuales el AIR. El AIR se saponificó mediante tratamiento con NaOH 0,5 M y la fracción soluble resultante del mismo se consideró la fracción NaOH 0,5 M. Dicha fracción fue acidificada con ácido acético y se procedió a realizar una primera partición en acetato de etilo. Consecutivamente, las muestras se secaron mediante vacío, y se re-disolvieron en agua acidificada, para volver a ser sometidas a una segunda partición en acetato de etilo. Las fases orgánicas se recogieron, secaron en vacío y re-disolvieron en propanol.

Las fracciones solubles obtenidas de los diferentes tratamientos fueron neutralizadas a pH 5 con ácido acético, dializadas y etiquetadas con el nombre del tratamiento correspondiente utilizado para su extracción.

#### Análisis de las paredes celulares

##### Valoración del contenido en celulosa

La cantidad de celulosa se cuantificó espectrofotométricamente mediante el método de Updegraff (Updegraff, 1969) con las condiciones hidrolíticas descritas por Saeman (Saeman y col., 1963). La glucosa liberada se valoró por el método de la antrona (Dische, 1962).

##### Valoración del contenido en azúcares



La determinación del contenido de azúcares totales de cada fracción se realizó espectrofotométricamente mediante el método del fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956) y la de ácidos urónicos mediante el método del m-hidroxifenil (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1963) utilizando como estándares glucosa y ácido galacturónico respectivamente. El contenido en azúcares neutros se realizó mediante cromatografía de gases según el método descrito por Albersheim y col. (1967).

#### Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Con objeto de monitorizar los cambios ocurridos en las paredes celulares de las diferentes líneas de maíz, se utilizó FTIR. Para ello, las paredes celulares procedentes de suspensiones, se mezclaron con KBr y se homogeneizaron en un mortero de ágata, hasta conseguir un polvo fino. Posteriormente se comprimieron en una prensa Graseby-Specac, obteniéndose las pastillas necesarias para el análisis y que se realizó mediante el empleo de un espectroscopio Perkin-Elmer. Una vez obtenidos los espectros FTIR se corrigió su línea base y se normalizaron sus áreas.

#### Inmuno-ensayos

La composición de las diferentes fracciones obtenidas en el fraccionamiento de las paredes celulares se analizó mediante ensayos de inmunodot. Para ello, se tomaron alícuotas de 1  $\mu$ l de distintas diluciones de las fracciones, y se colocaron en orden decreciente en membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas se incubaron con una endo-poligalacturonasa, una  $\alpha$ -xilanasasa y una endo-arabinanasa (para más detalle ver el apartado de digestiones enzimáticas) aplicando la metodología descrita en Øbro y col. (2007) con ligeras modificaciones. Después de los tratamientos enzimáticos, las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con tampón fosfato salino (PBS) con leche en polvo, y se incubaron con anticuerpos primarios específicos para diferentes tipos de polisacáridos pécticos y hemicelulósicos. Se lavaron las membranas con agua y PBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-rata conjugado con peroxidasa de rábano. Después de lavar las membranas con PBS y agua milli-Q para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, se añadió la solución sustrato para proceder al revelado de las membranas.

La cuantificación del inmuno-marcaje mostrado en cada fracción se realizó otorgando valores correspondientes al número de diluciones que exhibían marcaje. Estos valores fueron después utilizados para generar los heatmaps (para más detalle ver el apartado correspondiente al análisis estadístico).

#### Análisis de expresión génica: aislamiento de ARN total, RT-PCR y PCR

El ARN total se extrajo empleando el reactivo comercial Trizol, y fue posteriormente retro-transcrito mediante el sistema  $\lambda$  Superscript III first strand synthesis system  $\lambda$ . El ADN complementario se generó usando un cebador oligo(dT)20, que fue utilizado como cadena molde en las consiguientes reacciones de PCR. Para cada análisis de expresión se hicieron pruebas variando el número de ciclos de las reacciones de PCR con objeto de determinar aquellas condiciones óptimas en las que la amplificación se encontrase dentro del rango exponencial. Como gen control se empleó el de la ubiquitina.

#### Análisis de expresión de genes ZmCESA



Para llevar a cabo el análisis de los genes ZmCESA1 (AF200525), ZmCESA2 (AF200526), ZmCESA3 (AF200527), ZmCESA5 (AF200529), ZmCESA6 (AF200530) y ZmCESA7 (AF200531) se usaron los cebadores específicos para ellos descritos en Holland y col. (2000). Debido a que los genes ZmCESA1 y ZmCESA2 poseen una alta homología de secuencia, se utilizó el mismo cebador para estudiar la expresión de ambos genes. En el caso de ZmCESA4 (AF200528) y ZmCESA8 (AF200532), se emplearon los cebadores descritos en Mérida y col. (2010a).

#### Análisis de expresión de genes homólogos IRX de arabidopsis

Se diseñaron y emplearon cebadores específicos para el análisis en maíz de los genes GRMZM2G100143, GRMZM2G059825 y gbIBT036881.1 homólogos de IRX10 (AT1G27440), IRX10-L (AT5G61840) y IRX9 (AT2G37090) respectivamente en arabidopsis (Bosch y col., 2011). Las secuencias de dichos cebadores derivaron de la base de datos *¿maize genome browser¿* para el caso de GRMZM2G100143 y GRMZM2G059825 y *¿Phytozome¿* para gbIBT036881.1.

#### Experimentos de radiomarcaje in vivo

##### Estudios que implicaron con [3H]arabinosa como precursor metabólico

Se recogieron alícuotas de suspensiones celulares de maíz en diferentes etapas del ciclo de cultivo y se les suministró L-[1-3H]arabinosa. La incorporación de [3H]arabinosa en los diferentes compartimentos celulares se midió a distintos tiempos en cada etapa de cultivo.

##### Estudios con ácido [14C]cinámico como precursor metabólico

El ácido [14C]cinámico se sintetizó partiendo de L-[U-14C]fenilalanina, siguiendo básicamente el método descrito en Lindsay y Fry. (2008). A las alícuotas de suspensiones de maíz se les suministró ácido [14C]cinámico en diferentes puntos del ciclo de cultivo y, tanto la incorporación del precursor como su consumo, se midieron a diferentes tiempos.

Cuando fue requerido, a algunas de las muestras se les añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 120 min después de la administración de ácido [14C]cinámico, y se mantuvieron durante 60 min más en condiciones de agitación.

La radioactividad presente en las muestras se analizó en un contador de centelleo.

#### Digestiones enzimáticas

Previamente al tratamiento enzimático con Driselasa las muestras se secaron en vacío y se sometieron a una hidrólisis suave en ácido trifluoroacético (TFA). Finalmente se volvieron a secar y el material seco se redisolvió en una solución de Driselasa al 0,5% (p/v) en piridina/ácido acético/agua y se incubó a 37°C durante 96 h. La reacción se paró mediante la adición de ácido fórmico al 15%.

Los tratamientos con endo-poligalacturonasa (M2) extraída de *Aspergillus aculeatus* (E-PGALUSP) (EC 3.2.1.15), *¿-xilanas* recombinante de *Neocallimastix patriciarum* (E-XYLNP) (EC 3.2.1.8) y endo-arabinanasa de *Aspergillus niger* (E-EARAB) (EC 3.2.1.99) se llevaron a cabo a 37°C durante 24 h. Para ello, las enzimas se disolvieron en tampón acetato 350 mM pH 4.7 a una concentración de 1 U/ml.

#### Cromatografía



### Cromatografía en papel

Para llevar a cabo la cromatografía en papel se utilizó papel Whatman 3 MM, y el tipo de solvente y la duración variaron dependiendo de los componentes a separar. De esta manera, para la separación de monosacáridos, se realizó en butanol/ácido acético/agua durante 16 h. En aquellos casos en que fue necesaria la separación de monosacáridos, disacáridos y material polimérico a RF 0, la cromatografía en papel se llevó a cabo empleando acetato de etilo/piridina/agua durante 18 h (Thompson y Fry, 1997). Posteriormente, se procedió a la tinción de los cromatogramas con ftalato de anilina (Fry, 2000) y se revelaron a 105°C.

### Cromatografía de Filtración en Gel

Los polímeros se fraccionaron por tamaños usando una columna de Sefarosa CL-4B por la que se hizo pasar un flujo de piridina/ácido acético/agua de 12,5 ml/h. La columna fue previamente calibrada con dextranos de masas moleculares relativas medias (Mw) conocidas. Mediante el método del Kav (1/2) (Kerr y Fry, 2003) se obtuvo la ecuación de calibración  $[\log Mw = -3,547 K_{av}(1/2) + 7,2048]$  que se empleó posteriormente para los cálculos necesarios.

### Cromatografía de Gases

Las muestras fueron previamente liofilizadas e hidrolizadas en TFA 2 M a 121°C durante 1 h. Los azúcares resultantes se derivatizaron a alditol acetatos y se analizaron mediante una columna Supelco SP-2330 (Albersheim y col., 1967).

### Cromatografía en Capa Fina

Se realizó en placas de plástico con silica gel como fase inerte, conteniendo indicadores de fluorescencia. Como solvente se empleó benceno/ácido acético y para su revelado las placas se expusieron a 321 nm.

### Electroforesis

#### Electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los análisis se llevaron a cabo tanto en condiciones semi-nativas como en desnaturalizantes, no hirviendo o hirviendo, respectivamente, las muestras. Posteriormente se separaron en geles de acrilamida del 7,5%, 10% o 12,5%. Como tinciones se emplearon coomassie brilliant blue (CBB) R-250 o nitrato de plata.

#### Electroforesis bidimensional

Antes de la realización de la electroforesis bidimensional, fueron necesarios ciertos pasos previos para la preparación de las muestras. Para ello, se liofilizaron alícuotas de las mismas que posteriormente se disolvieron en el tampón específico para la electroforesis bidimensional, el tampón de lisis. Una vez disueltas, se incubaron en un baño de ultrasonidos, se centrifugaron y se recogió el sobrenadante, que fue dializado. A continuación, las muestras se concentraron mediante el sistema de columnas Vivaspín, hasta que se obtuvo la concentración de proteína necesaria.

Subsiguientemente, con objeto de realizar la separación en la primera dimensión se utilizaron gradientes inmovilizados con un rango de pH 4-7. La separación en la segunda dimensión se realizó en geles SDS-PAGE al 10%. Los geles resultantes se tiñeron empleando CBB G-250 (Campos y col., 2010) o mediante tinción de plata (Shevchenko y col., 1996; Irar y col., 2006) en función de la cantidad de proteínas a resolver, siendo este último de mayor sensibilidad. Una vez teñidos, los geles fueron escaneados y la adquisición de las imágenes se



realizó a 16-bits/canal, 300 dpi (en escala de grises) y en formato TIFF. Las imágenes generadas se utilizaron para realizar el análisis proteómico (Farinha y col., 2011), fueron integradas y los spots identificados. A estos spots de manera automática les fueron asignados una intensidad, volumen, área y el parámetro saliency, que integra a todos ellos. En este caso el parámetro normalizado utilizado fue el %Volumen o volumen normalizado. Cuando los datos mostraron variaciones superiores a un valor del 0,5 del volumen normalizado y 1 del ratio se realizó el análisis estadístico, con la consecuente validación de los resultados mediante el Test-t con un valor p del 0,05 (Farinha y col., 2011). Los spots de interés fueron cortados y se procedió a su identificación mediante MALDI-TOF y por ESI-MS/MS. Para la identificación de proteínas se utilizaron las bases de datos de NCBI y Swissprot. Los programas de búsquedas utilizados fueron SEQUEST y MASCOT.

#### Análisis estadísticos

El análisis de componentes principales (PCA) se realizó con un máximo de cinco componentes principales en el software Statistica 6.0.

Para el análisis de diferencias significativas se realizó un test ANOVA de una vía con una prueba de Tukey's como análisis post-hoc en el software PASW Statistics 18 o bien el Test-t con un valor p del 0,05.

Los heatmaps se realizaron empleando el software Rkward.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La habituación a DCB se basa en el desarrollo de estrategias que implican cambios tanto en el metabolismo como en la arquitectura de la pared celular, para superar la limitación que supone el hecho de tener paredes deficitarias en celulosa. En el caso específico de las células de maíz habituadas a crecer en concentraciones letales de DCB, se ha observado que una remodelación cuantitativa y cualitativa de la red de arabinosilanos juega un papel clave en una gran parte de estas estrategias (Mélida y col., 2009; 2010a; 2010b; 2011). Sin embargo, también se ha demostrado que la variedad de respuestas de adaptación depende del tipo de pared celular, así como de la concentración de DCB y el tiempo de exposición al inhibidor (Alonso-Simón y col., 2004; Mélida y col., 2009). Dado que los estudios previos en células de maíz habituadas a DCB se han llevado a cabo con altas concentraciones del inhibidor y períodos de habituación a largo plazo, la información acerca de las primeras modificaciones que tienen lugar durante el proceso de habituación se pierde. Tal información puede resultar muy valiosa ya que durante los primeros estadios de la habituación las células podrían presentar una gran variedad de respuestas. Por lo tanto, en la presente tesis se ha realizado un extenso análisis de las modificaciones que tienen lugar en los primeros pasos del proceso de habituación a DCB.

#### Monitorización de los cambios acontecidos en los primeros pasos del proceso de habituación a DCB

En primer lugar, se procedió a identificar una línea celular de maíz que mostrara características de una temprana o incipiente habituación a DCB (de Castro et al., 2013; Capítulo I). Por esta razón, suspensiones celulares de maíz Snh fueron sub-cultivadas durante varios ciclos de cultivo en diferentes concentraciones de DCB (partiendo de 0,3  $\mu\text{M}$  hasta 1,5  $\mu\text{M}$ ), y las modificaciones en la pared celular se monitorizaron mediante espectroscopía FTIR (Figuras I.1 a 3) y valoraciones del contenido en celulosa (Figura I.4) Los resultados revelaron que la principal modificación de la pared celular durante la habituación a DCB está relacionada con el contenido en celulosa. Las células que crecían en las concentraciones más bajas de DCB presentaron inicialmente una reducción en el contenido en celulosa que posteriormente revirtió hasta valores próximos a los de Snh, a medida que se incrementaban los ciclos de cultivo en presencia del inhibidor (Figura I.4). Dado que se



había observado previamente que las células habituadas a altas concentraciones de DCB presentaban fluctuaciones en el nivel de expresión de algunos genes ZmCESA (Mélida y col., 2010a) se procedió a evaluar su expresión también en células habituadas a bajas concentraciones de DCB (Figura I.5). Al igual que en los procesos de habituación a altos niveles (Mélida y col., 2010a), los resultados mostraron una inducción de ZmCESA7 y ZmCESA8 en células de maíz habituadas a bajos niveles. Dicha coincidencia podría indicar que CESA7 y CESA8 actúan de manera más eficiente en presencia de DCB, por lo que podrían tener un papel en la habituación a todos los niveles.

Los resultados de la monitorización dieron lugar a la selección de una línea Sh1,5 como la más adecuada para los posteriores análisis, basándonos en los siguientes criterios: a) presentó una reducción no reversible de un 33% del contenido en celulosa respecto al control (Figura I.4), dicha reducción puede considerarse leve si se compara con el 75% de reducción que presentan las líneas habituadas a largos tiempos y elevadas concentraciones de DCB (Mélida y col., 2009); b) los espectros FTIR mostraron que, además de la celulosa, también otros polisacáridos estaban afectados en esta línea (Figuras I.1 y 2); c) los resultados de PCA apuntan a diferencias no solo con las células control sino también con respecto al resto de las líneas habituadas monitorizadas (Figura I.3), lo que indicaría características de una habituación incipiente.

#### Caracterización de la línea celular de maíz habituada a bajos niveles de DCB

La amplia caracterización de la línea Sh1,5 y de sus paredes celulares reveló factores comunes en la habituación de maíz a DCB a todos los niveles. Algunas de las características comunes de las células habituadas a DCB es que muestran cinéticas de crecimiento retrasadas y parámetros de crecimiento alterados respecto a las de las células control (Figura I.6), desarrollo celular en forma de grandes agregados (Figura I.7) y un incremento neto en arabinoxilanos (Figura I.8). Sin embargo, también se han encontrado diferencias en los tipos de modificaciones de la pared celular. En primer lugar, durante los primeros estadios de la habituación, el incremento en arabinoxilanos se produjo en fracciones de polisacáridos fácilmente extraíbles (Figura I.8), contrastando con los arabinoxilanos más fuertemente unidos que presentaban las líneas habituadas a altos niveles de DCB (Mélida y col., 2009). Además, otros polisacáridos como el xiloglucano, el ramnogalacturonano I y el homogalacturonano con bajo grado de metil esterificación parecen estar involucrados en los primeros pasos de la habituación (Figura I.9B). Los tratamientos enzimáticos específicos para pectinas, hemicelulosas y cadenas laterales de algunos polisacáridos, afectaron de manera diferencial a las líneas celulares control y estas líneas habituadas (Figura I.10). Esto podría indicar diferencias estructurales en los polisacáridos de ambas líneas, lo cual permitiría una acción enzimática más o menos eficaz. No obstante, son necesarios análisis más profundos para verificar esta hipótesis.

Estudios similares realizados en cultivos celulares de alubia habituados a DCB mostraron que estas células con pared celular tipo I compensaban su pérdida en celulosa modificando la red péctica y hemicelulósica (Encina y col., 2001; García-Angulo y col., 2006). Las células de maíz presentan paredes de tipo II en las que el xiloglucano y las pectinas no son componentes mayoritarios. Sin embargo, es de destacar que cuando son habituadas a DCB, comparten características con células de alubia. En sus paredes celulares tipo I, xiloglucano y pectinas sí son componentes principales y tienen un papel relevante en la habituación a DCB (Encina y col., 2001; 2002; Alonso-Simón y col., 2004; 2011; García-Angulo y col., 2006; 2009). Por otro lado, en las células de maíz habituadas a altos niveles de DCB el contenido en pectinas o xiloglucano no se vio modificado o incluso fue reducido (Mélida y col., 2009).

Estos resultados ponen en evidencia la elevada capacidad de los cultivos celulares de maíz para modificar la



arquitectura de la pared celular, con el fin de adaptarse a los distintos niveles de habituación a DCB.

**Análisis del metabolismo de polisacáridos de células de maíz habituadas a bajos niveles de DCB**

Dado que es esperable que tales respuestas de plasticidad estructural estén relacionadas con el metabolismo, se eligieron células habituadas a DCB como sistema experimental para indagar en el metabolismo de los polisacáridos de la pared celular y en las interacciones que entre ellos tengan lugar. De este modo, células de maíz Snh y Sh1,5 fueron cultivadas en presencia de [3H]arabinosa como precursor metabólico en diferentes etapas del ciclo de cultivo, con el objetivo de aislar distintos compartimentos celulares y fracciones de pared para su posterior análisis (Capítulo II). Además, con el fin de comprobar si estaba siendo particularmente afectado un tipo específico de polisacárido, las muestras se sometieron a digestión enzimática con Driselasa.

**Tráfico celular y caracterización de hemicelulosas y otros polímeros**

Se realizó un seguimiento del metabolismo, así como del tráfico celular de hemicelulosas ([3H]arabinosilanos y [3H]xiloglucano) y otros polímeros ([3H]polímeros que contienen arabinosa y polímeros no digeridos por Driselasa). En primer lugar, se observó que ambas líneas celulares diferían en la toma del precursor radio-marcado. Mientras que las células Snh mostraron una tendencia similar a la observada previamente en cultivos celulares de maíz (Kerr y Fry, 2003) y rosa (Edelmann y Fry, 1992; Thompson y col., 1997), las células Sh1,5 mostraron una capacidad menor en la toma de [3H]arabinosa (Figura II.1). Además, en todas las fases de cultivo analizadas (Figura II.2) las células Sh1,5 fueron metabólicamente más lentas y menos eficientes que las células Snh y que otros cultivos celulares de maíz (Kerr y Fry, 2003). Dicha reducción en la capacidad metabólica afectó por igual a la síntesis, la incorporación a pared celular o la liberación al medio de cultivo de arabinosilanos, xiloglucano, polímeros que contienen arabinosa y polímeros no digeridos por Driselasa (Figuras II.3 a 6).

La extractabilidad de los arabinosilanos de la pared celular también se vio modificada en función del nivel de habituación. Los cultivos celulares habituados a altos niveles de DCB presentaron arabinosilanos más difícilmente extraíbles que las líneas Snh (Mélida y col., 2009; 2011) y Sh1,5.

La siguiente cuestión que se planteó fue si las 3H-hemicelulosas o los 3H-polímeros de las células Sh difieren de alguna manera de los correspondientes a las células Snh. Las 3H-hemicelulosas de las células Sh presentaron un incremento en la relación [3H]arabinosa/[3H]xilano lo cual podría estar indicando la presencia de arabinosilanos más sustituidos en estos cultivos (Tabla II.1). No obstante, este resultado se debe tomar con cautela ya que otros polisacáridos también pueden aportar restos de arabinosa, como los arabinogalactanos de las arabinogalactano proteínas y determinadas cadenas laterales del ramnogalacturonano (para más detalle ver Fry, 2011). Sin embargo, el análisis de las fracciones obtenidas de la pared celular de células Sh1,5 reveló bajos contenidos de ácidos urónicos así como de restos de galactosa y ramnosa (Figura I.8). Por lo tanto, se puede asumir que la mayor parte de los restos de arabinosa derivan de moléculas de arabinosilanos.

**Destino celular de hemicelulosas y otros polímeros**

El destino celular de los 3H-polímeros cuando abandonan el protoplasma también fue distinto en Sh1,5 (Figura II.2). Al contrario de lo observado en altos niveles de habituación (Mélida y col., 2009; 2011), las células Sh1,5 presentaron una reducción en la cantidad de hemicelulosas fuertemente unidas a la pared (las extraídas con NaOH 6 M). Además, las células Sh1,5 mostraron un incremento relativo en hemicelulosas extraídas con tratamientos suaves (NaOH 0,1 M) (Figura II.4), lo cual coincide con resultados anteriores (Figura I.8). Por



último, se observó un incremento de polisacáridos extracelulares (SEPs) liberados al medio de cultivo (Figura II.6). Estos SEPs pueden incluir polímeros que han sido sintetizados recientemente y excretados al medio sin unirse a la pared, y polímeros que fueron integrados a la pared y más tarde han sido liberados al medio de cultivo (Kerr y Fry, 2003; Mérida y col., 2011). Sin embargo esta última posibilidad puede descartarse, ya que no se observó en las células Sh1,5 una disminución en la incorporación de radiactividad en las fracciones obtenidas de la pared, sincrónicamente con un aumento de la misma en el medio de cultivo. Este hecho puede tener dos posibles explicaciones: a) dado que las células Sh1,5 contienen menos celulosa en sus paredes, se produciría un descenso en los posibles puntos de unión para otros polisacáridos, y/o b) las líneas Sh1,5 podrían tener una menor capacidad para incorporar polisacáridos a través de enlaces fenólicos. Esta alternativa es particularmente interesante ya que en la habituación de células de maíz a niveles altos de DCB, se ha demostrado que la presencia de una red más desarrollada de arabinoxilanos unidos mediante acoplamiento fenólico oxidativo es decisiva en las estrategias de reforzamiento de la pared (Mérida y col., 2009; 2011). La importancia del incremento del acoplamiento oxidativo reside en que produce moléculas de arabinoxilano con mayores Mw, cruciales para reforzar unas paredes celulares que muestran un 75% de reducción en celulosa.

#### Análisis de la distribución de masas moleculares y Mw de hemicelulosas y otros polímeros

Las Mw de hemicelulosas y polímeros recién sintetizados en células Sh1,5 fueron menores que los de Snh (Capítulo III), lo cual apoya la hipótesis de que estas líneas pudieran presentar menor capacidad para entrecruzar polisacáridos (Figuras III.1 y 2). Esta tendencia fue consistente en todo el ciclo de cultivo y en todos los compartimentos celulares (protoplasma y pared celular), así como en el medio extracelular para los diferentes tipos de polisacáridos y polímeros (Figuras III.1 a 5). Además, cuando se compararon las Mw de polímeros protoplásmicos con los de hemicelulosas unidas a la pared, se comprobó que los polímeros protoplásmicos recién sintetizados sufrían un intenso entrecruzamiento una vez incorporados a la pared (Figura III.2). Este comportamiento ya se había observado con anterioridad en suspensiones de maíz (Kerr y Fry, 2003), aunque fue menos marcado en Sh1,5 que en Snh. La explicación más plausible es que los polisacáridos son sometidos a un proceso de unión después de ser secretados en la pared celular. Tales mecanismos incluyen interacciones entre moléculas tanto de tipo no covalente como de tipo covalente, tales como formación de puentes iónicos, de hidrógeno, glicosídicos o acoplamiento oxidativo (Fry, 2000). Aunque conviene considerar todo tipo de interacciones, es esperable que los puentes de hidrógeno o el acoplamiento oxidativo sean especialmente importantes en el proceso de entrecruzamiento entre arabinoxilanos.

#### Estudio del metabolismo fenólico

En maíz, se sabe que la formación de dímeros u oligómeros de ácido ferúlico que entrelazan arabinoxilanos por acción de peroxidasas es el principal mecanismo por el cual aumenta la Mw de estas hemicelulosas (Fry y col., 2000). Por otra parte, y como se mencionó anteriormente, en las células de maíz habituadas a altas concentraciones de DCB este tipo de entrecruzamiento fenólico tiene un papel crucial en las estrategias de reforzamiento de la pared (Mérida y col., 2011). Por este motivo, se realizó un análisis del metabolismo del ácido cinámico, así como una caracterización de sus derivados en la pared celular, en células habituadas a bajos niveles de DCB (Figuras III.6 a 9). Las células Sh1,5 mostraron una escasa capacidad para incorporar en la pared celular polisacáridos con restos de ácido ferúlico o p-cumárico (Figuras III.6 a 9), lo cual apoyaría los resultados obtenidos previamente (Figura II.2). Los resultados que se han expuesto hasta ahora reforzarían la hipótesis de una disminución en la capacidad de las células Sh1,5 para llevar a cabo el entrecruzamiento de los





polisacáridos. Sin embargo, en términos relativos, el contenido en dímeros y oligómeros de ácido ferúlico fue mayor en células Sh1,5. Este hecho podría indicar que las Mw menores observadas en estas líneas no están relacionadas con un menor acoplamiento fenólico de los arabinoxilanos.

Dado que la reducción en el contenido de celulosa en las células habituadas a bajos niveles es considerablemente menor que en las habituadas a concentraciones altas de DCB (33% vs 75%), surge la posibilidad de que las células Sh1,5 estén sintetizando una mayor cantidad de moléculas con menor Mw como parte de su estrategia de habituación. En este sentido, se ha descrito con anterioridad que las hemicelulosas, específicamente el xiloglucano, con menores Mw pueden unirse más fácilmente a la celulosa (Lima y col., 2004). Además, Alonso-Simón y col. (2007) propusieron que un xiloglucano con menor Mw, junto con un incremento de la actividad xiloglucano-endo-transglucosilasa, podría contribuir a aumentar la rigidez de la pared en células de alubia habituadas a DCB. Estudios previos, realizados en niveles de habituación a DCB medios y altos, parecen indicar que a medida que disminuye el contenido en celulosa en las paredes aumenta progresivamente el tamaño (Mw) de las hemicelulosas unidas a pared (Mélida y col., 2009). En concordancia con esto se comprobó que las células de maíz habituadas a altos niveles de DCB presentaban un mayor nivel de expresión de los genes IRX ortólogos de arabidopsis implicados tanto en la iniciación como en la elongación de las cadenas de xilano (Figura III.10). Sin embargo las células Sh1,5 no mostraron cambios en la expresión de los genes implicados en la iniciación de la síntesis de xilanos, pero sí presentaron una menor expresión para los genes involucrados en la elongación. Este hecho podría explicar por qué las células Sh1,5 contienen hemicelulosas de cadenas más cortas.

Como consecuencia, es factible suponer que a pesar de tener menores Mw, las hemicelulosas y polímeros de células Sh1,5 están más entrelazados. Por lo tanto, la contribución de este tipo de enlaces parece ser otra característica común en el proceso de habituación a DCB en células de maíz.

#### Estudio del proteoma de Golgi en células de maíz habituadas a DCB

Como hemos visto, las células habituadas a crecer en presencia de DCB presentan alteraciones metabólicas que afectan entre otras cosas a la síntesis de polisacáridos de la pared. En lo referente al metabolismo de polisacáridos, el aparato de Golgi es uno de los orgánulos más importantes en eucariotas. En plantas es el orgánulo encargado no solo de la síntesis de polisacáridos sino también del procesamiento de algunas proteínas (Parsons y col., 2012). Por lo tanto, un estudio del proteoma de Golgi podría proporcionar una valiosa información sobre cómo las proteínas contribuyen a la plasticidad de las respuestas que muestran las células habituadas a DCB (Capítulo IV).

#### Obtención de fracciones enriquecidas en Golgi

Para abordar este objetivo se desarrolló un protocolo de obtención de fracciones enriquecidas en Golgi de células de maíz, no habituadas y habituadas a niveles bajos y altos de DCB, empleando un gradiente discontinuo de sacarosa (Figura IV.1). La caracterización general mostró que las fracciones obtenidas de células habituadas presentaban menor cantidad de proteína total pero mayor actividad IDPasa (actividad marcadora de Golgi; Tabla IV.1). Cuando la síntesis y secreción de polisacáridos tiene lugar, el aparato de Golgi experimenta ciertas diferenciaciones morfológicas, revirtiendo a su estado compacto cuando estas actividades cesan (Dauwalder y col., 1969). En este estudio se observó un aumento en los valores de actividad IDPasa en tejidos donde la síntesis y secreción de polisacáridos eran muy activas, valores que revirtieron a basales cuando ambos procesos dejaron de producirse. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la actividad IDPasa está



correlacionada con la síntesis de polisacáridos, más concretamente con los cambios morfológicos que experimenta el aparato de Golgi durante la secreción de este tipo de moléculas. Consecuentemente, nuestros resultados podrían apuntar a una síntesis potenciada de polisacáridos no celulósicos en las líneas habituadas, precisamente para contrarrestar la pérdida en celulosa.

Tras varios pasos de preparación de las muestras (Figuras IV.2 a 4 y Tabla 2), la fracción enriquecida en Golgi de cada una de las líneas fue sometida a electroforesis 2-D (Figura IV.5), ya que este tipo de metodología ha demostrado ser adecuada en estudios similares realizados con otras especies (Taylor y col., 2000; Wu y col., 2000). De todas las proteínas desreguladas (Tabla IV.3) aquellas de mayor interés fueron extraídas del gel para su posterior identificación.

#### Identificación de proteínas desreguladas

Los resultados de la secuenciación de dichas proteínas se muestran en la Tabla IV.4. Algunas de las proteínas secuenciadas (enolasa 1, chaperonina 60 y 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa 1 -ACO 1-) fueron coincidentes con otras encontradas en un estudio de proteoma total llevado a cabo anteriormente por nuestro grupo en células habituadas (Mélida y col., 2010a). Estos resultados parecen sugerir que estas proteínas juegan un importante papel en la habituación a DCB. Además, se detectó una ascorbato peroxidasa menos diferencialmente acumulada en las líneas habituadas, lo cual coincide con la menor actividad que presenta esta enzima en dichas líneas (Mélida y col., 2010a).

Los resultados apuntan a que algunas de las proteínas secuenciadas se encuentran desreguladas por efecto directo del DCB, y no tanto por la habituación al mismo. Por ejemplo, se ha descrito que la chaperonina 60 está implicada en el ensamblaje de la actina y la tubulina (Gutsche y col., 1999). Dado que el DCB actúa impidiendo la polimerización de los microtúbulos (Bisgrove y Kropf, 2001; Himmelspach y col., 2003; Rajangam y col., 2008), este hecho podría explicar por qué en células habituadas la chaperonina 60 aparece menos diferencialmente acumulada. Otro caso puede ser la represión observada en células habituadas para la  $\zeta$ -1,4-glucano sintasa, clasificada dentro del grupo de polipéptidos de glicosilación reversible (RGP). Aunque algunos RGPs están involucrados en la síntesis de polisacáridos de pared (Dhugga y col., 1997; Langeveld y col., 2002), su ausencia puede estar relacionada con una pared celular más debilitada, tal y como han demostrado para dobles mutantes de genes RGPs Drakakaki y col. (2006).

Por otro lado, otras proteínas diferencialmente acumuladas en las células habituadas parecen formar parte de la estrategia de adaptación a DCB. Algunas de ellas podrían participar como indicadores relacionados con la integridad de la pared celular cuando ésta se ve dañada. La enolasa 1, que aparece más acumulada en las células habituadas, se ha descrito como una señal de estrés en maíz (Sachs y col., 1996), así como su sustrato (hexosas) cuando la integridad de la pared celular se ve dañada (Hamann y col., 2003; Wolf y col., 2012). La ACO 1, enzima implicada en la síntesis de etileno, también se acumuló menos en las líneas habituadas. En este caso, es su sustrato, amino-ciclopropano-carboxílico (ACC), más que la enzima, el que presenta una relevancia fisiológica cuando la síntesis de celulosa se ve afectada (Tsang y col., 2011). Si los niveles de ACO 1 son menores en las células habituadas, su sustrato ACC sufrirá una acumulación en las células, lo cual podría activar la correspondiente ruta de señalización para comenzar con las estrategias de habituación.

La enzima cafeoil-CoA O-metiltransferasa 1 (CCoAOMT 1), que participa en la síntesis de unidades G y S de la lignina, apareció menos acumulada en las células habituadas a DCB. Ya se había descrito anteriormente que esta enzima era sustituida durante el proceso de habituación por la ácido cafeico 3-O-metiltransferasa (COMT), que participa en la síntesis de unidades S (Mélida y col., 2010a). Además, se ha visto en alfalfa que los cambios



cualitativos y cuantitativos en la composición de la lignina están relacionados con la represión de la enzima CCoAOMT (Guo y col., 2001). Curiosamente, resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que nuestras líneas celulares habituadas a DCB presentan diferencias cualitativas en la lignina, ya que ésta presenta un menor contenido en unidades G sin tener afectado el contenido de las unidades S.

No todas las proteínas que fueron secuenciadas son residentes de Golgi. Sin embargo, hay que considerar que el estudio se ha llevado a cabo con fracciones enriquecidas en Golgi, por lo que es esperable que puedan tener contaminaciones con otros orgánulos celulares (Hanton y col., 2005; Parsons y col., 2012). Además, dado que una de las funciones más importantes del aparato de Golgi es realizar modificaciones post-traduccionales en muchas proteínas, resulta difícil discriminar entre proteínas en tránsito o residentes.

Aunque la metodología empleada ha demostrado ser efectiva para el análisis de muestras similares en otras especies (Taylor y col., 2000; Wu y col., 2000), tiene la restricción de que las proteínas más abundantes enmascaran a las minoritarias (Timperio y col., 2008). Por otro lado, recientemente se ha visto que la interacción entre proteínas que forman parte de los complejos proteicos del Golgi puede diferir, y que este hecho afecta también a la función catalítica de los mismos (Oikawa y col., 2012). Por lo tanto, hay que considerar la posibilidad de que algunas de las proteínas desreguladas, aunque no tengan un papel fisiológico claro en la respuesta de habituación a DCB, podrían participar a través de su interacción con otras.

Puesto que las células habituadas tienen modificada la red de arabinosilanos, es plausible asumir que también presenten algún tipo de desregulación en las enzimas que los sintetizan. Se ha descubierto recientemente que la iniciación de la síntesis de polisacáridos de la pared celular y su maduración se produce en diferentes cisternas de Golgi, y que dicha localización varía dependiendo del tipo de célula (Driouich y col., 2012; Worden y col., 2012). Por lo tanto, sería esperable que las enzimas GTs encargadas de dicha síntesis y/o maduración estuvieran también ubicadas en distintas cisternas del aparato de Golgi. En futuros estudios sería interesante realizar un análisis más fino de las membranas contenidas en la fracción enriquecida en Golgi y comprobar en ellas distintas actividades GTs.

## CONCLUSIONES

1. La línea celular habituada a DCB 1,5  $\mu$ M (Sh1,5) mostró las características de una habituación incipiente al inhibidor. Estas células presentaron patrones de crecimiento alterados, entre los que se observaron cinéticas de crecimiento más lentas, tiempos de duplicación más largos y tasas de crecimiento más bajas que las células no habituadas (Snh). Además, crecieron desarrollando agregados celulares de mayores tamaños. La composición de sus paredes celulares también resultó modificada como consecuencia de la habituación a DCB: se observó una reducción del 33% en el contenido en celulosa que fue parcialmente compensado por un incremento en arabinosilanos. Además, aunque en menor medida, los contenidos de otros polisacáridos como el xiloglucano y el ramnogalacturonano tipo I parecen encontrarse modificados.

2. Los arabinosilanos de las células Sh1,5 constituyeron poblaciones más homogéneas en términos de masas moleculares, con tamaños medios más bajos y mayor grado de extractabilidad que los de las células Snh. Estas características fueron consistentes en todas las fases del ciclo de cultivo así como en los diferentes compartimentos celulares analizados: protoplasma, pared celular y en el medio extracelular. El destino celular de los polisacáridos se encontró también modificado en las células habituadas a DCB, que mostraron proporciones reducidas de hemicelulosas fuertemente unidas a la pared y un incremento de los polímeros



liberados al medio de cultivo. El análisis del metabolismo fenólico descartó que este último hecho fuese debido a una menor capacidad de las células Sh1,5 para entrelazar dichos polisacáridos.

3. La expresión de algunos de los genes implicados en la biosíntesis de celulosa y de xilanos resultó alterada durante la habituación a bajos niveles de DCB. De esta manera, según aumentaba el número de ciclos de cultivo en el que las células crecían en presencia de DCB, o cuando la concentración del mismo superó cierto umbral, las isoformas ZmCESA7 y ZmCESA8 resultaron inducidas. Este hallazgo da lugar a la hipótesis de que aunque menos eficientes en la síntesis de celulosa, las proteínas CESA7 y CESA8 serían más resistentes a los efectos de DCB. Los resultados del análisis de expresión de los genes ortólogos IRX de arábido, implicados tanto en la iniciación de la síntesis como en la elongación de las cadenas de xilanos, sugieren que solo ésta última se encontraría afectada en las células Sh1,5, lo cual contribuiría parcialmente a explicar las menores masas moleculares medias de estas moléculas observadas en esta línea celular.

4. Como consecuencia de la habituación a bajos niveles de DCB, el metabolismo de las células de maíz también resultó alterado, siendo menos eficiente y más lento a lo largo de todo el ciclo de cultivo. No obstante, aunque la síntesis, integración en la pared así como la liberación de los distintos tipos de polisacáridos al medio de cultivo se encontró retrasada con respecto a los de las células Snh, ocurrió de manera sincronizada.

5. Importantes enzimas metabólicas relacionadas con condiciones de estrés, síntesis de etileno o metabolismo de carbohidratos y lignina se encontraron diferencialmente acumuladas en las fracciones enriquecidas en Golgi de las células habituadas a DCB. Algunas de las proteínas desreguladas parecen estarlo debido a efectos directos del DCB, como la chaperonina 60 y la  $\beta$ -1,4-glucano sintasa. Sin embargo otras parecen estar implicadas en las estrategias de habituación a DCB, como la enolasa 1, la 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa 1, la ascorbato peroxidasa y la cafeoil-CoA O-metiltransferasa 1.

Los resultados del presente trabajo confirman que los cultivos celulares de maíz son capaces de adoptar distintas estrategias en función del nivel de habituación a DCB, lo que implica no sólo cambios en la composición de la pared celular, sino también importantes alteraciones metabólicas. Estas estrategias mostraron rasgos comunes a todos los niveles de habituación, como la presencia de una red de arabinoxilano modificada, cambios en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de celulosa o xilanos, o la desregulación en el metabolismo de algunas proteínas. Sin embargo, también se han observado alteraciones exclusivas asociadas a los distintos procesos de adaptación a DCB. Todos estos resultados ponen de manifiesto la notable plasticidad estructural de las células de maíz para hacer frente a diferentes grados de reducción en su contenido de celulosa.

