



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 363 231**

⑤ Int. Cl.:  
**C12N 15/29** (2006.01)  
**C12N 15/70** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)  
**C12Q 1/48** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨ Número de solicitud europea: **05708108 .5**  
⑨ Fecha de presentación : **27.01.2005**  
⑨ Número de publicación de la solicitud: **1721980**  
⑨ Fecha de publicación de la solicitud: **15.11.2006**

⑤ Título: **Procedimiento para la producción de sacarosa sintasa recombinante, su uso en la fabricación de kits de determinación de sacarosa, método de producción de ADPglucosa y método de obtención de plantas transgénicas cuyas hojas y órganos de reserva acumulen alto contenido en ADPglucosa y almidón.**

③ Prioridad: **05.02.2004 ES 200400257**

④ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.07.2011**

④ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.07.2011**

⑦ Titular/es: **Universidad Pública de Navarra  
Campus Arrosadía  
31006 Pamplona, ES  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

⑦ Inventor/es: **Baroja Fernández, Miren Edurne;  
Muñoz Pérez, Francisco José;  
Pozueta Romero, Francisco Javier;  
Morán Zorzano, María Teresa y  
Alonso Casajús, Nora**

⑦ Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

**Aviso:** En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de sacarosa sintasa recombinante, su uso en la fabricación de kits de determinación de sacarosa, método de producción de ADPglucosa y método de obtención de plantas transgénicas cuyas hojas y órganos de reserva acumulen alto contenido en ADPglucosa y almidón.

### 5 SECTOR DE LA TÉCNICA AL QUE SE REFIERE LA INVENCION

La invención se refiere a la optimización de la producción de sacarosa sintasa recombinante (SS) en forma soluble y activa haciendo uso de una cepa apropiada de *Escherichia coli*, la utilización de la SS para la elaboración de dispositivos (kits) de determinación de sacarosa, diseño de formas optimizadas de SS para la síntesis de ADPglucosa (ADPG), y a la obtención de plantas transgénicas cuyas hojas y tejidos de reserva acumulan altos niveles de ADPG y almidón enriquecido en amilosa como resultado de la sobreproducción de ADPG citosólico en plantas que sobreexpresan la SS.

### ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El almidón constituye la forma principal de almacenamiento de carbohidratos en plantas. Se acumula en grandes cantidades en órganos tales como semillas (trigo, cebada, maíz, guisante, etc.) y tubérculos (patata y batata entre otros) y es un constituyente fundamental de la dieta del ser humano. Por otro lado, el almidón es utilizado frecuentemente en las industrias papelera, cosmética, farmacéutica y alimentaria, y también se utiliza como componente fundamental para la fabricación de plásticos biodegradables y pinturas de bajo impacto medioambiental. Constituidos por moléculas de glucosa unidas covalentemente, el estudio de los procesos implicados en la síntesis de este polisacárido constituye un tema prioritario en diversos ámbitos de la producción industrial.

El ADPG es el precursor universal de la biosíntesis del almidón en plantas, tanto en órganos heterotróficos (Fig. 1A) como en hojas (Fig. 2A), y está ampliamente asumido que su producción está exclusivamente controlada por el enzima ADPG pirofosforilasa (AGPasa) o ADPG sintasa (EC 2.7.7.27) (Okita, T. W. (1992) Is there an alternative pathway for starch synthesis? *Plant Physiol.* 100, 560-56; Müller-Róber, B., Sonnewald, U. Willmitzer, L. (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* 11, 1229-1238; Stark, D.M., Timmerman, K.P., Barry, G.F., Preiss, J., Kishore, G.M. (1992) Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADPglucose pyrophosphorylase. *Science* 258, 287-282; Neuhaus, E.H., Háusler, R.E., Sonnewald, U. (2005) No time to shift the paradigm on the metabolic pathway to transitory starch in leaves. *Trends Plant Sci.* en prensa. Las diferentes aplicaciones del almidón producido en una planta están basadas principalmente en el balance de amilosa y amilopectina, el cual determina la estructura del granulo de almidón, así como su viscosidad en suspensiones acuosas. Tal proporción de amilosa y amilopectina depende, entre otras razones, de la concentración de ADPG en la célula vegetal (Clarke, B.R., Denyer, K., Jenner, C.F., Smith, A.M. (1999) The relationship between the rate of starch synthesis, the adenosine 5"-diphosphoglucose concentration and the amylose content of starch in developing pea embryos. *Planta* 209, 324-329).

La SS (EC 2.4.1.13, SS) (UDP-glucose:D-fructose-2-glucosyl transferase) es una enzima reversible que cataliza la producción de UDPG y fructosa a partir de la sacarosa y UDP. Aunque, tal y como se ilustra en la Fig. 1A, clásicamente se ha atribuido a la SS el papel de producir el UDPG cuyo procesamiento metabólico le da lugar a la producción eventual de almidón en tejidos heterotróficos tales como endospermos y tubérculos (Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L., Sonnewald, U. (1995) Evidence for the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants. *Plant J.* 7, 97-107; Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Saikusa, T., Rodríguez-López, M., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2003) Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant Cell Physiol.* 44, 500-509; Pozueta-Romero, J., Muñoz, F.J., Rodríguez-López, M., Baroja-Fernández, E., Akazawa, T. (agosto 2003) New waves in the starch field. *Lett. Plant Cell Physiol.* 24-32), existen referencias sobre la potencialidad del enzima de utilizar in vitro otros nucleótidos difosfato para la producción de los correspondientes azúcares-nucleótido (Murata, T., Sugiyama, T., Minamikawa, T., Akazawa, T. (1966) Enzymic mechanism of starch synthesis in ripening rice grains. Mechanism of the sucrose-starch conversion. *Arch. Biochem. Biophys.* 113, 34-44; Delmer, D. P. (1972) The purification and properties of sucrose synthase from etiolated *Phaseolus aureus* seedlings. *J. Biol. Chem.* 247, 3822-3828;). Aunque de cuestionada relevancia fisiológica (Okita, T. W. (1992) Is there an alternative pathway for starch synthesis? *Plant Physiol.* 100, 560-56; Müller-Róber, B., Sonnewald, U. Willmitzer, L. (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* 11, 1229-1238), se ha sugerido que la SS está capacitada para producir directamente ADPG utilizable para la producción de almidón tanto en tejidos heterotróficos como tejidos fotosintéticos (Figs. 1B y 2B) (Pozueta-Romero, J., Perata, P., Akazawa, T. (1999) Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18, 489-525; Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2001) Reappraisal of the currently prevailing model of starch biosynthesis in photosynthetic tissues: a proposal involving the cytosolic production of ADP-glucose by sucrose synthase and occurrence of cyclic turnover of starch in the chloroplast. *Plant Cell Physiol.* 42, 1311-1320; Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Saikusa, T., Rodríguez-López, M., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2003) Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant Cell Physiol.* 44, 500-509; Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Zandueta-Criado, A., Morán-Zorzano, M.T., Viale, A.M., Alonso-Casajús, N., Pozueta-Romero, J. (2004) Most of ADPglucose linked to starch biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 13080-13085). De acuerdo a esta hipótesis (basada única y circunstancialmente en evidencias de tipo bioquímico), la SS sería responsable de la síntesis

de un pool importante de moléculas de ADPG necesarias para la biosíntesis del almidón. Tal hipótesis sin embargo no ha sido demostrada experimentalmente mediante ingeniería genética o técnicas de mejora tradicional de cultivos, y no es consistente con las innumerables pruebas de tipo genético y molecular que indican que la AGPasa es la única fuente de ADPG en plantas (Okita, T. W. (1992) Is there an alternative pathway for starch synthesis? *Plant Physiol.* 100, 560-56; Müller-Róber, B., Sonnewald, U., Willmitzer, L. (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* 11, 1229-1238; Neuhaus, E.H., Háusler, R.E., Sonnewald, U. (2005) No time to shift the paradigm on the metabolic pathway to transitory starch in leaves. *Trends Plant Sci.* en prensa).

Azúcares-nucleótidos tales como el UDPG o el ADPG se producen para su comercialización a partir de reacciones pirofosforilásicas catalizadas por enzimas tales como la UDPG pirofosforilasa (UGPasa) y la AGPasa, respectivamente, basadas en la utilización de una sustancia de alto coste económico denominada glucosa-1-fosfato (G1P). Una alternativa a esta práctica de producción de azúcares-nucleótidos se basa en la utilización de SS cuyo desarrollo se ha visto impedido en gran medida por las limitaciones de *Escherichia coli* para expresar y procesar de manera eficiente un gran número de proteínas eucariotas. Tal limitación ha impulsado a algunos investigadores a producir SS recombinante haciendo uso de factorías biológicas de tipo eucariota tales como las levaduras (Zervosen, A., Römer, U., Elling L. (1998) Application of recombinant sucrose synthase-large scale synthesis of ADP-glucose. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* 5, 25-28; Romer, U., Schrader, H., Günther, N., Nettelstroth, N., Frommer, W.B., Elling, L. (2004) Expression, purification and characterization of recombinant sucrose synthase I from *Solanum tuberosum* L. For carbohydrate engineering. *J. Biotechnology* 107, 135-149). Alternativamente, la SS destinada a la producción de azúcares-nucleótidos ha tenido que ser purificada mediante costosos procesos de purificación de proteínas a partir de extractos vegetales (patente DE4221595 (1993), Purified sucrose synthase enzyme useful for production of nucleotide-activated sugars or oligosaccharides). Tal SS obtenida desde extractos vegetales tiene el inconveniente de que presenta una predilección por el UDP y muy baja afinidad por el ADP (Pressey R (1969) Potato sucrose synthase: purification, properties, and changes in activity associated with maturation. *Plant Physiol.* 44, 759-764; Nguyen-Quoc B., Krivitzky, M., Huber, S. C., Lechamy, A. (1990) Sucrose synthase in developing maize leaves. *Plant Physiol.* 94, 516-523; Morell, M., Copeland, L. (1985) Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiol.* 78, 149-154). Recientemente se ha logrado producir SS recombinante a partir de cultivos de *E. coli* (Nakai, T., Tonouchi, N., Tsuchida, T., Mori, H., Sakai, F., Hayashi, T. (1997) "Expression and characterization of sucrose synthase from mung bean seedlings in *Escherichia coli*" *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 1500-1503; Nakai, T., Konishi, T., Zhang, Z-Q., Chollet, R., Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Mori, H., Sakai, F., Hayashi, T. (1997) "An increase in apparent affinity for sucrose of mung bean sucrose synthase is caused by in vitro phosphorylation or directed mutagenesis of Ser11" *Plant Cell Physiol.* 39, 1337-1341; Barratt, D.H.P., Barber, L., Kruger, N.J., Smith, A.M., Wang, T.L., Martin, C. (2001) Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. *Plant Physiol.* 127, 655-664; Christopher, B., William, B., Robert, H. "Bacterial sucrose synthase compositions and methods of use" Patente WO9803637). Sin embargo, la producción de SS en este sistema procaríota estaba asociada a problemas tales como (1) la cantidad de SS producida era muy baja (30 microgramos/gramo de bacteria, Nakai, T., Tonouchi, N., Tsuchida, T., Mori, H., Sakai, F., Hayashi, T. (1997) "Expression and characterization of sucrose synthase from mung bean seedlings in *Escherichia coli*" *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 1500-1503; Li, C.R., Zhang, X.B., Hew, C.S. (2003) "Cloning, characterization and expression analysis of a sucrose synthase gene from tropical epiphytic orchid *Oncidium Goldiana*. *Physiol. Plantarum* 118, 352-360), (2) la cantidad de SS activa obtenida era muy baja o nula (0.05-1.5 unidades/mg (Nakai, T., Tonouchi, N., Tsuchida, T., Mori, H., Sakai, F., Hayashi, T. (1997) "Expression and characterization of sucrose synthase from mung bean seedlings in *Escherichia coli*" *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 1500-1503; Li, C.R., Zhang, X.B., Hew, C.S. (2003) Cloning, characterization and expression analysis of a sucrose synthase gene from tropical epiphytic orchid *Oncidium Goldiana*. *Physiol. Plantarum* 118, 352-360); 5.6 U/mg (Rómer, U., Schrader, H., Günther, N., Nettelstroth, N., Frommer, W.B., Elling, L. (2004) Expression, purification and characterization of recombinant sucrose synthase I from *Solanum tuberosum* L. For carbohydrate engineering. *J. Biotechnology* 107, 135-149.), (3) la SS recombinante debía ser purificada por métodos convencionales de purificación de proteínas tales como cromatografía, electroforesis, isoelectroenfoque, etc. que, combinados, resultan costosos y no garantizan la purificación de la proteína en estado homogéneo y (4) la mayor parte de la SS es enviada a cuerpos de inclusión o bien se acumulaba en forma de agregados inactivos como resultado de la incapacidad de la maquinaria de la bacteria de plegar correctamente la proteína (Miroux, B., Walker, J.E. (1996) "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels" *J. Mol. Biol.* 260, 289-298).

La presente invención describe el desarrollo de un sistema basado en la utilización de una cepa apropiada de *E. coli* y en el uso de un vector de expresión adecuado que permita la producción a gran escala y purificación rápida y fácil de distintas versiones de SS recombinante en su forma activa. Algunas de estas versiones presentan una afinidad por ADP muy superior a las obtenidas desde extractos vegetales y pueden ser empleadas tanto para la producción de UDPG como ADPG a partir de sustancias de bajo coste económico tales como la sacarosa, el UDP o el ADP.

Las técnicas cromatográficas constituyen una poderosa herramienta de determinación de contenido de sacarosa en muestras complejas tales como extractos vegetales, sueros, orina, zumos, vinos, frutos y alimentos (D'Aoust, M-A., Yelle, S, Nguyen-Quoc, B. (1999) Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. *Plant Cell* 11, 2407-2418; Tang, G-Q., Sturm, A. (1999) Antisense repression of sucrose synthase in carrot affects growth rather than sucrose partitioning. *Plant Mol. Biol.* 41, 465-479; Frias, J., Price, K.R., Fenwich, G.R., Hedley, C.L., Sorensen, H., Vidal-Valverde, C. (1996) *J. Chromatogr. A* 719, 213-219). Tales técnicas requieren personal técnico altamente especializado y están asociadas a una alta inversión económica en

equipamientos. Lamentablemente, métodos alternativos basados en la hidrólisis de la molécula de sacarosa por acción de la enzima invertasa y posterior determinación espectrofotométrica o fluorométrica de las moléculas de glucosa y/o fructosa (Sweetlove, L.J., Burrell, M.M., ap Rees, T. (1996) Starch metabolism in tubers of transgenic potato with increased ADPglucose pyrophosphorylase. *Biochem. J.* 320, 493-498; Stitt, M., Lilley, R.M., Gerhardt, R., Heldt, H.W. (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymol.* 174, 518-552; Holmes, E.W. (1997) Coupled enzymatic assay for the determination of sucrose. *Anal. Biochem.* 244, 103-109; Methods of Analysis (1996) Code of Practice for Evaluation of Fruit and Vegetable Juicess. Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Economic Community) están sujetos a limitaciones de tipo técnico tales como la sustracción de las medidas correspondientes a la glucosa y/o fructosa endógenas existentes en la muestra. La abundancia de la glucosa y/o fructosa en la muestra puede aportar un ruido de fondo tal que impida la determinación fiable y exacta de sacarosa. En la gran mayoría de los casos es preciso realizar controles exhaustivos antes de emitir un dato fiable sobre el verdadero contenido de sacarosa de una muestra (Worrell, A.C, Bruneau, J-M., Summerfelt, K., Boersig, M., Voelker, T.A. (1991) Expression of a maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *Plant Cell* 3, 1121-1130). Kits de determinación de sacarosa basados en la utilización de la invertasa están disponibles en compañías tales como Sigma, Biopharm GmbH y Megazyme. Alternativamente se ha desarrollado un método automatizado de determinación de la sacarosa basado en la determinación de la glucosa-1-fosfato liberada por la acción de la sacarosa fosforilasa de origen bacteriano (Vinet, B., Panzini, B., Boucher, M., Massicotte, J. (1998) Automated enzymatic assay for the determination of sucrose in serum and urine and its use as a marker of gastric damage. *Clin. Chem.* 44, 2369-2371). La presente invención describe el desarrollo de un método alternativo simple, fiable y poco costoso para la determinación de la sacarosa en una muestra, basado en la utilización de la SS y enzimas acopladores que hidrolizan el ADPG o el UDPG.

Las reflexiones acerca de los factores que gobiernan los niveles intracelulares de ADPG han girado fundamentalmente en torno a la regulación del enzima sintetizador, la AGPasa (Preiss, (1988) Biosynthesis of starch and its regulation. *The Biochemistry of Plants*. Vol. 14, Academic Press, New York, pp.182-249; Pozueta-Romero, J., Perata, P., Akazawa, T. (1999) Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 18, 489-525). De hecho, gran parte de las patentes y publicaciones científicas relacionadas con la obtención de ADPG y con la obtención de plantas productoras de almidones de interés industrial, giran en torno a la utilización de la AGPasa (Stark, D.M., Timmerman, K.P., Barry, G.F., Preiss, J., Kishore, G.M. (1992) Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADPglucose pyrophosphorylase. *Science* 258, 287-282; Slattery, C.J., Kavakli, H., Okita, T.W. (2000) Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends Plant Sci* 5, 291-298). Sin embargo, pendiente de ser confirmado por evidencias de tipo genético/molecular, recientes aportaciones científicas de tipo bioquímico indican que, tal y como se ilustra en las Figs. 1B y 2B, la SS podría estar implicada en la síntesis directa de ADPG necesario para la biosíntesis del almidón (Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Saikusa, T., Rodríguez-López, M., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2003) Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant Cell Physiol.* 44, 500-509). Esta hipótesis es especialmente conflictiva, teniendo en cuenta que (a) jamás se ha vinculado la SS con la producción de almidón en hojas, (b) es preciso la existencia de un translocador de ADPG en las membranas de los plastidios que conecte el pool citosólico del ADPG producido por SS con la almidón sintasa existente en el interior del plastidio y (c) la implicación de la SS como fuente productora de ADPG riñe frontalmente con multitud de pruebas de tipo bioquímico/genético/molecular que aparentemente muestran que la AGPasa es la única fuente de ADPG (Okita, T. W. (1992) Is there an alternative pathway for starch synthesis? *Plant Physiol.* 100, 560-56; Müller-Róber, B., Sonnewald, U. Willmitzer, L. (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* 11, 1229-1238; Stark, D.M., Timmerman, K.P., Barry, G.F., Preiss, J., Kishore, G.M. (1992) Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADPglucose pyrophosphorylase. *Science* 258, 287-282; Neuhaus, E.H., Háusler, R.E., Sonnewald, U. (2005) No time to shift the paradigm on the metabolic pathway to transitory starch in leaves. *Trends Plant Sci.* en prensa). Quizás por todo ello jamás hasta ahora se hayan diseñado plantas que sobre-expresan SS para la producción de altos niveles de almidón. Sin embargo, la presente invención describe por primera vez la producción de plantas transgénicas que sobre-expresan SS para incrementar su producción de ADPG y almidón. Por otro lado demostramos que plantas deficitarias en almidón como resultado de la ausencia de AGPasa poseen niveles normales de ADPG. Con todo ello se demuestra que, tal y como se ilustra en las Figs. 1B y 2B, la SS está implicada en la síntesis directa del ADPG necesario para la biosíntesis del almidón y es responsable de la síntesis de la mayor parte del ADPG acumulado en la célula vegetal.

Aunque basados en el planteamiento ilustrado en la Fig. 1A según el cual la SS está implicada en la síntesis del UDPG (no ADPG) en tejidos de reserva, varios trabajos han descrito la producción de plantas con reducido contenido de almidón como consecuencia de la reducción de la actividad SS (Chourey, P.S., Nelson, O.E. (1976) The enzymatic deficiency conditioned by the shrunken-1 mutations in maize. *Biochem. Genet.* 14, 1041-1055 ; Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L., Sonnewald, U. (1995) Evidence for the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants. *Plant J.* 7, 97-107; Tang, G-Q., Sturm, A. (1999) Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning. *Plant Mol. Biol.* 41, 465-479). En este sentido, no existen evidencias experimentales de que la sobre-expresión de la SS pueda utilizarse para la producción de plantas con alto contenido en almidón como resultado del incremento de los niveles de ADPG acorde a los esquemas metabólicos representados en las Figs. 1B y 2B. Por el contrario, basados en la capacidad de la SS de producir la molécula precursora de la biosíntesis de polisacáridos de pared celular (la UDPG) se han publicado y patentado trabajos en los que se describe la producción de plantas de algodón con alto contenido en fibra o cereales con alto contenido en celulosas como resultado de la sobre-expresión de la SS (Timothy, H.J., Xiamomu N., Kanwarpal, S "Manipulation of

sucrose synthase genes to improve stalk and grain quality" Patente WO02067662; Robert, F., Danny, L, Yong-Ling, R. "Modification of sucrose synthase gene expression in plant tissue and uses therefor" Patente WO0245485; Christopher, B., William, B., Robert, H. "Bacterial sucrose synthase compositions and methods of use" Patente WO9803637).

5 Un objeto de la invención es, en primer lugar, la puesta a punto y optimización de un método de producción de grandes cantidades de SS recombinante soluble, fácilmente purificable y de alta actividad específica basado en la utilización de una cepa de *E. coli* apropiada y en la utilización de un vector de expresión que permite la obtención de la SS con una cola de histidinas. Otro objeto de la invención es el procedimiento seguido para la elaboración de dispositivos o kits de determinación de sacarosa basados en el empleo del producto enzimático con actividad SS acoplado a enzimas que metabolizan el ADPG o el UDPG. Otro objetivo es la optimización de la producción de azúcares-nucleótidos tales como el ADPG o el UDPG a partir de versiones de la SS especialmente diseñadas a tal efecto. Finalmente, se detalla el diseño de plantas transgénicas con alto contenido de sacarosa, ADPG y almidón y alto balance amilosa/amilopectina tras sobreexpresar la SS.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Ampliación de un cDNA que codifica para una SS.

15 Conocida la secuencia nucleotídica de Sacarosa sintasa silvestre SS4 (Fu, H., Park, W.D. (1995) Sink- and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato. *Plant Cell* 7, 1369-1385) se crearon dos cebadores específicos correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen. Haciendo uso de estos cebadores se amplificó por métodos convencionales de PCR un fragmento de DNA de 2418 pares de bases, designado con SSX, a partir de una genoteca de cDNA de hoja de patata. Tal fragmento de PCR se introdujo en el plásmido pSK Bluescript (Stratagene) dando lugar a la construcción pSS (Fig. 3A) la cual fue amplificada en la bacteria hospedadora XL1 Blue.

### Obtención de SS recombinante activa a partir de una cepa especial de *E. coli*

25 pSS fue digerido con los enzimas de restricción NcoI y NotI. El fragmento liberado (que contiene al cDNA que codifica para SS, SSX) fue clonado en los mismos sitios de restricción del plásmido de expresión pET-28a(+) (Novagen) (Fig. 3B) el cual posee una secuencia nucleotídica en la región polylinker que codifica para una secuencia rica en histidinas, la cual queda fusionada con la proteína recombinante. El plásmido resultante (designado con el nombre de pET-SS, Fig. 3C) fue introducido por electroporación en varias cepas de *E. coli*. La cepa de *E. coli* BLR(DE3) (Novagen) transformada con pET-SS fue depositada en la Colección Española de Cultivos tipo el 29 de octubre de 2003, sita en el Edificio de Investigación de la Universidad de Valencia, Campus de Burjassot, Burjassot 46100 (Valencia, España) con el n° de depósito CECT:5850. Las bacterias fueron incubadas a 20°C en medio LB. La sobre-expresión de SSX tuvo lugar mediante la adición de 1 mM isopropil-D-D-tiogalactopiranosido (IPTG) en 100 ml de cultivo celular crecido a 20°C. Tras seis horas de cultivo inducido se recogieron las bacterias y se resuspendieron en 4 ml de "binding buffer" (Novagen, His-bind purification kits), se sonicaron y se centrifugaron a 40.000 g durante veinte minutos. El sobrenadante que contiene la SS recombinante con una secuencia amonoacídica rica en residuos de histidinas en el extremo N-terminal se hizo pasar a través por una columna de afinidad del kit de purificación de proteínas "His-bind" de Novagen. Siguiendo las instrucciones del kit se eluyó SS con 6 ml del tampón de elución recomendado, en el que se habla incluido 200 mM de imidazol en lugar de 1 molar. Tras la elución la proteína fue sometida rápidamente a una diálisis para retirar cualquier traza de imidazol que inactive irreversiblemente a la SS.

### Producción de una isoforma de SS optimizada para la producción de ADPG

40 Haciendo uso de cebadores adecuados y utilizando pSS como molde, se diseñó la versión mutada SS5, dando lugar a la construcción pSS5. Para ello, se hizo uso del kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). pSS5 fue digerido con NcoI y NotI. El fragmento liberado (que contiene a SS5) se clonó en los mismos sitios de restricción del plásmido de expresión pET-28a(+) dando lugar a pET-SS5, el cual se introdujo por electroporación en *E. coli* BLR(DE3). La cepa de *E. coli* XL1 Blue transformada con pSS5 fue depositada en la colección Española de Cultivos Tipo el 29 de octubre de 2003, sita en el Edificio de Investigación de la Universidad de Valencia, Campus de Burjassot, Burjassot 46100 (Valencia, España), con el n° de depósito CECT:5849.

### Obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan SS4

En la presente invención SS ha sido sobre-expresada (a) constitutivamente, (b) específicamente en hojas y (c) específicamente en órganos de reserva tales como tubérculos.

50 Para la producción de plantas que sobre-expresen SS de manera constitutiva, se crearon construcciones gobernadas por la acción del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico del tabaco. La introducción secuencial en pSS del promotor 35S y del terminador NOS en las regiones 5' y 3' de SSX, dio lugar a la producción del plásmido p35S-SS-NOS cuyo mapa de restricción se representa en la Fig. 4B.

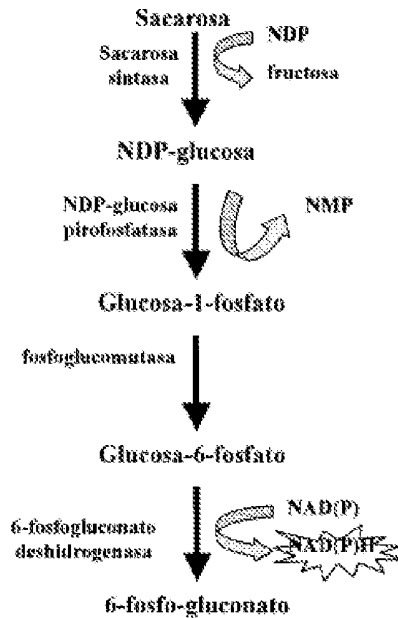
Para poder transferir esta construcción al genoma de las plantas vía *Agrobacterium tumefaciens*, es preciso que previamente sea clonada en un plásmido binario. Para ello, p35S-SS-nos fue digerido secuencialmente con los enzimas NotI, T4 DNA polimerasa y HindIII y se clonó dentro del plásmido binario pBIN20 (Fig. 4A) Hennegan, K.P., Danna, K.J. (1998) pBIN20: An improved binary vector for *Agrobacterium*-mediated transíormation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 16, 129-131) que previamente había sido digerido secuencialmente con los enzimas EcoRI, T4 DNA polimerasa y HindIII. El plásmido así obtenido se designó con el nombre de pBIN35S-SS-NOS (Fig. 4C).

Para sobre-expresar SS específicamente en hojas iluminadas se amplificó por PCR la región promotora (designada como RBCS) del gen que codifica para la subunidad pequeña de la RUBISCO (Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) de tabaco (Barnes, S.A., Knight, J.S., Gray, J.C. (1994) Alteration of the amount of the chloroplast phosphate translocator in transgenic tobacco affects the distribution of assimilate between starch and sugar. *Plant Physiol.* 106, 1123-1129). Dicha secuencia nucleotídica (que confiere expresión específica en células fotosintéticamente activas) se introdujo en el vector pGEMT-easy (Promega), dando lugar a pGEMT-RBCSprom (Fig. 5A). Esta construcción fue digerida con HindIII y NcoI y el fragmento liberado fue clonado en los sitios de restricción correspondientes de p35S-SS-NOS, dando lugar a pRBCS-SS-NOS (Fig. 5B). Esta construcción fue digerida secuencialmente con HindIII, T4 DNA polimerasa y NotI. El fragmento liberado fue clonado en pBIN20 digerido secuencialmente con HindIII, T4 DNA polimerasa y EcoRI. La construcción resultante se designó con el nombre de pBINRBCS-SS-NOS (Fig. 5C).

Tras amplificarse en *E. coli* (XL1 Blue), tanto pBIN35S-SS-NOS como pBINRBCS-SS-NOS se introdujeron en *A. tumefaciens* C58:GV2260 (Debleare, R., Bytebier, B., de Greve, H., Debroeck, F., Schell, J., van Montagu, M., Leemans, J. (1985) "Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors of *Agrobacterium* mediated gene transfer to plants" *Nuc. Acids Res.* 13, 4777-4788) el cual fue utilizado para transformar especies tales como tomate (*Lycopersicon sculentum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*) y arroz de acuerdo a técnicas convencionales (Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. (1985) "A simple and general method for transferring genes into plants" *Science* 277, 1229-1231; Pozueta-Romero, J., Houlné, G., Schantz, R., Chamorro, J. (2001) "Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation" *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 67, 173-180; Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T. (1994) "Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6, 271-282). La cepa de *A. tumefaciens* C58:GV2260 transformada con pBIN35S-SS-NOS fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo el 29 de octubre de 2003, sita en el Edificio de Investigación de la Universidad de Valencia, Campus de Burjassot, Burjassot 46100 (Valencia, España), con el n° de depósito CECT:5851.

**25 Elaboración de dispositivos (kits) de ensayo para determinación de sacarosa**

Uno de los kits diseñados para la determinación de sacarosa, ilustrado en el siguiente Esquema I de reacciones enzimáticas implicadas en el kit de determinación espectrofotométrica/fluorimétrica de sacarosa basado en la transformación de la sacarosa en un azúcar-nucleótido y posterior transformación de éste en glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato y NAD(P)H.

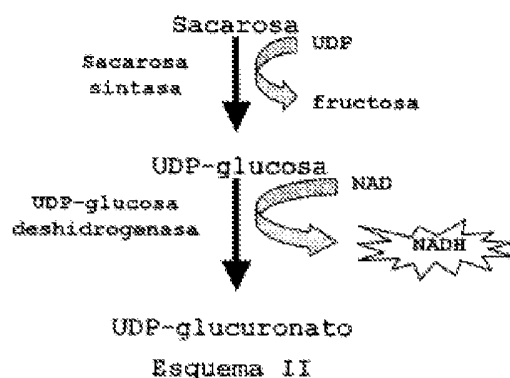


Esquema I

El kit está basado en la acción de la SS sobre la molécula de sacarosa en presencia de un nucleótido difosfato (ej. UDP o el ADP), liberando cantidades equimolares de fructosa y el azúcar-nucleótido correspondiente. Si el azúcar-nucleótido resultante de la reacción es UDPG, éste se somete a la acción de enzimas hidrolíticas del UDPG tales como la UDPG pirofosfatasa de tipo Nudix (EC 3.6.1.45) (Yagi, T., Baroja-Fernández, E., Yamamoto, R., Muñoz, F.J., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2003) Cloning, expression and characterization of a mammalian Nudix hydrolase-like enzyme that cleaves the pyrophosphate bond of UDP-glucose. *Biochem. J.* 370, 409-415) o la UDPG hidrolasa (Burns, D.M., Beacham, I.R. (1986) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *E. coli* ushA gene, encoding periplasmic UDP-sugar hydrolase (5'-nucleotidase): regulation of the ushA gene, and the signal sequence of its encoded protein

product. Nucl. Acids Res. 14, 4325-4342). La G1P liberada por acción de estos enzimas hidrolíticos es transformada por acción de la fosfoglucomutasa (PGM), rindiendo glucosa-6-fosfato (G6P), que a su vez puede hacerse reaccionar acopladamente con NAD(P)<sup>+</sup> por acción del enzima G6P deshidrogenasa (G6PDH), obteniéndose 6-fosfogluconato y NAD(P)H, fácilmente determinable por fluorimetría y por espectrofotometría a 340 nm. A su vez, el NAD(P)H liberado puede acoplarse a la acción de la FMN-oxidoreductasa/luciferasa, rindiendo luz que es cuantificada espectrofotométricamente.

Alternativamente, y tal y como se ilustra en el esquema II, el UDPG producido puede acoplarse con la UDPG deshidrogenasa (EC 1.1.1.22) que, en presencia de NAD, da lugar a cantidades equimolares de UDP-glucuronato y NADH determinable por fluorimetría o por espectrofotometría a 340 nm. A su vez, el NADH liberado puede acoplarse a la acción de la FMN-oxidoreductasa/luciferasa, rindiendo luz que es cuantificada espectrofotométricamente.



Si el producto de la reacción catalizada por la SS es ADPG, éste se somete a la acción de enzimas hidrolíticos del ADPG tales como la ADPG pirofosfatasa bacteriana (EC 3.6.1.21) (Moreno-Bruna, B., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Bastarrica-Berasategui, A., Zanduetta-Criado, A., Rodríguez-López, M., Lasa, I., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2001) Adenosine diphosphate sugar pyrophosphatase prevents glycogen biosynthesis in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 8128-8132). La G1P liberada es transformada por acción de la fosfoglucomutasa, rindiendo glucosa-6-fosfato (G6P), que a su vez puede hacerse reaccionar acopladamente con NAD(P)<sup>+</sup> por acción del enzima G6P deshidrogenasa, obteniéndose 6-fosfogluconato y NAD(P)H, fácilmente determinable por fluorimetría o espectrofotometría a 340 nm.

En cualquier caso, los esquemas de reacciones enzimáticas acopladas a la producción de un azúcar-nucleótido por mediación de la SS, son perfectamente susceptibles de ser aplicados a la detección amperométrica.

### EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Se describen a continuación ejemplos en los que se muestra detalladamente el procedimiento de clonaje de un cDNA que codifica para una isoforma de SS de patata en un vector de expresión adecuado y en una cepa de *E. coli* optimizada para la producción y acumulo del enzima en su forma activa. Otros ejemplos muestran la utilización de la SS recombinante para la producción de kits (dispositivos de ensayo) de determinación de sacarosa en muestras vegetales, suero, orina, zumos, néctares, bebidas refrescantes, etc. Otro ejemplo muestra la utilización de versiones de SS optimizadas para la producción a gran escala de azúcares-nucleótidos tales como UDPG y ADPG. Por último otro ejemplo muestra la obtención de plantas con alto contenido en sacarosa, ADPG, almidón y alto balance amilosa/amilopectina como resultado de la alta actividad productora de ADPG en plantas que sobreexpresan la SS.

#### Ejemplo 1: Expresión en *Escherichia coli* BLR (DE3), de una SS recombinante con una cola de histidinas, fácilmente purificable y de alta actividad específica

El conocimiento de la secuencia nucleotídica del gen SS4 que codifica para una isoforma de SS de patata permitió la creación de dos cebadores específicos cuyas secuencias son, en sentido 5' -3', SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Haciendo uso de estos cebadores se amplificó por métodos convencionales de PCR un fragmento de DNA, designado como SSX, a partir de una genoteca de cDNA de tubérculo de patata, que se introdujo en un plásmido pSK Bluescript (Stratagene) el cual fue amplificado en la bacteria hospedadora XL1 Blue. La secuencia nucleotídica de SSX es SEQ ID NO: 3 que es ligeramente diferente a SS4 (número de accesión en GenBank U24087). La secuencia aminoacídica deducida de SEQ ID NO: 3 es ligeramente diferente a SS4 y por ello se designa con el nombre de SSX. La secuencia aminoacídica deducida tras la expresión de SEQ ID NO: 3 en el plásmido pET-28a(+) es SEQ ID NO: 4, la cual incluye una secuencia de 38 aminoácidos rica en histidinas fusionada con el extremo amino-terminal de la secuencia aminoacídica deducida de SEQ ID NO: 3.

La inducción de la producción de SSX en bacterias BL21(DE3) transformadas con pET-SS tuvo lugar al añadir 1 mM IPTG. Tras seis horas adicionales de cultivo a 37°C, se observó que las bacterias transformadas con pET-SS acumulaban una proteína en forma agregada cuyo tamaño se corresponde al de la SS. Sin embargo, tales bacterias no tenían actividad SS. Tal fracaso en la expresión de una forma activa de SS es atribuible a los problemas que posee *E. coli* en el correcto plegado de algunas proteínas eucariotas de alto peso molecular (Miroux, B., Walker, J.E. (1996) "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels" *J. Mol. Biol.* 260, 289-298). Con el fin de superar este problema, se investigó la capacidad de producción de SS activa en otras cepas bacterianas y a una temperatura de 20°C. En todas ellas la inducción de la producción de SSX tuvo lugar al añadir 1 mM de IPTG. Tras 6 horas de incubación adicional, las bacterias fueron sonicadas y centrifugadas. El sobrenadante resultante fue analizado para la actividad SS. En estas condiciones, tal y como se ilustra en la Fig. 6, la cepa BLR(DE3) resultó ser la más eficiente desde el punto de vista de la producción de SS activa y soluble. La cepa de *E. coli* BLR(DE3) (Novagen) transformada con pET-SS fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo el 29 de octubre de 2003, con el n° de depósito CECT:5850. La contribución de la SSX recombinante en el pool proteico total de CECT:5850 es de aproximadamente un 20%, frente a la muy escasa productividad de SS recombinante (30 microgramos por gramo de bacteria) descrita en la literatura (Nakai, T., Tonouchi, N., Tsuchida, T., Mori, H., Sakai, F., Hayashi, T. (1997) "Expression and characterization of sucrose synthase from mung bean seedlings in *Escherichia coli*" *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 1500-1503; Li, C.R., Zhang, X.B., Hew, C.S. (2003) Cloning, characterization and expression analysis of a sucrose synthase gene from tropical epiphytic orchid *Oncidium Goldiana*. *Physiol. Plantarum* 118, 352-360). El sobrenadante se hizo pasar a través de la columna de afinidad "His-Bind" (Novagen) en la que se queda retenida específicamente la proteína recombinante poseedora de una cola de histidinas. Tras eluir y dializar la SS purificada, ésta fue incubada con 50 mM HEPES, pH 7.0 / 1 mM EDTA/20% polietilenglicol/1 mM MgCl<sub>2</sub>/15 mM KCl/2 mM UDP. La actividad específica, estimada en términos de producción de UDPG, era de 80 unidades/mg de proteína, muy superior a la actividad de 0.05-5 unidades/mg de SS recombinante descrita en la literatura (Nakai, T., Tonouchi, N., Tsuchida, T., Mori, H., Sakai, F., Hayashi, T. (1997) "Expression and characterization of sucrose synthase from mung bean seedlings in *Escherichia coli*" *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 1500-1503; Li, C.R., Zhang, X.B., Hew, C.S. (2003) Cloning, characterization and expression analysis of a sucrose synthase gene from tropical epiphytic orchid *Oncidium Goldiana*. *Physiol. Plantarum* 118, 352-360; Romer, U., Schrader, H., Günther, N., Nettelstroth, N., Frommer, W.B., Eiling, L. (2004) Expression, purification and characterization of recombinant sucrose synthase I from *Solanum tuberosum* L. For carbohydrate engineering. *J. Biotechnology* 107, 135-149) y superior a 3 unidades/mg correspondiente a la SS purificada a partir de extractos vegetales (Pressey R (1969) Potato sucrose synthase: purification, properties, and changes in activity associated with maturation. *Plant Physiol.* 44, 759-764). La unidad se define como la cantidad de enzima que cataliza la producción de un micromol de UDPG por minuto. La afinidad por UDP en presencia de 500 mM sacarosa fue de Km(UDP) = 0.25 mM, mientras que la Km por sacarosa fue de 30 mM en presencia de 1 mM UDP. Esta afinidad por sacarosa en presencia de UDP es significativamente superior a la mostrada por la SS recombinante obtenida en levaduras (Km= 95 mM, Romer, U., Schrader, H., Günther, N., Nettelstroth, N., Frommer, W.B., Eiling, L. (2004) Expression, purification and characterization of recombinant sucrose synthase I from *Solanum tuberosum* L. For carbohydrate engineering. *J. Biotechnology* 107, 135-149).

### **Ejemplo 2: Producción de UDPG y ADPG a gran escala a partir de la utilización de SS recombinante de *E. coli***

La producción económica y eficiente de 3 gramos de UDPG de alta pureza tuvo lugar tras la incubación durante 12 horas a 37°C de 100 mililitros de una solución con 1 M sacarosa, 50 mM HEPES, pH 7.0 / 1 mM EDTA/20% polietilenglicol/1 mM MgCl<sub>2</sub>/15 mM KCl/100 mM UDP y 30 unidades de SS recombinante de patata obtenida tras la expresión de pET-SS en BLR(DE3) y posterior purificación. La reacción finalizó tras calentar la solución a 100°C durante 90 segundos y posterior centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se aplicó a un cromatógrafo HPLC (Waters Associate's) a escala preparativa y el UDPG se purificó según se describe en la literatura (Rodríguez-López, M., Baroja-Fernández, E., Zanduetta-Criado, A., Pozueta-Romero, J. (2000) Adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase: a plastidial phosphodiesterase that prevents starch biosynthesis. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 97, 8705-8710). La producción de ADPG requirió la generación de una forma mutada de SS con una afinidad por el ADP mucho mayor que la descrita para la SS extraída desde tejidos vegetales (Pressey R (1969) Potato sucrose synthase: purification, properties, and changes in activity associated with maturation. *Plant Physiol.* 44, 759-764; Nguyen-Quock B., Krivitzky, M., Huber, S. C., Lechamy, A. (1990) Sucrose synthase in developing maize leaves. *Plant Physiol.* 94, 516-523; Morell, M., Copeland, L. (1985) Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiol.* 78, 149-154).

Tal isoforma, designada como SS5 se obtuvo mediante mutagénesis puntual de SSX haciendo uso del kit QuikChange Site-directed Mutagénesis (Stratagene) y utilizando secuencialmente las siguientes parejas de cebadores cuyas secuencias son [SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6], [SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8] y [SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 10]. La secuencia nucleotídica obtenida, designada como SS5, es SEQ ID NO: 11. Los cambios en la secuencia aminoacídica de SS5 (Susy 5) respecto a SS4 -Susy 4- (existente en bancos de datos) se ilustran a continuación sombreados en la Tabla I. La secuencia aminoacídica deducida tras la expresión de SEQ ID NO: 11 en el plásmido pET-28a(+) es SEQ ID NO: 12, la cual incluye una secuencia de 38 aminoácidos rica en histidinas fusionada con el extremo amino-terminal de la secuencia aminoacídica deducida a partir de la SEQ ID NO: 11.

En la Tabla I se incluye dicha secuencia de 38 aminoácidos rica en histidinas fusionada a la parte amino-terminal de SS5.





sacarosa fue de 30 mM y 100 mM en presencia de concentraciones saturantes de UDP y ADP, respectivamente. Estos parámetros cinéticos son muy diferentes a los descritos para la SS extraída desde tubérculo de patata y otros órganos de otras especies, según los cuales la  $V_{max}$  del enzima es 10 veces superior en presencia de UDP que en presencia de ADP (Pressey R (1969) Potato sucrose synthase: purification, properties, and changes in activity associated with maturation. *Plant Physiol.* 44, 759-764; Morell, M., Copeland, L. (1985) Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiol.* 78, 149-154; Nguyen-Quoc, B., Krivitzky, M., Huber, S.C., Lechamy, A. (1990) Sucrose synthase in developing maize leaves. *Plant Physiol.* 94, 516-523). La cepa de *E. coli* XL1 Blue transformada con pSS5 fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el n° de depósito CECT:5849.

La producción económica y eficiente de 3 gramos de ADPG de alta pureza tuvo lugar tras la incubación durante 12 horas a 37°C de 100 mililitros de una solución con 1 M sacarosa, 50 mM HEPES, pH 7.0/1 mM EDTA/20% polietilenglicol/1 mM  $MgCl_2$  / 15 mM KCl/100 mM ADP y 30 unidades de SS recombinante de patata obtenida tras la expresión de pET-SS5 en BLR(DE3) y posterior purificación en una columna His-bind. La reacción finalizó tras calentar la solución a 100°C durante 90 segundos y posterior centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se aplicó a un cromatógrafo HPLC (Waters Associate's) a escala preparativa para la purificación del ADPG.

### **Ejemplo 3: Elaboración de kits enzimáticos para la determinación de sacarosa**

Para la determinación de sacarosa se elaboraron los siguientes cocktails de reacción con los siguientes elementos y cantidades/concentraciones finales:

#### 1. KITS BASADOS EN LA UTILIZACIÓN DE ENZIMAS HIDROLITICOS DE AZÚCARES-NUCLEÓTIDOS:

- a. 2 unidades de SS (recombinante o no)
- b. 2 mM de ADP o UDP (según se produzca ADPG o UDPG, respectivamente)
- c. 2 unidades de ADPG pirofosfatasa o 2 unidades de UDPG pirofosfatasa (según se incluya en el cocktail de reacción ADP o UDP, respectivamente)
- d. 2 unidades de PGM
- e. 2 unidades de G6PDH
- f. 0.5 mM de NAD(P)
- g. tampón de reacción: 50 mM HEPES, pH 7.0/1 mM EDTA/20% polietilenglicol/1 mM  $MgCl_2$ /15 mM KCl
- h. muestra problema previamente filtrada

#### 2. KIT BASADO EN LA UTILIZACIÓN DE LA UDPG DESHIDROGENASA

- a. 2 unidades de SS (recombinante o no)
- b. 2 mM de UDP
- c. 2 unidades de UDPG deshidrogenasa
- d. 0.5 mM de NAD
- e. tampón de reacción: 50 mM HEPES, pH 7.0/1 mM EDTA/20% polietilenglicol/1 mM  $MgCl_2$ /15 mM KCl
- f. muestra problema previamente filtrada

La determinación de la cantidad de sacarosa presente en la muestra problema se basa en la determinación fluorométrica o espectrofotométrica a 340 nm del NAD(P)H producido según las reacciones acopladas ilustradas en los esquemas I y II.

Para la determinación del contenido de sacarosa en semillas de cebada con diferentes grados de desarrollo (Figura 7), las reacciones tuvieron lugar en pocillos de 300 microlitros de una placa de Elisa durante 3 minutos a 37°C. El volumen de muestra problema fue de 20 microlitros, mientras que el volumen del cocktail resultante de la combinación de los reactivos a-g (kit #1) y a-e (kit #2) fue de 280 microlitros. Los blancos contenían todos los componentes del cocktail excepto la SS. La medición tuvo lugar en un espectrofotómetro MultiSkan. Los valores obtenidos, tanto por el kit de tipo "1" como por el kit de tipo "2" resultaron ser comparables a las determinados haciendo uso de técnicas cromatográficas descritas en la introducción (Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Saikusa, T., Rodríguez-López, M., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2003) Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant Cell Physiol.* 44, 500-509).

### **Ejemplo 4: Obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan SS**

Las Figuras 8-10 ilustran los resultados obtenidos en hojas de plantas de patata que sobreexpresan la SS tanto de manera constitutiva (35S-SS-NOS), como de manera específica (RBCS-SS-NOS).

Tal y como se ilustra en la Fig. 8, la actividad SS en las hojas de cualquiera de estas plantas es 2-10 veces superior a la existente en el mismo órgano de una planta silvestre (WT). Tales hojas presentaron las siguientes características:

1. Clara correlación entre la actividad SS productora de ADPG (Fig. 8) y niveles de almidón (Fig. 9) y ADPG (Fig. 10). Tal característica se observó no solamente en hojas, sino también en tejidos de reserva tales como tubérculos y semillas (ver después).

2. Alto contenido en almidón (Fig. 9) respecto a hojas de plantas silvestres. Así por ejemplo, el contenido en almidón de una hoja de planta de patata "silvestre" crecida en un fotoperíodo de 8 horas luz/16 horas oscuridad y a 20°C es de 5 micromoles/gramo de peso fresco, mientras que en una hoja de una planta transgénica que sobreexpresa la SS es de 8 micromoles/gramo peso fresco. Las diferencias entre plantas silvestres y transgénicas se acentúan

cuando el fotoperiodo es largo, de tal modo que las hojas de una planta que sobreexpresa SS contiene 4 veces más almidón que las de una silvestre.

3. Alto contenido en ADPG respecto al mismo tejido u órgano de la planta no transformada (Fig. 10). El contenido promedio de una hoja de planta de patata silvestre crecida en un fotoperiodo de 8 horas luz/16 horas oscuridad y a 20 °C es de 0.35 nanomoles/gramo de peso fresco, mientras que las hojas de las plantas que sobreexpresan SS pueden tener un contenido de 2.5 nanomoles/gramo de peso fresco.

4. Tanto el ADPG como el almidón se acumulan de manera transitoria a lo largo del fotoperiodo (Fig. 11). La tasa de acumulo de ambas sustancias guarda una correlación positiva con la actividad SS, indicando que, contrariamente a lo que el modelo "clásico" de biosíntesis de almidón sugiere (Fig. 2A) y confirmando las tesis del modelo "alternativo" ilustrado en la Fig. 2B, la SS juega un papel fundamental en la producción de ADPG y en la conexión del metabolismo de la sacarosa con el metabolismo del almidón.

5. Niveles normales de azúcares solubles tales como glucosa y fructosa. Sin embargo, los niveles de glucose-6-P y sacarosa en hojas transgénicas son superiores a los observados en las hojas de patata silvestres (Tabla 2).

Tabla 2: Niveles de metabolitos (expresados en nmol/g peso fresco) en hojas de plantas control (WT) y en hojas de plantas 35S-SuSy-NOS. Valores significativamente diferentes a los observados en WT se indican en negrita.

	Control	35S-SS-NOS					
	WT	6	5	12	3	4	7
<u>Glucosa</u>	848 ± 31	922 ± 29	860 ± 30	933 ± 29	891 ± 56	895 ± 32	871 ± 60
<u>Fructosa</u>	996 ± 43	1,035 ± 67	1,094 ± 17	1,022 ± 10	1,067 ± 58	1,078 ± 63	817 ± 41
<u>Sacarosa</u>	1,012 ± 27	<b>1,529 ± 48</b>	<b>1,402 ± 68</b>	<b>1,642 ± 58</b>	<b>1,307 ± 35</b>	<b>1,317 ± 35</b>	<b>1,391 ± 70</b>
<u>Glucosa-6-P</u>	244 ± 28	<b>309 ± 15</b>	<b>280 ± 25</b>	<b>271 ± 27</b>	<b>355 ± 23</b>	<b>298 ± 12</b>	<b>315 ± 9.8</b>
<u>Glucosa-1-P</u>	227 ± 19	<b>155 ± 21</b>	<b>103 ± 1.1</b>	<b>99 ± 12</b>	<b>95 ± 15</b>	<b>152 ± 1.9</b>	<b>114 ± 1.8</b>

6. La morfología externa de las plantas que sobreexpresan SS no es aberrante, tras ser comparada con la de las plantas no transformadas.

Las Figuras 12-14 ilustran los resultados obtenidos en tubérculos de patata que sobreexpresan la SS de manera constitutiva (35S-SS-NOS). Tales resultados son esencialmente idénticos a los observados en tubérculos que sobreexpresan la SS bajo el control de un promotor específico de tubérculo (promotor del gen de la patatina). Tal y como se ilustra en la Fig. 12, la actividad SS en los tubérculos de cualquiera de estas plantas es ¿??? veces superior a la existente en el mismo órgano de una planta silvestre. Tales tubérculos presentaron las siguientes características:

1. Clara correlación entre la actividad SS productora de ADPG (Fig. 12) y niveles de almidón (Fig. 13) y ADPG (Fig. 14).

2. Alto contenido en almidón (Fig. 13) respecto a tubérculos de plantas no transformadas. Así por ejemplo, el contenido en almidón de tubérculo de planta "silvestre" es de aproximadamente 300 micromoles/gramo de peso fresco, (equivalente a 54 mg de almidón/ gramo de peso fresco), mientras que en tubérculo que sobreexpresa la SS es de 450-600 micromoles/gramo peso fresco.

3. Alto contenido en ADPG respecto a tubérculos de plantas silvestres (Fig. 14). El contenido promedio de un tubérculo silvestre es de 5 nanomoles/gramo de peso fresco, mientras que los tubérculos que sobreexpresan SS pueden tener un contenido de 7-9 nanomoles/gramo de peso fresco.

Los resultados obtenidos en semillas de arroz, hojas de tomate y tabaco, así como en frutos de tomate, son cualitativamente similares a los mostrados en las Figuras 8-14. En todos los casos se dio un incremento del contenido de almidón y un incremento del balance amilosa/amilopectina.

5 La producción de plantas con alto contenido en ADPG y almidón tras sobre-expresar SS es un resultado totalmente inesperado según la percepción actual de la biosíntesis del almidón (ilustrado en las Figs. 1A y 2A) y quizás ello explica por qué no se han diseñado hasta ahora plantas que sobre-expresen SS como estrategia de incremento de producción de almidón. Los resultados obtenidos a partir de este trabajo sugieren que la SS, pero no la AGPasa, es la fuente fundamental de ADPG que se acumula en las plantas. Según los modelos aún vigentes, la AGPasa es la única fuente de ADPG. Sorprendentemente sin embargo, los niveles de ADPG jamás han sido investigados en plantas deficitarias en AGPasa. Para explorar la relevancia de nuestra invención hemos analizado por primera vez los niveles de ADPG y almidón en plantas de Arabidopsis y patata con reducida actividad AGPasa. Tal y como se ilustra en la Fig. 15A, los niveles de almidón en plantas TL25 de Arabidopsis deficitarias en AGPasa (Lin, T.P., Caspar, T., Somerville, C.R., Preiss, J. (1988) Isolation and characterization of a starchless mutant of Arabidopsis thaliana lacking ADPglucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol.* 88, 1131-1135) son reducidos respecto a los observados en las plantas WT. Sin embargo, los niveles de ADPG son normales (Fig. 15B). Por otro lado, los niveles de almidón en plantas AGP62 y AGP85 de patata (Müller-Róber, B., Sonnewald, U., Willmitzer, L. (1992) Inhibition of the ADPglucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* 11, 1229-1238) son reducidos con respecto a los observados en hojas de plantas silvestres (Fig. 16A). Sin embargo, los niveles de ADPG son totalmente normales (Fig. 16B). En conjunto, todas estas observaciones (a) demuestran que SS, pero no AGPasa, es la fuente principal de ADPG en plantas y (b) contrastan la relevancia de nuestra invención tras demostrar que la sobreexpresión de SS da lugar a plantas con alto contenido en almidón.

#### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 Fig. 1: Mecanismos de biosíntesis de almidón en órganos heterotróficos. (A) Mecanismo "clásico" según el cual la SS está implicada en la producción de UDPG, el cual es eventualmente convertido en almidón tras la acción combinada de la UDPG pirofosforilasa (UGPase), fosfoglucomutasa (PGM) citosólica, fosfoglucomutasa plastidial, ADPG pirofosforilasa (AGPase) y almidón sintasa. (B) Mecanismo "alternativo" según el cual SS está implicada en la producción directa de ADPG en el citosol. El ADPG es transportado posteriormente al amiloplasto por acción de un translocador. Una vez en el interior del amiloplasto, la almidón sintasa utiliza el ADPG para producir almidón.

30 Fig. 2: Mecanismos de biosíntesis de almidón en hojas. (A) Mecanismo "clásico" según el cual todo el proceso de biosíntesis del almidón tiene lugar en el interior del cloroplasto. Según esta visión, el metabolismo del almidón y la sacarosa no están conectados. Además, la SS no interviene en el proceso gluconeogénico. (B) Mecanismo "alternativo" de biosíntesis del almidón según el cual la SS está implicada en la síntesis directa de ADPG en el citosol. El ADPG es posteriormente transportado al interior del plastidio donde la almidón sintasa lo utiliza como sustrato para la reacción de síntesis del almidón.

Fig. 3: Etapas de construcción del plásmido de expresión pET-SS a partir de pET-28a(+) y pSS.

Fig. 4: Etapas de construcción del plásmido de expresión pBIN35S-SS-NOS a partir de pBIN20 y p35S-SS-NOS

Fig. 5: Etapas de construcción del plásmido de expresión pRBCS-SS-NOS a partir de pGEMT-RBCSprom, p35S-SS-NOS y pBIN20

40 Fig. 6: Expresión de pET-SS en diferentes cepas de Escherichia coli. (A) Actividad SS (en miliunidades (mU) por miligramo de proteína bacteriana) en extractos bacterianos transformados con pET o con pET-SS. La reacción tuvo lugar en la dirección de degradación de sacarosa y producción de ADPG. El cocktail de reacción contenía 50 mM HEPES (pH 7.0), 1 mM EDTA, 20% polietilenglicol, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM de KCl y 2 mM de ADP. La reacción tuvo lugar durante 10 minutos a 37°C. (B) SDS-PAGE de extractos proteicos de las diferentes cepas de E. coli transformadas con pET y con pET-SS. Con un asterisco se indica la posición de la SSX recombinante.

45 Fig. 7: Determinación de la sacarosa en diferentes estadios de desarrollo de endospermos de cebada haciendo uso del kit basado en las reacciones acopladas de la SS, la ADPG (UDPG) pirofosfatasa, la PGM y la G6PDH. Los resultados fueron idénticos a los obtenidos paralelamente mediante (a) la utilización de un kit basado en las reacciones acopladas de SS y la UDPG deshidrogenasa y (b) la utilización de cromatografía de alta presión (HPLC) con detección amperométrica en un sistema DX-500 Dionex ajustado a una columna Carbo-Pac PA1.

Eje de abscisas: Días tras la floración

Eje de ordenadas: Contenido en sacarosa (μmol/gFW)

55 Fig. 8: Actividad SS en hojas de plantas de patata silvestres (WT) y plantas de patata que sobreexpresan SSX tras integrar en su genoma las construcciones 35S-SS-NOS (por acción de la cepa de Agrobacterium tumefaciens CECT:5851) o RBCS-SS-NOS. La actividad está referida en miliunidades (mU) por gramo de peso fresco. La unidad se define como la cantidad de SS necesaria para producir un micromol de ADPG por minuto.

- Fig. 9: Contenido de almidón en hojas de plantas de patata silvestres (WT) y plantas de patata que sobreexpresan SSX tras integrar en su genoma las construcciones 35S-SS-NOS (por acción de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* CECT:5851) o RBCS-SS-NOS.
- 5 Fig. 10: Contenido de ADPG en hojas de plantas de patata silvestres (WT) y plantas de patata que sobreexpresan SSX tras integrar en su genoma las construcciones 35S-SS-NOS (por acción de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* CECT:5851) o RBCS-SS-NOS.
- Fig. 11: Acumulación transitoria de (A) almidón y (B) ADPG durante un fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad en hojas de plantas WT (●), 35S-SS-NOS (■) y RBCS-SS-NOS (▲).
- 10 Fig. 12: Actividad SS (referida a peso fresco, FW) en tubérculos de plantas de patata silvestres (WT), controles de regeneración (RG) y plantas de patata que sobreexpresan SSX (líneas 4,5,6 y 12) tras integrar en su genoma la construcción 35S-SS-NOS (por acción de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* CECT:5851). La actividad está referida en miliunidades (mU) por gramo de peso fresco. La unidad se define como la cantidad de SS necesaria para producir un micromol de ADPG por minuto.
- 15 Fig. 13: Contenido de almidón (referido a peso fresco, FW) en tubérculos de plantas de patata silvestres (WT), controles de regeneración (RG) y plantas de patata que sobre-expresan SSX (líneas 4,5,6 y 12) tras integrar en su genoma la construcción 35S-SS-NOS (por acción de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* CECT:5851).
- Fig. 14: Contenido de ADPG (referido a peso fresco, FW) en tubérculos de plantas de patata silvestres (WT) y plantas de patata que sobreexpresan SSX tras integrar en su genoma la construcción 35S-SS-NOS (por acción de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* CECT:5851).
- 20 Fig. 15: Contenido de (A) almidón y (B) ADPG en hojas de *Arabidopsis thaliana* TL25 deficitarias en AGPasa.
- Fig. 16: Contenido de (A) almidón y (B) ADPG en hojas de patata AGP62 y AGP85 deficitarias en AGPasa.

## LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA
- <120> "Procedimiento para la producción de sacarosa sintasa recombinante, su uso en la fabricación de kits de determinación de sacarosa, producción de ADPglucosa y obtención de plantas transgénicas cuyas hojas y órganos de reserva acumulen alto contenido en ADPglucosa y almidón".
- 5 <130> PCT-180  
 <150> ES 200400257  
 <151> 05.02.04  
 <160> 12  
 <210> 1
- 10 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> *Solanum tuberosum*  
 <220>  
 <223> Promotor de la región 5' de SS4
- 15 <400>  
 ctgccatggc tgaacgtgtt ttgac 25  
 <210> 2  
 <211> 27  
 <212> DNA
- 20 <213> *Solanum tuberosum*  
 <220>  
 <223> Promotor de la región 5' de SS4  
 <400>  
 cttcattcac tcagcagcca atggaac 27
- 25 <210> 3  
 <211> 2418  
 <212> DNA  
 <213> *Solanum tuberosum*  
 <220>
- 30 <223> SSX  
 <400>

ES 2 363 231 T3

atg gct gaa cgt gtt ttg act cgt gtt cat agc ctt cgt gaa 42  
 cgt gtt gat gca act tta gct gct cac cgc aat gag ata ctg 84  
 ctg ttt ctt tca agg atc gaa agc cac gga aaa ggg ata ttg 126  
 aaa cct cat gag ctt ttg gct gag ttc gat gca att cgc caa 168  
 gat gac aaa aac aaa ctg aac gaa cat gca ttc gaa gaa ctc 210  
 ctg aaa tcc act cag gaa gcg att gtt ctg ccc cct tgg gtt 252  
 gca ctt gct att cgt ttg agg cct ggt gtc tgg gaa tac atc 294  
 cgt gtg aac gtc aat gca cta gtt gtc gag gag ctg tcc gtc 336  
 cct gag tat ttg caa ttc aag gaa gaa ctt gtc gac gga gcc 378  
 tcg aat gga aat ttt gtt ctc gag ttg gat ttc gag cct ttc 420  
 act gca tcc ttt cct aaa cca acc ctc acc aaa tct att gga 462  
 aat gga gtt gaa ttc ctc aat agg cac ctc tct gcc aaa atg 504  
 ttc cat gac aag gaa agc atg acc ccg ctt ctc gaa ttt ctt 546  
 cgc gct cac cat tat aag ggc aag aca atg atg ctg aat gat 588  
 agg ata cag aat tcg aat act ctt caa aat gtc cta agg aag 630  
 gca gag gaa tac ctc att atg ctt tcc cca gat act cca tat 672  
 ttc gaa ttc gag cac aag ttc caa gaa atc gga ttg gag aag 714  
 gga tgg ggg gac acg gcg gag cgt gtg cta gag atg gta tgc 756  
 atg ctt ctt gat ctc ctt gag gct cct gac tca tgt act ctt 798  
 gag aag ttc ttg ggg aga att cct atg gtt ttc aat gtg gtt 840  
 atc ctt tcc cct cat gga tat ttt gcc caa gaa aat gtc ttg 882  
 ggt tat ccc gac acc ggt ggc cag gtt gtc tac att tta gat 924  
 caa gtt ccc gcc ttg gag cgt gaa atg ctt aag cgc ata aag 966  
 gag caa gga ctt gat atc atc ccc cgt att ctt att gtt act 1008  
 cgt ctg ctg ccc gat gca gtt gga acc act tgt ggt cag agg 1050  
 att gag aag gtg tat gga gca gaa cac tca cat att ctt agg 1092  
 gtc cct ttt agg act gag aag ggc att gtt cgc aaa tgg atc 1134  
 tct cgc ttt gaa gtg tgg cca tac atg gag aca ttc att gag 1176  
 gat gtt gca aaa gaa att tct gca gaa ctg cag gcc aag cca 1218  
 gat ttg ata att gga aac tac agt gag ggc aat ctt gct gct 1260  
 tct ttg cta gct cac aag tta ggc gta act cag tgc acc att 1302  
 gcc cac gcg ttg gag aaa acg aag tat cct gat tcc gac att 1344  
 tac tgg aaa aag ttt gat gaa aaa tac cat ttc tcg tcc cag 1386  
 ttt acc gct gat ctc att gca atg aat cac act gat ttc atc 1428  
  
 atc acc agc acc ttc cag gag ata gca gga agc aag gac act 1470  
 gta gga caa tat gag agc cat atg gca ttc aca atg cct gga 1512  
 ttg tac aga gtt gtt cac ggc att aat gtg ttc gac ccc aaa 1554  
 ttc aac att gtc tca cct gga gct gat att aat ctc tac ttc 1596  
 tcg tac tcc gaa acg gag aag aga ctt aca gca ttt cac cct 1638

ES 2 363 231 T3

gaa att gat gag ctg ctg tat agt gat gtt gag aat gac gag 1680  
 cat ctg tgt gtg ctc aag gac agg act aaa cca att tta ttc 1722  
 aca atg gca agg ttg gat cgt gtg aag aat tta act gga ctt 1764  
 gtt gag tgg tac gcc aag aat cca cga cta agg gga ttg gtt 1806  
 aac ctg gtt gta gtt ggc gga gat cga agg aag gaa tcc aaa 1848  
 gat ttg gaa gag cag gca gag atg aag aag atg tat gag cta 1890  
 att gag act cat aat ttg aat ggc caa ttc aga tgg att tct 1932  
 tcc cag atg aac cga gtg agg aat ggt gag ctc tac cga tac 1974  
 att gct gac act aag gga gct ttc gtt cag cct gca ttc tac 2016  
 gag gcc ttt ggt ctg act gtt gtc gaa gca atg act tgt ggt 2058  
 ttg cct aca ttt gca act aat cac ggt ggt cca gct gag atc 2100  
 atc gtt cat gga aag tcc ggc ttc cac att gat cca tat cac 2142  
 ggt gag caa gct gct gat ctg cta gct gat ttc ttt gag aaa 2184  
 tgc aag aaa gag cct tca cat tgg gaa acc att tgc acg ggt 2226  
 ggc ctg aag cgc atc caa gag aag tac act tgg caa atc tac 2268  
 tcc gaa agg cta ttg aca ctg gct gct gtt tat ggg ttc tgg 2310  
 aaa cat gtt tct aaa ctt gat cgt cta gaa atc cgt cgc tat 2352  
 ctt gaa atg ttt tat gct ctc aag tac cgt aag atg gct gaa 2394  
 gct gtt cca ttg gct gct gag tga 2418

<210> 4

<211> 841

<212> protein

5 <213> *Solanum tuberosum*

<223> SSX fusionada con una cola aminoacídica rica en histidinas, deducida tras la expresión de SSX en el plásmido de expresión pET-28a(+)

<400>

Met gly ser ser his his his his his ser ser gly leu val pro arg gly ser his  
 5 . 10 15 20  
 met ala ser met thr gly gly gln gln met gly arg gly ser glu phe met ala glu arg  
 25 30 35 40  
 val leu thr arg val his ser leu arg glu arg val asp ala thr leu ala ala his arg  
 45 50 55 60  
 asn glu ile leu leu phe leu ser arg ile glu ser his gly lys gly ile leu lys pro  
 65 70 75 80  
 his glu leu leu ala glu phe asp ala ile arg gln asp asp lys asn lys leu asn glu  
 85 90 95 100  
 his ala phe glu glu leu leu lys ser thr gln glu ala ile val leu pro pro trp val  
 105 110 115 120  
 ala leu ala ile arg leu arg pro gly val trp glu tyr ile arg val asn val asn ala  
 125 130 135 140



ES 2 363 231 T3

leu val val glu glu leu ser val pro glu tyr leu gln phe lys glu glu leu val asp	145	150	155	160
gly ala ser asn gly asn phe val leu glu leu asp phe glu pro phe thr ala ser phe	165	170	175	180
pro lys pro thr leu thr lys ser ile gly asn gly val glu phe leu asn arg his leu	185	190	195	200
ser ala lys met phe his asp lys glu ser met thr pro leu leu glu phe leu arg ala	205	210	215	220
his his tyr lys gly lys thr met met leu asn asp arg ile gln asn ser asn thr leu	225	230	235	240
gln asn val leu arg lys ala glu glu tyr leu ile met leu ser pro asp thr pro tyr	245	250	255	260
phe glu phe glu his lys phe gln glu ile gly leu glu lys gly trp gly asp thr ala	265	270	275	280
glu arg val leu glu met val cys met leu leu asp leu leu glu ala pro asp ser cys	285	290	295	300
thr leu glu lys phe leu gly arg ile pro met val phe asn val val ile leu ser pro	305	310	315	320
his gly tyr phe ala gln glu asn val leu gly tyr pro asp thr gly gly gln val val	325	330	335	340
tyr ile leu asp gln val pro ala leu glu arg glu met leu lys arg ile lys glu gln	345	350	355	360
gly leu asp ile ile pro arg ile leu ile val thr arg leu leu pro asp ala val gly	365	370	375	380
thr thr cys gly gln arg ile glu lys val tyr gly ala glu his ser his ile leu arg	385	390	395	400
val pro phe arg thr glu lys gly ile val arg lys trp ile ser arg phe glu val trp	405	410	415	420
pro tyr met glu thr phe ile glu asp val ala lys glu ile ser ala glu leu gln ala	425	430	435	440
lys pro asp leu ile ile gly asn tyr ser glu gly asn leu ala ala ser leu leu ala	445	450	455	460
his lys leu gly val thr gln cys thr ile ala his ala leu glu lys thr lys tyr pro	465	470	475	480
asp ser asp ile tyr trp lys lys phe asp glu lys tyr his phe ser ser gln phe thr	485	490	495	500

ES 2 363 231 T3

ala asp leu ile ala met asn his thr asp phe ile ile thr ser thr phe gln glu ile  
 505 510 515 520  
 ala gly ser lys asp thr val gly gln tyr glu ser his met ala phe thr met pro gly  
 525 530 535 540  
 leu tyr arg val val his gly ile asn val phe asp pro lys phe asn ile val ser pro  
 545 550 555 560  
 gly ala asp ile asn leu tyr phe ser tyr ser glu thr glu lys arg leu thr ala phe  
 565 570 575 580  
 his pro glu ile asp glu leu leu tyr ser asp val glu asn asp glu his leu cys val  
 585 590 595 600  
 leu lys asp arg thr lys pro ile leu phe thr met ala arg leu asp arg val lys asn  
 605 610 615 620  
 leu thr gly leu val glu trp tyr ala lys asn pro arg leu arg gly leu val asn leu  
 625 630 635 640  
 val val val gly gly asp arg arg lys glu ser lys asp leu glu glu gln ala glu met  
 645 650 655 660  
 lys lys met tyr glu leu ile glu thr his asn leu asn gly gln phe arg trp ile ser  
 665 670 675 680  
 ser gln met asn arg val arg asn gly glu leu tyr arg tyr ile ala asp thr lys gly  
 685 690 695 700  
 ala phe val gln pro ala phe tyr glu ala phe gly leu thr val val glu ala met thr  
 705 710 715 720  
 cys gly leu pro thr phe ala thr asn his gly gly pro ala glu ile ile val his gly  
 725 730 735 740  
 lys ser gly phe his ile asp pro tyr his gly glu gln ala ala asp leu leu ala asp  
 745 750 755 760  
 phe phe glu lys cys lys lys glu pro ser his trp glu thr ile ser thr gly gly leu  
 765 770 775 780  
 lys arg ile gln glu lys tyr thr trp gln ile tyr ser glu arg leu leu thr leu ala  
 785 790 795 800  
 ala val tyr gly phe trp lys his val ser lys leu asp arg leu glu ile arg arg tyr  
 805 810 815 820  
 leu glu met phe tyr ala leu lys tyr arg lys met ala glu ala val pro leu ala ala  
 825 830 835 840

glu  
 841

<210> 5

<211> 41

5 <212> DNA

<213> *Solanum tuberosum*

<220>

<223> Promotor directo necesario para la mutagénesis puntual de SSX.

<400>

10 cgaacatgca ttcgaagaac cctgaaatc cactcaggaa g 41

<210> 6

<211> 41

<212> DNA

<213> *Solanum tuberosum*

- <220>  
 <223> Promotor inverso necesario para la mutagénesis puntual de SSX.  
 <400>  
 cttcctgagt ggatttcagg ggttcttcca atgcatgttc g 41  
 5 <210> 7  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> *Solanum tuberosum*  
 <220>  
 10 <223> Promotor directo necesario para la mutagénesis puntual de SSX.  
 <400>  
 cggagaagag acttacagca tctcacccctg aaattgatga gc 42  
 <210> 8  
 <211> 42  
 15 <212> DNA  
 <213> *Solanum tuberosum*  
 <220>  
 <223> Promotor inverso necesario para la mutagénesis puntual de SSX.  
 <400>  
 20 gctcatcaat ttcagggtga gatgctgtaa gtctcttctc cg 42  
 <210> 9  
 <211> 76  
 <212> DNA  
 <213> *Solanum tuberosum*  
 25 <220>  
 <223> Promotor directo necesario para la mutagénesis puntual de SSX y obtención de SS5.  
 <400>  
 gatttcttg agaaatgcaa gagagagcct tcacattggg aaaccatttc  
 gacggatggc ctgaagcgca tccaag 76  
 30 <210> 10  
 <211> 76  
 <212> DNA  
 <213> *Solanum tuberosum*  
 <220>  
 35 <223> Promotor inverso necesario para la mutagénesis puntual de SSX y obtención de SS5.  
 <400>  
 cttggatgag cttctggcca tccgctgaaa tggttccca atggaaggc tctctctgc atttctcaaa gaaatc 76  
 <210> 11  
 <211> 2418  
 40 <212> DNA  
 <213> *Solanum tuberosum*  
 <220>

ES 2 363 231 T3

<223> SS5

atg gct gaa cgt gtt ttg act cgt gtt cat agc ctt cgt gaa 42  
 cgt gtt gat gca act tta gct gct cac cgc aat gag ata ctg 84  
 ctg ttt ctt tca agg atc gaa agc cac gga aaa ggg ata ttg 126  
 aaa cct cac gag ctt ttg gct gag ttc gat gca att cgc caa 168  
 gat gac aaa aac aaa ctg aac gaa cat gca ttc gaa gaa ccc 210  
 ctg aaa tcc act cag gaa gcg att gtt ctg ccc cct tgg gtt 252  
 gca ctt gct att cgt ttg agg cct ggt gtc tgg gaa tac atc 294  
 cgt gtg aac gtc aat gca cta gtt gtc gag gag ctg tcc gtc 336  
 cct gag tat ttg caa ttc aag gaa gaa ctt gtc gac gga gcc 378  
 tcg aat gga aat ttc gtt ctc gag ttg gat ttc gag cct ttc 420  
 act gca tcc ttt cct aaa cca acc ctc acc aaa tct att gga 462  
 aat gga gtt gaa ttc ctc aat agg cac ctc tct gcc aaa atg 504  
 ttc cat gac aag gaa agc atg acc ccg ctt ctc gaa ttt ctt 546  
 cgc gct cac cat tat aag ggc aag aca atg atg ctg aat gat 588  
 agg ata cag aat tcg aat act ctt caa aat gtc cta agg aag 630  
 gca gag gaa tac ctc att atg ctt tcc cca gat act cca tat 672  
 ttc gaa ttc gag cac aag ttc caa gaa atc gga ttg gag aag 714  
 gga tgg ggg gac acg gcg gag cgt gtg cta gag atg gta tgc 756  
 atg ctt ctt gat ctc ctt gag gct cct gac tca tgt act ctt 798  
 gag aag ttc ttg ggg aga att cct atg gtt ttc aat gtg gtt 840  
 atc ctt tcc cct cat gga tat ttt gcc caa gaa aat gtc ttg 882  
 ggt tat ccc gac acc ggt ggc cag gtt gtc tac att tta gat 924  
 caa gtt ccc gcc ttg gag cgt gaa atg ctt aag cgc ata aag 966  
 gag caa gga ctt gat atc atc ccc cgt att ctt att gtt act 1008  
 cgt ctg ctg ccc gat gca gtt gga acc act tgt ggt cag agg 1050  
  
 att gag aag gtg tat gga gca gaa cac tca cat att ctt agg 1092  
 gtc cct ttt agg act gag aag ggc att gtt cgc aaa tgg atc 1134  
 tct cgc ttt gaa gtg tgg cca tac atg gag aca ttc att gag 1176  
 gat gtt gca aaa gaa att tct gca gaa ctg cag gcc aag cca 1218  
 gat ttg ata att gga aac tac agt gag ggc aat ctt gct gct 1260  
 tct ttg cta gct cac aag tta ggc gta act cag tgc acc att 1302  
 gcc cac gcg ttg gag aaa acg aag tat cct gat tcc gac att 1344  
 tac tgg aaa aag ttt gat gaa aaa tac cat ttc tcg tcc cag 1386  
 ttt acc gct gat ctc att gca atg aat cac act gat ttc atc 1428  
 atc acc agc acc ttc cag gag ata gca gga agc aag gac act 1470  
 gtg gga caa tat gag agc cat atg gca ttc aca atg cct gga 1512  
 ttg tac aga gtt gtt cat ggc att aat gtg ttc gac ccc aaa 1554

ES 2 363 231 T3

ttc aac att gtc tca cct gga gct gat att aac ctc tac ttc 1596  
 tcg tac tcc gaa acg gaa aag aga ctt aca gca tct cac cct 1638  
 gaa att gat gag ctg ctg tat agt gac gtt gag aat gac gaa 1680  
 cat ctg tgt gtg ctc aag gat agg act aaa cca att tta ttc 1722  
 aca atg gca agg ttg gat cgt gtg aag aat tta act gga ctt 1764  
 gtt gag tgg tac gcc aag aat cca cga cta agg gga ttg gtt 1806  
 aac ctg gtt gta gtt ggc gga gat cga agg aag gaa tcc aaa 1848  
 gat ttg gaa gag cag gca gag atg aag aag atg tat gag cta 1890  
 ata gag act cat aat ttg aat ggc caa ttc aga tgg att tct 1932  
 tcc cag atg aac cga gtg agg aat ggt gag ctc tac cga tac 1974  
 att gct gac act aag gga gct ttc gtt cag cct gca ttc tac 2016  
 gag gct ttt ggt ctg act gtt gtc gaa gca atg act tgt ggt 2058  
 ttg cct aca ttt gca act aat cac ggt ggt cca gct gag atc 2100  
 atc gtt cat gga aag tcc ggc ttc cac att gat cca tat cac 2142  
 ggt gag caa gct gct gat ctg cta gct gat ttc ttt gag aaa 2184  
 tgc aag aga gag cct tca cat tgg gaa acc att tcg acg gat 2226  
 ggc ctg aag cgc atc caa gag aag tac act tgg caa atc tac 2268  
 tcc gaa agg cta ttg aca ctg gct gct gtt tat ggg ttc tgg 2310  
 aaa cat gtt tct aag ctt gat cgt cta gaa atc cgt cgc tat 2352  
 ctt gaa atg ttt tat gct ctc aag tac cgt aag atg gct gaa 2394  
 gct gtt cca ttg gct gct gag tga atg aag 2418

<210> 12

<211> 841

<212> protein

5 <213> *Solanum tuberosum*

<223> SS5 fusionada con una secuencia aminoacídica rica en histidinas

<400>

Met	gly	ser	ser	his	his	his	his	his	his	ser	ser	gly	leu	val	pro	arg	gly	ser	his
			5						10				15					20	
met	ala	ser	met	thr	gly	gly	gln	gln	met	gly	arg	gly	ser	glu	phe	met	ala	glu	arg
			25						30				35					40	
val	leu	thr	arg	val	his	ser	leu	arg	glu	arg	val	asp	ala	thr	leu	ala	ala	his	arg
			45						50				55					60	

ES 2 363 231 T3

asn glu ile leu leu phe leu ser arg ile glu ser his gly lys gly ile leu lys pro	65	70	75	80
his glu leu leu ala glu phe asp ala ile arg gln asp asp lys asn lys leu asn glu	85	90	95	100
his ala phe glu glu pro leu lys ser thr gln glu ala ile val leu pro pro trp val	105	110	115	120
ala leu ala ile arg leu arg pro gly val trp glu tyr ile arg val asn val asn ala	125	130	135	140
leu val val glu glu leu ser val pro glu tyr leu gln phe lys glu glu leu val asp	145	150	155	160
gly ala ser asn gly asn phe val leu glu leu asp phe glu pro phe thr ala ser phe	165	170	175	180
pro lys pro thr leu thr lys ser ile gly asn gly val glu phe leu asn arg his leu	185	190	195	200
ser ala lys met phe his asp lys glu ser met thr pro leu leu glu phe leu arg ala	205	210	215	220
his his tyr lys gly lys thr met met leu asn asp arg ile gln asn ser asn thr leu	225	230	235	240
gln asn val leu arg lys ala glu glu tyr leu ile met leu ser pro asp thr pro tyr	245	250	255	260
phe glu phe glu his lys phe gln glu ile gly leu glu lys gly trp gly asp thr ala	265	270	275	280
glu arg val leu glu met val cys met leu leu asp leu leu glu ala pro asp ser cys	285	290	295	300
thr leu glu lys phe leu gly arg ile pro met val phe asn val val ile leu ser pro	305	310	315	320
his gly tyr phe ala gln glu asn val leu gly tyr pro asp thr gly gly gln val val	325	330	335	340
tyr ile leu asp gln val pro ala leu glu arg glu met leu lys arg ile lys glu gln	345	350	355	360
gly leu asp ile ile pro arg ile leu ile val thr arg leu leu pro asp ala val gly	365	370	375	380
thr thr cys gly gln arg ile glu lys val tyr gly ala glu his ser his ile leu arg	385	390	395	400
val pro phe arg thr glu lys gly ile val arg lys trp ile ser arg phe glu val trp	405	410	415	420
pro tyr met glu thr phe ile glu asp val ala lys glu ile ser ala glu leu gln ala	425	430	435	440
lys pro asp leu ile ile gly asn tyr ser glu gly asn leu ala ala ser leu leu ala	445	450	455	460
his lys leu gly val thr gln cys thr ile ala his ala leu glu lys thr lys tyr pro	465	470	475	480
asp ser asp ile tyr trp lys lys phe asp glu lys tyr his phe ser ser gln phe thr	485	490	495	500
ala asp leu ile ala met asn his thr asp phe ile ile thr ser thr phe gln glu ile	505	510	515	520

ES 2 363 231 T3

ala gly ser lys asp thr val gly gln tyr glu ser his met ala phe thr met pro gly  
525 530 535 540

leu tyr arg val val his gly ile asn val phe asp pro lys phe asn ile val ser pro  
545 550 555 560

gly ala asp ile asn leu tyr phe ser tyr ser glu thr glu lys arg leu thr ala ser  
565 570 575 580

his pro glu ile asp glu leu leu tyr ser asp val glu asn asp glu his leu cys val  
585 590 595 600

leu lys asp arg thr lys pro ile leu phe thr met ala arg leu asp arg val lys asn  
605 610 615 620

leu thr gly leu val glu trp tyr ala lys asn pro arg leu arg gly leu val asn leu  
625 630 635 640

val val val gly gly asp arg arg lys glu ser lys asp leu glu glu gln ala glu met  
645 650 655 660

lys lys met tyr glu leu ile glu thr his asn leu asn gly gln phe arg trp ile ser  
665 670 675 680

ser gln met asn arg val arg asn gly glu leu tyr arg tyr ile ala asp thr lys gly  
685 690 695 700

ala phe val gln pro ala phe tyr glu ala phe gly leu thr val val glu ala met thr  
705 710 715 720

cys gly leu pro thr phe ala thr asn his gly gly pro ala glu ile ile val his gly  
725 730 735 740

lys ser gly phe his ile asp pro tyr his gly glu gln ala ala asp leu leu ala asp  
745 750 755 760

phe phe glu lys cys lys arg glu pro ser his trp glu thr ile ser thr asp gly leu  
765 770 775 780

lys arg ile gln glu lys tyr thr trp gln ile tyr ser glu arg leu leu thr leu ala  
785 790 795 800

ala val tyr gly phe trp lys his val ser lys leu asp arg leu glu ile arg arg tyr  
805 810 815 820

leu glu met phe tyr ala leu lys tyr arg lys met ala glu ala val pro leu ala ala  
825 830 835 840

glu  
841

**REIVINDICACIONES**

1. Sacarosa sintasa caracterizada por la SEQ ID NO: 12.
2. Uso de la sacarosa sintasa de la reivindicación 1 en la producción de ADPG, caracterizado por la incubación de ADP y una isoforma de la sacarosa sintasa de patata, en condiciones adecuadas, seguido del aislamiento y purificación del ADPG producido.
- 5 3. El uso según la reivindicación 2, caracterizado por que comprende:
  - a) Incubar durante 12 h a 37°C 100ml de la siguiente solución:
 

Sacarosa	1 M
HEPES, pH 7.0	50 mM
EDTA	1 mM
Polietilenglicol	20%
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
KCl	15 mM
ADP	100 mM
  - b) Detener la reacción mediante calor, preferentemente a 100°C durante 90 s
  - c) Centrifugar durante 10 min a 10000 g
  - d) Someter a cromatografía en HPLC el sobrenadante, eluyendo y purificando el ADPG, mediante métodos convencionales.
4. Uso de la sacarosa sintasa de la reivindicación 1 en la fabricación de un kit o dispositivo de ensayo para determinación espectrofotométrica/fluorimétrica/amperométrica de sacarosa.
- 25 5. El uso según la reivindicación 4, caracterizado por que comprende el siguiente medio de incubación:
  - a) 2 unidades de sacarosa sintasa.
  - b) 2 mM de ADP
  - c) 2 unidades de ADPG pirofosfatasa de origen vegetal, animal o microbiano
  - d) 2 unidades de PGM
  - e) 2 unidades de G6PDH
  - f) 0.5 mM de NAD(P)
  - g) 100 ml de tampón de reacción: 50 mM HEPES, pH 7.0/1 mM EDTA/20% polietilenglicol/1 mM MgCl<sub>2</sub>/15 mM KCl
  - h) Muestra a ensayar previamente filtrada.
6. El uso según la reivindicación 4, caracterizado por que comprende el siguiente medio de incubación:
  - a) 2 unidades de sacarosa sintasa.
  - b) 2 mM de UDP
  - c) 2 unidades de UDPG pirofosfatasa de origen vegetal, animal o microbiano
  - d) 2 unidades de PGM
  - e) 2 unidades de G6PDH
  - f) 0.5 mM de NAD(P)
  - g) 100 ml de tampón de reacción: 50 mM HEPES, pH 7.0/1 mM EDTA/20% polietilenglicol/1 mM MgCl<sub>2</sub>/15 mM KCl
  - h) Muestra a ensayar previamente filtrada.
7. El uso según la reivindicación 4, caracterizado por que comprende el siguiente medio de incubación:
  - a) 2 unidades de sacarosa sintasa.
  - b) 2 mM de UDP
  - c) 2 units de UDPG dehidrogenasa
  - d) 0.5 mM de NAD
  - e) 100 ml de tampón de reacción: 50 mM HEPES, pH 7.0/1 mM EDTA/20% polietilenglicol/1 mM MgCl<sub>2</sub>/15 mM KCl
  - f) Muestra a ensayar previamente filtrada.
8. Uso de un fragmento de ADN caracterizado por la SEQ ID NO: 11 en la obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan sacarosa sintasa, caracterizado por introducir una construcción génica que contenga y exprese el fragmento de ADN de SEQ ID NO: 11 en un vector adecuado y transferir dicha construcción génica al genoma de una planta.



- 5
9. Plantas transgénicas caracterizadas por la sobreexpresión de la sacarosa sintasa de la reivindicación 1 y por presentar alto contenido en sacarosa, G6P, ADPG y almidón, respecto a los observados en el mismo tejido u órgano de las correspondientes plantas silvestres, crecidas en idénticas condiciones.
- 10
10. Plantas transgénicas, según la reivindicación 9, caracterizadas por que dicha sobreexpresión supone unos niveles de actividad enzimática sacarosa sintasa del orden de 2-10 veces superiores a los existentes en el mismo tejido de una planta silvestre no transgénica.
- 10
11. Plantas transgénicas, según las reivindicaciones 9 o 10, caracterizadas por que se seleccionan preferentemente entre plantas de tabaco, patata, tomate o arroz.
- 15
12. Plantas transgénicas, según la reivindicación 11, donde las hojas tienen un contenido superior en sacarosa, G6P, ADPG y almidón, y un balance amilosa/amilopectina superior, al observado en las hojas de las correspondientes plantas silvestres.
13. Plantas transgénicas, según la reivindicación 11, cuyas raíces, tubérculos y/o semillas presentan un contenido superior en G6P, ADPG y almidón, y un balance amilosa/amilopectina superior, a los observados en los mismos tejidos u órganos de las correspondientes plantas silvestres.

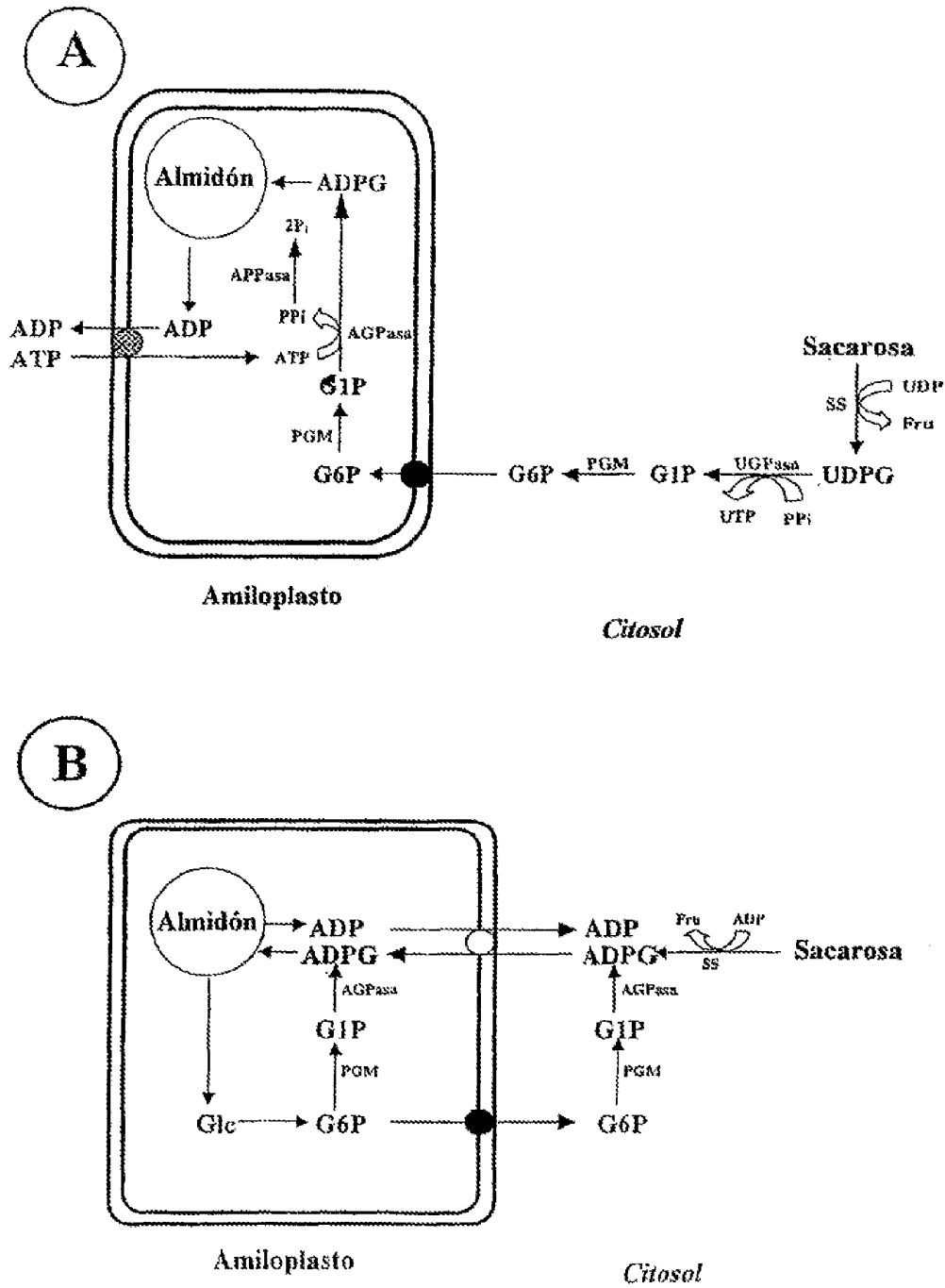


Fig. 1

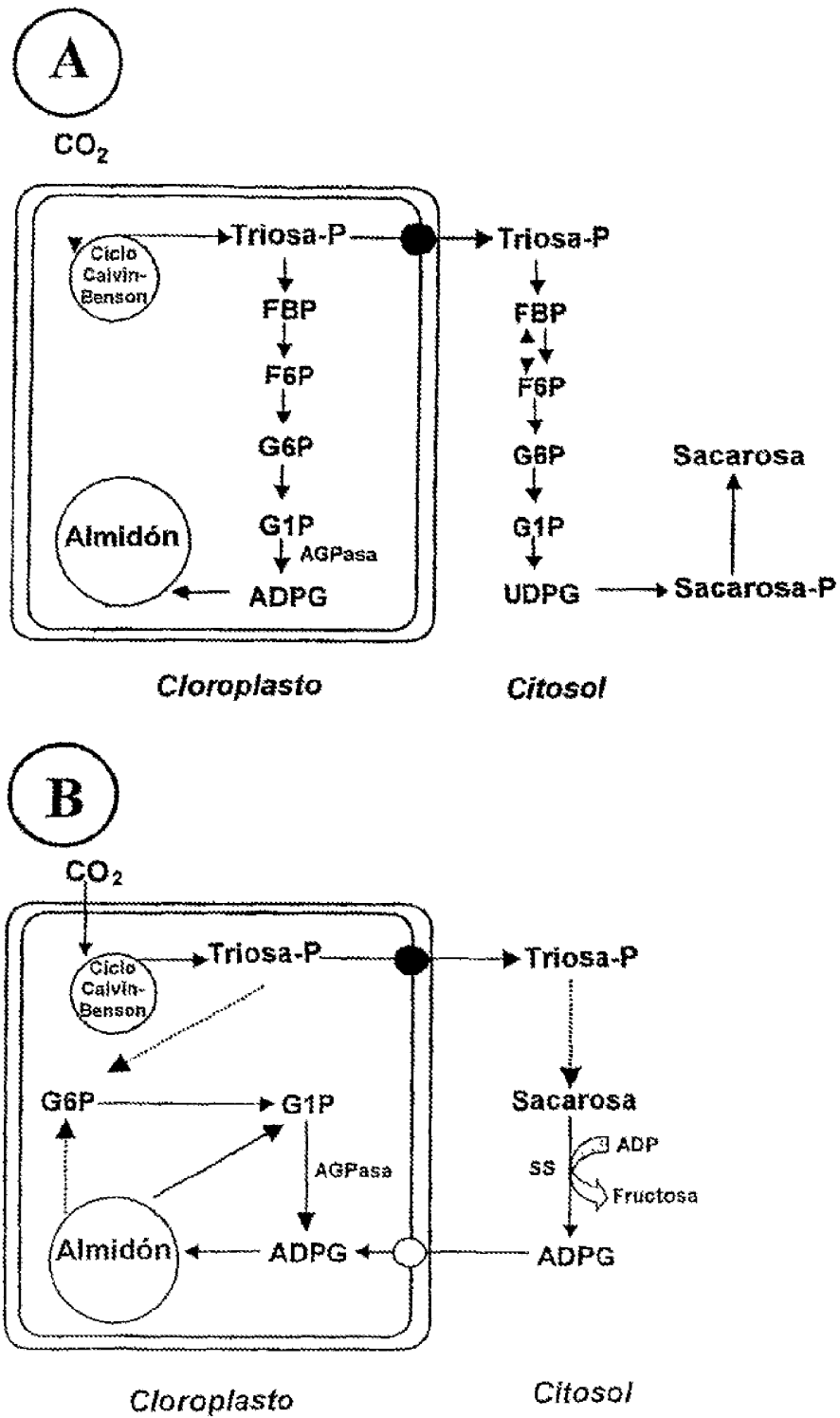
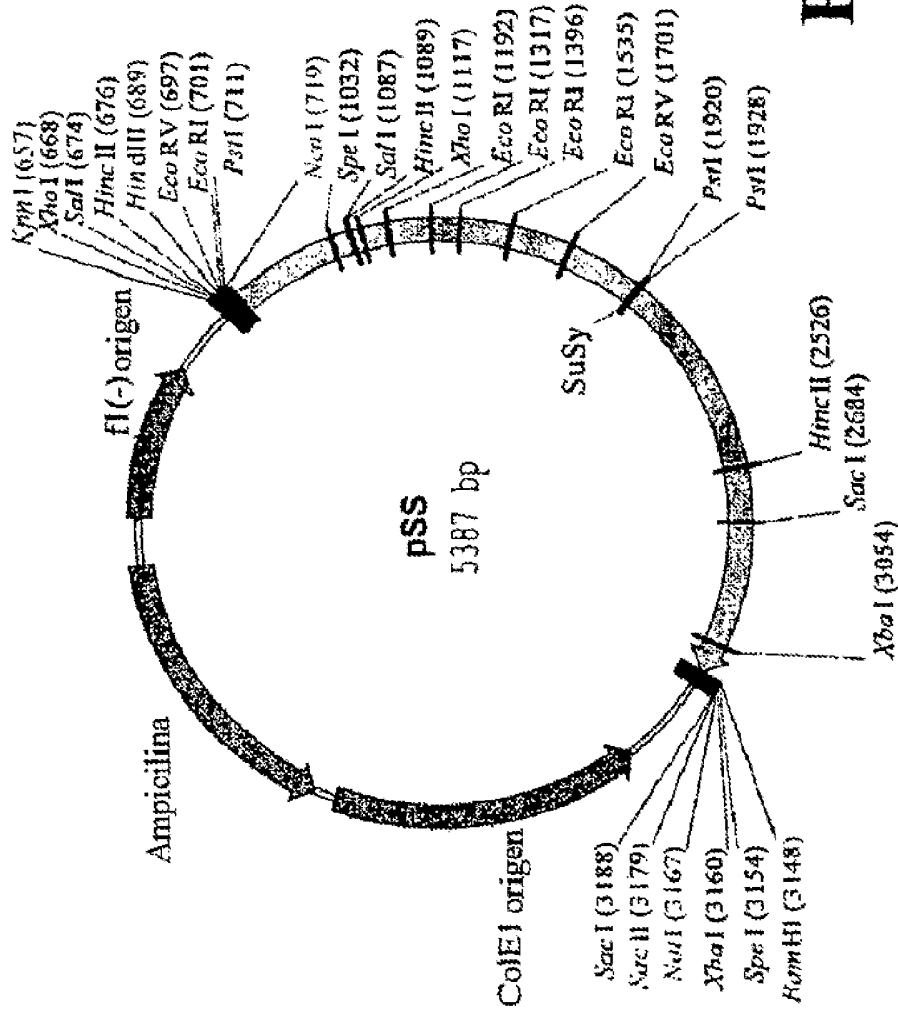
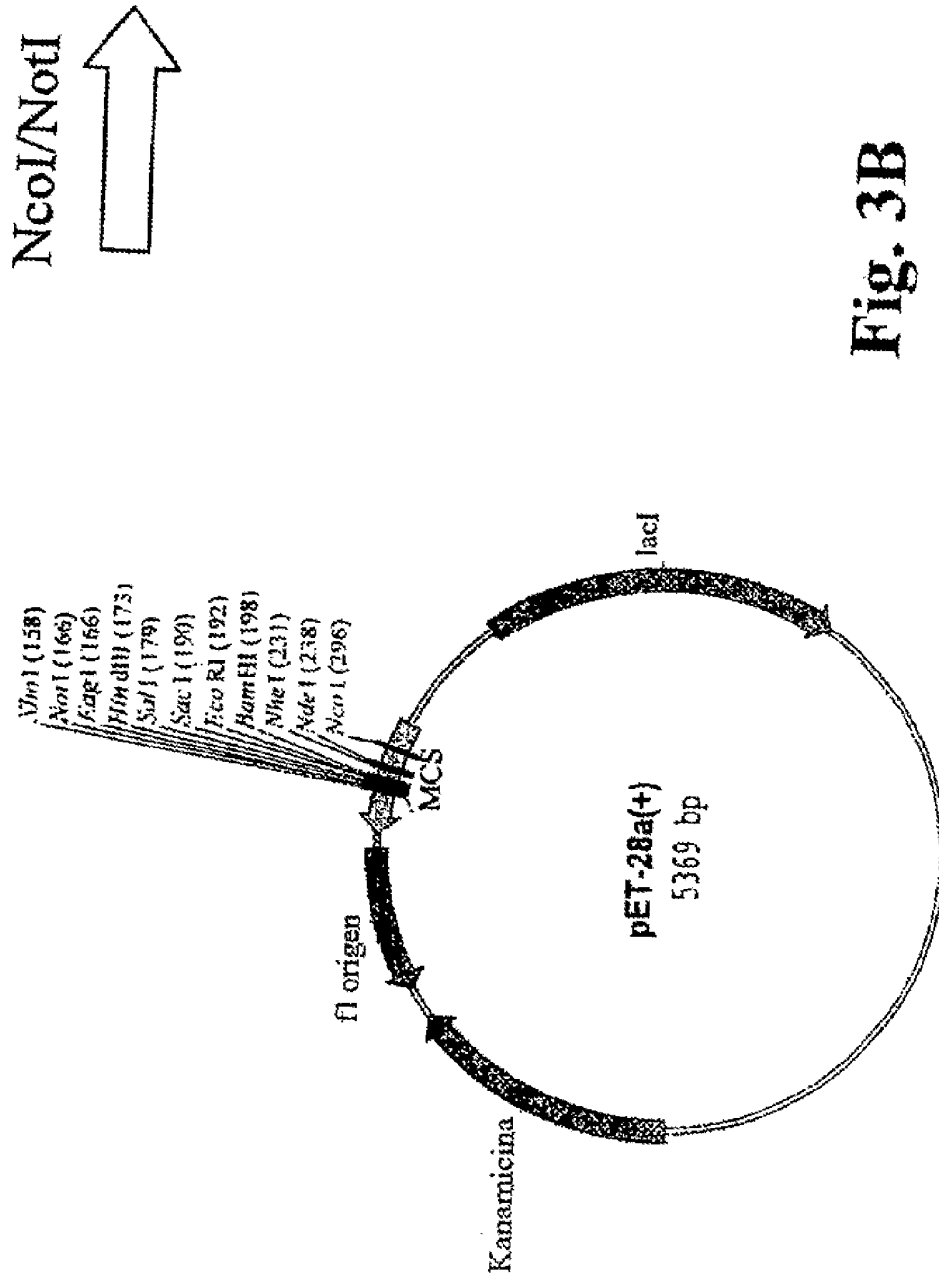


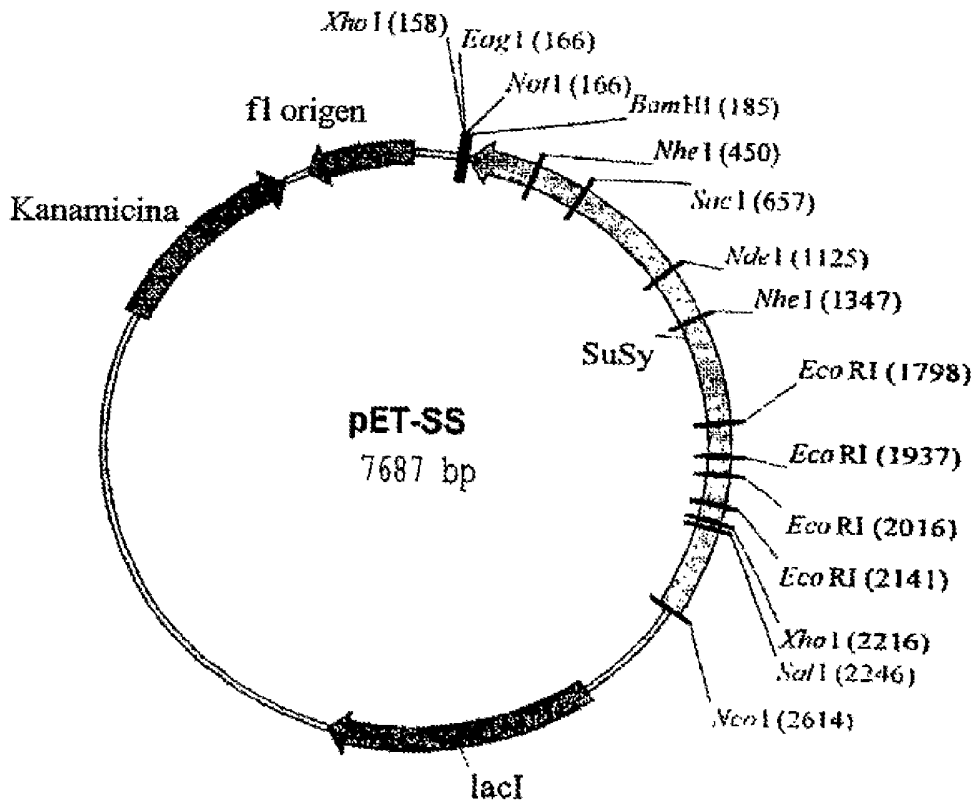
Fig. 2



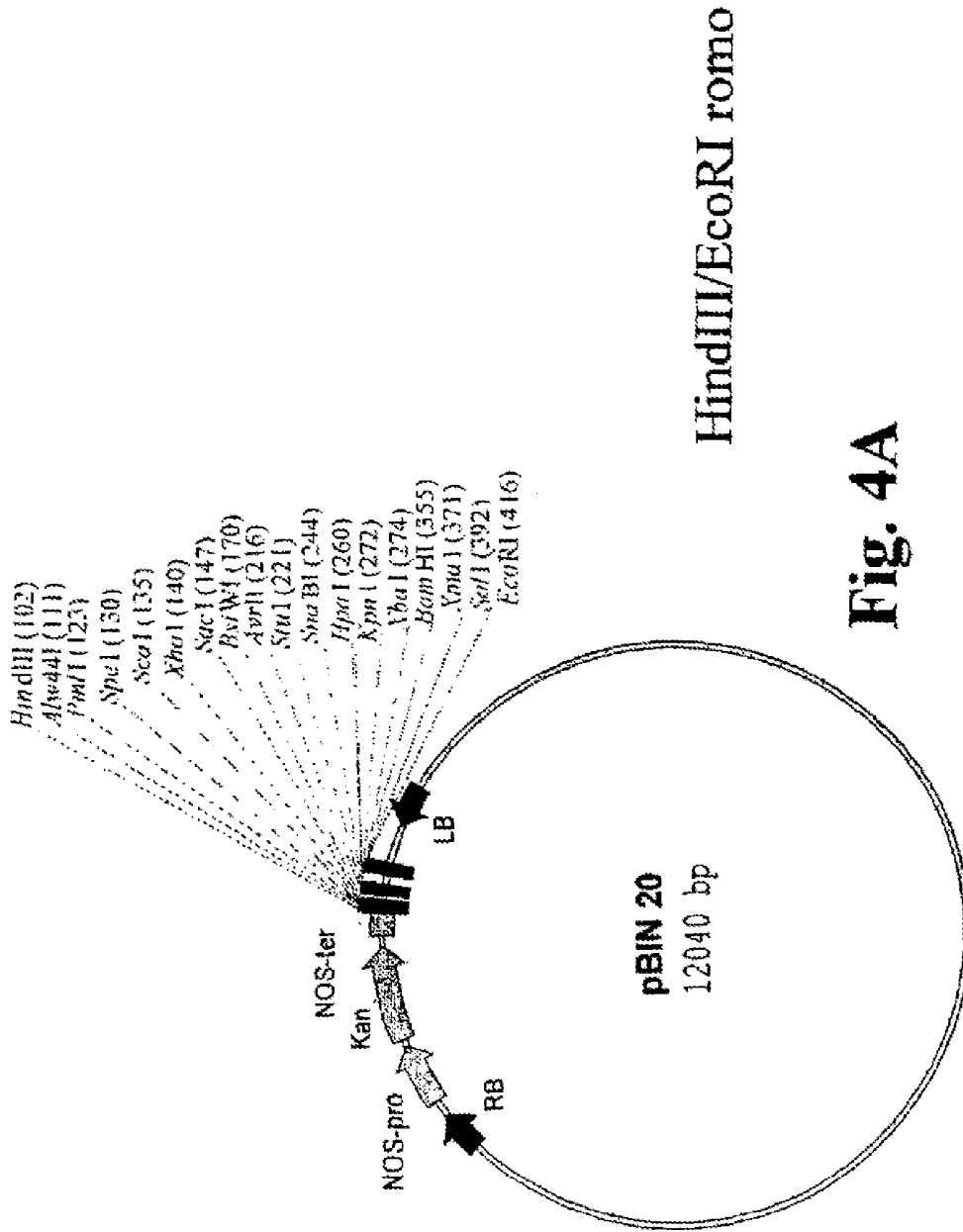
**Fig. 3A**



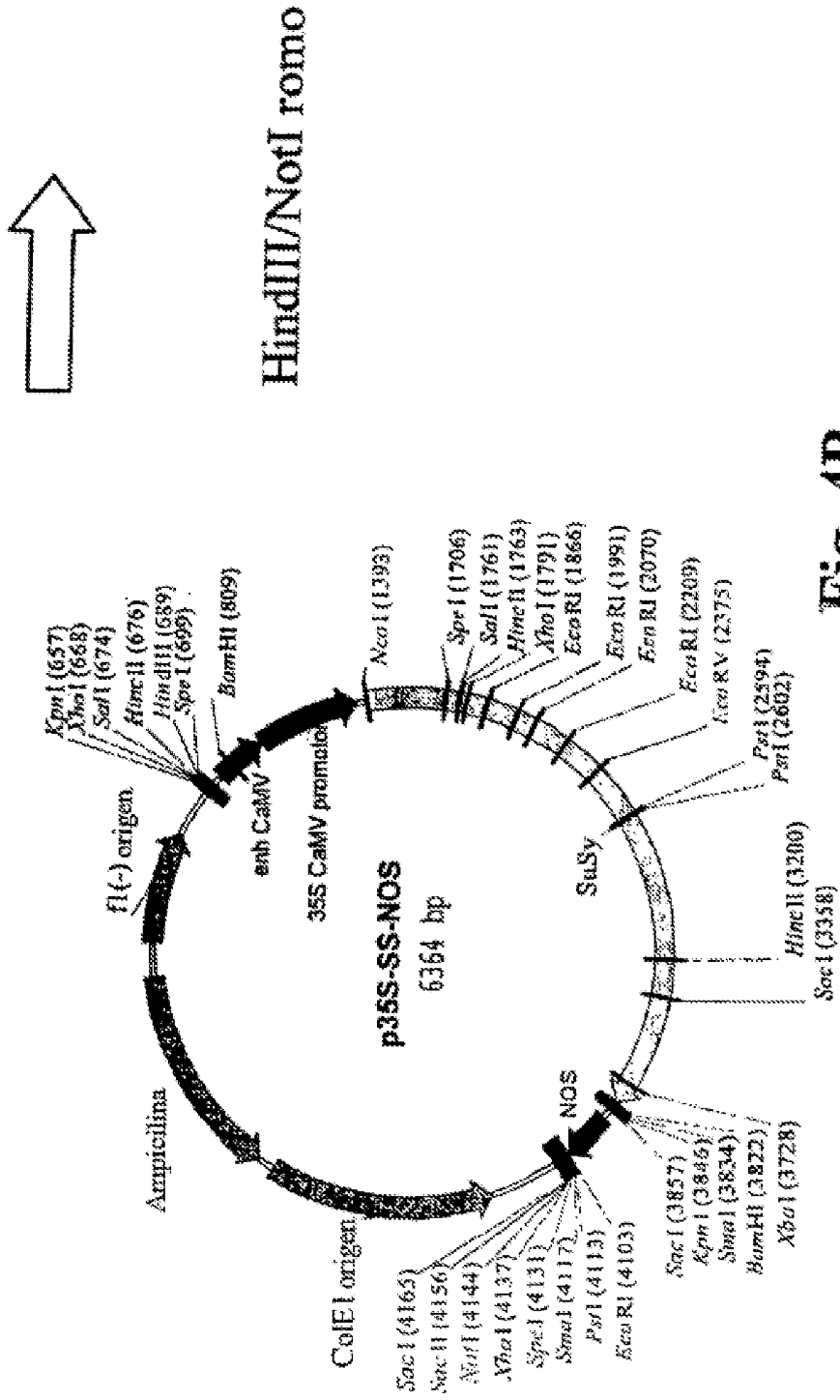
**Fig. 3B**



**Fig. 3C**

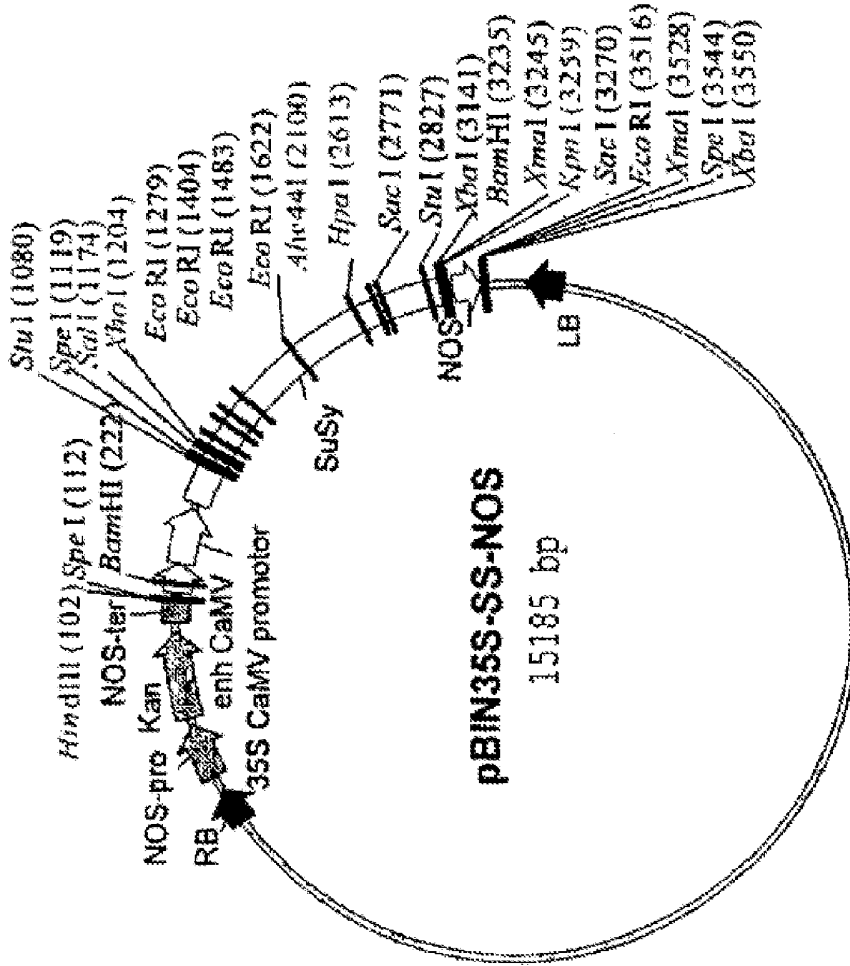


**Fig. 4A**



**Fig. 4B**





**Fig. 4C**

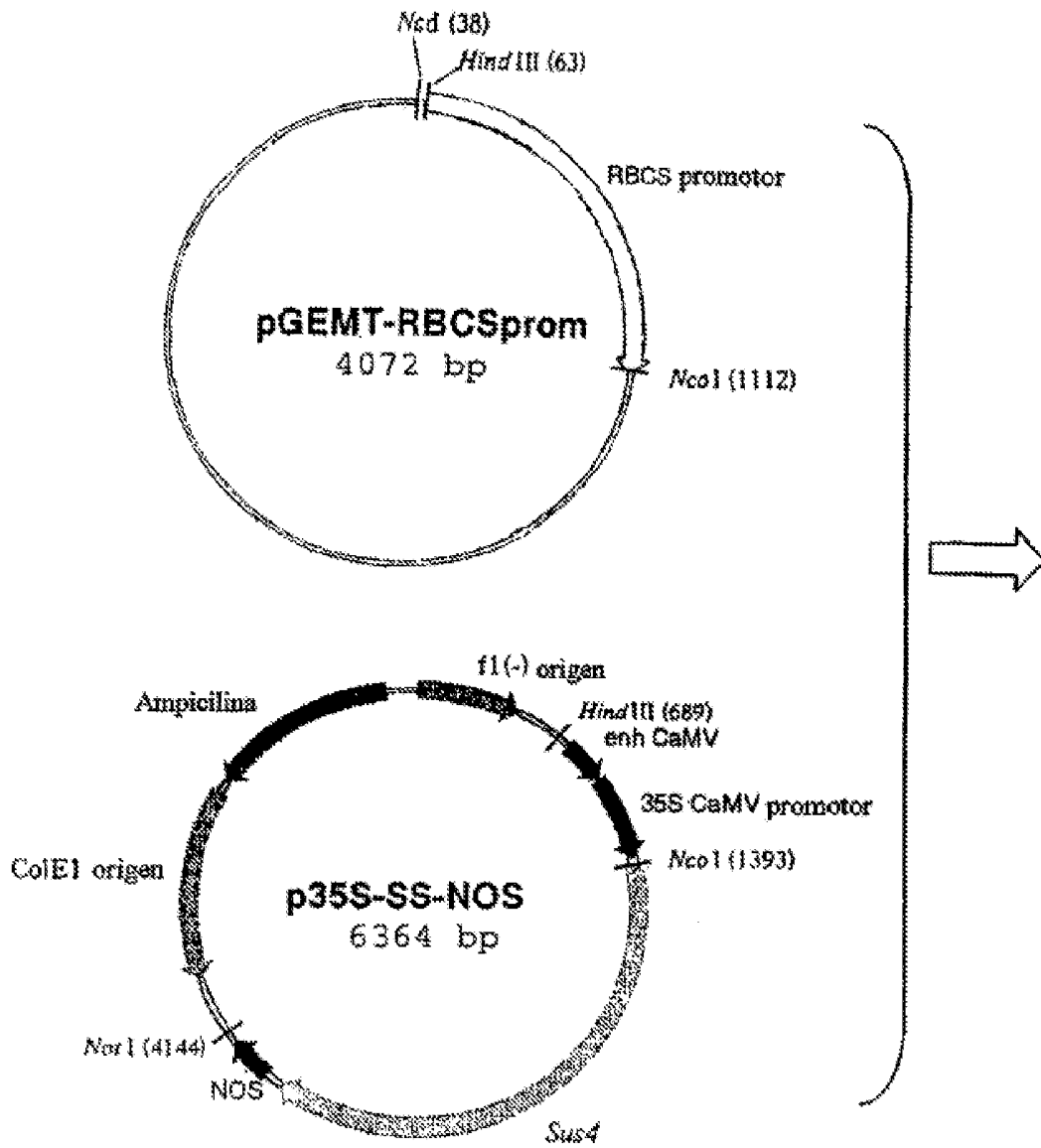


Fig. 5A

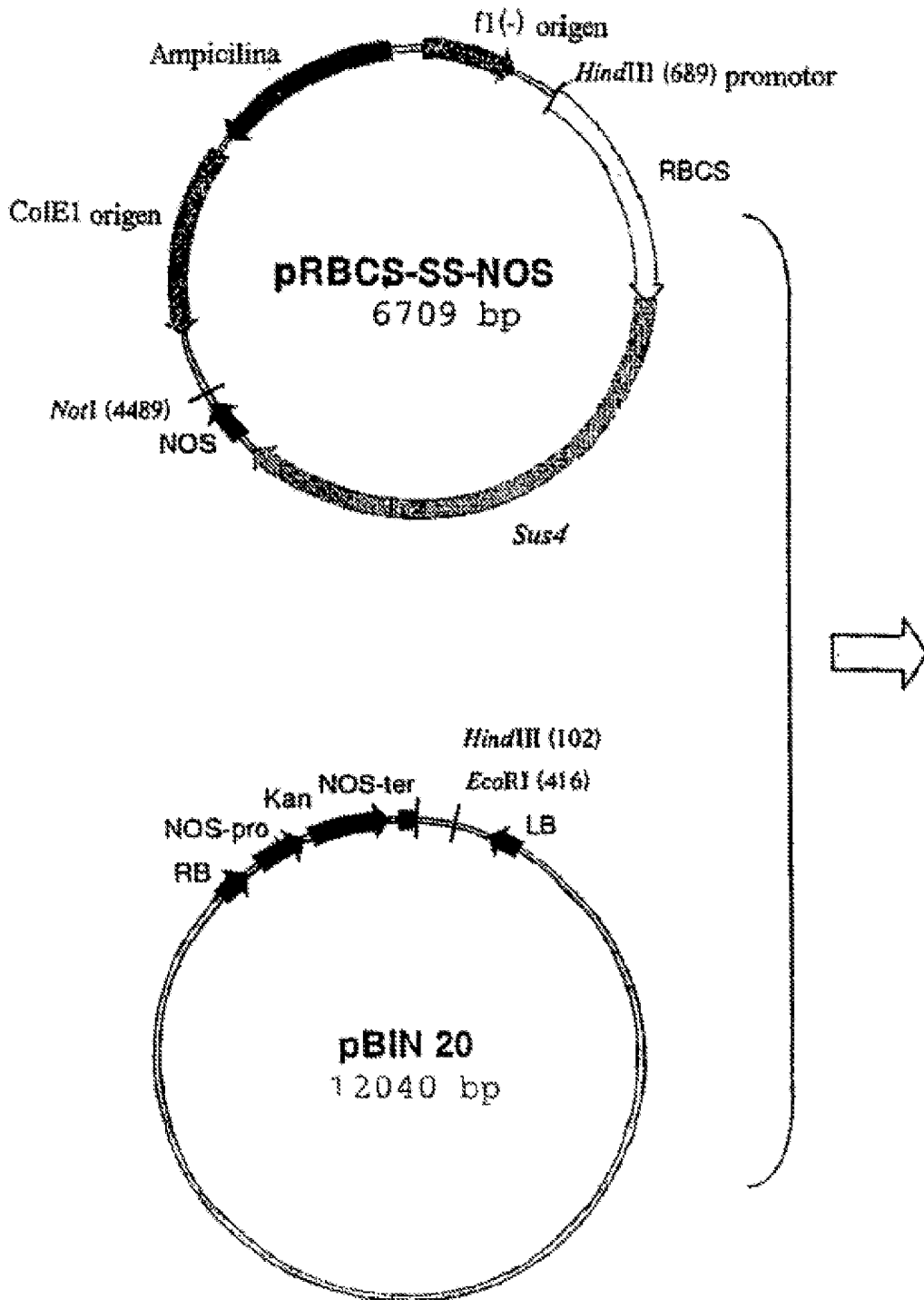


Fig. 5B

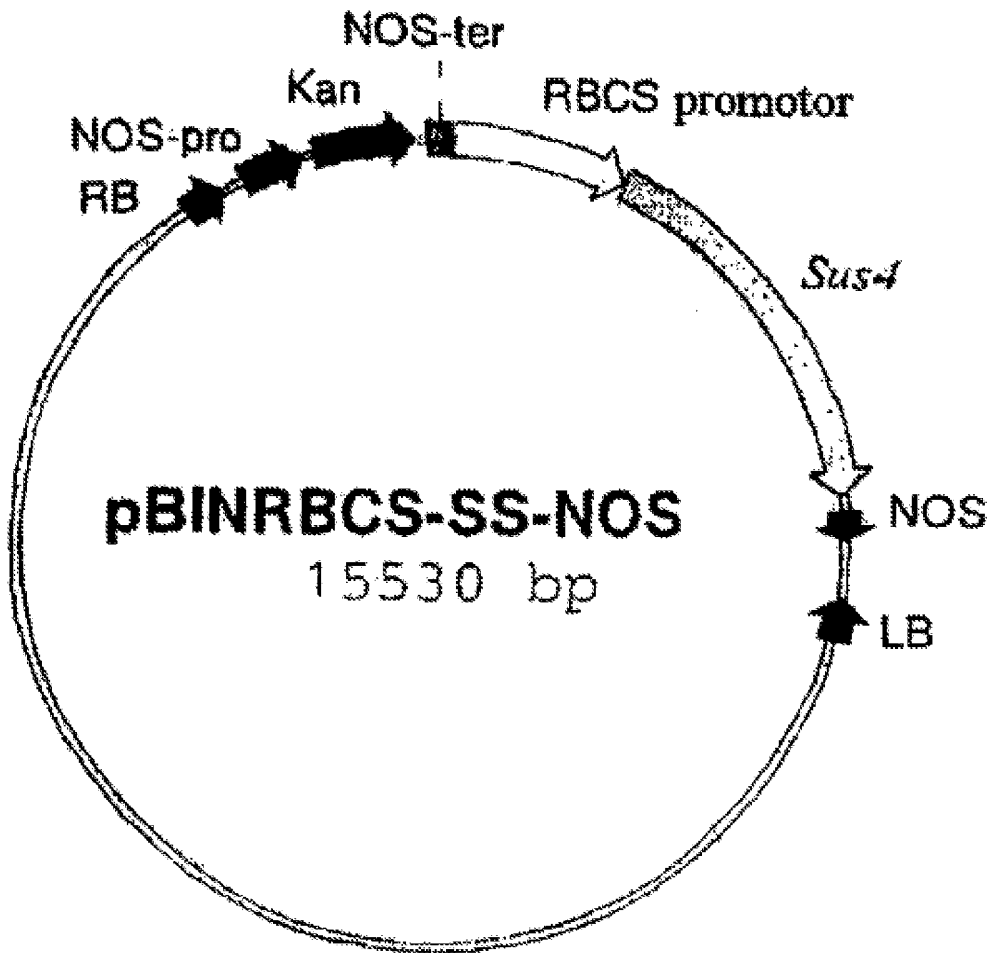


Fig. 5C

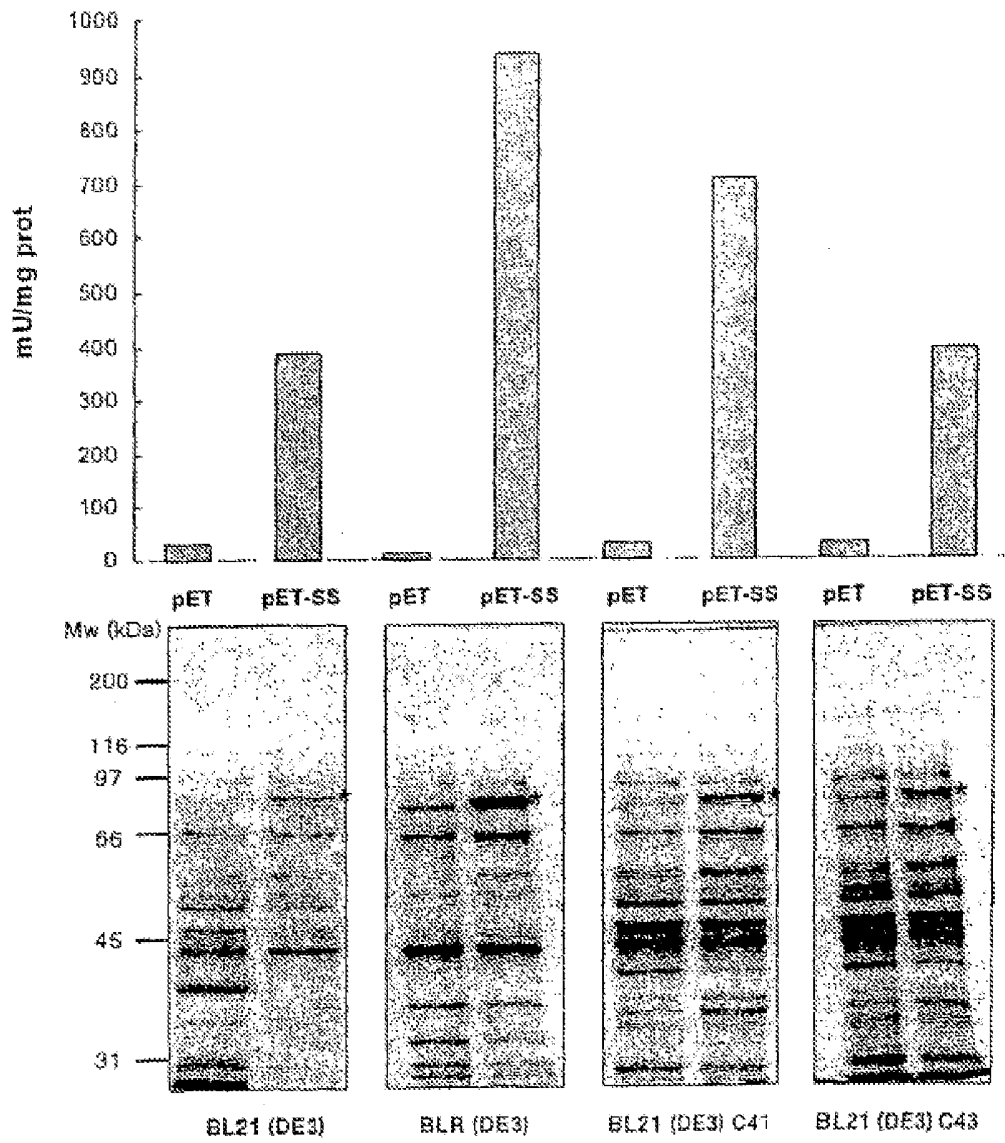
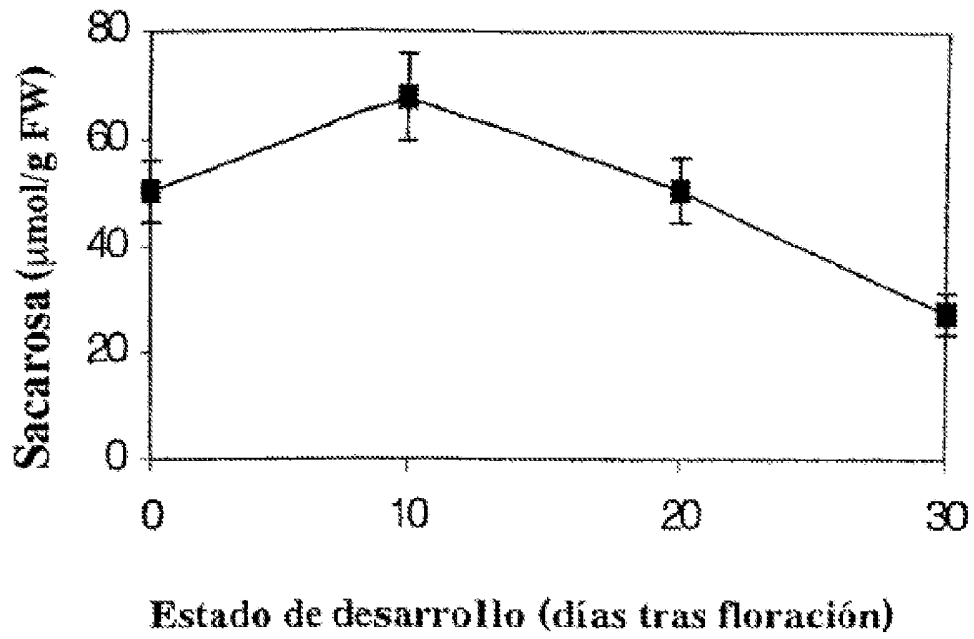


Fig. 6



**Fig. 7**

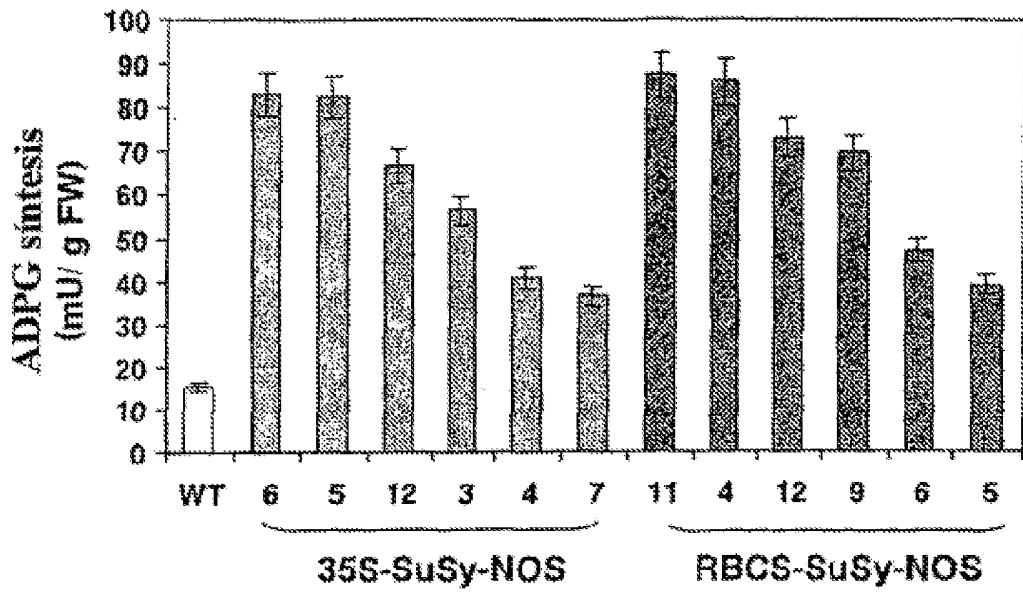


Fig. 8

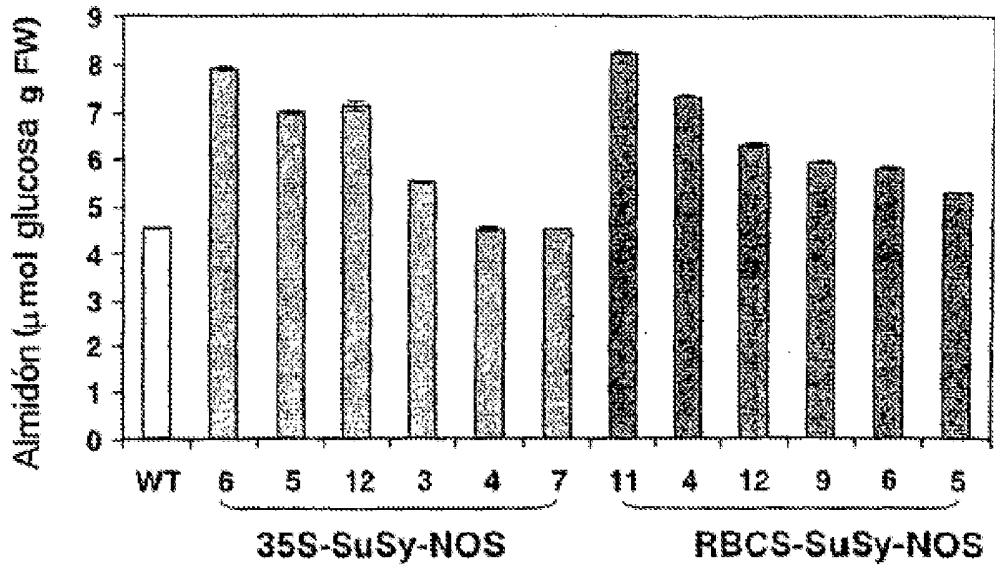


Fig. 9



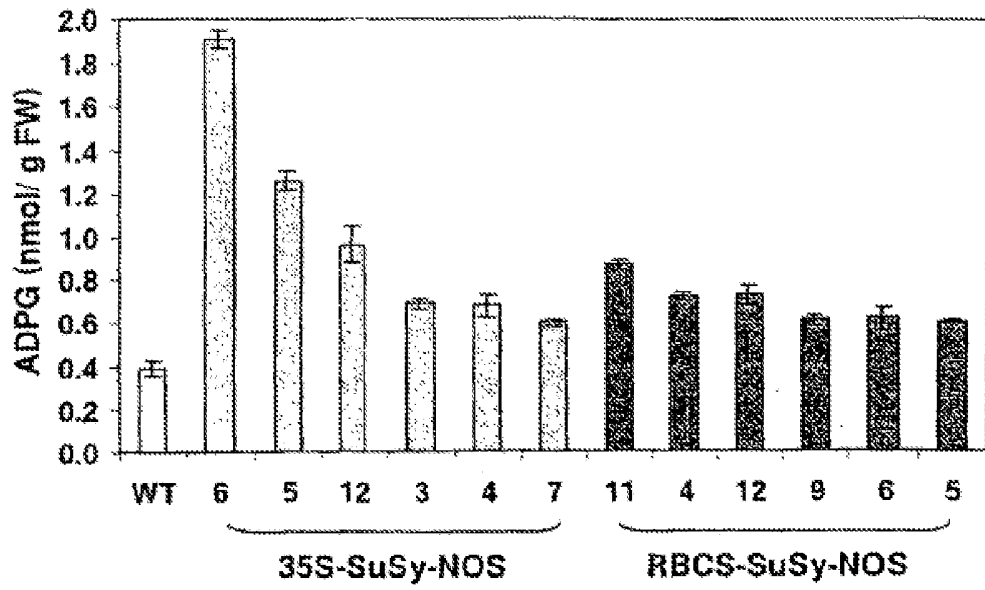


Fig. 10

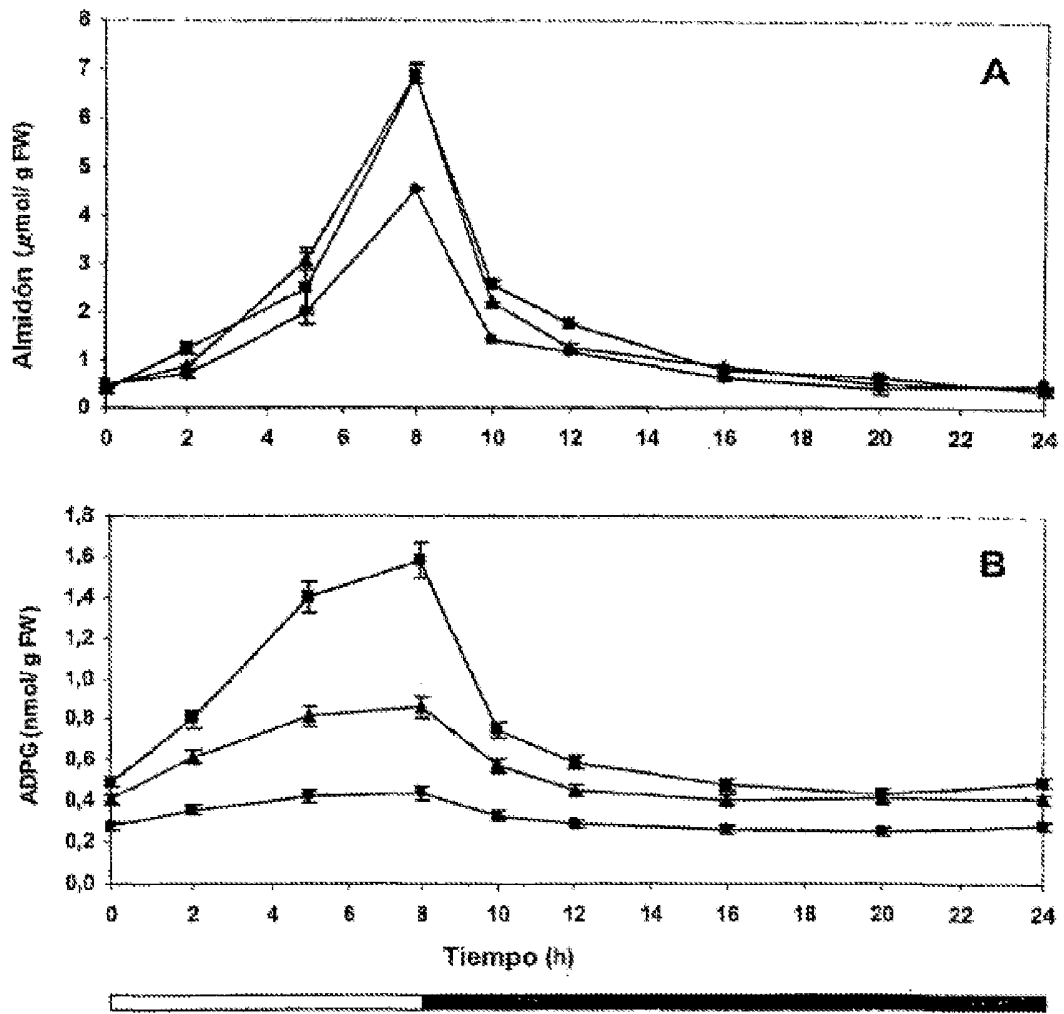


Fig. 11

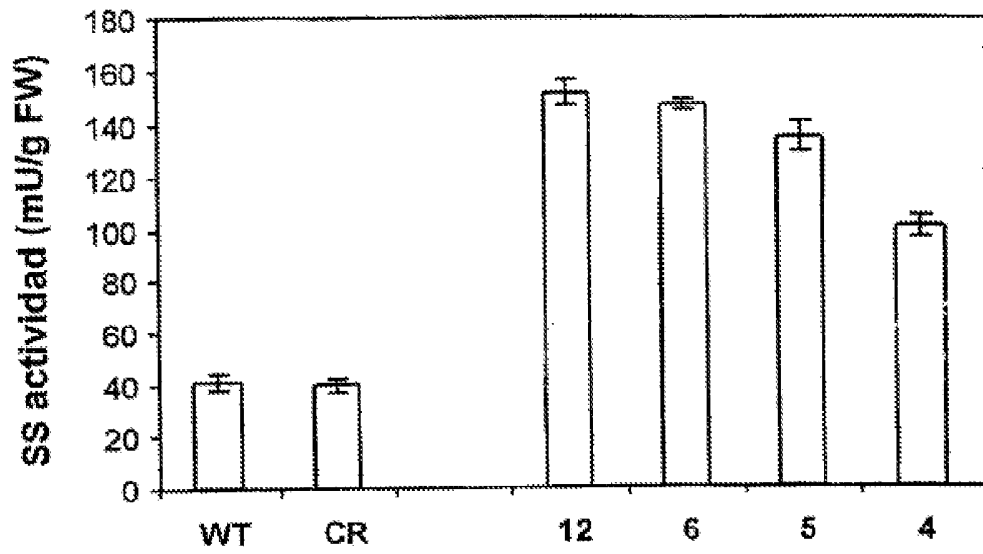
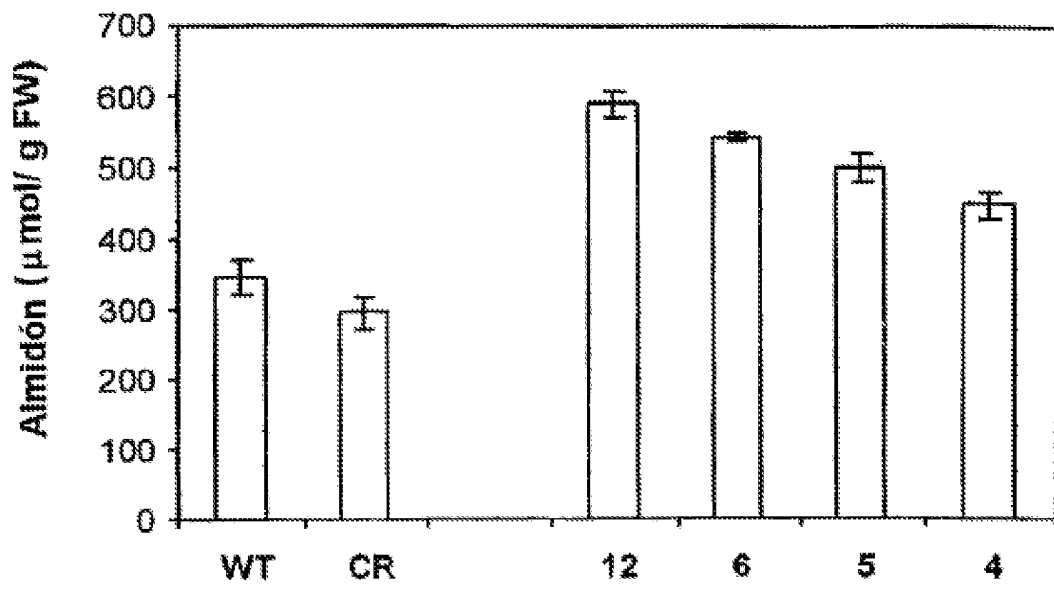
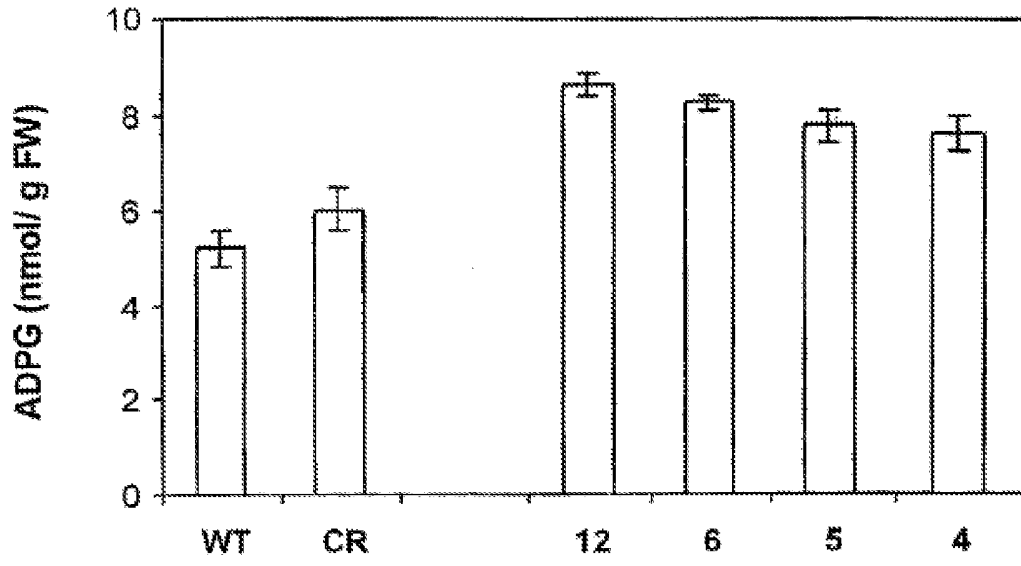


Fig. 12



**Fig. 13**



**Fig. 14**

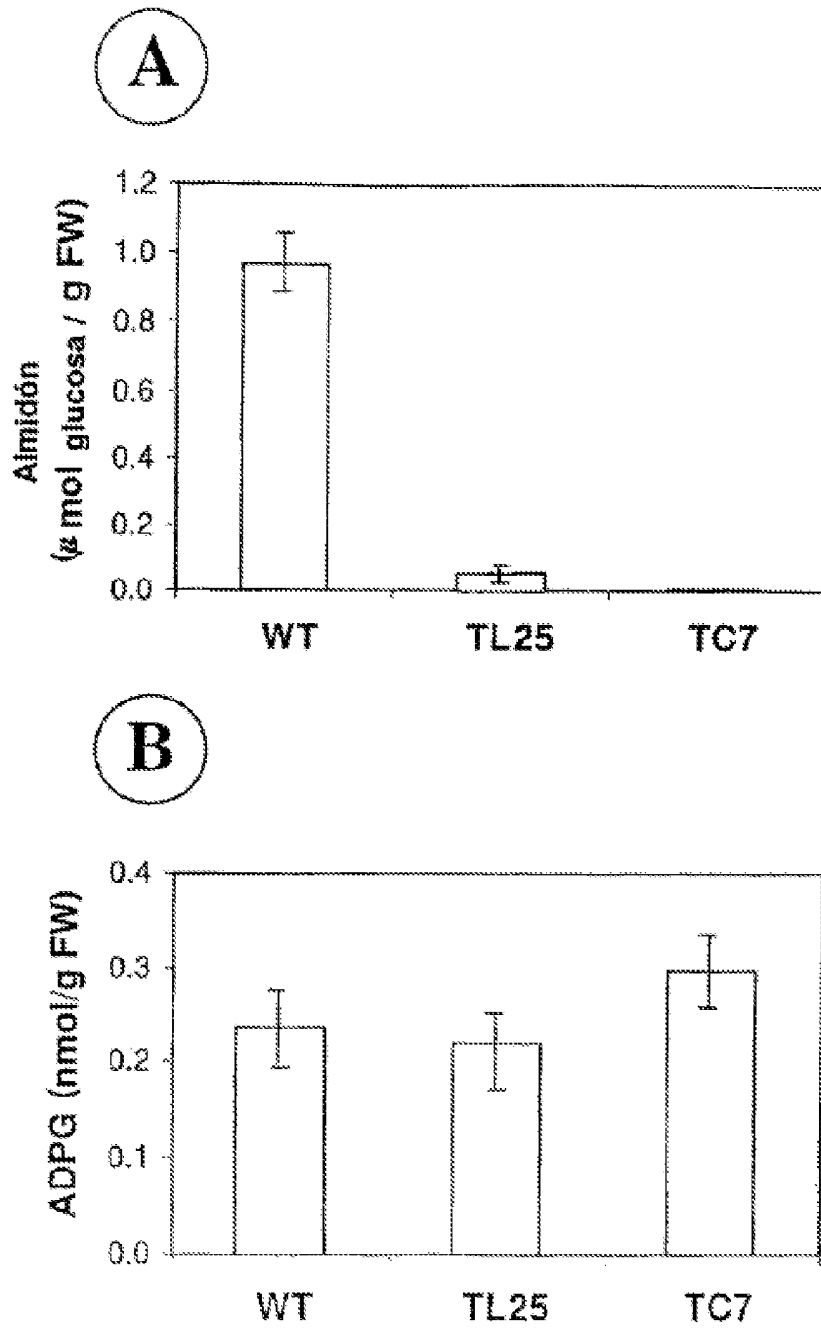


Fig. 15

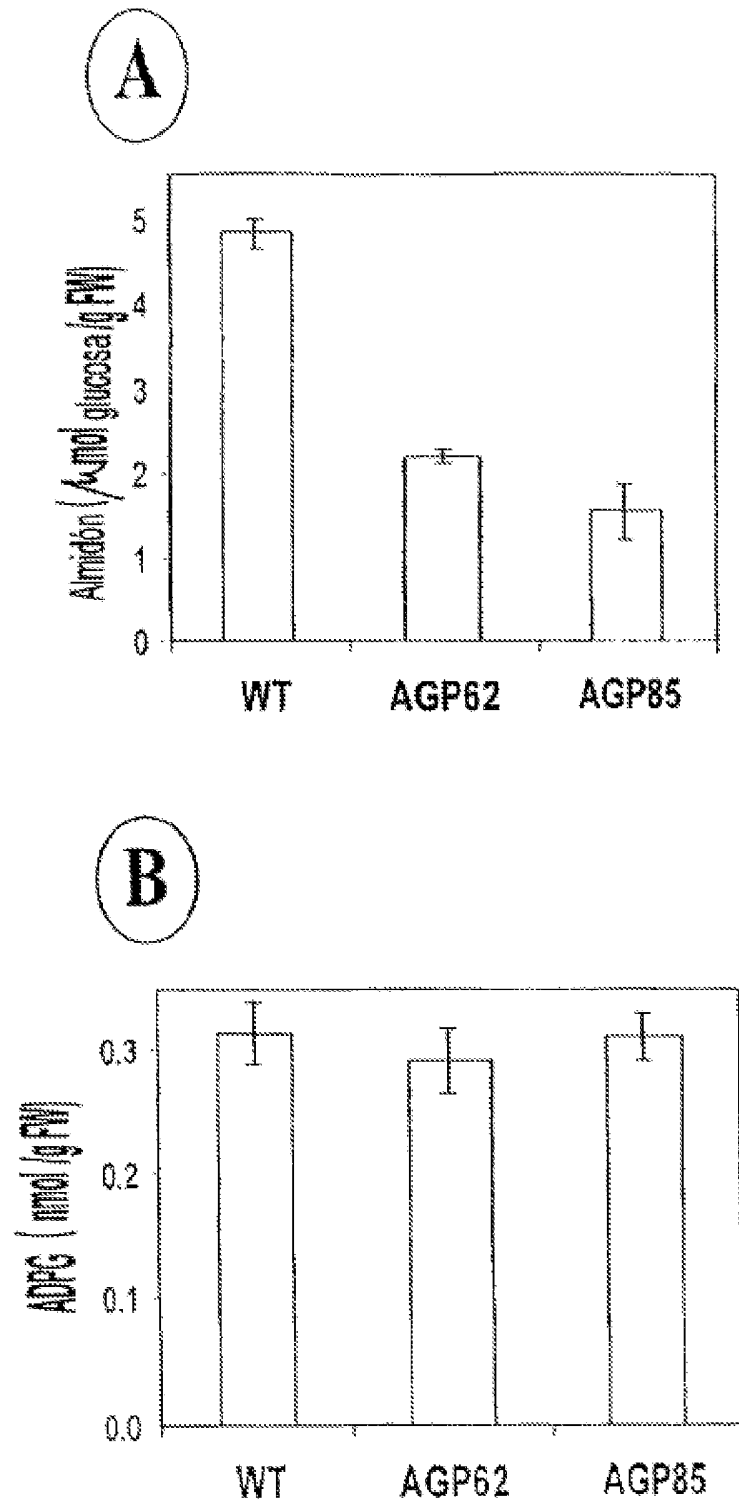


Fig. 16

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

### 5 Documentos de patente citados en la descripción

- \* DE 4221595 [8885]
- \* WO 9803637 A [0005] [9999]
- \* WO 02967662 A [9999]
- \* WO 0245485 A [0008]
- \* ES 200400257 PCT [9945]

### Literatura no patente citada en la descripción

- \* Okita, T.W. Is there an alternative pathway for starch synthesis?. *Plant Physiol.*, vol. 100, 560-56 [0003] [0004] [0008]
- \* Müller-Röber, B.; Sonnwald, U.; Willmitzer, L. Inhibition of the ADPglucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.*, 1992, vol. 11, 1229-1238 [0003] [0004] [0008] [0043]
- \* Stark, D.M.; Timmerman, K.P.; Barry, G.F.; Preiss, J.; Kishore, G.M. Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADPglucose pyrophosphorylase. *Science*, 1992, vol. 258, 287-282 [0003]
- \* Clarke, B.R.; Denyer, K.; Jenner, C.F.; Smith, A.M. The relationship between the rate of starch synthesis, the adenosine 5'-diphosphoglucose concentration and the amylose content of starch in developing pea embryos. *Pflanzl.*, 1999, vol. 209, 324-329 [0003]
- \* Zrenner, R.; Salanoubat, M.; Willmitzer, L.; Sonnwald, U. Evidence for the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants. *Plant J.*, 1995, vol. 7, 97-107 [0004] [0009]
- \* Baroja-Fernández, E.; Muñoz, F.J.; Saikusa, T.; Rodríguez-López, M.; Akazawa, T.; Pozueta-Romero, J. Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant Cell Physiol.*, 2003, vol. 44, 500-509 [0004] [0037]
- \* Pozueta-Romero, J.; Muñoz, F.J.; Rodríguez-López, M.; Baroja-Fernández, E.; Akazawa, T. New waves in the starch field. *Leif. Plant Cell Physiol.*, August 2003, 24-32 [0004]
- \* Murata, T.; Sugiyama, T.; Minamikawa, T.; Akazawa, T. Enzymic mechanism of starch synthesis in ripening rice grains. Mechanism of the sucrose-starch conversion. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1966, vol. 113, 34-44 [0004]
- \* Delmer, D.P. The purification and properties of sucrose synthase from etiolated *Phaseolus aureus* seedlings. *J. Biol. Chem.*, 1972, vol. 247, 3822-3828 [0004]
- \* Pozueta-Romero, J.; Perata, P.; Akazawa, T. Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 1999, vol. 18, 489-525 [0004]
- \* Baroja-Fernández, E.; Muñoz, F.J.; Akazawa, T.; Pozueta-Romero, J. Reappraisal of the currently prevailing model of starch biosynthesis in photosynthetic tissues: a proposal involving the cytosolic production of ADPglucose by sucrose synthase and occurrence of cyclic turnover of starch in the chloroplast. *Plant Cell Physiol.*, 2001, vol. 42, 1311-1320 [0004]
- \* Baroja-Fernández, E.; Muñoz, F.J.; Zandúeta-Criado, A.; Morán-Zorzano, M.T.; Viale, A.M.; Alonso-Casajús, N.; Pozueta-Romero, J. Most of ADPglucose linked to starch biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, vol. 101, 13080-13085 [0004]
- \* Neuhaus, E.H.; Häusler, R.E.; Sonnwald, U. No time to shift the paradigm on the metabolic pathway to transitory starch in leaves. *Trends Plant Sci. at press*, 2005 [0004] [0008]
- \* Zervosen, A.; Römer, U.; Eiling, L. Application of recombinant sucrose synthase-large scale synthesis of ADP-glucose. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, 1998, vol. 5, 25-28 [0005]
- \* Römer, U.; Schrader, H.; Günther, N.; Nettelstroth, N.; Frommer, W.B.; Eiling, L. Expression, purification and characterization of recombinant sucrose synthase I from *Solanum tuberosum* L. for carbohydrate engineering. *J. Biotechnology*, 2004, vol. 107, 135-149 [0005] [0026]
- \* Presse, R. Potato sucrose synthase: purification, properties, and changes in activity associated with maturation. *Plant Physiol.*, 1969, vol. 44, 759-764 [0005] [0026] [0028] [0031]
- \* Nguyen-Quock, B.; Krivitzky, M.; Huber, S.C.; Lecharny, A. Sucrose synthase in developing maize leaves. *Plant Physiol.*, 1990, vol. 94, 516-523 [0005] [0028] [0031]



- Morell, M. ; Copeland, L. Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiol.*, 1985, vol. 78, 149-154 [0005] [0028] [0031]
- Nakai, T. ; Tonouchi, N. ; Tsuchida, T. ; Mori, H. ; Sakai, F. ; Hayashi, T. Expression and characterization of sucrose synthase from mung bean seedlings in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1997, vol. 61, 1500-1503 [0005] [0026]
- Nakai, T. ; Konishi, T. ; Zhang, Z-Q. ; Chollet, R. ; Tonouchi, N. ; Tsuchida, T. ; Yoshinaga, F. ; Mori, H. ; Sakai, F. ; Hayashi, T. An increase in apparent affinity for sucrose of mung bean sucrose synthase is caused by *in vitro* phosphorylation or directed mutagenesis of Ser11. *Plant Cell Physiol.*, 1997, vol. 39, 1337-1341 [0005]
- Barratt, D.H.P. ; Barber, L. ; Kruger, N.J. ; Smith, A.M. ; Wang, T.L. ; Martin, C. Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. *Plant Physiol.*, 2001, vol. 127, 655-664 [0005]
- Li, C.R. ; Zhang, X.B. ; Hew, C.S. Cloning, characterization and expression analysis of a sucrose synthase gene from tropical epiphytic orchid *Oncidium goldiana*. *Physiol. Plantarum*, 2003, vol. 118, 352-360 [0005] [0026]
- Miroux, B. ; Walker, J.E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.*, 1996, vol. 260, 289-298 [0005] [0026]
- D'Agost, M-A. ; Yelle, S ; Nguyen-Quock, B. Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. *Plant Cell*, 1999, vol. 11, 2407-2418 [0007]
- Tang, G-Q. ; Sturm, A. Antisense repression of sucrose synthase in carrot affects growth rather than sucrose partitioning. *Plant Mol. Biol.*, 1999, vol. 41, 465-479 [0007]
- Frias, J. ; Price, K.R. ; Fenwick, G.R. ; Hedley, C.L. ; Sorensen, H. ; Vidal-Valverde, C. *J. Chromatogr. A*, 1996, vol. 719, 213-219 [0007]
- Sweetlove, L.J. ; Burrell, M.M. ; ap Rees, T. Starch metabolism in tubers of transgenic potato with increased ADPglucose pyrophosphorylase. *Biochem. J.*, 1996, vol. 320, 493-498 [0007]
- Stitt, M. ; Lilley, R.M. ; Gerhardt, R. ; Heldt, H.W. Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymol.*, 1989, vol. 174, 518-552 [0007]
- Holmes, E.W. Coupled enzymatic assay for the determination of sucrose. *Anal. Biochem.*, 1997, vol. 244, 103-109 [0007]
- Worrell, A.C. ; Bruneau, J-M. ; Summerfelt, K. ; Boersig, M. ; Voelker, T.A. Expression of a maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *Plant Cell*, 1991, vol. 3, 1121-1130 [0007]
- Vinet, B. ; Panzini, B. ; Boucher, M. ; Massicotte, J. Automated enzymatic assay for the determination of sucrose in serum and urine and its use as a marker of gastric damage. *Clin. Chem.*, 1998, vol. 44, 2369-2371 [0007]
- Biosynthesis of starch and its regulation. Preiss, The Biochemistry of Plants. Academic Press, 1988, vol. 14, 162-249 [0008]
- Pozueta-Romero, J. ; Perata, P. ; Akazawa, T. Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 1999, vol. 18, 489-525 [0008]
- Stark, D.M. ; Timmerman, K.P. ; Barry, G.F. ; Preiss, J. ; Kishore, G.M. Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADPglucose pyrophosphorylase. *Science*, 1992, vol. 258, 287-282 [0008]
- Slattery, C.J. ; Kavakli, H. ; Okita, T.W. Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends Plant Sci.*, 2000, vol. 5, 291-298 [0008]
- Baroja-Fernández, E. ; Muñoz, F.J. ; Saikusa, T. ; Rodríguez-López, M. ; Akazawa, T. ; Pozueta-Romero, J. Sucrose synthase catalyzes the *de novo* production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant Cell Physiol.*, 2003, vol. 44, 500-509 [0008]
- Chourey, P.S. ; Nelson, O.E. The enzymatic deficiency conditioned by the shrunken-1 mutations in maize. *Biochem. Genet.*, 1976, vol. 14, 1041-1055 [0009]
- Tang, G-Q. ; Sturm, A. Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning. *Plant Mol. Biol.*, 1999, vol. 41, 465-479 [0009]
- Fu, H. ; Park, W.D. Sink- and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato. *Plant Cell*, 1995, vol. 7, 1369-1385 [0011]
- Hennegan, K.P. ; Danna, K.J. pBIN20: An improved binary vector for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1998, vol. 16, 129-131 [0016]
- Barnes, S.A. ; Knight, J.S. ; Gray, J.C. Alteration of the amount of the chloroplast phosphate translocator in transgenic tobacco affects the distribution of assimilate between starch and sugar. *Plant Physiol.*, 1994, vol. 106, 1123-1129 [0017]
- Debleare, R. ; Rytelbier, B. ; de Greve, H. ; Debroeck, F. ; Schell, J. ; van Montagu, M. ; Leemans, J. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors of *Agrobacterium* mediated gene transfer to plants. *Nucl. Acids Res.*, 1985, vol. 13, 4777-4788 [0018]
- Horsch, R.B. ; Fry, J.E. ; Hoffmann, N.L. ; Eichholtz, D. ; Rogers, S.G. ; Fraley, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 1985, vol. 277, 1229-1231 [0018]

- Pozueta-Romero, J. ; Houliné, G. ; Schantz, R. ; Chamarro, J. Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2001, vol. 67, 173-180 [0018]
- Hiei, Y. ; Ohta, S. ; Komari, T. ; Kumashiro, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.*, 1994, vol. 6, 271-282 [0018]
- Yagi, T. ; Baroja-Fernández, E. ; Yamamoto, R. ; Muñoz, F.J. ; Akazawa, T. ; Pozueta-Romero, J. Cloning, expression and characterization of a mammalian Nudix hydrolase-like enzyme that cleaves the pyrophosphate bond of UDP-glucose. *Biochem. J.*, 2003, vol. 370, 409-415 [0020]
- Burns, D.M. ; Beacham, I.R. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *E. coli* *ushA* gene, encoding periplasmic UDP-sugar hydrolase (5'-nucleotidase): regulation of the *ushA* gene, and the signal sequence of its encoded protein product. *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 14, 4325-4342 [0020]
- Moreno-Bruna, B. ; Baroja-Fernández, E. ; Muñoz, F.J. ; Bastarrica-Berasategui, A. ; Zandueña-Criado, A. ; Rodríguez-López, M. ; Lasa, I. ; Akazawa, T. ; Pozueta-Romero, J. Adenosine diphosphate sugar pyrophosphatase prevents glycogen biosynthesis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98, 8128-8132 [0022]
- Li, C.R. ; Zhang, X.B. ; Hew, C.S. Cloning, characterization and expression analysis of a sucrose synthase gene from tropical epiphytic orchid *Oncidium goldiana*. *Physiol. Plantarum*, vol. 118, 352-360 [0026]
- Rodríguez-López, M. ; Baroja-Fernández, E. ; Zandueña-Criado, A. ; Pozueta-Romero, J. Adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase: a plastidial phosphodiesterase that prevents starch biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, 8705-8710 [0027]
- Lin, T.P. ; Caspar, T. ; Somerville, C.R. ; Preiss, J. Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* lacking ADPglucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol.*, 1988, vol. 88, 1131-1135 [0043]