



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE GENES DE
PIROFOSFATASA POSIBLEMENTE IMPLICADOS EN
RESPUESTA A DEFICIENCIA DE FOSFORO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:
ERNESTO NAVARRO DE LA SANCHA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

MÉXICO. D.F.

2005

m342439





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Dr. Agustín López-Munguía Canales
Vocal	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Secretario	Dra. Sobeida Sánchez Nieto
1er. Suplente	Dr. Ismael Bustos Jaimés
2º. Suplente	Dr. Armando Butanda Ochoa

Trabajo desarrollado en la Facultad de Química. UNAM, Div. de Estudios de Posgrado, Departamento de Bioquímica, Conjunto "E", Edificio de Bioquímica y Farmacia. Laboratorio 105 y 115.

Financiado por:

UNAM-DGAPA-PAPIIT IN201502 y
por CONACYT 43896-Q.

Asesor del tema:



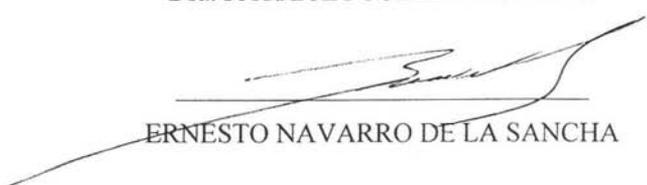
Dr. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

Supervisión técnica:



Dra. PATRICIA COELLO COUTIÑO

Sustentante:



ERNESTO NAVARRO DE LA SANCHA

ITACA

Cuando emprendas el viaje hacia Itaca,
ruega que tu camino sea largo
y rico en aventuras y descubrimientos.
No temas a lestrigones, a ciclopes o al fiero poseidón;
no lo encontrarás en tu camino
si mantienes en alto tu ideal,
si tu cuerpo y alma se conservan puros.
Nunca verás los lestrigones, los ciclopes o a Poseidón,
si de ti no provienen,
si tu alma no los imagina.

Ruega que tu camino sea largo,
que sean mucha las mañanas de verano,
cuando con placer llegues a puertos
que descubras por primera vez.
Ancla en mercados fenicios y compra cosas bellas:
madre perla, coral, ámbar, ébano
y voluptuosos perfumes de todas clases.
Compra todos los aromas sensuales que puedas;
ve a las ciudades egipcias y aprende de los sabios.

Siempre ten a Itaca en tu mente;
llegar allí es tu objetivo, pero no apresures el viaje.
Es mejor que dure mucho,
mejor anclar cuando estés viejo.
Pleno con la experiencia del viaje,
no esperes la riqueza de Itaca.
Itaca te ha dado un bello viaje.
Sin ella nunca lo hubieras emprendido;
pero no tienes mas que ofrecerte,
y si la encuentras pobre, no fue Itaca quien te defraudó.

Con la sabiduría ganada, con tanta experiencia,
habrás comprendido lo que las itacas significan.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo, como cada uno de mis éxitos, a las personas que han velado por mi, que han dado todo por verme crecer de la manera mas sana y cómoda posible, que me han dado el apoyo, la alegría de un hogar, y la dicha de tener una familia unida y siempre cálida. A ellos, a esas personas que me dieron la vida hoy les digo GRACIAS, este es el comienzo de cosechar lo que ustedes sembraron.. Elvia De La Sancha Sosa y Leopoldo Navarro Sánchez, este trabajo es dedicado con todo mi cariño a ustedes.

Miguel y Leopoldo: Cómo mirar las estrellas, sin apreciar también la belleza de estas?, así mismo, cómo decirles a ustedes gracias sin antes decirles que ustedes son la base de lo que hoy yo soy. Gracias por ser mi ejemplo, por darme el apoyo en cada momento y a cada paso, por consentirme como solo ustedes lo hacen....GRACIAS. Este trabajo también lo dedico a ustedes hermanos.

Así también, dedico este trabajo con todo mi cariño a esa gran niña que tiene un potencial e inteligencia único: a mi hermanita Nayeli que se que llegará tan lejos ella se lo proponga.

A mis tías Violeta De la Sancha y Emma De la Sancha, les dedico con todo mi amor este trabajo, fruto del esfuerzo compartido con mis padres. Gracias por brindarme todo su cariño y ser siempre como una segunda madre para mi.

Por último, a aquel tipo que sin ser mi hermano, siempre lo sera en el alma: A ti Jesús F, gracias por todas tus enseñanzas. Este trabajo también lo dedico a ti.

Finalmente, al amigo que siempre esta conmigo, y me llena de bendiciones: A ti Dios gracias.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento al Doctor Rogelio Rodríguez Sotres por el apoyo recibido a lo largo de este proyecto, por sus sabios consejos, y sus muestras de amistad a mi persona. También quiero expresar mi admiración por usted, por ser una persona talentosa, sabia y con un cálido sentido del humor. Gracias por confiar en mi y por brindarme un espacio para el comienzo de mi vida profesional.

A las maestras Lilian Valencia T y Beatriz King D, al Q.A Erick E.H, y a la Dra Aurora Lara . quienes han sido parte fundamental en la armonía del lugar de trabajo. Gracias por su apoyo y amistad. Los aprecio y admiro mucho. A los compañeros que continuaran con la línea de investigación mis mejores deseos y un agradecimiento por su amistad.

Sin duda alguna, mi mas grande agradecimiento a mis sinodales la Dra Sobeida Sánchez, al Dr. Armando Butanda y al Dr. Agustín López por sus valiosa aportación de consejos y criticas brindadas para que este trabajo fuera mejor. Gracias.

A la Dra. Patricia Coello C. por permitirme trabajar en su laboratorio, por las enseñanzas, los consejos y recomendaciones hechas. . Así también a los compañeros del laboratorio 105 las maestras Selene Fragoso y Carmen Parra. Así como a la Q.F.B Gabriela Galicia y las estudiantes Alejandra y Liliana.

A los estudiantes de doctorado Elpidio García, Dairo Orjuela así como al Dr. Francisco Quiroz , quienes me han brindado su amistad, y fueron parte importante en el desarrollo de esta tesis. A ustedes amigos gracias por todos los consejos y conocimientos transmitidos.

A mis amigos de toda la vida Ivon García, Rosa I. Delgado, Perla Paredes, Melvi Calderón, Fabián Aranda, Ismael y Samuel Cuenca, Juan J. García, José C. Hernández, Iribiel Ávila, Miguel A. Nava, J. Paul Cruz. Quienes han sido parte fundamental en mi desarrollo personal y con quienes he vivido momentos inolvidables e invaluable que jamas olvidaré. A ustedes muchachos, muchas gracias siempre estarán en mi corazón.

A mis muchos amigos de la carrera con quienes he vivido aunque muy poco tiempo pero lo suficiente para ganarse mi amistad. Los aprecio mucho y les deseo el mejor de los éxitos.

Y por supuesto, gracias a ti universidad por forjarme como profesionalista y darme las herramientas para contribuir al desarrollo de esta nación de la que me enorgullezco.

Índice

1. ABREVIATURAS.....	5
2. RESUMEN.....	6
3. INTRODUCCIÓN.....	7
4. ANTECEDENTES.....	13
4.1 Importancia del pirofosfato en los vegetales.....	13
4.2 Respuesta ante deficiencia de fósforo.....	16
4.3 Cambios morfológicos y estructurales del sistema radicular.....	17
4.4 Exudados radicales.....	18
4.5 Toma de fosfato a través de transportadores en membrana.....	20
4.6 Papel de la expresión genética ante la deficiencia de fósforo.....	21
5.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
5.2 HIPÓTESIS.....	24
6. OBJETIVOS.....	25
6.1 Objetivo general.....	25
6.2 Objetivos particulares.....	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1 MATERIALES.....	26
7.1.1 Sustancias.....	26
7.1.2 Material biológico.....	26
7.1.3 Material molecular y microbiológico.....	27
7.1.4 Microorganismos y vectores.....	27
7.2 MÉTODOS.....	28
7.2.1 Germinación de las semillas y crecimiento de las plantas.....	28
Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	28
7.2.2 Extracción de proteína soluble.....	29
7.2.3 Elución en columna de fenil-sepharosa.....	30
7.2.4 Medición de actividad de pirofosfatasa.....	31
7.2.5 Cuantificación de proteína.....	32
7.2.6 Acondicionamiento bacteriano.....	33
7.2.7 Extracción y purificación de los plásmidos.....	33
7.2.8 Electroforesis de ácidos nucleicos.....	34
7.2.9 Cuantificación del plásmido.....	34
7.2.10 Digestión de plásmidos.....	35
7.2.11 Amplificación del inserto por PCR.....	35
7.2.12 Purificación del DNA en gel.....	36
7.2.13 Ligación del producto de PCR con el vector pGEM-T Easy.....	38
7.2.14 Transformación de células competentes E. coli BL codon plus o E coli DH5α.....	38
7.2.15 Purificación de los plásmidos pGEM-T Easy.....	39
7.2.16 Digestión del plásmido pGEM T- Easy y pGTK+.....	40
7.2.17 Defosforilación del plásmido pGTK+.....	40
7.2.18 Ligación en gtk+.....	41
7.2.19 Inducción de expresión de las proteínas de fusión.....	42
7.2.20 Extracción de proteína soluble.....	42
7.2.21 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).....	43
7.2.22 Purificación en Glutathione Sepharose TM y Benzamidine Sepharose.....	43
7.2.23 Obtención de anticuerpos contra las proteínas puras.....	45
7.2.24 Actividad de fosfatasa.....	45
7.2.25 Efecto de cationes divalentes sobre la actividad de pirofosfatasa.....	46
7.2.26 Isotermas de saturación a concentraciones variables de magnesio y pirofosfato.....	47
7.2.27 Longitudes de absorción y fluorescencia de las proteínas puras.....	49
8. RESULTADOS.....	50
8.1 Extracción y purificación del ADN plasmídico.....	50

8.2 Comparación con otras secuencias de pirofosfatasa.....	54
8.3 Construcción de la proteína de fusión.....	56
8.4 Inducción de la expresión de las proteínas.....	58
8.5 Proteínas de fusión purificadas por cromatografía de afinidad.....	59
8.6 Actividad y características de las proteínas de fusión.....	60
8.7 Digestión desalado y purificación de las PPiases recombinantes.....	61
8.8 Actividad de pirofosfatasa ante diferentes sustratos.....	62
8.9 Actividad de pirofosfatasa ante diferentes cationes.....	63
8.10 Cinéticas de saturación por pirofosfato y magnesio.....	64
8.11 Elución de picos de proteínas 241114 y VBVDG06 en columnas de exclusión molecular de HPLC.....	67
8.12 Datos de absorción y fluorescencia.....	68
8.13 Inmunodetección e identificación de picos de elusión en extractos de frijol ante deficiencia o suficiencia de fosfato.....	69
9. DISCUSIÓN.....	71
10. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	74
11. REFERENCIAS.....	75

1. ABREVIATURAS

<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
P	Fósforo
Pi	Fosfato inorgánico
PPi	Pirofosfato inorgánico
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
EDTA	etilendiaminotetraacetato
ATP	Trifosfato de adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
NAD ⁺	Nicotinamida-adenina-dinucleótido (oxidada)
NADH	β -Nicotinamida-adenina-dinucleótido (reducida)
NADP ⁺	Nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato
GDP	Guanosin- 5-difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
G6P	Glucosa-6-fosfato
PGA	Ácido fosfoglicérico
PEP	Fosfoenolpiruvato
GUDP	Uridin-5-difosfoglucosa
PRPP	5-fosforilribosa-1-pirofosfato
p-NPP	<i>p</i> -nitrofenil fosfato
p-NPS	<i>p</i> -nitrofenil sulfato
Bis p-NPP	Bis- <i>p</i> -nitrofenil fosfato
sq-	Secuencia nucleotídica (cDNA)
Gst-241114	Proteína 241114 fusionada a Gst
Gst-VBVDG06	Proteína VBVDG06 fusionada a Gst
pr-241114	Proteína pura 241114
pr-VBVDG06	Proteína pura VBVDG06
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FMN	Flavina mononucleótido
BSA	Albúmina sérica bovina
GST	Glutathione S-transferasa

2. RESUMEN

La importancia que el fósforo tiene en la nutrición de las plantas y, por tanto, en la agricultura, aunadas al papel del pirofosfato en el metabolismo de macromoléculas y en la regulación metabólica, invita a pensar que las pirofosfatasas, enzimas que degradan el pirofosfato, son enzimas cuya expresión debe ser regulada, especialmente, cuando el fósforo se vuelve limitante para la planta. En este proyecto se identificaron diferencias en señales de actividad de pirofosfatasas de frijol crecidas en suficiencia o deficiencia de fosfato ($10\mu\text{M}$). Empleando para ello genes de la planta silvestre *Arabidopsis thaliana*, cuyo genoma ha sido completamente secuenciado. En esta propuesta, nos apoyamos en técnicas de biología molecular bien conocidas, para generar en *Escherichia coli* dos proteínas recombinantes de pirofosfatasas vegetales, útiles como herramientas para el estudio del metabolismo del pirofosfato. Las proteínas correspondientes se caracterizaron con base a sus características moleculares y cinéticas, y se generaron anticuerpos contra estas proteínas. Se analizó el perfil de actividad y de proteína inmunoreactiva de las pirofosfatasas de frijol, bien nutridas, o sometidas a deficiencia de fósforo. Se discuten los resultados del perfil obtenido, correlacionándolo con las características de las proteínas estudiadas y en relación con las características de la respuesta fisiológica a la deficiencia de fósforo. Finalmente, se presentan propuestas para estudios futuros sobre la expresión de los genes de pirofosfatasas en relación con la respuesta adaptativa de la planta a la deficiencia de fosfato, así como el análisis de la regulación de su actividad.

3.INTRODUCCIÓN

A medida que la producción mundial de alimentos se ha expandido para satisfacer la creciente demanda, los suelos se han ido empobreciendo, al grado que la pérdida en la calidad agrícola de los suelos hace necesaria la aplicación de fertilizantes, medida poco exitosa para revertir el deterioro.

La investigación en temas relacionados con el manejo de cultivos, suelos, agua y nutrimentos se hace necesaria para contribuir a lograr una agricultura sustentable, que permita mantener o incluso elevar la productividad en los suelos, empleando tecnología económicamente viable, socialmente aceptable y ambientalmente favorable.

Uno de los problemas agrícolas más evidentes, radica en que casi la tercera parte de la superficie de la tierra es árida y hay muy pocas áreas que sean uniformemente húmedas y no padezcan de sequía periódica. Las limitaciones nutrimentales suelen no resultar tan evidentes, sin embargo pueden ser de igual o mayor importancia. Las plantas, así como todos los seres vivos, requieren de un aporte nutrimental completo, para sostener su crecimiento y funciones normales. La deficiencia de algún factor nutrimental se manifiesta en alteraciones fisiológicas, que impactan en su morfología, desarrollo y, por lo tanto, merman parcial o totalmente su productividad agrícola.

Los nutrimentos minerales esenciales para los vegetales superiores se subdividen en macro y micronutrimentos, los cuales se encuentran en forma de sales disueltas y asociadas con arcillas y arenas, mientras que el aporte de dióxido de carbono, hidrógeno y oxígeno puede tenerlo a través de la atmósfera y agua de lluvia.

Dentro de los macronutrimentos se incluye al Nitrógeno (N), Fósforo (P), Azufre (S), y Potasio (K), mientras que los micronutrimentos son Magnesio (Mg), Calcio (Ca), Zinc (Zn), Hierro (Fe),

Manganeso (Mn), Molibdeno (Mo), Boro (B), Cobre (Cu), Cobalto (Co) y Cloro (Cl). Todos y cada uno de estos nutrimentos deben ser absorbidos por las plantas desde el suelo, pero son el Fósforo (P), y el Nitrógeno (N) los nutrimentos que con mayor frecuencia resultan limitantes a la producción agrícola de cultivos vegetales, ya que a pesar de encontrarse en cantidades relativamente altas, no se encuentran en forma directamente asimilable (Raghothama, 1999; Coello, 2001). La deficiencia de nitrógeno ha sido extensamente estudiada y algunas plantas han logrado solventar esta limitante mediante su asociación con bacterias simbióticas capaces de aprovechar la casi inagotable fuente del nitrógeno atmosférico (Lynch, 1995).

Por su parte, en plantas la nutrición por fósforo está limitada a la disponibilidad de sus formas solubles en el suelo, orillando a la disminución del crecimiento de ellas en ecosistemas naturales, por lo que el fósforo, junto con el nitrógeno se ha convertido en el fertilizante más empleado en la agricultura intensiva (Kochian, 2000)

De los cuatro macronutrientes, el nitrógeno y el azufre se encuentran en las macromoléculas de importancia biológica en formas reducidas, el K^+ se conserva siempre en su forma de ion inorgánico y el P puede existir en las plantas en diversas formas de aniones inorgánicos y formando parte de compuestos organofosfatados (Smith, 2000). Aunque existen algunos organismos, principalmente bacterias y animales marinos, capaces de sintetizar compuestos organofosforados en los que el fósforo se encuentra parcialmente reducido, esto es más bien una excepción a la regla (Grossman y Takashi, 2001).

El fosfato (P_i) es un componente estructural importante de los ácidos nucleicos y fosfolípidos, juega un papel crítico en la conversión y manejo de energía, en los nucleótidos fosfatados, como ATP, GTP, FAD, NAD^+ y $NADP^-$, y en la regulación de la actividad de muchas enzimas y proteínas de diversas actividades celulares y metabólicas, incluyendo aquellas relacionadas con la regulación de la expresión genética (Theodorou y Plaxton, 1993).

Considerando que las plantas requieren tomar Pi en su forma de aniones (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}) de elevada reactividad como quelantes de iones metálicos, las formas de fósforo mineral más abundantes en el suelo son sales de fosfato con iones de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} y Fe^{3+} , que además son muy poco solubles. Por otro lado, sus formas orgánicas, resultado de la actividad biológica, son los ésteres de Pi, principalmente los fitatos (hexafosfo-mioinositol). En ocasiones podemos encontrar fosfonatos en su mayoría producto de la actividad industrial humana.

Por las razones anteriores, la concentración de Pi asimilable para las plantas en el suelo casi nunca rebasa el 10^{-6} M, por lo que las plantas han desarrollado estrategias para tomarlo de manera eficiente, así como habilidades fisiológicas para aprovechar de manera óptima la cantidad asimilada de este macronutriente (Junk *et al.*, 1993).

Para tratar de solucionar este problema de baja disponibilidad de fósforo, en los sistemas agrícolas se ha intensificado el uso de fertilizantes fosfatados, principalmente como superfosfato de calcio triple, pero se ha observado que el uso de este fertilizante es efectivo para mejorar la productividad de los cultivos, sin embargo, no todo el fosfonato añadido es eficientemente asimilado y, en consecuencia, mucho fertilizante se desperdicia, llegando incluso a convertirse en un problema de contaminación para diversos ecosistemas acuáticos (Horst *et al.*, 2001).

Hoy, la comprensión de los procesos bioquímicos que determinan la productividad de las plantas cultivables ha rebasado los límites del interés científico y es un tema de relevancia económica, ya que el consumo de alimentos en un planeta sobrepoblado exige el aumento de la capacidad de la producción agrícola, la cual es limitada y, eventualmente, la demanda puede llegar a superar la producción (Maddison, 1988). Así, los estudios detallados acerca de los mecanismos que las plantas usan para contrarrestar la deficiencia de Pi en los suelos resulta fundamental para desarrollar estrategias agrícolas óptimas y sustentables.

Una estrategia actual, es la que han venido empleando los agrónomos fitomejoradores, quienes han seleccionado algunas variedades cultivables de especies económicamente importantes con una mejor capacidad para crecer en suelos pobres. Especies de importancia económica como maíz, soya, trigo, cebada y frijol con capacidad para aprovechar mejor el Pi que tienen disponible ya existen en nuestro país, dado que son cultivares de importancia nutricional y económica para México, lo que no significa que nuevas mejoras no sean posibles. Sin embargo, es posible que se requieran nuevas estrategias de mejoramiento, para lo cual hace falta mejor información sobre la fisiología y bioquímica de estas especies relacionadas con la captación de fósforo.

El frijol común, *Phaseolus vulgaris* es una especie importante en la dieta de más de 500 millones de personas por su alto valor nutritivo (Miranda, 1991). Esta semilla es una buena fuente de proteínas, hierro vegetal, fibra, ácido fólico, tiamina, magnesio, potasio y zinc (Miranda, 1991). En México, se ha reportado, según cálculos de la SAGARPA, que el frijol es el segundo cultivo en valor económico, apenas después del maíz. En cifras actualizadas a septiembre del 2004, se estima que la superficie cosechada alcanza las 241,628 Ha, con una producción de 219,548 toneladas y el comercio de frijol en 2002 significó más de siete mil millones de pesos, siendo el segundo mejor producto en ganancias después del maíz (SAGARPA, 2004). Sin embargo, la disponibilidad de nutrientes juega un papel muy importante en la producción del frijol, ya que a pesar de que sus requerimientos de nitrógeno pueden ser cubiertos gracias a la presencia de microorganismos simbiotes en sus raíces, (Selosse *et al*, 2004) sin el uso de fertilizantes industriales, la disponibilidad de fósforo en los suelos agrícolas mexicanos suele ser baja y tal limitación sólo puede solventarse mediante el uso de fertilizantes orgánicos o inorgánicos. Para complicar la situación, el frijol es un cultivo poco tolerante a la deficiencia de Pi, por lo que no debe sorprendernos que haya sido objeto de numerosos intentos de selección para mejorar su productividad en suelos pobres (Coello, 2001). Por todo ello, esta especie vegetal representa un

buen modelo para aquellos estudios dirigidos a entender las respuestas adaptativas de las plantas en respuesta a la deficiencia de fósforo, así como la contribución y el éxito relativo de cada una de estas respuestas.

La adaptación a los suelos pobres por las plantas puede subdividirse en dos componentes esencialmente distintos, el primero consiste en la expresión de mecanismos para una asimilación más eficiente, que incluye la movilización de las diferentes formas de fósforo presentes en el suelo. El segundo componente, aunque se conoce menos sobre ello, se refiere a mecanismos de adaptación metabólica tendientes a ahorrar el uso de fósforo en diversos intermediarios y macromoléculas que pueden ser reemplazadas por otras que contengan menos fósforo (Rivera, 2004). En este sentido, sorprende el hecho de que diversas especies muestran una respuesta adaptativa que se acompaña de una disminución de ATP, en tanto que los niveles de otro intermediario semejante, el pirofosfato, se mantienen constantes (Dancer *et al.*, 1990, Duff *et al.*, 1989).

Así, una línea de investigación interesante de abordar es el estudio de las pirofosfatasas inorgánicas (iPPiase), enzimas encargadas de la hidrólisis del pirofosfato (PPi) subproducto por excelencia de reacciones del metabolismo de síntesis de varias macromoléculas, y considerado también como una fuente de energía autónoma en las plantas, actuando como una alternativa al ATP (Dancer, 1990) y cuya producción está estrechamente relacionada con el crecimiento de las plantas (Lara *et al.*, 2001).

Todas las PPiase hidrolizan el pirofosfato produciendo Pi libre, son enzimas muy activas, con gran afinidad por su sustrato y son consideradas de entre los mejores catalizadores. Están presentes en todos los seres vivos, siendo esenciales para la supervivencia de las células (Heinonen, 2001). Estas pueden subdividirse en tres familias, de acuerdo a sus características. Las pirofosfatasas de protones, como la de la membrana vacuolar (Maeshima *et al.*, 1996) y del

aparato de golgi (Mitsuda *et al.*, 2001), que acoplan la hidrólisis del PPI a la generación de un gradiente electroquímico. Otro grupo lo conforman las iPPiasa solubles que utilizan Mg^{2+} como cofactor exclusivo, las cuales se encuentran en forma ubicua en las células de plantas, animales y hongos (Sivula *et al.*, 1999). Por último, algunas bacterias presentan pirofosfatasas inorgánicas solubles capaces de emplear Mn^{2+} y/o Co^{2+} como cofactor catalítico (Kuhn y Ward, 1998).

El presente proyecto se enfoca en la clonación, expresión heteróloga y caracterización de dos pirofosfatasas inorgánicas solubles de la planta *Arabidopsis thaliana*, así como la obtención de herramientas moleculares que nos amplíen las vías de investigación con la intención futura de aportar conocimientos que mejoren nuestra comprensión del metabolismo de fósforo en los vegetales y, así, nos pongan en mejor situación para contribuir al desarrollo agrícola y a la autosuficiencia alimentaria en el país.

4. ANTECEDENTES

4.1 Importancia del pirofosfato en los vegetales.

Desde hace ya algunas décadas el estudio de los macronutrientes de las plantas ha sido tema de interés, dado que, como se mencionó en la sección anterior, su abundancia en el suelo natural limita el crecimiento de las plantas y la productividad agrícola, base del sustento humano (Raghothama, 1999). Aunque una estrategia común que se ha vuelto necesaria en la agricultura intensiva es la adición de fertilizantes a los suelos agrícolas, esta práctica tiene un impacto ecológico negativo, ya que el exceso de minerales se lava hacia los ríos y mares, afectando el equilibrio de los ecosistemas (Lynch, 1998). Los macronutrientes que más limitan el crecimiento de las plantas son sin duda el nitrógeno y el fósforo. El primero es muy abundante en la atmósfera terrestre, de modo que el problema se remite a que las plantas puedan fijarlo en forma orgánica. El fósforo es sin embargo poco abundante en la corteza terrestre pero es un elemento clave para la vida, ya que forma parte de diversas moléculas tales como los ácidos nucleicos, ATP, fosfolípidos, nucleótidos (FAD, FMN, NAD⁺, NADP⁺, etc) e interviene en muchos mecanismos metabólicos y regulatorios de las células, formando parte de intermediarios fosforilados y proteínas que se fosforilan reversiblemente (Voet *et al.*, 1999). Adicionalmente, la asimilación de fósforo por las plantas está limitada a la toma de fosfato inorgánico, siendo que mucho del fósforo en el suelo está en forma de sales insolubles (hidroxifosfatos de calcio, hierro y aluminio), o como material orgánico no asimilable, aunque este último puede ser convertido a fosfato inorgánico para ser asimilado (Gavito y Miller, 1998).

La respuesta a la deficiencia de fósforo en las plantas ha sido caracterizada a nivel de la expresión de mecanismos para mejorar la disposición y la toma de fosfato del suelo (Roghothama, 1999), lo que se relaciona con una activación en los mecanismos de transporte de fosfato a nivel de raíz, secreción de ácidos orgánicos para mejorar la solubilidad del fosfato y la secreción de fosfatasas al suelo para elevar la disponibilidad de fosfato inorgánico (Coello-Coutiño, 2001), mecanismos que además se asocian a modificaciones estructurales en el sistema radicular para ampliar la superficie de contacto con el suelo y extender el volumen de tierra explorada por las raíces (Jackson *et al.*, 1990; Dinkelaker *et al.*, 1995).

Sin embargo, los mecanismos de adaptación metabólica capaces de mejorar la eficiencia del uso del fósforo en los organismos no han sido estudiados con el mismo detalle. Dos líneas de evidencia sugieren que tales mecanismos se presentan en las plantas y que pueden contribuir a explicar el porque unas plantas son tolerantes a la escasez de este mineral, mientras que otras plantas son incapaces de sobrevivir en condiciones semejantes. Por un lado, se sabe que ciertas enzimas responden preferentemente a inanición de fosfato tales como la PEP carboxilasa, de *Lupinus* y *Brassica* o la citrato sintasa de células de zanahoria (Koyama *et al.*, 2000). Por otro lado, se han detectado cambios en los contenidos de ciertas macromoléculas fosforiladas en respuesta a la falta de fósforo, particularmente en el caso de los fosfolípidos (Essigmann *et al.*, 1998) y, en el mismo sentido, hay modificaciones en las pozas de metabolitos fosforilados que acompañan a la adaptación a bajas concentraciones de dicho mineral (Dancer *et al.*, 1990). Es sugerente que las respuestas anteriores están encaminadas a mantener niveles de intermediarios fosforilados que permitan a la planta realizar sus funciones aún bajo condiciones de estrés nutrimental.

Las vacuolas de las plantas pueden funcionar como reservas de fósforo, mismas que, bajo régimen de deficiencia, pueden ser consumidas para destinarse hacia los sitios de demanda, tales

como el cloroplasto o el mismo citoplasma. Sin embargo, si la poca disponibilidad de fósforo se prolonga, las reservas se agotarán, y solo aquellos vegetales capaces de inducir un conjunto óptimo de respuestas adaptativas a la deficiencia de fósforo serán los que aminoren los efectos dañinos ganando así la batalla por la sobrevivencia del organismo y la perpetuación de la especie.

Una de las fuentes directas de fósforo en las células de todos los seres vivos es el PPi, producido durante numerosas actividades metabólicas y cuya hidrólisis inmediata constituye una manera eficiente de mejorar la disponibilidad de fósforo inorgánico. La molécula de PPi fué descubierta al rededor del siglo XIX, y su formación en sistemas biológicos fue reportada en 1941 (Cori *et al* 1951). Se sabe que éste es un subproducto biológico de las reacciones de biosíntesis de ácidos nucleicos, de carbohidratos poliméricos y de proteínas (Kornberg, 1999). Si bien, su concentración en células animales tiende a ser bastante baja, la concentración de PPi en el citoplasma de células vegetales, bacterianas y de levaduras está en el rango de 200 a 300 μM (Weiner *et al.* 1987; Heinonen, 2001). Siendo en la mitocondria donde el mayor contenido de PPi ha sido determinado (0.2mM), en vacuola (2.2 μM) y en cloroplastos menos de 1 μM .

Así, el PPi considerado como un subproducto del metabolismo, destinado a ser destruido para la reutilización del fosfato (Kornberg, 1999), llama la atención su relativa estabilidad en las plantas (Weiner, 1987; Duff, *et al.*, 1989; Carswell *et al.*, 1997; Rycher y Randall, 1994), incluso aún bajo condiciones de deficiencia de fósforo en el suelo (Duff, *et al.*, 1989; Carswell *et al.*, 1997; Rycher y Randall, 1994). Diversas evidencias recientes indican que su papel va más allá de ser un simple desecho del metabolismo (Dancer, 1990), que incluso puede servir como sustituto del ATP para la fosforilación de fructosa-6-fosfato, durante la glucólisis en el citoplasma de las plantas (Plaxton, 1996), o para la acidificación de la vacuola a través de la PPi-asa membranal

(Maeshima, 2000). Todo lo anterior resulta de gran interés y plantea numerosas interrogantes relativas al metabolismo del fósforo.

4.2 Respuesta ante deficiencia de fósforo

Como todo ser viviente, las plantas presentan respuestas para contrarrestar los efectos de condiciones adversas que dificulten su supervivencia. Las condiciones de insuficiencia de fósforo inducen respuestas adaptativas en diversas plantas que se traducen en cambios metabólicos, morfológicos y estructurales. Los cambios morfológicos que han sido observados en estrecha asociación con la deficiencia de fósforo, consisten principalmente en un incremento en el tamaño y grosor de sus raíces, formación de raíces proteoides. También, se han visto cambios bioquímicos asociados a la presencia de transportadores de mayor afinidad por fósforo del suelo (Raghothama, 2000) y entre los diferentes tejidos de la planta (Liu *et al.*, 1997), se ha observado la reducción en la circulación de Pi a través del floema, cambios metabólicos posiblemente relacionados con un uso más eficiente de Pi (Rivera, 2004), movilización de Pi de la vacuola al citoplasma (Raghothama, 2000), secreción de ácidos orgánicos (Marshner, 1995.), secreción de fosfatasas y RNAsas (Duff *et al.*, 1989) y, finalmente, alteraciones metabólicas de la respiración (Theodorou y Plaxton, 1993), del metabolismo del carbono (Farré *et al.*, 2000), de la fijación de nitrógeno y de la síntesis de aminoácidos aromáticos. Todos estos cambios metabólicos se asocian a la activación de ciertos genes, al silenciamiento de otros y/o a los cambios en actividad enzimática por modificación postraduccional, particularmente, se ha detectado la participación de enzimas como RNAsas (Green, 1994), fosfatasas (Duff *et al.*, 1989) H⁺-ATPasas (Raghothama, 2000), y PEPCasa (Koyama, 2000). Aunque los cambios morfológicos suelen ser más evidentes, los

cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares no juegan un papel menos importante en la respuesta adaptativa de la planta y su papel en tal respuesta difícilmente puede separarse.

4.3 Cambios morfológicos y estructurales del sistema radicular.

El eje de la raíz, diámetro, cubierta y ondulaciones del eje de la raíz y de sus raíces secundarias son consideradas características de la morfología. La configuración y distribución espacial que adopta el sistema radicular, incluyendo el impacto que dicha distribución tienen sobre los aspectos funcionales de las raíces, tales como su eficiencia de toma de nutrientes, el alcance de exploración del suelo y la robustez de la fijación al suelo, se consideran dentro del dominio de la arquitectura del sistema radicular. Al enfrentarse las plantas a situaciones adversas de suficiencia de Pi y que atentan contra su supervivencia, las plantas activan respuestas que, entre otros aspectos, modifican la morfología de las raíces y la arquitectura del sistema radicular.

En el caso de las plantas crecidas en suelos pobres de Pi, diversos estudios han mostrado que la arquitectura radicular tiende a modificarse substancialmente (Coello, 2001). En términos generales, se observan incrementos de hasta 63 % de la biomasa de la raíz (Grotz y Guerinot, 2002). En *A. thaliana* la proliferación de pelos radiculares, así como de raíces laterales suele acompañarse de una disminución en la elongación de la raíz principal. Así, el incremento en biomasa y los cambios arquitectónicos resultan en una mayor extensión del sistema radicular en las regiones cercanas a la superficie del suelo, a costa de una menor profundidad.

Adicionalmente, en *Lupinus* responden con el desarrollo de raíces proteoides. Estas se componen de raíces secundarias y terciarias así como una raíz primaria engrosada y poseen una capacidad incrementada para la secreción de ácidos orgánicos y fosfatasas hacia la rizosfera (Raghotama *et al.*, 1999).

Se estima que en conjunto, estas modificaciones pueden brindarle a *A. thaliana* un incremento en eficiencia de adquisición de fósforo que va desde un 30 y hasta un 400 % (Ma *et al.*, 2001).

4.4 Exudados radicales.

La secreción de ácidos orgánicos a través de las raíces de plantas hacia la rizosfera es uno de los mecanismos mejor estudiados para elevar la solubilidad del Pi inorgánico en suelos pobres (Raghothama 1999). La acidificación del suelo, así como el efecto quelante de ácidos orgánicos como el malato y el citrato permite disolver fosfato inorgánico de las sales de Al y Fe presentes en el suelo (Fig. 1). En alfalfa se ha detectado la secreción de ácido psídico (p-hidroxibencil tartárico) y alfafuran (2-(3,5-dihidroxifenil)-5,6-dihidroxibezofuron). Estos compuestos fenólicos son efectivos para solubilizar las sales de fosfato de Fe, ya que forman fácilmente quelatos estables con los iones de este metal. Aunque la liberación de ácidos orgánicos aparenta ser una respuesta generalizada, la magnitud de la respuesta y el tipo de ácidos secretados varía considerablemente entre especies (Marschner 1995).

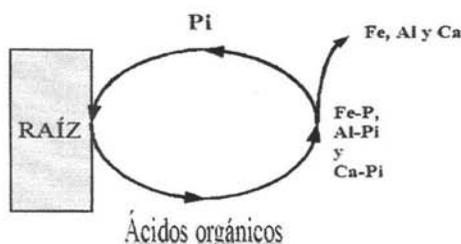


Figura 1. Esquema que resume el papel de los ácidos orgánicos en aumentar la disponibilidad de fósforo asimilable para las raíces de las plantas.

En diversas plantas estudiadas, como tomate, lupino blanco, rábano y mostaza negra, se ha observado que la excreción de ácidos orgánicos es paralela a un incremento en la actividad de PEP carboxilasa, lo que permite proponer que la vía anaplerótica es la responsable de aportar los esqueletos carbonados para la producción de los ácidos orgánicos exudados, adicionalmente, es de esperarse, aunque no se ha demostrado, que tal respuesta se acompañe de una elevación en la actividad de los canales iónicos apropiados para permitir la excreción acelerada de dichos aniones.

Aún cuando la secreción de ácidos orgánicos facilita la adquisición de Pi, no todo el fósforo presente en el suelo está presente en formas inorgánicas, un alto porcentaje se encuentra en forma orgánica y la liberación de este requiere de la presencia de fosfatasas activas capaces de liberarlo. La secreción de fosfatasas también ha sido documentada recientemente en relación con la deficiencia de fósforo, especialmente en soya y en *Arabidopsis* (Haran *et al*, 2000).

4.5 Toma de fosfato a través de transportadores en membrana.

El transporte de iones a través del plasmalema semipermeable es un paso crítico que regula la toma de nutrientes al interior de la planta. Actualmente, se conoce la fisiología y cinética de transporte de nutrimentos (Smith, 2002). Se ha observado también que la toma de iones por raíces de plantas sigue una cinética saturable y se ha demostrado que para la mayoría de los nutrimentos el proceso es bifásico con un sistema de alta afinidad que opera a concentraciones externas en el rango de 10^{-7} a 10^{-5} M del anión (K_m 's entre 3-7 μ M) y un sistema de baja afinidad operando a concentraciones externas mayores (K_m 's entre 50 y 330 μ M).

En los últimos seis años, el entendimiento del transporte del fosfato a través de la membrana plasmática ha avanzado considerablemente. Se han identificado diversos genes que codifican para transportadores en un número importante de especies vegetales. Estos transportadores pertenecen a la familia de proteínas de membrana con dos dominios hidrofóbicos, cada uno con 6 cruces transmembranales, que se encuentran separados por una larga asa hidrofílica central que al igual que sus extremos amino y carboxilo se orienta hacia el citoplasma (Fig. 2).

De las diversas formas iónicas del fosfato ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}), la evidencia experimental indica que es el $H_2PO_4^-$ la forma transportada al interior de las células de las plantas. Como resultado el medio externo sufre una alcalinización y el citoplasma se acidifica, así la absorción de fosfato debe estar acompañada por el contra flujo de protones H^+ con una estequiometría de 2 a 4 moléculas de H^+ por cada molécula de $H_2PO_4^-$ transportado. Con ello, se consigue compensar la alcalinización e incluso inducir acidificación externa. Tal acidificación se explica por la acción de la bomba H^+ ATPasa de la membrana plasmática.

Los transportadores de baja afinidad para P_i son transportadores constitutivos cuya expresión no se afecta por la disponibilidad de fosfato, mientras que el sistema de alta afinidad es inducido por

la deficiencia de Pi presente, siendo su expresión mayoritariamente en la raíz (Raghutama, 2000).

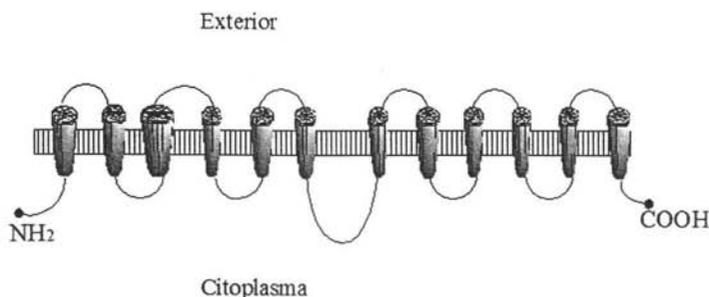


Figura 2. Topología típica de proteínas membranales transportadoras de fosfato en plantas. Estas proteínas se caracterizan por doce cruces transmembrales separados en dos grupos de seis, gracias a la presencia de una larga asa hidrofílica citoplasmática.

En *Arabidopsis* se han separado al menos seis transportadores de Pi de alta afinidad, la necesidad de la existencia de tal número de genes parece estar relacionada con los requerimientos de regular la expresión en función de su edad y las condiciones externas.

4.6 Papel de la expresión genética ante la deficiencia de fósforo.

Actualmente, avances en las metodologías de Biología Molecular han derivado en un conocimiento bastante detallado de los mecanismos de regulación genética de procariontes como *Escherichia coli* y han mejorado nuestro entendimiento de como se regula dicha expresión en eucariontes simples, como las levaduras (*Saccharomyces cereviceae*). En estos modelos ha sido posible obtener mutantes que facilitan la clonación y el estudio de la expresión de los genes que juegan un papel crítico en la adquisición de Pi. Este conocimiento puede servir como base para estudiar modelos más complejos, incluyendo a los vegetales.

En *Saccharomyces cereviceae* y en *E.coli* la toma de Pi ante las condiciones de deficiencia de fósforo se da por la activación de un sistema multigénico de emergencia diseñado para la

búsqueda y asimilación de Pi susceptible de ser movilizado en el medio circundante. Estos sistemas son conocidos como el regulón pho, que consiste de al menos treinta genes codificantes para transportadores de fosfato, fosfatasas ácidas y alcalinas así como reguladores positivos y negativos.

En la levadura el regulón pho está controlado a nivel transcripcional por una cascada de proteínas cinasas (con actividad de serina/treonina cinasas) y de proteína fosfatasas que actúan sobre factores de transcripción, los que a su vez, ejercen controles positivos y negativos sobre la expresión de los diversos genes involucrados en la respuesta a la deficiencia de Pi (Oshima, 1982). Para el regulon pho participan los factores de transcripción pho4 y pho2 que actúan sobre el promotor del gene pho5, activando la expresión de la proteína pho5, que tiene actividad de fosfatasa. En suficiencia de Pi, pho4 se fosforila por un complejo cdk-ciclina formado los productos pho80 y pho85, respectivamente, con ello, se inhibe la asociación pho4-pho2 y no se promueve la transcripción de Pho 5. En condiciones de deficiencia de Pi, el complejo pho80/pho85 permanece asociado a la proteína pho81 que inhibe su actividad de cinasa.

Debido, entre otras cosas, a la mayor complejidad genética y a la plasticidad metabólica de los organismos vegetales, la investigación de los mecanismos de regulación genética está mucho menos avanzada. De esta manera, un modelo vegetal que ha resultado de gran utilidad es *Arabidopsis thaliana* (mouse-ear cress), una maleza anual pequeña, de ciclo vital rápido (cinco semanas por generación), sin valor agrícola, pero con un genoma de apenas 100Mpb, distribuido en cinco cromosomas y que ha sido completamente secuenciado. *Arabidopsis thaliana* es de fácil cultivo en espacios reducidos, presenta abundante producción de semilla y se cuenta con una gran cantidad de mutantes disponibles para la investigación. Esto la convierte en una muy buena herramienta para estudiar la genética de las plantas a nivel molecular. Se sabe por ejemplo, que en *A thaliana* dos genes de RNAsas extracelulares *RNS1* y *RNS2* son inducidos por deficiencia de

Pi (Bariola *et al.*, 1994). Estas RNAsas liberan Pi a partir de moléculas de RNA en la matriz extracelular incluyendo la rizosfera. Así mismo, han sido clonados y caracterizados diferentes genes que responden ante la deficiencia de Pi tales como el gene *Psr3* (Malboobi, 1997), que codifica para un polipéptido homólogo de la β -glucosidasa y que parece jugar un papel en la diglicocilación de fosfatasas ácidas, lo que constituye un mecanismo de regulación asociado a la respuesta ante la insuficiencia de Pi. La deficiencia de fósforo induce el gene *TPSII* (trealosa fosfato sintetasa II) en tomate (Liu C. 1997) y del gene *Mt4*, en *Medicago truncatula* (Burleigh S H. 1997). La relación de estas proteínas con la respuesta adaptativa de la planta no es aún clara. Finalmente, los estudios relacionados a las respuestas del frijol (*Phaseolus vulgaris*) frente a la deficiencia de fósforo son escasos, ya que hay pocos grupos de investigación analizando este problema en dicho cultivo. Sin embargo, se ha reportado que la deficiencia de fósforo eleva la expresión de una proteína homóloga a las metiltransferasas de *A. thaliana*, posiblemente implicada en la síntesis de la Ubiquinona (Coenzima Q). La respuesta se observa desde el primer día de exposición a la deficiencia de fosfato, pero para el tercer día de deficiencia la expresión disminuye nuevamente a niveles basales (Galicia, 2005).

5.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La deficiencia de fósforo no modifica sensiblemente los niveles citoplasmáticos de pirofosfato en la células vegetales, lo que si ocurre con el ATP y la actividad metabólica, en general. Por lo tanto, es de esperarse que, cuando la planta se cultive en condiciones de insuficiencia de fósforo, algunas pirofosfatasas sufrirán cambios en su cantidad y/o actividad, lo que se traducirá en una menor degradación de pirofosfato, compensado así la menor producción del mismo que se deriva de una actividad metabólica y un crecimiento menor.

5.2 HIPÓTESIS

Si lo anterior es un fenómeno general en las plantas, la respuesta será semejante en *Phaseolus vulgaris* L. y *Arabidopsis thaliana*, ambas plantas superiores. Así, podrán emplearse los recursos genéticos disponibles en la segunda, para analizar y comparar la respuesta a la deficiencia de fósforo en la primera.

6.OBJETIVOS

6.1 Objetivo general:

Obtener las herramientas moleculares para caracterizar el perfil de actividades de pirofosfatasas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en plantas tratadas con suficiencia o deficiencia de fósforo.

6.2 Objetivos particulares.

- > Obtener cDNA de los genes de las pirofosfatasas de *Arabidopsis thaliana*.
- > Subclonar los genes de *Arabidopsis thaliana* como proteínas de fusión con Glutathione S-transferasa (GST).
- > Expresar la proteína recombinante y purificarla mediante cromatografía de afinidad.
- > Caracterizar de manera preliminar cada una de las proteínas anteriormente purificadas.
- > Obtener anticuerpos que reconozcan a las pirofosfatasas subclonadas anteriormente.
- > Identificar las actividades de pirofosfatasa presentes en extractos protéicos de raíces de plántulas de frijol, tratadas con suficiencia o deficiencia de fósforo y analizar la inmunoreactividad de estas actividades frente a los anticuerpos generados.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MATERIALES

7.1.1 Sustancias

Todos los reactivos químicos fueron obtenidos por cualquiera de estos proveedores Sigma (St. Louis, MO. USA), Roche (Hvi dovre, Denmark) o Merck (Darmstadt, Germany). La Glutathione Sepharose™ y la Benzamidine Sepharose™ para la purificación de las proteínas recombinantes se obtuvieron de Amersham Biosciences.

7.1.2 Material biológico

Los experimentos que a continuación se describen se realizaron con semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad Pinto Villa (PV). Las semillas maduras y secas se almacenaron en refrigeración dentro de contenedores de baja humedad. La agrolita y el sustrato METROMIX-200 se adquirieron a través de un proveedor local de materiales para invernadero.

7.1.3 Material molecular y microbiológico

Se adquirieron dos clonas de ESTs (*expressed sequence tags*) de *Arabidopsis thaliana*, en el centro de la iniciativa genómica TAIR (Arabidopsis Information Resource). Ambas secuencias codifican para dos diferentes proteínas anotadas como pirofosfatasas putativas. Las clonas presentaban las características descritas en la tabla 1.

TABLA 1. Características de las dos clonas de secuencias EST (*expressed sequence tags*) de *Arabidopsis thaliana*. Las clonas fueron adquiridas a través de la iniciativa TAIR (Arabidopsis Information Resource). Los nombres 241I14 y VBVDG06 corresponden a la nomenclatura del proveedor y se hicieron extensivos a los insertos.

Nombre	Tamaño	Resistencia	Vector de procedencia
VBVDG06	651 pb	Ampicilina	Bluescript.sk
241I14	639 pb	Ampicilina	Lambda zip.

7.1.4 Microorganismos y vectores.

Para los diferentes procedimientos de clonación y expresión heteróloga se emplearon los recursos biológicos que se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2. Recursos biológicos empleados para los procedimientos de subclonación y expresión heteróloga de los insertos recuperados de las clonas descritas en la tabla 1. El plásmido *pGEM T-easy* se obtuvo comercialmente de GIBCO-BRL.

Bacteria / Plásmidos	Propiedades / Fenotipo
<i>E. coli</i> BL codon plus	F - <i>ompT hsdS_B (r_B - m_B -) gal dcm rne131</i> (DE3)
<i>E. coli</i> DH5 α	F Φ 80 <i>lacZ</i> M15 .(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17 (r_k - , m_k) phoA supE44λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>
<i>pGEM T-easy</i>	Amp ^r , ori, lac Z
<i>pgtk+</i>	Amp ^r , ori, lac Z

7.2 MÉTODOS

7.2.1 Germinación de las semillas y crecimiento de las plantas.

Frijol (*Phaseolus vulgaris*)

Las semillas de frijol se lavaron con solución 1% de NaClO, por 15 minutos y se enjuagaron con abundante agua desionizada estéril. Visualmente se eligieron semillas en buen estado y de un tamaño uniforme. Cinco semillas se depositaron entre 2 capas de papel filtro Whatman 3MM humedecido con solución de germinación, dentro de cajas petri estériles. La solución de germinación fue agua estéril sin (deficiencia) o con (control) la adición de Na₂HPO₄ 10 μ M.

Al cabo de 7 días, las plántulas de frijol se transfirieron a Agrolita y se mantuvieron en invernadero con ciclos de 26 °C durante el día y 15 °C durante la noche. Se continuó el riego por dos semanas más con agua destilada (deficiencia) o con 10 μ M de Na₂HPO₄ (control) y cada tercer día con solución de Hoagland II(control) o el mismo en casi todos sus contenidos minerales, excepto por la ausencia de fosfatos en su formulación (-Pi).

Solución nutritiva completa de Hoagland II

(3 mM KNO₃, 2 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM MgSO₄, 0.004 mM MnCl₂, 0.023 mM H₃BO₃, 0.004 mM ZnSO₄, 0.00005 mM H₂MoO₄, y 1 g 200 ml⁻¹ Fe (III) EDTA). A menos que se especifique otra cosa, la solución nutritiva usada difiere únicamente en las concentraciones de Pi: para los tratamientos de ausencia de Pi (-Pi) se utilizó una solución con 500 μM de sulfato de amonio.

7.2.2 Extracción de proteína soluble.

Las plantas se sacaron de la Agrolita, sus raíces se lavaron para eliminar los restos del sustrato de crecimiento, se cortaron, se eliminó la humedad exterior con papel absorbente y se pesó el material de raíz recuperado. Las raíces se molieron en un mortero con la ayuda de arena de mar en 4 volúmenes (por g de tejido) del amortiguador de extracción, que contiene Tris, HCl 0.1 M, pH 7.5, EDTA 1.0 mM, MgCl₂ 3.0 mM y una tableta de inhibidor de proteasas (Complete TM, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim Germany) por cada 50 ml. Una vez que las raíces quedaron perfectamente molidas se filtraron con la ayuda de manta de cielo o gasa. Se colectó esa fracción y se etiquetó como extracto crudo.

7.2.3 Elución en columna de fenil-sepharosa.

Una vez que se obtuvo la fracción del extracto crudo se diluyó con 1 volumen de solución 1 M de NaCl y se prosiguió a fraccionarlo en columnas de fenil-sepharosa. La columna de fenil sepharosa de 5 ml fue previamente equilibrada con un mínimo de cinco veces el volumen de total de la columna del amortiguador de elución A, que contiene Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, EDTA 1.0 mM, MgCl₂ 3.0 mM y 0.5 M NaCl. El extracto crudo se aplicó a la columna y se lavó la proteína que se une a la columna con amortiguador de elución A. Se realizó una segunda elución con

amortiguador de elución B, que contiene Tris-HCl 0.1 M pH 7.5; EDTA 1.0 mM y MgCl₂ 3.0 mM, en agua. Finalmente, la tercera elución con el amortiguador de elución C que contiene Tris-HCl 0.1 M pH 7.5; EDTA 1.0 mM y MgCl₂ 3.0 mM, en etilenglicol al 50%. Se colectaron fracciones de 2.5 ml y se determinó actividad y concentración total de proteína (*cf.* 7.2.4 y 7.2.5) en las fracciones.

7.2.4 Medición de actividad de pirofosfatasas.

La medición de actividad se llevó a cabo determinando la cantidad de fosfato liberado del pirofosfato por minuto en placas multipozo de 12 x 8 pozos, tipo ELISA. Para dicha determinación, la muestra de enzima (1 a 25 µl) se diluye hasta un volumen de 25 µl con agua y se mezcla con un amortiguador de ensayo, Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5, EDTA 0.2 mM, MgCl₂ 6.0 mM y 160 µM de pirofosfato, para dar concentraciones finales de Tris-HCl 0.05 M pH 7.5; EDTA 0.1 mM, MgCl₂ 3.0 mM y 80 µM de pirofosfato. La mezcla se incuba por un periodo de 5 a 30 minutos (según el nivel de actividad esperada) y se detiene la reacción con 0.2 ml del reactivo de verde de Malaquita (RVM). Todo el material empleado para estas medidas debe ser nuevo de plástico o bien haberse lavado con ácido nítrico (libre de fosfatos) al 10%, enjuagando luego con abundante agua desionizada.

Para la preparación del (RVM), se requieren las soluciones siguientes: RVM-A: 0.45 % (v/v) de verde de Malaquita en HCl 2N, dejar reposar por 24 h; RVM-B: 12.4% de Molibdato de amonio en HCl 6M y RVM-C, 4 M NaCl con 3% de Brij 35. Antes de realizar el ensayo se mezclan 2 ml de RVM-A, 1 ml de RVM-B y 9 ml de agua, con 1 ml de RVM-C, que debe añadirse al final.

Luego de la adición del reactivo de verde de Malaquita, la placa se incuba de 5 a 10 minutos y se lee la absorbancia con un filtro de 655 nm en un lector de placas de Elisa "Bio-Rad Benchmark".

Para determinar la cantidad de fosfato producida se prepara una curva patrón, utilizando una solución de 0.1mM de Fosfato de potasio monoácido Na_2HPO_4 . Dicha solución se diluye para contener cantidades variables desde 0.2 hasta 10 nmol de Pi en 25 μl , los que se mezclan con 25 μl de amortiguador de ensayo y con 200 μl de RVM.

7.2.5 Cuantificación de proteína.

Las determinaciones de proteína soluble se realizaron mediante alguna de dos técnicas diferentes: la técnica de Bradford modificada (Zor y Seelinger, 1996) y el método del ácido bicinchonínico (Smith *et al.*, 1985).

Para el método de Bradford debe prepararse el reactivo de color disolviendo 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250® en 50 ml de etanol al 95% v/v posteriormente se agregan 100 ml de ácido fosfórico al 85%, (p/v) se mezclan y se llevan a un volumen final de 1000 ml con agua destilada y desionizada. La curva patrón de proteína se prepara con BSA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, con ello se obtiene un rango de 0 a 2000 ng. La lectura de proteína en placas de ELISA debe realizarse con el cociente de las absorbencias (A_{590}/A_{450}). La determinación proteica de las muestras se realiza mezclando una alícuota igual o menor a 50 μl con 200 μl del reactivo de color arriba descrito.

La cuantificación de proteína por el método de ácido bicinchonínico se realizó usando ácido bicinchonínico y sulfato de cobre al 4% como reactivo de color. El reactivo de color se preparó al mezclar reactivo A y B en relación 50:1. Reactivo A: 1 % de sal sódica de ácido bicinchonínico, 2 % de carbonato de sodio, 0.16 % de tartrato y 0.95 % de bicarbonato de sodio. Reactivo B: Sulfato de cobre al 4 % . La curva patrón y muestras se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 565 nm, estas determinaciones se realizaron también en

placas de Elisa y en un equipo para placas de Elisa "Bio-Rad Benchmar". La curva patrón se realizó con BSA en un rango de 0 a 64.8 µg de proteína.

7.2.6 Acondicionamiento bacteriano

Con el fin de tener suficiente biomasa de las bacterias portadoras de los plásmidos, inóculos de dichas bacterias se incubaron en 5 ml de medio líquido LB (caldo Luria, constituido por Triptona 1%, extracto de levadura 0.5 % y NaCl 1%, pH: 7. Con 50 mg/ml de ampicilina, cuando se indique). Para el medio sólido se adiciono 1.5 % de Agar. Se incubaron por 12 h a 37 °C y agitación constante.

Una vez que presentó desarrollo celular en el medio, una parte se separó mezclándose con 50 % de glicerol estéril y el resto fue purificado con un sistema de purificación rápida de plásmidos (Marlingen Biosciences, Inc. USA).

7.2.7 Extracción y purificación de los plásmidos.

De cada unas de las clonas que se consiguieron, se realizó el siguiente procedimiento:

- 1) Cultivar cada una de las clonas en 5 ml de medio LB por toda la noche a 37°C con agitación constante de 250 r.p.m.
- 2) Centrifugar a 12 000 r.p.m. en microfuga.
- 3) Resuspender en 250 µl de amortiguador de suspensión celular que contiene [5mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA].
- 4) Adicionar 25µl de solución de lisis celular [200 mM NaOH, 1 (w/V)] y mezclar invirtiendo por cinco veces.

- 5) Adicionar 350 μ l de amortiguador de neutralización (Acetato y guanidina hidroclicorada) y mezclar por cinco veces mas.
- 6) Centrifugar a 12 000 r.p.m por 10 min en microfuga.
- 7) Verter el sobrenadante en el cartucho de purificación el cual debe estar montado en un cartucho de recolección y se centrifuga nuevamente en las condiciones anteriores.
- 8) Desechar el filtrado y lavar lo atrapado en el cartucho con 500 μ l amortiguador de lavado GX (Guanidina hidroclicorada, EDTA, y etanol) e incubar a 25 $^{\circ}$ C por 1 min.
- 9) Centrifugar y desechar el amortiguador de lavado G4 (NaCl,EDTA y Tris-HCl)
- 10) Nuevamente al cartucho de purificación se vierten 400 μ l de amortiguador de lavado G4.
- 11) Centrifugar y desechar el amortiguador de lavado.
- 12) Finalmente se eluye el plásmido, adicionando 75 μ l de TE amortiguador [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA] previamente calentado a 70 $^{\circ}$ C, este se deja en incubación por 2 minutos y se centrifuga a 12 000 R.P.M. por 2 min a temperatura ambiente.

7.2.8 Electroforesis de ácidos nucleicos

La visualización de ADN, los productos de PCR y los plásmidos se realizó por electroforesis en gel de agarosa 1 %. Estos geles se corrieron a 10 V/cm por 45 min. El gel se tiñe con solución de bromuro de etidio para su posterior visualización por fluorescencia al irradiarse con luz ultravioleta.

7.2.9 Cuantificación del plásmido.

La cuantificación del plásmido se realizó por absorción de luz a 260 nm en diluciones 1/100 de la muestra. La concentración de plásmido recuperado para cada clona se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Clonas correspondientes a cada inserto.

Clona	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
VBVDG06	5
241114	6.3

Estas muestras fueron mandadas a secuenciar y se confirmó que se trataba cDNA's completos para las dos pirofosfatasa de *Arabidopsis thaliana* estudiadas. La secuencia de bases se muestra en la figura 4 (Pag. 50) y su traducción a secuencia de aminoácidos se presenta en la figura. 6.

7.2.10 Digestión de plásmidos.

La digestión de los plásmidos correspondientes a cada una de las secuencias se realizó en un medio cuya formulación se indica en la tabla 4 (pag. 32).

Tabla 4. Digestión de los plásmidos de cada una de las secuencias 241114 y VBVDG06.

Reactivos	Cantidad	Condición de digestión
H ₂ O	14.0 μl	37°C, 12 horas
NE amortiguador 3	2.0 μl	
DNA (plásmido purificado)	3.0 μl	
Enzima BSTX ♣	1.0 μl	

♣ El sitio de corte de la enzima de restricción BSTX es 5'CCAN NNNN'NTGG 3' y 3'GGTN'NNNN NACC 5'.

7.2.11 Amplificación del inserto por PCR.

La amplificación de cada inserto se realizó utilizando los cebadores diseñados con el programa Biology Workbench (San Diego Supercomputer Center) y presentados en la tabla 5 para generar los nuevos sitios de corte y permitir la ligación en fase bajo las condiciones indicadas en la tabla 6.

Tabla5. Oligonucleótidos construídos para la amplificación de sq-241114 y sq-VBVDG06 por PCR.

241I14F*	: 5'cccgaattcatgagtgaagaaactaaagataaccag 3'
241I14R:	5'cccaagctttcaacgcctcaggggtgtggag 3'
VBVDG06F:	5'ggggaattcatggcgccaccgattgaggtt 3'
VBVDG06R:	5'cccaagctttcaacgtcttaggttctccac 3'

* la sigla F designa a los oligonucleótidos sentido y la sigla R a los antisentido.

Tabla 6 . Condiciones de amplificación por PCR.

REACTIVOS	CANTIDAD	CONDICIONES DE REACCIÓN
Amortiguador 10X	2.5µl	1 Ciclo
Mezcla de dNTP's (10 mM)	1.5µl	95.0°C/3.0 min
Cebador de inicio	1.5µl	25 Ciclos
Cabador de término	1.5µ	95.0°C/1.0 min
Plásmido	1.0µl	55.0°C/1.0 min
		72.0°C/ 1.0 min
Mg ²⁺ (25 mM)	2.5µl	1 Ciclo
H ₂ O	14.0µl	72.0°C/10.0 min
Taqpol (5.00 U/µl)	0.5µl	

7.2.12 Purificación del DNA en gel.

Después de obtener el producto de PCR anteriormente descrito, se recuperó el fragmento del gel mediante una metodología basada en un sistema comercial de purificación rápida de DNA en gel de agarosa (Marlingen Biosciences Inc., USA), como sigue:

- 1) Recortar el área de la banda de interés y verterla en un tubo Eppendorf.
- 2) Adicionar 500 µl de amortiguador de solubilización L1 (perclorato de sodio concentrado, acetato de sodio, y solubilizante TBE *) e incubar a 50°C por 15 min, con agitación moderada.
- 3) Disuelto el gel, se vertió la solución en el cartucho de purificación y se centrifugó a 12 000 r.p.m. por 1 min en microfuga.
- 4) Se desechó el filtrado, se vertieron 500 µl del amortiguador de solubilización (perclorato de sodio concentrado y solubilizante TBE*) y se incubó a 25°C, por un minuto.

Centrifugar y desechar el filtrado. * Es una formulación propia de Marlingen Bioscience, Inc.

- 5) Verter al cartucho 700 μ l de amortiguador de lavado (NaCl, EDTA, y Tris-HCl), incubar a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugar a 12 000 r.p.m., por un minuto.
- 6) Centrifugar nuevamente una vez mas a 12 000 r.p.m., para eliminar en su totalida restos de amortiguador de lavado.
- 7) A continuación el cartucho de filtrado se monto sobre un Eppendorf y se le vertieron 50 μ l de TE amortiguador [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA] previamente calentado a 70°C, se mantuvo en incubación por un minuto y nuevamente se centrifugó a 12000 r.p.m., por 2 min en microfuga.
- 8) Finalmente, se colecta ese filtrado y se somete a liofilización.
- 9) Una vez que sólo queden unos minúsculos cristales, se disuelve la muestra en 10 μ l de agua estéril.

Para determinar que se encuentre la banda purificada se realiza una electroforesis de ácidos nucleicos aplicando 2 μ l de muestra bajo el procedimiento antes mencionado.

7.2.13 Ligación del producto de PCR con el vector pGEM-T Easy.

La ligación se realizó utilizando el Sistema pGEM-T Easy vector (Promega Corp., Madison WI, USA), en el medio de reacción cuya composición se describe en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de ligación a pGEM T-Easy

Reactivos	Cantidad	Condiciones de ligación
Amortiguador de ligación	5.0 μ l	4°C durante 12 horas
PGEM-T	1.0 μ l	
Producto de PCR	3.0 μ l	
DNA ligasa T4	1.0 μ l	

7.2.14 Transformación de células competentes *E. coli* BL codon plus o *E. coli* DH5 α

- 1) El producto de la reacción de ligación fue mezclado con células competentes *E. coli* α DH5F o *E. coli* BL codon plus. Incubar a 25°C por 10 min.
- 2) Aplicar choque térmico de 42°C en baño por 90 seg y adicionar 800 μ l de medio LB e incubar a 37°C por una hora.
- 3) Verter 100 μ l de la mezcla anterior sobre cajas de Petri con medio LB y adicionar 50 μ l de IPTG [100 mM] (Isopropylthio- β -D-galactosido) y 10 μ l de X Gal [50 mg/ml] (5-bromo-4-cloro-3-indolyl β -D galactósido). Mezclar perfectamente hasta lograr homogeneidad.
- 4) Incubar las cajas de Petri a 37°C por toda la noche.

7.2.15 Purificación de los plásmidos pGEM-T Easy

- 1) De las colonias características se toma una asada y se dejan crecer en 5 ml de medio LB hasta una densidad óptica de 1. Centrifugar por 2 minutos a 12 000 r.p.m a temperatura ambiente.
- 2) Resuspender las células en 100 μ l de (50 mM glucosa, 25 mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA y 10 mg/ml de lisozima). Mezclar hasta homogeneizar la pastilla celular.

- 3) Adicionar 5µl de enzima RNAsa 10mg/ ml.
- 4) Adicionar 200 µl de la solución fresca de 0.2 M NaOH y 1 % de SDS. Mezclar invirtiendo por cinco veces e incubar en hielo por 2 minutos.
- 5) Posteriormente adicionar 150 µl de una disolución 5 M de acetato de potasio (pH 5) y mezclar invirtiendo por 10 veces, manteniendo los tubos en hielo por un lapso de 3 a 5 minutos.
- 6) Centrifugar a máxima velocidad en microfuga durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 7) Separar el sobrenadante transfiriéndolo a tubos nuevos desechar la pastilla.
- 8) Verter un volumen igual que el colectado en los tubos nuevos de fenol-cloroformo, centrifugar a máxima velocidad, por dos minutos.
- 9) Repetir el paso siete.
- 10) Precipitar el DNA con dos volúmenes de Etanol concentrado a -20 °C, manteniendo en incubación a -20 °C, por 10 minutos.
- 11) Centrifugar las muestras a 12 000 R.P.M., por 5 minutos.
- 12) Secar a vacío y resuspender en 10 µl de agua estéril.

7.2.16 Digestión del plásmido pGEM T- Easy y pGTK+.

Esta digestión se lleva a cabo en el medio cuya composición se muestra en la tabla 8, para así liberar el inserto de interés. Dicho inserto se purifica mediante electroforesis en geles de agarosa (cfr. 7.2.12) y se liga en el vector pgtk+ dentro del marco de lectura de la Glutación- S-transferasa, para generar una proteína de fusión, la cuál esta bajo el control de un promotor inducible Lac, tal como se describe en los apartados siguientes.

Tabla 8 . Condiciones de digestión del vector pGEM T-Easy

Reactivos	Cantidad	condiciones de digestión
Plásmido	7 μ l	
Amortiguador universal 10 X	3 μ l	
Enzima Eco R1	1 μ l	37°C por 12 horas.
Enzima Hind III	1 μ l	
H ₂ O	18 μ l	

7.2.17 Defosforilación del plásmido pGTK⁺.

El proceso de defosforilación del plásmido se lleva a cabo para dejar el vector con los extremos libres para acoplar al inserto.

1. Verificar la presencia y tamaño del DNA digerido por medio de una electroforesis de ácidos nucleicos. (*cf.* 7.2.8).
2. A cada muestra del plásmido purificado, como se indicó anteriormente, se adicionan 2 μ l de fosfatasa alcalina.
3. Se incuba a 37 °C, por una hora.
4. Inactivar la fosfatasa por choque térmico a 72 °C, por 5 min.
5. Se lleva a 200 a μ l con agua estéril.
6. Adicionar un volumen igual de fenol-cloroformo-isopropanol.
7. Mezclar, centrifugar a 12 000 r.p.m y colectar la fase acuosa.
8. Repetir paso 6 y 7.
9. Agregar a la fase acuosa 1/10 de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol.
10. Dejar precipitar por una hora a -20 °C.
11. Centrifugar a 12 000 r.p.m., retirar sobrenadante y resuspender en 20 μ l de agua estéril.

12. Comprobar por electroforesis de ácidos nucleicos (arriba descrito) la presencia y tamaño del inserto así como la proporción de estos para ligarlos al vector de expresión.

7.2.18 Ligación en gtk+

Este paso debe realizarse en un medio cuya composición se describe en la tabla 9.

Tabla 9 Condiciones de ligación al vector pgtk+.

Reactivos	Cantidad	Condiciones de ligación
Amortiguador de ligación 5X	4 µl	
Vector pgtk+	1 µl	25 °C por 1 h
DNA desfosforilado (para ambas clonas)	1 µl	
Ligasa	1 µl	
H ₂ O	13 µl	

7.2.19 Inducción de expresión de las proteínas de fusión.

El proceso de inducción de *gst-24II14* y *gst-VBVDG06* se realizó en dos fases. Primero se cultivaron células de *E coli* transformadas con el plásmido gtk+, en 5 ml de medio LB con 5 µl de ampicilina [50 mg/ml], por una noche a 37 °C, con agitación constante. Medio mililitro de estos cultivos se inoculó a 50 ml del mismo medio LB fresco en matraces de 250 ml. El cultivo se incubó a 37 °C, con agitación constante hasta alcanzar 0.6 a 0.8 unidades de densidad óptica a 595 nm (DO). Al llegar a la DO se suplementó con 0.1 mM final del inductor IPTG. El cultivo se incubó a 25 °C, por 12 h más.

Los cultivos pertenecientes a cada clona, se centrifugaron juntos en un rotor JA-14 a 12 000 rpm, por 10 minutos.

7.2.20 Extracción de proteína soluble.

1. Centrifugar a 12 000 R.P.M. en rotor JA-14, por 10 minutos.
2. Retirar el medio LB. Lavar la pastilla celular con 1 ml de amortiguador de lisis celular (Tris-HCl 0.1M, pH 7.5, MgCl₂ 3 mM y EDTA 1 mM)
3. Sonicar las células en 15 ml de amortiguador de lisis celular con PMSF 1mM final en un equipo de punta de titanio Braun Biotech Inc., USA
4. Centrifugar a 12 000 rpm y coleccionar sobrenadante (Primer extracto proteico).
5. A la pastilla celular repetir los pasos 3 y 4 de este apartado tres veces mas.
6. Coleccionar cada extracto proteico en refrigeración (Segundo, tercero y cuarto extracto).

7.2.21 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

Para realizar la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), con una concentración al 10 y 12 % (p/v), se prepararon geles de poliacrilamida cuya composición se describe en la tabla 10.

Tabla 10 . Preparación de gel para electroforesis desnaturalizante en SDS (SDS-PAGE).

Solución	Gel apilador 4 % Acrilamida (ml)	Gel separador 10 % Acrilamida (ml)	Gel separador 12 % Acrilamida (ml)
30 % Acrilamida, Bis- Acrilamida 0.8 %	0.67	3.33	4.0
Amortiguador para gel apilador ¹	1.25	-	-
Amortiguador para gel separador ²	-	2.5	2.50
Agua	3.05	4.11	3.44
TEMED*	0.005	0.007	0.007
Persulfato de amonio 25 %*	0.025	0.050	0.050
Volumen final (ml)	5	10	10

* Se añaden después de desgasificar la solución con vacío por un periodo de 10 minutos.

¹ 0.25M Tris HCl pH: 6.8, 0.2 % SDS, Urea 6M

² 0.75M Tris HCl pH: 8.8, 0.2 % SDS, Urea 6M

El gel se prepara entre dos placas de vidrio y se corre a 70 mV (aprox. 100 mA) por dos a tres horas. Estos se revelan por inmersión en solución de azul de Coomassie (Coomassie R250 0.05%, en metanol:acético:agua (5:1:5) y se destiñe en ácido acético al 7 % (v/v) y metanol al 5 % (v/v). Los geles así obtenidos pueden conservarse en una solución de ácido acético al 5 %.

7.2.22 Purificación en Glutathione SepharoseTM y Benzamidine Sepharose

Al cabo de haber obtenido cada uno de los extractos protéicos como se menciona en la sección 7.2.20 estos se pasaron a través de 0.5 ml de resina de Glutathione SepharoseTM (Amersham Biosciences). Con la finalidad de que la máxima cantidad de proteína de interés sea atrapada en la columna, cada extracto se hizo pasar tres veces, se lavó la columna con el amortiguador de lisis celular y se eluyeron 10 fracciones de 0.5 ml con amortiguador de lisis celular adicionado de 10 mM Glutathione reducido (Gibco-BRLTM).

A cada fracción obtenida se le determinó la actividad enzimática de PPiase (*cf.* 7.2.4), la concentración de proteína (*cf.* 7.2.5) y su perfil electroforético de proteínas en SDS-PAGE (*cf.* 7.2.21).

Las fracciones en las que eluyó mayor cantidad de proteína pura se mezclaron y se les adicionaron 10 unidades de Trombina (Amersham Biosciences) por mg de proteína. La mezcla se dejó digerir por una noche a 25 °C y agitación constante. Posteriormente y después del tratamiento de digestión anterior, se corroboró que las muestras presentaran actividad hidrolítica y se observaron las bandas esperadas en geles de acrilamida. Proteína recombinante de 25 KD y proteína GST de 25 KD.(SDS-PAGE, *cf.* 7.2.22).

Una vez que la digestión mostró ser satisfactoria, se pasó cada muestra a través de columnas de 0.5 ml de Benzamidine-Sepharose (Amersham Biosciences). Cada muestra se pasó tres veces por la resina y al final se colectó el eluato. Posteriormente, se lavó la columna con 1 ml del amortiguador de lisis celular. El eluato anterior y el volumen de lavado se analizaron para verificar la presencia de la banda correspondiente a la proteína recombinante y a la proteína GST.

El eluato final anterior se desaló a través de columnas de Sephadex G25, la cual se pasó nuevamente por la resina de Glutathione-Sepharose. Los eluatos se analizaron por actividad enzimática de PPiase (*cf.* 7.2.4), concentración de proteína (*cf.* 7.2.5) y por SDS-PAGE (*cf.* 7.2.21), con lo que se comprobó la presencia de la enzima recombinante purificada.

De la cantidad final de proteína pura obtenida se separaron 900 µg para la generación de anticuerpos, el resto se empleó para el estudio de las propiedades cinéticas y moleculares de la enzima.

7.2.23 Obtención de anticuerpos contra las proteínas puras.

La obtención de anticuerpos contra pr-24114 y pr-VBVDG06 fue realizada en conejos jóvenes por inyección subcutánea de 900 µg de proteína pura mezclada 1:1 con el adyuvante completo de Freud (Sigma Immuno Chemicals) para la primera inoculación, e incompleto para las subsecuentes. El total de proteína fue dosificada en cuatro inoculaciones (0.3 mg de inicio, 0.2 mg a los 15 días, 0.2 mg a los 21 días y 0.2 mg a los 33 días). Al cabo de cuarenta y cinco días los antiseros designados anti-pr-24114 y anti-pr-VBVDG06 fueron colectados y evaluados por su habilidad para detectar la proteínas correspondientes en papel de nitrocelulosa conteniendo 0.2 ng de proteína pura, aplicada mediante la técnica de filtrado llamada "Dot-blot". La máxima dilución de antisuero capaz de revelar una mancha obvia, luego de la incubación con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa y el revelado por medio de la técnica de "Enhanced Chemio Luminescence" (ECL, Amersham Biociences), se designó como el título del antisuero.

7.2.24 Actividad de fosfatasa

El análisis de la actividad de fosfatasa se determinó por la generación de fosfato libre en el medio de reacción. Esta se fue hecha con $MgCl_2$ 6 mM o sin el, con un amortiguador de reacción compuesto por Tris-HCl 0.1M, pH 7.5 y EDTA 2 mM. La metodología ocupada es la misma que la reportada en la sección 7.2.4 para medir la actividad de pirofosfatasa. Los sustratos y concentraciones empleadas se encuentran en la tabla 11.

Tabla 11. Sustratos y condiciones empleadas para determinar actividad de fosfatasa de cada una de las pr-241114 y pr-VBVDG06.

Sustratos fosforilados analizados en su actividad de fosfatasa				
Sustrato	Condición	Sustrato	Condición	
ATP	Concentración final	p-NPP	Concentración final	
ADP	0.5 mM			
NADP ⁺	Reacción por	p-NPS	400 μM	
DGP				
PGA	10 min. A	Bis p-NPP	Reacción por	
PEP	temperatura			10 min.
GUDP				
PRPP	ambiente.			
GDP				

7.2.25 Efecto de cationes divalentes sobre la actividad de pirofosfatasa.

La determinación de actividad ante la presencia de diferentes cationes se llevó a cabo con medio de reacción de Tris-HCl pH: 7.5 0.1 M EDTA 0.1 mM y sin catión, o adicionando una concentración final de catión de 1.5, ó 3 mM. Las sales analizadas fueron MgCl₂, CaCl₂, ZnSO₄, CoCl₂, MnSO₄, CuSO₄ y FeSO₄. Adicionalmente, se determinó la actividad en presencia de 1.5 mM de MgCl₂, más 1.5 mM de un segundo catión, ya sea CaCl₂, ZnSO₄, CoCl₂, MnSO₄, CuSO₄ ó FeSO₄.

La metodología utilizada para la determinación de fósforo liberado fue la reportada en el apartado 7.2.4.

7.2.26 Isothermas de saturación a concentraciones variables de magnesio y pirofosfato.

Cada determinación de cinética de saturación se realizó en medio de reacción constituido por Tris 0.1 M, pH 7.5, EDTA 0.1mM y concentraciones de $MgCl_2$ de 0.2, 0.6, 1.1 y 5.1 mM. Para cada concentración de Mg^{2+} se emplearon la concetraciones de Pirofosfato de 1, 5, 10, 20,50, 100, 150, 400, y 1000 μM . Los tiempos de incubación se variaron entre 5 y 60 minutos a 25 °C, según se requiriese para generar una respuesta adecuada.

Las concentraciones de las especies libres y complejos en equilibrio químico múltiple en solución en los ensayos con pirofosfato y magnesio variables se calculó conforme a lo descrito por Rodríguez-Sotres (1990). Para este cálculo se consideraron las constantes de estabilidad globales reportadas en la tabla 12.

Tabla 12. Constantes de estabilidad globales (considerando la formación desde sus especies libres más simples) de los complejo de pirofosfato con magnesio, pirofosfato con sodio, EDTA con magnesio y EDTA con sodio. Estas constantes se emplearon en los cálculos de las concentraciones de equilibrios múltiples en solución con el programa MECOMPLX (los valores fueron calculados de acuerdo con los valores reportados por (Baykov *et al.* 1972). Los valores son independientes del pH en el rango cercano a la neutralidad, dado que la concentración de protones se incluyó en los cálculos. Los valores de las constantes se consideraron a fuerzas iónicas entre 0.1 y 0.15 M.

Complejo	Constante	Unidades
PPiMg ²⁻	7.76×10 ³	mM ⁻¹
PPiHMg ⁻	5.129×10 ⁶	mM ⁻²
PPiMg ₂ ⁰	3.89×10 ²	mM ⁻²
PPiH ₂ Mg ⁰	3.89×10 ⁸	mM ⁻³
PPiNa ³⁻	2.57×10 ⁻²	mM ⁻¹
PPiHNa ²⁻	3.311×10 ⁴	mM ⁻²
PPiNa ₂ ²⁻	4.677×10 ⁻⁴	mM ⁻²
PPiH ³⁻	1.288×10 ⁶	mM ⁻¹
PPiH ₂ ²⁻	3.09×10 ⁹	mM ⁻²
EDTAH ³⁻	2.19×10 ⁷	mM ⁻¹
EDTAH ₂ ²⁻	3.162×10 ¹⁰	mM ⁻²
EDTANa ³⁻	5.01×10 ⁻²	mM ⁻¹
EDTAMg ²⁻	3.98×10 ⁵	mM ⁻¹
EDTAHMg ⁻	3.98×10 ⁹	mM ⁻²

Los resultados permitieron el cálculo de las especies y complejos tales como en el ejemplo que se muestra en la tabla 13.

Tabla 13. Reporte de las concentraciones de especies libres, especies totales y complejos de pirofosfato magnesio en el ensayo reportados por el programa MECOMPLX (ejemplo de una condición con 1.1 mM de Magnesio y 1 μ M de pirofosfato totales).

Especie	Libre (mM)	Total (mM)	Complejo	(mM)
Mg ²⁺	1.0000000	1.1009394	PPiMg ²⁻	1.0000 \times 10 ⁻³
Na ⁺	0.2000000	0.2000000	PPiHMg ⁻	2.0901 \times 10 ⁻⁵
H ⁺	3.1623 \times 10 ⁻⁵	2.7974 \times 10 ⁻⁴	PPiMg ₂ ⁰	5.0129 \times 10 ⁻⁵
EDTA ⁴⁻	2.5072 \times 10 ⁻⁷	0.1000000	PPiH ₃ Mg ⁰	5.0129 \times 10 ⁻⁸
PPI ⁴⁻	1.2887 \times 10 ⁻⁷	0.0010769	PPiNa ³⁻	6.6237 \times 10 ⁻¹⁰
			PPiHNa ²⁻	2.6985 \times 10 ⁻⁸
			PPiNa ₂ ²⁻	1.2054 \times 10 ⁻¹¹
			PPiH ³⁻	5.2487 \times 10 ⁻⁶
			PPiH ₂ ²⁻	3.9820 \times 10 ⁻⁷
			EDTAH ³⁻	1.7363 \times 10 ⁻⁴
			EDTAH ₂ ²⁻	7.9278 \times 10 ⁻⁶
			EDTANa ³⁻	2.5122 \times 10 ⁻⁹
			EDTAMg ²⁻	0.0997866
			EDTAHMg ⁻	3.1555 \times 10 ⁻⁵

7.2.27 Longitudes de absorción y fluorescencia de las proteínas puras.

La determinación de los espectros de fluorescencia de las proteínas se obtuvo en un rango de longitud de onda de 240 a 450 nm, en un espectrofluorofotometro SHIMADZU RF5000U, a temperatura ambiente.

8. RESULTADOS

8.1 Extracción y purificación del ADN plasmídico.

Una vez adquiridas las dos clonas en TAIR (Arabidopsis Information Resource) cuya secuencia codificaba para dos diferentes pirofosfatasa de *A thaliana*, se transformaron bacterias competentes de *E. coli* DH5 α . Las bacterias se sembraron en placa y se escogieron colonias positivas, estas se cultivaron y se purificó el plásmido tal como se describe en el apartado 7.2.7. La secuencia nucleotídica 24II14 estaba dentro del vector Bluescript.sk, mientras que la VBVDG06 se encontraba dentro del plásmido Lambda zip. Para ambos casos se extrajo el inserto con la enzima de restricción BSTX I (7.2.10). El plásmido se analizó mediante electroforesis en Agarosa al 1% (Fig. 3, pag. 49) antes (carriles 1 y 2) y después de digerir con BSTX I (carriles 3 y 4). Lo anterior permitió liberar cada uno de los insertos del plásmido del cual provenían y posteriormente generar las construcciones que nos permitieran expresar esos genes.

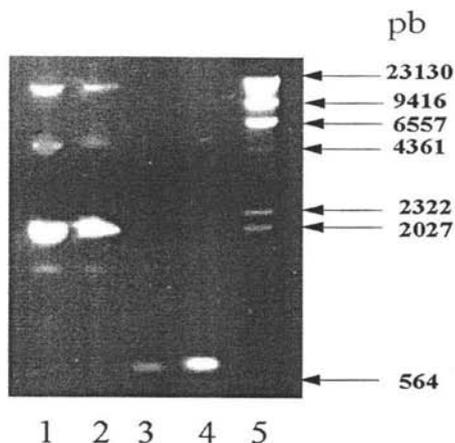


Figura 3. Perfil electroforético de los extractos totales y digeridos de los plásmidos Lambda zip y Bluescript.sk que contienen a los insertos que codifican para las proteínas VBVDG06 y 241114 respectivamente. Carril 1 Extracción del vector Bluescript.sk Carril 3 inserto 241114 separado del vector de origen. Carril 2 Extracción del vector Lambda zip. Carril 4 inserto VBVDG06 separado por digestión del vector de origen.

Luego de confirmar su pureza e integridad, cada uno de los dos plásmidos se cuantificó por absorbancia a 260 nm y se envió a un servicio de secuenciación (Unidad de biología molecular, Instituto de fisiología celular, UNAM), para así comparar la secuencia de los insertos con los cADNs teóricos obtenidos de la base de datos TAIR (Arabidopsis Information Resource). Cuya identidad fue del 100% para ambos cADN's. La secuencia fue traducida *in silico* (Fig 4). Mediante el programa ALINE (Biology WorkBench. San Diego Supercomputer Center, <http://workbench.sdsc.edu/>) se realizó un alineamiento entre ambas secuencias y reveló coincidencia del 79%, a nivel de aminoácidos. Con el programa "TargetP" (Center for Biological Sequence Analysis BioCentrum DTU) se calcularon las masa moleculares y los puntos isoeléctrico teóricos, también mostró que la proteína predicha para VBVDG06 es posiblemente citoplasmática, en tanto que la predicha para 241114, podría ser mitocondrial, sin embargo estos resultados deben tomarse con reserva hasta que se demuestre su localización.

VBVDG06.

ATGGCGCCACCGATTGAGGTTTCTACCAAAAGCTTACGTTGAGAAACATGTTTCACTTCCTAC
TCTTAATGAGAGGATACTTTTCGTCCATGAGTCACAGATCAGTAGCTGCACACCCATGGCATGA
TCTCGAGATAGGACCTGAAGCCCCAATTATCTTCAATTGTGTGGTTGAGATAGGAAAAGGGAG
CAAGGTGAAATATGAACTCGACAAAACACGGGTCTCATTAAAGTCGACCGTATTCTTTACTC
ATCTGTGCGTATACCCACACAACACTATGGGTTTATTCCCGCGTACCCTTTGTGAGGACAGTGACC
CTATTGATGTTCTTGTATTATGCAGGAACCGGTGATCCCAGGATGCTTTCTTCGGGCCAAAG
CTATTGGTCTGATGCCAATGATGATCAGGGTGAGAAAAGACGACAAGATCATTGCTGTCTGCG
CTGACGATCCAGAGTATCGCCATTACAACGACATCAGTGAGCTTCCGCCTCATCGTATGGCTG
AGATCCGCCGTTTCTTTGAAGACTATAAGAAAAACGAGAACAAGGAAGTAGCCGTTAACGACT
TCCTTCGGGCAACTGCAGCCTACGACGCAGTTCAGCATTCCATGGATCTCTTGCAGACTACGT
CGTGGAGAACCTAAGACGTTGA.

241114.

ATGAGTGAAGAACTAAAGATAACCAGAGGCTGCAGCGACCAGCTCCTCGGTCTTAAACGAGAG
GATTCTCTCATCCTTGTCAAGAAGATCCGTAGCTGCTCATCCATGGCATGATCTTGAGATTGG
ACCTGGAGCTCCACAGATTTTCAATGTGGTTGTTGAGATCACTAAAGGAAGCAAGGTCAAATA
CGAGCTTGACAAAAAGACAGGACTCATCAAGTTGATCGTATTCTCTACTCCATCAGTTGTGT
ACCCTCAACTATGTTTTGTTCTCGCACATTGTGTGAAGACAATGACCCCATGATGCT
TAGTCATCATGCAGGAACCTGTGCTTCCGGGTTGTTTTCTGCGTGCCAGAGCCATTGGATTAA
TGCCATGATTGACCAGGGTGA AAAAGATGACAAGATCATTGCAAGTGTGTGTTGATGATCCTG
AATATAAGCACTACACTGACATAAAGA ACTTCTCCTCACCGTCTCTGAAATCCGTCGTTT
CTTCGAAGACTACAAGAAAAACGAGAACAGGAAGTTGCAGTGAATGATTTTCTGCCATCTGA
GTCTGCGGTTGAAGCTATCCAGTACTCAATGGACCTCTATGCTGAATACATTCTCCACACCT
GAGGCGTTGA

Figura 4. Secuencia nucleotídica de sq-241114 y sq-VBVDG06.

A)

	10	20	30	40	50	60
VBVDG06	MAPP	IEVSTKSYVEKHVSLPTLNERILSSMSHRSVAAHPWHDL	EIGPEAPIIFN	VVEIG		
241I14	MSE--	ETKDNQRLQRP	--PRLNERILSSLSRRSVA	AHPWHDL	EIGPGAPQIFNVVVEIT	
	70	80	90	100	110	120
VBVDG06	KGSKVKYELDKTTGLIKVD	RILYSSVVYPHNYGFIPRTL	CE	EDSDPIDVLVIMQEPV	IPGC	
241I14	KGSKVKYELDKTTGLIKVD	RILYSSVVYPHNYGFVPR	T	CE	EDNDPIDVLVIMQEPV	IPGC
	60	70	80	90	100	110
	130	140	150	160	170	180
VBVDG06	FLRAKAI	GLMPMIDQGEKDDKIIAV	CADDPEYRHYNDISEL	PPHMAEIR	RRFFEDYK	KNE
241I14	FLRARAIG	LMPMIDQGEKDDKIIAV	C	VDDPEYKHYTDIKEL	PPHRLSEIR	RRFFEDYK
	120	130	140	150	160	170
	190	200	210			
VBVDG06	NKEVAVNDFLPATAAYDAV	QHSMDLYADYVVENLRR				
241I14	NKEVAVNDFLPSESAVEAI	QYSMDLYAEYILHTLRR				
	180	190	200	210		

B)

<i>Datos teóricos</i>	<i>Longitud</i>	<i>pI</i>	<i>Masa</i>
Secuencia	(aa)		(dalton)
VBVDG06	216	5.26	24576.17
241I14	212	5.73	24484.07

Figura 5. A) Alineamiento de secuencias traducidas de sq-241I14 y sq-VBVDG06.
B) Datos moleculares calculados para las secuencias traducidas sq-241I14 y sq-VBVDG06.

Nuevamente con el programa “ProtParam” (ExpPASy Server protein tools, <http://au.expasy.org/tools/protparam.html> Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExpPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005), pp. 571-607) se calculó la composición de aminoácidos de ambas proteínas (Tabla 14). Estos datos sirvieron para determinar el punto isoeléctrico teórico y el peso molecular esperado ((Fig 5 B) y para dar una explicación posible a las diferencias encontradas en los espectros de absorción y fluorescencia de ambas proteínas (vease más adelante 8.12).

Tabla 14. Perfil de composición de aminoácidos de clonas VBVDG06 y 241114.

	VBVDG06		241114	
	# A.A	%composición	# A.A	%composición
Ala (A)	15	6.9	11	5.2
Arg (R)	11	5.1	15	7.1
Asn (N)	8	3.7	8	3.8
Asp (D)	17	7.9	16	7.5
Cys (C)	4	1.9	3	1.4
Gln (Q)	3	1.4	6	2.8
Glu (E)	17	7.9	18	8.5
Gly (G)	8	3.7	8	3.8
His (H)	8	3.7	6	2.8
Ile (I)	18	8.3	16	7.5
Leu (L)	15	6.9	19	9
Lys (K)	13	6	14	6.6
Met (M)	7	3.2	5	2.4
Phe (F)	6	2.8	6	2.8
Pro (P)	16	7.4	15	7.1
Ser (S)	13	6	12	5.7
Thr (T)	6	2.8	6	2.8
Trp (W)	1	0.5	1	0.5
Tyr (Y)	11	5.1	10	4.7
Val (V)	19	8.8	17	8
Asx (B)	0	0	0	0
Glx (Z)	0	0	0	0
Xaa (X)	0	0	0	0
Cargas (-)/(Asp+ Glu)	31		34	
Cargas (+)/(Arg + Lys)	24		29	

8.2 Comparación con otras secuencias de pirofosfatasa.

El análisis de las secuencias de las dos pirofosfatasa estudiadas (VBVDG06 y 241114) indican que estas dos proteínas coinciden en un 79 % de sus secuencia, y presentan elevada semejanza con pirofosfatasa solubles inorgánicas de plantas como *Populus tremula tomentosa*, *Solanum tuberosum*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, y bacterias como *Beta Vulgaris* (Tabla 14, y Fig. 6). Los cristales analizados para las pirofosfatasa de E. coli y Levadura, revelan que este tipo de pirofosfatasa poseen 4 iones de Mg^{2+} por sitio activo y un sitio activo por subunidad, siendo ambas enzimas oligoméricas en su forma activa. Ambas son inactivas en ausencia de Mg^{2+} . (Cooperman *et al.*, 1992).

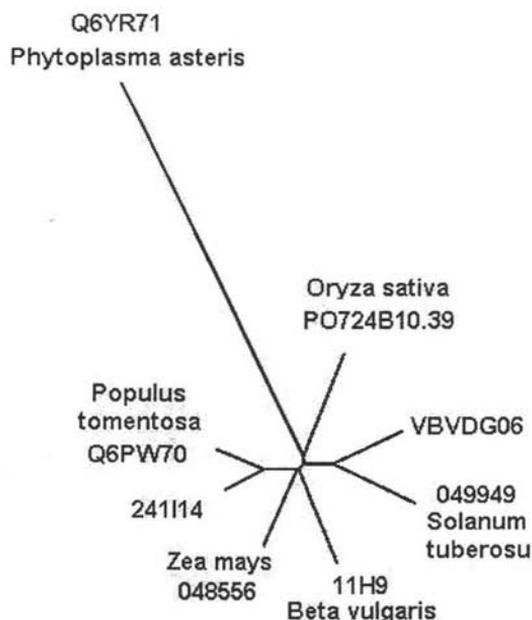


Figura 6. Dendrograma construido con las distancias evolutivas entre las secuencias de aminoácidos de pirofosfatasa de diversos organismos, relacionadas con las estudiadas en el presente trabajo. Los códigos mostrados son números de acceso del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit.html>). El cálculo se realizó con el programa *ClustalW* (Biology WorkBench, San Diego Supercomputer Center, <http://workbench.sdsc.edu/>)

Tabla 15. Porcentaje de identidad de aminoácidos de las secuencias 241114 y VBVDG06 con otras pirofosfatasa de vegetales y bacterias.

	<i>Zea mays</i>	<i>Onion yellow</i>	241114	VBVDG06	<i>β vulgaris</i>	<i>Solanum t</i>	<i>Populous t</i>	<i>Oryza sativa</i>
241114	81	41	100	79	79	77	89	75
VBVDG06		38	79	100	77	81	75	75
<i>Populus t</i>			89	75	79	76	100	75
<i>Zea mays</i>				77	78	74	81	78
<i>Solanum t</i>					72	100	76	71
<i>β vulgaris</i>						72	79	75
<i>Oryza sativa</i>							75	100
Onion yellows								41

8.3 Construcción de la proteína de fusión

La amplificación de cada gen por la técnica de PCR (vease 7.2.11) se muestra en la figura 7. Los productos de PCR correspondientes se ligaron en pGEM-T Easy y se introdujeron en células *E. coli* DH5 α . Se recuperó el plásmido de varias transformates positivas (Fig. 8) Las que corresponden a los carriles 3, 4, 5, 6, y 9 se digirieron con las enzimas Eco R1 y Hind III, que cortan en los oligonucleótidos usados para la amplificación, pero no en el interior de los insertos en estudio. El análisis electroforético reveló las bandas esperadas (cercanas a 600 pb) para ambos insertos, siendo los carriles 3, 4 y 5 para la clona 241I14 y los carriles 6 y 9 para la clona VBVDG06 de la figura 8.

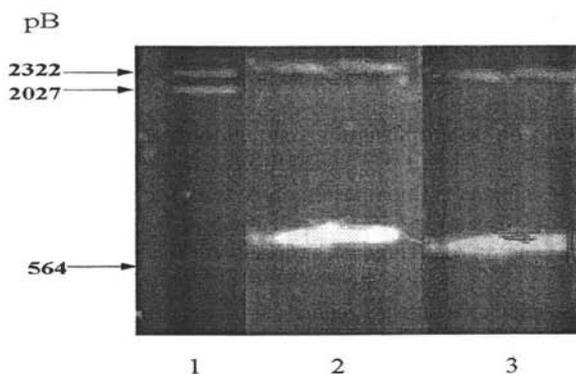


Figura 7. Amplificación por PCR de cada gen de pirofosfatasa. Carril 1, marcador de peso molecular λ / Hind III ; Carril 2, Inserto correspondiente a VBVDG06. Carril 3, Inserto correspondiente a proteína 241I14.

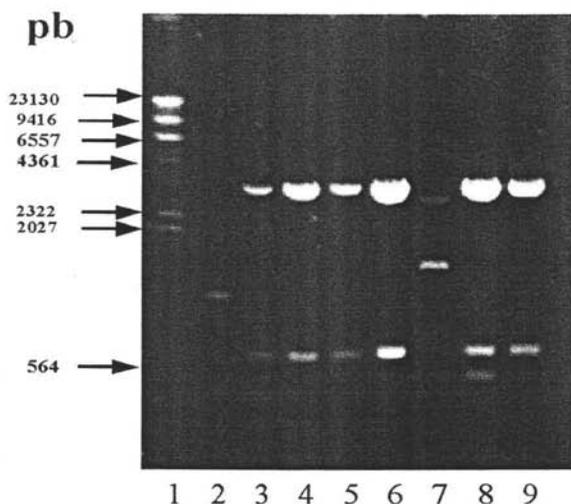


Figura 8. Identificación de insertos 241114 y VBVDG06 en los plásmidos pGEM T-easy. Carril 3,4 y 5 Producto obtenido por digestión del plásmido pGEM T-easy con inserto de la proteína 241114; carriles 6 al 9, Producto obtenido por digestión del plásmido pGEM T-easy con inserto de la proteína VBVDG06. Carril 1, escalera de maracadores de λ -Hind III.

Entonces, cada inserto se separó, purificó, y se ligó nuevamente ahora en el vector gtk+ en fase con GST. La figura 9 muestra los insertos digeridos así como el vector gtk+ digerido y defosforilado previo a la ligación con las nuevas construcciones. No se muestra imagen posterior a la construcción vectorial, pues esta fue accidentalmente borrada de mis documentos, sin embargo si fue realizada y mostró un resultado exitoso. Una vez realizada la construcción anterior, nuevamente fueron transformadas células competentes *E coli* BL codon plus y se indujo la expresión de las proteínas de fusión.

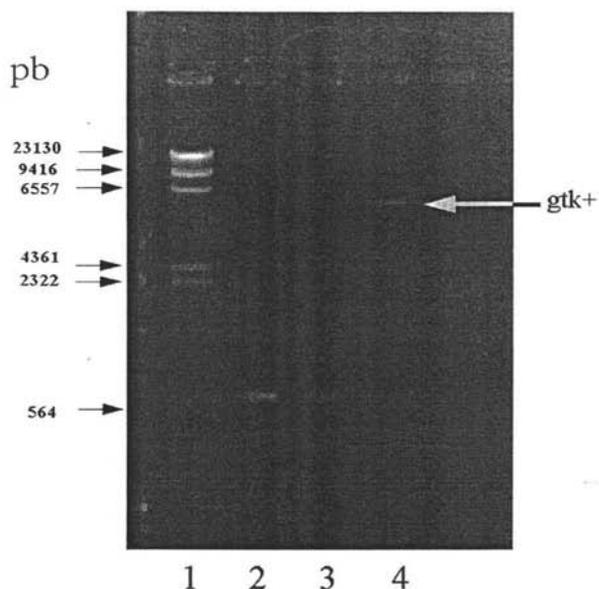


Figura 9. Insertos purificados y vector digerido y desfosforilado. carriles: 1: marcadores de peso molecular λ /Hind III; 2 y 3, secuencias de DNA digeridas y purificadas 241114 y VBVDG06 respectivamente; 4, vector de expresión gtk+, digerido y desfosforilado, portador del gene para la proteína GST.

8.4 Inducción de la expresión de las proteínas

La inducción proteica fue exitosamente lograda bajo la metodología reportada en el apartado 7.2.19. Los resultados que se muestran en la figura 10 (Pag. 57) revelan una banda intensa en un peso aproximado de 50 KDa el cuál únicamente aparece después de realizar la inducción. Véase que en los carriles 2 y 5 no se presenta la intensa banda de 50 KDa que si aparece en las muestras inducidas de los carriles 3, 4, 6 y 7.

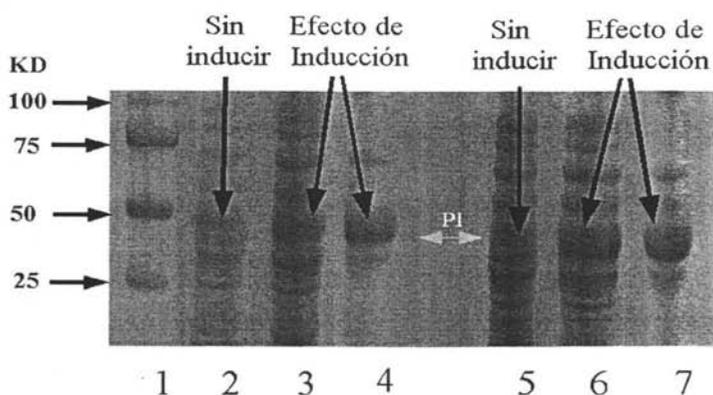


Figura 10. Perfil electroforético de proteínas solubles intracelulares inducidas y no inducidas. Carril 1, Marcadores de peso molecular Bio Rad Dual Color. Carril 2 al 4 Proteínas correspondientes a la clona 241114, y 5 a 7 proteínas pertenecientes a clona VBVDG06. 2 y 5 No se encuentran bajo la influencia del inductor IPTG. 3 y 6 Primer extracto proteico bajo la influencia del factor de inducción. 4 y 7 Segundo lavado de células inducidas.

8.5 Proteínas de fusión purificadas por cromatografía de afinidad

Los extractos proteicos *gst-241114* y *gst-VBVDG06* se purificaron en columnas de Glutathione-sepharose, el perfil electroforético de las fracciones recuperadas se muestra en la figura 11, mientras que la figura 12; muestra que después de tres lavados aún se obtiene proteína de fusión de las columnas de Glutathione Sepharose™.

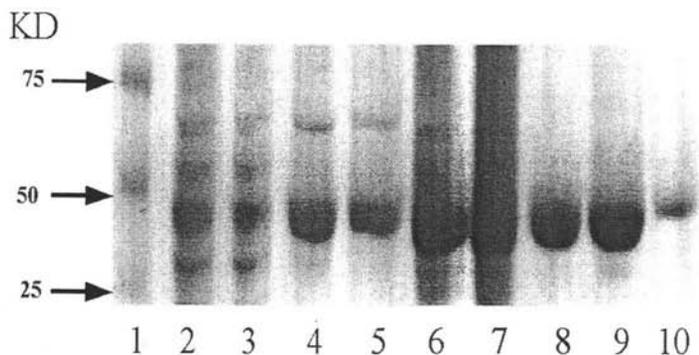


Figura 11. Perfil electroforético de proteínas, diferentes fracciones. Carril 1, Marcadores de peso molecular Bio Rad Dual Color. Carril 2 y 3 fracciones proteicas que no se pegaron a las columnas de afinidad de Glutathione Sepharose[™] Carril 4 a 7 Proteína 241114 fusionada con la Glutathione S transferasa (diferentes lavados). Carril 8 al 10 Proteína VBVDG06 fusionada con la Glutathione S transferasa (diferentes lavados).

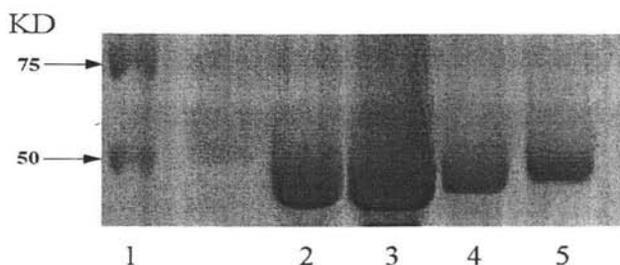


Figura 12. Perfil electroforético de purificación por afinidad de las proteínas de fusión GST-241114 (carriles 2 y 4) y GST- VBVDG06 (carriles 3 y 5). Carriles (4 y 5) muestran un lavado adicional. Carril 1 : Marcadores de peso molecular (Bio Rad Dual Color).

8.6 Actividad y características de las proteínas de fusión

Debido a que las PPiasas de bacterias y levaduras estudiadas hasta la fecha son inactivas como monómeros y, debido a que la proteína de fusión posee un importante impedimento estérico para permitir la formación de los oligómeros, nuestra predicción inicial fue que la proteína de fusión no presentaría actividad. Sin embargo, ambas proteínas de fusión presentaron actividad de

PPiases. En ambos casos la actividad fue totalmente dependiente de la presencia de magnesio. (Tabla 16). Su perfil de elución en columnas de filtración en gel correspondió al de los monómeros y aunque se observaron agregados de proteína de peso molecular superior, dichos picos no presentaron actividad. Una caracterización más detallada de esta enzima no es parte del de este estudio y fue realizada por Gustavo García Olvera y Rogelio Rodríguez Sótres (Datos no publicados). Dichos datos no se incluyen en este trabajo.

Tabla 16 . Capacidad de hidrólisis de diferentes sustratos fosforilados.

<i>Actividad de fosfatasa presentada por cada proteína de fusión. ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)</i>			
Proteína de fusión	Sustrato	+Mg ²⁺	- Mg ²⁺
		(0.3 mM)	
Gst-VBVDG06	PPi (0.16 mM)	0.298	0.002
Gst-241I14	PPi (0.16 mM)	0.274	0.002
Gst-VBVDG06	Otros [†]	ND [‡]	ND [‡]
Gst-241I14	Otros [†]	ND [‡]	ND [‡]

[†]Actividad hidrolítica sobre : ATP, ADP, NADP, G6P, PGA, PEP, UDP, PRPP,GDP (0.5mM) o sobre pNPP, pNPS, y bis pNPP (0.4 mM). [‡]ND, no detectada.

8.7 Digestión desalado y purificación de las PPiases recombinantes

Después de observar la presencia de la proteína de fusión en cada uno de los lavados de la columna, se mezclaron aquellos de mayor concentración protéica y se adicionó la proteasa Trombina. La mezcla de digestión se desaló a través de una columna de Sephadex™ G-25 para eliminar el glutatión, se aplicó secuencialmente a columnas de Benzamidina-sepharosa y de Glutathione-sepharose para retener la Thrombina y la GST, respectivamente, ambas columna se lavaron con un volumen de amortiguador, para recuperar la totalidad de la proteína, con lo cual se obtuvo la proteína recombinante totalmente pura y libre de la proteína de fusión (Fig. 13).

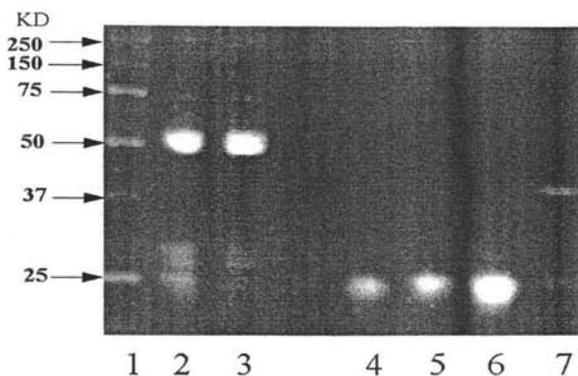


Figura 13. Perfil electroforético de las proteínas fusionadas con la Glutathion-S-transferasa y aquellas digeridas, separadas y purificadas. Carril 1 Marcadores de peso molecular Bio Rad Dual Color. Carril 2 y 3 Proteínas *gst-241114* y *gst-VBVDG06*. Carril 4 y 5 Proteínas *241114* purificada. Carril 6: Proteína *VBVDG06* purificada. Carril 7. Proteasa *Thrombina*, pura.

8.8 Actividad de pirofosfatasa ante diferentes sustratos

La medición de actividad de las proteínas puras dió como resultado que de todos los sustratos analizados, sólo el pirofosfato es hidrolizado por las proteínas puras obtenidas (Tabla 17, Pag. 61).

Tabla 17. Actividad de las pirofosfatasa recombinantes puras sobre diferentes sustratos fosforilados.

<i>Actividad de fosfatasa presentada por cada clona.</i>			
<i>($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)</i>			
Clona	Sustrato	+Mg ²⁺	-Mg ²⁺
		(0.3 mM)	
VBVDG06	PPi (0.16 mM)	0.368	0.003
241I14	PPi (0.16 mM)	0.314	0.002
VBVDG06	Otros †	ND‡	ND‡
241I14	Otros†	ND‡	ND‡

† Actividad hidrolítica sobre: ATP, ADP, NADP, G6P, PGA, PEP, UDP, PRPP, GDP (0.5mM) o sobre pNPP, pNPS, y bis pNPP (0.4 mM).

‡. No detectada.

8.9 Actividad de pirofosfatasa ante diferentes cationes

La determinación de actividad ante la presencia de diferentes cationes se llevó a cabo como se expresa en el apartado 7.2.25. Dentro de los resultados obtenidos (Fig. 14) se observó que el MgCl₂ es el único que produce una activación importante de la actividad de PPiase, en cambio Ca²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺ y Fe²⁺, resultaron inefectivos como activadores. Nótese además, que en presencia de magnesio, la adición de cualquiera de los anteriores cationes, no incrementa considerablemente la actividad hidrolítica de estas enzimas, sin embargo si la disminuye (Fig. 14 Mg-Ca, Mg-Zn, Mg-Co, Mg-Cu y Mg-Fe). En presencia de Manganeso, se detectó una muy baja actividad, que no se incrementó al añadir el catión en doble concentración (Fig. 14, 2-Mn) o al añadir Mg²⁺. Nótese además que frente a la adición del doble de magnesio (Fig. 14, 2-Mg) la actividad de la proteína pr-VBVDG06 es igual a la obtenida con 1.5 mM de MgCl₂, en tanto que la proteína pr-241I14 si presentó una mayor actividad en esta condición. Lo anterior indica que a pesar de su parecido a nivel de secuencia, sus características cinéticas no parecen ser las mismas,

al menos frente a la activación por magnesio, por ello se decidió realizar un experimento en el cual se modificaran las concentraciones de Mg^{2+} y determinar la hidrólisis de pirofosfato ante estas condiciones.

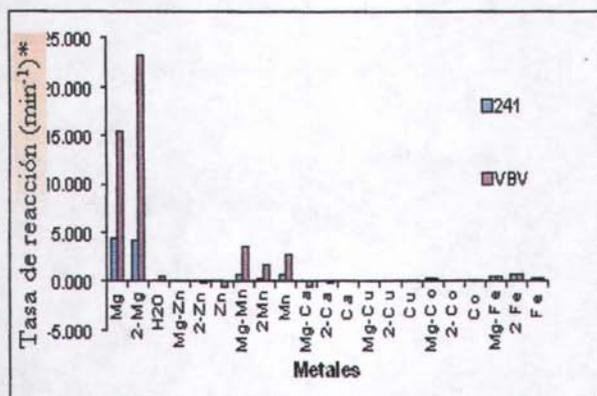


Figura 14. Actividad de hidrólisis de pirofosfato por la pirofosfatasas recombinantes puras (■) p241114 y (■) pVBVDG06, en ausencia o en presencia de varios cationes divalentes añadidos individualmente a una concentración de 1.5 mM (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+}), o a una concentración de 3 mM (2-Mg, 2-Zn, 2-Mn, 2-Ca, 2-Cu, 2-Co, 2-Fe). También se muestra la actividad en presencia de 1.5 mM de Mg y con 1.5 mM de cada uno de los restantes cationes (Mg-Zn, Mg-Mn, Mg-Ca, Mg-Cu, Mg-Co, Mg-Fe). * Representa las moléculas de pirofosfato hidrolizado por molécula de enzima por minuto.

8.10 Cinéticas de saturación por pirofosfato y magnesio.

El análisis realizado se efectuó modificando las concentraciones totales del sustrato pirofosfato a concentraciones fijas del activador magnesio, tal como se describe en el apartado 7.2.26. Una vez realizado el experimento, los datos se graficaron frente a las concentraciones calculadas del complejo $MgPPi$ (Tablas 12 y 13), dado que estas enzimas requieren para ser activas de el sustrato $MgPPi^{2-}$ como se muestra en las figuras 15 A, B y C. No se reportan parámetros cinéticos dado que aún no tenemos claridad del tipo de modelo que siguen estas enzimas. Sin embargo, las gráficas muestran una clara dependencia por Mg^{2+} como cofactor, necesario para la

activación de estas enzimas. Es evidente que a bajas concentraciones de Mg^{2+} , la tasa de hidrólisis de pirofosfato es menor y se presenta una inhibición por altas concentraciones de este sustrato (ver figura 15-B y 15-C ■ 0.2 mM y ● 0.6 mM). Por otro lado, en estas gráficas puede verse una diferencia mas entre ambas proteínas, siendo notorio que la proteína VBVDG06 muestra que a concentraciones de ■ 0.2 mM de Mg^{2+} alcanza aproximadamente la mitad de la tasa de reacción máxima presentada por la proteína 241I14. Además, mientras que a las concentraciones de 0.6, 1.0, y 5.0mM de Mg^{2+} , las tasas de reacción para la proteína VBVDG06 alcanzan máximos semejantes, la enzima 241I14 muestra una actividad ligeramente menor a la concentración de 0.6 mM de Mg^{2+} . Los resultados anteriores, sugieren que alguna de las especies libres de pirofosfato inhibe la hidrólisis, ya que como se ve en el panel A de la figura 15 cuando la concentración de pirofosfato libre supera los 0.05 mM (aproximadamente) es cuando la inhibición se hace evidente. Hay que aclarar que aquí se representa la concentración de Pirofosfato tetraniónico, pero las concentraciones de pirofosfato tri y di aniónico se mueven en paralelo a este valor.

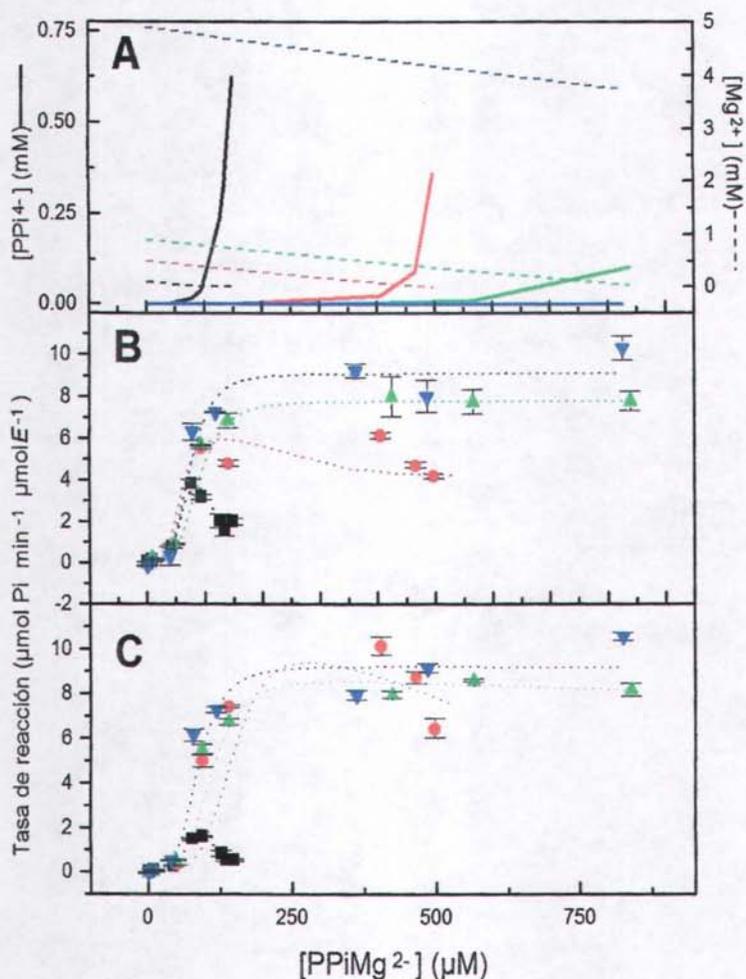


Figura 15. Cinética de saturación por pirofosfato y dependientes de magnesio. A) Las líneas discontinuas descendentes (---) muestran la concentración de Mg^{2+} libre (escala derecha) y las líneas continuas (—) muestran las concentraciones del tetranión pirofosfato libre (escala izquierda). B) clona 241114 y C) clona VBVDG06. Los puntos unidos por líneas muestran el ajuste de actividad a la ecuación de Hill sin o con un componente de inhibición por exceso de sustrato (Tovar-Mendez *et al.*, 2001). Las concentraciones de Mg^{2+} para cada condición son ■ 0.2 mM, ● 0.6 mM, ▲ 1.0 mM y ▼ 5.0 mM.

8.11 Elución de picos de proteínas 241I14 y VBVDG06 en columnas de exclusión molecular de HPLC

Como parte final de la caracterización de las dos proteínas recombinantes generadas (241I14 y VBVDG06), Estas fueron inyectadas en una columna de exclusión molecular de HPLC como proteínas puras y como mezcla de proteínas con la Glutathione S-transferasa (solo digeridas y sin purificar). Las proteínas puras eluyeron como un sólo pico con un tiempo de retención de 23.5 minutos. Sin embargo, el perfil de actividad de la proteína VBV es más ancho que el pico de absorbencia, a diferencia del pico de actividad de la proteína 241 que si coincide con el pico de proteína. La muestras inyectadas antes de eliminar la GST y la trombina de la mezcla muestran dos picos adicionales a los 18.5 min. y a los 21 min., que podrían corresponder a las proteína de fusión remanente y a la GST. El pico de actividad que se encontró con a los 25.5 min puede corresponder a fosfato contaminante, porque corresponde a fracciones de muy bajo peso molecular y es poco probable que sea enzima activa. El hecho de que se detecte actividad en zonas que corresponden a tiempos de retención más cortos que 23.5 minutos (pico de la enzima pura) indica que es posible que la proteína pueda presentar formas de agregación, posiblemente dímeros, que podrían presentar alta actividad, pero si su proporción como proteína es baja, no serían evidentes en el cromatograma.

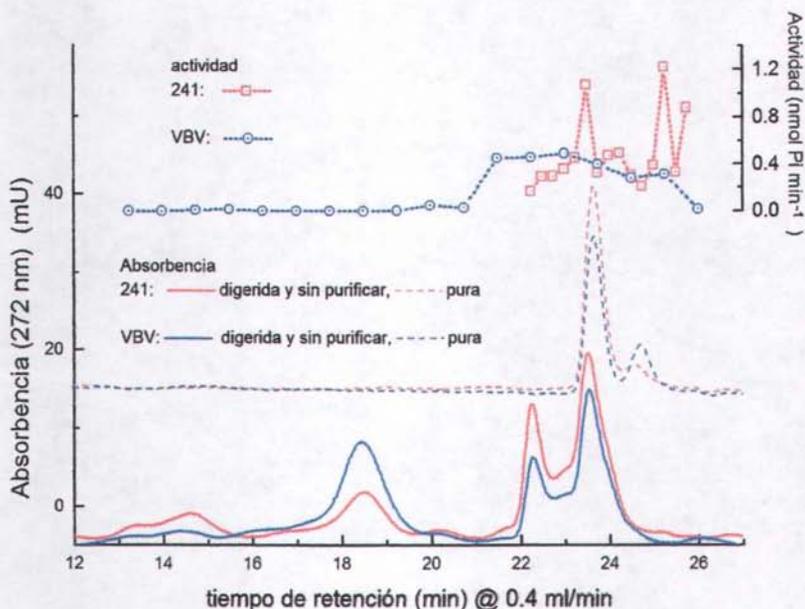


Figura 16. Perfil de elución de las proteínas VBVDG06 y 241114. Las muestras se inyectaron después de la digestión con trombina y antes o después de purificar la proteína recombinante. La separación se realizó en una columna de exclusión molecular de HPLC (SHODEX SB-803-HQ). El medio de elución fue Tris-HCl 0.05 M pH 7.5 con 0.1 M sulfato de amonio. La basal de las líneas correspondientes a la absorbancia de la proteína pura (.....,) fueron desplazadas verticalmente sobre la escala para facilitar la interpretación.

8.12 Datos de absorción y fluorescencia

Para cada una de las dos proteínas se analizaron los espectros de fluorescencia teniendo como resultado un solo pico de excitación para la proteína 241114 en 338 nm con un rendimiento cuántico máximo si es excitado a 285 nm, mientras que la proteína VBVDG06 presenta dos picos de excitación uno a 285 nm y otro a 239 nm siendo este último de un rendimiento cuántico de 1/5 con respecto al pico de 285 nm (Tabla 18). Mientras que los picos 285/338 se deben a la presencia de aminoácidos aromáticos ocultos al solvente, el pico de 239/285 se atribuye a un

sulfhidrido oculto (libre o como puente de disulfuro) que se encuentre en las cercanías de un aminoácido aromático (posiblemente un triptofano). A pesar de ello, las secuencias difieren en tan sólo una cisteína y una tirosina.

Tabla 18 . Longitudes de absorción y fluorescencia de las proteínas pr-241I14 y pr-VBVDG06.

Clona	λ máx nm		(UF)
	Excitación	Emisión	I Relativa
241I14	285	338	13.5
VBVDG06	239	336	2.9
	285	336	15.4

8.13 Inmunodetección e identificación de picos de elusión en extractos de frijol ante deficiencia o suficiencia de fosfato.

Como se esperaba que la actividad de pirofosfatasa estuviese relacionada con el estado de nutrición con fósforo, se obtuvieron extractos de raíz de frijol. Estos se fraccionaron en una columna de fenil sepharosa, tal como se describe en materiales y métodos (*cf*r.7.2.3). Las fracciones colectadas fueron analizadas determinando actividad de pirofosfatasa dependiente de magnesio y su respuesta inmunoreactiva frente a los anticuerpos desarrollados contra cada una de las proteínas recombinantes pr-VBVDG06 y pr-241I14 puras. Para ello, se emplearon los antisueros a una dilución de 1:5000 y 1:10000, respectivamente. Dicha dilución fue elegida luego de una titulación.

En la figura 17 se muestran señales de reconocimiento de extractos de raíces de plántulas de frijol crecidas por tres semanas bajo suficiencia 10 μ M o deficiencia de fosfato. Unidos a la actividad de pirofosfatasa generada por los mismos extractos bajo la técnica antes reportada. En esta imagen podemos ver de forma preliminar, que los anticuerpos generados a partir de las proteínas recombinantes 241I14 y VBVDG06 de *A.Thaliana*, reconocen señales en extractos de

raíces de frijol mostrando diferencias notables en la fracción 4 de las plantas tratadas en suficiencia o deficiencia de fósforo. Estas señales no coinciden con los picos de actividad, lo que indica que no necesariamente las proteínas eluidas en los puntos de mayor actividad deben ser reconocidos por los anticuerpos generados. De esta manera, las proteínas eluidas en los puntos 4, 10 y 11 (Fig. 17) seguramente presentan mayor homología con las proteínas de las cuales fueron generados los anticuerpos. Este resultado nos invita a generar nuevas estrategias que nos permitan estudiar con mayor profundidad estas proteínas.

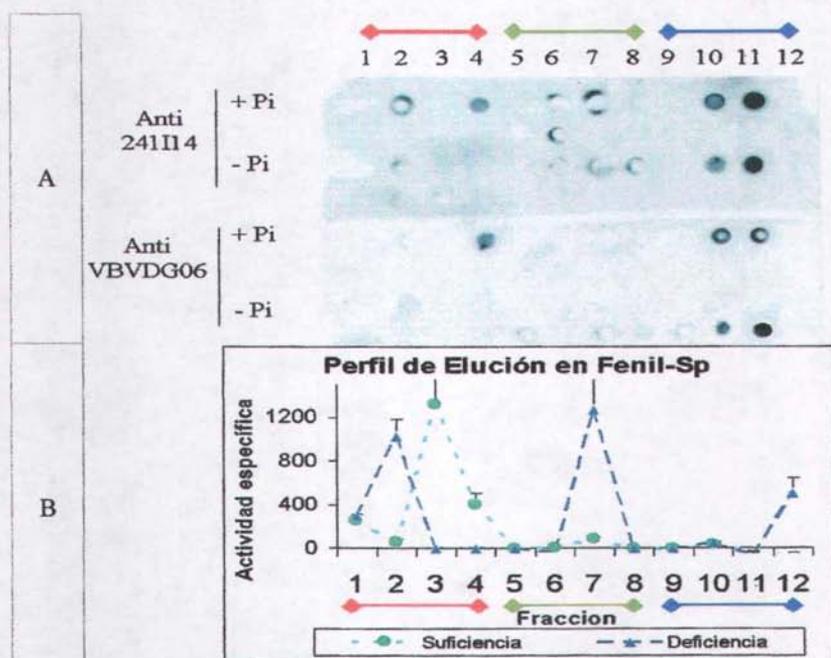


Figura 17. Fraccionamiento de extractos proteicos de raíces de plántulas de frijol crecidas en suficiencia $10\mu\text{M}$ (●), o deficiencia (▲) de fósforo en fenil-sefariosa con Tris 0.1 M pH 7.5 , EDTA 0.5 mM y MgCl_2 3 mM , suplementado con 0.5 M NaCl (◄◄), sin suplementos (◄◄), o con 50% etilenglicol (◄◄). A) Inmunodetección con anticuerpos Anti-241114 y Anti-VBVDG06 de la proteína aplicada a papel de nitrocelulosa (DotBlot). B) Actividad específica de pirofosfatasa de las mismas fracciones.

9. DISCUSIÓN.

Los dos c-ADN analizados en este trabajo presentan gran semejanza entre ellos, especialmente a nivel de la secuencia de aminoácidos para la que codifican (Fig. 5). No es sorprendente que ambas sean proteínas con características semejantes, *i.e.* poseen actividad de pirofosfatasa, con alta especificidad hacia pirofosfato (Tabla, 17) y, a las concentraciones probadas, magnesio es un activador esencial que no es reemplazado por ningún otro de los cationes divalentes probados, excepto quizá manganeso, aunque la actividad fue cercana al límite de detección y es poco probable que sea relevante, desde el punto de vista fisiológico (Fig. 14). Se trata además de proteínas cuyos monómeros pesan cerca de los 25 Kda, característica que las relaciona a las pirofosfatasas de levadura y *E. Coli* (Cooperman et al., 1992).

Sin embargo, a pesar de la semejanza entre ellas, las proteínas recombinantes aquí estudiadas muestran diferencias en su afinidad por el magnesio y por el sustrato. La proteína pr-VBVDG06 mostró un débil pico de fluorescencia a 336nm, con excitación a 239 nm que posiblemente se deba a la existencia de un sulfhidrilo o un puente de disulfuro que se encuentra a corta distancia de algún residuo aromático (muy posiblemente un triptofano). Puesto que la composición de las proteínas es muy semejante, esta diferencia podría ser atribuible a la presencia de una cisteína más y/o una tirosina adicional en la proteína pr-VBVDG06, (Cys 55 y/o Tyr 12) ambas hacia el extremo amino de la secuencia (Fig. 5, pag.51; y Tabla 14, pag. 52). Alternativamente, podría tratarse de una diferencia en el plegamiento, a nivel de la estructura terciaria entre ambas proteínas. Además de una cinética compleja, que muestra una inhibición por exceso de sustrato (Fig.15), lo que las distingue de las pirofosfatasas de levadura y de *E coli*. Este fenómeno

tampoco ha sido reportado en preparaciones obtenidas directamente de la planta, lo que nos lleva a considerar tres posibilidades:

- i) Las diferencias en el extremo amino pueden ser indicativas de una localización intracelular diferente, si bien el análisis de secuencias no aportó indicios claros, una de las proteínas podría ser mitocondrial y su extremo amino podría ser procesado (*cf.* 8.1). Es posible que el comportamiento cinético de las proteínas no procesadas sea diferente.
- ii) Se trata de proteínas que se regulan o requieren de algún otro tipo de modificación postraduccional que no ocurre en el sistema recombinante, o bien, la expresión como proteínas de fusión lleva a un plegamiento estable, pero ligeramente diferente del que se observa *in planta*.
- iii) Las proteínas presentan este comportamiento porque está relacionado con un mecanismo regulatorio de su actividad que no ha sido explorado.

Al respecto cabe mencionar que muchos de los estudios hechos en las pirofosfatasa de plantas se realizaron en preparaciones purificadas directamente del tejido vegetal, desafortunadamente, se trata de proteínas de baja abundancia y cuya medida de actividad sufre interferencia por la presencia de fosfatasa, lo que complica los estudios. Por otro lado, los estudios realizados con enzimas de plantas no han sido exhaustivos en el análisis de las especies químicas que se forman en solución, lo que dificulta la comparación. Finalmente, la presencia de varias isoenzimas de peso molecular semejante abre la posibilidad de que las preparaciones purificadas directamente de la planta fuesen mezclas de varias isoenzimas.

En relación con lo anterior, el fraccionamiento de los extractos de frijol en fenil sefarosa permitió revelar varias proteínas inmunoreactivas con los antisueros generados frente a las proteínas 241I14 y VBVDG06 expresadas y en esas mismas fracciones, se detectó actividad de pirofosfatasa dependientes de magnesio (Fig. 17). Lo que confirma que el genoma de *A. thaliana* posee múltiples isoformas de pirofosfatasa inmunológicamente relacionadas y varias de ellas se

expresan simultáneamente en un mismo tejido. Así, aunque desconocemos su localización intracelular y su papel metabólico concreto, resultan de gran interés los cambios en los niveles de actividad de los diferentes picos en relación con la deficiencia de fósforo, de entre los que resalta la completa desaparición de inmunoreactividad en la fracción 4 (Fig. 17.). Tales cambios son difíciles de interpretar en detalle por el momento dado que ignoramos la localización y características de cada isoforma, pero refleja la relevancia de estas actividades en la respuesta a la deficiencia de fósforo.

Por otro lado, un aspecto en el que también difieren de las enzimas de bacterias y levaduras es el estado de asociación en columnas de filtración. Las proteínas purificadas y digeridas con trombina, eluyen con un pico principal de proteínas, en el también aparece la actividad, pero se observa cierta actividad en un peso molecular que no corresponde al monómero (aunque ahí no se detecta la proteína, posiblemente por su baja concentración). Este resultado indica que las proteínas aquí estudiadas pueden ser activas como monómeros y, quizá también, como dímeros (Fig. 16) . La enzima de bacterias es un hexámero de subunidades idénticas (Cooperman *et al.*, 1992) en tanto que la de levaduras es un dímero (Cooperman *et al.*, 1992) en estos últimos dos casos las formas disociadas son inactivas.

Una confirmación de su actividad en formas monoméricas viene del hecho de que las proteínas de fusión presentan una actividad semejante a la de las formas digeridas, en este caso, la presencia del dominio de GST en la proteína dificultaría la asociación para la formación de dímeros y la actividad de esta forma debería ser menor a la de la forma digerida, lo que no se observó (Tablas, 16 y 17)

10. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las dos proteínas recombinantes 241I14 y VBVDG06 muestran ser pirofosfatasa, clásicas en el sentido de que su sustrato único es pirofosfato y su actividad se manifiesta sólo en presencia de Mg^{2+} . Pese a su semejanza a nivel enzimático y molecular (79 % de similitud en su secuencia) muestran cinéticas de saturación diferentes entre sí, que invitan a caracterizarlas de una forma más exhaustiva. Por otra parte, se obtuvieron anticuerpos anti-241I14 y anti-VBVDG06 con títulos de 1/ 5000 y 1/ 10000 respectivamente, con ellos fueron detectados cambios importantes en la presencia de ciertas isoformas de las pirofosfatasa en plantas de frijol sometidas a deficiencia o suficiencia de fósforo, lo que sugiere una estrecha relación entre la presencia de algunas de estas isoformas y la adaptación de la planta a la deficiencia.

De estas diferencias resulta de gran interés identificar a la proteína de la fracción 4 (Fig. 17) y determinar sus características cinéticas, regulatorias y su localización intracelular.

Finalmente, se han logrado generar las herramientas moleculares para realizar una caracterización más detallada de las pirofosfatasa en su respuesta a la deficiencia de fósforo en plantas.

11. REFERENCIAS.

- Amersham Biosciences Corp.** 800 Centennial Avenue PO Box 1327. Piscataway, NJ 08855 USA.
- Bariola PA, Howard Cj, Taylor CP, Verburg MT, Jaglan VD, Green PJ. (1994)**, The *Arabidopsis* ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J.* 6:673-85.
- Baykov AA, Braga EA, Avaeva SM. (1972)**, A Kinetic studio of activation of yeast inorganic pyrophosphatase by magnesium. *FEBS Letters* 21:1 80-82.
- Burleigh SH, Harrison MJ.(1997)**, A novel gene whose expression in *Medicago truncatula* roots is suppressed in response to colonization by vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi and to phosphate nutrition. *Plant Mol. Biol.* 34 :199-208.
- Coello, C. P. (2001)**, "Respuesta de las plantas a la deficiencia de Fosfato" Avances en Bioquímica y Biología Molecular de plantas. Depto de bioquímica . Facultad de Química.UNAM. Pp: 43-54
- Cori G.T., Ochoa S., Slein M.W., Cori C.F.** The Metabolism of Fructose in Liver . Isolation of Fructose-1-phosphate and Inorganic Pyrophosphate. *Biochim Biophys Acta* 1951; 7:304-317.
- Carswell, M.C.; Grant, B.R.; Plaxton, W.C. (1997)**, "Disruption of phosphate-starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate". *Planta* 203:67-74.
- Cooperman BS, Baykov AA Lahti R (1992)** Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. *Trends Biochem Sci* 1992 Jul;17(7):262-6. Review.
- Dancer, J.; Veith, R.; Feil, R.; Komor, E.; Stitt, M. (1990)**, "Independent Changes of Inorganic Pyrophosphate and the ATP/ADP or UTP/UDP ratios in planta cell suspension cultures". *Plant Sci.* 66: 59-63.
- Dinkelaker B, Hengeler C, Marschner H. (1995)**, "Distribution and function of proteoid roots and other root clusters". *Bot. Acta* 108:183-200

- Duff, S.M.G.; Muorhead, G.B.G.; Lefebure, D.D.; Plaxton, W.C.(1989)**, "Phosphate starvation inducible "by Pases" of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells". *Plant Physiol.* 90:1275-1278.
- Essigmann, B.; Ler, S.G.; Narang, R.A.; Linke, D.; Benning, C. (1998)**, "Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1950-1955.
- Farré EM, Geigenberger P, Willmitzer L, Trethewey N. (2000)**, A possible role for pyrophosphate in the coordination of cytosolic and plastidial carbon metabolism within the potato tuber. *Plant Physiol* 123: 681-688.
- Galicia Vázquez Gabriela. (2005)** Obtención y caracterización de un cDNA que se induce por deficiencia de fosfato en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*). Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Gavito M E and Miller M H. (1998)**, "Early phosphorus nutrition, mycorrhizae development, dry matter partitioning and yield of maize". *Plant Soil* 199, 177-186.
- Green P.J. (1994)**, The ribonucleases of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 421-45
- Grossman A, H Takahashi. (2001)**, Macronutrient utilization by photosynthetic eukariotes and the fabric of interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001. 52: 163-210.
- Grotz N y Guerinot ML .(2002)**, Limiting nutrients an old problem with new solutions? *Plant Biology.* 5: 158- 163.
- Haran S, Logendra S, Seskar m, Bretanova M, Raskin I. (2000)**, Characterization of *Arabidopsis* acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expresion. *Plant Physiol.* 124: 615-626.
- Heinonen, J.K. (2001)**, "The Biological Role of Inorganic Pyrophosphate." Kluwer Academic Publishers. Boston, U.S.A. pp. 10-13.
- Horst, W J, Kamh M, Jibrin J M, Chude V O (2001)**, "Agronomic measures for increasing P availability to crops" *Plant and Soil* 237: 211-223.
- Invitrogen Corporation.** 1600 Faraday Ave Carlsbad, CA 92008 USA.
- Jackson RB, Manwaring JH, Caldwell MM. (1990)**, "Rapid physiological adjustment of roots to localized soil enrichment". *Nature* 344:58-60;

- Junk, A., Seeling, B., Gerke, J.(1993)**, Mobilization of different phosphate fractions in rhizosphere. *Plant Soil*, 155/156 :91-94
- Kochian Leo V. (2000)**, Molecular physiology of mineral nutrient acquisition, transport and utilization. In: *Biochemistry and Molecular Biology of plants*, (B. Buchanan. W. Gruissem and R. Jones, eds.) pag 1223, cap 23. American Society of Plant Biologists. Bethesda, MD, USA 2000.
- Kornberg A., Rao N.N ., Ault Riche P.(1999)**, Inorganic Polyphosphate: A molecule of many functions. *Annu Rev Biochem*; 68:89-125
- Koyama H, Kawamura A,Kihara T, Hara T,Takita E, Shibata D. (2000)**, Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. *Plant cell Physiol* 41:1030-1037.
- Kuhn Nicholas J., Ward Simon. (1998)**, Purification, properties and multiple forms of a Manganese activated Inorganic Pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*.. *Archives of Bioch and biophy*; 354 : 1; 47-56.
- Lara, A; Chávez. R; Domínguez. E; Rodríguez.R. (2001)**, “Partición del carbono en las semillas de cereales durante la fase de llenado” *Avances en Bioquímica y Biología Molecular de plantas*. Depto de Bioquímica . Facultad de Química UNAM. Pp.147-164.
- Liu C, Muchhal US, Raghothama KG. (1997)**, Differential expression of TPSII, a phosphate starvation-induced gene in tomato. *Plant Mol. Biol.* 33:867-74.
- Lynch. Jonathan. (1998)**, “The role of nutrient-efficient crops in modern agriculture”. *J. Crop Production* 1, 241–264.
- Lynch Jonathan.(1995)**, Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol.* 109: 7-13
- Ma Z, Walk TC, Marcus A, Lynch JP. (2001)**, Morphological synergism in root hair length, density, initiation and geometry acquisition in *Arabidopsis thaliana*: a moleing approach. *Plant Soil* 236, 221-235.
- Maddison,A. (1988)**, ¿Se ha descuidado a la agricultura?: Progreso y política económica en los países en vías de desarrollo, V:128-162.
- Maeshima. M (2000)**, “Vacuolar H⁺ pyrophosphatase”. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 37-51
- Maeshima M., Nakanishi Y., Matsuura-Endo C.(1996)**, Proton pumps of the vacuolar membrana in growing plants cells. *J plant Res*; 109: 119-25

- Marshner H. (1995)**, Mineral nutrition in higher plants.. 2ed Academic press London.
- Malboobi MA, Lefebvre DD. (1997)**, A phosphate-starvation inducible β -glucosidase gene (psr 3.2) isolate from *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct subfamily of the BGA family. *Plant Mol. Biol.* 34:57-68.
- Miranda, C. S. (1991)**, Evolución de *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus coccineus*: Engleman H. Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México, Colegio de posgraduados, IEICA, Chapingo, México, 83-99.
- Mitsuda N, Enami K, Nakata M, Takeyasu K, Sato MH. (2001)**, Novel type *Arabidopsis thaliana* H⁺-PPase is localized to the Golgi apparatus. *FEBS Lett*; 488:29–33.
- Oshima Y. (1982)**, Regulatory circuits for gene expression: the metabolism of galactose and phosphate. En: *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Metabolism and gene expression.* Strathern J, Jones EW, Broach JR (ed) CSHL Press. Pp 159-180.
- Plaxton, W.C. (1996)**, “The organization and regulation of plant glycolysis”. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 47: 185-214.
- Raghothama, K. G. (1999)**, “Phosphate Acquisition”. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:665–93
- Raghothama K G.(2000)**, Phosphate transport and signaling. *Current opinion in plant biology.* 3:182-187.
- Rivera Sánchez Juan Carlos. (2004)**, Movilización de fosfato y recambio de RNA en la germinación de frijoles sensibles y tolerantes a deficiencia de fosfato. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Rodríguez Sotres Rogelio. (1990)**, Características cinéticas y moleculares de la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa en relación con la regulación de su actividad *In vivo* en hoja de maíz. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. UNAM.
- Rycher A.M.; Randall D.D. (1994)**, “The effect of phosphate deficiency on carbohydrate metabolism in bean roots.” *Physiol. Plantarum* 91:383-388.
- SAGARPA. (Mayo 2004)** Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Mexico D.F 2004
<http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/tematicos/mediano/med.Y>
http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comrecre.html

- Sambrook, J; Fritsch .E.F; Maniatis. T. (1989)**, "Molecular Cloning A laboratory Manual" 2nd Ed pp.1.85
- Selosse Marc-André, Baudoin Ezékiel, Vanderkoornhuysse Philippe (2004)**. Symbiotic microorganisms a key for ecological success and protection for plants. C. R. Biologies 327:7 639-648
- Sivula A Salminen., Parfenyev Alexey N , Pekka Pohjanjoki. (1999)**, Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase. FEBS Letters 454 (1999) 75-80 USDA, 2000
- Smith, K. P.; Krohn, I. H.; Hermanson, T. G.(1985)**, " Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150: 776-85.
- Smith Frank W. (2000)**, The phosphate uptake mechanism. Plant and soil. 245: 105-114.
- TAIR. (Arabidopsis Information Resource)**. . Carnegie Institution of Washington Dept. of Plant Biology 260, Panama Stanford, CA 94305 USA www.arabidopsis.org
- TargetP. Center for Biological Sequence Analysis BioCentrum DTU. Technical University of Denmark Kemitorvet, Buildin 208 DK 2800 Lyngby Denmark. www.cbs.dtu.dk**
- Theodorou ME, Plaxton WC. (1993)**, Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. Plant Physiol 101:339-344.
- Tovar-Méndez Alejandro, Muños Clares Rosario A. (2001)** Kinetics of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays* leaves at high concentration of substrate. Biochimica et Biophysica Acta 1546:1, 242-252.
- Voet D, Voet JG, Pratt. (1999)**, Introduction to metabolism In: Fundamentals of Biochemistry pag 361-365 cap 13. John Wiley and Sons, Inc USA.
- Weiner H., Stitt M., Heldt H.W.(1987)**, Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves . Biochim Biophys Acta; 893: 13-21.
- Zor Tsaffrir and Seelinger Zvi. (1996)**, Linearización of Bradford Protein Assay Increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. Anal.Biochem. 236: 302-308.