



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE ALGUNAS
ISOENZIMAS DE PIROFOSFATASA EN PLANTAS**

T E S I S
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS PRESENTA**

Q.A ERNESTO NAVARRO DE LA SANCHA



México D.F.
Ciudad Universitaria, Noviembre 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Esta tesis ha sido realizada en el laboratorio 115 del departamento de bioquímica de la facultad de química de la UNAM. Bajo la dirección tutorial del Doctor Rogelio Rodríguez Sotres. El comité tutorial estuvo conformado por los doctores:

Dr. Alejandro Sosa Peinado

Dra. Marta Patricia Coello Coutiño

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

El jurado de examen para la obtención de grado estuvo constituido por:

PRESIDENTE

Dr. Mario Rocha Sosa

VOCAL

Dra. Sonia Vázquez Santana

SECRETEARIO

Dr. Alejandro Sosa Peinado

SUPLENTE

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

SUPLENTE

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Durante el desarrollo de este proyecto gocé de una beca económica otorgada por el Concejo Nacional de Ciencia y la Tecnología (CONACYT), a través del presupuesto otorgado al proyecto de investigación número 43896.

Con todo mi amor, dedico este trabajo a mis queridos padres Elvia de la Sancha Sosa y Leonardo Leopoldo Navarro Sánchez, por ser el pilar de mi ser, mi máximo orgullo y el motivo de mi superación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios la bendición vivir y gozar de salud. De haber tenido la fortuna de crecer acompañado de mi familia y por darme la oportunidad de disfrutar de ellos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que me ha formado como profesionista y me ha brindado la oportunidad de formar parte de su comunidad.

A mis padres, por brindarme siempre su apoyo y cariño infinito. Gracias papá, por haber sido ese gran hombre y gran padre que fuiste, siempre estas en mi mente y corazón, algún día estaremos juntos otra vez.

A mis hermanos Nayeli, Miguel Angel y Leopoldo, así como a mis tías Emma y Violeta que siempre me han apoyado de manera incondicional en todas mis decisiones y me han dado todo a manos llenas. Muchas gracias, los amo.

A Jesús Flores que además de ser un gran amigo, es un hermano más para mí.

Infinitas gracias al Doctor Rogelio Rodríguez Sotres por compartir conmigo parte de su sabiduría, es usted un gran tutor, un excelente amigo y gran ser humano. Mi admiración, cariño y respeto por usted.

A las doctoras Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Sonia Vázquez Santana y Sobeida Sánchez Nieto por su tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, pero principalmente por todas sus sugerencias realizadas a favor del mejoramiento de este. Muchas gracias.

A los doctores Mario Rocha Sosa y Alejandro Sosa Peinado por sus sabios consejos y recomendaciones emitidas durante la revisión de este trabajo.

A la M en C. María Teresa de Jesús Olvera, así como a la doctora Sonia Vázquez Santana, responsables del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la facultad de química y laboratorio de desarrollo de plantas de la facultad de ciencias respectivamente, por todas las facilidades brindadas durante el desarrollo experimental de este trabajo. Mil gracias!

A la Bióloga María de Jesús Jiménez Villalobos por el gran apoyo que me brindó en las técnicas de cultivo de tejidos y transformación por biobalística. Mary, muchas gracias! Aprecio mucho tu amistad.

A la M en C. Karina Jiménez Durán por brindarme su amistad y apoyo en las técnicas histológicas empleadas en este trabajo. Muchas gracias Karina!

A la M en C. Lilián Valencia Turcotte, por la gran ayuda que me brindo en todo momento. Por sus sabias recomendaciones y sugerencias. Muchas gracias Lilian!

A mis grandes amigos la M en C. Isabel Rivero así como los doctores Martín Gonzalez y Mario Figeroa, solo me resta decirles imuchas gracias por todo el apoyo que me han dado! Un placer tener su amistad.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 115, las M en C. Lilián Valencia y Beatríz King, el M en C. Eric Edmundo Hernández, el doctor Eneas Alejandro Chavelas, la Q. Xiomara Quezada, los QFB's L Ramón Perales y Fernando Rodríguez, el M en C Félix y el Biólogo Alonso Zabaleta. Con mi mas sincero cariño y aprecio por todos ustedes, mil gracias.

A todos mis amigos y amigas de los demás laboratorios del conjunto "E", a todos ellos, muchas gracias. Jamás olvidaré los grandes momentos vividos con ustedes.

A una gran persona, que nos apoya en todo momento y toma nuestros problemas como suyos buscando la mejor de las soluciones.... A ti, Lety García mil gracias! Todos los alumnos del posgrado te queremos, apreciamos y valoramos tu trabajo.

Índice de contenido

Tabla de abreviaturas.....	5
1 RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
2 INTRODUCCIÓN.....	11
3 ANTECEDENTES.....	14
Nutrición de las plantas.....	14
Importancia del PPI.....	15
Pirofosfatasas inorgánicas.....	17
Complejos de pirofosfato.....	19
PPIasas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
5 HIPÓTESIS.....	29
6 OBJETIVO.....	29
6.1 Objetivos particulares.....	29
7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	31
8 MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
Material biológico.....	33
Extracción y purificación de los plásmidos.....	33
Diseño de oligonucleótidos cebadores.....	34
PCR con Pfu polimerasa.....	34
Sistema de clonación TOPO®.....	35
Transformación de bacterias competentes One Shot TOP 10®.....	36
Selección de bacterias transformadas.....	36
Sistema de recombinación al vector pEarley Gate 101, 102 ó 103.....	36
Electroforesis de ácidos nucleicos.....	37
Purificación del DNA en gel.....	38
Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE).....	39
Medición de actividad de pirofosfatasas.....	39
Determinación de la concentración de proteína.....	40
Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40
Transformación genética transitoria por biobalística.....	41
Inclusión de muestras en paraplant™.....	42
Tinción celular con colorante fluorescente de Calcofluor.....	43
Extracción de RNA total.....	43
Selección de plantas transformantes.....	44
Microscopía confocal.....	45
9 RESULTADOS.....	46
Clonación en fase al vector pENTRTM/D-TOPO®.....	47
Recombinación al sistema pEarley Gate serie 100.....	48
Predicción de localización subcelular in silico de las diferentes isoformas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	52

Expresión de AtPPasas etiquetadas con GFP, YFP o CFP en plantas.	53
Localización intracelular de las diferentes isoformas de <i>Arabidopsis thaliana</i> in vivo.....	55
Fluorescencia intrínseca de las células vegetales	55
AtPPa 1.....	58
Atppa 2 y AtPPa 3.....	62
AtPPa 4 y AtPPa 5.....	65
Purificación y caracterización de isoformas de PPasas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en bacterias.	70
Purificación y caracterización de la actividad enzimática de la isoforma AtPPa 3.....	72
10 DISCUSIÓN.....	79
11 CONCLUSIONES.....	82
12 REFERENCIAS.....	83

1 RESUMEN

A nivel celular, diversas reacciones anabólicas generan como subproducto pirofosfato inorgánico (PPi), las enzimas encargadas de hidrolizar este compuesto son llamadas Pirofosfatasas inorgánica (PPiasas). En la naturaleza se ha reportado la presencia de superfamilias de PPiasas; las solubles (sPPiasa) y aquellas insertadas en membrana y que acoplan la hidrólisis del pirofosfato a la translocación de protones (H-PPiasa).

El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica para seis diferentes isoformas de sPPiasa (AtPPa 1, AtPPa 2, AtPPa 3, AtPPa 4, AtPPa 5 y AtPPa 6) cinco de ellas presentan una similitud de secuencia igual o superior al 66%. En un trabajo previo la AtPPa 1 y AtPPa 4 fueron caracterizadas a nivel de su actividad. Diversos estudios sugieren que las sPPiasas están presentes en diversos tipos de plastidios y ausentes o muy poco abundantes en citosol, por lo que el PPi generado a nivel citosólico podría ser removido por la enzima vacuolar. Sin embargo, el análisis de las secuencias de las isoformas de *Arabidopsis* sugiere que varias de ellas podrían ser citosólicas, una podría presentar una localización ambigua en mitocondria o citoplasma y una más podría ser de cloroplasto.

En este trabajo, se clonaron cada una de las isoformas de sPPiasas de *Arabidopsis thaliana* (AtPPa) en plásmidos apropiados que permitieron fusionar en fase en su extremo C terminal alguna de las proteínas fluorescentes (YFP, CFP o GFP). Sin embargo, sólo fue posible expresar y localizar eficientemente cinco de ellas, ya que la AtPPa 6, posiblemente cloroplástica, no se expresaba a niveles suficientes. Los resultados generados muestran evidencias de localización citosólica de varias de las isoformas, aunque la AtPPa 1 es localizada también en núcleo, mientras que la AtPPa 4 y AtPPa 5 están particuladas y con la posibilidad de localizarse en mitocondrias.

Por otro lado, mediante su expresión en sistemas bacterianos se confirmó que las isoformas de AtPPa 2, AtPPa 3, AtPPa 5 y AtPPa 6, son también pirofosfatasas activas, pero debido a la carencia de estabilidad, sólo la isoforma AtPPa 3 pudo ser caracterizada. Sus propiedades nos permitieron clasificarla como una auténtica pirofosfatasa perteneciente a la familia I, del tipo monomérico, cuya presencia ha sido reportada sólo en plantas y en algas fotosintéticas.

Finalmente, lo encontrado en este estudio, indica que la multiplicidad de genes de sPPiase en *Arabidopsis thaliana* no es resultado de simple redundancia genética, sino que varias isoformas poseen algún grado de subfuncionalización, comenzando por su distribución intracelular.

ABSTRACT

A number of metabolic reactions generate inorganic pyrophosphate (PPi) as a by-product. The enzymes in charge of its hydrolysis are called inorganic pyrophosphatases (PPIases). Two different superfamilies of PPIases have been found in nature, the soluble enzymes (sPPIases) and the membrane bound proton pumping pyrophosphatases.

The Arabidopsis genome possesses six different genes encoding sPPIases (AtPPa 1, AtPPa 2, AtPPa3, AtPPa 4, AtPPa 5 and AtPPa 6) five of them present sequence similarity above 66%. The activity of two of them (AtPPa 1 and AtPPa 4) were characterised in a previous work. Evidence from other laboratories place most of the sPPIase activity in the plastids, with little or no activity in the cytoplasm. Yet, five out of the six genes encode proteins whose sequences indicate a cytoplasmic localisation, and only in one case a possible mitochondrial signal peptide might be present.

In this work, the six sPPIase genes from Arabidopsis were cloned and expressed as fusion proteins with a fluorescent protein (GFP, YFP or CFP) at the C terminus. With the exception of the AtPPa 6 (probable chloroplastic isoform) the rest were expressed at high enough levels to allow their intracellular localisation. All of them were present in the cytoplasm, but some of them gave also a strong nuclear signal. In one of them, the signal was also present in particles resembling the mitochondria, though the data were not conclusive.

In addition, the isoforms AtPPa 2, AtPPa 3, AtPPa 5 and AtPPa 6 were expressed as recombinant proteins in bacterial systems. All them present Mg^{2+} -dependent PPIase activity, but due to their lack of stability, only the isoform 3 could be purified. Its properties allowed us to classify this protein as a true Mg^{2+} -dependent sPPIase of the family I, of the monomeric type. This type of enzymes has been found in plants and photosynthetic algae so far.

Finally, according to our data, the sPPIase gene multiplicity in the *Arabidopsis thaliana* genome is not the result of simple genetic redundancy, but the enzymes appear to have some functions of their own, as judged from their individual intracellular distribution patterns.

2 INTRODUCCIÓN

A partir del conocimiento del genoma completo de *Arabidopsis thaliana*, (The *Arabidopsis* genome initiative, 2000) el número de estudios relacionados a este organismo se ha incrementado considerablemente. El uso de esta planta como modelo de estudio ha permitido apreciar en detalle las diferencias genéticas entre el más simple de los vegetales y diversos organismos pertenecientes a otros grupos filogenéticos. Sus características singulares ofrecen una serie de ventajas que convierten a *A. thaliana* en un modelo de estudio útil como herramienta para la investigación de las plantas.

Según su contenido en la célula de plantas, los elementos se pueden agrupar como macronutrientes, incluyendo al Nitrógeno (N), Fósforo (P), Azufre (S) y al Potasio (K). Éstos deben ser tomados por la planta en las proporciones necesarias para permitirle cubrir sus necesidades; sin embargo, son el (P) y el Nitrógeno (N) los nutrientes que con mayor frecuencia limitan 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).

En los seres vivos, el fosfato inorgánico (Pi) es un componente estructural de diferentes moléculas de importancia biológica central, como lo son los ácidos nucleicos, nucleótidos fosforilados y fosfolípidos, entre muchos otros. Este elemento juega un papel crítico en el manejo y transferencia de energía, en la regulación de la actividad de muchas enzimas y proteínas, así como en diversas actividades celulares y metabólicas, incluyendo aquellas relacionadas con la regulación de la expresión genética (Theodorou y Plaxton, 1993).

Desafortunadamente, la concentración de Pi asimilable para las plantas en los suelos casi nunca supera 10^{-5} M, por lo que estos organismos han desarrollado estrategias para tomarlo de manera eficiente y habilidades fisiológicas para aprovechar de manera óptima la cantidad asimilada de este macronutriente (Junk *et al.*, 1993). Por un lado, existen diversos mecanismos de movilización de las diferentes formas de fósforo presentes en el suelo; por otro, aunque menos estudiado, se sabe de la presencia de 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, o ser recambiadas más rápidamente, para reducir su concentración de estado estacionario en las células (Rivera-Sánchez, 2004).

El pirofosfato inorgánico (PPi) es un compuesto fosforilado producto de la condensación de dos moléculas de ortofosfato para dar un compuesto anhídrido ($O_3P-O-PO_3^{4-}$). Es además, un subproducto por excelencia de diversas reacciones anabólicas, por lo que su producción está estrechamente relacionada con el crecimiento de los seres vivos (Lara *et al.*, 2001). Se le considera también, como una fuente de energía autónoma en las plantas, actuando como una alternativa al ATP (Dancer, 1990). Su hidrólisis procede con un $\Delta G'$ de -23.7 kJ/mol, bajo condiciones semejantes a las que prevalecen en el citoplasma de células de plantas y podría proponerse como candidato para reciclarse rápidamente bajo condiciones de limitación de fósforo. Por ello, el estudio de las pirofosfatasas inorgánicas (PPiase), enzimas encargadas de la hidrólisis del pirofosfato, se convierte en una línea de investigación propia de ser abordada en detalle.

Las PPiases están presentes en todos los seres vivos y son esenciales para la supervivencia de las células (Heinonen, 2001), hidrolizan el pirofosfato produciendo Pi libre (Figura 1) manteniendo el anabolismo celular. Son enzimas muy activas, con elevado número de recambio y gran afinidad por su sustrato, al grado de que las enzimas de *Escherichia coli* y de *Saccharomyces cereviceae* son consideradas catalizadores perfectos (Cooperman, 1982). Estas enzimas catalizan la hidrólisis de PPi a dos moléculas de Pi, en presencia de un catión divalente (Mg^{2+} o Mn^{2+} ;) favoreciendo el equilibrio termodinámico de muchas reacciones biosintéticas (Kornbers, 1962).

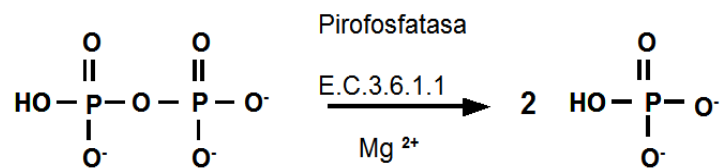


Figura 1. Reacción de hidrólisis catalizada por las pirofosfatasas inorgánicas solubles.

En contraste con las dos isoenzimas que se han identificado en el genoma de la *Saccharomyce cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* contiene en su genoma seis diferentes genes de pirofosfatasas inorgánicas solubles (AtPPa 1, AtPPa 2, AtPPa 3, AtPPa 4, AtPPa 5 y AtPPa 6), con una similitud promedio entre ellas de casi 79%. Se sabe que los mensajeros de al menos cinco de ellas se expresan abundantemente en casi todos los tejidos a cualquier edad de la planta (Navarro *et al.*, 2007), y a pesar ello, la concentración de pirofosfato en el citoplasma de las células vegetales es elevada (Weiner *et al.*, 1987) y tiende a permanecer relativamente constante (Dancer *et al.*, 1990) y (Farré *et al.*, 2000). Hay pocos estudios sobre mecanismos de regulación de su actividad, aunque se ha reportado que en algunos vegetales, ciertas isoformas específicas de polen pueden ser inactivadas por fosforilación (De Graaf *et al.*, 2006). Por otro lado, la actividad extraíble de pirofosfatasas suele ser elevada en los tejidos vegetales (Kumar y Singh, 1983; Navarro *et al.*, 2007).

Por ello, en este proyecto nos enfocamos a estudiar los diferentes genes de pirofosfatasas inorgánicas de *Arabidopsis thaliana* con el fin, de determinar la localización subcelular de varias de ellas y caracterizar un poco mejor a estas proteínas. Así como, relacionar la localización intracelular de las isoformas con la posible ventaja que pudiera darle a la planta. Para ello, nos apoyaremos de la tecnología de clonación molecular Gateway[®] cuya utilidad ha sido demostrada (Sasaki *et al.*, 2004). Esta tecnología aprovecha un tipo de recombinación sitio-específica adaptada a partir del bacteriófago lambda. Así mismo, existen plásmidos binarios que pueden introducirse en *Agrobacterium tumefaciens* y que poseen promotores y terminadores vegetales adecuados para expresar proteínas en células vegetales transformadas con ellos. Siendo así, buscamos generar las construcciones genéticas adecuadas que permitan la expresión de las diferentes AtPPasas fusionadas con al menos alguna proteína fluorescente, para poder ser observadas en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Y así, determinar la localización de estas proteínas en la célula, para aportar nueva información que ayude a entender el papel que juega cada isoenzima en la célula vegetal.

3 ANTECEDENTES

Nutrición de las plantas.

Desde hace ya algunas décadas el estudio de los macronutrientes de las plantas ha sido tema de interés, pues su abundancia en el suelo natural limita el crecimiento de las plantas y la productividad agrícola (Raghothama, 1999). Aunque la adición de fertilizantes a los suelos agrícolas se ha vuelto necesaria en la agricultura intensiva, 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, lo cual puede ocurrir gracias a la interacción simbiótica de algunas plantas con microorganismos fijadores de nitrógeno (Gadal, 1983). El fósforo es menos abundante en la corteza terrestre que el nitrógeno, pero es igualmente clave para la vida, ya que forma parte de diversas moléculas tales como los ácidos nucleicos, ATP, fosfolípidos, nucleótidos (FAD, FMN, NAD⁺, NADP⁺, etc) entre otros. Así mismo, el fosfato interviene en muchos mecanismos metabólicos, bioenergéticos y de regulación en las células, formando parte de intermediarios fosforilados y proteínas que se fosforilan reversiblemente (Voet *et al.*, 1999).

Desafortunadamente, no sólo su abundancia en la corteza terrestre es menor que la del nitrógeno, sino además, la asimilación de fósforo por las plantas está limitada a la toma de fosfato inorgánico, ya que mucho del fósforo en el suelo está en forma de sales insolubles (hidroxifosfatos de calcio, hierro y aluminio). También se encuentra en forma de materia orgánica, que si bien, no es directamente asimilable, sí puede ser convertida a fosfato inorgánico asimilable (Gavito y Miller, 1998). De esta manera, aunque la abundancia de fósforo en los minerales del suelo puede llegar a ser considerable, la abundancia de formas asimilables por las plantas son casi siempre limitantes para el crecimiento de las mismas (Coello-Coutiño, 2001).

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 (Raghothama, 1999), 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). En muchos casos, dichos mecanismos se acompañan de modificaciones estructurales en el sistema radicular para ampliar la superficie de contacto con el suelo y extender el volumen de sustrato explorado por las raíces (Jackson *et al.*, 1990; Dinkelaker *et al.*, 1995). Por otro lado, los mecanismos de adaptación metabólica capaces de mejorar la eficiencia del uso del fósforo en los organismos no han sido estudiados con suficiente detalle. La evidencia experimental sugiere que tales mecanismos se presentan de manera particular en diferentes plantas (Rivera-Sánchez, 2004), lo que puede explicar el porque unas plantas son tolerantes a la escasez de este mineral, mientras que otras plantas son incapaces de sobrevivir en tales condiciones.

Por otro lado, 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. En cualquier caso, si la poca disponibilidad de fósforo se prolonga, las reservas se agotarán y sólo aquellos vegetales capaces de inducir un conjunto óptimo de respuestas adaptativas a la deficiencia de fósforo resultarán ganadores de la batalla por la sobrevivencia y la perpetuación de la especie.

Importancia del PPI

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 rápida hidrólisis constituye una manera inmediata de mejorar la disponibilidad interna de fosfato inorgánico. La molécula de PPI fue descubierta a finales 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, carbohidratos poliméricos, proteínas etc. En las reacciones químicas, la constante de equilibrio (K') está relacionada con el cambio de energía libre estandar (ΔG°) de acuerdo a la ecuación $\Delta G^{\circ} = -RT \ln(K')$. Un signo positivo de ΔG° implica que la reacción es termodinámicamente desfavorable, resultado en que numerosos procesos biosintéticos se acoplan a la hidrólisis de nucleósidos trifosfato (NTP), los cuáles dirigen la reacción en la dirección de los productos por efecto de valores negativos en su ΔG° .

De acuerdo a Frey y Arabshasi (1995), la reacción:



$$\text{genera un } \Delta G^{0'} = -45.6 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}},$$

mientras que la reacción



$$\text{genera sólo un } \Delta G^{0'} = -32.6 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}.$$

Aunque estos valores son los calculados para las reacciones en condiciones estándar, se ha estimado que el $\Delta G'$ producido por la hidrólisis del PPi es de -17 kJ/mol bajo condiciones similares a las que prevalecen en células *in vivo* de mamíferos (Floodgard y Fleron, 1974), mientras que en condiciones semejantes a aquellas que prevalecen en el citoplasma de células de plantas, el $\Delta G'$ de la hidrólisis del PPi es de -23.7 KJ/mol. Lo que sugiere que el PPi está destinado a ser destruido para la reutilización del fosfato (Kornberg *et al.*, 1962).

Por otro lado, mientras que la concentración del PPi en células animales tiende a ser bastante baja; en el citoplasma de células vegetales, bacterianas y de levaduras los rangos de concentración oscilan entre los 200 a 300 μM (Weiner *et al.* 1987; Heinonen, 2001). Adicionalmente, las vacuolas y cloroplastos presentan una concentración de PPi de 2.2 μM y menos de 1 μM respectivamente, (Takeshige y Tazawa, 1989, Farre *et al.*, 2001) concentración comparable a la encontrada en células animales.

En virtud de lo anterior, llama la atención no sólo la elevada concentración de PPi en las plantas, sino su relativa estabilidad en ellas (Weiner 1987, Duff, *et al.*, 1989; Rycher y Randall, 1994, Carswell *et al.*, 1997), ya que incluso bajo condiciones de estrés diversas especies muestran una respuesta adaptativa que se acompaña de una disminución de las tasas de ATP/ADP o UTP/UDP, en tanto que los niveles de pirofosfato, se mantienen constantes (Duff *et al.*, 1989, Dancer *et al.*, 1990).

Diversas evidencias indican que su papel va más allá de ser un simple desecho del metabolismo (Dancer, 1990) sino que funciona como un regulador de diversas reacciones químicas, al inhibir o activar algunas enzimas, o servir como fuente alternativa de energía, ya que puede ser un sustituto del ATP para la fosforilación de fructosa-6-fosfato durante la glucólisis en el citoplasma de las plantas (Plaxton, 1996) o bien, sostener la acidificación de la vacuola a través de la PPiasea membranal (Maeshima, 2000).

Una de las interrogantes relativas al control de la concentración de PPi está precisamente en el desconocimiento de los mecanismos que determinan que la actividad de pirofosfatasa no consuma el PPi citoplásmico por completo, ya que no se ha reportado ningún mecanismo de control de la actividad de estas enzimas. Siendo que existen varias isoenzimas de sPPiasea en la planta, la comprensión del papel del PPi en el metabolismo vegetal hace necesario saber el nivel de expresión protéico, su ubicación intracelular y los mecanismos que pudieran contribuir al control de su actividad de cada una de ellas.

Pirofosfatasas inorgánicas

Como se ha mencionado, las enzimas responsables de la hidrólisis del pirofosfato son denominadas pirofosfatasas inorgánicas, estas catalizan la hidrólisis de pirofosfato, empleando Mg^{2+} o Mn^{2+} como cofactor y su sustrato es exclusivamente la forma inorgánica del pirofosfato, por el que poseen gran afinidad. En este sentido, hay que distinguirlas de las fosfatasas inespecíficas, que pueden liberar fosfato inorgánico a partir de ésteres orgánicos o anhídridos fosfóricos inorgánicos u orgánicos, así como de las diversas formas de pirofosfatasas orgánicas capaces de actuar sobre diversos compuestos orgánicos di o polifosforilados (Kole *et al*, 1976).

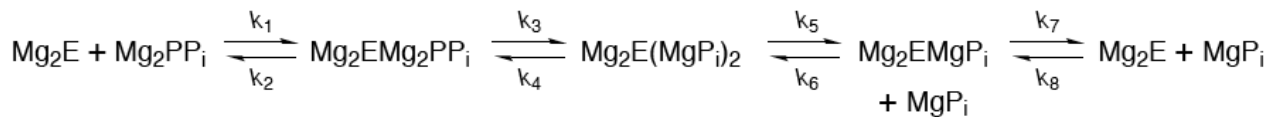
De acuerdo a sus características y forma de acción, las pirofosfatasas inorgánicas pueden dividirse en dos superfamilias. Una de ellas compuesta por las llamadas pirofosfatasas de protones, caracterizadas por ser proteínas membranales capaces de acoplar la hidrólisis de PPi a la generación de un gradiente electroquímico. Estas pirofosfatasas han sido encontradas en plantas y hongos (Maeshima *et al.*, 1996), bacterias fotosintéticas (García-Contreras *et al.*, 2004) y en algunos protozoarios parásitos (Drozdowicz *et al.*, 2002), pero no se han reportado en animales. En las plantas, se encuentran presentes en la membrana vacuolar (Maeshima *et al.*, 1996) y en el aparato de Golgi (Mitsuda, *et al.*, 2001).

Por otro lado, se conoce otra superfamilia denominada pirofosfatasas inorgánicas solubles (sPPiasa) compuesta por PPiasas solubles que, en función de sus requerimientos por el metal pueden a su vez dividirse en las familias I y II. La familia II está compuesta por aquellas sPPiasas capaces de emplear Mn^{2+} y/o Co^{2+} como cofactor catalítico, principalmente están distribuidas en bacterias como *Bacillus subtilis* y arqueas (Jun y Wuard, 1998). Recientemente, han adquirido relevancia debido a su presencia en algunos microorganismos patógenos como *Helicobacter pylori* (Romero et al., 2000). Sin embargo, hasta ahora no se ha reportado la presencia de este tipo de enzimas en organismos eucariontes. La familia I se caracteriza por poseer mayor distribución en la naturaleza, son dependientes de Mg^{2+} como cofactor y se encuentran de forma ubicua en células de plantas, animales y hongos, aunque también, están presentes en diversas bacterias. De entre estas enzimas, destacan las representantes de la levadura y la de *Escherichia coli*, que han sido extensamente estudiadas (Sivula, et al., 1999). Se les considera como los arquetipos de las isoformas de Eucariontes y de Procariontes, respectivamente, aunque este paradigma ha ido cambiando gradualmente (Navarro et al., 2007; Gómez-García, 2008). Son consideradas como catalizadores perfectos (Heikinheimo., et al. 2001) debido a su importante tasa catalítica acompañada de alta afinidad por el sustrato, considerado el complejo Mg-Pirofosfato (Cooperman 1982). Ambas enzimas se han agrupado en subfamilias independientes debido a que poseen una secuencia de aminoácidos diferente y a que su forma activa tiene diferente estructura cuaternaria (Sivula, 1999; Gómez-García et al., 2006). Las PPiasas de *Escherichia coli* y de levadura han sido reportadas como oligómeros de subunidades idénticas de alrededor de 24 y 30 KDa, respectivamente, siendo hexámeros en bacterias y dímeros en levaduras y en ambos casos, las formas disociadas son inactivas. (Cooperman et al.,1992).

Complejos de pirofosfato

Las pirofosfatasas de *E. coli* y de levaduras han sido extensamente caracterizadas. Se sabe por ejemplo que poseen gran afinidad por su sustrato, propuesto el complejo MgPPi (Avaeva, 1999), o bien, el complejo Mg_2PPi (Baykov *e t al.*, 1996), esto es; existen en la enzima sitios adicionales para la unión del metal divalente (Avaeva, 1999), de manera que en *E. coli* parecen requerirse 4 átomos de Mg^{2+} para completar la catálisis, en tanto que en la levadura la evidencia indica que con tres puede ser suficiente (Oksanen *et al.*, 2007). Sus requerimientos por el metal son bastante estrictos, ya que la catálisis promovida por Mn^{2+} , Zn^{2+} y otros cationes divalentes es de órdenes de magnitud inferior a la observada con Mg^{2+} (Avaeva, 1999). Su especificidad por el sustrato es notable, ya que la hidrólisis de tripolifosfato (Shafranskii,1977) y la de ésteres orgánicos de piro y polifosfato, como el ATP, es

extraordinariamente lenta (Schlesinger *et al.*, 1960; Melnik *et al.*, 1982).



Esquema 1. Mecanismo cinético mínimo para la hidrólisis de pirofosfato catalizado por la pirofosfatasa inorgánica de *Escherichia coli* (Baykov *et al.*, 1996).

Basados en el análisis de sus secuencias, se consideró por mucho tiempo que las sPPiasas de plantas tenían origen procariote y por lo tanto, su estructura era probablemente hexamérica (Sivula, 1999). Recientemente, se demostró que estas enzimas también pueden ser activas en su forma monomérica (Gómez *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2007) y que sus características cinéticas diferían de las encontradas para las enzimas de levadura y de bacterias. A pesar de estos avances, el conocimiento es limitado, ya que sólo tres de los seis isoenzimas de *Arabidopsis thaliana* han sido abordadas en estos trabajos (Shulze *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2007) y su caracterización dista de ser completa.

Algunas pirofosfatasa fueron purificadas de diferentes fuentes vegetales y caracterizadas parcialmente en los 70's y 80's. Los reportes indican que están presentes en diversos compartimentos celulares (Du Jardín *et al.*, 1995; Visser *et al.*, 1998). Su composición de subunidades, su masa molecular nativa, su especificidad y afinidades por los sustratos y sus requerimientos de cationes presentan gran diversidad (Bucke 1970; Kumar y Singh 1983; Maslowski *et al.*, 1997; Du Jardin *et al.*, 1995; Pewee y Hoo 1995; Visser *et al.*, 1998; Navarro *et al.*; 2007, Trejo, 2007). En microalgas de *Chlamydomonas reinhardtii* fueron aisladas dos PPiasas monoméricas procedentes de dos diferentes cDNAs, su localización intracelular fue reportada como una PPiasa cloroplástica de 30KDa y otra mitocondrial de 24 Kda, ambas miembros de la Familia I de las PPiasas (Gómez *et al.*, 2006).

PPiasas de *Arabidopsis thaliana*

En nuestro laboratorio se han caracterizado la AtPPa 1 y AtPPa 4, encontrando que los genes que las codifican presentan entre sí una similitud de 77 % en su secuencia de bases. Estas proteínas fueron clonadas, sobreexpresadas en *E. coli* y purificadas como proteínas de fusión a la glutation-S-transferasa. Cada proteína se purificó y se caracterizó cinética y molecularmente como proteína recombinante. Algunas características encontradas distinguen claramente a estas proteínas de otro tipo de proteínas con actividad de fosfatasa y de sus ortólogos bacterianas y fúngicas.

Ambas proteínas, tienen una alta especificidad hacia pirofosfato (Figura 1) y, a las concentraciones

probadas, magnesio es un activador esencial que no es reemplazado por otro catión divalente de los probados, excepto quizás manganeso, que aunque la actividad registrada fue significativamente inferior, puede tener alguna relevancia fisiológica. Se trata además de dos proteínas cuyos monómeros pesan cerca de los 25 KDa, lo que, junto con su secuencia de aminoácidos las relaciona a las pirofosfatasas de *E. coli* (Sivula *et al.*, 1999). Sin embargo, a pesar de la semejanza entre ellas, las proteínas de Arabidopsis reportadas en dicho estudio muestran diferencias en su afinidad por el magnesio y por el sustrato (Figura 2 y Tabla 1), con respecto a las encontradas en otros organismos (Cooperman *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 2007).

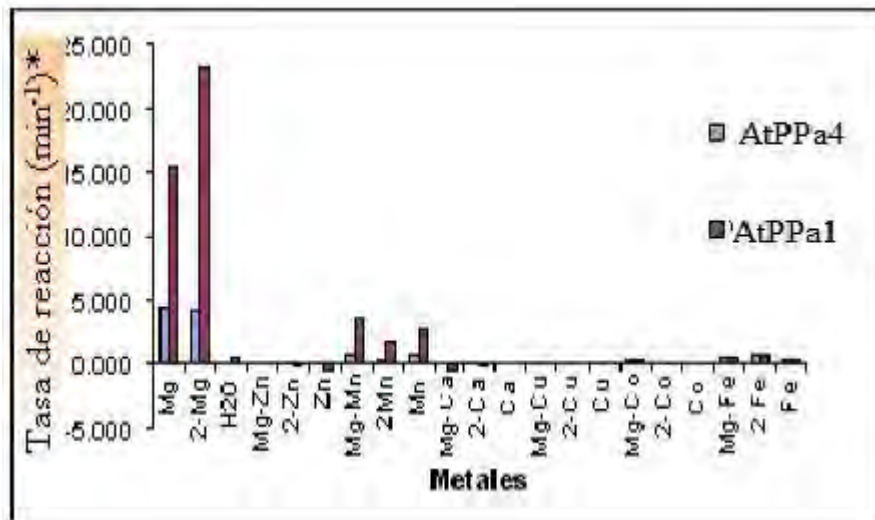


Figura 1. Actividad de hidrólisis de pirofosfato por las pirofosfatasas recombinantes puras (■)AtPPa1 y (■) AtPPa4, en ausencia o en presencia de varios cationes divalentes añadidos individualmente a una concentración de 1.5 mM (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+}), o 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^{2+} 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 (tomado de Navarro, 2005).

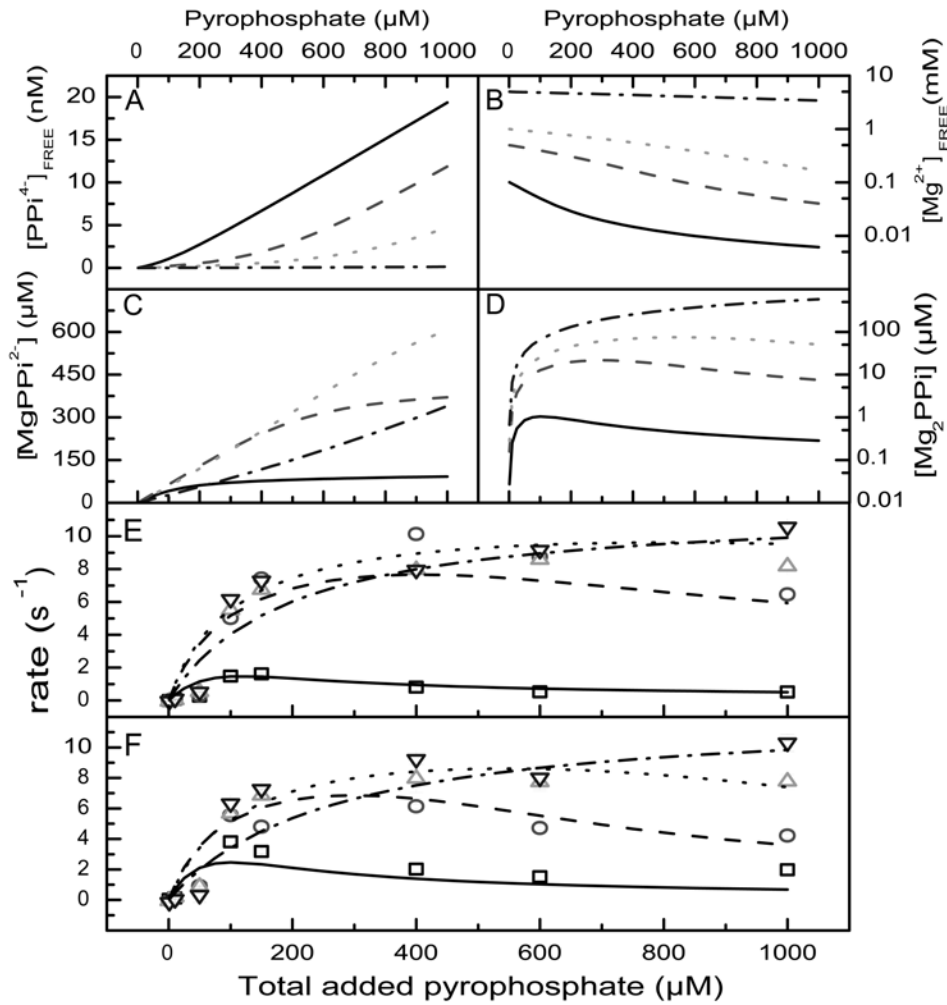


Figura 2 Respuesta de saturación de las proteínas recombinantes AtPPa4 (E) y AtPPa1 (F). (Figura tomada de Navarro *et al.*, 2007). La concentración de pirofosfato de sodio total (en la presencia de 0.1 mM de EDTA) se vario a cuatro niveles del total de magnesio (0.2 □, 0.6 ○, 1.1Δ y 5.1 ▼mM) La concentración de pirofosfato libre (A), Mg^{2+} libre (B), Complejo $MgPPi$ (C), y complejo Mg_2PPi (D) usado para mejorar el llenado fue calculado con el programa MECOMPLEX (Rodríguez-Sotres y Muñoz, 1990), usando las constantes de estabilidad global reportadas en la tabla 1. La función empleada para el ajuste es la ecuación 1.

$$v = \frac{V_{MAX} [Mg^{2+}] [MgPPi^{2-}]}{K_{Mg} K_{MgPPi} \left(1 + \frac{[MgPPi^{2-}]}{K_{iMgPPi}} + \frac{[Mg^{2+}]}{K_{Mg}} \right) + [Mg^{2+}] [MgPPi^{2-}]} \quad (\text{Ecuación 1}).$$

Tabla 1. Valor de parámetros estimados para la cinética de saturación de las pirofosfatasa AtPPa1 y AtPPa4. El error estándar de cada estimado se indica entre paréntesis.

Parámetro ^a	AtPPa1	AtPPa4	units
k_{CAT} (se)	12.1 (1.0)	11.9 (0.9)	s ⁻¹
K_{Mg} (se)	0.019 (0.005)	0.185 (0.071)	μM
K_{MgPPi} (se)	0.069 (0.015)	0.059 (0.012)	μM
K_{IMgPPi} (se)	0.015 (0.010)	2.3 (1.8)	μM
k_{CAT}/K_{MgPPi}	8.07×10^8	2.02×10^8	M ⁻¹ s ⁻¹

^aValores obtenidos mediante el ajuste por regresión no lineal de los datos mostrados en la figura 2 a la ecuación 1 empleando el programa SigmaStat 2.0.

Estas proteínas muestran una cinética compleja, con inhibición por exceso de sustrato (Navarro, 2005), lo que las distingue de las pirofosfatasa 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 algunas posibilidades: primero, las diferencia en afinidad por el Magnesio se reflejan en un orden obligado para la adición del magnesio y el sustrato (complejo Mg-PPi), lo que se traduce en un mecanismo cinético distinto, tal como el propuesto por Navarro *et al.* (2007). De forma alternativa, se podría tratar 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 llevan a un plegamiento estable, pero ligeramente diferente del que se observa *in planta*, o simplemente, existe una localización diferencial en la célula que se relaciona directamente con los requerimientos distintos por PPi y Mg²⁺. Finalmente, las diferencias en la secuencia de aminoácidos podrían también resultar en un procesamiento distinto de estas proteínas, de ser así, es posible que el comportamiento cinético de las proteínas no procesadas sea diferente.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al completarse el proyecto de secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* genome initiative, 2000) se identificaron seis genes que codifican a diferentes isoformas de AtPPasas con evidencias que indican una expresión constitutiva. Dada la importancia y papel que tiene el PPI en la célula, la acción de las AtPPasas en su hidrólisis resulta esencial, sin embargo, se desconoce aún si presentan actividad diferencial según su localización celular o simplemente su multiplicidad de genes es parcial o completamente redundante.

A pesar de elevada similitud a nivel de secuencia, estas proteínas no parecen ser redundantes, ya que datos recientes de nuestro laboratorio han mostrado que mutantes nulas en la proteína AtPPa1 (AtPPA1^{Null}) y mutantes deficientes en la enzima AtPPa4 (AtPPA4^{Low}) no poseen fenotipos equivalentes. Ambas plantas son casi normales en condiciones de crecimiento óptimas, pero presentan una tolerancia incrementada a algunas condiciones de estrés. Sin embargo, en tanto AtPPA1^{Null} es muy tolerante a estrés por calor, AtPPA4^{Low} es medianamente tolerante y por otro lado, AtPPA4^{Low} es muy tolerante a salinidad, en tanto que AtPPA1^{Null} es ligeramente más tolerante que la planta silvestre.

En relación con su expresión, los datos de microarreglos han mostrado que los niveles de mRNA codificante de estas proteínas, son elevados y se transcriben de manera constitutiva en casi todos los tejidos y a lo largo de la vida de la planta (Figuras 1 y 2) (<https://www.geneinvestigator.ethz.ch/>). Por otra parte, el análisis de las secuencias codificantes de estas proteínas revelan la posibilidad de que estén sujetas a fosforilaciones, o-glucosilaciones, y otras modificaciones postraduccionales (Tabla 1) que pueden ser relevantes para el control de su actividad.

Uno de los aspectos más importantes para aproximarse a su función individual es su ubicación intracelular. Al respecto, hay evidencia experimental *in vitro* que plantea que la AtPPa 6 es capaz de ser importada al estroma de cloroplastos aislados de hojas de espinaca (Schulze *et al.*, 2004). Sin embargo, algunas proteínas pueden presentar péptidos señales ambiguos, que permiten su tránsito hacia mitocondrias o cloroplastos, en paralelo. De modo que se vuelve interesante conocer la ubicación intracelular de la AtPPa 6 *in vivo* y determinar la ubicación *in vivo* o *in vitro* de las cinco proteínas restantes, que hasta ahora es desconocida. En tubérculos de papa, se identificó una secuencia de pirofosfatasa cuya localización intracelular resultó citoplásmica, este hallazgo se logró mediante tinción inmunocitoquímica (Rojas-Beltrán *et al.*, 1999). Desafortunadamente en dicho estudio se emplearon anticuerpos policlonales, que son poco específicos, según hemos podido comprobar en nuestro

laboratorio. En nuestro caso, los anticuerpos contra AtPPa1 y AtPPa4 reconocen de manera semejante a proteínas en al menos 3 picos de actividad que pueden separarse mediante cromatografía de interacción hidrofóbica en los extractos crudos de hojas, raíces y tallos de *A. thaliana* y de frijol (Trejo-Yepes, 2008). Lo anterior indica que la inmunotinción observada por Rojas-Beltrán *et al.* (1999) podría deberse a otras isoformas y no a las empleadas para la generación de los anticuerpos (Trejo-Yepes, 2008).

Así, la localización intracelular de cada una de las seis isoformas de PPIasas de *Arabidopsis thaliana* dista de ser un problema resuelto, el cual, además de ser interesante desde el punto de vista científico, nos colocará en mejor posición para entender el papel que juegan estas proteínas en la célula vegetal.

Tabla 1 . Códigos de identificación de las seis diferentes isoformas de pirofosfatasa inorgánica de *Arabidopsis thaliana* y sitios de modificación postraducciona predichos por diversos programas de análisis de secuencias. NetPhos; Predicción de fosforilación en Serina, Treonina, y Tyrosina. NetPhosK; Predicción de sitios específicos de fosforilación por cinasas en eucariotes. OPEGET; Algoritmo de predicción de sitios de O- glucosilación. SUMOplot; Análisis de sitios protéicos capaces de generar sumoilación.

Pirofosfatasa	AtPPia 1	AtPPia 2	AtPPia 3	AtPPia 4	AtPPia 5	AtPPia 6
Número	241114	U13044	U84891	VBVDG06	U16301	U10272
Locus TIRs	AT1G01050	AT2G18230	AT2G46860	AT3G53620	AT4G01480	AT5G09650
Gene Bank Accesion	NM_099987	AY091698	BT025278	NP_190930	AY081667	AY079355
Locus	NP_171613	CAA40764.1	NP_182209.1	NP_190930	NP_192057.1	AAS57950.1
Gi	gi 15223288	gi 16348	gi 15226453	gi 15231849	gi 15234191	gi 45331391
Fosforilación	S27, S30, S163, T63, T202	S9, S105 Y208	S12, S15, S31, S34, S192, S194, T98 Y6, Y67, Y152, Y176	S19, S53, S56, S73, S76 S79, T23, T143, Y57, Y12, Y197, Y221, Y251	S9, S31, S34, Y67, Y206	S51, S56, S91, S161, S165 S217, S291, T4, T17, T134, T185
Cinasa	T209 PKC, S27 PKA	S33 PKC	T213 PKC	S29 PKC	T213 PKC	T27 PKC
O-Glucosilación	NO	NO	S2, T9	T9	NO	T4
Acetilación	S2	NO	S2	NO	T8	NO
Glucosilación	K60, K67, K149, K155	K5, K66, K73, K79,	K21, K64, K71, K153, K159, K183	K15, K64, K71, K125	K7, K64, K71, K153	K50, K52, K66, K88, K113, K116, K222, K266
SUMO	K73	K66	K77, K66	K159, K148	K77	K131, K118
Motivos	98-104 DNDPIDV	104-110 DSDPMDV	102-108 DNDPLDV	102-108 DSDPIDV	102-108 DNDPIDV	173-179 DNDPVDV
N° de Pb	639	657	651	651	651	900
N° de AA	212	218	218	217	216	300
WM. KDa	24.484	24.671	25.145	24.663	24.709	33.38
PI	5.73	5.72	5.43	5.26	6.09	5.72

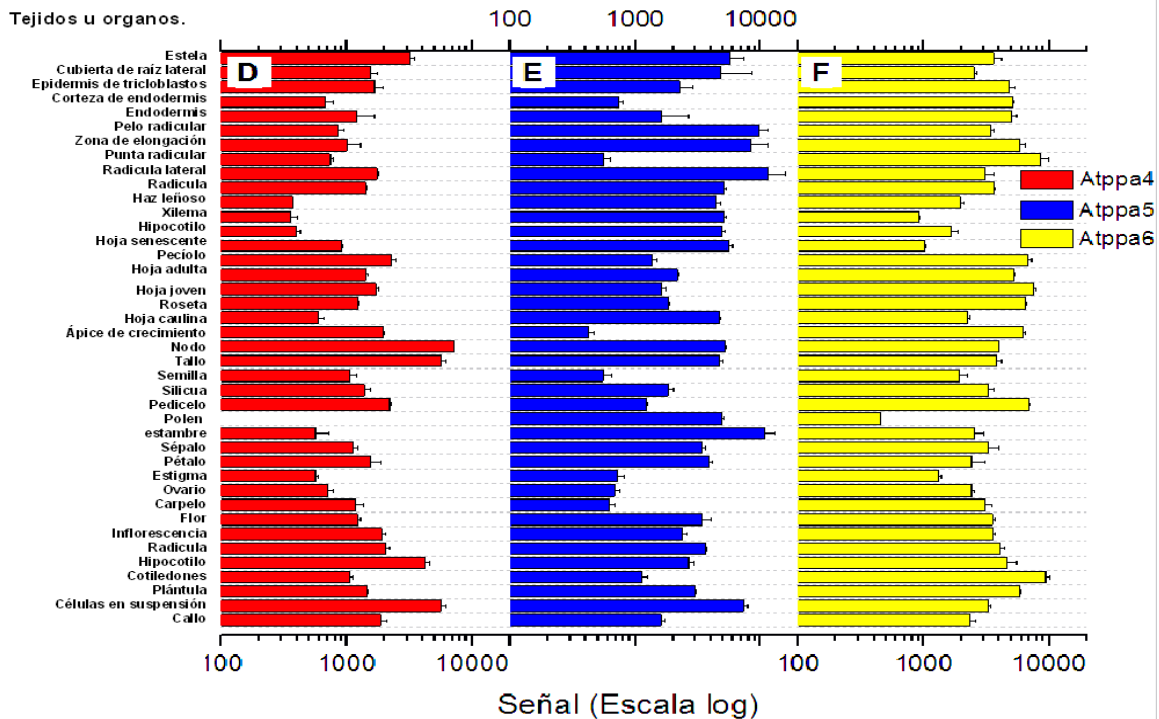
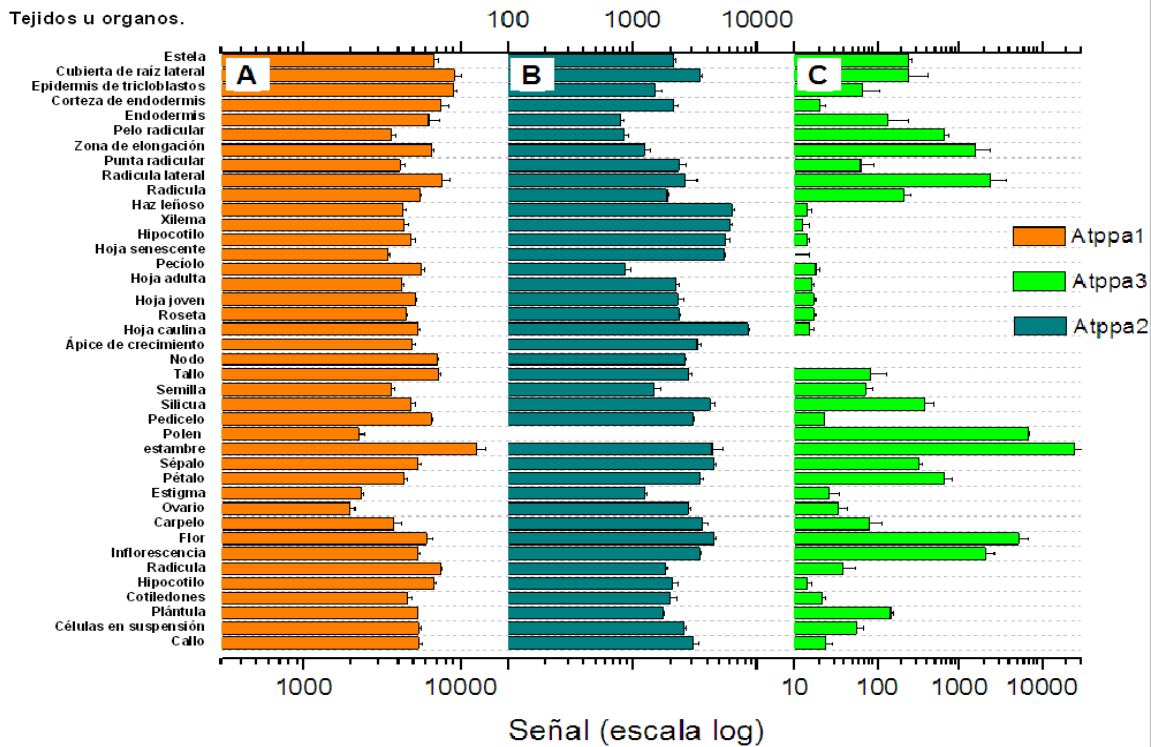


Figura 1 . Señales promedio de expresión genética derivada de los datos de microarreglos disponibles de la base de datos de GENVESTIGATOR. Ajustados de acuerdo a cada tejido (Parte de los datos fueron tomados de Navarro *et al.*, 2007). La señales de AtPPa 1, 2, 3, 4, 5 y 6 son representados por las barras señaladas con las letras A, B, C, D, E y F respectivamente.

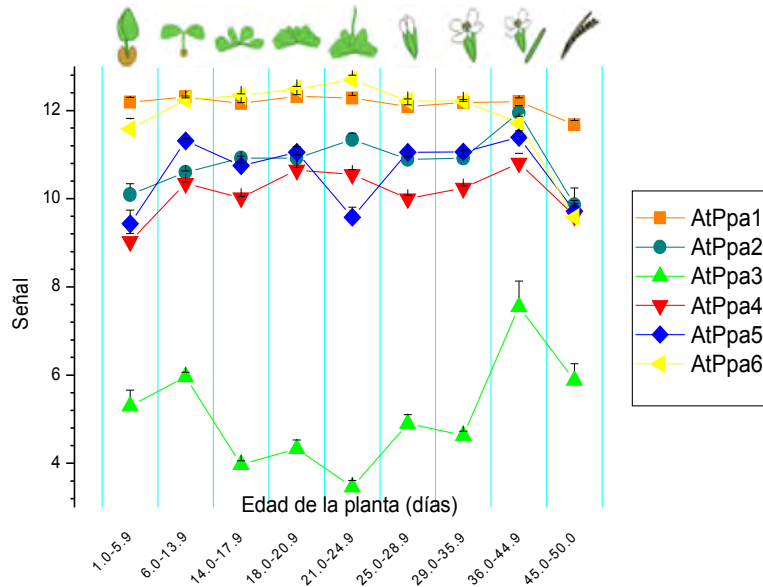


Figura 2. Nivel de expresión de mRNA de las seis isoformas de siPPiasas en diferentes intervalos de vida de la planta *Arabidopsis thaliana*. (<http://www.genevestigator.ethz/>).

Tabla 2 . Matriz de identidad de secuencias de las seis diferentes isoformas de pirofosfatasa inorgánica de *Arabidopsis thaliana*. Como referencia se incluyen la comparación con las secuencias de las pirofosfatasa solubles citoplasmáticas de la levadura y de *Escherichia coli*. Los valores mostrados corresponden al porcentaje de similitud entre ellas.

Secuencia	AtPPa1	AtPPa5	AtPPa3	AtPPa4	AtPPa2	AtPPa6	<i>E. coli</i>
AtPPa5	89.3						
AtPPa3	87	81.9					
AtPPa4	77.7	75.9	75.9				
AtPPa2	66.2	66.2	68.9	68.4			
AtPPa6	19.7	19.7	20	18.7	18.4		
<i>E. coli</i>	26.3	26.8	26.3	25.4	28.3	12.1	
Levadura	17.7	17.2	16.8	17.8	17.9	27.7	14.8

La comparación de secuencias muestran que existe más del 66 % de identidad entre las isoformas correspondientes a la AtPPa 1 a la 5 (tabla 2) y a diferencia de la AtPPa 6 ninguna de ellas presenta un péptido señal, a pesar de lo cual no parecen ser totalmente redundantes en sus funciones. Por lo tanto, se plantea la siguiente hipótesis:

5 HIPÓTESIS.

Los datos de análisis bioinformático de las secuencias de las pirofosfatasas de *Arabidopsis thaliana* predicen para la mayoría de ellas una localización citosólica, sin embargo, el pirofosfato se produce en varios compartimentos subcelulares; por lo tanto, al menos algunas de las diferentes isoformas de pirofosfatasa inorgánica soluble de *Arabidopsis thaliana* estarán localizadas en diferentes ubicaciones subcelulares.

6 OBJETIVO

Determinar la localización subcelular de las diferentes siPPiasas de *Arabidopsis thaliana*, fusionadas a proteínas fluorescentes (GFP, YFP o CFP), así como caracterizar a nivel enzimático, la actividad de estas proteínas.

6.1 Objetivos particulares

- ◆ Diseñar por medio de herramientas informáticas cada uno de los oligonucleótidos cebadores que permitan subclonar cada uno de los genes de AtPPia en plásmidos convenientes para su expresión en un sistema bacteriano y en forma de una proteína de fusión en células vegetales.
- ◆ Incorporar cada plásmido a células de *A. thaliana* a través del método de bombardeo de plásmidos y/o transformación genética de plantas.
- ◆ Determinar por microscopía confocal CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) la región de localización de cada una de las proteínas de AtPPa estudiadas.
- ◆ Caracterizar la actividad de estas proteínas para determinar si se trata de pirofosfatasas inorgánicas solubles *bona fide*.

7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Nosotros contamos con las secuencias codificadoras de las seis diferentes isoformas de PPiasas de *Arabidopsis thaliana* (AtPPa 1-6), obtenidas a través de la iniciativa TAIR (The Arabidopsis Information Resource). Un primer paso fue la secuenciación de estos plásmidos para confirmar la identidad e integridad de las secuencias. Las secuencias nucleotídicas de cinco de ellas (AtPPa 1-5) presentan un porcentaje de similitud del 66% o mayor entre si. Sin embargo, la sexta (AtPPva 6) presenta diferencias significativas en su secuencia nucleotídica con respecto a las cinco anteriores (Tabla 3). La localización intracelular de estas proteínas es un aspecto no estudiado anteriormente en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Por ello, se clonaron en fase cada una de las secuencias correspondientes de PPiasas de *A. thaliana* a las proteínas fluorescentes GFP, YFP o CFP (verde, amarillo o cian respectivamente), para ello, se construyeron plásmidos apropiados y se determinó la integridad y pureza de los mismos. Primeramente, se diseñaron oligonucleótidos adecuados que permitieron amplificar cada gen y clonarlos direccionalmente en los plásmidos elegidos. Una vez que se obtuvieron las construcciones vectoriales PPiasa-Proteína Fluorescente, se expresaron las proteínas en células vegetales para determinar, mediante la emisión de fluorescencia, la localización intracelular de las proteínas de fusión correspondientes.

Paralelamente, cada uno de los genes de AtPPa fue clonado en el plásmido pET 101/D-TOPO y mediante diversas técnicas cromatográficas se purificaron las proteínas correspondientes. Finalmente, se realizaron ensayos de actividad enzimática para determinar su especificidad por el sustrato y el cofactor. Un diagrama general de la estrategia experimental se muestra en la figura 1.

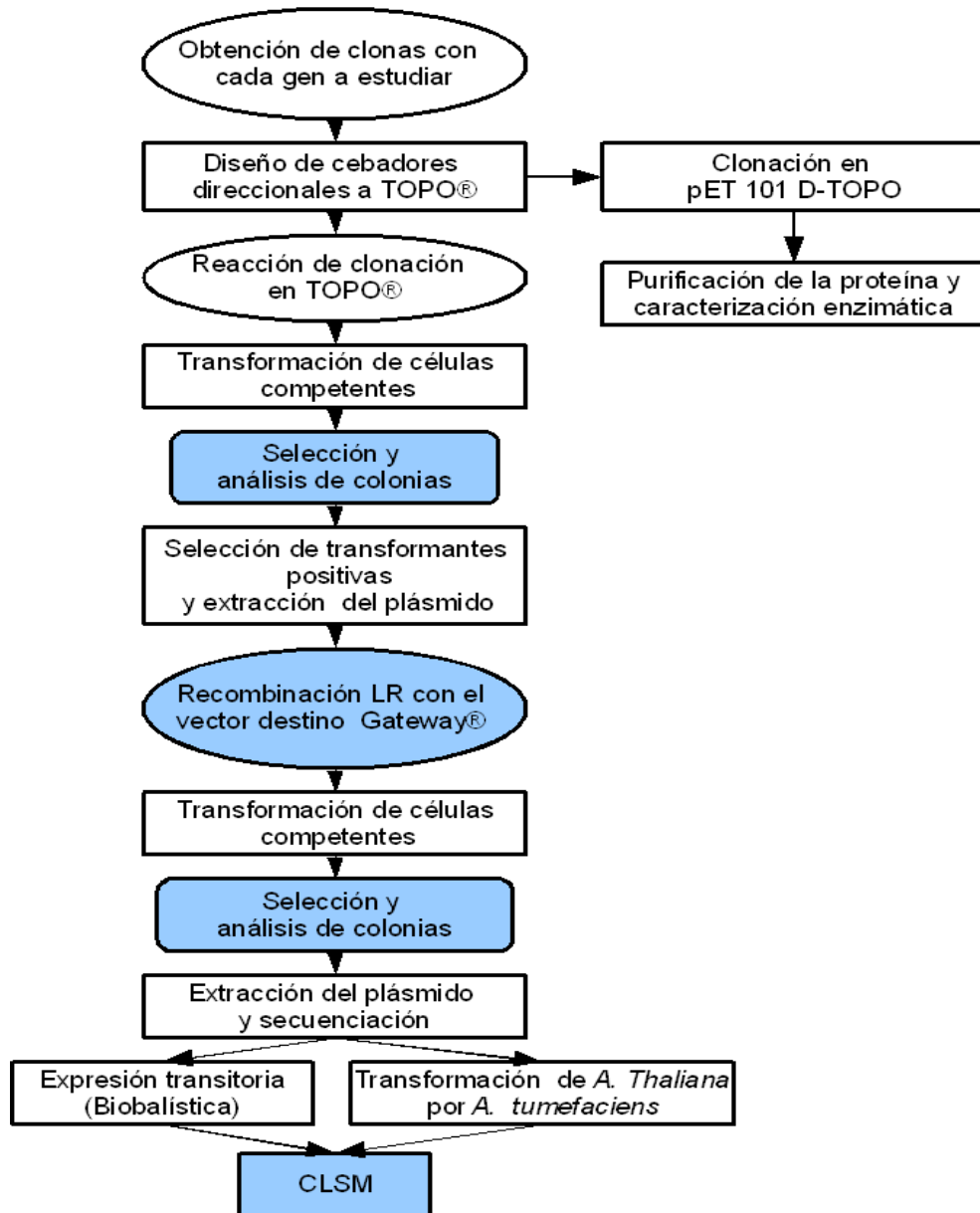


Figura 1. Diagrama de flujo para la localización de isoformas de AtPPasas en células vegetales *in vivo* así como la purificación y caracterización de las isoformas de pirofosfatasa de *Arabidopsis thaliana*.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Los seis diferentes genes de AtPPasas fueron adquiridos a través del Centro de Investigación Biológica de Arabidopsis (ABRC).

El procedimiento de transformación genética de plantas de *Arabidopsis thaliana* (Floral dip), requirió de la cepa LB4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, mientras que para aquellos procedimientos de mantenimiento de plásmidos se ocuparon cepas One shot top 10 de *E. coli*.

Extracción y purificación de los plásmidos

De cada clona se extrajo el plásmido bajo la siguiente técnica.

- 1) Cultivar cada una de las clonas en 5 ml de medio LB por toda la noche a 37 °C con agitación constante a 250 r.p.m.
- 2) Centrifugar a 12 000 r.p.m. en microfuga.
- 3) Suspender 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 µl de amortiguador de neutralización (Acetato y clorhidrato de guanidina) y mezclar por cinco veces más.
- 6) Centrifugar a 12 000 r.p.m por 10 min en microfuga.
- 7) Verter el sobrenadante en el cartucho de purificación, el cuál debe estar previamente 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 µl amortiguador de lavado GX (clorhidrato de guanidina, EDTA, y etanol) e incubar a 25 °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 µl de amortiguador de lavado G4.
- 11) Centrifugar y desechar el amortiguador de lavado.
- 12) Finalmente se eluye el plásmido, adicionando 50 µl de amortiguador TE [10 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1 mM EDTA], este se deja en incubación por 2 minutos y se centrifuga a 12 000 r.p.m por 1 min a temperatura ambiente.

Diseño de oligonucleótidos cebadores

A través del programa Biology Workbench (San Diego Supercomputer Center) se diseñaron los diferentes oligonucleótidos pertenecientes a cada gen. La tabla 1 muestra los oligonucleótidos sintetizados para la clonación direccional al vector D-TOPO de tecnología GATEWAY. A estos últimos se le removió el codón nativo de paro para que al recombinar al vector destino fuera expresado ese gen como una proteína recombinante fusionada a alguna de las proteínas fluorescente reporteros.

Tabla 1 . Oligonucleótidos diseñados para cada gen de PPiasa para clonación direccional en D/TOPO.

Gen	Secuencia de nucleótidos
AtPPa 1	F: CACCATGAGTGAAGAACTAAAGATAACCAGAG
	R: ACGCCTCAGGGTGTGGAGAATG
AtPPa 2	F: CACCATGGCTGAAATCAAGGATGA
	R: GCGTTGCAGGCCAGC
AtPPa 3	F: CACCATGAGTGAAGAAGCATATGAAGAAA
	R: TCTCCTCAACGTGTGGAGAA
AtPPa 4	F: CACCATGGCGCCACCGATT
	R: ACGTCTTAGGTTCTCCACGAC
AtPPa 5	F: CACCATGAATGGAGAAGAAGTGAAAACG
	R: AAGCCAAATATGAGACACGTGC
AtPPa 6	F: CACCATGGCGGCTACTAGAGTGTTAA
	R: TAAGTCGACATTGCAAAATATGTTC
YFP o CFP reverse (4578-4600) del plásmido.	R: CGGGGTAGCGGGCGAAGCACTGCA Este oligonucleótido puede usarse para cualquiera de las dos secuencias.

PCR con Pfu polimerasa

Los genes cuyo destino son el vector pENTRTM/D-TOPO[®], se amplificaron con las condiciones de reacción expresadas en la tabla 2, correspondientes a las condiciones óptimas de amplificación con la polimerasa purificada de *Pirococcus furiosus* (Pfu Polimerasa). Aquellos genes que fueron amplificados con Taq polimerasa se amplificaron usando la condiciones de la tabla 3.

Tabla 2 . Condiciones de reacción para amplificación de secuencias con Pfu polimerasa. Cada reacción requiere específicamente de 125 ng de cada oligonucleótido, 100 ng de plásmido, 5 µl de amortiguador de reacción 10X con 2 mM de MgSO₄, 5 µl de mezcla de nucleótidos 10 mM y 3 unidades de Pfu Polimerasa. La reacción requiere de 3 minutos de elongación por cada Kb que se desea amplificar.

Condiciones óptimas de reacción para Pfu polimerasa.		
Desnaturalización inicial	2 minutos a 95° C	Un ciclo
Desnaturalización	1 minuto a 95° C	
Hibridación	3 segundos a 50° e incrementos de 0.2°C/segundo por 75 segundos	25 ciclos
Elongación	2 minutos a 72° C	
Elongación final	2 minutos a 72° C	Un ciclo
Final	Mantener a 4°C	Fin.

Tabla 3. Condiciones de reacción para amplificación de secuencias con Taq polimerasa. Cada reacción requiere específicamente de 250 ng de cada oligonucleótido y 200 ng de plásmido. 2.5 µl de amortiguador de reacción 10X con 2.5 mM de MgCl₂, 2 µl de mezcla de nucleótidos 10 mM y una unidad enzimática de Taq polimerasa.

Condiciones óptimas de reacción para Taq polimerasa.		
Desnaturalización de inicial	3 minutos a 95° C	Un ciclo
Desnaturalización	1 minutos a 95° C	
Hibridación	0.5 minutos a 55° C	25 ciclos
Elongación	1 minutos a 72° C	
Elongación final	3 minutos a 72° C	Un ciclo
Final	Mantener a 4°C	Fin.

Sistema de clonación TOPO®

Después de generar el producto de PCR se verificó la cantidad y calidad del producto a través de electroforesis en gel de agarosa, observando que la banda de interés presentara el peso correspondiente a cada uno. Cada gen de *Arabidopsis thaliana* fue clonado en el plásmido pENTR™/D-TOPO®. La reacción de clonación se realizó mezclando 2 µl del producto de PCR (20 ng) con 1µl del vector D/TOPO (20 ng), 1µl de solución de sal y 2µl de agua estéril. La solución de sal, el agua y el vector pertenecen al kit de clonación pENTR™. (Directional TOPO cloning kit, Invitrogen™).

Transformación de bacterias competentes One Shot TOP 10®

Cada uno de los genes clonados en el vector D/TOPO fue introducido en bacterias *E. coli* One Shot® para prolongar su conservación. El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Descongelar las bacterias *E. coli* One Shot manteniéndolas en hielo.
2. Adicionar 2µl de la reacción de clonación al vial de células competentes One Shot y mezclar ligeramente.
3. Incubar en hielo por 15 minutos.
4. Dar choque térmico en baño de agua a 42 °C sin agitación por treinta segundos y transferir los tubos a hielo.
5. Inmediatamente adicionar 250 µl de medio S.O.C a temperatura ambiente.
6. Incubar a 37 °C por una hora con agitación constante.
7. Esparcir 100 µl del cultivo bacteriano en placas de agar LB previamente aclimatadas a 37 °C y con 50µg de Kanamicina por mililitro de medio.

Selección de bacterias transformadas

Se seleccionaron al azar cinco colonias transformadas, a cada una se le extrajo el DNA plasmídico y se realizaron reacciones de PCR para corroborar que aquellas bacterias seleccionadas contuvieran el plásmido cuya construcción había sido generada en pENTR™/D-TOPO®. Aquellas colonias positivas fueron cultivadas en medio LB y guardadas como muestras stock con 30 % de glicerol, a -70 °C.

Sistema de recombinación al vector pEarley Gate 101, 102 ó 103

Los vectores pEarley Gate 101, 102 ó 103 fueron elegidos para identificar subcelularmente el sitio de localización de las proteínas recombinantes fluorescentes. Estos plásmidos, cuentan con las regiones AttR1 y AttR2 necesarias para la recombinación a los sitios AttL1 y AttL2 del plásmido donador. Así también, los plásmidos elegidos cuentan con la secuencia de alguna de las proteínas reportero ampliamente utilizadas que pueden ser YFP, CFP o GFP para quedar en fase al extremo carboxilo terminal de la secuencia en estudio, estos plásmidos cuentan con el gen (BAR) de resistencia al herbicida Basta, para la selección en plantas y el gen (Km) de resistencia al bactericida Kanamicina. Así también con un gen de resistencia a cloramfenicol (CmR) y un gen asesino (ccdB Killer) para diferenciar colonias que no adquirieron la secuencia recombinante.

Los sistemas de clonación Gateway han sido promocionados como altamente efectivos por su alto rendimiento en la incorporación de genes mediante la estrategia de recombinación en sitio específico

del bacteriófago lambda.

Para llevar a cabo la reacción de recombinación de sitio específico, primeramente se extrajo del vector aquella región en la que se encuentra la secuencia de interés. Esta acción se conduce mediante la endonucleasa MluI, cuya actividad hidrolítica la realiza entre las bases 5' A CGCGT 3' ubicadas en los sitios 231 y 1879 del vector pENTR™/D-TOPO®. Las condiciones de digestión se expresan en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de digestión con enzima MluI.

Digestión con endonucleasa MluI		
Buffer 10 X	3 µl	37 °C por Tres horas.
Plásmido	20 µl	
Enzima MluI	1 µl	
H ₂ O	6 µl	

Finalmente, la banda liberada por efecto de la endonucleasa MluI se purificó y se introdujo mediante recombinación al plásmido destino pEarley Gate 101, 102 ó 103, con el siguiente protocolo.

1. En tubo eppendorf de 1.5 ml se mezclaron 5 µl de DNA puro digerido (130ng), 1µl de vector destino, y 2µl de TE buffer, pH 8.0
2. A cada muestra se aplicaron 1 µl de LR Clonase™ II, se mezclaron y se centrifugaron las muestras.
3. Las muestras se incubaron a 25 °C, por una hora.
4. A cada muestra se le adicionó 1µl de Proteinasas K para dar fin a la reacción. Se agitaron bien y se centrifugaron.
5. Las muestras se incubaron a 37 °C, por 10 minutos y se procedió a la transformación de células competentes de *Escherichia coli* Top10.

Electroforesis de ácidos nucleicos

La visualización de DNA (productos de PCR, extracciones, digestiones y ligaciones de plásmidos) se realizó por electroforesis en gel de agarosa 1 %. Estos geles se corrieron a 75 V, 3 W, 200 mA por 45 min. El gel se tiñó con solución de bromuro de etidio para su posterior visualización por fluorescencia al irradiarse con luz ultravioleta.

Purificación del DNA en gel

Después de obtener el producto de PCR anteriormente descrito, se extrajo de un gel de agarosa la banda correcta por medio de una metodología basada en un sistema comercial de extracción rápida de DNA, a partir de bandas en el gel de agarosa (Marlingen Biosciences Inc., USA), como sigue:

1. Se recortó el área de la banda de interés y se colocó en un tubo Eppendorf.
2. Se adicionaron 500 μ l de amortiguador de solubilización L1 (perclorato de sodio concentrado, acetato de sodio y solubilizante TBE) y se incubó 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 y se vertieron 500 μ l del amortiguador de solubilización (perclorato de sodio concentrado y solubilizante TBE (amortiguador que contiene una formulación registrado por Marlingen Bioscience, Inc.) y se incubó a 25 °C, por un minuto. Se centrifugó y se desechó el filtrado.
5. Se adicionó al cartucho 700 μ l de amortiguador de lavado (NaCl, EDTA, y Tris-HCl), se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugó a 12 000 r.p.m., por un minuto.
6. Se centrifugó nuevamente a 12 000 r.p.m., para eliminar en su totalidad restos del amortiguador de lavado.
7. A continuación el cartucho de filtrado se montó sobre un Eppendorf y se le vertieron 50 μ l de TE amortiguador (conteniendo 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 0.1 mM EDTA). Se mantuvo en incubación por un minuto y nuevamente se centrifugó a 12000 r.p.m., por 2 min en microfuga.
8. Finalmente, se colectó el filtrado.

Para valorar la pureza de la banda analizada, se realizó una electroforesis de ácidos nucleicos aplicando la cantidad de muestra necesaria para valorar presencia de contaminantes.

Después de haber purificado la banda de interés, continuaron los tratamientos necesarios según la aplicación que vaya a tener la secuencia purificada, ya sea para recombinación en pEarley Gate o para la purificación de plasmidos presentes en bacterias transformadas. A través de las cepa de *E. coli* BL21(DE3) se sobreexpresaron las proteínas recombinantes de AtPPasas para los ensayos de actividad. Estas proteínas fueron purificadas por métodos cromatográficos de afinidad, intercambio iónico, hidrofobicidad y/o exclusión molecular o la combinación de algunas de ellas.

Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

Para realizar la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), se montaron geles de acrilamida al 10 y 12 % (p/v) para el gel separador y al 4% para el gel concentrador.

Los geles se preparan entre dos placas de vidrio y se corren a 120 mV (aprox. 100 mA) por dos horas. Estos se revelan por inmersión en solución de azul de Coomasie (Coomasie 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 obtenidos pueden conservarse en una solución de ácido acético al 5 %.

Medición de actividad de pirofosfatasas

La medida de actividad de hidrólisis del pirofosfato se determinó al cuantificar la cantidad de fosfato que es liberado por unidad de tiempo a partir de pirofosfato y en presencia de magnesio, utilizando una detección colorimétrica con el reactivo de verde de malaquita (RVM).

Todo el material empleado para estas medidas debe ser nuevo o en su defecto, debe lavarse perfectamente con ácido nítrico al 10% y enjuagado con abundante agua desionizada.

Para la preparación del reactivo 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.

El ensayo de actividad se realizó en placas multipozo de 12 x 8 pozos, tipo ELISA. Para dicha determinación, la muestra enzimática (1 a 25 μ l) se diluye hasta un volumen de 25 μ l con agua y se mezcla con un amortiguador de ensayo, Tris HCl 0.2 M, pH 7.5, EDTA 0.3 mM, MgCl₂ 6.0 mM y 160 μ M de pirofosfato, para dar concentraciones finales de Tris HCl 0.1 M pH 7.5; EDTA 0.15 mM, MgCl₂ 3.0 mM y 80 μ M 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 de RVM. Luego, la placa se incuba de 5 a 10 minutos y se lee la absorbencia con un filtro de 655 nm en un lector de placas de Elisa "Bio-Rad Benchmark".

Para cuantificar la cantidad de fosfato liberado, se prepara una curva patrón con una solución de 0.1mM de Fosfato de potasio monoácido Na₂HPO₄. Dicha solución se diluye para contener cantidades variables desde 0.2 hasta 10 nmol de Pi en 25 μ l, los que se mezclan con 25 μ l de amortiguador de ensayo y con 200 μ M de RVM.

Determinación de la concentración de proteína

Las determinaciones de proteína soluble se realizaron mediante alguna de las dos técnicas diferentes: la técnica de Bradford modificada (Zor y Seelinger, 1996) o por el método del ácido bicinconínico (Smith *et al*, 1985). Para el método de Bradford se preparó el reactivo de color disolviendo 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250® en 50 ml de etanol al 95% (v/v) y posteriormente se agregaron 100 ml de ácido fosfórico al 85% (p/v), se mezcló y se llevó a un volumen final de 1000 ml con agua de alta pureza, la solución se deja reposar por varias horas y se filtra en papel Whatman® del número 2. La curva patrón de proteína se prepara con BSA 100 µg/ml y 10 µg/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 bicinconínico se realizó usando ácido bicinconínico en 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. El reactivo A contiene 1 % de sal sódica de ácido bicinconínico, 2 % de carbonato de sodio, 0.16 % de tartrato y 0.95 % de bicarbonato de sodio. El reactivo B contiene 4% de sulfato de cobre. La curva patrón y las muestras se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbencia a 565 nm, estas determinaciones se realizaron también en placas de 96 posos (tipo Elisa) y en un lector para placas de Elisa "Bio-Rad Benchmark™". La curva patrón se realizó con BSA en un rango de 0 a 64.8 µg de proteína.

Transformación de *Arabidopsis thaliana* por *Agrobacterium tumefaciens*

El procedimiento de transformación ocupado es conocido bajo el nombre de "Floral Dip" y se compone de tres fases: En primer lugar, el desarrollo de plantas sanas y capaces de producir inflorescencias. En segundo lugar, transformación de la planta por medio de *Agrobacterium tumefaciens*, sobre las inflorescencias, finalmente, la colección de semillas y selección de transformantes positivas. El protocolo empleado fue el siguiente:

1. Se germinan semillas de *Arabidopsis* en medio GAMBORG B5 con periodo de luz de día corto (9 hrs de luz /15 hrs de oscuridad).
2. Cada planta es trasplantada a tierra y se ajustan las condiciones de luz a 12 hrs por día.

3. Se retira la primer inflorescencia tan pronto como emerge para favorecer el crecimiento de mas inflorescencias. Se modifican las condiciones de luz a un foto-periodo largo (16 hrs de luz por día)
4. A las 72 hrs las plantas están listas para ser transformadas.
5. Tres días previos a la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, se inoculan 5 ml de medio LB con Rifampicina 100 µg / ml y Kanamicina 50 µg / ml.
6. Se toman 200 µl del cultivo anterior y se inoculan en 200 ml de LB con las proporciones correspondientes de antibióticos y se incuban a 28 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 1.5 a 2.0.
7. Se colecta el pellet bacteriano centrifugando a 6000 rpm por 10 minutos y se resuspende en 500 ml de medio de infiltración (Solución de sacarosa 5%, Silwet L-77 50 µl/L).
8. Se transfiere la suspensión de *Agrobacterium* a un contenedor adecuado que permita voltear y sumergir cada planta por 30 segundos procurando que la suspensión se mantenga en contacto con la planta por 30 segundos.
9. Después del tratamiento anterior se cubren las plantas con bolsas de plástico transparente y se recuesta cada maceta de manera horizontal.
10. A las 24 hrs se retira la cubierta y cada planta es enjuagada con agua. Finalmente, cada planta es retornada a sus condiciones normales de crecimiento.
11. Después de cinco semanas se recolectan semillas y se someten a selección por resistencia a BASTA.

Transformación genética transitoria por biobalística.

1. El ensayo de biobalística se condujo en hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y de *Arabidopsis thaliana* para ello, primeramente se desinfectaron las hojas mediante arduos lavados con solución de hipoclorito de sodio al 1%.
2. Como medio de soporte y de nutrientes para la transformación de hojas de frijol se utilizó el medio SH cuya composición se describe en la tabla 5. Este medio contiene diversas sales minerales que aportan macro (N, P, K y S) y microelementos (B, Cu, Fe, Mn, I, Mo y Zn) nutritivos, vitaminas e inositol. De manera adicional se suplemento con auxina artificial 2,4-D, cinetina, antioxidante y sacarosa. El pH es ajustado a 5.8 y se añaden 3.2 g/L de gellana (GelRire™) para hacer al medio sólido.
3. Se ocuparon balas de tungsteno M5 y se dispararon a 7.5 cm de distancia con una presión de He (g) de 8 Bar y con vacío de -21 pulgadas de Hg.
4. La concentración de plásmido usada fue de 1mg/ml, al cual se le adicionó espermidina a una concentración de 0.1 M y CaCl₂ 2.5 M.

Tabla 5. Composición del medio SH (Schenk y Hildebrandt).

Compuesto	mg l ⁻¹
NH ₄ H ₂ PO ₄	300
CaCl ₂ 2H ₂ O	151
MgSO ₄ 7H ₂ O	400
KNO ₃	1000
H ₃ BO ₃	0.1
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.2
Na ₂ EDTA	20.1
FeSO ₄ 7H ₂ O	15
MnSO ₄ 4H ₂ O	10
KI	0.1
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.1
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1
Myo-inositol	1000
Ácido nicotínico	5
Piridoxina	0.5
Tiamina HCl	5

Inclusión de muestras en paraplast™

1. Se colectaron los tejidos a incluir en paraplast™ y se lavaron con agua desionizada.
2. Cada tejido se fija en formaldehído al 3.7 % en PBS por 15 minutos.
3. Se aplican tres lavados de PBS de 10 minutos cada uno.
4. Se somete el tejido al proceso de deshidratación en una serie gradual de etanoles (50, 70, 85, 96 y 100%) por 15 min cada uno.
5. Cada muestra se sumerge en Citrosolv™ por 10 minutos.
6. Se incluyeron las muestras en cubos de paraplast™. y se realizaron cortes de 7 micras con un microtomo rotatorio de navajas de acero desechables.
7. Los cortes se depositan en un baño de agua a 20°C y son colectados de la superficie de éste con la ayuda del porta objetos, entonces son sometidos a desparafinación.
8. Para desparafinar, se incubaron las muestras por una hora a 60 °C y se trataron con tres cambios de Slide Brite® de 5 min cada uno, a continuación se lavan, con una serie de soluciones de etanol comenzando por la mas concentrada y en el siguiente orden: 100%, 96%, 85%, 70%, 50% y 30%. Por ultimo, se realizan un par de lavados con solución de PBS.

9. Finalmente, cada preparación es observada al microscopio de fluorescencia o confocal.

Tinción celular con colorante fluorescente de Calcofluor.

Para identificar la pared celular se tiñó con Calcofluor™ (Polysciences, Inc.). Para las mitocondrias se tiñó con Mitotracker™ (Invitrogen), sin embargo esta tinción debe realizarse previo al proceso de fijación del tejido, en nuestros resultados no se muestran las tinciones realizadas con con este colorante.

Para la tinción con Mitotracker™, las muestras se colocaron una solución de colorante 200nM, por 30 minutos. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS y se fijaron con Formaldehído al 3.7%, en PBS, por 15 minutos y a 37°C. En seguida, se aplicó acetona fría por 5 minutos para aumentar la permeabilidad a la célula y, finalmente, se sigue el procedimiento de inclusión en paraplast™ indicado anteriormente.

La tinción con Calcofluor se realizó mezclando el colorante con el medio de montaje a una concentración final de 300 nM. El colorantes se aplicó directamente a la muestra y en seguida, se coloca el cubre objetos y se sellaron las orillas con esmalte acrílico incoloro. Posteriormente la laminilla es observada al microscopio.

Extracción de RNA total

1. 100 mg de tejido son pulverizados en nitrógeno líquido y finalmente homogenizados en 1 ml de TRIzol®.
2. Se centrifugan las muestras a 12 000 x g por 10 min a temperatura de 2 a 8 C°.
3. La pastilla celular es eliminada y se conserva el sobrenadante (RNA).
4. El sobrenadante es incubado por cinco minutos a temperatura de 15 a 30 C°.
5. Se adicionan 0.2 ml de cloroformo y se agita vigorosamente por 15 segundos.
6. Finalmente se incuba la mezcla por 2 o 3 minutos a temperatura de 15 a 30 C°, posteriormente, la muestra es centrifugada a 12 000 g por 15 minutos a temperatura de 2 a 8 C°.
7. Identificar la fase acuosa (arriba) y la orgánica (abajo) y transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
8. Precipitar la fase acuosa con 0.5 ml de isopropil alcohol por cada mililitro de trizol ocupado. Se deja en incubación por 10 minutos a temperatura de 15 a 30°C.
9. Centrifugar las muestras a 12,000 rpm por 10 minutos a temperatura de 2 a 8 °C.
10. Remover el supernadante y lavar el pellet con etanol al 75% (1ml de EtOH 75% / 1ml de trizol)
11. Mezclar con abundante agitación y centrifugar a no mas de 7500 rpm por cinco minutos a temperatura de 2 a 8 °C.

12. Eliminar el etanol sin permitir que el pellet se seque completamente.
13. Disolver el RNA en agua libre de RNAsas ó en agua con 0.5% SDS e incubar por 10 minutos a una temperatura de 55 a 60 °C.

Selección de plantas transformantes

Las construcciones realizadas en los plásmidos pEarley Gate 101, 102 y 103 (Earley *et al.*, 2006) contienen en su secuencia los genes de resistencia al antibiótico Kanamicina, bajo el control de un promotor bacteriano y una región limitada por las secuencias de *Agrobacterium tumefaciens* para transferencia a la planta, entre los cuales se localiza el gene de resistencia al herbicida BASTA™ (glufosinato de amonio) y una región con secuencias para recombinación tipo fago lambda. De esta manera, aquella primer generación de semillas colectadas de las plantas sometidas a tratamiento de transformación por "Floral dip" serán candidatas a contener la construcción genética y, por ende, a resistir al tratamiento de selección con basta. La selección consiste en atomizar el herbicida BASTA 1 mg/l cada tercer día a durante dos semanas. Las transformantes positivas se desarrollarán, mientras que aquellas no transformantes se volverán cloróticas y eventualmente morirán dentro de las tres o cuatro semanas de selección por tratamiento al herbicida.

Microscopía confocal.

Las observaciones de microscopía confocal fueron realizadas en un microcopio OLYMPUS FLUORVIEW FV1000 perteneciente al Instituto de Fisiología Celular UNAM.

Las señales de cada tipo de emisor fluorescente se identificaron en base a sus longitudes máximas de excitación y emisión ($\lambda_{EM}/\lambda_{EM}$), las cuales se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Listado de las señales fluorescentes analizadas en este trabajo y las longitudes de onda características empleadas en su detección.

Emisor fluorescente	$\lambda_{EM}/\lambda_{EM}$ (nm)
Proteína verde fluorescente (GFP)	488/510
Proteína cian fluorescente (CFP)	458/490
Proteína amarilla fluorescente (YFP)	515/527
Calcofluor™ (Compañía, lugar)	395/415
Clorofila (autofluorescencia)	633/647

9 RESULTADOS

Con el fin de identificar la localización subcelular de cada isoforma de sPPiase de *A. thaliana*, se comenzó por recuperar cada uno de los plásmidos que contuvieran la secuencia nucleotídica codificante para cada una de las isoformas que se deseaba clonar. Para ello, se siguió el protocolo estandarizado de extracción y purificación de plásmidos (Quiagen®). Seguidamente, se diseñaron el par de oligonucleótidos específicos para la clonación en fase de cada uno de los genes al vector pENTR™/D-TOPO®. cuyo requerimiento específico es la adición de la secuencia CACC al extremo 5' del oligonucleótido *forward* y la eliminación del codón de paro del oligonucleótido *reverse* (Tabla Error: No se encuentra la fuente de referencia)

Con los oligonucleótidos diseñados, se amplificó cada secuencia a través de la enzima Pfu polimerasa procedente de *Pyrococcus furiosus* que se caracteriza por poseer la actividad de exonucleasa 3'a 5' (proofreading) no presente en Taq polimerasa, lo que disminuye la probabilidad de errores durante la amplificación. La figura 1 muestra las bandas amplificadas de cinco de los seis genes de AtPPasas mediante Pfu polimerasa. Las condiciones de amplificación son las indicadas en la tabla Error: No se encuentra la fuente de referencia.

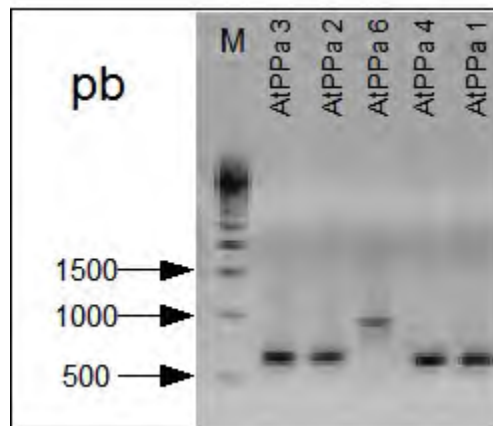


Figura 1. Producto de amplificación de secuencias mediante el uso de Pfu polimerasa, empleando los oligonucleótidos cebadores indicados en la tabla Error: No se encuentra la fuente de referencia y los plásmidos obtenidos a través del proyecto TAIR (ver materiales y métodos).

Clonación en fase al vector pENTRTM/D-TOPO[®]

Cada uno de los productos de PCR fue purificado y concentrado a 120 ng/μl. Se verificó la cantidad y calidad del producto a través de electroforesis en gel de agarosa al 1 % observando que la banda de interés presentara el tamaño correcto. Entonces cada gen fue clonado en el plásmido pENTRTM/D-TOPO[®]. mediante el protocolo recomendado por InvitrogenTM. Con los productos de clonación se transformaron bacterias competentes *E. coli* One Shot[®] TOP10 y se seleccionaron transformantes positivas que contuvieran la construcción de interés (Figura 2).

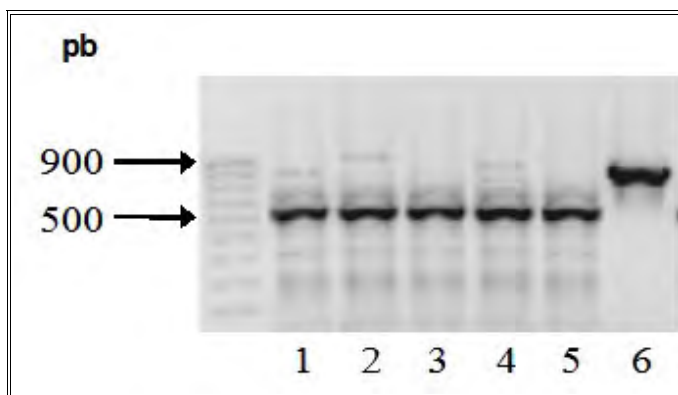


Figura 2 . Amplificación con Taq polimerase de transformantes positivas. Este ensayo solo se realizó con fines de comprobación para verificar la eficiencia de la clonación en TOPO. Los números 1 a 6 corresponden al número de isoforma de AtPPasa.

Finalmente, el gen de interés fue subclonado al vector de expresión. Para ello, el plásmido pENTRTM/D-TOPO[®] debe ser abierto en su forma lineal mediante la nucleasa de restricción Mlu1 que escinde el fragmento ubicado entre los nucleótidos 231 y 1879 del plásmido pENTRTM/D-TOPO[®] (Figura 3). El producto de digestión liberó dos fragmentos de secuencias nucleotídicas; una de 931 bases y otra de mayor tamaño en la que se encuentra contenido el gen de interés. Las condiciones de digestión ocupadas se expresan en la tabla Error: No se encuentra la fuente de referencia, en la figura 4 se muestran algunas construcciones sometidas a digestión con Mlu1. La banda ubicada entre 2000 y 2500 pb corresponde a la secuencia de interés.

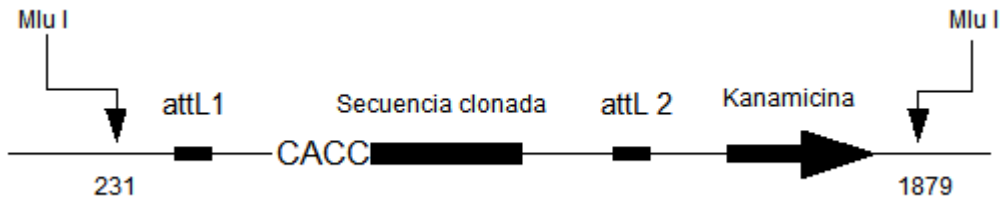


Figura 3 . Mapa del fragmento que se produce por digestión con endonucleasa MluI del vector pENTR™/D-TOPO® con la secuencia de interés clonada.

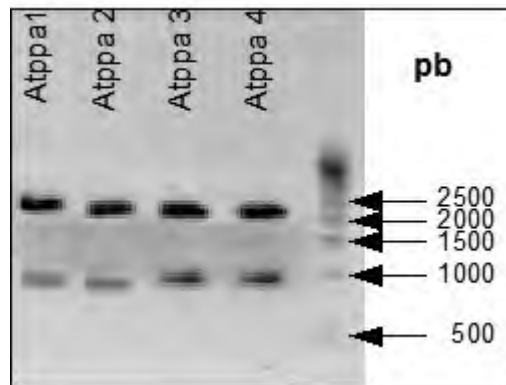


Figura 4 . Muestras digeridas con endonucleasa MluI para extracción de secuencia de interés para recombinación a pEarley Gate 103.

Recombinación al sistema pEarley Gate serie 100

A partir del producto de digestión con la nucleasa MluI se recombinó la secuencia de interés a cada uno de los vectores de expresión pEarley Gate 101, 102 y 103, de la tecnología Gateway, cuyos genes codifican para las proteínas fluorescentes amarillo, azul y verde, respectivamente. Cada plásmido contiene en su secuencia los genes Kan; marcador de selección por resistencia a Kanamicina (que se expresa en bacterias), la secuencia 35S; promotor constitutivo del virus del mosaico de coliflor (CaMV) y el gen BAR; que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio (Figura 5.).

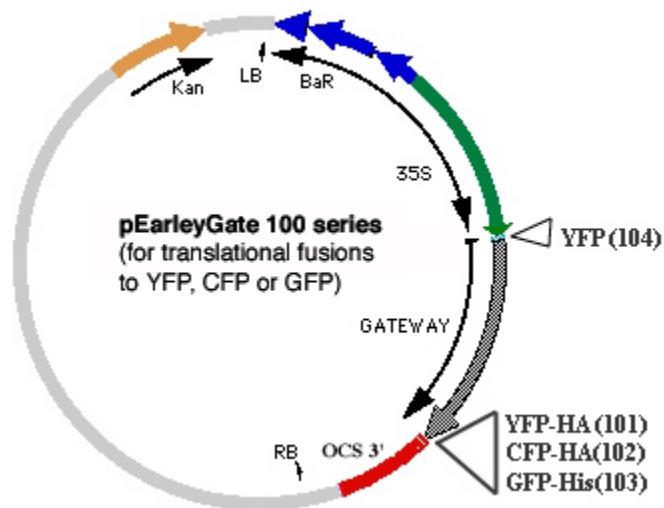


Figura 5 . Mapa general de los vectores destino para expresión en tejidos vegetales: pEarley Gate serie 100.

El mecanismo de clonación de los sistemas Gateway está basado en la inserción de secuencias genéticas a través del sistema de recombinación sitio específico del bacteriofago lambda (Figura 6).

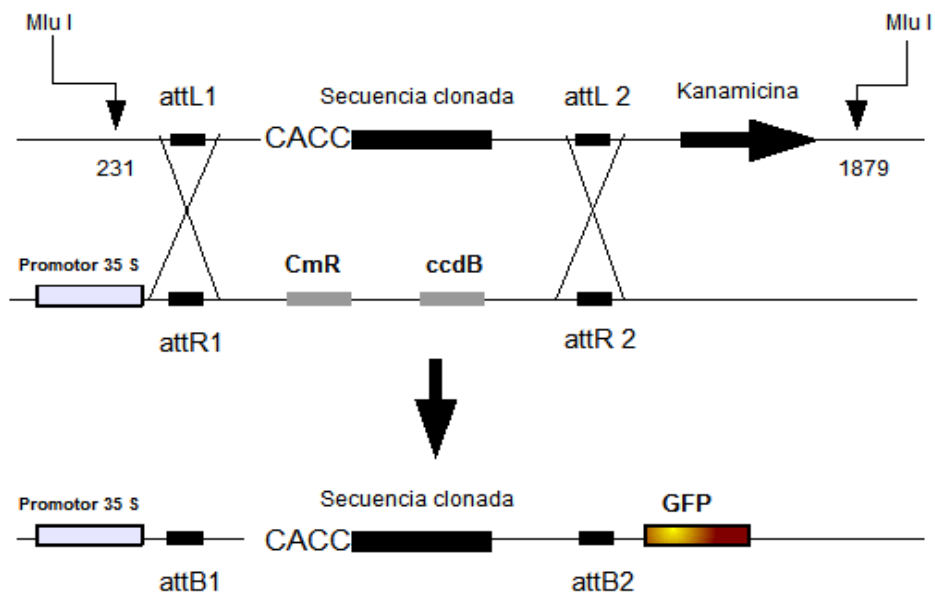


Figura 6 . Diagrama de recombinación homóloga al plásmido destino pEarley Gate 103. Este mecanismo de recombinación representa la transferencia del gen de interés al vector destino, con la correspondiente eliminación de los genes CmR y ccdB, cuya actividad son de resistencia a kanamicina y un gene letal para la mayoría de las cepas de *E. coli*, respectivamente.

Este sistema de recombinación, intercambia la región flanqueada por los sitios attL con la región

localizada entre los sitios attR mediante el uso de LR clonasa (Invitrogen). Esta reacción transfiere la secuencia de interés al vector destino elegido y remueve las secuencias de los genes CmR y ccdB. El producto final de esta recombinación es un plásmido funcional que contiene las secuencias necesarias para promover la expresión del gen de interés en fase con alguna de las proteínas fluorescentes. La expresión a nivel celular de cada gen queda bajo la dependencia del promotor fuerte CaMV 35S. Del total de reacciones de recombinación homóloga realizadas, sólo algunas fueron clonadas correctamente (Tabla 2, pag 9), el resto de las reacciones resultaron ser recombinaciones que no quedaron en fase y, por ende, mal construidas, en otros casos se obtuvo una recombinación con la secuencia invertida. Sin embargo, con estas construcciones también se transformaron plantas por Floral dip, ya que las plantas resultantes serían antisentido para la enzima correspondiente y resultan útiles en el análisis de la función de la proteína. Los datos de estas transformantes no se reportan en este trabajo.

Para confirmar la identidad de las construcciones de cada clona, cada plásmido se aisló y se amplificó por PCR la región comprendida entre el inicio del gen de la AtPPasa y un fragmento del gen reportero perteneciente a alguna de las proteínas fluorescentes (Figura 7). Así mismo, cada plásmido fue secuenciado para su completa valoración de la integridad de la secuencia nucleotídica de cada gen y su integración en fase a la secuencia de la proteína fluorescente correspondiente.

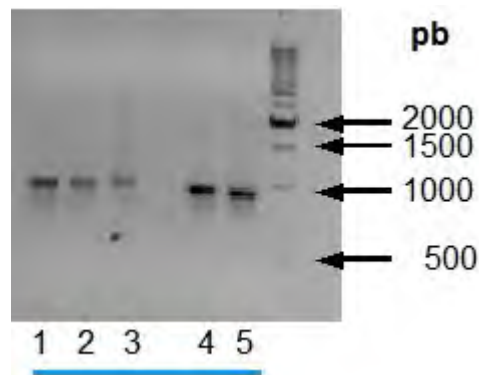


Figura 7. Producto de PCR de los genes AtPPa 1, AtPPa 2, AtPPa 3, AtPPa 4 y AtPPa 5 en fase con la proteína reportero. Cada número corresponde con la respectiva AtPPasa. El oligonucleótido reverse diseñado, solo abarca los primeros 220 nucleótidos que codifican a la proteína fluorescente, por ello, el peso de la secuencia amplificada es de aproximadamente 900 pares de bases, que corresponde al fragmento del gen de la proteína fluorescente y la AtPPasa completa.

Aquellos plásmidos cuya secuencia nucleotídica correspondía a la secuencia deseada, fueron llevados a una concentración de 1µg/µl para ser bombardeados en las células epiteliales de hojas de frijol o

arabidopsis con el fin de generar transformantes transitorias de las diferentes isoformas. Paralelamente, con el fin de generar plantas que expresen de forma constitutiva las diferentes quimeras de sPPias-proteína fluorescente, se llevó a cabo el conocido método *Floral dip*, útil para generar transformantes estables de *Arabidopsis thaliana* mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* por su capacidad de integrar genes exógenos al genoma de plantas.

Predicción de localización subcelular *in silico* de las diferentes isoformas de *Arabidopsis thaliana*.

Con el fin de conocer las probables regiones subcelulares en las que pudieran ser localizadas las diferentes AtPPasas, cada una de las secuencias fue analizada por los programas PSORT (Nakai and Kanehisa, 1992), TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000), LOCTree (Nair and Rost, 2005) y SLPFA (Tamura T and Akutsu T, 2007) para identificar secuencias señales y predecir regiones subcelulares de localización *in silico*. Los resultados de la predicción *in silico* de la ubicación subcelular de estas proteínas se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Predicción de localización intracelular *in silico* de las diferentes isoformas de PPiasas. PSORT y LOCTree; específicos para plantas, TargetP y SLPFA; Específicos de organismos eucariotes.

Isoforma	PSORT	TargetP	LOCTree	SLPFA
AtPPa 1	Citoplasma	Mitocondria	Citoplasma	Núcleo o Citosol
AtPPa 2	Citoplasma	NSS	Citoplasma	Citosol
AtPPa 3	Citoplasma	NSS	Citoplasma	Núcleo o Citosol
AtPPa 4	Citoplasma	NSS	Citoplasma	Núcleo o Citosol
AtPPa 5	Citoplasma	NSS	Citoplasma	Citosol
AtPPa 6	Vacuola	Cloroplasto	Cloroplasto	Mitocondria

NSS, no contiene secuencia señal.

Aún cuando los resultados de la predicción *in silico* no muestran un consenso claro de la región subcelular en la que se localizan estas isoformas, se sugiere que cinco de las seis isoformas son localizadas principalmente en citosol. Este dato no concuerda con los análisis de la distribución subcelular de la actividad de sPPiasas realizados por Weiner y colaboradores (1987), los cuales indican que esta actividad es plastidial. Este mismo trabajo también indica que la mayor concentración de PPi se encuentra en el citoplasma, en donde puede alcanzar concentraciones del orden de 0.3 mM. Por otro lado Farré y colaboradores (2001) demostraron que la concentración plastidial de PPi es muy baja y sugirieron que esto favorece la síntesis de almidón.

La predicción realizada con los programas PSORT y SLPFA de la isoforma AtPPa 6 es al menos, parcialmente incorrecta, dado que ha sido demostrado que esta isoforma puede ser importada y procesada en cloroplastos aislados, lo que indica que al menos una parte de esta proteína sería importada a cloroplasto (Shulze *et al*, 2004). Por supuesto, como puede constatarse con este último dato, las predicciones *in silico no* deben ser consideradas inequívocas y se requiere una demostración experimental para asegurar la localización de una proteína.

Expresión de AtPPasas etiquetadas con GFP, YFP o CFP en plantas.

Con el fin de generar plantas transgénicas que expresen de forma constitutiva las quimeras de AtPPasa-Proteína Fluorescente (GFP, YFP o CFP) se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana* mediante el método de *Floral dip* como lo describe (Zhang, X *et al.*, 2006). Mediante éste método, se pueden empezar a colectar las primeras semillas a los 50 días de haber iniciado el proceso de floral dip. Las plantas que eficientemente incorporaron el gen son seleccionadas por su resistencia al herbicida BASTA™.

Después de asperjar en cinco ocasiones con el herbicida específico resulta fácil identificar plantas modificadas genéticamente (Figura 8), gracias a su habilidad para resistir al herbicida, aquellas plantas sensibles al herbicida presentan blanqueamiento y mueren luego de dos semanas de tratamiento. Las plantas sensibles presentan estrés por el herbicida, pero sobreviven y se recuperan al suspender la aplicación. Sin embargo, para poder asegurar que las plantas resistentes al herbicida son efectivamente plantas transgénicas que portan el gene de interés, se realizaron ensayos de PCR para confirmar la presencia del gen de AtPPasa ligado al de la proteína fluorescente, en el DNA extraído de la planta. De esta manera, se confirmó la presencia del segmento completo, incluyendo el gene de interés unido a la proteína fluorescente. A partir de estas plantas se obtuvieron preparaciones fijas y en fresco para microscopía confocal.

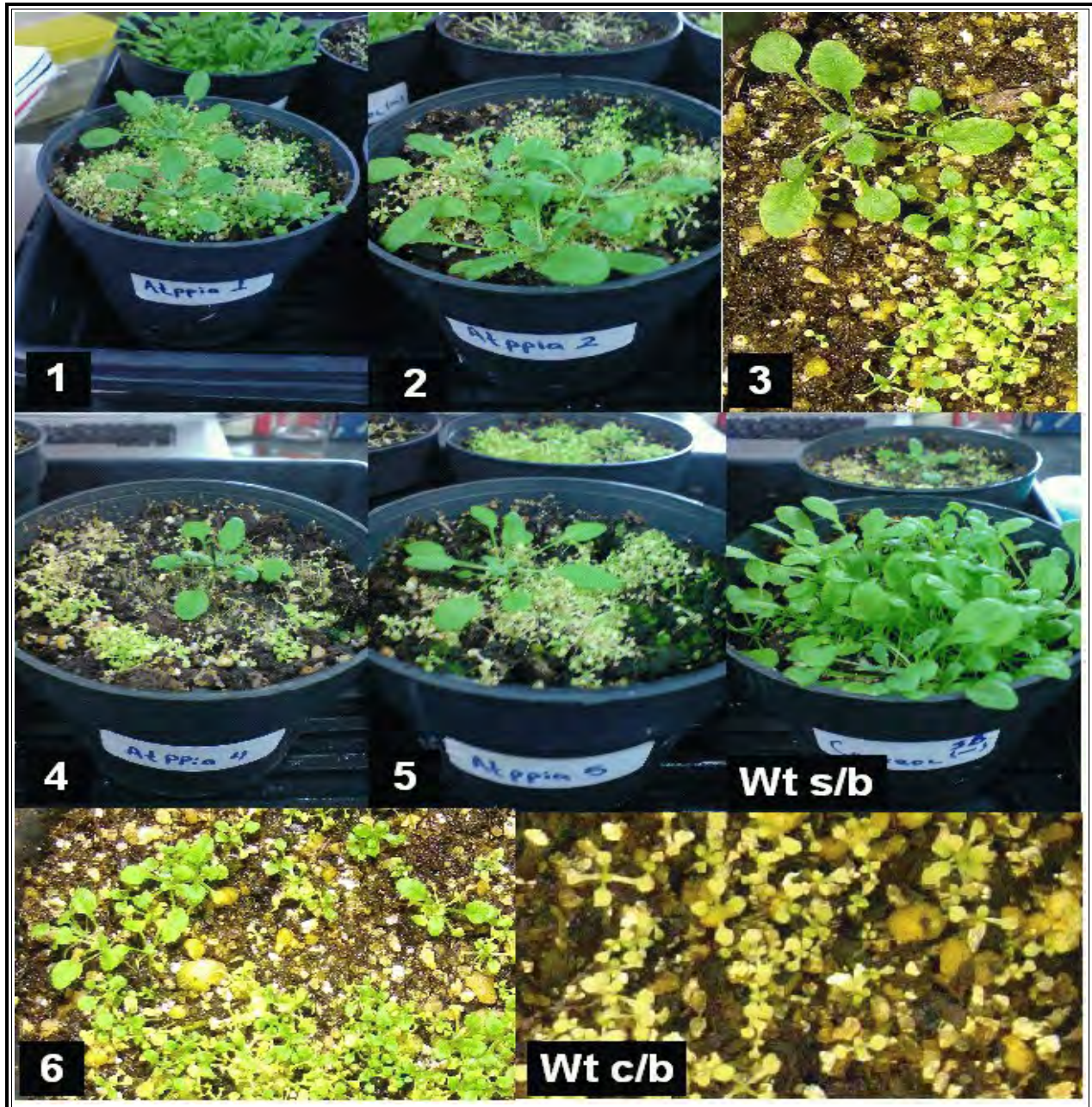


Figura 8. Proceso de selección de plantas resistentes al tratamiento del herbicida BASTA™ (Glufosinato de Amonio 1 mg/l) Las plantas se fotografiaron a las 7 semanas. El tratamiento de herbicida se aplicó durante las primeras dos semanas. La numeración de cada fotografía corresponde al gen de cada AtPPasa. Wt c/b y Wt s/b corresponden a plantas control con y sin tratamiento del herbicida respectivamente.

Localización intracelular de las diferentes isoformas de *Arabidopsis thaliana* in vivo.

Nuestro primer enfoque fue realizar la expresión transitoria de las AtPPasas por métodos de

biobalística. Este enfoque presenta la ventaja de ser rápido (1 a 2 semanas, si se tiene las plantas disponibles), además de que puede ser aplicable a varias especies vegetales, incluyendo algunas para las cuales la tecnología de recuperación de transgénicas no está bien desarrollada (como, por ejemplo, frijol). A pesar de que se intentaron clonar las seis isoformas en fase a los tres diferente plasmidos pEarley Gate 101, 102 y 103 para expresar al extremo carboxilo terminal las proteínas CFP, YFP o GFP, respectivamente, no todas las construcciones resultaron correctas, dado que en muchos de los intentos de recombinación la secuencia codificante no quedó en fase y con ello el marco de lectura de la proteína reportera se modificó también. En otros casos, la recombinación ocurrió con inversión del inserto, con lo que se generaron construcciones en antisentido. Dichas construcciones también fueron introducidas en plantas transgénicas, pero el análisis de esos datos no se incluye en este trabajo. En la tabla 2 se resumen las construcciones quiméricas que no presentaron errores en el proceso de recombinación y que cuentan con la secuencia de DNA esperada. La localización de cada isoforma se presenta de forma individual y para algunas de ellas se muestra la pared celular visualizada con el marcador fluorescente calcofluor.

Tabla 2. Quimeras moleculares utilizadas en los procesos de transformación transitoria o estable.

	AtPPasa1	AtPPasa 2	AtPPasa 3	AtPPasa 4	AtPPasa 5
Quimera obtenida	AtPPa 1-CFP AtPPa 1-YFP	AtPPa 2-CFP	AtPPa 3-GFP	AtPPa 4- YFP	AtPPa 5-YFP AtPPa 5-CFP

Fluorescencia intrínseca de las células vegetales

Para determinar la existencia de señales de fondo fluorescente que pudieran presentarse en las regiones en las que se desea introducir tinciones o proteínas fluorescentes foráneas, se observaron células de hojas de *Arabidopsis thaliana* y de *Phaseolus vulgaris* al microscopio confocal. La figura 9 (A-D) contiene únicamente los resultados de las observaciones realizadas en *Arabidopsis*, no se presentan las de frijol, pero presentan el mismo patrón que las de *Arabidopsis*. Tales imágenes de la figura 9 muestran la ausencia de señal emitida por las proteínas GFP, YFP y CFP aún al ser excitadas a las longitudes correspondientes (tabla Error: No se encuentra la fuente de referencia), ya sea en las preparaciones en vivo como en las preparaciones fijas. Es posible apreciar únicamente la autofluorescencia emitida por la clorofila presente en cloroplastos en color rojo.

Así también, se observaron plantas transgénicas portando construcciones de los plásmidos pEarlyGate 103 en los que simplemente se eliminó el gene suicida para permitir la transformación de plantas que

expresen a GFP bajo el control del promotor CMV35S. Dichas imágenes se muestran en la figura 9 (E y F) y se puede apreciar que la fluorescencia está restringida a la región citoplásmica, pero no aparece en núcleo y no colocaliza con la autofluorescencia de los cloroplastos (estructuras de forma ovalada de color rojo).

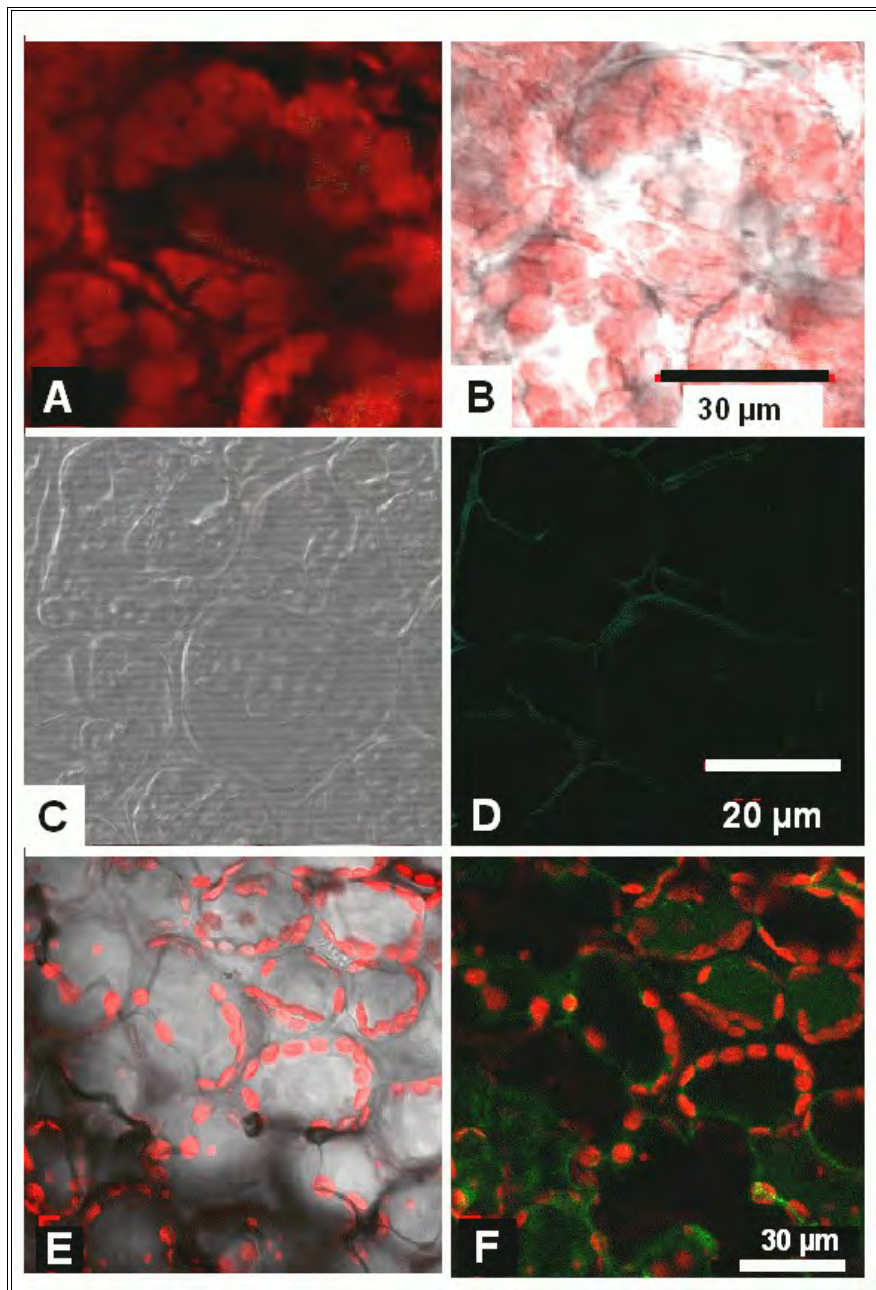


Figura 9. En A, B, C y D se muestran las células de las hojas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo columbia, tipo silvestre). Las imágenes en A y B pertenecen a células sin tratamiento de fijación, observadas en tejido vivo y muestran el patrón de autofluorescencia que emite la clorofila presente en cloroplastos pero ausente de la fluorescencia emitida por CFP, GFP o YFP aún cuando fueron excitadas a cada una de las longitudes correspondientes. C y D son preparaciones fijadas y teñidas con Calcofluor™ y nuevamente hay ausencia de fluorescencia emitida por CFP, GFP o YFP. En E y F se presenta la expresión de la proteína GFP bajo el promotor 35S como control positivo y a diferencia de las anteriores se aprecia la señal de GFP en color verde a nivel del citosol y la clorofila en rojo.

La expresión transitoria de la proteína AtPPa1-CFP en hojas de *Phaseolus vulgaris* se muestra en color cian en la figura 10, en ella es posible observar que la AtPPa1 está preferentemente localizada en regiones citosólicas. Así también, se aprecian amplias regiones subcelulares libres de señal fluorescente perteneciente a las regiones vacuolares (v). Sin embargo, al enfocar con mayor aumento es posible diferenciar con mayor claridad que la proteína de fusión AtPPa1-CFP también es localizada en el núcleo de las células, en donde la señal es particularmente intensa (Fig. 10, paneles B-a, B-b y B-c).

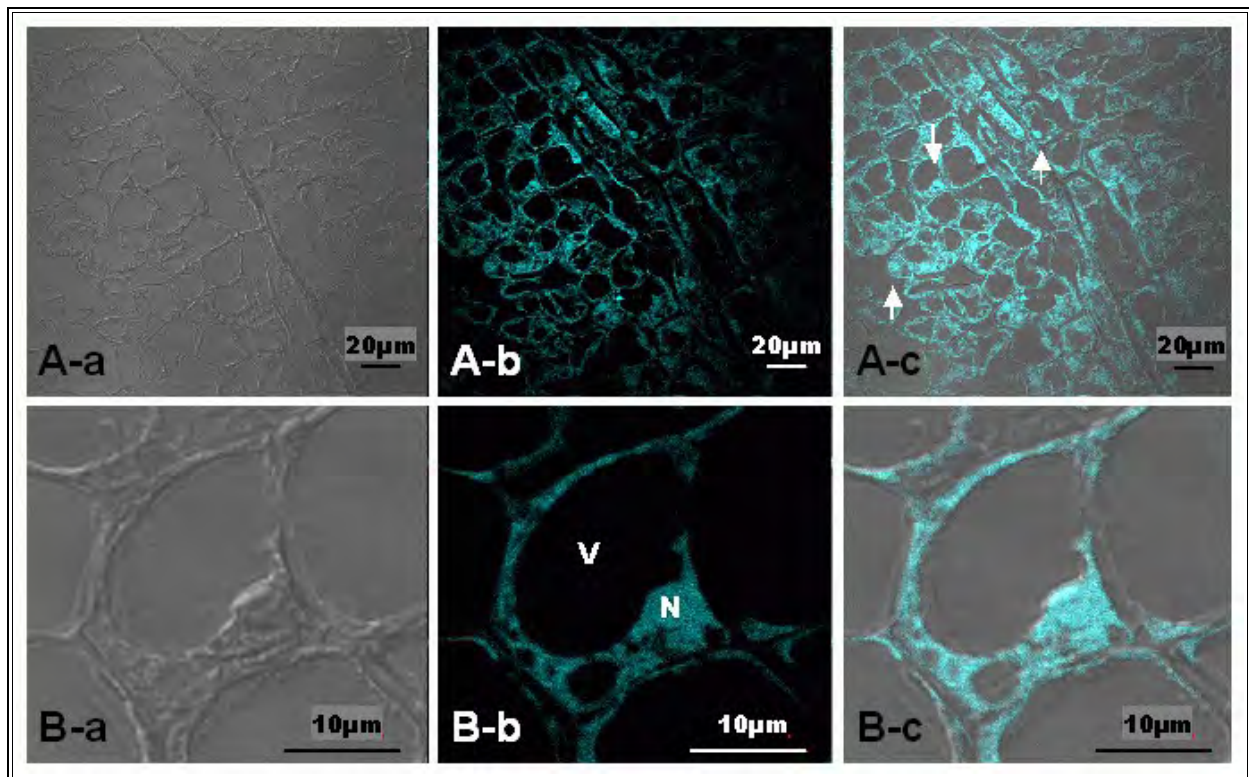


Figura 10 . Expresión transitoria de AtPPa1-CFP en células fijas de hojas de *Phaseolus vulgaris*. A, campo visual con diversas células transformadas, A-a, A-b y A-c corresponden al contraste de fases, señal de fluorescencia y su superposición, respectivamente. B-a, B-b y B-c, enfoque de una célula mostrando el contraste de fases, fluorescencia y su superposición, respectivamente (amplificación 1000X). Las flechas blancas o la letra N señalan las estructuras subcelulares que aparentan ser los núcleos de las células y la letra V señala a la vacuola. La señal en color cian está limitada a la región citosólica y nuclear.

Para observar con mayor detalle el resultado anterior, se realizaron cortes ópticos de 0.4μm en el eje "Z" de los cortes vegetales. Con ello, fue posible identificar con mejor claridad que esta isoforma no sólo se localiza a nivel citosólico, sino a nivel nuclear (figura 11). En primera instancia, este resultado no era esperado, ya que la predicción de localización con "SLPFA"(Tabla 1) es ambigua, y de los cuatro programas de predicción usados, SLPFA es el único de ellos que predice la localización de la mitad de las isoformas en citosol ó núcleo.

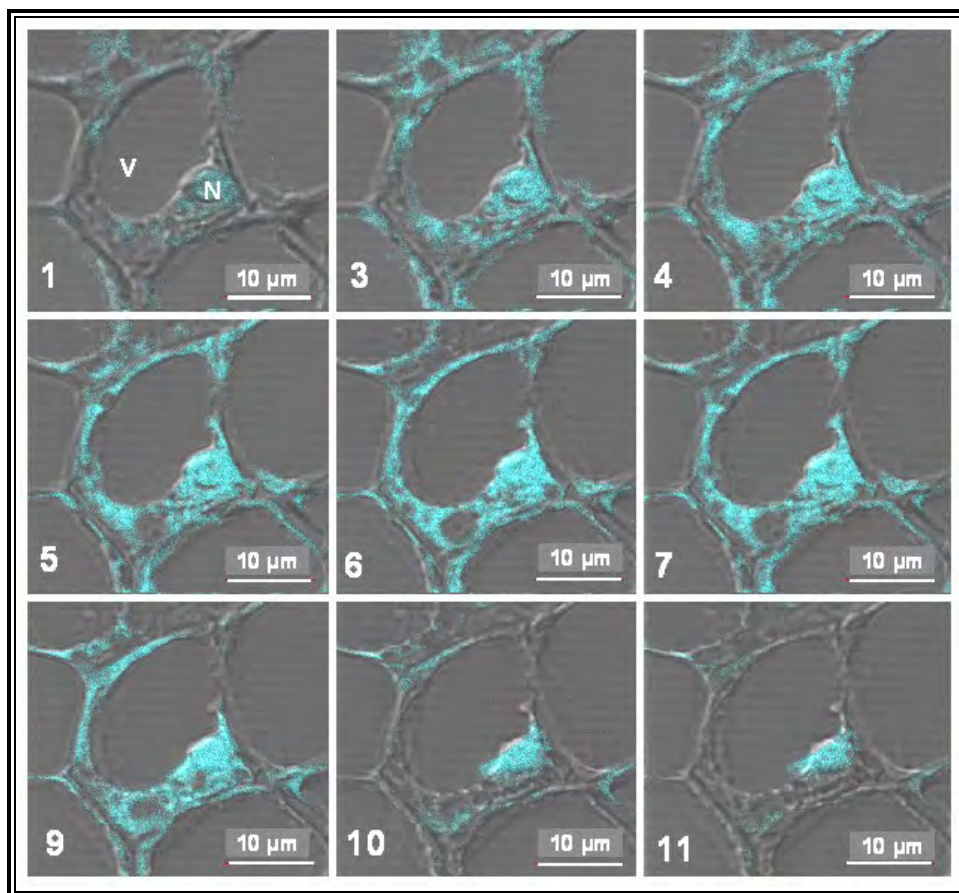


Figura 11. Expresión transitoria de AtPPa1-CFP en hojas de *Phaseolus vulgaris*. Los cuadros 1 a 11 muestran cortes ópticos cada 0.4 µm en Z (amplificación 1000X). Las imágenes muestran la señal de contraste de fases superpuesta a la fluorescencia de CFP. El núcleo (N) se observa como una elipse de 6x4 µm aproximadamente. Al interior de la célula se observa una cavidad aparente de unos de unos 13X15 µm aproximadamente, que corresponde a la vacuola (V).

Sin embargo, no es sorprendente que al menos una de las isoformas de AtPPasa se halle presente a nivel nuclear, dado que en este compartimiento se localizan al menos, la síntesis de DNA y RNA, procesos de gran importancia que generan PPi como subproducto, por lo que debe ser hidrolizado o removido, para impulsar estas reacciones hacia la vía anabólica.

De forma adicional, en la figura 12 se presenta el resultado de expresión transitoria de AtPPa1-YFP en células de *Phaseolus vulgaris*, así como en transformaciones estables de *Arabidopsis thaliana*. Ambas preparaciones, fueron fijadas y teñidas con el marcador fluorescente Calcofluor™ (Invitrogen U.S.A) para contrastar las paredes celulares del resto de la célula. Al igual que en la figura 10, la señal emitida por la AtPPa1-YFP es localizada en citosol y núcleo, a pesar de ser *Arabidopsis thaliana* y

Phaseolus vulgaris dos dicotiledoneas de familias diferentes, Brassicaceae y Fabaceae repectivamente.

Los resultados experimentales indican que es posible que la proteína AtPPa1 contenga secuencias de tránsito al núcleo y que estas secuencias hayan sido identificadas por el programa SLPFA, dado que fue el único programa que pudo predecir una localización nuclear de esta isoforma. O bien, que esta isoforma pueda formar interacciones o complejos con alguna proteína pequeña de tránsito nuclear o quizás aún que esta proteína se difunda al núcleo de manera activa.

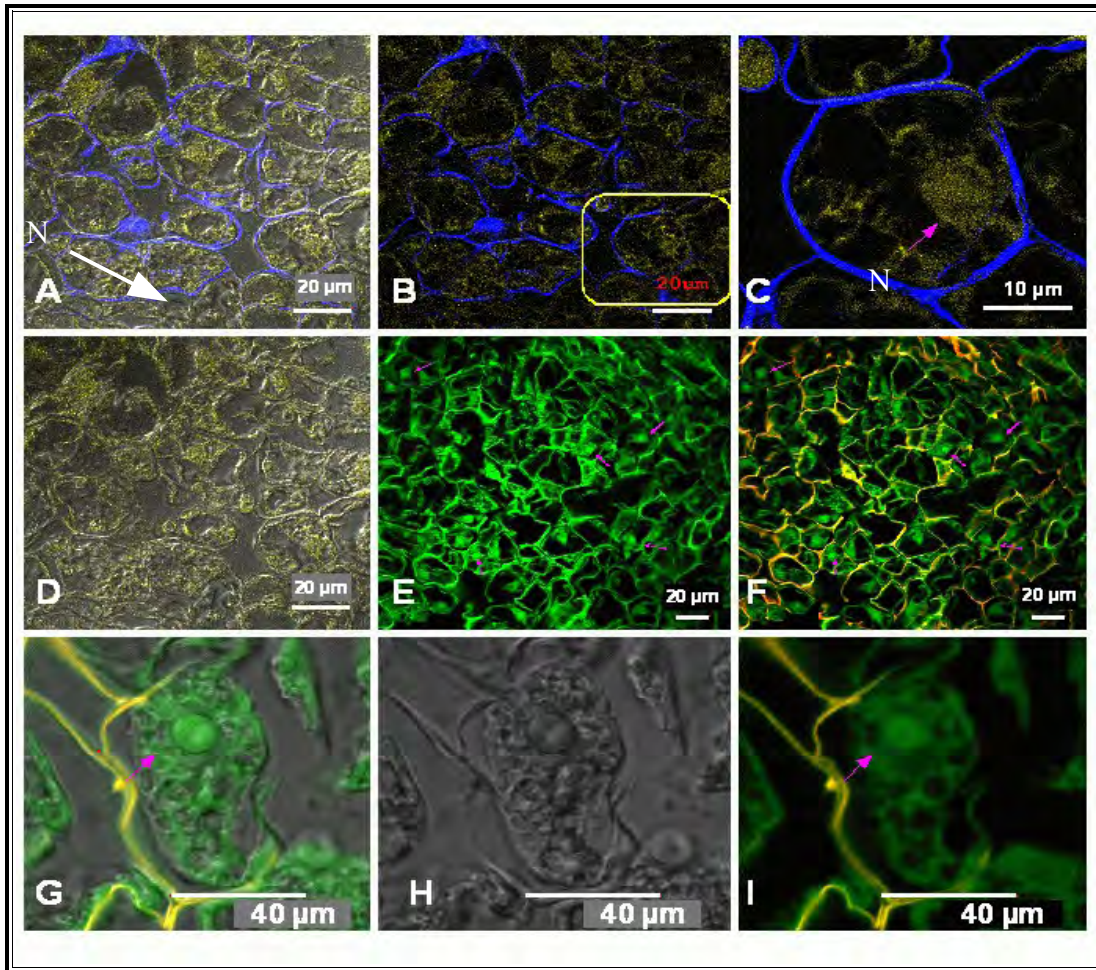


Figura 12 Expresión transitoria de la AtPPa 1-YFP en células de *Phaseolus vulgaris* (A, B, C y D) y transformaciones estables de *A. thaliana* (E, F, G, H e I). En “A” se presenta la superposición del contraste de fases con la señal emitida por AtPPa 1-YFP y la señal emitida por el colorante Calcofluor™ (azul). B; corresponde a las mismas señales que en A, pero en ausencia del contraste de fases. C; corresponde a la célula que es enmarcada en B con un cuadro amarillo. D; Pertenece a las mismas señales que A, pero en ausencia de la señal del Calcofluor. En E se presenta un conjunto de células fijas de *A. thaliana* que expresan de forma estable la quimera de AtPPa1-YFP. La señal registrada fue ajustada al color verde. F; muestra las mismas células que E con la adición de la señal emitida por calcofluor (amarillo). G, H e I; muestran el enfoque de una célula con aumento de 1000X en superposición de contraste de fases y fluorescencia, contraste de fases y señal de fluorescencia respectivamente. Las flechas señalan los núcleos de las células.

Atppa 2 y AtPPa 3

A diferencia de la AtPPa 1, la localización subcelular observada durante la expresión transitoria de las proteínas de fusión AtPPa 2-CFP (Fig. 13) y AtPPa 3-GFP (Fig. 14) en hojas de *A. thaliana*, es similar para ambos casos, pues comparten el mismo patrón de localización. Sin embargo, la localización de AtPPa2-CFP es ligeramente más clara, ya que el nivel de señal de emisión resultó ser mayor para esta isoforma. Por sus tamaños y distribución, resultan muy evidentes algunas estructuras subcelulares, lo que permite identificar que la señal de fluorescencia de CFP está restringida al citosol. Además, los cloroplastos (de fácil identificación por su autofluorescencia) no presentaron colocalización con la señal de CFP (Figura 13).

En el caso de la AtPPa3-GFP (Fig. 14), el patrón es semejante, aunque la distribución aparece un poco más granulosa, esta isoforma podría estar parcialmente asociada a alguna estructura citoplasmática cuya identidad no es clara. En la imagen del panel F de la figura 14 se puede apreciar una débil superposición de la señal de autofluorescencia de la clorofila, que resulta demasiado débil para ser concluyente. Es claro que la asociación de esta isoforma con otras proteínas celulares merece un análisis posterior. Sin embargo, a pesar de que las imágenes no son lo suficientemente claras, es posible identificar que la señal de fluorescencia se distribuye principalmente a nivel de citoplasma y en ambos casos, no hay evidencia alguna de estar localizadas en el núcleo como sí lo está la isoforma AtPPa 1.

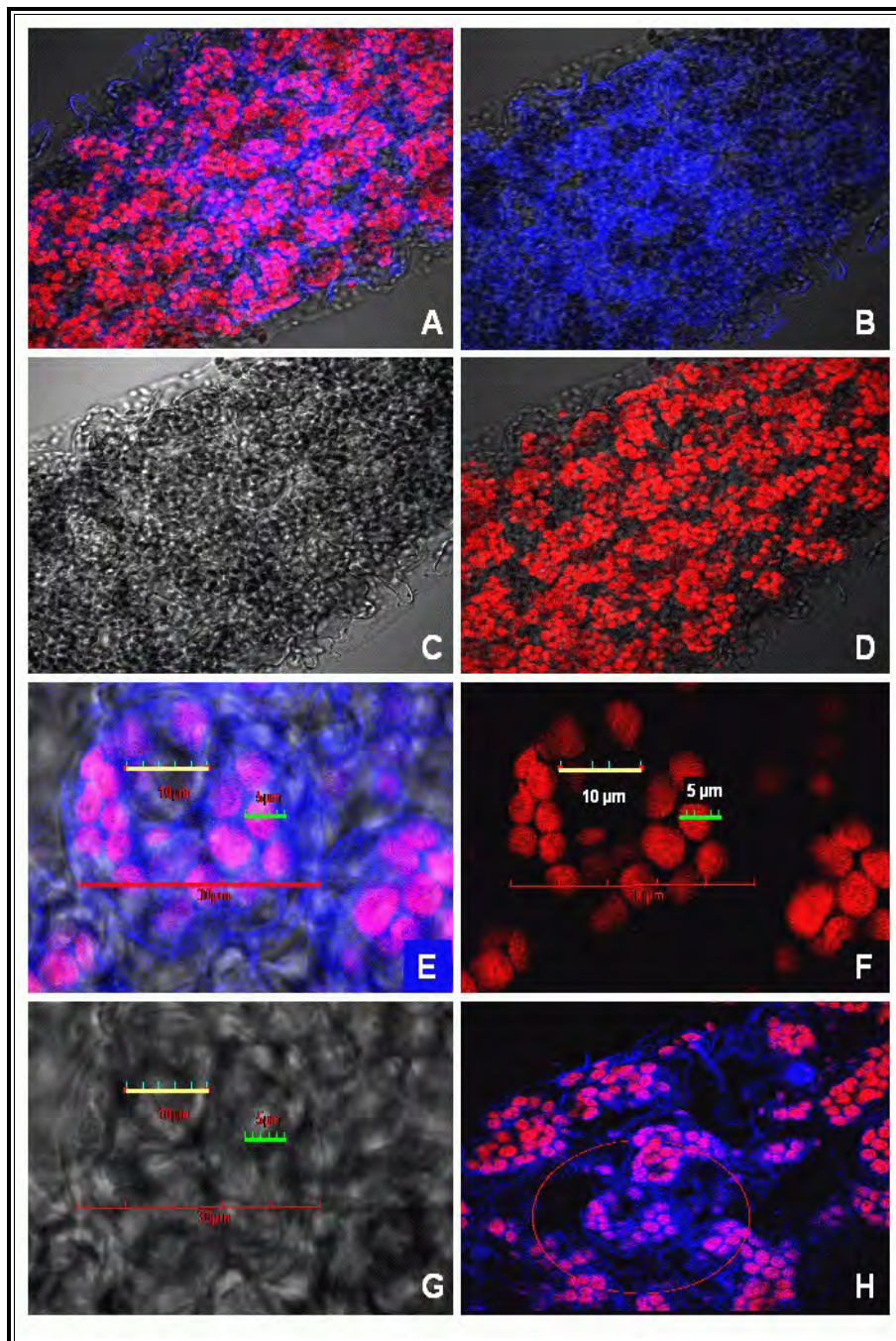


Figura 13. Localización subcelular de AtPPa2-CFP mediante expresión transitoria en hojas de *A. thaliana*. A, superposición de la fluorescencia emitida por CFP y la autofluorescencia de cloroplastos (objetivo de 40X); En B, C y D se presenta la fluorescencia emitida por CFP, el contraste de fases y la autofluorescencia de cloroplastos respectivamente. En E, F y G se muestran en aumento de 1000 X la región limitada por el círculo rojo del panel H. El panel E presenta la superposición de la fluorescencia de CFP y la autofluorescencia de cloroplastos y en F y G se presentan la autofluorescencia de cloroplastos y el contraste de fases, respectivamente. El panel H muestra una región de tejido celular enfocado con el objetivo de 60X.

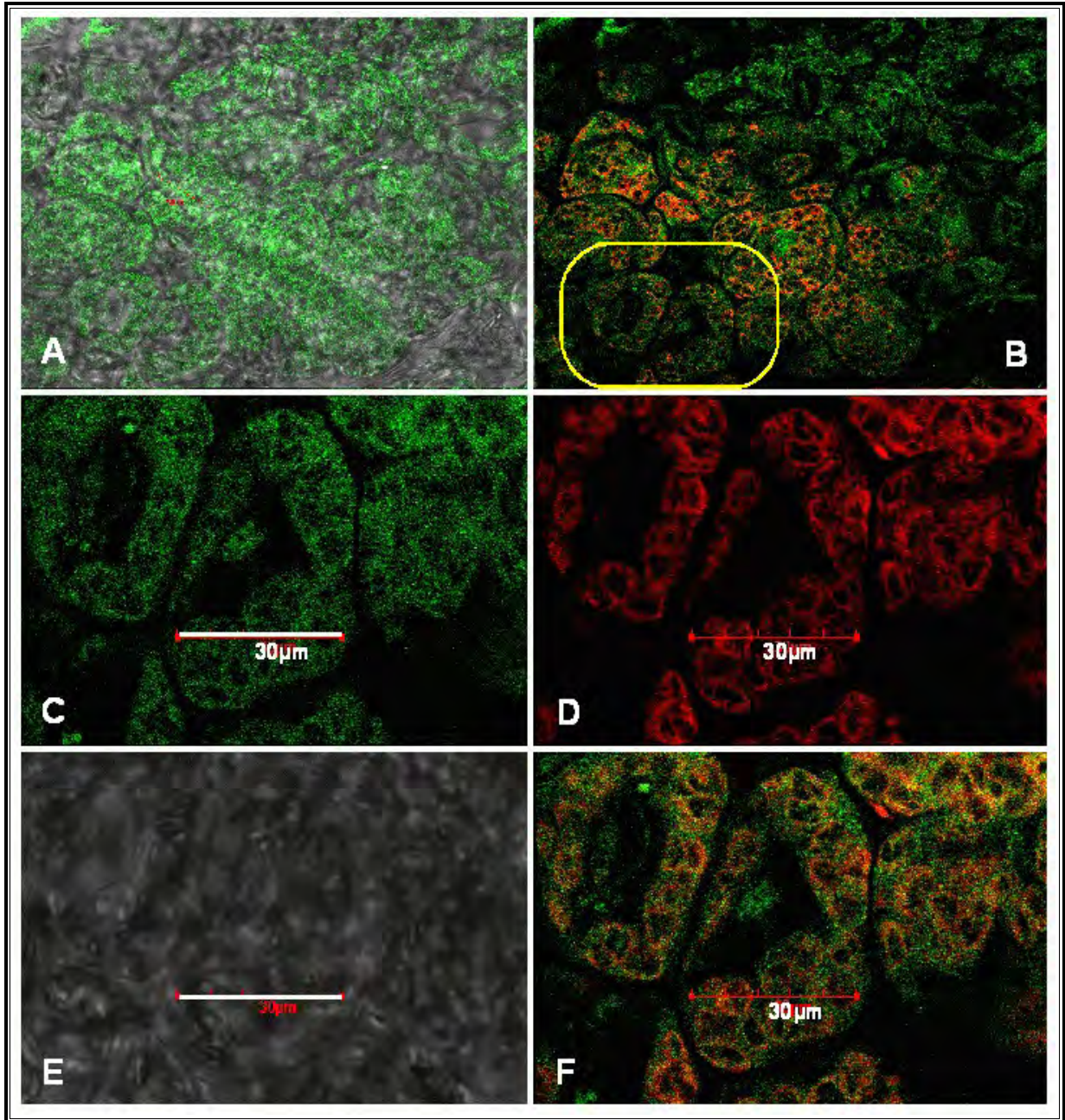


Figura 14. Expresión transitoria de AtPPa3-GFP en hojas de *A. thaliana* (observación en fresco, objetivo 60X). A. fluorescencia superpuesta a la imagen de contraste de fases. B, fluorescencia de GFP superpuesta a la autofluorescencia de la clorofila. C, D, E y F, muestran la región enmarcada en amarillo del panel B. C, señal de GFP; D, señal de clorofila; E, contraste de fases; F, superposición de C y D.

AtPPa 4 y AtPPa 5

La proteína recombinante AtPPa 4-YFP presenta un patrón de localización distinto al que presentan las isoformas AtPPa1, AtPPa2 y AtPPa3. Para la isoforma AtPPa 4 se obtuvieron dos distintos patrones de fluorescencia (Fig. 15 y 16). Por un lado, en células de frijol la expresión transitoria no está claramente definida a nivel citoplásmico. En la figura 15 se puede apreciar que la señal de fluorescencia se distribuye alrededor de posibles organelos celulares, como si se encontraran a nivel periférico de estos. Cabe resaltar que estas muestras fueron sometidas a fijación, tratamiento que involucra deshidratación e hidratación del tejido en diferentes concentraciones de etanol, a través del cual, la clorofila presente en cloroplastos es lavada, lo que dificulta ubicar la posición de los cloroplastos y determinar si la señal de fluorescencia rodea a estos organelos. Sin embargo, en transformantes estables de *Arabidopsis thaliana*, la quimera AtPPa 4-YFP (Figura 16) presenta un patrón de localización a nivel citosólico, acompañado de señales singulares en partículas de gran intensidad. Es claro, que el simple tamaño y forma de las partículas no son suficiente para identificarlas y que se requieren experimentos más detallados para definir su naturaleza de manera certera. Sin embargo, según lo reportado por Köler R *et al* (1997), su tamaño y distribución coincide con la de mitocondrias; aunque, según lo reportado por Teixeira *et al.*, 2005, estos cuerpos particulados de gran intensidad de fluorescencia podrían ser cuerpos de procesamiento (P-bodies), que principalmente contienen mRNA's no traducidos. Estos cuerpos P se generan ante situaciones de estrés en la planta. Insistimos en que ambas sugerencias sólo se plantean como posibilidades, dada la carencia de un resultado concluyente que sustente la identificación.

Un patrón de distribución semejante es que se presenta con la quimera AtPPa 5-YFP (Figura 17). Sin embargo, la expresión transitoria de AtPPa 5-YFP en células fijas de *Phaseolus vulgaris* presenta una evidente localización en citosol, pero la señal emitida en transformantes estables de *A. thaliana* no sólo es de localización citosólica sino que además, es en forma de pequeñas partículas de características similares a las encontradas en la figura 16. Para facilitar la visualización de dichos gránulos o partículas de mayor intensidad, se realizó la observación celular con cortes ópticos seriados en el CLSM, para reconstruir una posible imagen en 3 D y obtener mejores referencias en cuanto a su forma y tamaño de estas partículas. En la figura 18 se muestra el resultado de los cortes obtenidos y se aprecia que dichas partículas tienen una morfología y tamaño semejante al que reporta Köler R *et al* (1997) quienes las señalan como mitocondrias. Sin embargo, a pesar de ser estructuras muy parecidas no es posible sostener cabalmente tal aseveración, dado que bajo nuestras condiciones no contamos con los controles necesarios que nos indiquen que esas estructuras son mitocondrias. Por lo tanto, la posibilidad de que sean mitocondrias o cuerpos P u otro tipo de estructura quedará latente hasta futuros estudios que

identifiquen con precisión el tipo de estructura.

Cabe hacer mención, que en todas las muestras, los registros de fluorescencia obtenidos de las proteínas recombinantes, autofluorescencia de cloroplastos y marcador de pared celular se realizó de manera independiente para evitar intercambio de señales entre ellas.

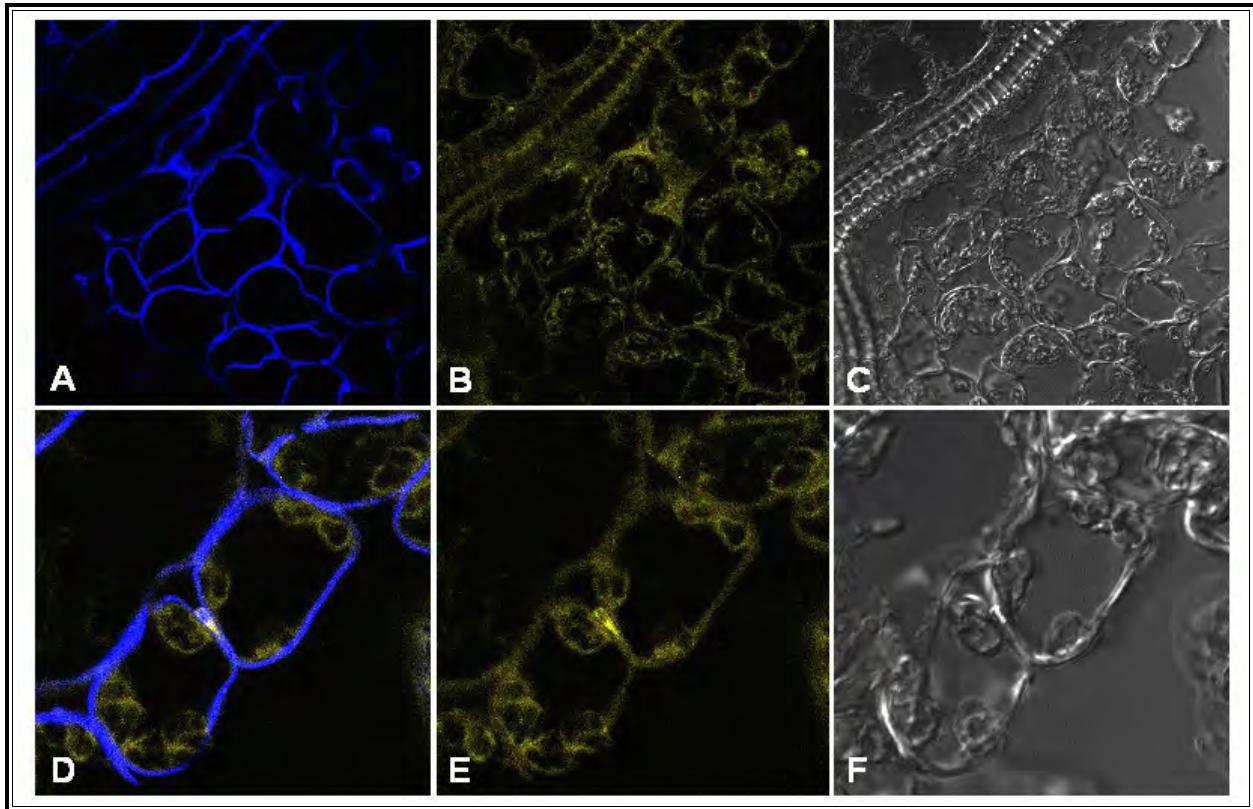


Figura 15. Expresión transitoria de la isoforma AtPPa 4-YFP en células fijas de *Phaseolus vulgaris*. En amarillo se presenta la señal de fluorescencia emitida por AtPPa4-YFP y en azul la fluorescencia del calcofluor. A, B y C muestran el mismo campo celular en el que se presentan la señal de Calcofluor, la señal de la AtPPa4-YFP y el contraste de fases respectivamente. En los paneles D, E y F se presentan la superposición de la señal de fluorescencia del calcofluor y de AtPPa4-YFP, la fluorescencia de AtPPa4-YFP y el contraste de fases, respectivamente.

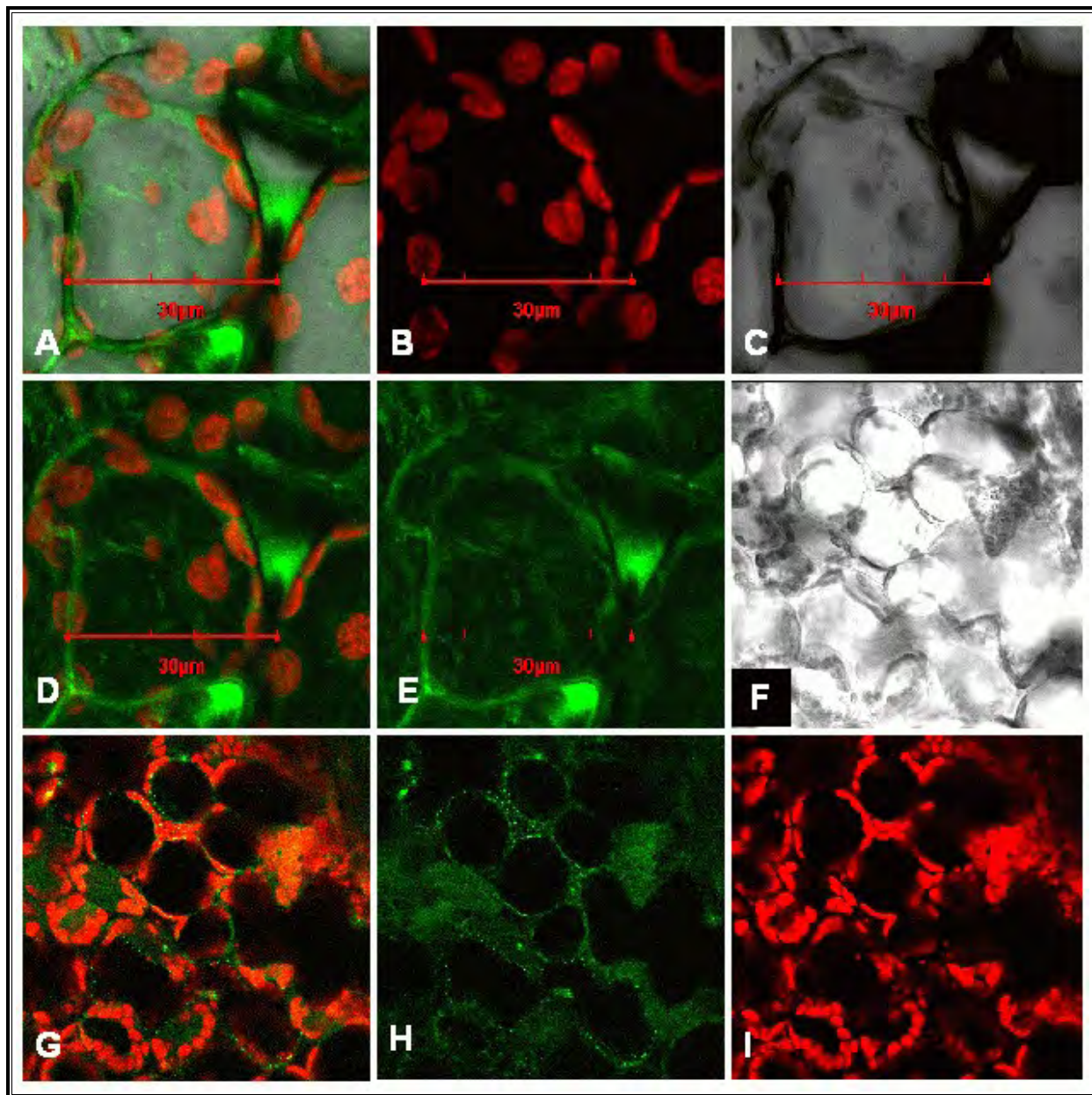


Figura 16 Localización subcelular de la isoforma AtPPa 4-YFP en células de *Arabidopsis thaliana*. mediante transformación estable. A, B, C, D y E muestran el mismo campo celular (objetivo 40X y acercamiento electrónico de 2X). En B se muestra la señal de clorofila (roja); C, el contraste de fases; E, la señal de YFP (verde). Mientras que la superposición de B, C y E se muestran en A. En D se presenta la superposición de B y E. Las imágenes del panel F, G, H e I pertenecen a otro campo celular y fueron obtenidas con un objetivo de 40X. En F se presenta el contraste de fases; H, la señal de AtPPa4-YFP; I, autofluorescencia de la clorofila; y en G, la superposición de H e I.

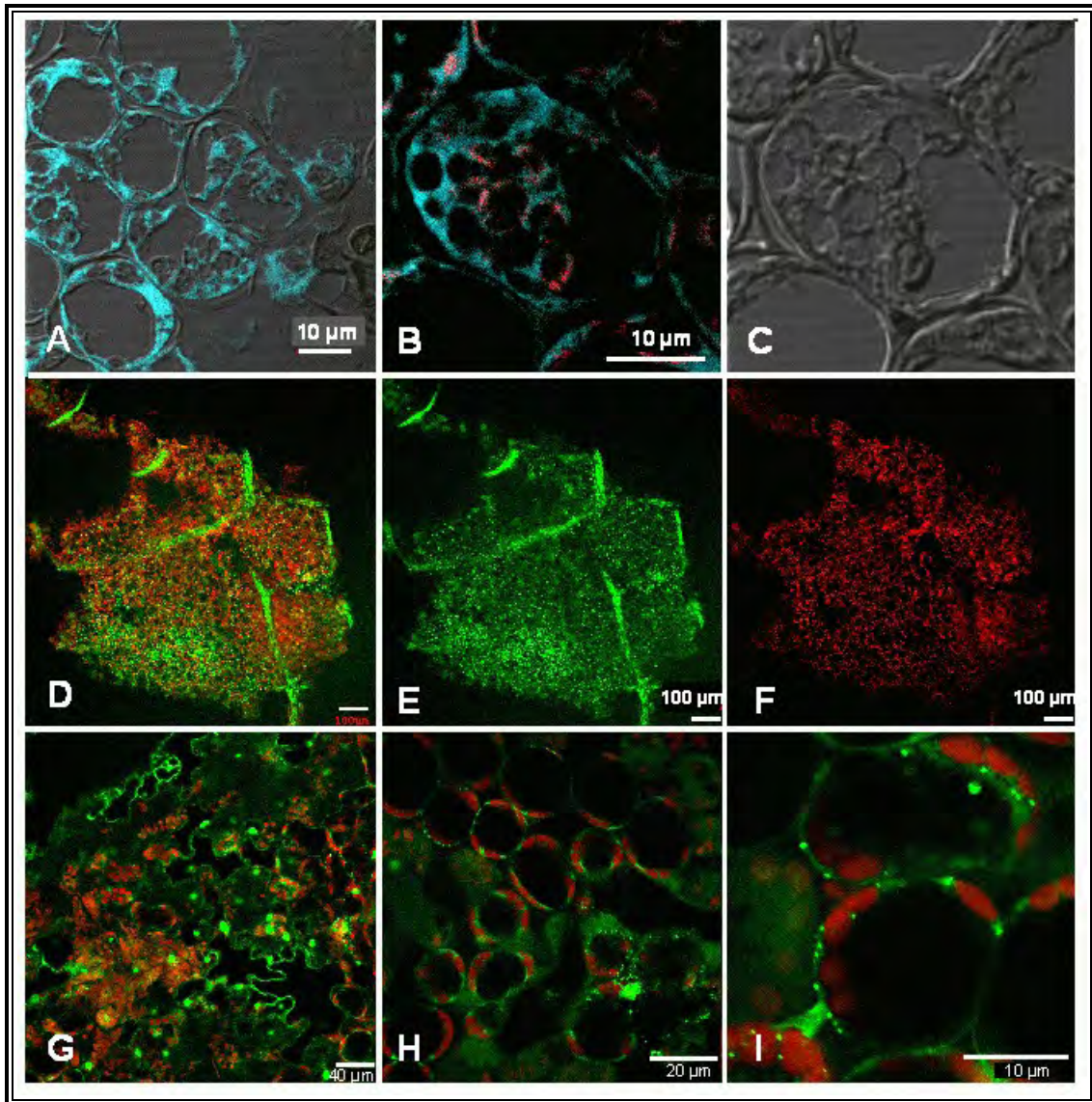


Figura 17 . Expresión transitoria de AtPPa 5-CFP en células fijas de *Phaseolus vulgaris* (A, B y C) y de AtPPa 5-YFP en células transgénicas estables de *A. thaliana* transgénica (D, E, F, G, H e I). En A se muestra la superposición de la señal de AtPPa 5-CFP y del contraste de fases (objetivo 40X); B, superposición de las señales de AtPPa 5-CFP y clorofila en un acercamiento de A; C, Contraste de fases de B. Los paneles D, E y F muestran la superposición de señales de fluorescencia de AtPPa5-YFP (verde) y clorofila (roja) en células de *A. thaliana* transgénicas estables (objetivo 10X). E y F son las señales individuales de AtPPa5-CFP y clorofila respectivamente. G y H señales de AtPPa5-YFP (verde) y clorofila (roja) en dos campos diferentes de la hoja respectivamente (10X); I, acercamiento óptico del panel H (objetivo de 40X y zoom electrónico 2X).

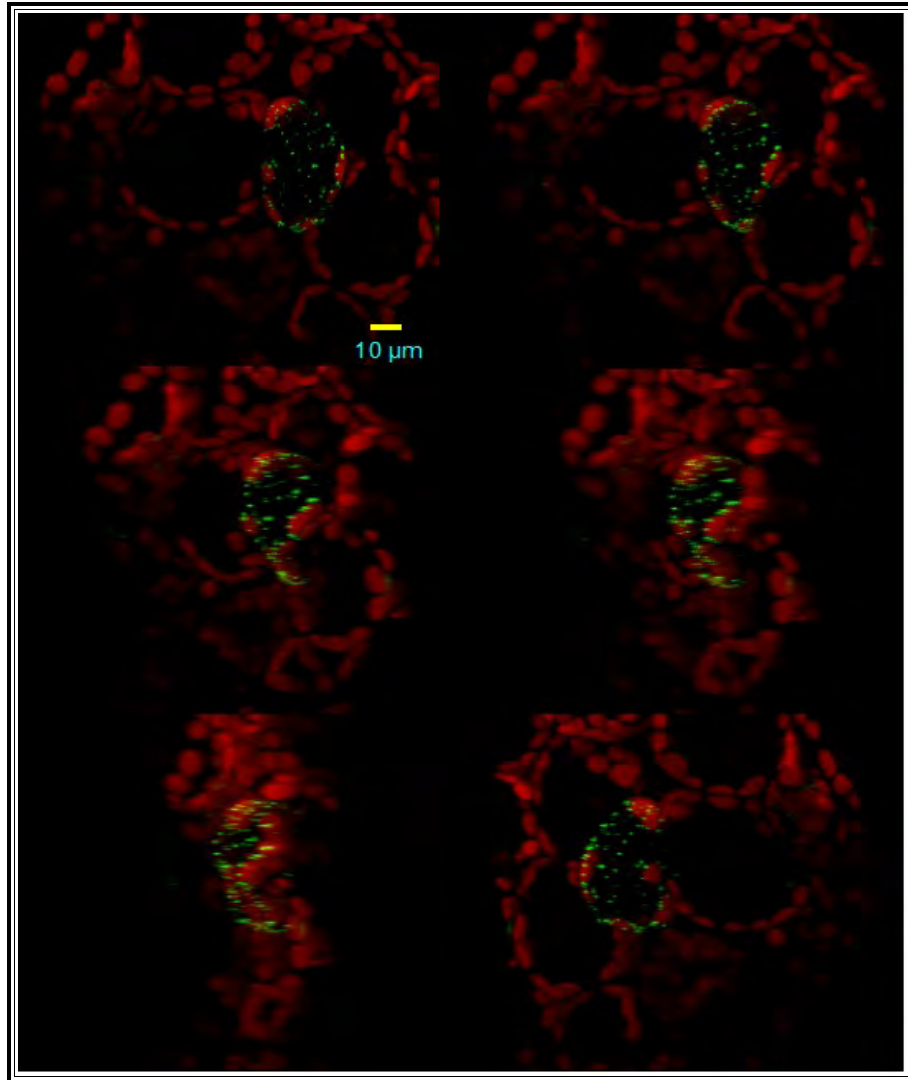


Figura 18. Reconstrucción 3D a partir de cortes ópticos en "Z". En verde se muestran las señales obtenidas por la expresión transitoria de la proteína AtPPa 5-YFP en células de *A. thaliana* en fresco. En rojo se muestra la señal emitida por autofluorescencia de cloroplastos (objetivo 40X). Los diferentes cuadros son resultado de una rotación de la reconstrucción.

La posibilidad de obtener una imagen en tercera dimensión a partir de cortes ópticos generados por microscopía confocal, permite observar con mejor detalle y ubicar fuera del plano X,Y la conformación de las estructuras observadas. En la figura 18, podemos observar que en el campo enfocado y conformado por seis células, sólo una de ellas emite señal fluorescente en pequeñas partículas distribuidas al interior de una célula. Esta peculiaridad de obtener señal fluorescente al interior de la célula en forma particularizada es la que se ha estado observando de manera constante en las figuras 16 (G, H e I) y 17 (D-I) correspondientes a las isoformas AtPPa4 y AtPPa5 respectivamente. Tal patrón es muy similar a la que reporta Köler R *et al.*, (1997) en relación al marcaje de mitocondrias *in vivo* con la proteína verde fluorescente. Sin embargo, esta no es razón suficiente para asegurar que estas

estructuras fluorescentes que se presentan en nuestros experimento sean también mitocondrias. La identificación certera de dichas partículas deberá abordarse en estudios futuros.

Purificación y caracterización de isoformas de PPasas de *Arabidopsis thaliana* en bacterias.

Mediante ensayos de PCR conducidos con *Pfu* polimerasa se amplificaron cada una de las secuencias codificantes de las isoformas de sPPiasas de *Arabidopsis thaliana* (Figura 8) cada gen amplificado se purificó y se clonó en el vector de expresión pET101/D-TOPO. Este plásmido fue seleccionado por poseer una secuencia de resistencia a ampicilina, un sitio de unión a ribosoma, y un sitio de clonación direccional, así como una etiqueta de histidinas al extremo carboxilo terminal para la purificación de la proteína recombinante. Una vez clonados los genes en el plásmido se transformaron células *E coli* One Shot TOP 10 y *E coli* BL21 DE3, las primeras para mantener el plásmido en conservación y las segundas para expresar las proteínas de interés.

Las seis construcciones realizadas fueron secuenciadas para confirmar la correcta clonación en fase con el gen de interés. Los resultados obtenidos de la secuenciación confirmaron errores en el extremo 3' del sitio de recombinación lo que originó errores en el marco de lectura y por ende, pérdida de la etiqueta de seis histidinas. Es poco clara la razón por la que dicha recombinación falló en las seis diferentes construcciones, por lo que suponemos que se trata de una característica asociada a la secuencia propia de bases en el extremo amino de los genes de PPasas de *Arabidopsis* que provoca una recombinación inadecuada en el sitio attB2 del plásmido elegido.

Por ello, se siguieron las técnicas de purificación tradicionales basadas en el uso de diferentes tipos de cromatografías. Se comenzó con una resina de intercambio iónico, seguida de cromatografía de hidrofobicidad (Phenyl Sepharose) y, por último, una resina de exclusión molecular (Superdex 75). Dicho protocolo ya había sido probado por Chávez-Montes y Rodríguez-Sotres para la purificación de esta actividad a partir de germen de trigo (resultados no publicados). Las isoformas AtPPa 1 y AtPPa 4 ya habían sido caracterizadas (Navarro *et al.*, 2007), por lo que se intentó purificar las 4 restantes. Las isoformas AtPPa 2 y 5 resultaron poco estables a lo largo de la purificación, por lo que al final de la misma su actividad era demasiado baja para permitir una caracterización de la actividad. Sin embargo, los datos sugieren que estas enzimas presentan actividad de hidrólisis de pirofosfato sólo en presencia de Mg^{2+} , al igual que las isoformas previamente caracterizadas.

Por otro lado, la AtPPa6 corresponde a la forma cloroplástica y la actividad de las sPPiasa cloroplástica ha sido purificada y caracterizada previamente (Schulze *et al.*, 2004, Weiner *et al.*, 1987, Gómez-

García *et al.*, 2006), de manera que el interés de purificarla en este trabajo era secundario. Desafortunadamente, la expresión de esta actividad en bacterias fue muy baja, por razones que no se estudiaron en más detalle. La figura 19 muestra el perfil de elución de una columna de Phenyl sepharosa de los extractos recuperados de bacterias que se esperaba expresaran la AtPPa6. Los niveles de actividad recuperada de esta proteína (Fig. 19) fueron muy inferiores con respecto a los recuperados para la proteína AtPPa3 (Fig. 21).

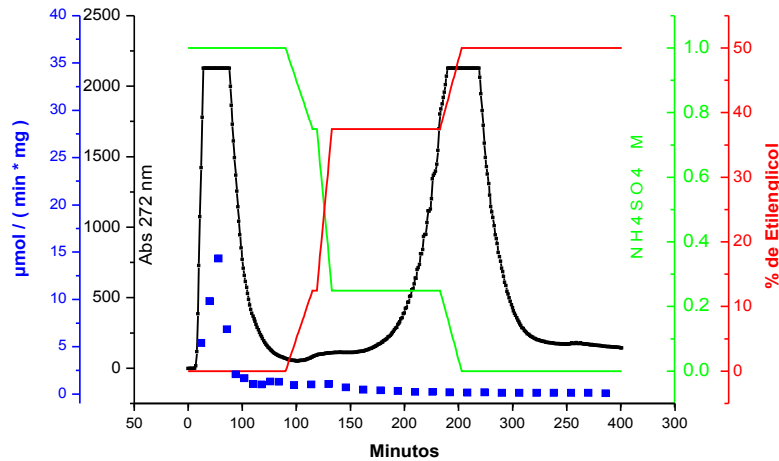


Figura 19 . Perfil de elución de la proteína recombinante AtPPa 6 en una columna de Phenyl-Sepharosa. La concentración de proteína que se obtuvo de las fracciones comprendidas entre los minutos 115 a 130 es muy inferior a lo esperado para una proteína sobrexpresada

Por otra parte, debido a que la AtPPa 6 posee un péptido señal, se consideró la posibilidad de que la proteína pudiera ser procesada y apareciera en el periplasma bacteriano. Por ello, se extrajo proteína a partir de espacio periplásmico con alto rendimiento (Figura 20) y la banda de proteínas más conspicua, ligeramente arriba de los 25 KDa se mandó secuenciar a la Facultad de Medicina con ayuda del Dr. Guillermo Mendoza Hernández. Los resultados indicaron que dicha banda corresponde a una beta-lactamasa (que está presente en el plásmido como marcador de selección) y que comigra con una banda de una proteína de unión a ribosa, característica del espacio periplásmico bacteriano.

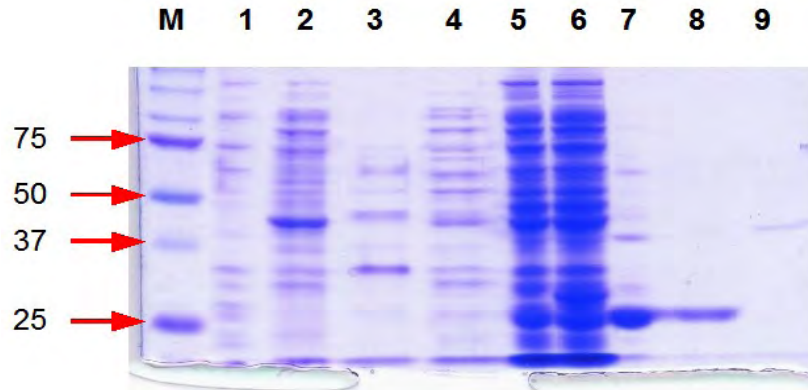


Figura 20. Electroforesis desnaturalizante de extractos protéicos. 1, 2, 3, 4 y 9 corresponden a extractos protéicos obtenidos a partir de *E. coli* BL21 DE3 sin transformar. 1; Proteínas que no interaccionan con resina de intercambio iónico. 2; Proteínas que se unieron a la resina y que han sido eluidas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M. 3, 4 y 9; Fracción colectadas en los minutos 170, 173 y 50 respectivamente en la resina de hidrofobicidad (Phenyl sepharose) y que generan falsos positivos en la prueba de hidrolisis de pirofosfato. 5 y 6; Inducción de las proteínas recombinantes AtPPi4 y AtPPi5. 7; Proteína AtPPa6 extraída de periplasma de *E. coli*. 8; Proteína AtPPi3 pura ya caracterizada (sólo como referencia).

Dados los resultados anteriores se abandonó la purificación de la AtPPa6, que por otro lado ha sido estudiada por otros grupos (Schulze *et al.*, 2004; Gómez-García *et al.*, 2006) y que tampoco pudo ser expresada adecuadamente en los estudios de localización intracelular.

La proteína codificada por la isoforma AtPPa 3 fue la que presentó mejor eficiencia en el proceso de purificación por métodos cromatográficos, por ende, fue la única que pudo ser caracterizada en este trabajo. Su purificación y caracterización inicial se describe a continuación, para dicho procedimiento se encontró que el paso inicial por una columna de intercambio aniónico AGMP1M (BioRad) resultaba en una pérdida de actividad específica y baja recuperación de la actividad total, por lo que este paso se suprimió en las purificaciones rutinarias posteriores.

Purificación y caracterización de la actividad enzimática de la isoforma AtPPa 3.

Las bacterias transformadas portadoras del plásmido recombinante con la AtPPa 3 fueron incubadas en medio LB durante varias horas, a 37 °C, con agitación orbital, hasta alcanzar una D.O. de 0.6 a 0.7. Después de inducir la expresión de la proteína en 1 mM de IPTG por 12 h a 25 °C se colectó el pellet bacteriano y se sonicó para extraer todas las proteínas solubles. La mezcla protéica se filtró y se inyectó en una columna de Phenyl-Sepharosa (HPLC). La elución se realizó con un gradiente decreciente de sulfato de amonio de 1M a 0M y de forma simultánea un gradiente creciente de etilenglicol de 0 a 50%. La figura 21 representa el perfil de elución de extractos de *E. coli* que

sobreexpresan la proteína recombinante AtPPa 3. Todas las fracciones son colectadas y analizadas experimentalmente determinando su actividad de hidrólisis de pirofosfato en presencia y ausencia de Mg^{2+} . La diferencia de actividades entre el ensayo con y sin Mg^{2+} se considera como la actividad de PPiase verdadera. El pico obtenido al rededor del minuto 125, corresponde al momento de elución de la Pirofosfatasa recombinante (Figura 21 panel izquierdo). El panel derecho presenta la actividad enzimática contenida en el pico eluido entre los minutos 100 y 150 de la figura 21 panel izquierdo.

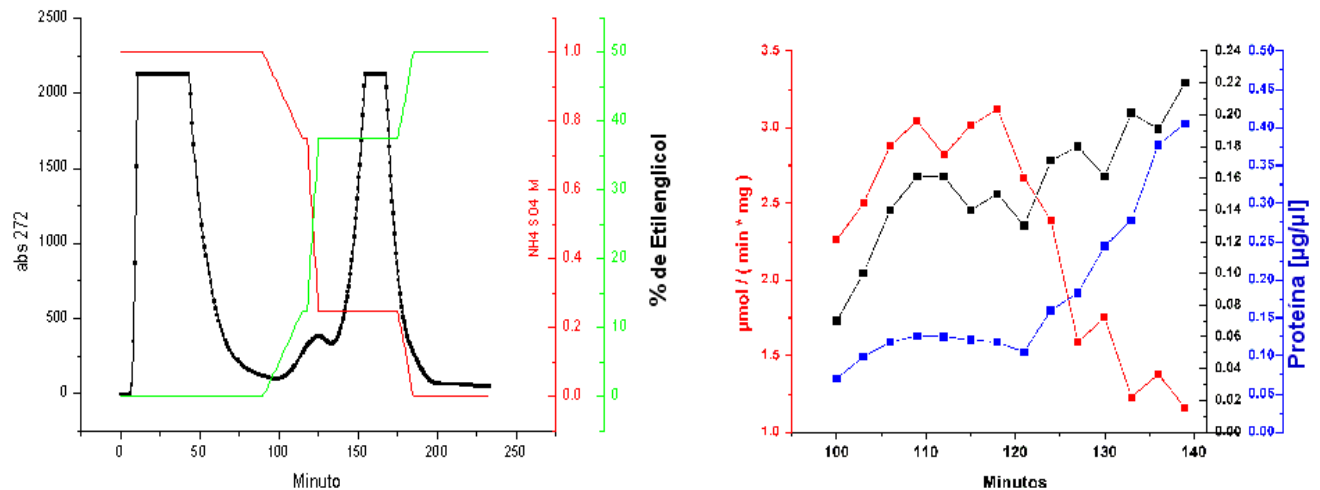


Figura 21. Perfil de elución de la proteína recombinante AtPPa 3 en Phenyl Sepharose. La gráfica de la izquierda (línea negra), presenta el perfil de elución en presencia de un gradiente decreciente de $(NH_4)_2SO_4$ de 1M a 0M (línea roja) y uno creciente de etilenglicol de 0 a 50% (línea verde). En la gráfica de la derecha se muestra el análisis de actividad específica de PPiase (Rojo), actividad volumétrica (negro) y la concentración de proteína determinada por el método de Bradford (azul) de las fracciones obtenidas entre los minutos 100 Y 150.

Una vez identificadas las fracciones con mayor actividad específica de PPiase, se mezclaron y concentraron aquellas fracciones colectadas entre los minutos 105 y 125. Este concentrado proteico nuevamente fue inyectado en una resina de exclusión molecular Superdex 75, que permitió la eliminación de contaminantes menores aún presentes en la preparación.

A partir de esta última columna cromatografica Superdex 75 se obtuvieron tres picos bien definidos. Sin embargo, a través de electroforesis desnaturizante y de ensayos de actividad se determinó que el pico número tres con un máximo en 14.33 minutos corresponde a la PPiase número 3 de *A thaliana* (AtPPa3). Aunque *E. coli* posee también una sPPiase endógena, esta proteína posee una estructura activa hexamérica, con monómeros de 20 KDa, por lo que la enzima nativa eluye con un peso de 120 KDa arriba del rango de exclusión de la resina Superdex 75.

En la figura 23 se muestra la banda proteica correspondiente a la isoforma AtPPa 3 antes y después del proceso de purificación con un peso aproximado de 25 KDa correspondiente al peso esperado, la preparación de teñido fue homogénea y bajo la técnica de azul de Coomassie. La actividad de hidrolisis de pirofosfato correspondiente al pico número tres (eluido a los 14.33 minutos, Fig. 22) fue estrictamente dependiente de Mg^{2+} (Fig. 24).

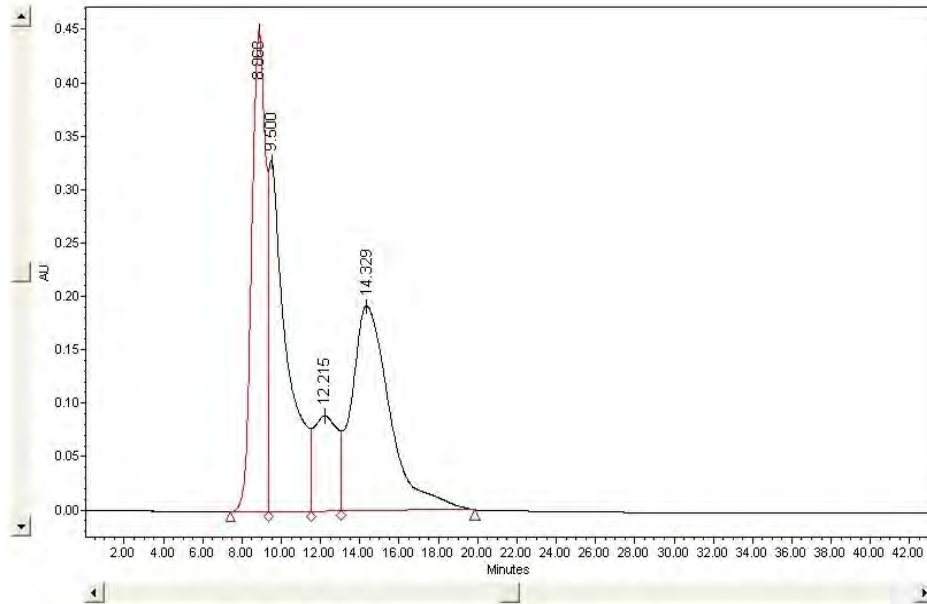


Figura 22 . Exclusión molecular en Superdex 75. El tercer pico corresponde al tiempo en minutos en el cuál eluyó la AtPPa 3 (minuto 14 al 16).

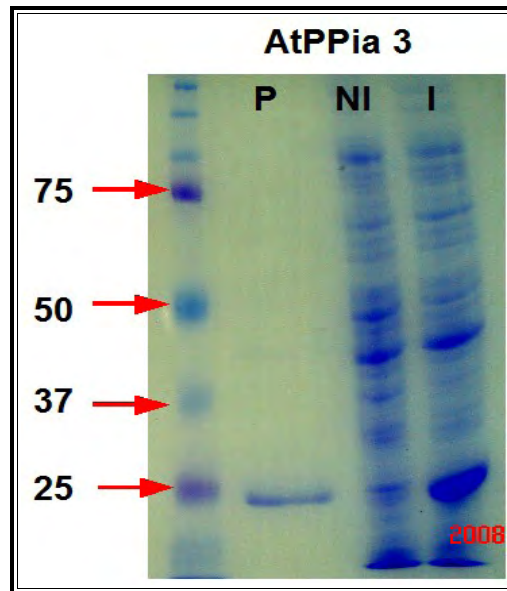


Figura 23. Electroforesis desnaturalizante de proteínas. P; AtPPasa 3 pura. NI; Fracción soluble de bacterias no inducidas. I; Fracción soluble de bacterias inducidas con IPTG 1 mM.

Con la finalidad de realizar la caracterización enzimática de esta proteína, se evaluó la actividad enzimática de fosfohidrolasas de la AtPPa 3 frente a diferentes sustratos fosforilados a una concentración de 160 μ M final, en ausencia o en presencia de 5 mM de $MgCl_2$. (Figura 24 y 25). Los resultados indican que el complejo enzimático es muy activo con PPi en presencia de Mg^{2+} , y prácticamente inactiva en ausencia del catión. Se encontró una tasa de hidrólisis pequeña con ADP en ausencia de Mg^{2+} y una pequeña hidrólisis de fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de Mg^{2+} . Cabe aclarar que las isoformas AtPPa 1 y AtPPa 4 presentaron una especificidad por PPi mucho más marcada, ya que su actividad con ADP y PEP fue por debajo del límite de detección confiable (Navarro de la Sancha *et al.*, 2007). Es posible que esta enzima sea menos específica que las otras isoenzimas cuando se estudia *in vitro* y que en cambio tenga una actividad mayor *in vivo* producto de la naturaleza de la proteína o de algún tipo de modificación post-traducciona. En cualquier caso, dichas actividades son muy bajas como para ser consideradas relevantes, en el contexto fisiológico de la planta.

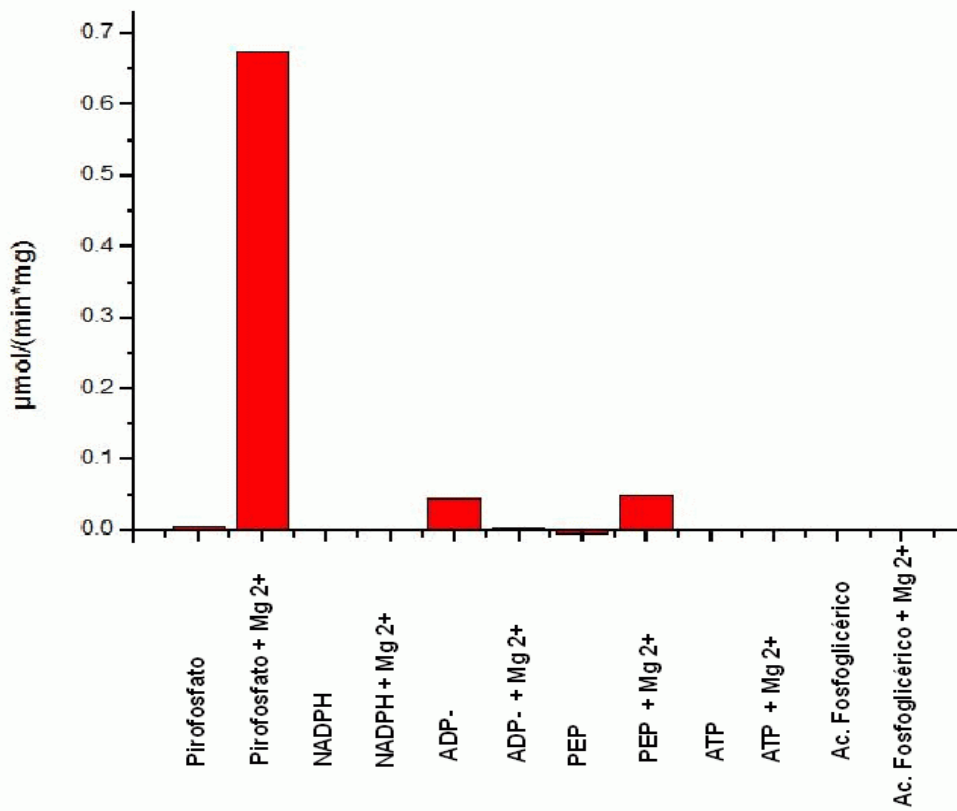


Figura 24 . Actividad hidrolítica de la AtPPa 3 ante diferentes sustratos fosforilados en presencia y ausencia de Mg²⁺. Para cada uno de estos sustratos se determinó la actividad enzimática de hidrólisis a una concentración de 160 μM de sustrato.

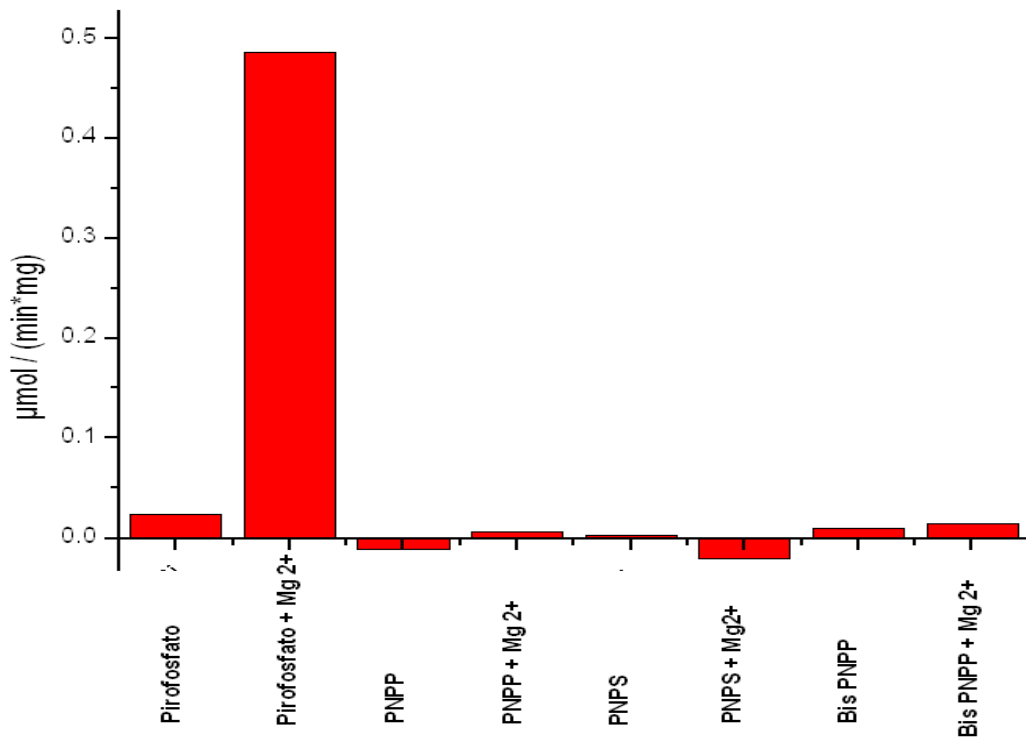


Figura 25 . Actividad hidrolítica de la AtPPa 3 ante diferentes sustratos fosforilados en presencia y ausencia de Mg²⁺. Para cada uno de estos sustratos se determinó la actividad hidrolítica a una concentración de 160 μM de sustrato.

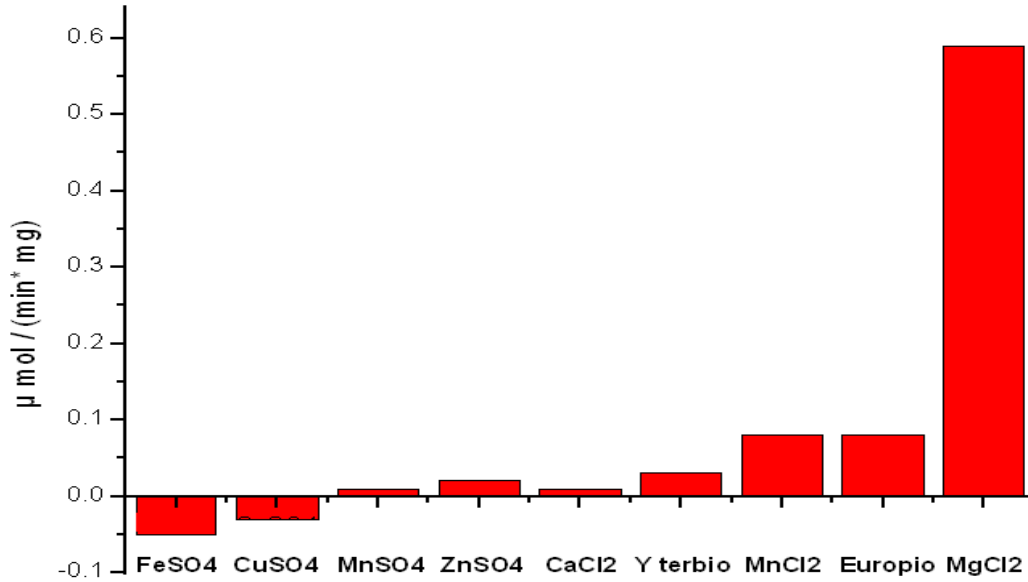


Figura 26. Actividad específica de AtPPa 3 con diferentes cationes divalentes a concentraciones de 3 mM para cada uno de ellos.

Anteriormente, se mencionó la existencia de dos familias bien identificadas de Pirofosfatasas inorgánicas solubles, aquellas dependientes de Mg^{2+} y aquellas dependientes de Mn^{2+} como cofactor catalítico. De hecho, se ha encontrado que las enzimas dependientes de Mg , presentan una actividad residual en presencia de Mn^{2+} (Cooperman *et al.*, 1992; Navarro de la Sancha, 2007). Por tales razones, se determinó la actividad catalítica ante diferentes cationes divalentes con una concentración final de 3mM para cada ensayo. En la figura 26 se muestra que sólo Mg^{2+} estimula la actividad de la enzima. Sin embargo, Mn^{2+} e inesperadamente, Eu^{3+} , estimularon la actividad a niveles de un 10% de la obtenida con Mg^{2+} . Los datos indican que esta proteína es una auténtica pirofosfatasa soluble de la Familia I dependiente de magnesio. La activación con Europio no ha sido estudiada en esta o en otras sPPiasas de la familia I, por lo que sería interesante caracterizarla en un futuro.

10 DISCUSIÓN

El pirofosfato es generado como un subproducto de diversas reacciones anabólicas conducidas a nivel celular, incluidas la síntesis de ácidos nucleicos o carbohidratos, por lo que su producción está estrechamente asociado con el desarrollo de los seres vivos (Lara *et al.*, 2001). Así mismo, en plantas se ha registrado que la hidrólisis del pirofosfato debido a la acción de las pirofosfatasas puede favorecer termodinámicamente las reacciones hacia la vía biosintética (Kornberg *et al.*, 1962). Sin embargo, llama la atención que las plantas presenten múltiples isoformas de sPPiases (Du Jardin *et al.*, 1995; Schulze *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2007), por lo que cabe preguntarse si estas diferentes isoenzimas poseen diferencias significativas en su actividad enzimática entre sí, o si están localizadas en regiones subcelulares diferentes. Especialmente, porque los datos de microarreglos indican que los mRNA para estas isoformas, con excepción de la AtPPa5, son expresados de manera constitutiva en *Arabidopsis* (Fig. 4 pag 27).

Usando un gradiente de centrifugación diferencial se ha determinado la concentración citosólica de PPI en hojas de espinaca registrando valores de 200 a 300 μM con muy poca actividad de sPPiase, mientras que en cloroplastos, la concentración de PPI es pequeña y la actividad de sPPiase es alta (Weiner *et al.*, 1987). Estos registros acoplados a la presencia de las H^+ -PPiases de vacuola cuestionan la presencia e importancia de las pirofosfatasas solubles y la razón por la cuál *Arabidopsis thaliana* contenga entre su genoma seis diferentes isoenzimas con la misma actividad. A la fecha, una de las isoenzimas ha sido reportada con posible localización cloroplástica (Schulze *et al.*, 2004). Sin embargo, se desconocía por completo la localización celular de las cinco isoformas restantes y sólo se había demostrado la presencia de estas proteínas en el citoplasma en el caso de la papa (Rojas-Beltrán *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos bajo nuestras condiciones experimentales sugieren que, las isoenzimas AtPPa 1, AtPPa 2, AtPPa 3, AtPPa 4 y AtPPa 5 están localizadas en el citosol, pero de manera adicional algunas de ellas presentan reparto hacia otras regiones subcelulares.

De manera particular, la isoenzima AtPPa1 presenta señales de fluorescencia a nivel nuclear, lo que podría relacionarse con la necesidad de remover el PPI generado durante las síntesis de DNA y RNA.. En este sentido, es posible que la proteína contenga dichas secuencias de transito al núcleo, ya que fueron identificadas por el programa *SLPFA* (tabla 10). Sin embargo, no es claro el mecanismo de

transporte por el cual pudiera ser importada al núcleo, ya que a nivel de secuencia, las señales de localización nuclear no son completamente evidentes pues sólo el programa *SLPFA* fue el único que las identificó y fue ese mismo programa el que también identificó señales de localización nuclear para las isoformas AtPPa 3 y AtPPa 4 sin que estas proteínas fueran localizadas de manera experimental en núcleo, como sí lo fue la AtPPa1, lo que coloca a este programa con una tasa de éxito por debajo del 50 %.

Se ha estimado también, que a través del complejo de poro nuclear (NPC) pueden difundir moléculas menores a 60 KDa correspondiente al tamaño de exclusión límite, lo que podría permitir la libre difusión hacia el núcleo, mientras que moléculas de mayor tamaño deben ser transportadas de manera activa (Haasen *et al.*, 1999; Koroleva *et al.*, 2005), sin embargo, todas las isoformas de sPPiase de *Arabidopsis thaliana* presentan tamaños cercanos a 25 KDa y, al menos para la AtPPa1, AtPPa4 (Navarro *et al.*, 2007) y la AtPPa6 (Gómez-García *et al.*, 2006) la forma activa de la enzima es monomérica. Salvo la AtPPa6, cuyo péptido señal puede secuestrarla al interior del cloroplasto. Siendo así, todas estas isoformas podrían desplazarse al núcleo por poseer un tamaño menor a 60 KDa aún como proteínas de fusión a la proteína fluorescente, situación que no se presentó así.

Por otro lado, para esta proteína puede existir la posibilidad de que el mecanismo de transporte a núcleo sea debido a alguna asociación con otra proteína que contenga señales fuertes de transporte a núcleo y por ello, las isoformas AtPPa3 y AtPPa4 no pudieron ser encontradas en núcleo. Sin embargo, la intensidad de la señal nuclear de la AtPPa1 sugiere que esta proteína está siendo concentrada de manera activa en el núcleo mediante algún mecanismo, quizás mediante asociación con la maquinaria de síntesis de DNA y de RNA. Al respecto, se sabe que en la mosca de la fruta hay una isoforma de sPPiase asociada a la maquinaria de síntesis de DNA (Gdula *et al.*, 1998).

Las isoformas AtPPa 2 y AtPPa 3 presentaron una distribución muy similar, su localización fue a nivel de citosol, pero con una menor intensidad en señal para la isoforma AtPPa3 lo que coincide con el nivel de señal de expresión genética de esta isoforma (Figura 4 panel C), lo que sugiere que a pesar de haber sido expresada bajo la acción de un promotor fuerte, esta isoforma se requiere en grandes niveles en el tejido usado (hojas jóvenes). Sin embargo, en un sistema recombinante esta isoforma si pudo ser purificada y usada con fines de caracterización, siendo esta proteína la menos lábil para manejarse *in vitro*. Desafortunadamente, no fue posible purificar la isoforma AtPPa 2 en su forma activa y a homogeneidad, por lo que, este aspecto deberá resolverse en el futuro. En cualquier caso, hasta donde las hemos estudiado, las isoformas AtPPa1, AtPPa4 y AtPPa3 presentan pocas diferencias entre si a nivel de actividad. Las tres isoenzimas son auténticas pirofosfatasa típicas de la familia I, que usan

magnesio como cofactor esencial, con alta especificidad por el pirofosfato.

En el caso de la AtPPa 4 y la AtPPa 5, estas isoenzimas mostraron señales de fluorescencia en cuerpos particularizados que por su tamaño aparentan de ser mitocondrias, lo que no sería sorprendente dado que también en mitocondrias se genera pirofosfato como subproducto, el cuál debe ser removido ya sea por acción de las PPiasas o por algún transportador hacia el citoplasma. En hongos y animales, la presencia de PPiasas en mitocondrias ha demostrado ser esencial para la sobrevivencia de las mitocondrias y existen estudios que muestran la posible presencia de sPPiasas en plantas (Vianello *et al.*, 1997) por lo tanto, no sería sorprendente que al menos, alguna de las sPPiasa de Arabidopsis lleve a cabo su función también en la mitocondria. Se ha reportado además la presencia de una actividad de H^+ -PPiasa en la parte interna de la mitocondrias de plantas cuyo papel es desconocido y para la cual no se ha identificado el gene que la codifica (Vianello y Macri, 1999).

Sin embargo, nuestros datos no son concluyentes, ya que en el desarrollo de nuestros ensayos no logramos las condiciones para teñir adecuadamente las mitocondrias *in vivo*. Por otro lado, asumiendo que los cuerpos fluorescentes particularizados de las figuras 22, 23 y 24 fueran mitocondrias habría que determinar si la asociación es intramitocondrial o es superficial. Estas dos isoformas (AtPPa 4 y AtPPa 5) podrían tener funciones semejantes, aunque su expresión en función del tejido difiere, ya que presentan una distribución y niveles de expresión de su mRNA muy similares, pero la isoforma AtPPa 4 no se expresa en polen (Fig. 4, pag 27). En base a los resultados obtenidos para las cinco diferentes isoenzimas, es posible, que las diferencias entre ellas se halle en otros aspectos, tales como la afinidad por el catión, los sustratos, las posibles modificaciones postraduccionales y la interacción con otras proteínas celulares, lo que force a que la planta contenga seis diferentes genes que codifiquen a proteínas de la misma actividad.

11 CONCLUSIONES

1. Los estudios de localización subcelular de las diferentes isoformas de Pirofosfatasas inorgánicas solubles de *Arabidopsis thaliana* indican que bajo las condiciones seguidas en este trabajo, las isoformas 1 a la 5 son citoplásmicas, pero sólo las 2 y 3 son exclusivamente citoplásmicas. Si la distribución de estas isoenzimas presenta algunas diferencias, esto ya indica que la necesidad de tener tantas isoformas para esta actividad obedece, al menos en parte, a la necesidad de regular la actividad en dichos sitios subcelulares de manera diferencial.
2. Hasta la fecha, todas las pirofosfatasas caracterizadas en la planta son pirofosfatasas verdaderas de la familia I, dependientes de Mg^{2+} que son activas como monómeros.

12 REFERENCIAS

Amersham Biosciences Corp. 800 Centennial Avenue PO Box 1327. Piscataway, NJ 08855 USA.

Avaeva S (2000) "Active site interactions in oligomeric structures of inorganic pyrophosphatases. *Biochemistry* 65 (3) 361-372.

Baykov A. A, Shestakov A.S, Kasho V.N, Vener A.V, and Ivanov A. H (1990)"Kinetics and termodinamics of catalysis by inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* in both directions". *European Journal Biochemistry* 194; 879-887.

Baykov A.A , Hyytia T, Volk S. E, Kasho V. N, Vener A. V, Goldman A, Lahti R, Cooperman B. S (1996) "Catalysis by *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase: pH and Mg²⁺ dependence". *Biochemistry* 35(15); 4655-4661.

Bucke C (1970) "The distribution and properties of alkaline inorganic pyrophosphatase from higher plants". *Phytochemistry* 9; 1303-1309.

Coello-Coutiño M. P(2001)"Respuesta de las plantas a la deficiencia de Fosfato" *Avances en Bioquímica y Biología Molecular de plantas*. Departamento de bioquímica. Facultad de Química.UNAM; 43-54.

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 B. S (1982) "The mechanism of action of Yeast inorganic pyrophosphatase". *Methods in Enzymology* 87; 526-548.

Cooperman B. S, Baykov A. A, Lahti R (1992) "Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase". *Trends in Biochemical Science* 17(7) 262-266.

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 Science* 66; 59-63.

De Graaf B. H, Rudd J. J, Wheeler M. J, Perry R. M, Bell E. M, Osman K, Franklin F. C, Franklin-Tong V. E. (2006) "Self-incompatibility in Papaver targets soluble inorganic pyrophosphatases in pollen". *Nature* 444(7118); 490-493.

Du Jardin P, Rojas-Beltran J, Gebhardt Ch, Brasseur R (1995) "Molecular cloning and characterization of soluble inorganic pyrophosphatase in potato". *Plant Physiology* 109; 853-860.

Dinkelaker B, Hengeler C, Marschner H (1995) "Distribution and function of proteoid roots and other root clusters". *Botanica Acta* 108;183–200.

Drozdowicz Y. M, Shaw M, Nishi M, Striepen B, Liwinski H. A, Ross D. S and Rea P. A (2002) "Isolation y characterization of TgVP1,a type I Vacuolar H-translocating Pyrophosphatase from *Toxoplasma gondii*". *Journal of Biological Chemistry* 278. 1075-1085.

Duff S. M. G, Muorhead G. B. G, Lefebure D. D, Plaxton W. C (1989) "Phosphate starvation inducible "bypasses" of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells". *Plant Physiology* 90:1275-1278.

Earley K. W, Haag J. R, Pontes O, Opper K (2006) "Gateway- Compatible vectors for plant functional genomics and proteomics". *The plant Journal* 45, 616-629.

- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S and Heijne G (2000)** Predicting subcellular localization of proteins bases on their N - terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology* 300;1005-1016.
- (FAO Alerta, 2007)** (Perspectivas de cosecha y situación alimentaria. Sistema de Información y Alerta de la FAO, No. 5, Octubre 2007; <http://www.fao.org/giews/>).
- (FAO reports 2007)** (Current world fertilizer trends and outlook to 2011/12. FAO reports 2007; <ftp://ftp.fao.org/agl/agll/docs/cwfto11.pdf>).
- Farre E. M, Tiessen A, Roessner U, Geigenberger P, Trethewey R. N, and Willmitzer L. (2001)** Analysis of the Compartmentation of Glycolytic Intermediates, Nucleotides, Sugars, Organic Acids, Amino Acids, and Sugar Alcohols in Potato Tubers Using a Nonaqueous Fractionation Method. *Plant Physiology*.127; 685-700.
- Flodgaard H and Floron P. (1974)** "Thermodynamic Parameters for the Hydrolysis of InorganicPyrophosphate at pH 7.4 as a Function of Mg^{2+} , K^+ , and Ionic Strength Determined from Equilibrium Studies of the Reaction". *Journal of Biological Chemistry* 249: 3465-3474.
- Frey P and Arabshahi A (1995)** "Standard Free Energy Change for the Hydrolysis of the α,β -Phosphoanhydride Bridge in ATP". *Biochemistry* 34; 11307-11310.
- Gadal P. (1983)** "Phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrogen fixation". *Physiologie. Végétale* 21(5);1069-1074.
- Gdula D, Sandaltzopoulos R, Tsukiyama T, Ossipow V, Wu C (1998)** "Inorganic pyrophosphatase is a component of the Drosophila nucleosome remodeling factor complex". *Genes and Development* 12(20);3206-3216.
- García-Contreras R, Celis H and Romero I. (2004).** "Importance of *Rhodospirillum rubrum* H^+ -pyrophosphatase in low energy conditions". *Journal of Bacteriology*; 186: 6651-6655.
- Gómez-García. M. R, Losada M and Serrano A (2006)** "A novel subfamily of monomeric inorganic pyrophosphatases in photosynthetic eucaryotes". *Biochemical Journal* 395, 211-221.
- Haasen D, Kohler C, Neuhaus G, Merkle T (1999)** "Nuclear export of proteins in plants: AtXPO1 is the export receptor for leucine-rich nuclear export signals in *Arabidopsis thaliana*". *Plant Journal* 20; 695-705.
- Heinonen J.K (2001)** "The Biological Role of Inorganic Pyrophosphate." Kluwer Academic Publishers. Boston, U.S.A. pp. 10-13.
- Heikinheimo P, Tuominen V, Ahonen A. K, Teplyakov A, Cooperman B. S, Baykov A. A, Lahti R, Goldman A (2001)** "Toward a quantum-mechanical description of metal-assisted phosphoryl transfer in pyrophosphatase". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 98(6):3121-3126.
- Junk A, Seeling B, Gerke J (1993)** "Movilization of different phosphate fractions in rhizosphere". *Plant Soil* 155/156; 91-94.
- Kochian L. V. (2000)** Molecular phisiology of mineral nutrient aquisition, transport and utilization. In: *Biochemistry and Molecular Biology of plants*, (B. Buchanans. W.Gruissem and R. Jones, eds.) pag 1223, cap 23. American Society of Plant Biologists.Bethesda, MD, USA 2000.
- Köler R, Zipfel W, Webb W and Hanson M. (1997)** "The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria *in vivo*". *The Plant Journal* 11(3); 613-621.
- Kole R, Sierakowska H, Shugar D (1976)** "Novel activity of potato nucleotide pyrophosphatase". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 438(2);540-550

- Kornberg A, Rao N. N, Ault R. P (1962)** "Inorganic Polyphosphate: A molecule of many functions". Annual Review of Biochemistry 68; 89-125.
- Koroleva O. A, Tomlinson M. L, Leader D, Shaw P, Doonan J. H. (2005)**. "High-throughput protein localization in Arabidopsis using Agrobacterium-mediated transient expression of GFP-ORF fusions". Plant Journal 41; 162-174.
- Kuhn J. N, Ward S. (1998)** "Purification, properties and multiple forms of a Manganese activated Inorganic Pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*". Archives of Biochemistry and biophysics 354(1); 47-56.
- Kumar R and Singh R (1983)** "Alkaline inorganic pyrophosphatase from immature wheat grains". Phytochemistry 22 (11).
- 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. Departamento de Bioquímica. Facultad de Química UNAM.147-164.
- Lynch J. (1998)** "The role of nutrient-efficient crops in modern agriculture". Journal of Crop Production 1, 241–264.
- Maeshima M (2000)**, "Vacuolar H⁺-pyrophosphatase". Biochimica et Biophysica Acta 1465; 37-51
- Maeshima M, Nakanishi Y, Matsuura-Endo C.(1996)** "Proton pumps of the vacuolar membrana in growing plants cells". Journal of Plant Research 109; 119-125.
- Maslowski P, Maslowska H and Kowalczyk S (1997)** "Subcellular distribution and properties of alkaline inorganic pyrophosphatase of maize leaves" Acta Biochimica Polonica 24 (2) 117–126.
- Melnik M, Nazarova T, and Avaeva S. (1982)** Methylpyrophosphate, the simplest organic substrate of yeast inorganic pyrophosphatase. Biokhimiia 47, 323-328.
- Miranda C.(1991)** "Evolución de *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus coccineus*: Engleman H. (ed) 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 M. H. (2001)** "Novel type *Arabidopsis thaliana* H⁺-Ppase is localized to the Golgi apparatus". Federation of European Biochemical Societies Letters 488; 29–33.
- Nair R and B Rost (2005)** "Mimicking cellular sorting improves prediction of subcellular localization". Journal of Molecular Biology 348 (1); 85-100.
- Nakai K and Kanehisa M (1992)**"A Knowledge base for predicting protein localization site in eukaryotic cells" Genomics 14 (4); 897-911.
- Navarro de la Sancha E (2005)** "Identificación y caracterización de genes de PPiases posiblemente implicados en respuesta a deficiencia de fósforo" Tesis de licenciatura. Facultad de Química , UNAM.
- Navarro de la Sancha E, Coello-Coutiño M P, Valencia T L, Hernández-Domínguez E,E, Rodríguez Sotres R (2007)**. "Characterization of two soluble inorganic pyrophosphatases from *Arabidopsis thaliana*". Plant Science. 172, 796-807.
- Oksanen E, Ahonen A-K, Tuominen H, Tuominen V, Lahti R, Goldman A, Heikinheimo P (2007)** "A complete structural description of catalytic cycle of yeast pyrophosphatase". Biochemistry. 46, 1228-1239.
- Oliva G, Romero I, Ayala G, Barrios I, Celis H. (2000)** "Characterization of inorganic

pyrophosphatase from the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*". Archives of Microbiology. 174(1-2):104-10.

Pwee K, Ho K (1995) "Identification and characterisation of two isoforms of soluble alkaline inorganic pyrophosphatase from sugar cane leaves". Plant Physiology and Biochemistry. 33; 39-46.

Raghothama K. G. (1999) "Phosphate Acquisition". Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50; 665-93.

Raghothama K. G. (2000) "Phosphate transport and signaling. Current Opinion in Plant Biology 3; 182-187.

Rodriguez-Sotres, R, Munoz-Clares R (1990) "Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase". Archives of Biochemistry and Biophysics 276; 180-190.

Rivera-Sánchez J. C (2004) "Movilización de fosfato y recambio de RNA en la germinación de frijoles sensibles. Tesis de licenciatura Facultad de Química. UNAM.

Rojas-Beltrán J. A, Dubois F, Mortiaux D, Portetelle D, Gebhardt C, Sangwan R, and Du Jardin P (1999) "Identification of cytosolic Mg²⁺-dependent soluble inorganic pyrophosphatases in potato and phylogenetic analysis". Plant Molecular Biology 39(3); 449-61.

Salminen T, Kpyl J, Heikinheimo P, Kankare J, Goldman A, Heinonen J, Baykov A. A, Cooperman B. S, and Lahti R. (1995) "Structure and function analysis of escherichia coli inorganic pyrophosphatase: Is a hydroxide ion the key to catalysis?". Biochemistry 34, 782-791.

Sambrook J; Fritsch E. F; Maniatis T. (1989) "Molecular Cloning A laboratory Manual" 2nd de pp.1.85

Selosse M. A, Baudoin E, Vanderkoornhuysse P (2004). "Symbiotic microorganisms a key for ecological success and protection for plants". Competes Rendus Biologies 327(7); 639-648.

Sivula A. S., Parfenyev A. N, Pekka P. (1999) "Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase". Federation of European Biochemical Societies Letters 454; 75-80.

Smith F. W (2000) "The phosphate uptake mechanism". Plant and soil. 245; 105-114.

Schulze S, Mant A, Kossmann J, Lloyd J. (2004). "Identification of an Arabidopsis inorganic pyrophosphatase capable of being imported into chloroplasts". FEBS Letters 565; 101-105.

Schlesinger M, and Coon M. (1960) "Hydrolysis of nucleoside di and triphosphates by crystalline preparations of yeast inorganic pyrophosphatase". Biochimica et Biophysica Acta, 41, 30-36.;

Tamura T and Akutsu T (2007) Subcellular location prediction of proteins using support vector machines with alignment of block sequences utilizing amino acid composition. BMC Bioinformatics 8(466).

TargetP. Center for Biological Sequence Analysis BioCentrum DTU. Technical University of Denmark Kemitovet, Buildin 208 DK 2800 Lyngby Denmark. www.cbs.dtu.dk

Takehige K, Tazawa M. (1989). "Determination of the inorganic pyrophosphate level and its subcellular localitation in *Chara corallina*". J Biol Chem. 264:3262-3266

Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez M, Brengues M and Parker R. (2005) Processing bodies requiere RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. RNA Journal 11: 371-382.

Trejo-Yepes, G. (2008) "Análisis de la expresión de isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles en arabidopsis y frijol en tejidos juvenes y maduros de la planta". Tesis de licenciatura, en revisión.

- Vianello A, Zancani M, Casolo V, Macri F (1997).** "Orientation of pea stem mitochondrial H⁺-pyrophosphatase and its different characteristics from the tonoplast counterpart. *Plant Cell Physiology* 38; 87-90.
- Vianello A and Macri F (1999)** "Proton pumping pyrophosphatase from higher plant mitochondria". *Physiologia Plantarum* 105;763-768.
- Visser K, Heimovaara-Dijkstra S, Kijne J. W, Wang M. (1998).** "Molecular cloning and characterization of an inorganic pyrophosphatase from barley". *Plant Mol. Biol* 37: 131-140
- Voet D, Voet J. G, 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.
- Yukari S, Takefumi S, Shouhei Y, Kazuhide Y, Junko H. (2004).** "Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system". *Journal of Biotechnology* 107; 233-243.
- Zhang X, Henriques R, Lin S. S, Qi-Wen N and Hai-Chua N (2006)** Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols* Vol.1, N°2 pag 1-6.