



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

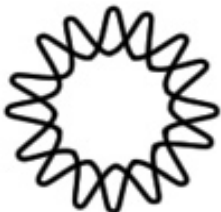
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Determinación de la asociación de las enzimas  
aldolasa y enolasa con la V-ATPasa y de su  
participación en la respuesta a estrés salino en  
*Arabidopsis thaliana*.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
P R E S E N T A :  
**Marcela Hernández Coronado**

ASESOR DE TESIS:

Dra. Bronwyn Barkla Coady



Cuernavaca, Mor.

Noviembre de 2010



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.

**A la Universidad Nacional Autónoma de México.**

**A mis antepasados, a su cultura y a su sangre.**

**A mi raza y a la grandeza de su espíritu.**

A mis padres, a mis hermanos, Lucía y Héctor,

y a Carlos Humberto;

a sus pasiones y convicciones.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco sinceramente a mi comité tutorial, a la Dra. Alejandra Covarrubias y a la Dra. Svetlana Shishkova, por ayudarme a construir el proyecto y la tesis, por sus sugerencias y comentarios. A mi jurado de tesis, a la Dra. Patricia León, a la Dra. Helena Porta, al Dr. Ismael Hernández y a la Dra. Rocío Cruz. Cada uno brindó a la tesis una visión diferente que me permitió no solamente mejorar el trabajo, sino también integrar conceptos, ideas y reflexiones que lo enriquecieron. A la Dra. Guadalupe Zavala por toda la ayuda en la microscopía, por compartir sus conocimientos conmigo y permitirme aprender de ella. A Olivia Santana, por su ayuda con el uso de la radioactividad.

A mi asesora, la Dra. Bronwyn Barkla por todo lo aprendido y el apoyo. Por darme libertad en el proyecto, y la seguridad de su respaldo.

A la Dra. Rosario Vera, por ser un apoyo extra en el trabajo y fuera de él. Por sus sugerencias y lecciones.

Al Dr. Omar Pantoja por permitirme ser parte del laboratorio, por sus observaciones y por el interés que mostró siempre en el trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Julio, Paul, Isaac, Armando y Josué, por sus consejos, por toda la ayuda y por su amistad.

A los investigadores del Instituto de Biotecnología que dedican su tiempo y experiencia a formarnos.

A CONACyt, al Instituto de Biotecnología y a la UNAM.

## ÍNDICE GENERAL.

<b>1. RESUMEN</b>	8
<b>2. INTRODUCCIÓN.</b>	9
2.1 Efecto de la salinidad en las plantas.	9
2.2 Mecanismos de tolerancia al sodio.	10
2.2.1 Compartimentalización de iones.	11
2.2.2 Antiportadores Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> .	11
2.2.3 Las H <sup>+</sup> -ATPasas vacuolares.	13
2.2.4 Regulación de la V-ATPasa.	15
2.3 La glicólisis.	17
2.3.1 Enzimas glicolíticas: la Aldolasa	18
2.3.2 Enzimas glicolíticas: la Enolasa	20
2.4 Las enzimas glicolíticas como proteínas con funciones alternativas (Moonlighting proteins).	22
<b>3. ANTECEDENTES.</b>	26
<b>4. JUSTIFICACIÓN.</b>	28
<b>5. HIPÓTESIS.</b>	29
<b>6. OBJETIVO GENERAL.</b>	29
<b>7. OBJETIVOS PARTICULARES.</b>	29
<b>8. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	30
8.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.	30
8.2 Extracción de DNA.	31
8.3 Amplificación del DNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	32
8.4 Selección de plantas de la línea Salk_080758, con inserción homocigótica de T-DNA en el gen At4g26530.	33
8.5 Confirmación de la mutación puntual en la línea <i>los2</i> .	33
8.6 Aislamiento de tonoplasto de hojas de <i>A. thaliana</i> utilizando un gradiente discontinuo de sacarosa.	33
8.7 Extracción de proteína total de hojas de <i>A. thaliana</i> .	35
8.8 Tratamiento caotrópico de tonoplasto.	35
8.9 Cuantificación de la proteína.	35
8.10 SDS-PAGE y análisis tipo “western blot”.	36
8.10.1 Detección de proteína empleando anticuerpos.	37
8.10.2 Anticuerpos utilizados y concentraciones.	38
8.10.3 Análisis de abundancia de la proteína detectada.	38
8.11 Actividad hidrolítica de la V-ATPasa.	39
8.12 Actividad enzimática de la enolasa.	39
8.13 Mediciones de osmolaridad y de concentración de iones Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> .	40
8.14 Fijación del tejido y microscopía electrónica.	41
8.15 Modelaje de la proteína enolasa.	41
8.16 Medición de clorofila y carotenoides en hojas de <i>A. thaliana</i> .	42
8.17 Diseño de los oligonucleótidos y secuencias.	42

<b>9. RESULTADOS.</b>	
9.1 Obtención de plantas de <i>A. thaliana</i> homocigóticas para la inserción de DNA en el gen de la aldolasa <i>At4g26530</i> .	44
9.1.1 Selección de mutantes empleando kanamicina.	45
9.2 Obtención de líneas homocigas de <i>A. thaliana</i> con mutación en el gen <i>At2g36530</i> que codifica para la enolasa.	47
9.3 Confirmación de la asociación de las enzimas aldolasa y enolasa con el tonoplasto de <i>A. thaliana</i> mediante ensayos tipo “western blot”.	49
9.4 En extractos de tonoplasto obtenidos mediante gradiente discontinuo de sacarosa, no hay contaminación por Mitocondrias o Membrana Plasmática.	51
9.5 La exposición a NaCl regula la abundancia de las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa asociadas al tonoplasto de <i>A. thaliana</i> .	53
9.6 Determinación de la fuerza de asociación de las enzimas glicolíticas al tonoplasto mediante tratamiento caotrópico.	54
9.7 La mutante <i>los2</i> muestra mayor sensibilidad a la salinidad.	56
9.8 En la mutante <i>los2</i> la abundancia de la enolasa en fracciones de tonoplasto disminuye bajo exposición a sal, no así en extractos de proteína total.	57
9.9 La concentración de pigmentos fotosintéticos de las plantas <i>los2</i> es igual al de las plantas de tipo silvestre.	59
9.10 Las plantas mutantes <i>los2</i> acumulan una mayor concentración de iones Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> que las plantas silvestres.	61
9.11 La estimulación de la actividad hidrolítica de la V-ATPasa por sal o por la adición de aldolasa es menor en la mutante <i>los2</i> .	62
9.12 Modelaje de la proteína enolasa por homología.	64
9.13 Bajo exposición a NaCl, la actividad enzimática de la enolasa de la mutante <i>los2</i> en fracciones de tonoplasto disminuye significativamente.	67
9.14 La organización e integridad de las membranas celulares se afecta en la mutante <i>los2</i> expuesta a NaCl.	68
9.15 La mutante Salk_080758 no presenta un fenotipo distinto al de plantas de tipo silvestre.	70
<b>10. DISCUSIÓN.</b>	74
10.1 El uso de mutantes de <i>Arabidopsis</i> para los genes de la aldolasa y de la enolasa ayuda a descifrar el papel de las enzimas en la respuesta a salinidad.	75
10.2 La enolasa y su posible función en el tonoplasto.	76
10.3 ¿Es la función catalítica de la enolasa relevante para su actividad en el tonoplasto?	79
10.5 ¿Es un complejo proteico el que se encuentra unido al tonoplasto?	82
<b>11. CONCLUSIONES.</b>	84
<b>12. PERSPECTIVAS.</b>	86
<b>13. BIBLIOGRAFÍA.</b>	87
	88

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

<b>Figura 1.</b>	Representación gráfica de la V-ATPasa.	14
<b>Figura 2.</b>	Representación de la vía Salt Overly Sensitive (SOS).	17
<b>Figura 3.</b>	Localización de los distintos genes que codifican para la aldolasa en los cromosomas de <i>A. thaliana</i> .	19
<b>Figura 4.</b>	Estructura secundaria de las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	21
<b>Figura 5.</b>	Organización de intrones y exones del gen <i>At4g26530</i> que codifica para la aldolasa en la línea <i>Salk_080758</i> .	45
<b>Figura 6.</b>	Las plantas de la línea <i>Salk_080758</i> son heterocigóticas para la inserción de T-DNA.	46
<b>Figura 7.</b>	Mediante selección con kanamicina, se detectaron plantas homocigóticas para la inserción de T-DNA en el gen <i>At4g26530</i> que codifica para la aldolasa.	48
<b>Figura 8.</b>	Plantas de la línea <i>Salk_080758</i> homocigóticas para la inserción de T-DNA en el gen <i>At4g26530</i> .	49
<b>Figura 9.</b>	Verificación de la mutación puntual en la mutante <i>los2</i> .	50
<b>Figura 10.</b>	Las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa están asociadas al tonoplasto de <i>A. thaliana</i> .	52
<b>Figura 11.</b>	Análisis de la pureza de la fracción de tonoplasto obtenido mediante gradiente discontinuo de sacarosa.	54
<b>Figura 12.</b>	En condiciones de estrés salino la aldolasa, la enolasa y la subunidad VHA-B, incrementan su abundancia en fracciones de tonoplasto de plantas de tipo silvestre.	55
<b>Figura 13.</b>	Determinación de la fuerza de asociación de las enzimas glicolíticas al tonoplasto de <i>A. thaliana</i> .	56
<b>Figura 14.</b>	Las plantas de la mutante <i>los2</i> son más sensibles a la exposición a sal.	58
<b>Figura 15.</b>	La abundancia de la enolasa presente en el tonoplasto de plantas <i>los2</i> disminuye bajo exposición a sal.	60
<b>Figura 16.</b>	Bajo exposición a sal las hojas de plantas <i>los2</i> poseen una concentración más elevada de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> , así como mayor osmolaridad.	64
<b>Figura 17.</b>	La estimulación de actividad hidrolítica de la V-ATPasa por la exposición a NaCl ó por la adición de aldolasa, es menor en plantas mutantes <i>los2</i> expuestas a sal.	66
<b>Figura 18.</b>	La actividad enzimática de la enolasa en fracciones de tonoplasto disminuye significativamente en la mutante <i>los2</i> expuesta a NaCl.	68
<b>Figura 19.</b>	Simulación de la estructura terciaria de la enolasa.	71
<b>Figura 20.</b>	Modificaciones en la estructura terciaria de la enolasa.	72
<b>Figura 21.</b>	Las electromicrografías de hoja muestran que en la mutante <i>los2</i> expuesta a NaCl la integridad y organización de las membranas celulares se altera.	73
<b>Figura 22.</b>	Las plantas de las líneas <i>Salk_080758</i> no presentan un fenotipo distinto al de plantas de tipo silvestre.	74

<b>Tabla 1.</b>	Enzimas con funciones alternativas (Moonlighting proteins).	24
<b>Tabla 2.</b>	Oligonucleótidos utilizados.	43
<b>Tabla 3.</b>	Secuencia de péptidos obtenidos a partir del estudio proteómico realizado con el tonoplasto de la halófito <i>M. crystallinum</i>	44
<b>Tabla 4.</b>	Contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas <i>los2</i> y de tipo silvestre.	61



## 1. RESUMEN.

La creciente salinidad en el suelo es un problema grave alrededor del mundo que compromete la integridad de los ecosistemas y la producción de alimentos. El exceso de sales en el suelo afecta a las plantas de dos formas, causando estrés osmótico al dificultar la toma de agua de las raíces, y estrés iónico debido a la acumulación de iones tóxicos en los tejidos. Para responder a ello, las plantas han evolucionado diferentes mecanismos que les permiten tolerar la salinidad, tales como el secuestro de iones en la vacuola, principalmente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . El transporte de  $\text{Na}^+$  a través de el tonoplasto se lleva a cabo por los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la familia *NHX*, los cuales acoplan su actividad al transporte de  $\text{H}^+$  realizado por la  $\text{H}^+$ -ATPasa vacuolar (V-ATPasa). Estas bombas de protones son complejos multiproteicos, cuya actividad se controla a través de la regulación de su ensamblaje o mediante la regulación de su expresión génica y proteica. Además se ha sugerido que una compleja red de proteínas podría interactuar con la V-ATPasa para regular su actividad en respuesta a cambios ambientales. Recientemente, en un trabajo realizado en el laboratorio con la halófito *Mesembryanthemum crystallinum* se demostró la asociación de las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa a la subunidad B de la V-ATPasa, así como su regulación positiva por sal. Además, se demostró que la aldolasa incrementa la actividad hidrolítica de la bomba de protones *in vitro*. Con el fin de determinar si éste mecanismo es exclusivo de las plantas tolerantes a la salinidad o si se encuentra extendido a todas las plantas, estudiamos a la aldolasa y a la enolasa presentes en el tonoplasto de *Arabidopsis thaliana* y, mediante el uso de las mutantes de aldolasa (*Salk\_080758*) y de enolasa (*los2*), estudiamos su participación en la respuesta a estrés salino. Bajo tratamiento con NaCl, la mutante *los2* muestra una mayor sensibilidad que plantas de tipo silvestre, así como menor abundancia de la enolasa presente en el tonoplasto, no así en extractos de proteína total. Lo que nos conduce a sugerir que la enolasa asociada al tonoplasto podría tener una función involucrada en la respuesta a estrés salino, distinta a la glicólisis. Mientras que la presencia de 8 posibles genes para la aldolasa complica el estudio de la enzima.

## 2. INTRODUCCIÓN

En un sentido general, la degradación del suelo se entiende como el deterioro de la calidad del suelo o la pérdida parcial o completa de una o más de sus funciones. Ésta puede ser producto de procesos naturales o inducida por el hombre (UNEP, 2002) y obedece a distintas causas. En los últimos 20 años degradación del suelo se ha incrementado en el mundo, trayendo consigo repercusiones agrícolas, sociales y económicas que comprometen la integridad de los ecosistemas y la calidad de vida de sus habitantes. Actualmente, el 24% del área cultivable mundial presenta cierto grado de degradación (Bai, et al. 2008).

Entre las causas de degradación, la salinización se ha identificado como uno de los principales procesos que afectan el suelo. Alrededor del mundo, aproximadamente el 6% del área terrestre se encuentra afectada por sales; y se estima que un área de 4 millones de Km<sup>2</sup> presenta daños causados específicamente por altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl), una condición en la cual los iones de sodio (Na<sup>+</sup>) representan más del 15% de los cationes intercambiables (FAO, 2008). En México el 64% del territorio nacional presenta afectación por procesos degradativos del suelo y el 3.19%, equivalente a 64 mil Km<sup>2</sup>, presenta algún grado de salinidad (SEMARNAP, 1999) que puede repercutir sobre la productividad agrícola.

### 2.1 Efecto de la salinidad en las plantas.

La presencia de NaCl en el suelo tiene efectos nocivos en las plantas. Altas concentraciones de esta sal puede ocasionar *estrés osmótico* al dificultar la absorción de agua por las raíces y causar *estrés iónico* con la acumulación de los iones. La alteración en la absorción de agua provoca una disminución en el crecimiento e inhibe la división y la expansión celular, mientras que la acumulación de cloro (Cl<sup>-</sup>) y de Na<sup>+</sup> produce toxicidad en los distintos tejidos y puede interferir con las vías metabólicas (Munns & Tester, 2008).

La absorción excesiva de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  limita la asimilación, el transporte y la distribución de micronutrientes, especialmente de potasio ( $\text{K}^+$ ) y de calcio ( $\text{Ca}^+$ ), resultando en desbalances de iones intracelulares y en efectos negativos sobre enzimas y otras macromoléculas (Keutgen & Pawelzik, 2008). Dada la capacidad del  $\text{Na}^+$  para competir con el  $\text{K}^+$  por los sitios de unión esenciales para el funcionamiento de proteínas, altos niveles de  $\text{Na}^+$  o altas proporciones  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pueden interrumpir varios procesos enzimáticos en el citosol (Tester & Davenport, 2003). Un efecto secundario de la presencia de  $\text{NaCl}$  en los tejidos es el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que puede provocar daño en el fotosistema II, inhibir la síntesis de proteínas e interferir con el funcionamiento de enzimas como la *fructosa-1,6-bisfosfatasa* o la *sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa* mediante la oxidación del grupo tiol (Bartels & Sunkar, 2005).

## **2.2 Mecanismos de tolerancia al sodio.**

Las distintas especies de plantas difieren en su capacidad para tolerar la salinidad, lo que se refleja en su crecimiento y en su habilidad para generar semillas bajo estas condiciones. Las plantas halófitas, la flora natural de suelos altamente salinos, presentan mayor capacidad para compartimentalizar las sales que aquellas plantas glicófitas, la flora de suelos no salinos, por lo que pueden tolerar mayores concentraciones de sal (Munns & Tester, 2008). En general, la respuesta a la salinidad es un proceso complejo que involucra numerosos cambios, tales como cambios en el crecimiento de la planta, incremento/reducción en la expresión de genes y proteínas, aumento en los niveles de ácido abscísico (ABA), acumulación de solutos compatibles y de proteínas protectoras, incremento en los niveles de antioxidantes y supresión de las vías metabólicas que consumen alta cantidad de energía (Bartels & Sunkar, 2005).

Dado que el  $\text{NaCl}$  es la sal más soluble y común, no es sorprendente que las plantas hayan desarrollado mecanismos adaptativos para regular su acumulación y expulsión. Entre dichos mecanismos se encuentra la habilidad para ajustar la osmolaridad celular, la exclusión de  $\text{Na}^+$  en las raíces y la tolerancia a sal en

distintos tejidos producto de la compartimentalización intracelular de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Munns & Tester, 2008).

### **2.2.1 Compartimentalización de iones.**

Una manera de mantener bajas las concentraciones de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma, es secuestrarlo dentro de vacuolas. En este proceso de compartimentalización el sodio entra a las células y es bombeado a la vacuola a través del tonoplasto antes de que las concentraciones en el citoplasma se incrementen (Tester & Davenport, 2003), lo que a su vez contribuye a la regulación osmótica permitiendo mantener la absorción de agua por las soluciones salinas (Lu, et al. 2004).

La entrada de  $\text{Na}^+$  a la célula vegetal es un proceso pasivo: la diferencia en el potencial eléctrico negativo en la membrana plasmática y las bajas concentraciones de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma favorecen el movimiento de  $\text{Na}^+$  hacia adentro de la célula. En contraste, la expulsión y la compartimentalización son procesos activos. Los antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  median la compartimentalización en la vacuola y la expulsión del sodio de la célula; dos procesos claves en la desintoxicación y la regulación osmótica que son necesarios para tolerar el estrés salino (Blumwald, et al. 2000).

### **2.2.2 Antiportadores $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .**

Los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  son proteínas de membrana que participan en la regulación del pH y del sodio dentro de la célula. Estas proteínas se encuentran presentes en los distintos reinos biológicos, y llevan a cabo el intercambio de  $\text{Na}^+$  por  $\text{H}^+$  a través de las membranas (Shi & Zhu, 2002). En los mamíferos, los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la familia *NHE* están implicados en varios procesos fisiológicos importantes, incluyendo la regulación del volumen celular, el control del pH intracelular y la homeostasis de  $\text{Na}^+$ . La presencia de genes homólogos a la familia *NHE* ha sido identificada en diferentes especies tales como *Escherichia coli* (NhaA y NhaB), *Schizosaccharomyces pombe* (sod2), *Saccharomyces cerevisiae* (NHX1 y NHA2), *Caenorhabditis elegans*, *Drosophyla melanogaster*, *Xenopus laevis* y *Arabidopsis thaliana* (NHX) (Putney, et. al. 2002).

Los genes homólogos de la familia *NHX*, identificados por primera vez en la levadura *S. cerevisiae*, corresponden a intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que desempeñan un papel primordial en la compartimentalización de sodio. Mediante estudios con la proteína *ScNhx1* se determinó su localización en el compartimento endosomal/prevacuolar y se estableció su participación en el secuestro intracelular de sodio, dependiente de pH (Nass, et al. 1997). Con la posterior complementación de la levadura mutante *nhx* con el gen *NHX1* de *A. thaliana*, se demostró la función de este transportador en plantas (Gaxiola, et. al.1999).

Hasta la fecha, se ha estudiado la presencia y la función de las proteínas *NHX* en numerosas especies vegetales como *Oryza sativa* (Fukuda, et al. 2004), *Solanum lycopersicu* (Rodríguez-Rosales, et al. 2008) e *Ipomea tricolor* (Yoshida, et al. 2005). Donde se ha demostrado que los intercambiadores *NHX* de plantas tienen funciones relacionadas con el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , con la homeostasis iónica y con la regulación del pH. La disponibilidad de las secuencias génicas, ha permitido detectar la presencia de varios genes *NHX* en algunas plantas: 6 genes para *Zea mays*, 7 para *Oryza sativa*, 1 gen para *Pinus taeda* y 5 para *Solanum lycopersicum* (Rodríguez-Rosales, et al. 2009).

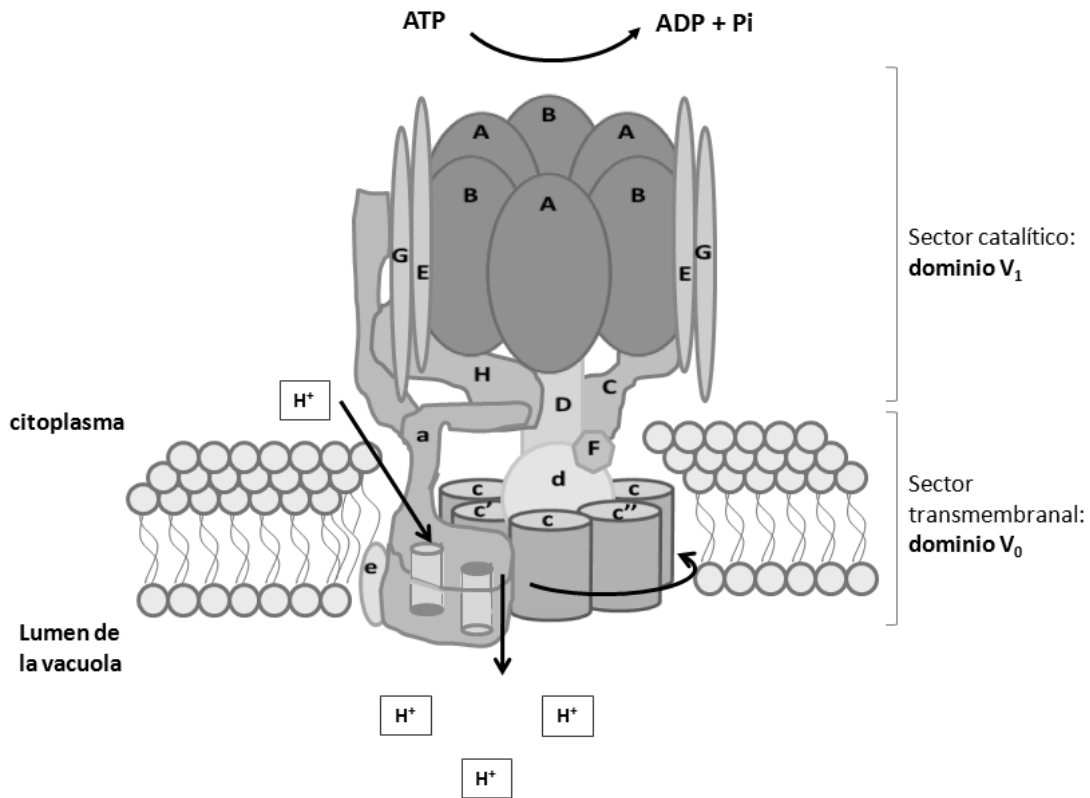
En *Arabidopsis thaliana*, se han identificado 8 genes pertenecientes a la familia *NHX* por homología en su secuencia, de los cuales se han caracterizado 7 en detalle (ARAMENON 6.1 <http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/index.ep>). Dentro de este grupo, los intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática y del tonoplasto, codificados por los genes *SOS1/AtNHX7* y *AtNHX1* respectivamente, participan en el transporte de sodio (Shi, et al. 2000; Nass, et al. 1997) y son regulados por estrés salino (Zhu, 2003). Para que se lleve a cabo el transporte mediado por los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , se requiere acoplar su actividad con los gradientes electroquímicos generados por las bombas de protones de las membranas plasmáticas ( $\text{H}^+$ -ATPasa) y del tonoplasto ( $\text{H}^+$ -ATPasa,  $\text{H}^+$ -PPiase). Los protones transportados a través de dichas membranas, permiten la movilización del  $\text{Na}^+$  hacia dentro de la vacuola o hacia afuera de la célula (Apse, et al. 2003).

### 2.2.3 Las H<sup>+</sup>-ATPasas vacuolares.

A diferencia de las células animales, las células vegetales carecen de Na<sup>+</sup>-ATPasas, por lo que dependen de H<sup>+</sup>-ATPasas para crear la fuerza-protón motriz que provee la energía para el transporte de los iones y metabolitos. Así, las células vegetales utilizan transporte activo primario mediado por H<sup>+</sup>-ATPasas y transporte secundario mediado por canales y co-transportadores para transportar los iones a través de sus membranas y garantizar la homeostasis (Zhu, 2003). Las H<sup>+</sup>-ATPasas vacuolares (V-ATPasas) son una familia de bombas de protones que acoplan la hidrólisis del ATP para transportar protones fuera del citosol. Están presentes en las endomembranas de las células eucarióticas, en el retículo endoplasmático, en el aparato de Golgi, en vesículas y en el tonoplasto; y son esenciales para el funcionamiento normal de diversos compartimentos internos. Las V-ATPasas consisten de dos macro dominios: el V<sub>1</sub> que corresponde al sector catalítico compuesto de proteínas periféricas, y V<sub>0</sub>, correspondiente al sector transmembranal compuesto de proteínas integrales de membrana y por proteínas periféricas, que translocan los protones a través de la bicapa lipídica (Fig. 1).

El sector V<sub>1</sub> se compone de 8 subunidades diferentes (A, B, C, D, E, F, G, H), mientras que V<sub>0</sub> está compuesto por 6 subunidades distintas (a, d, e, c, c', c'') algunas de las cuales se presentan en varias copias génicas (Lu, et al. 2004). En el dominio V<sub>1</sub>, las subunidades A y B, presentes en tres copias génicas cada una, forman la cabeza catalítica donde se lleva a cabo la hidrólisis del ATP. Mediante distintos estudios como la modificación química de aminoácidos y la mutagénesis dirigida realizada en la proteína, se ha determinado que la subunidad A constituye el principal sitio de unión al ATP (Zhang, et al. 1995). La subunidad B, por otro lado, ha sido implicada en la regulación de la V-ATPasa. Se ha propuesto que la presencia de un dominio no-catalítico en esta subunidad podría competir por la unión al ATP y modular la actividad de la bomba de protones (Vasylieva, et al. 2000). Así mismo, la existencia de isoformas de la subunidad B y su expresión diferencial en mamíferos, aportan evidencia a dicha función regulatoria (Brown, et al. 2009).

El resto de las subunidades de la V-ATPasa se encuentran distribuidas en dos tipos de tallos: el tallo periférico, cuya función es prevenir la rotación de la cabeza catalítica durante la hidrólisis del ATP y el tallo central, que une a los sectores  $V_0$  y  $V_1$  y sirve como rotor que acopla la energía liberada por la hidrólisis del ATP al anillo de rotación compuesto por las proteínas hidrofóbicas del sector  $V_0$  (Fig. 1).



**Figura 1. Representación gráfica de la V-ATPasa.** Las V-ATPasas se componen de dos dominios, un sector catalítico ó dominio  $V_1$  en el que se lleva a cabo la hidrólisis del ATP y un sector transmembranal ó dominio  $V_0$  que acopla la energía generada por el dominio  $V_1$  para transportar los protones al interior del compartimento vacuolar. Modificada de Forgac, 2007.

El sector  $V_0$  es la región de la V-ATPasa donde se lleva a cabo el transporte de protones. Cada una de sus subunidades están presentes en una sola copia génica, a excepción de la subunidad c que se encuentra en varias (de 4 a 5 copias dependiendo de la especie). En particular, las subunidades c, c' y c'' corresponden a

proteínas altamente hidrofóbicas que se encuentran formando un anillo. Cada una de ellas contiene un residuo de glutamina (Glu), el cual es protonado reversiblemente durante el transporte de protones (Forgac, 2007).

#### **2.2.4 Regulación de la V-ATPasa.**

La V-ATPasa se encuentra finamente regulada, su estructura heteromultimérica así como su distribución en distintas membranas permiten el control de su actividad a distintos niveles. La disociación reversible de los sectores  $V_1$  y  $V_0$ , por ejemplo, constituye un método eficiente para controlar la actividad de la bomba de protones sin afectar el potencial de membrana. Así mismo, la redistribución de la V-ATPasa en las diferentes endomembranas permite dirigir la actividad de la bomba a las regiones donde es necesaria (Forgac, 2007). El control en la expresión de la V-ATPasa en respuesta a demandas celulares específicas se logra mediante la regulación génica de algunas de sus subunidades o a través de modificaciones post-transcripcionales como la poliadenilación del mensajero (Merzendorfer, et al. 1997). Bajo variaciones a corto plazo, la bomba de protones se regula bioquímicamente por pH o por la concentración de iones, por la presencia de ATP/ADP o de  $P_i$  y por procesos de oxidación/reducción (Klychnikov, et al. 2007) o de fosforilación (Liu, et al. 2004). Bajo estrés salino, la actividad de la V-ATPasa se regula por  $Na^+$  (Binzel & Ratajczak, 2002). La exposición a NaCl aumenta la transcripción de los genes de algunas subunidades de la V-ATPasa (Narasimhan, et al. 1991; Tsiantis, et al. 1996), e incrementa la abundancia de la V-ATPasa presente en el tonoplasto a nivel de proteína (Ratajczak, et al. 1994). Así mismo, la exposición a NaCl incrementa la actividad hidrolítica (Vera-Estrella, et al. 1999) y el bombeo de protones de la V-ATPasa (Barkla, et al. 1995).

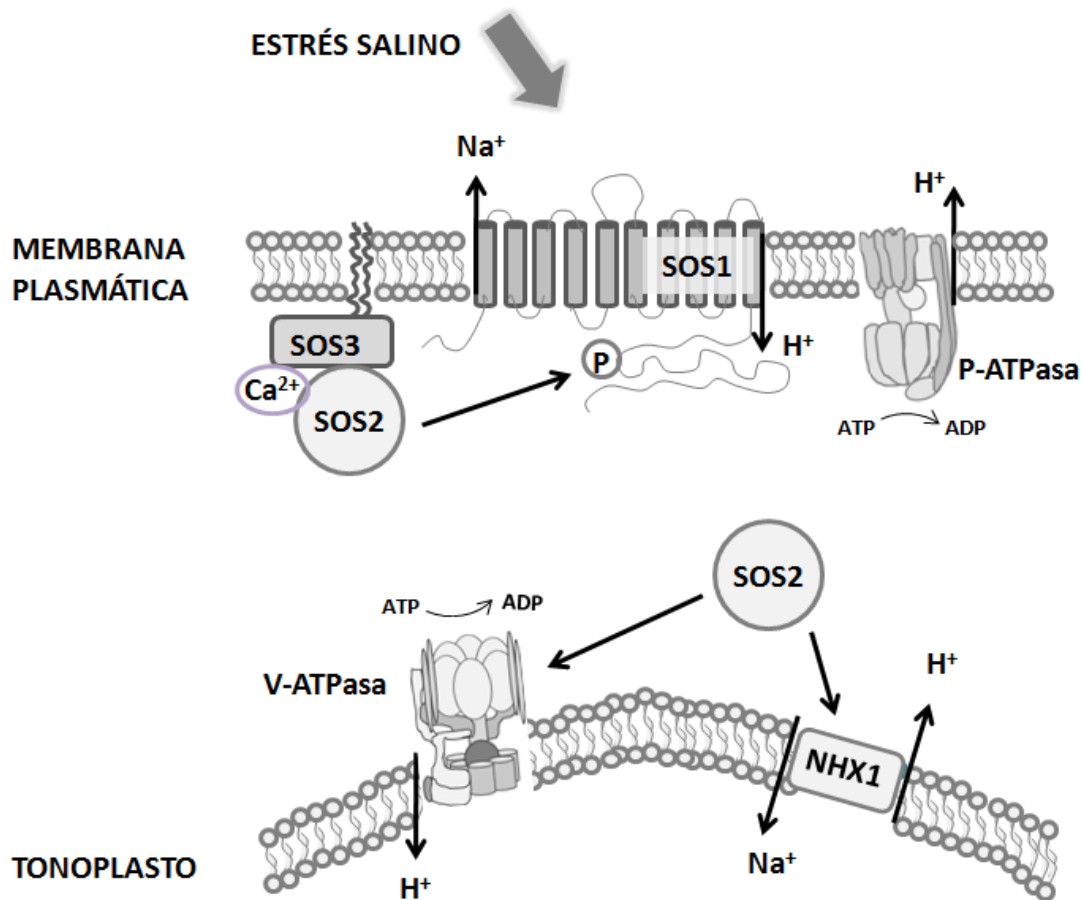
Recientemente se han identificado varias proteínas asociadas a las subunidades de la V-ATPasa en levadura (Seol, et al. 2001; Smardon, et al. 2002; Lu, et al. 2004) y en células de mamífero (Chen, et al. 2004; Vitavska, et al. 2005), lo que apunta a que la regulación de la bomba de protones puede involucrar una red de interacciones proteína-proteína que podrían permitir a la V-ATPasa percibir el



estado de la célula y regular su funcionamiento de acuerdo a condiciones particulares (Forgac, 2007).

En células de levadura, el acoplamiento de los sectores  $V_1$  y  $V_0$  está mediado por la disponibilidad de glucosa; en ausencia de ella, la V-ATPasa permanece desarticulada. Cuando los niveles de glucosa aumentan, el complejo proteico RAVE (**R**egulator of the **A**TPasa of **V**acuolar and **E**ndosomal membranes) se une al sector  $V_1$  con alta afinidad, mediando el reensamblaje de la ATPasa vacuolar (Smardon, et al. 2002).

En plantas, la vía SOS (**S**alt **O**verly **S**ensitive) desempeña un papel central en la coordinación de las actividades de los sistemas transportadores de sodio. Ésta, se compone de tres proteínas: SOS1/NHX7, SOS2/CIPK24 y SOS3/CBL4. La proteína SOS1 es un intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática, cuya expresión aumenta bajo estrés salino. Posee de 10 a 12 dominios transmembranales y una cadena citoplásmica de más de 700 aminoácidos sobre la que actúa la cinasa SOS2 para activar el transportador (Shi, et al. 2000). SOS3 es una proteína tipo calcineurina- $\beta$  (CBL), capaz de percibir los cambios intracelulares de calcio generados por estrés salino (Ishitani, et al. 2000). Una vez activada mediante su unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , la proteína SOS3 forma un complejo con la proteína SOS2, una cinasa de proteínas que fosforila serinas y treoninas, con un dominio regulador C-terminal y un dominio catalítico N-terminal (Halfter, et al. 2000). Durante condiciones de estrés salino, el complejo SOS2-SOS3 se asocia con la membrana plasmática y la proteína SOS2 fosforila a SOS1, activando su capacidad transportadora. Recientemente se ha demostrado que la cinasa de proteínas SOS2 interactúa con varias subunidades del sector  $V_0$  de la V-ATPasa, regulando su actividad (Batelli, et al. 2007) y se ha propuesto a la proteína intercambiadora  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  SOS1/NHX7 como un sensor de sodio (Fig. 2) (Zhu, 2003).



**Figura 2. Representación de la vía Salt Overly Sensitive (SOS).** La vía SOS se compone de tres proteínas que participan en la respuesta a estrés salino. El intercambiador de sodio protones de la membrana plasmática (SOS1/NHX7) es activado por el complejo CIPK-CBL constituido por las proteínas SOS2 y SOS3 respectivamente. Recientemente se ha obtenido evidencia de que la proteína SOS2 interactúa con algunas subunidades de la V-ATPasa, así como con el intercambiador de sodio protones NHX1, presente en el tonoplasto.

### 2.3 La glicólisis.

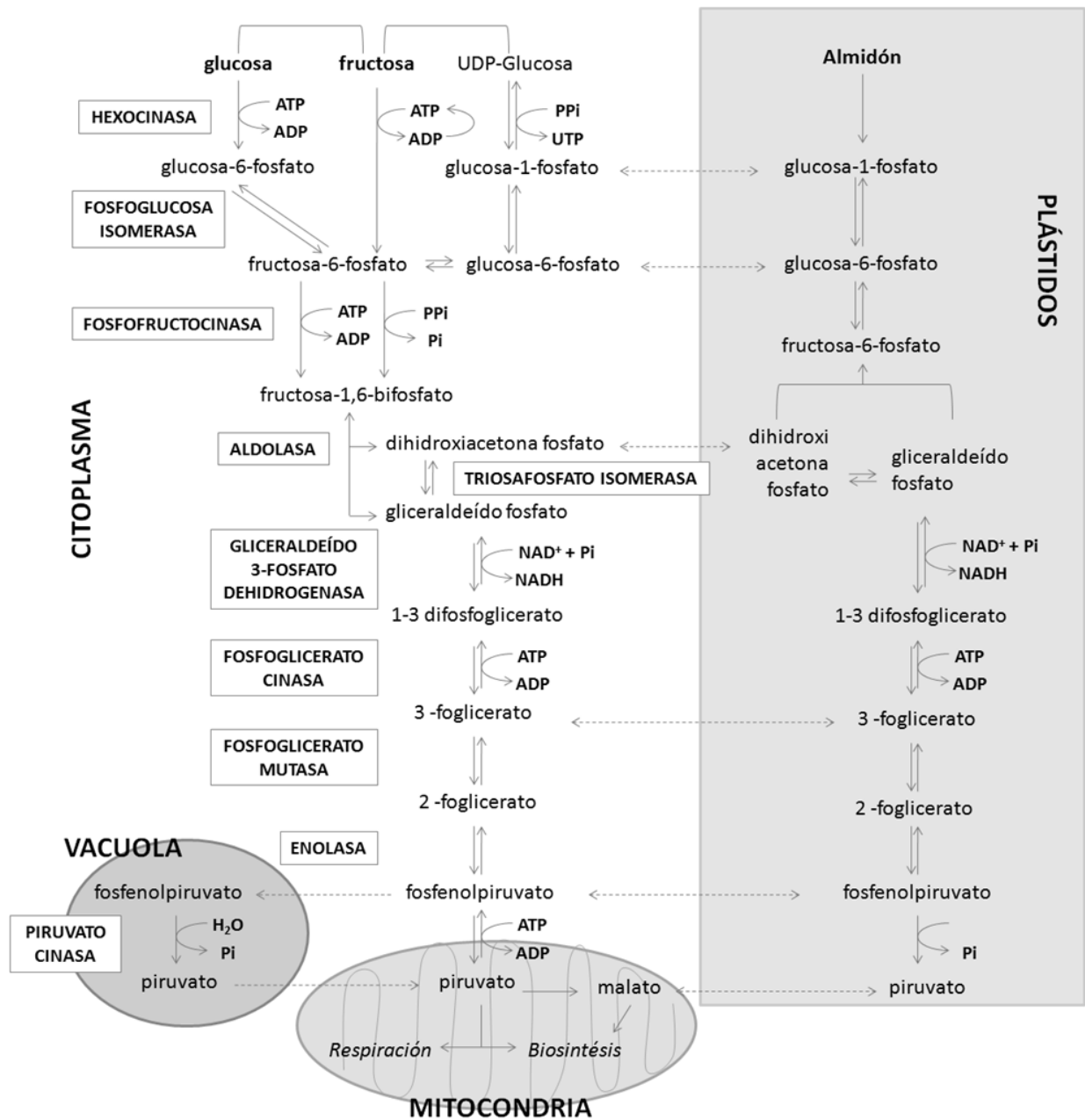
La glicólisis es una vía central en el metabolismo de diversos organismos como plantas, animales y microorganismos, en ella una molécula de glucosa es degradada mediante una serie de reacciones enzimáticas para generar dos moléculas de piruvato. Durante las 10 reacciones secuenciales de la glicólisis, cada una llevada a cabo por una enzima distinta, parte de la energía liberada de la glucosa es almacenada en forma de ATP y NADH, los cuales constituyen moléculas

básicas para el funcionamiento celular (Lehninger, et al. 2004). En plantas superiores, la vía de la glicólisis se lleva a cabo en distintos compartimentos celulares (Gottlieb, 1982). Lo que permite una amplia plasticidad de esta vía metabólica (Plaxton, 1996) (Fig. 3).

Se ha reportado que en especies halófitas expuestas a sal, la abundancia de las enzimas glicolíticas se incrementa a nivel de mensajero o de proteína (Suzuki, et al. 2005; Cushman, et al. 2007; Sobhanian, et al. 2010), lo que sugiere que la regulación de la glicólisis podría estar involucrada en la respuesta y tolerancia a la salinidad. Recientemente se han identificado a las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa asociadas al tonoplasto de la halófito *Mesembryanthemum crystallinum* y se ha determinado que bajo estrés salino estas enzimas se regulan positivamente (Barkla, et al. 2009).

### **2.3.1 Enzimas glicolíticas: la Aldolasa.**

La aldolasa (*Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa*) es una enzima altamente conservada, responsable de la ruptura de la *fructosa-1,6-bisfosfato* en *gliceraldeído-3-fosfato* y *dihidroxiacetona fosfato* durante la glicólisis (Fig. 3) y de la reacción inversa en la gluconeogénesis y en el ciclo de Calvin (Lehninger, et al. 2004). Se han identificado dos tipos de aldolasas: Las aldolasas de clase I corresponden a proteínas tetraméricas de ~160 kD, presentes en animales, plantas superiores, helechos, musgos y algunas algas. Estas proteínas se caracterizan por llevar a cabo la reacción arriba descrita mediante la asociación del grupo amino de la lisina (Lys), presente en el sitio catalítico de la enzima, con el carbono 2 de la *fructosa-1,6-bisfosfato*. En contraste, las aldolasas de clase II son proteínas diméricas de aproximadamente 80 kD, que se encuentran en organismos tales como bacterias, cianobacterias y hongos, y que para llevar a cabo la reacción utilizan un catión divalente ( $Zn^{2+}$  o  $Fe^{2+}$ ) como electrófilo en el ciclo catalítico (Rutter, 1964; Marsh & Lebherz, 1992). Dadas las diferencias estructurales y funcionales, se considera que ambas clases de aldolasas evolucionaron independientemente (Rutter, 1964; Flechner, et al. 1999).



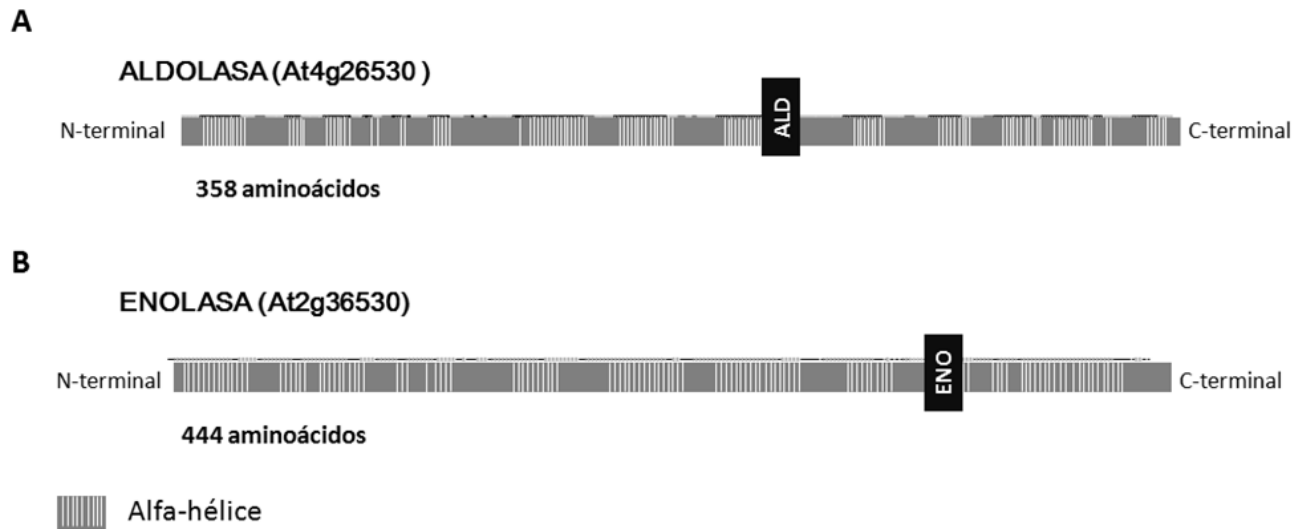
**Fig. 3 La vía glicolítica en plantas.** La glicólisis consta de 10 pasos secuenciales, cada uno realizado por una enzima diferente (*hexocinasa*, *fosfoglicosa isomerasa*, *fosfofructocinasa*, *aldolasa*, *triosafosfato isomerasa*, *gliceraldeído 3-fosfato deshidrogenasa*, *fosfoglicerato cinasa*, *fosfoglicerato mutasa*, *enolasa* y *piruvato cinasa*). En ella una molécula de glucosa es degradada para generar dos moléculas de piruvato, obteniéndose ATP y NADH (Lehninger, et al, 2004). En plantas, la glicólisis puede ocurrir de manera independiente en dos compartimentos celulares, el citoplasma y los plástidos. Ambos compartimentos pueden interactuar, aunque cada uno posee sus propias isoenzimas codificadas por genes distintos (Plaxton, et al. 1996). En la figura se muestra la glicólisis y la compleja red metabólica de esa vía en plantas. Modificado de Plaxton, et al. 1996.

En *Arabidopsis thaliana* se ha identificado por homología de secuencia a 8 genes que posiblemente codifican para aldolasas de tipo I (Fig.4 A). Estos genes se encuentran distribuidos en distintos cromosomas ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) y dado que algunos de ellos poseen péptidos de tránsito para mitocondria y cloroplasto en su secuencia, las proteínas resultantes podrían estar localizadas en diferentes compartimentos celulares (TargetP 1.1, [www.cbs.dtu.dk/services/](http://www.cbs.dtu.dk/services/)). A la fecha, se ha confirmado experimentalmente que el producto del gen At4g26520 corresponde a una aldolasa citosólica (Herbette, et al. 2006); mientras que el producto del gen At2g36460 es una aldolasa mitocondrial (Geigé, et al. 2003).

La presencia de la enzima aldolasa en distintos compartimentos subcelulares no es extraño, pues se ha documentado que en plantas superiores la vía de glicólisis está presente en el citoplasma y en los plástidos (Gottlieb, 1982), donde se ha detectado la presencia de isoenzimas (Lebherz, et al. 1984; Anderson & Levin, 1970) codificadas por genes nucleares distintos (Plaxton, 1996). Evidencia de esto es la presencia de aldolasas citosólicas (ALD C), así como de aldolasas plástidicas (ALD P) en distintas especies vegetales como *Pisum sativum* (Anderson, et al. 2005), *Oryza sativa* (Tsumi, et al. 1994), *Nicotiana paniculata* (Yamada, et al. 2000) y *Spinacia oleracea* (Lebherz, et al. 1984). Debido a que las isoformas difieren en carga, composición de aminoácidos, estructura en el dominio C-terminal y tamaño, es posible distinguirlas mediante métodos inmunológicos (Lebherz, et al. 1984).

### **2.3.2 Enzimas glicolíticas: la Enolasa.**

La enolasa (*2-fosfo-D-glicerato hidrolasa*) es una enzima integral de la glicólisis, responsable de la interconversión de *2-fosfoglicerato* a *fosfenolpiruvato* mediante la remoción reversible de una molécula de agua (Lenhinger, et al. 2004) (Fig. 3). En vertebrados superiores se han descrito tres isoenzimas con especificidad celular ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), codificadas por los genes *ENO1* y *ENO2* (Fletcher, et al. 1976), mismos que se han identificado en levaduras (McAllister & Holland, 1982). En plantas el número de genes de enolasa para cada especie es variable y, al igual que para la aldolasa, se ha documentado la presencia de isoenzimas.



**Figura 4. Estructura secundaria de las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa de *Arabidopsis thaliana*.** **A.** El gen *At4g26530*, es uno de los ocho genes que codifican para la aldolasa en *A. thaliana* (*At2g11040*, *At2g21330*, *At2g36460*, *At3g52930*, *At4g26520*, *At4g38970* y *At5g03690*). **B.** La enolasa está codificada por los genes *At1g74030*, *At2g29560* y *At2g36530*. En la figura se muestra la estructura secundaria del gen *At2g36530*. La predicción de las estructuras fue realizada utilizando el programa Jpred3 desarrollado por la Universidad de Dundee ([www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/](http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/)). En el recuadro negro se muestra el dominio catalítico.

En *Zea mays* se han identificado dos genes (*pENO1* y *pENO2*) altamente homólogos entre sí (80%), así como cuatro proteínas (ENO1, ENO2, ANP45A, ANP45B) cuya actividad parece estar regulada bajo estrés ambiental (Lal, et al. 1998). En *Ricinus communis* se ha localizado solamente un gen de enolasa (Blakeley, et al. 1994), y se ha reportado la presencia de isoenzimas en plástidos y en el citoplasma con distinta actividad durante el desarrollo (Miernyk & Dennis, 1992). No obstante, no es claro si se trata de genes distintos o de modificaciones postraduccionales del mismo polipéptido. Para *Mesembryanthemum crystallinum* también se ha reportado un gen y se ha demostrado que la actividad de la enzima está regulada por condiciones de estrés (Forsthoefel, et al. 1995).

En *A. thaliana* existen 3 genes que codifican para la enolasa ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)), no obstante solamente se han caracterizado dos de ellos (Fig.4 B): el producto del gen At2g36530 corresponde con una enolasa funcional (Lee, et al. 2002), mientras que el gen At1g74030 codifica para una enolasa localizada en cloroplasto (Prabhakar, et al. 2009).

#### **2.4. Las enzimas glicolíticas como proteínas con funciones alternativas (Moonlighting proteins).**

La capacidad que presentan algunas proteínas para desempeñar funciones alternativas ha sido estudiada por más de veinte años, cuando se descubrió que el cristalino ocular de mamíferos, aves y reptiles, está constituido por enzimas citosólicas (Wistow & Piatigorsky, 1987). A partir de ello, se ha documentado extensamente la diversidad funcional que pueden tener algunas proteínas en distintos organismos (Tabla 1) y se ha especulado acerca del origen evolutivo de esta propiedad compartida por gran cantidad de proteínas como enzimas, receptores, canales y factores de transcripción (Jeffery, 1999). Muchas enzimas evolucionaron sitios de unión a proteínas, independientes de su sitio catalítico, mientras que otras parecen haber sido reclutadas para realizar una nueva función en los nuevos tipos celulares u órganos. Mientras que en el primer caso, el surgimiento de las nuevas funciones parece ser producto de mutaciones fortuitas en las grandes regiones que rodean al sitio catalítico de una enzima, en el segundo caso probablemente se hizo uso de las propiedades físicas o estructurales de la proteína (Jeffery, 2004). En ambos escenarios, la evolución dio lugar a proteínas con una función completamente distinta a la que desempeñaban, por lo que se han agrupado en un grupo aparte al de las proteínas bifuncionales y multifuncionales (Moore, 2004). Además de su función en la glicólisis, algunas de las enzimas que participan en esta vía pueden cumplir funciones alternas (Plaxton, 1996). En los últimos años se ha documentado la participación de varias de ellas en otros procesos celulares: la *hexocinasa* (HXK2) ha sido localizada en el núcleo de *S. cereviceae*, donde interactúa con el represor transcripcional *Mig1* para regular la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa (Ahuatzi, et al.

2004; 2007). En plantas se ha identificado como un sensor de glucosa involucrado en la expresión de genes durante el desarrollo y en respuesta a estrés (Rolland, et al. 2002; Moore, et al. 2003). Así mismo, se ha determinado la asociación de la HXK con la subunidad B de la V-ATPasa y con la subunidad reguladora del proteosoma 19S (RPT5B) (Cho, et al. 2006). En la levadura *Pichia pastoris* la fosfofructocinbasa (PFK1) participa en la microautofagia de peroxisomas y se ha demostrado que su actividad catalítica no es necesaria para dicha función (Yuan, et al. 1997). También se ha documentado que la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) posee actividad de uracil-DNA glicosilasa, la cual media la reparación del DNA (Meyer-Siegler, et al. 1991) y se ha identificado como un mediador general de muerte celular (Sawa, et al. 1997).

Para la aldolasa existe evidencia de que la enzima participa en el ensamblaje de la membrana nuclear (Nakagawa, et al. 2003) y se ha propuesto que distintas isoenzimas pueden tener una función relacionada con la expresión de genes en el núcleo (Ronai, 1993). En *Medicago sativa* (alfalfa) se ha identificado a la aldolasa citosólica de clase 1 como una proteína asociada a dominios MADS, los cuales constituyen secuencias de unión al DNA conservadas en distintos factores de transcripción (Páez-Valencia, et al. 2008). En mamífero, por otra parte, se ha determinado la asociación de la aldolasa con la membrana de eritrocitos (Campanella, et al. 2005), donde se ha identificado su asociación con la proteína Banda 3, el polipéptido más abundante de la membrana de los eritrocitos (Huber, et al. 1996), así como con el citoesqueleto en tejido muscular (Pagliaro & Taylor, 1988). Y en levadura se ha determinado su interacción con la V-ATPasa (Lu, et al. 2007).

Por otra parte, se ha demostrado que la enolasa participa en la fusión de vacuolas homeotípicas, es decir del mismo tipo, y en la regulación del transporte de proteínas hacia la vacuola (Decker & Wickner, 2006). En *Escherichia coli* se encuentra asociada al complejo de degradosoma de RNA en donde parece tener una función reguladora en respuesta a estrés (Morita, et al. 2004) y se le ha asociado a la tolerancia térmica al funcionar como proteína de choque térmico (Iida & Yahara,



### Enzimas con funciones alternativas (Moonlighting Proteins)

Proteína	Función	Funciones alternativas	Organismo	Referencia
<i>Acetohidroxiácido reductoisomerasa</i>	Síntesis de aminoácidos	Estabilización del DNA mitocondrial	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zelenaya-Troitskaya, et al. 2005
<i>Aconitasa</i>	Isomerización de citrato a isocitrato	Proteína de unión al elemento de respuesta hierro (IRE-BP) Proteína de unión al DNA * Homeostasis de hierro	Mamíferos <i>Mus musculus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kenedy, et al. 1992 Philpott, et al. 1994. Narahari, et al. 2000
<i>Aldehído</i>	Glucólisis	Ensamblaje de la V-ATPasa * Ensamblaje de la membrana nuclear Asociación con la membrana de eritrocitos Proteína asociada a dominios MADS	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Xenopus laevis</i> <i>Medicago sativa</i>	Lu, et al. 2001; 2004; 2007 Nakagawa, et al. 2003 Campanella, et al. 2005 Páez-Valencia, et al. 2008
<i>Fosfofructocinasa</i>	Glucólisis	Autofagia de peroxisomas *	<i>Pichia pastoris</i>	Yuan, et al. 1997
<i>Fosfoglucoasa isomerasa</i>	Glucólisis, gluconeogénesis, vía de las pentosas	Factor de crecimiento neuronal (neuroleucina) Factor de motilidad autocrina Mediador de diferenciación y maduración celular	Mamíferos <i>Mus musculus</i> <i>Homo sapiens</i>	Chaput, et al. 1988 Watanabe, et al. 1996 Xu, et al. 1996
<i>Galactocinasa</i>	Catabolismo de la galactosa	Regulación de genes	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Hittinger & Carroll, 2007
<i>Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa</i>	Glucólisis	Uracil-DNA glicosilasa Muerte celular Ensamblaje de la membrana nuclear	<i>Homo sapiens</i> <i>Homo sapiens</i> <i>Xenopus laevis</i>	Meyer-Siegler, et al. 1991 Sawa, et al. 1997 Nakagawa, et al. 2003
<i>Glucocinasa</i>	Glucólisis	Sensor de glucosa y modulador de la secreción de insulina Apoptosis	<i>Mus musculus</i> <i>Mus musculus</i>	Matschinsky & Ellerman, 1968 Danial, et al. 2003
<i>Hexocinasa</i>	Metabolismo de la glucosa	Señalización Regulación de genes *	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Moore, et al. 2003 Ahuatzi, et al. 2004; 2007
<i>Piruvato carboxilasa</i>	Gluconeogénesis	Ensamblaje de la enzima <i>alcohol oxidasa</i> *	<i>Hansenula polymorpha</i>	Ozimek, et al. 2003
<i>Presentilina</i>	Proteasa y-secretasa	Involucrada con funciones del citoesqueleto *	<i>Physcomitrella patens</i>	Khandelwal, et al. 2007
<i>Enolasa</i>	Glucólisis	Cristalino del lente ocular Gen asociado a la respuesta al frío Proteína asociada al complejo de degradosa de RNA Fusión de vacuolas *	Mamíferos <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wistow & Piatigorsky, 1987 Lee, et al. 2002 Morita, et al. 2004 Decker & Wickner, 2006

\* Se ha demostrado que la función es independiente de la actividad catalítica de la enzima

**Tabla 1.** Enzimas con funciones alternativas (Moonlighting proteins).

1985). En plantas, la enolasa se regula positivamente en respuesta a salinidad (Forsthoefel, et al. 1995), sequía (Riccardi, et al. 1998) y anaerobiosis (Lal, et al. 1998), y se ha identificado como un gen esencial para la adaptación a frío en *A. thaliana* (Lee, et al. 2002).

### 3. ANTECEDENTES

Con el fin de identificar proteínas del tonoplasto involucradas en el transporte de sodio a la vacuola, recientemente en el laboratorio se realizó un estudio de proteómica cuantitativa en la halófito *Mesembryanthemum crystallinum*. Mediante electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE) se separaron las proteínas de la fracción altamente pura de tonoplasto de plantas expuestas y no a sal, obtenida por *Electroforesis Zonal de Flujo Libre* (EZFL), y a través del marcaje diferencial en gel (DIGE) se determinaron las proteínas cuya abundancia se modificó bajo exposición a NaCl. Después de analizar los geles utilizando el software Decyder 6.5, se determinaron diferencias entre los geles, donde cada proteína corresponde a un punto. Dichas diferencias fueron analizadas estadísticamente, considerándose solamente significativo el incremento o reducción de la abundancia de la proteína cuando esta fuera de 1.5 veces. De esta manera se identificaron 8 puntos que cumplían con los requisitos establecidos, incrementando todos ellos su abundancia. Mediante espectrometría de masas (MS) se identificaron seis de ellos, los cuales correspondieron con las subunidades B y d de la V-ATPasa, así como con las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa. La interacción de las enzimas aldolasa y enolasa con la subunidad B de la V-ATPasa fue confirmada a través de ensayos de inmunoprecipitación (Barkla, et al. 2009).

Estudios posteriores realizados en el laboratorio, permitieron determinar la participación *in vitro* de la aldolasa en la regulación de la V-ATPasa en respuesta a salinidad. Dichos ensayos se realizaron tanto en la halófito *M. crystallinum* como en la glicófito *Ananas comosus* (Barkla, et al. 2009), lo que constituye un indicio de la participación de las enzimas glicolíticas en la respuesta a salinidad no es exclusiva de plantas halófitas.

La interacción de enzimas glicolíticas con el tonoplasto de distintas especies vegetales había sido observada previamente en estudios proteómicos, pero al ser considerada como una contaminación sin función en el tonoplasto, no se profundizó

en su estudio. La HXK, por ejemplo, fue identificada en la vacuola de *A. thaliana* pero se excluyó del estudio al ser considerada como una contaminación proveniente de la vía secretora (Carter, et al. 2004). De igual manera, en un estudio proteómico para identificar proteínas vacuolares fosforiladas en cebada (*Hordeum vulgare*) las enzimas glicólíticas GPDH y aldolasa fueron descartadas (Endler, et al. 2009).

Otros estudios en levadura reportan la asociación de la aldolasa y de la enolasa a la vacuola y proponen para ellas funciones alternativas a la glicólisis. Se ha demostrado que la aldolasa interactúa directamente con las subunidades  $\alpha$ , B y E de la V-ATPasa y que la enzima regula el ensamblaje y actividad de la bomba de protones. La mutación en el gen de la aldolasa provoca la incapacidad de las levaduras para crecer a pH 7.5, condición que refleja la disociación de los sectores  $V_1$  y  $V_0$  de la V-ATPasa (Lu, et al. 2004). Ya que esto no ocurre al interrumpir el gen de la *glucosa-6-fosfato isomerasa*, una enzima de la glicólisis que cataliza un paso anterior al de la aldolasa, nos permite sugerir que el efecto observado no es simple consecuencia de la disrupción de la glicólisis. Además de esto, se ha demostrado que la unión de la aldolasa a la V-ATPasa es independiente de su actividad catalítica y se propone como el sensor de glucosa que permite la asociación de los dominios de la bomba de protones (Lu, et al. 2007). Por otro lado, Decker y Wickner (2006) demostraron que la enolasa está asociada a la vacuola de *S. cerevisiae* y proponen que la enzima podría regular el tráfico de la V-ATPasa hacia ella.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La creciente salinización del suelo es un grave problema al que se enfrenta la agricultura. Éste no solamente repercute en la producción agrícola mundial, sino que también tiene un efecto directo en la calidad del suelo y en la integridad de los ecosistemas. Entre los procesos de tolerancia a la salinidad presentes en las células vegetales, la compartimentalización de los iones de sodio constituye un aspecto importante y, al ser un proceso en el cual las sales son secuestradas, impacta en la capacidad de las plantas para evitar el daño celular causado por iones tóxicos y por tanto en su capacidad para sobrevivir, germinar y establecerse, en condiciones de estrés salino. La vacuola es el principal orgánulo involucrado en la compartimentalización, sin embargo, las distintas proteínas y los mecanismos involucrados en su funcionamiento y en su regulación no han sido completamente elucidados.

Por ello, su estudio nos ofrece la posibilidad de generar conocimiento referente a la capacidad de tolerancia y de adaptación a sal en las plantas, incluyendo aquellas de importancia alimenticia. Conocimiento que posteriormente podría ser de utilidad para seleccionar cultivos tolerantes, crear organismos transgénicos resistentes a la salinidad e incluso proponer estrategias de fitoremediación para los suelos afectados.

Recientemente se identificó la presencia de las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa asociadas al tonoplasto de la halófito *M. crystallinum* y se demostró que la abundancia de dichas proteínas en esta membrana es regulada por sal. Aunque se han propuesto distintas funciones en las que pueden estar involucradas, se desconoce aún el papel específico que desempeñan en las plantas. Debido a ello, es importante realizar estudios que nos permitan conocer la función que realizan dichas enzimas en la respuesta de las plantas a estrés salino, procurando así tener un conocimiento integral del proceso de compartimentalización y de la participación de nuevos componentes en ello.

## 5. HIPÓTESIS

- Las enzimas aldolasa y enolasa participan en la regulación de la V-ATPasa y en el funcionamiento de la vacuola en la respuesta a sal en *Arabidopsis thaliana*, por lo que las mutantes de *A. thaliana* en los genes que codifican dichas enzimas serán más susceptibles a salinidad.

## 6. OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar la participación de las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa asociadas al tonoplasto en la regulación de la respuesta a salinidad en plantas de *A. thaliana*.

## 7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la asociación de las enzimas aldolasa y enolasa con el tonoplasto de *A. thaliana* mediante ensayos de inmunolocalización.
- Obtener mutantes homocigóticas de aldolasa y de enolasa en *A. thaliana*.
- Determinar el fenotipo, a nivel macro y microscópico, de las plantas mutantes.
- Determinar la susceptibilidad al estrés salino de plantas mutantes.
- Caracterizar morfológicamente la vacuola de plantas mutantes y plantas de tipo silvestre, expuestas y no expuestas a NaCl.
- Determinar la actividad hidrolítica y de transporte de H<sup>+</sup> de la V-ATPasa de *A. thaliana* en plantas mutantes y de tipo silvestre, expuestas y no expuestas a NaCl.

## 8. MATERIAL Y MÉTODOS

### 8.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Las semillas de la línea mutante para la aldolasa, *Salk\_080758*, con inserción de T-DNA en el gen At4g26530 de la aldolasa se obtuvieron del Laboratorio de Análisis Genómicos del Instituto Salk (Alonso, et al. 2003). Mientras que las semillas de la mutante en el gen de la enolasa At2g36530 (*los2*) se obtuvieron directamente del grupo del Dr. Jian Kang Zhu, de la Universidad de California, Riverside (Lee, et al. 2002).

Las plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) se crecieron en medio MS completo (Murashige & Skoog, 1962), adicionado con vitaminas B5, 3% de sacarosa y 0.8% de agar. Para la línea Salk se adicionaron 25 mg/L de kanamicina (Weigel & Glazebrook, 2006). Las semillas de *A. thaliana* se esterilizaron previamente exponiéndolas a etanol al 100% por 1 min, se lavaron dos veces con agua estéril y se transfirieron a una solución con 15% cloro y 0.05% Tween20 por 15 min. Se realizaron cuatro lavados con agua estéril y las semillas se distribuyeron en medio MS en cajas Petri (colocando no más de 50 semillas por caja), las cuales se colocaron en un cuarto de cultivo a 25°C y con fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad. A las 2 semanas de edad, las plantas se transplantaron a charolas de germinación con tierra Metro-Mix 510<sup>®</sup> o a charolas para hidroponía de 20L con la solución nutritiva de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1938) pH 7, diluida a la mitad de su concentración (Vera-Estrella, et al. 1999; 2005; Barkla, et al. 2002), y se mantuvieron en condiciones de invernadero (17 a 28°C) con luz y fotoperiodo natural. Las plantas mantenidas en charolas de germinación se regaron con agua de la llave cada tercer día (siempre y cuando no estuvieran en tratamiento) y una vez por semana con la solución nutritiva Hoagland pH 7, diluida a la mitad de su concentración. El medio hidropónico fue cambiado 2 veces al mes. A las 8-10 semanas después de la germinación, se dio inicio al tratamiento con 75 mM de NaCl por 4 días.

Las plantas de la línea mutante *los2* no se desarrollan normalmente en condiciones de hidroponía por lo que fueron crecidas en charolas de germinación con tierra Metro-Mix 510<sup>®</sup>. En este caso, las plantas de la línea mutante y de la línea tipo silvestre Col-0 de 10 semanas de edad se expusieron al tratamiento con sal mediante la inmersión de las charolas en 75mM de NaCl. La base de las charolas se perforó previamente y, para dar inicio al tratamiento, se colocaron dentro de contenedores con la solución salina, permitiendo que el suelo se humedeciera con ella. La tierra de las charolas se mantuvo húmeda con la solución salina durante 4 días, evitándose el exceso de agua que pudiera inducir una condición de anoxia en las plantas. Al cabo de 4 días de exposición a NaCl se realizaron los experimentos.

## **8.2 Extracción de DNA.**

El DNA genómico se obtuvo utilizando el kit de extracción Phytopure de GE Healthcare ([www6.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/sample\\_preparation~product\\_selection\\_category~genomic\\_dna\\_purification~nucleon\\_phytopure?OpenDocument&moduleid=39983](http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/sample_preparation~product_selection_category~genomic_dna_purification~nucleon_phytopure?OpenDocument&moduleid=39983)). Se utilizó 0.1g de tejido fresco, el cual se molió en un mortero estéril con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El tejido pulverizado se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL al que se añadieron 600 µL del reactivo 1 que contiene el detergente lauril sulfato sódico (SDS) y Hidroximetil aminometano (Tris). En este mismo paso se añadieron 20 µg/mL de RNAasa y se dejó incubar por 30 min a 37°C. Para continuar la lisis celular se agregaron 200 µL del reactivo 2 que contiene NaCl y se incubaron a 65°C durante 10 min con agitaciones regulares seguidas de 20 min de reposo en hielo. Posteriormente, las muestras se incubaron por 10 min con agitación constante a temperatura ambiente y se centrifugaron a 1500 x g por 10 min en una microcentrífuga BioFuge *pico*<sup>®</sup> (Sorvall, México). Se colectó el sobrenadante y el DNA se precipitó con un volumen igual de isopropanol. Se realizó otra centrifugación en la misma centrífuga, a 4000 x g durante 5 min para concentrar el ADN. La pastilla se lavó con etanol frío al 70%, se secaron las muestras a temperatura ambiente por 10 min y se resuspendieron en 20 µL de agua estéril MilliQ.



Como alternativa al kit, se utilizó el protocolo descrito por Dellaporta y colaboradores (1983), con algunas modificaciones. De 0.5 a 2.0 g de tejido fresco de *A. thaliana* se molió en mortero con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se transfirió a tubos eppendorf con 250 mL de la solución amortiguadora de extracción que contiene 50 mM de Tris pH 8, 10 mM de EDTA pH 8, 100 mM de cloruro de sodio, SDS al 1% (peso/volumen) y 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol (agregado inmediatamente antes de usar). El tejido se homogeneizó con un pistilo estéril y se colocó a 65°C por 10 min con agitación cada 2 min. Posteriormente se agregaron 65  $\mu$ L de acetato de potasio (KOAc) 5 M a cada muestra, los tubos se invirtieron 5 veces y se transfirieron a hielo por 5 min. Se llevaron a cabo dos centrifugaciones a 16,000 x g y en ambas se tomó el sobrenadante para eliminar el tejido. Se agregó un paso de limpieza con un volumen igual al de la muestra de fenol-cloroformo, se centrifugó a 16,000 x g por 5 min y nuevamente se tomó el sobrenadante. Se agregaron 320  $\mu$ L de isopropanol y 30  $\mu$ L de acetato de sodio (NaOAc) 3 M, pH 4.5, los tubos se invirtieron 5 veces para mezclar las soluciones y se colocaron a -20°C durante 10 min. Pasado ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 16,000 x g por 10 min, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70%. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y se resuspendieron en agua MilliQ estéril. La concentración de ADN obtenida se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, México).

### **8.3 Amplificación del ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

Para amplificar los genes de interés, se prepararon reacciones para PCR de 20  $\mu$ L y 50  $\mu$ L. En el tubo de reacción se colocó la solución amortiguadora para PCR con 50 mM de KCl, 0.2 mM de la mezcla de dNTP's ([www.fermentas.com/catalog/nucleotides/dntpset.htm](http://www.fermentas.com/catalog/nucleotides/dntpset.htm)), 0.2 mM de cada uno de los oligonucleótidos, 0.25  $\mu$ M de Taq Polimerasa ([www.fermentas.com/catalog/modifyingenzymes/taqdnapolymeraserecomb.htm](http://www.fermentas.com/catalog/modifyingenzymes/taqdnapolymeraserecomb.htm)), 1.5 mM de MgCl y 50-100 ng del templado de ADN. Las muestras se colocaron en un termociclador PTC 200 de MJ Research con el siguiente protocolo de temperaturas:

2 min a 95°C en un ciclo inicial para desnaturalizar el ADN, 40 ciclos alternando temperaturas de 95°C por 1 min, 50-65°C por 30 s, 72°C por 1 min y una elongación final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis horizontal utilizando una cámara Gel XL ultra de Labnet, en gel de agarosa al 0.8% (peso/volumen) en TAE 0.5X, a 50 V por 45 min o a 100 V por 20 min según el tamaño del producto esperado.

#### **8.4 Selección de plantas de la línea *Salk\_080758*, con inserción de T-DNA en el gen *At4g26530*.**

Las semillas provenientes de plantas identificadas por PCR como heterocigóticas para la inserción de T-DNA se sembraron en medio MS con kanamicina (25mg/L). A los 7-10 días después de la siembra, las plántulas se observaron bajo el estereoscopio y se contabilizaron las semillas cuya pigmentación y raíz se desarrollaron normalmente. Con estos datos se estimó la proporción de heterocigóticas y homocigóticas en la población. Las plantas que se desarrollaron normalmente, sin efectos de la kanamicina, se transfirieron a charolas con tierra para obtener sus semillas y se repitió el proceso de selección hasta obtener porcentajes de germinación y de desarrollo normal cercanos al 100%.

#### **8.5 Confirmación de la mutación en la línea *los2*.**

A partir del DNA de plántulas de 3 semanas y mediante PCR, utilizando los oligos diseñados específicamente para la mutante, se amplificó un fragmento de 645 pb en el cual se encuentra la mutación de interés. La calidad del producto de PCR se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, 20 min a 100V, se purificó y se cuantificó. Se envió la muestra (100 ng) a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología (UNAM), empleando el primer derecho (RP) para su secuenciación.

#### **8.6 Aislamiento de tonoplasto de hojas de *A. thaliana* utilizando un gradiente discontinuo de sacarosa.**

El aislamiento de membranas se llevó a cabo utilizando un gradiente discontinuo de

sacarosa, de acuerdo con la metodología descrita por Barkla y colaboradores (1995). Pasados los 4 días de exposición a 75mM de NaCl, se obtuvo la parte aérea de las plantas (30 g peso fresco) y se colocó en 300 mL de solución de homogeneización fría, manteniendo una relación de 1-2 gramos de tejido por 10 mL de medio. La solución de homogeneización contiene: 400 mM de manitol, 10% (peso/volumen) de glicerol, 30mM de Tris, 0.5% (peso/volumen) de albúmina de suero bovino (BSA), 5 mM de ácido tetra-acético del etilenglicol (EGTA), 0.5 mM de hidroxibutilanisol (BHT), 0.25 mM de dibucaina, 5 mM de MgSO<sub>4</sub>. Se ajusta el pH a 8.0 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e inmediatamente antes de usar se agregan 5% (peso/volumen) de polivinilpirrolidona 10 (PVP-10), 5% (peso/volumen) de PVP insoluble, 1 mM de fluoruro de fenilmetanosulfonil (PMSF), 2 mM de ditiotreitól (DTT), 1mM de benzamidina y 26 mM de K-metabisulfito. La homogenización del tejido se llevó a cabo en una licuadora comercial marca Waring con 5 pulsos de 20 segundos cada uno y 20 segundos entre cada pulso. El homogeneizado se filtró en 4 capas de gasa y se centrifugó a 10,000 x g a 4°C durante 20 min, utilizando el rotor Beckman JA-20 y la centrífuga JS-HS de la misma marca. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 100,000 x g por 50 min a 4°C utilizando el rotor Beckman Ti45 y la ultracentrífuga Beckman Optima<sup>®</sup> L-80. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 10 mL de medio de suspensión utilizando el homogenizador de tejidos Potter-Elvehjem con pistilo de teflón. El medio de suspensión contiene 400 mM de manitol, 10% (peso/volumen) de glicerol, 1.8 mM de Tris/Mes pH 8.0 y 1.3 mM de DTT. La suspensión microsomal se colocó sobre gradientes discontinuos de sacarosa, los cuales consistieron en 9 mL de sacarosa al 22% (peso/volumen), 9 mL de sacarosa al 32% (peso/volumen) y 9 mL de sacarosa al 38% (peso/volumen), todos disueltos en solución de suspensión. Se centrifugaron las muestras a 100,000 x g por 2 horas a 4°C utilizando el rotor SW28 y la ultracentrífuga previamente descrita. Las membranas que corresponden al tonoplasto, contenidas en la interfase 0/22% de sacarosa, se colectaron. Se diluyeron en solución de suspensión y se precipitaron a 80,000 x g por 1 hora a 4°C empleando el rotor Beckman Ti60 y la ultracentrífuga L-80. Se recuperó la pastilla, se resuspendió en 200 µL de la solución de suspensión y se dividió la muestra en

alícuotas de 50  $\mu$ L, se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **8.7 Extracción de proteína total de hojas de *A. thaliana*.**

La parte aérea de plantas de 8-10 semanas de edad de *A. thaliana* se colocó en nitrógeno líquido y se maceró en un mortero hasta obtener un polvo fino. La muestra se transfirió a un tubo cónico de 15 mL con la solución amortiguadora de extracción en una proporción 1:1 y se dejó incubar por 10 min en hielo. La solución amortiguadora de extracción contiene 250mM de manitol, 10% (peso/volumen) de glicerol, 10mM de Tris/Mes pH 8.0, 1mM de EDTA, 5mM de DTT, 1mM de benzamidina, 1mM de PMSF y 5% (peso/volumen) de PVP insoluble. Pasados los 10 min, las muestras se mezclaron en el vortex por 1 min y se filtraron a través de dos capas de Miracloth. El filtrado se separó en alícuotas de 1mL, se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **8.8 Tratamiento caotrópico de tonoplasto.**

Con el fin de eliminar aquellas proteínas unidas débilmente a la membrana, las muestras de tonoplasto puro se trataron con una solución amortiguadora caotrópica. Se tomaron 200  $\mu$ g de cada muestra y se incubaron 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$  en la solución de suspensión descrita anteriormente, en presencia de 200 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 11, suplementado con 3mM de  $\text{MgSO}_4$  y 3 mM BTP-ATP. Pasado ese tiempo, las membranas se concentraron mediante centrifugación empleando el rotor Beckman Ti45 y la ultracentrifuga L-80 de la misma marca, a 100,000 x g por 50 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **8.9 Cuantificación de la proteína.**

La proteína presente en las muestras de tonoplasto obtenidas se cuantificó mediante el método modificado de Bradford (1976). La proteína de membrana se solubilizó con 0.5% de Triton X-100 (v/v) por 5 min a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se agregaron 800  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ para diluir el detergente y se añadieron 200  $\mu$ L de colorante Bradford. Las muestras se incubaron por 5 minutos, se mezclaron empleando el vortex y se leyeron a 595 nm utilizando el espectrofotómetro de UV-visible 845x de Hewlett Packard y el software UV-visible

Chem Station de la misma marca.

Para eliminar los lípidos en la muestra antes de la separación de las proteínas por SDS-PAGE, se transfirió el volumen necesario de proteína a un tubo eppendorf y se añadieron 1.5 mL de Etanol/Acetona (1:1) a  $-30^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se mantuvieron a  $-30^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, según la metodología expuesta por Parry y colaboradores (1989). Las muestras se centrifugaron a 13,000g por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$  en un rotor F2404 de una centrifuga de mesa modelo GS-15R (Beckman). Las pastillas se secaron al aire por 5 min y se resuspendieron con solución amortiguadora de Laemmli (1970) (62.5 mM Tris/HCl, 2.5% (peso/volumen) de SDS, 5% (peso/volumen) de 2,β-mercaptoentanol y 0.001% (peso/volumen) de azul de bromofenol, en una relación 1μL por μg de proteína, para someterse a la electroforesis.

#### **8.10 SDS-PAGE y análisis tipo “western blot”.**

Previa a la colocación de la proteína en los geles, los tubos con las muestras de proteína se colocaron a baño maría a  $60^{\circ}\text{C}$  por 2 min. La electroforesis se llevó a cabo en mini gel de acrilamida a concentración final del 10%, compuesto por 30% de acrilamida/bisacrilamida, 1.5 M Tris/HCl pH8.0, SDS al 10%, N,N,N,N'-tetrametilnediamina (TEMED) y persulfato de amonio al 10%, durante 45 min a 200V ( $4^{\circ}\text{C}$ ) utilizando una cámara Mini Protean II de Bio-Rad. Se utilizaron 300 mL de solución amortiguadora de corrida (0.06 M Tris, 0.04 M glicina y 8mM de SDS) y se cargaron 12-20 μg de proteína por carril y 5 μg de marcador de peso molecular (Fermentas, México) en el primer carril de la izquierda de cada gel. Para algunos casos, la electroforesis fue realizada por duplicado, empleando un gel para corroborar que la cantidad de proteína cargada fuera la misma para todas las muestras. Para este fin, el gel de acrilamida obtenido fue teñido por 45 min con solución de tinción que contiene 0.025% de azul de Coomassie (peso/volumen), 50% (v/v) de metanol y 7% (v/v) de ácido acético glacial. Posteriormente, el gel se transfirió a solución para desteñir, la cual consta de 40% de metanol y 7% de ácido acético glacial. Una vez que las bandas se observaron claramente, se retiró el gel y se escaneó utilizando el escáner Scan Jet 8250 de Hewlett Packard y el software

Fotografías e Imágenes HP versión 1.1 proporcionado por la misma compañía. Una vez concluida la electroforesis, se incubó el gel de acrilamida durante 10 min en solución amortiguadora de transferencia (0.02 M de Tris, 0.15 M de glicina y 20% de metanol) con agitación constante, para eliminar el exceso de SDS que podría reducir la eficiencia de la transferencia. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (ECL plus, GE Lifesciences) utilizando la unidad de transferencia Mini Trans-Blot Cell de Bio-Rad y la misma solución de transferencia. La transferencia se realizó durante 75 min a 100 V a 4°C. Para corroborar que la cantidad de proteína colocada en cada carril haya sido la misma, la membrana fue teñida por 1 min con una solución que contiene 0.01% (peso/volumen) de colorante rojo de Ponceau y 5% (v/v) de ácido acético, se lavó con H<sub>2</sub>O estéril y se escaneó empleando el escáner y el software previamente descrito.

#### **8.10.1 Detección de proteína empleando anticuerpos específicos.**

La presencia y abundancia de las proteínas aldolasa y enolasa así como de las subunidades E, B y A de la V-ATPasa, se determinó empleando anticuerpos específicos policlonales contra cada una de ellas. Las membranas se incubaron por 2-3 horas en solución para bloquear, la cual contiene solución amortiguadora Salina Tris (10mM Tris/HCl, 150mM NaCl y pH 7.5), 5% (peso/volumen) de leche descremada en polvo (Svelty, Nestlé) y 0.02% (peso(volumen) de azida de sodio para evitar su contaminación con bacterias. Posteriormente, las membranas se colocaron en 8 mL de la misma solución con el anticuerpo primario y se dejó incubar por 12 horas a temperatura ambiente, con agitación constante. Al día siguiente se llevaron a cabo tres lavados con 50 mL de solución amortiguadora Salina Tris (TBS), TBS con 0.02% (v/v) Tween-20 y TBS, durante 15 minutos cada una, con agitación constante y se colocó el segundo anticuerpo en solución para bloquear sin azida de sodio, ya que este inhibe la reacción enzimática de la peroxidasa de rábano. Al cabo de 3 horas, se realizaron los tres lavados con TBS comentados anteriormente y los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron utilizando el kit de quimioluminiscencia ECL (Enhanced ChemiLuminescence) para detección de western blot de GE Healthcare

([www6.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&moduleid=46853](http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&moduleid=46853)) de acuerdo con las indicaciones del fabricante y una placa de autoradiografía expuesta por 5-20 min. Para la aldolasa y la VHA-E se realizaron exposiciones por 5 minutos, 15 minutos para la enolasa y 20 minutos para la VHA-A y la VHA-B.

### **8.10.2 Anticuerpos utilizados y concentraciones empleadas.**

Los anticuerpos policlonales generados en conejo contra la aldolasa ([www.agrisera.com/en/artiklar/fructose-16-bisphosphate-aldolase-fba.html](http://www.agrisera.com/en/artiklar/fructose-16-bisphosphate-aldolase-fba.html)) y contra la VHA-E ([www.agrisera.com/en/artiklar/-v-atpase-h-vacuolar-h-atpase-subunit-h.html](http://www.agrisera.com/en/artiklar/-v-atpase-h-vacuolar-h-atpase-subunit-h.html)) de *A. thaliana*, se emplearon a una dilución de 1:5000. El anticuerpo policlonal generado en cabra contra el C-terminal de la enolasa de humano ([www.scbt.com/datasheet-7455-enolase-c-19-antibody.html](http://www.scbt.com/datasheet-7455-enolase-c-19-antibody.html)) se utilizó a una dilución de 1:1000 y para el caso de los anticuerpos contra la VHA-A y la VHA-B de *Kalanchoe*, ambos producidos en conejo (donado por el Dr. J.A.C, Smith, Universidad de Oxford) se empleo una dilución de 1:500. Para determinar la presencia de distintos organelos en las fracciones obtenidas mediante gradiente discontinuo de sacarosa se utilizaron los siguientes anticuerpos contra proteínas marcadoras: tonoplasto (VHA-E, subunidad E de la V-ATPasa) a una dilución de 1:1000, cloroplasto ( $\alpha$ -ATP beta, subunidad de la ATPasa de cloroplasto) a una dilución de 1:1000, golgi/RE (CRT1, calreticulina) a una dilución de 1:2000, mitocondria (VDAC, canal de aniones dependiente de voltaje de la membrana externa) a una dilución de 1:1000 y membrana plasmática (AHA2, H<sup>+</sup>ATPasa) a una dilución de 1:2000, todos generados en conejo. Los anticuerpos secundarios para detectar la fracción constante de la inmunoglobulina G (IgG) de conejo y/o de cabra, producidos en cabra y en conejo respectivamente, se utilizaron a una dilución de 1:3000.

### **8.10.3 Análisis de abundancia de la proteína detectada con anticuerpos específicos.**

Para determinar la cantidad de proteína detectada por los anticuerpos específicos en los experimentos de western blot, las placas de autoradiografía obtenidas fueron

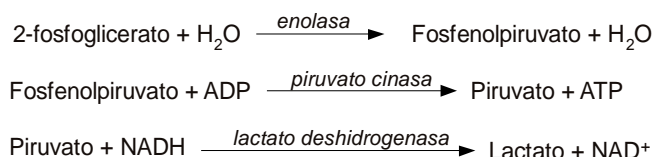
digitalizadas utilizando el escáner y el software para tratamiento de fotografías e imágenes previamente descritos. Las imágenes fueron analizadas semicuantitativamente por densitometría, utilizando el software ImageJ versión 1.42q (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Se normalizaron los valores obtenidos con base al control (plantas de tipo silvestre no expuestas a sal) y se realizó el análisis estadístico empleando el software OriginPro 8 ([www.originlab.com](http://www.originlab.com)).

### 8.11 Actividad hidrolítica de la V-ATPasa.

La actividad hidrolítica de la V-ATPasa se midió en relación a la liberación de fosfato inorgánico (Pi) siguiendo el método de Ames (1966). La proteína de tonoplasto previamente aislado (15 µg/100 µl) se incubó a 37°C por 30 min en 300 µl de solución de ensayo, la cual contiene: 50 mM de KCl, 6 mM de MgSO<sub>4</sub>, 30 mM de Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM de molibdato de sodio como inhibidor de fosfatasas. Para evaluar el efecto de las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa sobre la estimulación de la actividad hidrolítica de la V-ATPasa, se añadieron 0.03 unidades de aldolasa purificada de *Spinacia oleracea* (Sigma, Aldrich # A9329) y/o 0.04 unidades de enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma, Aldrich # E6126). La reacción fue detenida agregando 800 µl de solución de Ames (1 volumen de ácido ascórbico al 10% y 6 volúmenes de molibdato de amonio al 0.42% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se incubó por 30 min a temperatura ambiente y se midió la absorbencia a 820 nm. Se utilizó el espectrofotómetro de UV-visible y el software descrito en párrafos anteriores.

### 8.12 Actividad enzimática de la enolasa.

La actividad catalítica de la enolasa se determinó a través de la medición de la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> (Hüter, et. al. 1999), de acuerdo con las siguientes reacciones acopladas:





El ensayo se llevó a cabo a 30°C en medio de reacción, el cual contiene 50mM de Tris-HCl pH 7.4, 0.2 mM de  $\beta$ -NADH (Sigma, # cat. N8129), 3.3 mM de  $MgCl_2$ , 20 mM de KCl, 1.2 mM de ADP (Sigma, # cat. A2754) y 2mM de 2-fosfolglicerato. Se añadieron 30  $\mu$ g de proteína total de tonoplasto y 3 unidades de lactato deshidrogenasa, 2.1 unidades de piruvato cinasa (Sigma, # cat. P0294) para iniciar la reacción. El ensayo se realizó en un volumen total de 1 mL. La disminución en la absorbencia se midió cada 5 s, durante 2 min a 340 nm, empleando el espectrofotómetro de UV-visible y el software previamente descritos.

La conversión de absorbencia a unidades se llevó a cabo utilizando el coeficiente de extinción del NADH con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad específica de la enolasa} = \frac{\Delta \text{ Abs 340 nm (min}^{-1} \text{ mg}^{-1})}{(\text{U/mg de proteína})(1)}$$

Donde:

U= 1  $\mu$ mol de sustrato convertido.

6.22= Coeficiente de extinción de  $\beta$ -NADH a 340 nm.

1= volumen de reacción en mL.

### **8.13 Mediciones de osmolaridad y de concentración de iones $Na^+$ y $K^+$ .**

La parte aérea de plantas de tipo silvestre y de plantas mutantes *los2*, control y expuestas a 75 mM de NaCl se colocó en jeringas de 10 mL a las que se colocó previamente un filtro Whatman No. 1. El material se congeló a -30°C por 24 horas y la savia se obtuvo mediante centrifugación a 1500g por 15 min utilizando el rotor Beckman S4180 y la centrifuga GS-15R de la misma marca. La osmolaridad se determinó en un volumen de 30  $\mu$ L, con el osmómetro crioscópico Osmomat 030 (Gonotec, Alemania). La medición de  $Na^+$  y  $K^+$  se llevó a cabo mediante fotometría de flama empleando el flamómetro modelo 943 de Instrumentation Laboratory (Lexington, Massachusetts. EUA).

#### **8.14 Fijación del tejido y microscopía electrónica.**

Se realizaron cortes semifinos de la sección media de hojas de plantas de *A. thaliana* de tipo silvestre y mutantes *los2*, expuestas y no expuestas a 75mM de NaCl, y se prepararon para su observación por microscopía electrónica. Las muestras se fijaron en 0.1 M de paraformaldehído (PFA) al 4% en solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.2M, pH 7.4 por 1 h y post-fijadas en tetraóxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) al 1% para dar contraste a la muestra. Después, el tejido se lavó tres veces en la solución de cacodilato durante 10 min y se colocó en una solución de sacarosa 0.2 M durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se repitieron los lavados y se realizó una serie de deshidrataciones con etanol (70-100%). Las muestras fueron embebidas en resina Epon durante 24 h, se cortaron con cuchilla de vidrio, se tiñeron con azul de toluidina, se montaron en rejillas de cobre de 200 mesh cubiertas por formvar-carbón y se observaron en el microscopio electrónico Zeiss EM 900 a 80 kv (Carl Zeiss, Int.). Se tomaron las fotografías con la cámara CCD Dual vision 300W (Gaton, Inc.) acoplada al microscopio.

#### **8.15 Modelaje de la proteína enolasa.**

Las estructuras simuladas de la enolasa de tipo silvestre y mutante *los2* de *A. thaliana* (gen At2g36530) se generaron mediante modelaje por homología con la estructura de la enolasa tipo 1 de humano (PDB:3B97) empleando el software gratuito Modweb (<http://modbase.compbio.ucsf.edu/ModWeb20-html/modweb.html>). Se realizó un alineamiento múltiple (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con 45 secuencias depositadas en el PDB (Protein Data Bank) para confirmar la elegida por el programa como la de más alta homología y el modelo fue verificado utilizando el software Swiss-Model (Arnold, et al. 2006; Kiefer, et al. 2009; Peitsch, 1995). La visualización y manipulación de la imagen se llevó a cabo con el programa Swiss PdbViewer (Guex & Peitsch, 1997). No se realizó ningún procedimiento de minimización de energía o ajuste manual.

### **8.16 Medición de clorofila y carotenoides en hojas de *A. thaliana*.**

Los pigmentos fotosintéticos de plantas de tipo silvestre y mutantes *los2*, germinadas en medio MS con 75 mM de NaCl, se extrajeron y se cuantificaron mediante espectrofotometría siguiendo el protocolo descrito por Lichtenthaler (1987). Las hojas de plantas de 12 días de edad se machacaron en acetona al 80% utilizando un pistilo, las muestras se dejaron incubar en la oscuridad a 4°C durante 12 h y se centrifugaron utilizando la microcentrífuga BioFuge *pico*<sup>®</sup> (Sorvall, México) a 16,000 x *g* por 10 min. 1 mL de cada muestra se tomó para su medición utilizando el espectrofotómetro de UV-visible y el software previamente descritos. Se obtuvo el diagrama de absorbencia de 400 a 700 nm para determinar la posición de los picos. Se midió la absorbencia a 470 nm, 645 nm y 663 nm y las concentraciones de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides se calcularon utilizando los siguientes coeficientes de extinción (Lichtenthaler, 1987; Lichtenthaler & Buschmann, 2001):

$$C_a (\mu\text{g/mL}) = 12.25(A_{663.2}) - 2.79(A_{646.8})$$

$$C_b (\mu\text{g/mL}) = 21.50(A_{646.8}) - 5.10(A_{663.2})$$

$$C_{\text{total}} (\mu\text{g/mL}) = 18.71(A_{646.8}) - 7.15(A_{663.2})$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g/mL}) = (1000(A_{470}) - 1.82(C_a) - 85.02(C_b))/198$$

Donde C es la concentración en  $\mu\text{g/mL}$  y A es la absorbencia a la longitud de onda indicada.

### **8.17 Diseño de los oligonucleótidos y secuencias.**

Los oligonucleótidos para la línea *Salk\_080758* con inserción de T-DNA en el gen de aldolasa se diseñaron utilizando el programa para diseño de oligonucleótidos Salk T-DNA (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) y se confirmaron empleando el software SDSC Biology Workbench 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu/>) y el programa OligoCalc ([www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html](http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html)). Mientras que los oligos diseñados para el gen de la enolasa se desarrollaron utilizando el programa Vector NTI 10.3.0 de Invitrogen ([www.invitrogen.com/site/us/en/home/LINNEA-Online-Guides/LINNEA-Communities/Vector-NTI-Community/Vector-NTI.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/LINNEA-Online-Guides/LINNEA-Communities/Vector-NTI-Community/Vector-NTI.html)) y se confirmaron utilizando los programas Workbench 3.2 y OligoCalc (Tabla 2).

***Aldolasa, Salk\_080758 (At4g26530)***

RP, 5'TAAGTACATTGCCACACCG3'

LP, 5'CTTCCTCTTCACTCTGTCC3'

LBb1.3, 5'ATTTTGCCGATTTTCGGAAC3'

***Oligos Enolasa (At2g36530)***

RP, 5'GTTGGTGATGAAGGTGGGTTTG3'

LP, 5'CCAACCTCCTCCTCAATACGCAA3'

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados.

## 9. RESULTADOS

A partir del trabajo previo en el que se identificaron a las enzimas aldolasa y enolasa asociadas al tonoplasto de *M. crystallinum*, nos planteamos profundizar en el estudio de la función de dichas enzimas en la respuesta a NaCl. Puesto que no se cuenta con mutantes en *M. crystallinum* se buscó trabajar con el organismo modelo *A. thaliana*, para el cual existe una gran cantidad de mutantes disponibles. Además de la facilidad para trabajar con *A. thaliana* debido a la existencia de bancos de semillas y a la disponibilidad de su genoma completo, la especie nos ofrecía la posibilidad de confirmar la presencia de las enzimas aldolasa y enolasa en el tonoplasto de una especie glicófita.

Ambas líneas mutantes, tanto para aldolasa como para la enolasa, fueron elegidas en base a los resultados obtenidos en el trabajo previo con el tonoplasto de *M. crystallinum* (Barkla, et al. 2009) (Tabla 3). Las secuencias de los péptidos cuya abundancia se modificaba bajo exposición a NaCl fueron alineados (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Coincidiendo la secuencia de los péptidos con los genes At4g26530 (que codifica para la aldolasa) y At2g36530 (que codifica para la enolasa), para los que existen líneas mutantes.

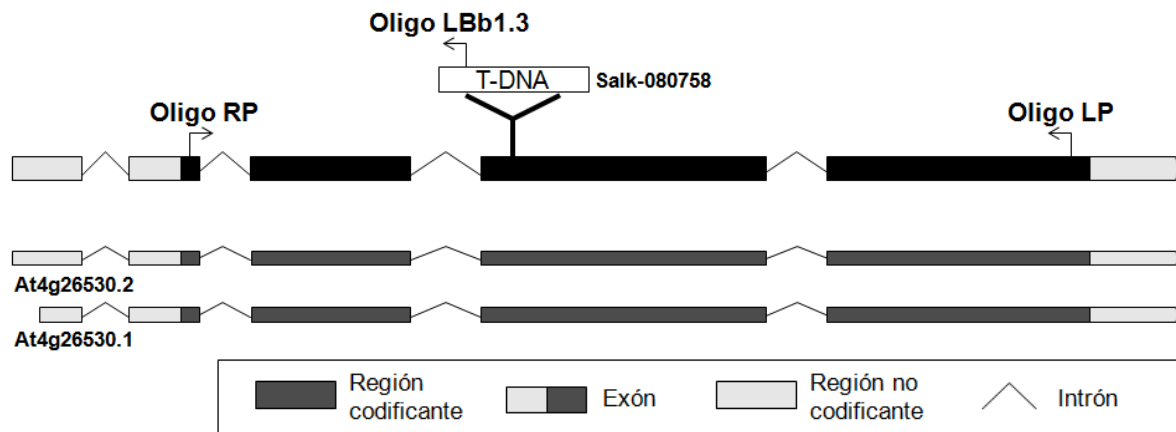
Identificación de proteínas reguladas por NaCl en <i>Mesembryantenum crystallinum</i>			
Nombre del gen	Nó. de péptidos identificados	Secuencia	Función
PGH1-Enolasa	3	K.VNQIGSVTESIEAVK.M	Glicólisis, fusión vacuolar y tráfico.
		K.NVNEIIGPALVGK.D	
		R.AAVPSGASTGVYEALER.D	
PGH1-Enolasa	2	K.VQIVGDDLLVTNPK.R	Glicólisis, fusión vacuolar y tráfico.
		K.VNQIGSVTESIEAVK.M	
ALF1- Fructosa bifosfato alddolasa	5	K.TAAGKPFVEVLK.E	Glicólisis.
		R.FAGINVENVESNR.R	
		K.VAPEVIAEYTVR.A	
		K.GVVELAGTNGETTT	
		QGLDGLGAR.C	
		K.YADELIANAAYIGTPGK.G	

**Tabla 3.** Secuencia de péptidos obtenidos a partir del estudio proteómico realizado con el tonoplasto de la halófita *M. crystallinum* (Barkla, et al. 2009).

La presencia de 8 genes para la aldolasa y de 4 genes para la enolasa en *A. thaliana*, así como la existencia de una vía alterna de glicólisis en los plástidos de las plantas (Plaxton, et al. 1996) nos llevó a suponer que las mutantes serían viables a pesar de contener mutaciones en genes básicos para el metabolismo de la glucosa.

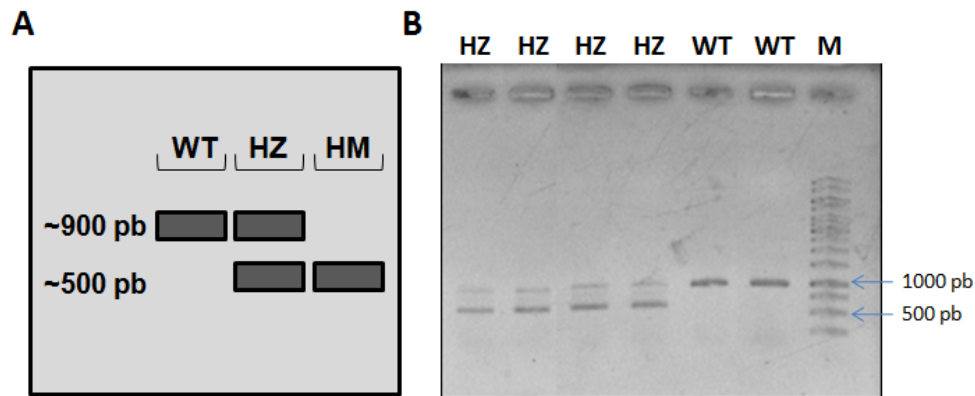
### 9.1 Obtención de plantas de *Arabidopsis thaliana* homocigóticas para la inserción de T-DNA en el gen de la aldolasa *At4g26530*.

Con el fin de caracterizar la función de la aldolasa en la respuesta y tolerancia a la salinidad en *A. thaliana*, se utilizó a la línea *Salk\_080758* ecotipo Columbia (Col-0) (Alonso, et al. 2003). Dicha línea contiene una inserción de T-DNA en el cuarto exón del gen de la aldolasa *At4g26530* (Fig. 5), lo que afecta cualquiera de los dos productos generados por el procesamiento alternativo del gen. El tamaño de los dos mensajeros (*At4g26530.1* y *At4g26530.2*) resultantes del gen difieren en 38 pb aproximadamente. Sin embargo, dicha diferencia se refleja en el tamaño de las regiones no transcritas (UTR) y no en el tamaño de la proteína resultante. La cual tiene un tamaño de 358 aminoácidos para ambos casos (AceView, [www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/index.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/index.html)).



**Figura 5. Organización de intrones y exones del gen *At4g26530* de la línea mutante *Salk\_080758*, con inserción de T-DNA.** Las flechas muestran las posición de los oligonucleótidos utilizados para analizar genéticamente a la mutante (RP en el extremo 5' del gen, LP en el extremo 3' y LbB1.3 dentro del inserto de T-DNA). El gen contiene 4 intrones y 5 exones. El rectángulo muestra la localización del inserto de T-DNA en el cuarto exón, en una región codificante. Los dos productos del procesamiento alternativo del gen (*At4g26530.1* y *At4g26530.2*) son afectados por esta inserción.

La línea *Salk\_080758* proveniente del Instituto Salk es una línea heterocigótica, cuyas semillas corresponden a la generación T2 o T3. Mediante PCR y utilizando los oligonucleótidos diseñados para reconocer los extremos del gen (RP, LP), así como para unirse al T-DNA (LBb1.3), se confirmó que la presencia y la heterocigosis del T-DNA. Dado que se utilizaron tres oligonucleótidos, se esperaba obtener fragmentos de distintas longitudes a partir de la amplificación por PCR: para el caso de plantas de tipo silvestre, o sin inserción de T-DNA, se esperaba la amplificación de un solo fragmento de 989 pb, mientras que para las plantas con inserción en ambos alelos se esperaba generar un fragmento corto de 517 pb (Fig. 6A). Como se observa en la figura 6B, la presencia de ambos fragmentos (uno de 517 bp y uno de 989 bp) nos indican que el T-DNA se encuentra presente solamente en uno de los alelos; por lo que recurrimos al gen de selección de resistencia a kanamicina presente en las plantas transformadas para obtener plantas homocigóticas.



**Figura 6. Las plantas de la línea *Salk\_080758* son heterocigóticas para la inserción de T-DNA en el gen *At4g26530*.** **A.** Esquema de productos esperados mediante PCR para las líneas obtenidas del instituto Salk. Para la mutante *Salk\_080758* homocigótica para la de T-DNA se espera una única banda de 517 pb, mientras que para los organismos sin inserción se espera un producto de 989 pb. Tomada de <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>. **B.** Producto de PCR obtenido para la línea *Salk\_080758*. La amplificación de dos fragmentos, uno largo y uno corto, nos indican que las plantas mutantes son heterocigóticas para la inserción de T-DNA. Como control se utilizaron plantas silvestres, en las cuales solamente hay una banda de 989 pb que corresponde con la ausencia de la inserción de T-DNA. Carriles: **WT**, plantas de tipo silvestre; **HZ**, plantas heterocigóticas para la inserción de T-DNA; **HM**, plantas homocigóticas para la inserción; **M**, marcador de peso molecular.

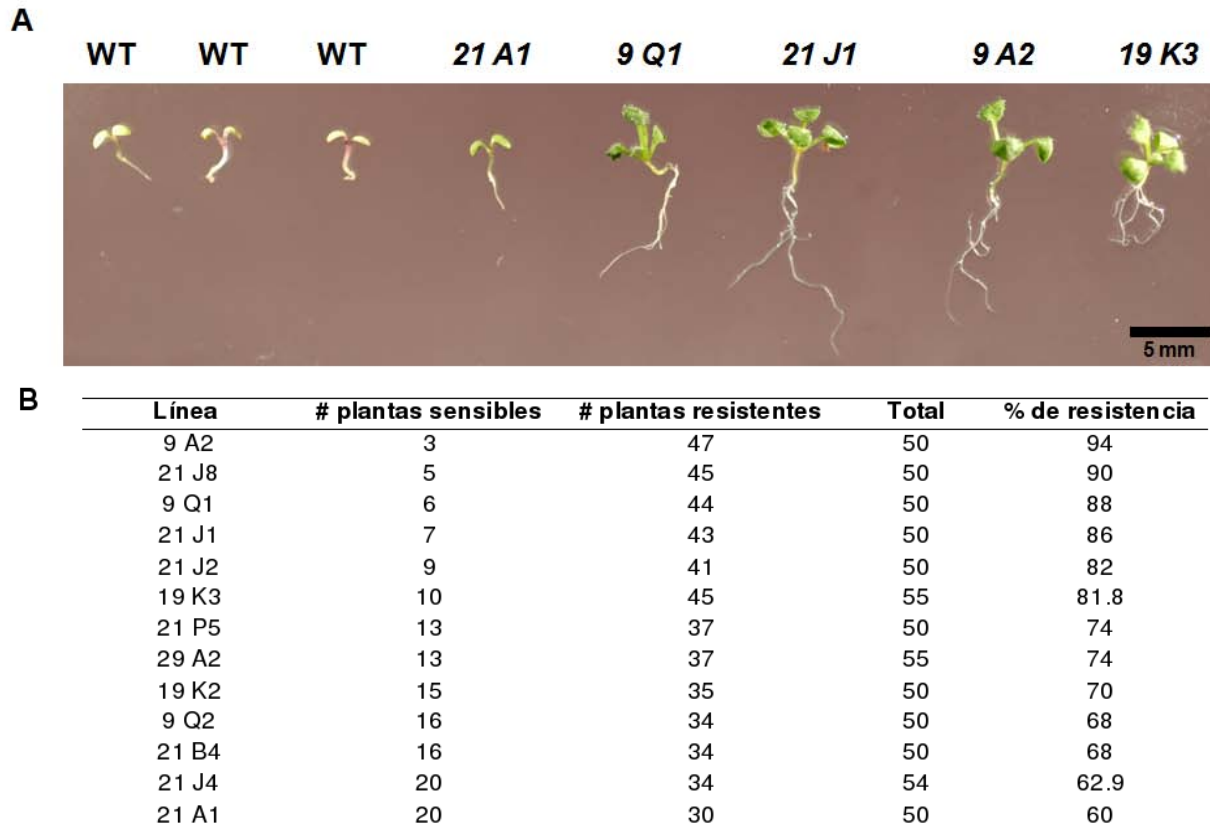
### 9.1.1 Selección de mutantes empleando kanamicina.

Las plantas mutantes de Salk fueron transformadas por el T-DNA de *Agrobacterium* utilizando el vector pROK2 (O'Malley, et al. 2007), el cual cuenta con el gen reportero NPTII que confiere resistencia a kanamicina (Miki & McHugh 2003). Aunque se ha demostrado que después de varias generaciones el gen de resistencia al antibiótico se silencia, decidimos probar el método de selección con kanamicina (Van der Kop, et. al. 1999) con la línea *Salk\_080758* como primera aproximación para seleccionar a las plantas homocigóticas para la inserción de T-DNA.

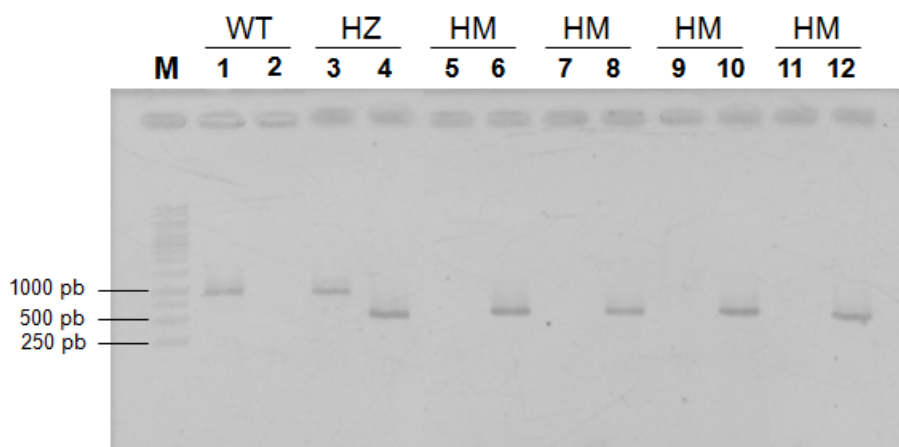
La kanamicina es un antibiótico aminoglicósido capaz de unirse a la subunidad del ribosoma 30S del cloroplasto y de la mitocondria, impidiendo la traducción de las proteínas. Los efectos de este antibiótico en las plantas transformadas, y por tanto sensibles al antibiótico, se relacionan con un crecimiento deficiente de la raíz, así como con hojas etioladas y poco desarrolladas (Duan, et. al. 2009). A diferencia de las plantas no transformadas, las plantas de la línea *Salk\_080758* con resistencia a la kanamicina muestran un fenotipo normal, con una raíz principal larga, raíces laterales bien desarrolladas y pigmentación normal (Fig. 7A). Después de tres generaciones de selección de esa línea, se obtuvieron plantas cuyos descendientes continuaban mostrando porcentajes de resistencia al antibiótico cercanos al 100% y desarrollo normal (Fig.7B). Para confirmar que las plantas que mostraron resistencia a kanamicina eran homocigóticas para la inserción se realizó un PCR, empleando los oligonucleótidos diseñados específicamente para el gen At4g26530. Debido a que previamente habíamos observado que la presencia de los oligonucleótidos LP, RP y LBb1.3 (Fig. 6) en la misma reacción de PCR podría amplificar preferentemente a uno de los fragmentos, se realizaron las reacciones por separado: en la primera reacción se colocaron los oligonucleótidos diseñados a los extremos del gen (RP y LP) con el fin de amplificar el gen completo, sin interrupción del T-DNA; mientras que en la segunda reacción se colocaron los oligonucleótidos RP y LBb1.3 para amplificar el fragmento pequeño generado por la presencia de T-DNA. De esta forma, observamos únicamente la presencia del fragmento de 517 pb



en la mayoría de las plantas seleccionadas por su alto porcentaje de resistencia a kanamicina, lo que nos indica que son homocigóticas para la inserción (Fig. 8).



**Figura 7. Mediante selección con kanamicina, se detectaron plantas homocigóticas para la inserción de T-DNA en el gen At4g26530 que codifica para la aldolasa.** Los altos porcentajes de germinación y de desarrollo normal en medio MS con kanamicina muestran que podría tratarse de plantas homocigóticas para la inserción de T-DNA. **A.** Las plantas de la línea mutante Salk\_080758 (9Q1, 21J1, 9A2 y 19K3) se desarrollan de manera normal. Las plantas de tipo silvestre (WT), así como las no resistentes al antibiótico (21A1), muestran poco desarrollo de la raíz y hojas etioladas **B.** Las líneas 9A2, 21J8, 9Q1, 21J1 y 21J2 presentan un alto porcentaje de resistencia a kanamicina después de tres generaciones de selección con el antibiótico. Se colocaron alrededor de 50 semillas por caja de petri conteniendo 25 mg/L de kanamicina, y las plantas resistentes fueron observadas al estereoscopio y contabilizadas. Debido a que se ha reportado que algunas líneas mutantes de Salk pueden perder la resistencia al antibiótico después de varias generaciones, no se esperaba obtener 100% de resistencia.



**Figura 8. Plantas de la línea Salk\_080758 homocigóticas para la inserción de T-DNA en el gen At4g26530 que codifica para la aldolasa.** Después de tres generaciones, el DNA de las plantas fue extraído. Mediante PCR y utilizando los oligonucleótidos diseñados específicamente para esta mutante, se amplificó el gen At4g26530. Se llevaron a cabo dos reacciones por separado para cada muestra, colocándose los oligos diseñados a los extremos del gen (RP y LP) en una y el oligo RP junto con el que se encuentra dentro del T-DNA (LBb1.3) en otra. Se separó el producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. **WT**, planta silvestre; **HZ**, planta heterocigótica para la inserción de T-DNA; **HM**, planta homocigótica para la inserción de T-DNA; **M**, marcador de peso molecular; **Carriles impares**, reacción con los oligos RP y LP; **Carriles pares**, reacción con los oligos RP y LBb1.3.

## 9.2 Obtención de líneas homocigas de *A. thaliana* con mutación en el gen *At2g36530* que codifica para la enolasa.

Para el caso de la enolasa se identificó a la mutante *los2*, la cual presenta una mutación puntual en el gen *At2g36530*. Dicha mutación se obtuvo mediante exposición a etil metano sulfonato (EMS), sustancia que genera el cambio de guaninas por adeninas y que provocó la sustitución de la glicina 326 (cerca al sitio catalítico) por una serina en el gen *Los2*. La mutante *los2* fue caracterizada como una mutante sensible al frío y se propuso que la enolasa está relacionada con dicha respuesta (Lee, et. al. 2002). No obstante, aunque el estrés por frío y el estrés salino producen baja disponibilidad de agua (Xiong, et al. 2002), los estudios preliminares realizados por Lee y colaboradores (2002) no relacionan a la mutante con el estrés salino.

En nuestro caso, resulta muy interesante estudiar a la mutante *los2* en la respuesta a NaCl asociada particularmente al tonoplasto. Pues una mutación puntual solamente afectaría parte de la función de la proteína, permitiéndonos estudiar la función específica que desempeña en el tonoplasto durante estrés salino.

Con la finalidad de confirmar que las semillas obtenidas correspondían a las de la mutante *los2*, se purificó y secuenció un fragmento de 645 pb del gen, región donde se encuentra el aminoácido 326. La secuencia obtenida (*los2*) fue alineada con la reportada para el gen At2g36530 en la base de datos de secuencias de nucleótidos del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI), con lo que se confirmó la sustitución de la guanina 2162 por alanina (Fig. 9). Y por tanto que las semillas son de plantas mutantes *los2*. Dado que en su estudio Lee y colaboradores (2002) realizaron el mapa génico de la mutante *los2*, sabemos que ésta no contiene otras mutaciones en su genoma.

```

At2g36530      CCTGTACAAGTCCTTTGTCGCTGAGTACCCAATCGTGTCCATTGAGGACCCATTTGACCA 2100
Los2           CCTGTACAAGTCCTTTGTCGCTGAGTACCCAATCGTGTCCATTGAGGACCCATTTGACCA 434
*****

At2g36530      AGATGACTGGGAGCACTATGCTAAGATGACCACTGAGTGTGGAACCGAGGTTTCAGATTGT 2160
Los2           AGATGACTGGGAGCACTATGCTAAGATGACCACTGAGTGTGGAACCGAGGTTTCAGATTGT 494
*****
                ↓
At2g36530      CGGTGATGATTTGTTGGTCACTAACCCCAAGGTTTGTGTTTTATTGCCAGTGTTCTTACC 2220
Los2           CAGTGATGATTTGTTGGTCACTAACCCCAAGGTTTGTGTTTTATTGCCAGTGTTCTTACC 554
* *****

At2g36530      AGTTTTTTTTTGTGTCTGCCCTCTCTTAAAATGCTCACATCTCTTATACTCTTTTCT 2280
Los2           AGTTTTTTTTTGTGTCTGCCCTCTCTTAAAATGCTCACATCTCTTATACTCTTTTCT 614
*****

At2g36530      TATCCAGAGAGTTGCTAAGGCAATCGCAGAGAAGTCTTGCAATGCTCTTCTTTTGAAGG 2340
Los2           TATCCAGAGAGTTGCTAAGGCAATCGCAGAGAAGTCTTGCAATGCTCTTCTTTTGAAGG 674
*****

```

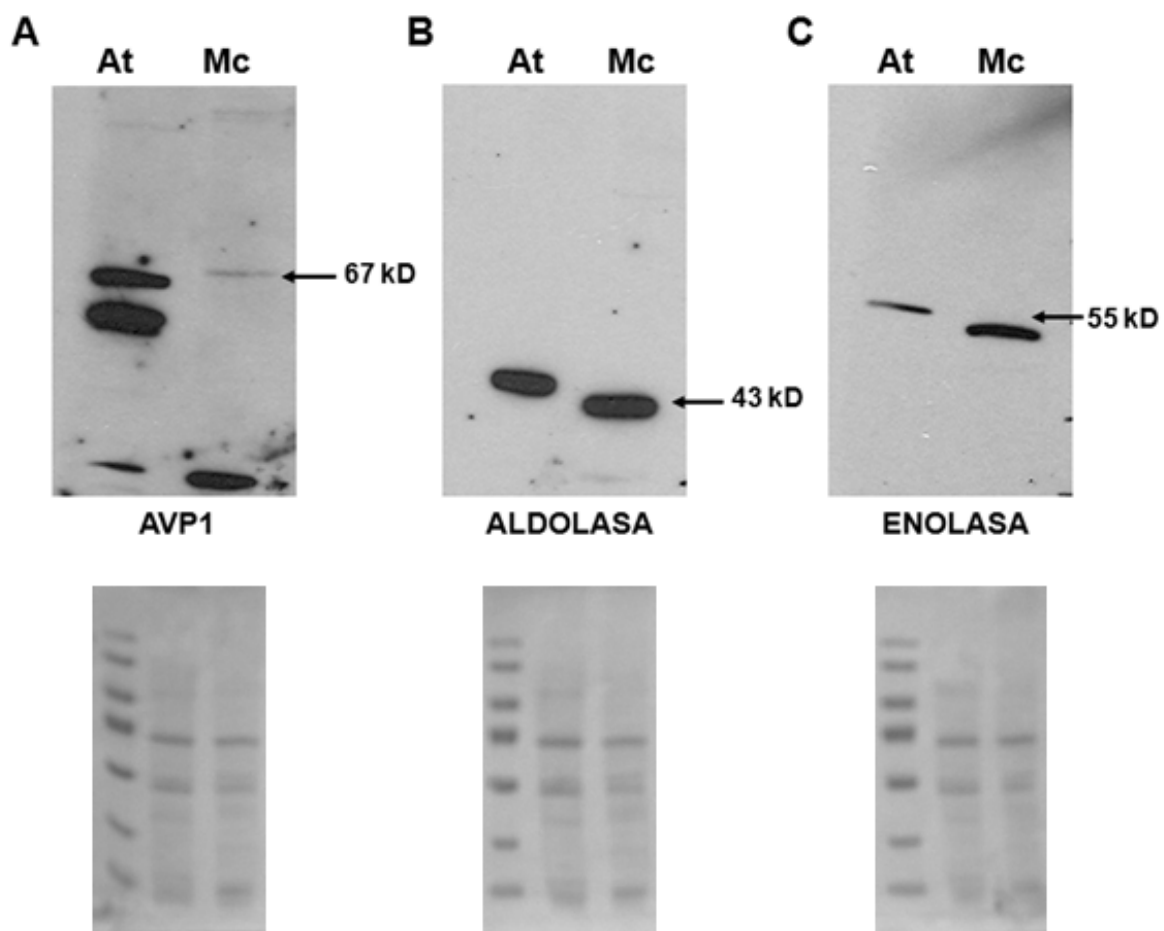
**Figura 9. Verificación de la mutación puntual en la mutante de enolasa *los2*.** La secuencia de la mutante *los2* obtenida mediante secuenciación fue alineada con la reportada para la enolasa LOS2 de *A. thaliana* depositada en la base de datos EMBL (**At2g36530**) con el número de acceso AY092986. El cambio de guanina por adenina en la primera base del codón que da origen a la Glicina326 en la secuencia de la mutante *los2*, provoca el cambio por Serina (flecha).

### 9.3 Confirmación de la asociación de las enzimas aldolasa y enolasa con el tonoplasto de *A. thaliana* mediante ensayos tipo “western blot”.

En trabajos anteriores realizados en el laboratorio (Barkla, et al. 2009) se identificó la presencia de las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa asociadas al tonoplasto de la planta halófito *M. crystallinum*, no obstante se desconocía si dicha presencia era exclusiva de la especie. La disponibilidad de un banco de semillas de mutantes para la mayoría de los genes de *Arabidopsis*, hace de esta especie un excelente candidato para el estudio funcional de las enzimas identificadas. Sin embargo, antes de utilizarla se tenía que confirmar la presencia de las proteínas de interés en el tonoplasto de *A. thaliana*.

Con ese fin, se realizó un ensayo preliminar tipo western blot con las fracciones de tonoplasto de *M. crystallinum* de 6 semanas de edad y de *A. thaliana* (Col-0) de 8 semanas de edad y se determinó la presencia de las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa, utilizando anticuerpos policlonales.

Los resultados indican que al igual que en la especie halófito, las enzimas aldolasa y enolasa se encuentran asociadas al tonoplasto de *A. thaliana* (Fig. 10). Para garantizar que las muestras utilizadas para el wester blot correspondieran a proteínas de tonoplasto, se utilizó el anticuerpo contra la H<sup>+</sup>-pirofosfatasa vacuolar (AVP1). Sin embargo, puesto que el anticuerpo fue generado para reconocer la AVP1 de *Arabidopsis*, el reconocimiento en *M. crystallinum* es menor (Fig. 10-A). La proteína se cuantificó antes de ser colocada en el gel, y la membrana a la que se transfirieron las proteínas se tiñó con rojo de Ponceau para confirmar la igualdad de carga. Permittiéndonos así comparar diferencias en la abundancia de las proteínas entre las especies. Mientras que la abundancia de la aldolasa es similar para *M. crystallinum* y *A. thaliana* (Fig. 10 B), la abundancia de la enolasa en *Arabidopsis* es menor que en *M. crystallinum* (Fig. 10 C).



**Figura 10. Las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa están asociadas al tonoplasto de *A. thaliana*.** Análisis tipo western blot de fracciones de tonoplasto (15µg/carril), aisladas de *A. thaliana* (**At**) ó *M. crystallinum* (**Mc**). La proteína se separó mediante SDS-PAGE al 10%, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se expuso a los anticuerpos indicados. Para confirmar que la fracción empleada es tonoplasto, se utilizó como marcador un anticuerpo contra la H<sup>+</sup>-pirofosfatasa vacuolar (AVP1) de *A. thaliana*. **A** (parte superior). Inmunolocalización de la AVP1 (67 kD). **B** (parte superior). Inmunolocalización de la aldolasa (43 kD). **C** (parte superior). Inmunolocalización de la enolasa (55 kD). Para asegurar que la cantidad de proteína colocada en cada carril es la misma, después de la transferencia las membranas fueron teñidas por 1 min con colorante de Ponceau al 0.01% en ácido acético al 5% (panel inferior de cada figura).

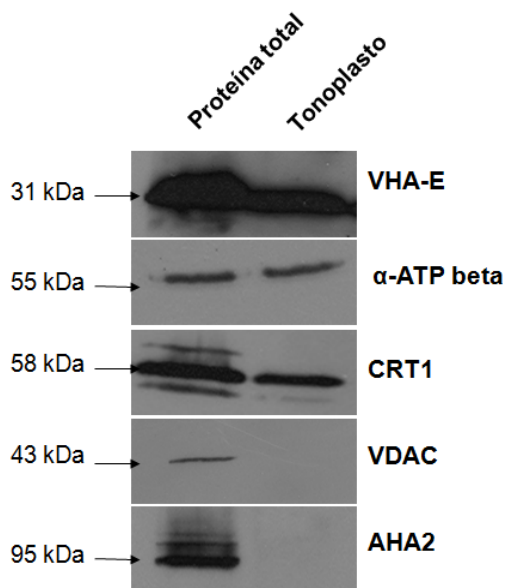
#### **9.4 En extractos de tonoplasto obtenidos mediante gradiente discontinuo de sacarosa, no hay contaminación por Mitocondrias o Membrana Plasmática.**

Una vez que observamos la presencia de las enzimas aldolasa y enolasa asociadas al tonoplasto de *A. thaliana* en nuestro experimento preliminar, decidimos confirmar la pureza de nuestro extracto de proteínas de membrana antes de continuar con más estudios.

En el trabajo previo con *M. crystallinum* (Barkla, et al. 2009) se utilizó la electroforesis zonal de flujo libre (EZFL) para obtener fracciones de tonoplasto altamente puras. Sin embargo, esta alternativa no es viable para *A. thaliana* debido a la poca biomasa que se obtiene en esta especie y a la dificultad para obtener grandes cantidades de proteínas microsomales, necesarias para la separación por EZFL. En este trabajo optamos entonces por emplear la técnica de separación por gradiente discontinuo de sacarosa para aislar la fracción de membranas de tonoplasto. Aunque la técnica tiene la desventaja de poder presentar contaminación por otras fracciones celulares, es una alternativa viable en los estudios con *Arabidopsis*.

La pureza de las membranas obtenidas mediante gradientes discontinuos de sacarosa, se determinó a través de la presencia de diferentes proteínas específicas para los organelos y compartimentos celulares en un ensayo de tipo western blot, utilizando las siguientes proteínas marcadoras: subunidad E de la V-ATPasa para tonoplasto (VHA-E; Kluge, et al. 2004), subunidad de la ATPasa de cloroplasto ( $\alpha$ -ATP beta; Schmidt, et al. 2007) calreticulina para golgi/RE (CRT1; Nelson, et al. 1997) canal de aniones dependiente de voltaje de la membrana externa de mitocondria (VDAC; Clausen, et al. 2004) y  $H^+$ ATPasa de la membrana plasmática (AHA2; Villalba, et al. 1992). Los resultados de nuestros experimentos demuestran que en extractos de proteína de tonoplasto no hay presencia de las proteínas VDAC ó AHA3, lo que nos indica que en dicha fracción no tenemos contaminación por mitocondrias o por membrana plasmática. No obstante, encontramos presencia del marcador de cloroplasto ( $\alpha$ -ATP beta) y del marcador de RE/Golgi (calreticulina), lo

que muestra que en la fracción aislada mediante gradiente discontinuo de sacarosa hay presencia de membranas de estos organelos (Fig. 11).



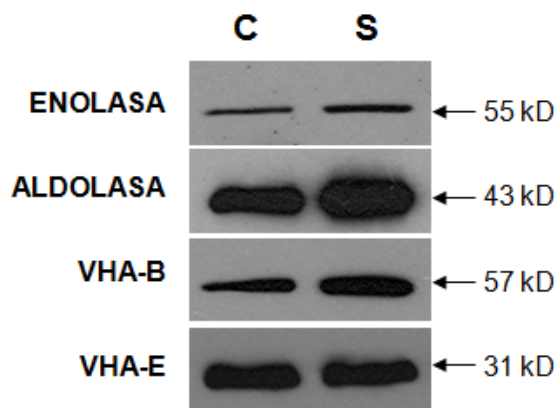
**Figura 11. Análisis de la pureza de la fracción de la fracción de tonoplasto obtenido de *A. thaliana* mediante gradiente discontinuo de sacarosa.** La posible presencia de distintos organelos en la fracción de tonoplasto obtenido fue probada mediante análisis tipo Western Blot utilizando anticuerpos específicos contra proteínas marcadores: tonoplasto (VHA-E, subunidad E de la V-ATPasa), cloroplasto ( $\alpha$ -ATP beta, subunidad de la ATPasa de cloroplasto), golgi/RE (CRT1, calreticulina), mitocondria (VDAC, canal de aniones dependiente de voltaje de la membrana externa) y membrana plasmática (AHA2, H<sup>+</sup>ATPasa). La proteína total se incluyó como control positivo para cada anticuerpo utilizado.

Puesto que este trabajo es complementario al realizado en *M. crystallinum*, donde la asociación de las enzimas glicolíticas al tonoplasto fue comprobada en membranas de dicha fracción altamente puras, consideramos que la asociación de las enzimas aldolasa y enolsas al tonoplasto no es debida a la contaminación por otras membranas.

### **9.5 La exposición a NaCl regula la abundancia de las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa asociadas al tonoplasto de *A. thaliana*.**

En distintas especies vegetales se ha documentado que el sodio regula la actividad de la V-ATPasa, así como la expresión a nivel de proteína de algunas sus subunidades (Kabala y Klobus 2008; Barkla, et al. 1995; Binzel y Ratajczak 2002; Vera-Estrella et al. 1999). Con el fin de conocer si el estrés salino afecta la abundancia de algunas subunidades de la V-ATPasa, así como de las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa en *A. thaliana*, plantas silvestres fueron expuestas a 75 mM de NaCl por 4 días, y se determinó la abundancia de las proteínas en la fracción del tonoplasto a través de western blot. Se utilizaron anticuerpos

policlonales contra la aldolasa, la enolasa y contra las subunidades B (VHA-B) y E (VHA-E) de la V-ATPasa. Los resultados de nuestros experimentos demuestran que la abundancia en fracciones del tonoplasto de la aldolasa, la enolasa y de la VHA-B aumenta bajo tratamiento con sal, mientras que los niveles de la VHA-E no se alteran en respuesta a NaCl (Fig. 12), por lo que puede utilizarse como control de carga.

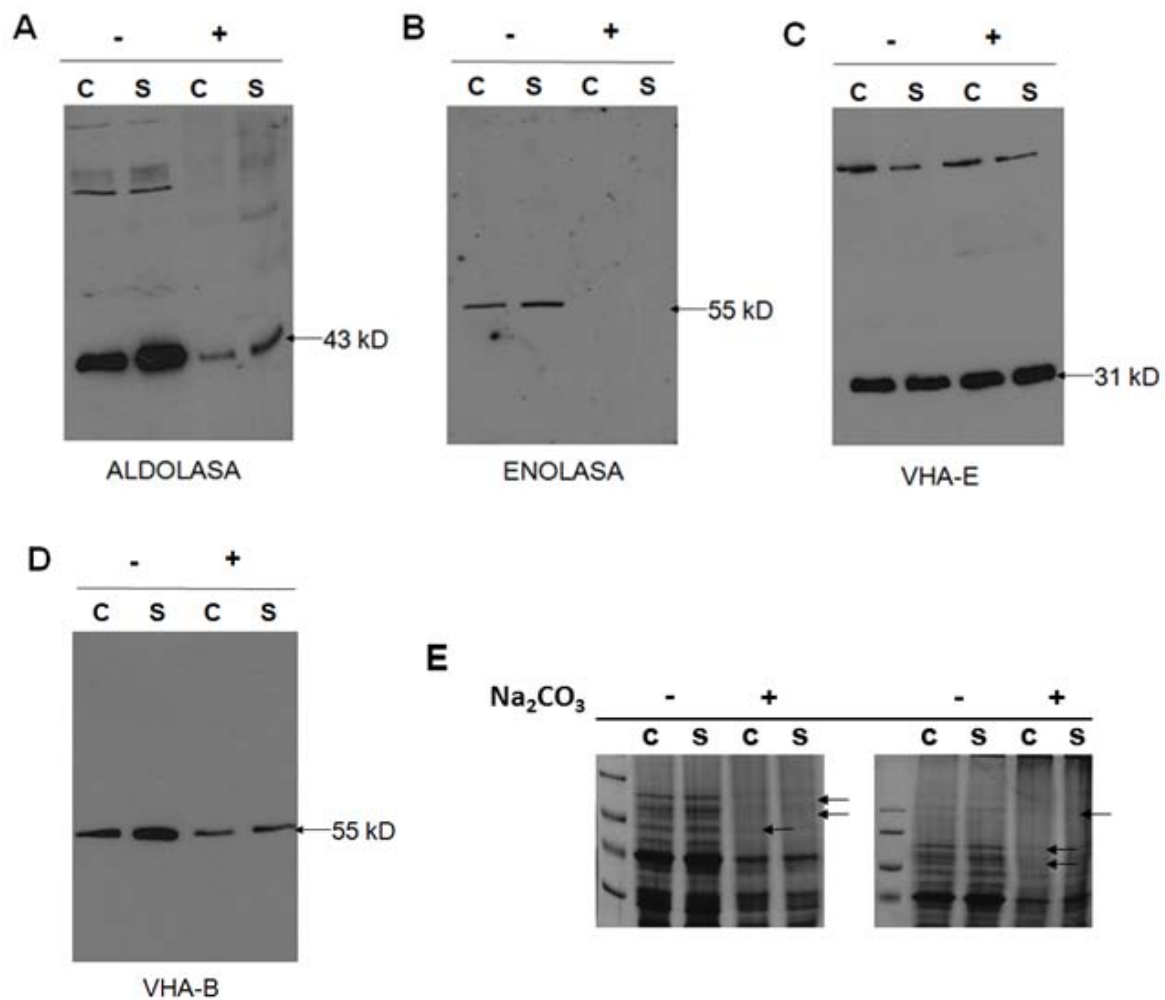


**Figura 12. En condiciones de estrés salino la aldolasa, la enolasa y la subunidad VHA-B, incrementan su abundancia en fracciones de tonoplasto de plantas *A. thaliana* de tipo silvestre.** La abundancia de las proteínas enolasa, aldolasa y de la subunidad B de la V-ATPasa (VHA-B) es mayor en la fracción de tonoplasto de plantas expuestas a sal en comparación con plantas no expuestas, mientras que la VHA-E no modifica su abundancia. (**S**) Muestras de tonoplasto de plantas silvestres tratadas con 75mM de NaCl por 4 días. (**C**) Muestras de tonoplasto de plantas no tratadas.

### 9.6 Determinación de la fuerza de asociación de las enzimas glicolíticas al tonoplasto mediante tratamiento caotrópico.

Los tratamientos caotrópicos desestabilizan las interacciones proteína-proteína y proteína-lípidos que median la asociación periférica a la membrana mediante disrupción de los enlaces de hidrógeno, de las fuerzas de Van der Waals y de los efectos hidrofóbicos, por lo que además permiten la determinación de la fuerza de unión (Hatefi y Hanstein, 1974). Estos compuestos se han utilizado exitosamente para remover proteínas periféricas de membranas, incluyendo algunas subunidades del sector  $V_1$  de la V-ATPasa de plantas y levaduras (Kane et al.1989; Ward et al. 1992).





**Figura 13. Determinación de la fuerza de asociación de las enzimas glicolíticas al tonoplasto de *A. thaliana* mediante tratamiento caotrópico.** La habilidad de los agentes caotrópicos para eliminar a las proteínas asociadas periféricamente a la membrana se probó utilizando un tratamiento con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a pH 11. Muestras de tonoplasto de plantas expuestas a 75mM de NaCl por 4 días (S) y de plantas control (C) fueron tratadas con la presencia de 200 mM de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 11 (+) y comparadas con las membranas no sometidas al tratamiento caotrópico (-). **A.** Inmunodetección con el anticuerpo contra la aldolasa. **B.** Inmunodetección con el anticuerpo contra la enolasa. **C.** Inmunodetección con el anticuerpo contra la subunidad VHA-E (31 Kd). **D.** Inmunodetección con el anticuerpo contra la subunidad VHA-B (57 kD). **E.** Gel teñido con azul de Coomassie de las proteínas analizadas por Western Blot. En las muestras tratadas con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 11 (+) la abundancia de algunas proteínas disminuyen ( $\leftarrow$ ) en comparación con las muestras no tratadas (-).

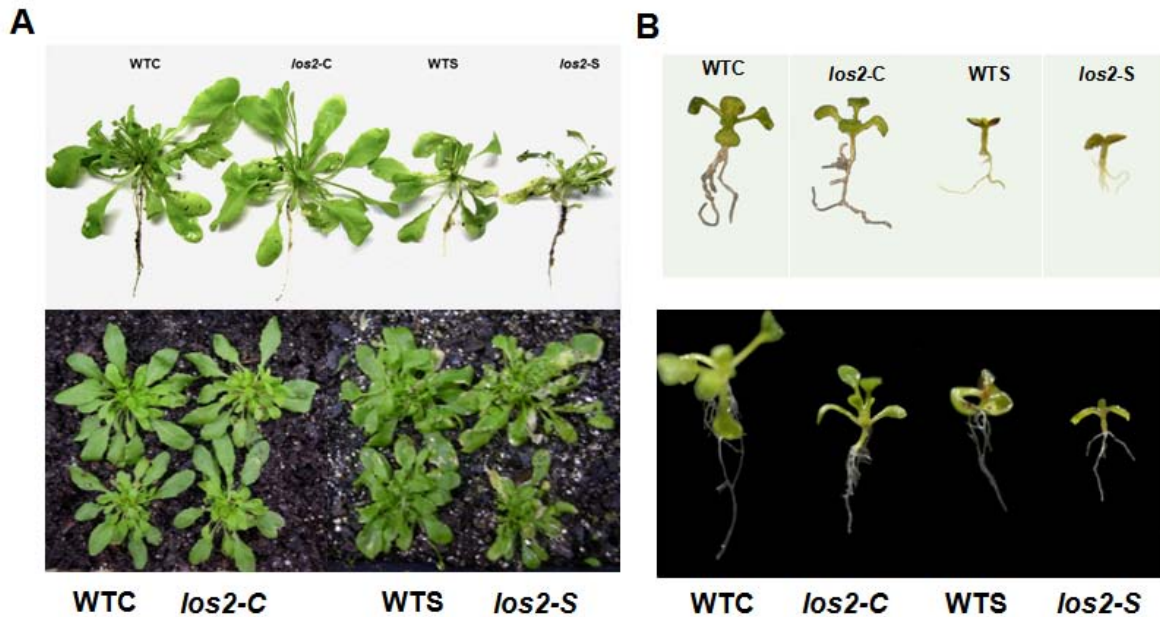
Con la finalidad de determinar que tan fuerte es la asociación de las proteínas aldolasa y enolasa a la membrana vacuolar de *A. thaliana*, las muestras de tonoplasto fueron tratadas con 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11, al que se le agregaron 3mM de MgSO<sub>4</sub> y 3 mM BTP-ATP, ya que se ha establecido que la adición de MgATP facilita la remoción de las subunidades del sector V<sub>1</sub> de la V-ATPasa hacia la fracción soluble en la presencia de los agentes caotrópicos (Ward, et al.1992). Mediante western blot se determinó la abundancia de las proteínas en muestras tratadas con el caotrópico y muestras control sin tratamiento.

Nuestros resultados revelan que la aldolasa permanece en las fracciones de tonoplasto aún después del tratamiento caotrópico en las membranas de plantas tratadas con NaCl y en las control, lo que apunta a que existe una fuerte asociación de esta proteína con el tonoplasto (Fig.13 A). Similar a lo observado en la Fig. 12, la abundancia de la aldolasa se incrementó en plantas tratadas con sal. Por otro lado, el tratamiento caotrópico elimina por completo a la enolasa de la fracción de tonoplasto tanto en plantas control como en las tratadas con sal (Fig. 13B), indicando que en este caso la unión es más débil. Este resultado contrasta con lo reportado para *M. crystallinum*, donde la enolasa permanece unida al tonoplasto aún después del tratamiento caotrópico (Barkla, et al. 2009). Al determinar la abundancia de las proteínas de la dominio V<sub>1</sub> de la V-ATPasa, VHA-E y VHA-B, en presencia del tratamiento, observamos que en ambos casos las proteínas se mantienen unidas (Fig. 13C y D).

### **9.7 La mutante *los2* muestra mayor sensibilidad a la salinidad.**

La mutante *los2*, generada mediante exposición a EMS, identificada y caracterizada por su sensibilidad al frío, presenta una mutación puntual en la Gly325 cercana al sitio catalítico de la enolasa, lo que afecta su actividad catalítica medida *in vitro* (Lee, et al. 2002). Dicha afectación nos permitió utilizar a la mutante para discriminar si la actividad enzimática de la enolasa está relacionada con la asociación al tonoplasto observada (Fig. 10).

Los resultados obtenidos previamente demostraron que la exposición a 75 mM de NaCl regula positivamente la abundancia de las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa presentes en el tonoplasto (Fig. 12), por lo que ambas proteínas podrían estar involucradas en la respuesta a la salinidad. Con el fin de investigar esta posibilidad para la enolasa, evaluamos la habilidad de plantas tipo silvestre y de plantas mutantes *los2* para germinar, crecer y desarrollarse en presencia de sal.



**Figura 14. Las plantas de la mutante *los2* son más sensibles a la exposición a sal. A.** Plantas adultas de tipo silvestre (WT) y plantas mutantes (*los2*) fueron crecidas en presencia (S) ó en ausencia (C) de 75 mM de NaCl durante 4 días. Después del tratamiento, las plantas *los2* muestran menor turgencia y mayor cantidad de hojas senescentes. **B.** Al igual que las plantas adultas, las plántulas presentan sensibilidad a la sal. Plántulas de tipo silvestre (WT) y mutantes (*los2*) fueron crecidas en presencia (S) ó en ausencia (C) de 75 mM de NaCl en cajas de petri con medio MS. El desarrollo de las plántulas mutantes es más lento que el de plantas de tipo silvestre crecidas en presencia de NaCl.

No se observó diferencia en el crecimiento ni en la apariencia entre las plantas adultas de tipo silvestre y las plantas mutantes crecidas en condiciones control. Sin embargo, con el tratamiento de 75 mM de NaCl durante 4 días, las plantas de la línea mutante *los2* fueron más sensibles, presentando menor turgencia y lesiones cloróticas en las hojas a diferencia de las plantas de tipo silvestre (Fig. 14A).

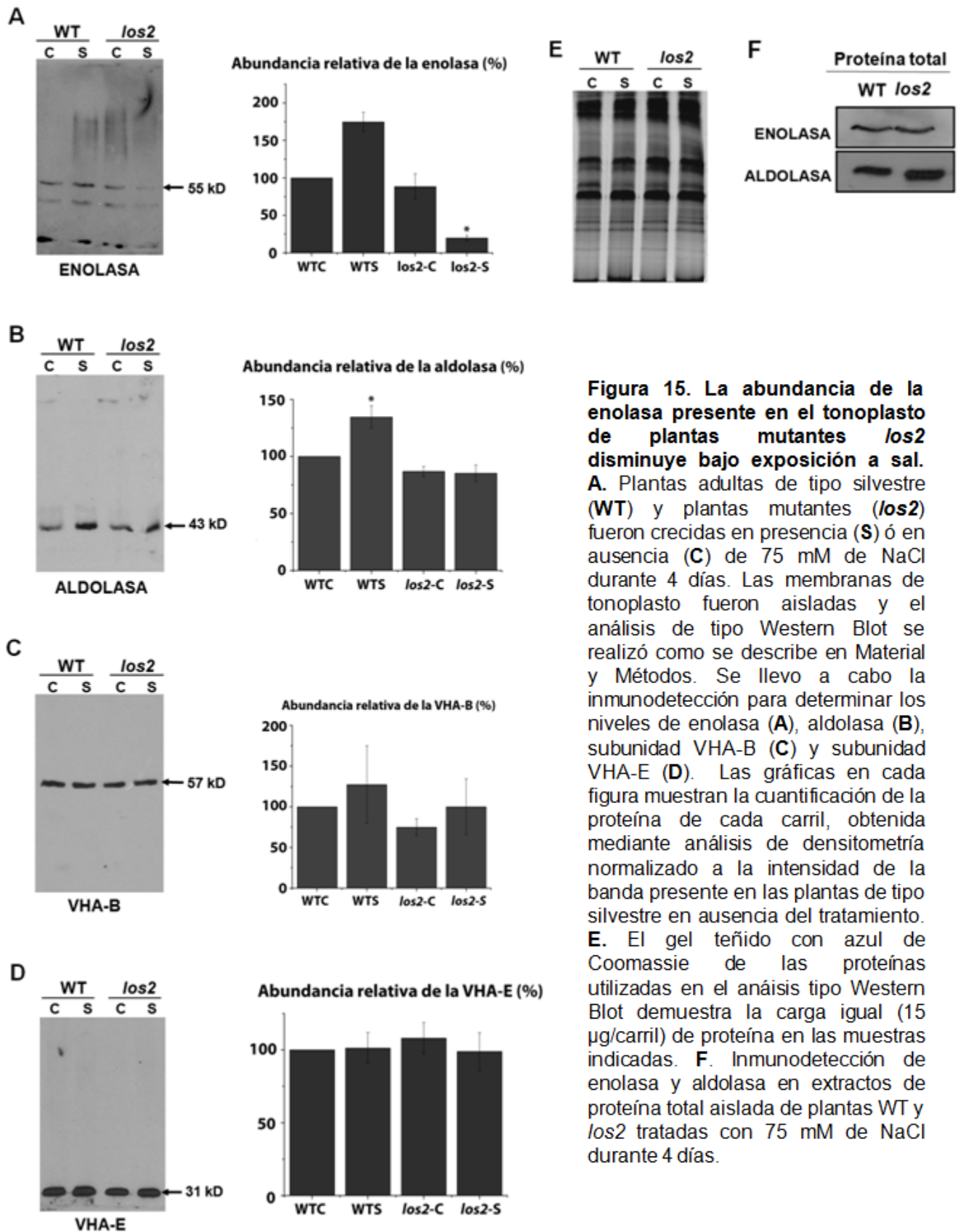
Cuando se evaluó el efecto de la salinidad sobre la germinación y el desarrollo de plántulas, efectos similares fueron observados. A diferencia de las plantas de tipo silvestre, las mutantes *los2* germinadas en medio MS suplementado con 75 mM de NaCl muestran un menor tamaño tanto de la parte aérea como de la raíz, así como una pigmentación más clara en las hojas a los 7 días de edad (Fig. 14B).

Ambos resultados, tanto con plantas adultas como con plántulas, muestran que la mutante *los2* es más sensible al tratamiento por sal, pero en condiciones control de crecimiento no hay un fenotipo diferente entre éstas y las plantas silvestres.

### **9.8 En la mutante *los2* la abundancia de la enolasa en fracciones de tonoplasto disminuye bajo exposición a sal, no así en extractos de proteína total.**

Con el fin de conocer si la mutación puntual en la línea *los2* tiene un efecto sobre los niveles de la enolasa presente en las plantas, se evaluó la abundancia de la enzima mediante ensayos de tipo western blot. Se realizaron los estudios de inmunolocalización en las fracciones de tonoplasto aisladas de plantas de tipo silvestre y de tipo mutante, expuestas y no a 75 mM de NaCl durante 4 días. Los ensayos se realizaron por triplicado (n=3) para cuantificar la abundancia proteica.

Al igual que lo observado anteriormente (Fig.14), en condiciones control (sin tratamiento) no hay diferencia entre las plantas mutantes y las plantas de tipo silvestre, ya que ambas muestran los mismos niveles de enolasa presente en el tonoplasto (Fig.15A, carriles "C"), así como de aldolasa, VHA-B y VHA-E (Fig.15B, C y D, carriles "C"). No obstante, aún cuando la abundancia de la enolasa en fracciones de tonoplasto de plantas de tipo silvestre expuestas a NaCl aumenta un 75% bajo exposición a NaCl, la mutante *los2* tratada con sal muestra niveles bajos de la proteína, la cual disminuye 75% en comparación con los niveles control (Fig. 15A, carriles "S"). Por otro lado, la disminución de la enolasa no tiene efecto sobre la abundancia de las proteínas aldolasa, VHA-A y VHA-E asociadas al tonoplasto (Fig. 15B, C y D, carriles "S"), las cuales mantienen el mismo nivel proteico en plantas silvestres y plantas mutantes expuestas a sal.



**Figura 15. La abundancia de la enolasa presente en el tonoplasto de plantas mutantes *los2* disminuye bajo exposición a sal.** **A.** Plantas adultas de tipo silvestre (WT) y plantas mutantes (*los2*) fueron crecidas en presencia (S) ó en ausencia (C) de 75 mM de NaCl durante 4 días. Las membranas de tonoplasto fueron aisladas y el análisis de tipo Western Blot se realizó como se describe en Material y Métodos. Se llevo a cabo la inmunodetección para determinar los niveles de enolasa (A), aldolasa (B), subunidad VHA-B (C) y subunidad VHA-E (D). Las gráficas en cada figura muestran la cuantificación de la proteína de cada carril, obtenida mediante análisis de densitometría normalizado a la intensidad de la banda presente en las plantas de tipo silvestre en ausencia del tratamiento. **E.** El gel teñido con azul de Coomassie de las proteínas utilizadas en el análisis tipo Western Blot demuestra la carga igual (15 µg/carril) de proteína en las muestras indicadas. **F.** Inmunodetección de enolasa y aldolasa en extractos de proteína total aislada de plantas WT y *los2* tratadas con 75 mM de NaCl durante 4 días.

Para establecer si la disminución en la cantidad de enolasa detectada en el tonoplasto de la mutante *los2* expuesta a NaCl se debe a una reducción general en los niveles de la enzima o si solamente disminuye la abundancia de la enzima que se une al tonoplasto, evaluamos su presencia en extractos de proteína total. Se utilizaron *Arabidopsis* tipo silvestre y *los2* expuestas a 75 mM de NaCl. Como control positivo se utilizó a la aldolasa, ya que la presencia de la enzima en el tonoplasto de la mutante expuesta a sal no cambió significativamente en comparación con la de las plantas de tipo silvestre crecidas en condiciones de salinidad (Fig.15 B). A diferencia de lo observado en extracto de proteína de tonoplasto, la cantidad de enolasa detectada en proteína total de la mutante *los2* no se modifica bajo exposición a 75 mM de NaCl (Fig. 15 F).

### 9.9 La concentración de pigmentos fotosintéticos de las plantas *los2* es igual al de las plantas de tipo silvestre.

Con el fin de profundizar en el hecho de que las mutantes *los2* crecidas en medio MS con 75 mM de NaCl presentaban una pigmentación más clara en las hojas que las plantas de tipo silvestre germinadas bajo las mismas condiciones (Fig. 14 B), se evaluó la concentración de pigmentos fotosintéticos mediante espectrofotometría.

Contenido de pigmentos fotosintéticos ( $\mu\text{g mL}^{-1} \text{g}^{-1}$ )				
	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila Total	Carotenoides
<b>WTC</b>	210.57 ± 24.4	236.63 ± 12.11	447.20 ± 31.95	41.69 ± 13.48
<b><i>los2-C</i></b>	309.50 ± 29.53 **	183.20 ± 22.21 **	492.70 ± 50.83	44.99 ± 10.32
<b>WTS</b>	129.12 ± 29.04 *	56.16 ± 12.70 *	185.28 ± 41.65 *	35.72 ± 8.27
<b><i>los2-S</i></b>	105.94 ± 20.91 *	47.69 ± 8.54 *	153.63 ± 29.42 *	26.09 ± 8.07

\* Diferencia significativa con respecto a plantas no tratadas.

\*\* Diferencia significativa de plantas *los2* con respecto a plantas WT en condiciones control.

**Tabla 4.** Contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides) en plantas *los2* y de tipo silvestre.

En ambos tipos de plantas y bajo condiciones control o de exposición a NaCl, la concentración de carotenoides se mantuvo en los mismos niveles por lo que no se encontraron diferencias significativas entre plantas *los2* y de tipo silvestre (Tabla 4).

La concentración de clorofila, por otro lado, disminuyó significativamente bajo exposición a sal independientemente del tipo de plantas. En plantas de tipo silvestre la concentración de clorofila en condiciones de estrés salino se redujo en un 39% para la clorofila a y en un 76% para la b. En plantas *los2* la reducción por exposición a NaCl fue de 66% para la clorofila a y de 74% para la clorofila b, lo que a su vez repercute en una disminución en el contenido de clorofila total (Tabla 4). Notablemente, en condiciones control las concentraciones de clorofila a y b son diferentes para plantas de tipo silvestre y mutantes *los2*. Situación que no corresponde con nuestras observaciones previas, en las que las plantas *los2* tiene el mismo fenotipo que las plantas de tipo silvestre en condiciones control (Fig. 14).

Con los datos que tenemos hasta el momento es difícil explicar la causa de esta diferencia. Aunque se realizaron tres repeticiones del experimento y las plantas fueron colocadas aleatoriamente en el cuarto de cultivo, no podemos descartar que se deba a artefactos experimentales tales como la exposición a luz.

Puesto que no encontramos diferencias entre las plantas mutantes y de tipo silvestre expuestas a NaCl, con este experimento descartamos que la coloración diferencial observada entre ellas (Fig. 14 B) se deba a una diferencia en la concentración de pigmentos fotosintéticos. Y sugerimos que se trata de antocianinas.

#### **9.10 Las plantas mutantes *los2* acumulan una mayor concentración de iones Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> que las plantas silvestres.**

Para conocer si la sensibilidad de la mutante *los2* a la salinidad está relacionada con una mayor acumulación de iones en los tejidos de la misma, se cuantificó la concentración de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> presente en la savia de hojas de plantas silvestres y

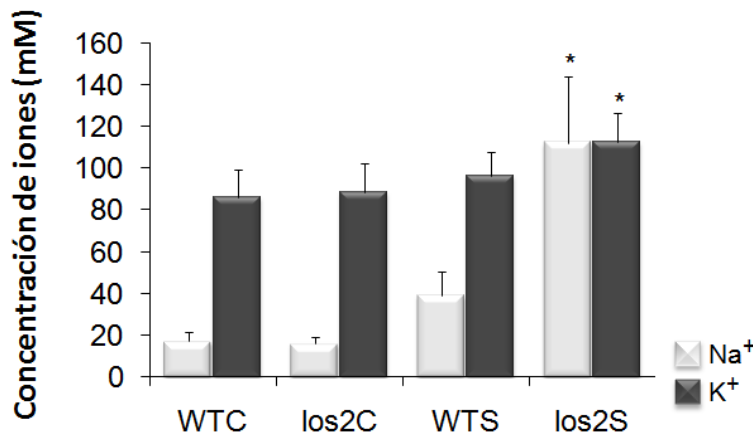
mutantes, tratadas y no tratadas con NaCl, y se determinó la osmolaridad de las muestras. Tanto en plantas de tipo silvestre como en plantas *los2* crecidas bajo condiciones control, sin tratamiento, los valores de la concentración de Na<sup>+</sup> en la savia de hojas son similares para ambos tipos de plantas; 17.2 mM y 16.3 mM de Na<sup>+</sup> para las plantas de tipo silvestre y mutantes *los2*, respectivamente (Fig. 16 A). Como se esperaba, los niveles de potasio fueron mucho más altos, con resultados similares en la concentración de K<sup>+</sup> presente en ambos tipos de plantas; 87.8 mM para las plantas de tipo silvestre y 88.4 mM para plantas *los2*.

Con 75 mM de NaCl la concentración de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup> en plantas de tipo silvestre se elevó a 38.9 mM y 95.3 mM, respectivamente, obteniéndose un incremento de más del doble en el sodio. De manera interesante encontramos que en las muestras de plantas tipo *los2* expuestas a sal, la concentración de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> se incrementó notablemente; 120 mM de Na<sup>+</sup> y 124 mM de K<sup>+</sup> (Fig. 16 A). Mostrando diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a plantas silvestres control y expuestas a NaCl, así como con plantas *los2* en condiciones control.

En condiciones control, la osmolaridad de las plantas de tipo silvestre y mutantes *los2* se mantuvieron en los mismos niveles (0.32 osmol/kg y 0.35 osmol/kg, respectivamente), lo que concuerda con la concentración de iones medida en la savia de hojas de las plantas. Sin embargo, la exposición a la sal afectó diferencialmente a los dos tipos de plantas. Mientras que la osmolaridad en la savia de plantas de tipo silvestre tratadas con NaCl se elevó 25% con respecto a la savia de plantas control (de valores de 0.32 osmol/kg a 0.43 osmol/kg), las plantas mutantes *los2* bajo las mismas condiciones de salinidad alcanzan un incremento de casi 50% en la osmolaridad (0.35 osmol/kg a 0.64 osmol/kg) (Fig. 16B). Confirmando una mayor acumulación de iones en la parte aérea de las plantas mutantes.

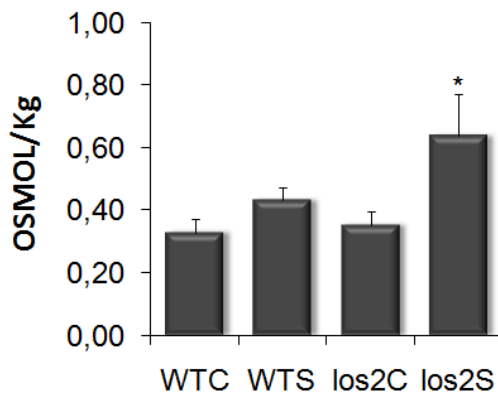


**A**



**Figura 16. Bajo exposición a sal las hojas de plantas mutantes *los2* poseen una concentración más elevada de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, así como mayor osmolaridad.** El contenido de los iones (A) y la osmolaridad (B) fueron determinados en la savia de hojas de plantas adultas de tipo silvestre (WT) y en plantas mutantes (*los2*), crecidas en presencia (S) ó en ausencia (C) de 75 mM de NaCl durante 4 días. Las mediciones corresponden a la media de tres repeticiones independientes y las barras de error representan la desviación estándar (D.S.) de la media. Las diferencias significativas fueron evaluadas utilizando la prueba t de Student para comparar diferencia entre pares de datos y un nivel de probabilidad <0.05 (indicada por el asterisco) es considerada significativa.

**B**



### 9.11 La estimulación de la actividad hidrolítica de la V-ATPasa por sal o por la adición de aldolasa es menor en la mutante *los2*.

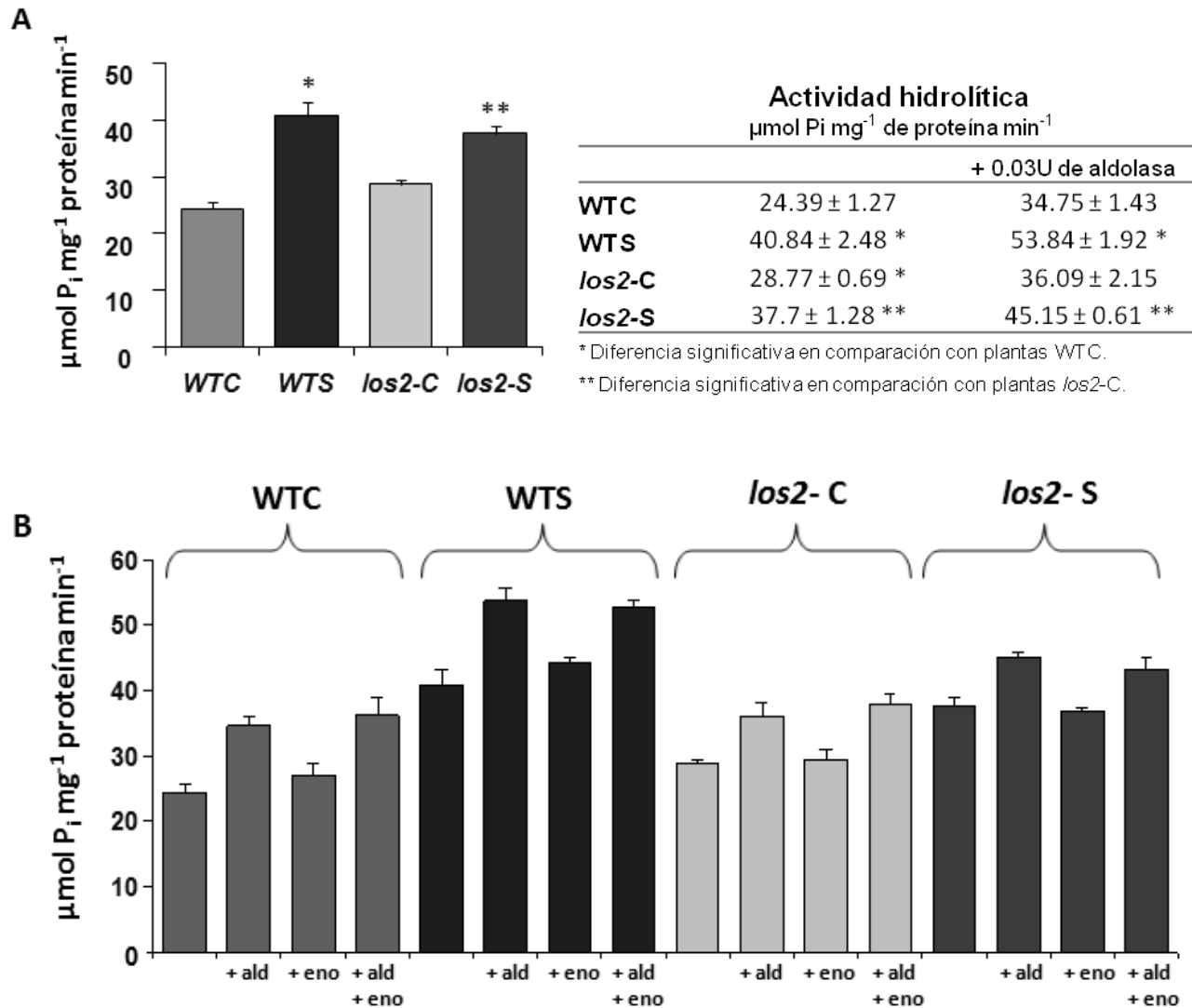
Con la finalidad de conocer sí la mutante *los2* tiene alguna afectación en la regulación de la actividad de la V-ATPasa, se evaluó la actividad hidrolítica de la bomba de protones en dicha mutante bajo condiciones control y tras la exposición a sal. Los valores se compararon con los obtenidos para las plantas silvestres bajo las mismas condiciones. El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose tres series de datos independientes.

Los resultados de nuestros experimentos confirman que la exposición a NaCl estimula significativamente la actividad hidrolítica de la V-ATPasa en plantas

silvestres, como se había mostrado previamente (Barkla, et. al. 2009). Sin embargo, mientras que la presencia de NaCl aumenta al 70% la actividad hidrolítica de la V-ATPasa, para la mutante *los2* dicho incremento es solamente del 30%. No obstante, en el caso de la mutante el valor inicial en condiciones control es significativamente mayor a la actividad hidrolítica de plantas silvestres (Fig. 17A). Por lo que no podemos descartar esto como la causa de una menor activación.

Basados en los resultados obtenidos en trabajos previos en *M. crystallinum* que indican que la adición de aldolasa a la reacción enzimática estimula la actividad hidrolítica de la V-ATPasa, decidimos probar el efecto de dicha enzima sobre la actividad de plantas mutantes *los2* expuestas y no a sal. Después de la adición de 0.03 unidades de aldolasa purificada de *Spinacia oleracea*, la actividad hidrolítica de V-ATPasa se estimuló. En plantas de tipo silvestre tratadas con NaCl el incremento fue de 31%, mientras que en plantas no tratadas la actividad de la V-ATPasa se incrementó en un 42%. En plantas *los2*, al igual que en la estimulación por NaCl, el incremento fue menor. La actividad hidrolítica de la V-ATPasa de plantas *los2* expuestas a sal aumentó solamente un 19% después de la adición de aldolasa, mientras que en plantas *los2* no expuestas el incremento fue de 25% (Fig. 17).

Estos resultados apuntan a que la disminución de los niveles de enolasa en el tonoplasto de la mutante *los2* tiene un efecto negativo sobre la actividad de la V-ATPasa, por lo que se analizó el cambio en la reacción al añadir enolasa exógena. Cuando añadimos 0.04 unidades de enolasa purificada de levadura a la reacción, tanto de plantas silvestres como mutantes *los2*, control y expuestas a NaCl, observamos que no hay un incremento significativo en la actividad hidrolítica de la V-ATPasa ( $p < 0.05$ ). Lo que nos permite sugerir que la enolasa agregada no modifica la actividad hidrolítica de la V-ATPasa como lo hace la aldolasa, y que la adición de 0.04 unidades de enolasa purificada de levadura no complementa la función en la mutante al no restablecer la estimulación por sal o por aldolasa a los niveles medidos en plantas silvestres (Fig. 17B).



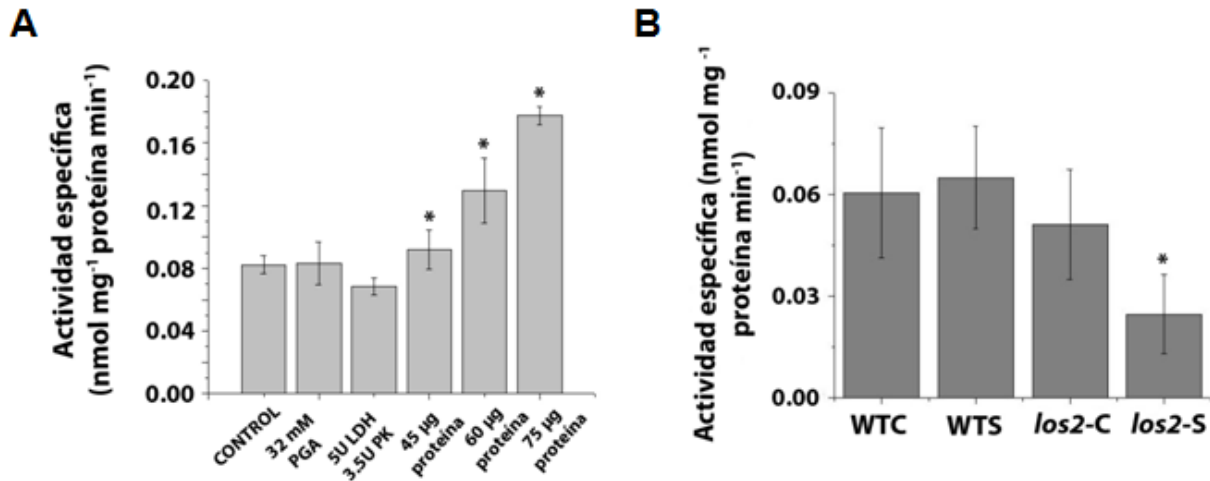
**Figura 17. La estimulación de actividad hidrolítica de la V-ATPasa por la exposición a NaCl o por la adición de aldolasa, es menor en plantas mutantes *los2* expuestas a sal.** **A.** La actividad hidrolítica de la V-ATPasa se evaluó en vesículas aisladas de tonoplasto (30 μg/proteína) de hojas de plantas de tipo silvestre (WT) y de plantas mutantes (*los2*) crecidas en presencia (S) ó en ausencia (C) de 75 mM de NaCl durante 4 días, de acuerdo con el método de Ames como se describe en material y métodos. Las mediciones corresponden a tres experimentos independientes y las barras de error representan la D.S. de la media. Las diferencias significativas fueron evaluadas utilizando la prueba t de Student para comparar pares de datos y un nivel de probabilidad <0.05 (indicado por asteriscos) se consideró significativo, (\*) en comparación con WTC y (\*\*) en comparación con *los2*C. **B.** La actividad hidrolítica de la V-ATPasa se evaluó en presencia de 0.03 unidades de aldolasa purificada de *Spinacia oleracea* y/ó 0.04 unidades de enolasa purificada de *S. cerevisiae*. Las mediciones corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la D.S. de la media.

Finalmente, la adición de las enzimas aldolasa y enolasa juntas resulta en un incremento en la actividad hidrolítica similar al observado después de la adición de aldolasa únicamente.

### **9.12 Bajo exposición a NaCl, la actividad enzimática de la enolasa de la mutante *los2* en fracciones de tonoplasto disminuye significativamente.**

Con el fin de determinar si la actividad catalítica de la enolasa en las fracciones del tonoplasto está afectada por la mutación G326S e involucrada en la función que desempeña la enzima en el tonoplasto, la actividad enzimática fue determinada indirectamente mediante la medición de la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> en presencia de su sustrato *2-fosfoglicerato*, según el método descrito por Hüter y colaboradores (1999). Previo a nuestro experimento, se realizó una estandarización de las concentraciones de enzimas y sustrato empleados utilizando proteína total de tonoplasto de *M. crystallinum* (Fig. 18A), para asegurarnos que, bajo las condiciones y concentraciones empleadas, el producto limitante de la reacción es la cantidad de proteína total de tonoplasto añadida y que los valores obtenidos dependerán de ésta y no de otro factor como la insuficiencia de sustrato o de cofactores para la reacción.

Nuestros ensayos en *Arabidopsis* demuestran que en la mutante *los2* expuesta a 75mM de NaCl durante 4 días, la actividad enzimática de la enolasa disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ) en comparación con plantas de tipo silvestre expuestas y no a NaCl, de 0.6 nmol mg<sup>-1</sup> de proteína min<sup>-1</sup> a 0.27 nmol mg<sup>-1</sup> de proteína min<sup>-1</sup>. Lo que coincide con lo reportado por Lee y colaboradores (2002), quienes midieron *in vitro* la actividad de la enzima expresada en levadura. Y reportan una disminución en la actividad de la proteína Los2. No obstante, en nuestros experimentos la disminución de la actividad solamente pudo observarse en condiciones de exposición a NaCl. Ya que en condiciones control, la mutante no presenta una disminución significativa en su actividad catalítica, la cual es de 0.54 nmol mg<sup>-1</sup> de proteína min<sup>-1</sup> (Fig. 18B).



**Figura 18. La actividad enzimática de la enolasa en fracciones de tonoplasto disminuye significativamente en la mutante *los2* expuesta a NaCl.** **A.** Estandarización del ensayo acoplado para determinar la actividad catalítica de la enolasa en tonoplasto de *A. thaliana*. En la reacción control se añadieron 0.2 mM de NADH, 1.2 mM de ADP, 2mM de 2-Fosfoglicerato (**PGA**), 3 U de Lactato deshidrogenasa (**LDH**), 2.1 U de Piruvato cinasa (**PK**) y 30µg de proteína de tonoplasto aislado de plantas de tipo silvestre. Las mediciones corresponden a tres experimentos independientes y las barras de error representan la D.S. de la media. Las diferencias significativas fueron evaluadas utilizando la prueba t de Student para comparar pares de datos y un nivel de probabilidad <0.05 (indicado por asteriscos) se consideró significativo. **B.** La actividad catalítica de la enolasa fue determinada en tonoplasto aislado de plantas de tipo silvestre (**WT**) y plantas mutantes (***los2***) crecidas en presencia (**S**) ó en ausencia (**C**) de 75 mM de NaCl durante 4 días, a través de la medición de la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>. Las mediciones constituyen la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la D.S. de la media. Las diferencias significativas fueron evaluadas mediante la prueba t de Student para comparar pares de datos y un nivel de probabilidad <0.05 (indicado por asteriscos) se consideró significativo. \* p<0.05 en comparación con plantas silvestres control (**WTC**), plantas silvestres expuestas a NaCl (**WTS**) y plantas mutantes control (***los2-C***).

### 9.13 Modelaje de la proteína enolasa por homología.

En nuestro experimento anterior encontramos que la actividad catalítica de la enolasa en la mutante *los2* expuesta a NaCl es menor que en las plantas de tipo silvestre. Lo que coincide con lo reportado previamente (Lee, et al. 2002). Por ello, consideramos en un inicio que la proteína mutada Los2 tiene una menor actividad catalítica y que dicha disminución enzimática podría ser la causa de los fenotipos observados. No obstante, un estudio más cuidadoso de los datos nos llevó a dudar de ello.

Nuestros datos demuestran que en condiciones control, la actividad catalítica de la enolasa en la mutante *los2* no disminuye significativamente (Fig. 18 B). Y de manera coincidente, la abundancia de la enzima asociada al tonoplasto de la mutante disminuye bajo condiciones de salinidad (Fig. 15 A). Por lo que no es claro si efectivamente hay una menor actividad en la mutante o si es la disminución en la presencia de la enolasa en la fracción de tonoplasto lo que provoca esa menor actividad.

Con la finalidad de tener elementos para especular acerca de los efectos de la mutación G326S sobre la estructura de la proteína en general y sobre el sitio catalítico en particular, decidimos hacer un modelo computacional de la enolasa. Dicho modelo nos permitiría conocer el efecto directo de la mutación sobre el sitio catalítico, si alguna región de la proteína externa al sitio catalítico se encuentra afectada y si podría estar involucrada con la unión al tonoplasto.

A partir del BLAST realizado para comparar la enolasa (gen At2g36530) con las reportadas en el banco de datos de proteínas RCSB-PDB se identificó a la proteína HsENO1 (enolasa tipo 1 de humano, **PDB:3B97**) como la que presenta mayor homología (83%). Una vez que se obtuvo el modelo y se verificó automáticamente con el servidor de bioinformática Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>), los aminoácidos importantes para la actividad catalítica fueron determinados en base a lo reportado en la literatura (Anderson, et al. 1998; Kang, et al. 2008). Mediante una alineación de secuencias entre las proteínas HsENO1 y AtENO, se estableció la posición de cada uno de los aminoácidos en nuestro modelo.

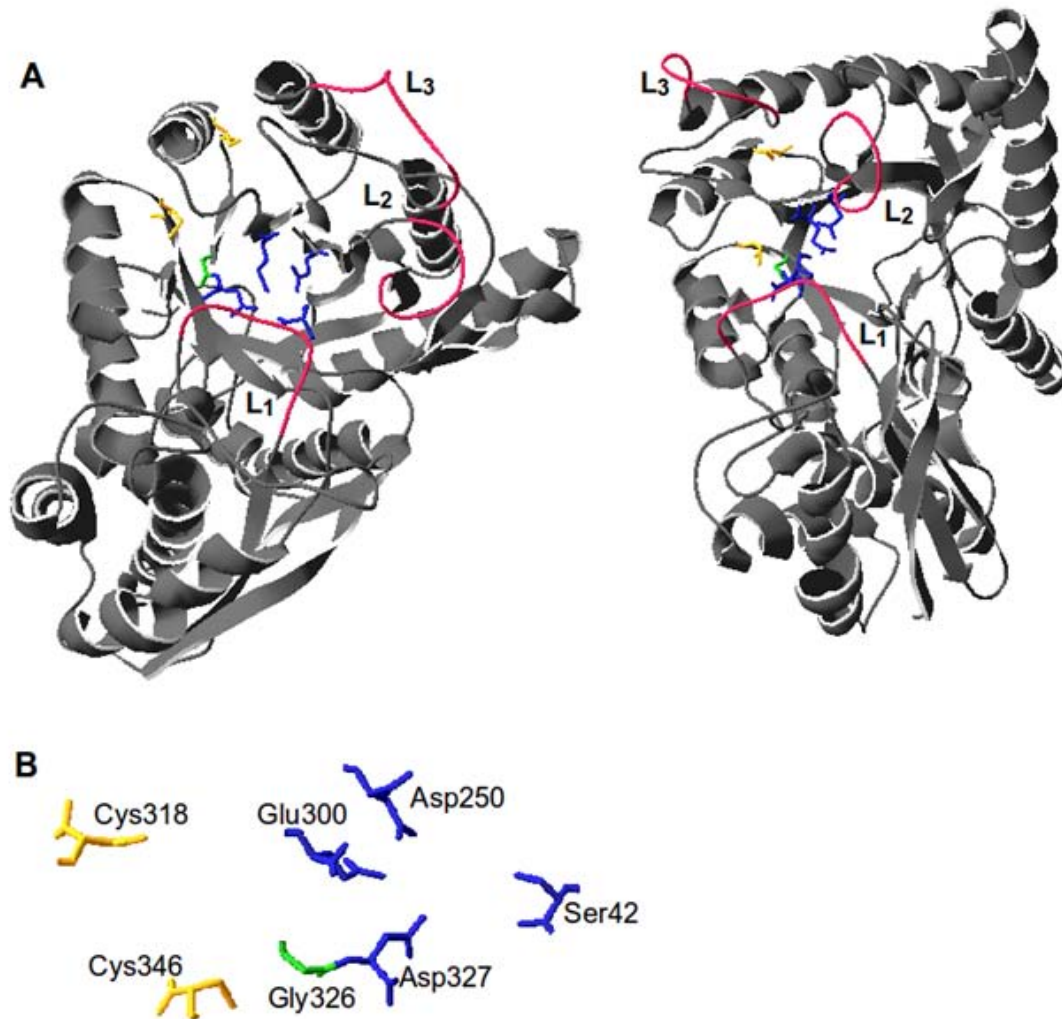
La estructura de la enolasa consiste en un dominio N-terminal que comprende tres hojas- $\beta$  y tres  $\alpha$ -hélices, y un dominio C-terminal con conformación de barril- $\alpha\beta$  en el que se encuentra el sitio activo. Dicho sitio, está conformado por las asas L<sub>1</sub> (residuos 39-46), L<sub>2</sub> (residuos 162-168) y L<sub>3</sub> (residuos 269-278), por dos iones Mg<sup>++</sup> unidos a los residuos Glu300, Asp327, Asp250 y Ser42, y por moléculas de H<sub>2</sub>O. La conformación abierta o cerrada del sitio catalítico depende de la posición de las tres

asas, las cuales rodean y protegen a los aminoácidos que llevan a cabo la reacción (Anderson et. al. 1998; Kang et. al. 2008). La cual consiste en la conversión reversible de *2-fosfoglicerato* a *fosfenolpiruvato*, uno de los sustratos últimos de la glicólisis (Lenhinger, et al. 2004). En su trabajo sobre la enolasa de *A. thaliana* y *M. crystallinum*, Anderson y colaboradores (2005) reportan la importancia de otros dos residuos (Cys318 y Cys346), exclusivos para dichas especies vegetales. Según los estudios realizados, las dos Cys tienen la capacidad de formar un enlace disulfuro que podría regular la actividad de la enzima (Fig. 19).

El modelo de la proteína mutada fue desarrollado de la misma forma, partiendo de la secuencia con el cambio de Gly326 a Ser326. Los modelos fueron sobrelapados utilizando el programa Swiss PdbViewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>) y las diferencias en posición determinadas (Fig.20). Aunque la Gly326 está ubicada dentro del sitio catalítico, no se le ha atribuido una función específica y al mutarse no se altera la posición u orientación del Asp327, el cual se encuentra relacionado directamente con la reacción catalítica al unirse al  $Mg^{++}$ . Aún cuando en la Glu300 y la Ser42 hay un ligero cambio de orientación entre el observado entre la configuración de la proteína silvestre y la mutante, lo más interesante son los cambios de orientación en la Ser326 y en la Cys318, así como la modificación del asa  $L_3$  (Fig. 20). La cual, al ser un asa externa, podría tener una participación en la asociación de la enolasa al tonoplasto.

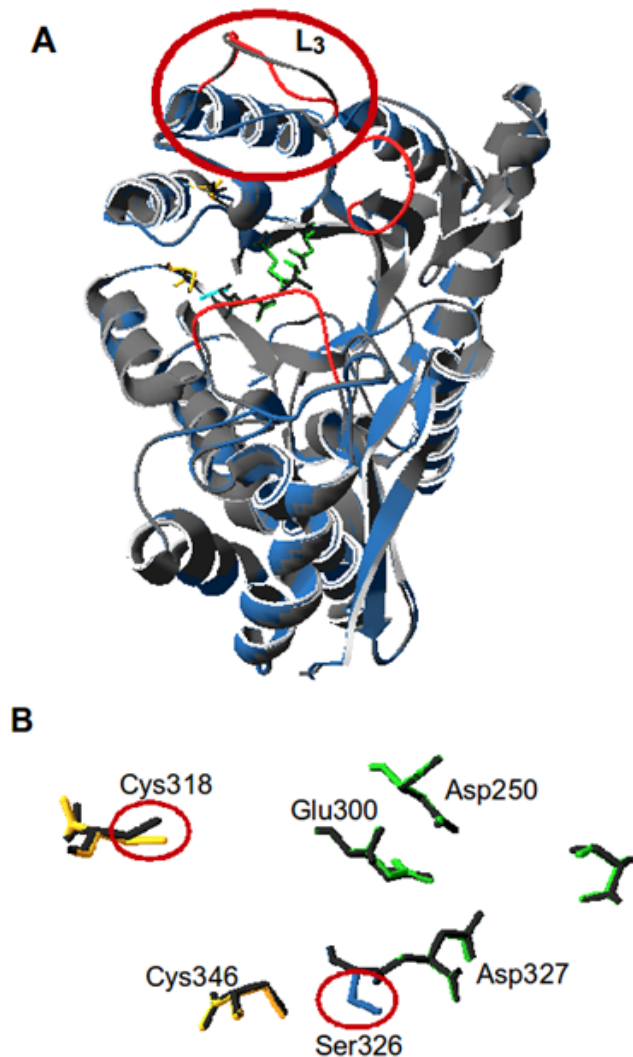
#### **9.14 La organización e integridad de las membranas celulares se afecta en la mutante *los2* expuesta a NaCl.**

En estudios previos se ha documentado la relación de la enzima enolasa con la formación y estabilidad de la membrana vacuolar en levadura (Decker & Wickner, 2006), lo que puede explicar la presencia de la proteína en el tonoplasto y su regulación por sal. Con el fin de determinar la participación de la enolasa en la estabilidad e integridad de las membranas celulares de *A. thaliana*, muestras de plantas de tipo silvestre y de tipo mutante *los2*, control y expuestas a 75 mM de NaCl fueron tomadas para su análisis en microscopía electrónica.

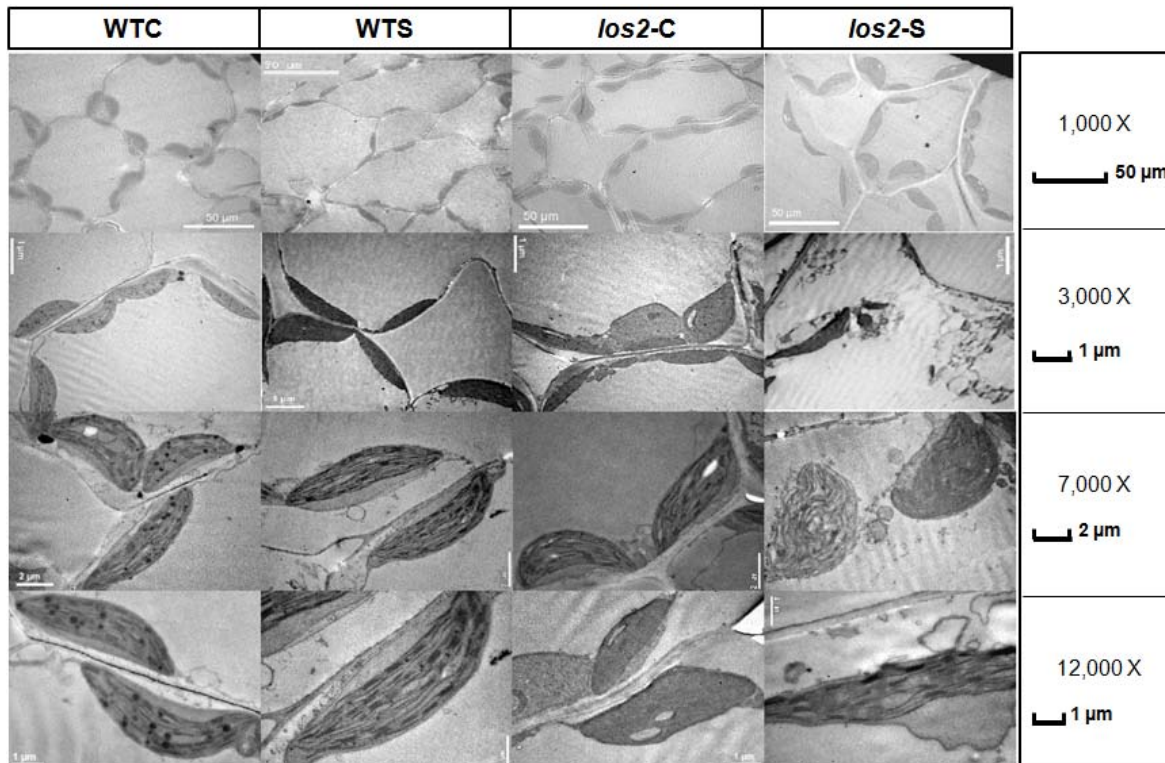


**Figura 19. Simulación de la estructura terciaria de la enolasa At2g36530 de *A. thaliana*.** El modelo fue obtenido mediante modelaje por homología con la enolasa 1 de humano (HsENO1), empleando el software libre Modweb y el programa Swiss PdbViewer para la visualización y manipulación de la imagen como se describe en Material y Métodos. **A.** El sitio catalítico está conformado por las asas L<sub>1</sub> (residuos 39-46), L<sub>2</sub> (residuos 162-168) y L<sub>3</sub> (residuos 269-278), marcados en rojo, y por los residuos Glu300, Asp327, Asp250 y Ser42 que unen los dos iones de Mg<sup>2+</sup>, marcados en azul. En amarillo se muestran la Cys318 y la Cys346, que podrían estar involucradas en la regulación de la enzima al formar un enlace disulfuro. En verde se muestra la Gly326 que corresponde al aminoácido mutado en las plantas *los2*. **B.** Estructura de los aminoácidos importantes en el sitio catalítico.





**Figura 20. Modificaciones en la estructura terciaria de la proteína enolasa At2g36530 de *A. thaliana* debido a la mutación puntual G326S.** Los modelos de la proteína silvestre (negro) y la mutante *los2* (azul), simulados con el software Modweb fueron sobrelapados empleando el programa Swiss PdbViewer. **A.** Las asas L<sub>1</sub> (residuos 39-46), L<sub>2</sub> (residuos 162-168) y L<sub>3</sub> (residuos 269-278) son marcados en rojo. El asa 3 (adentro del círculo rojo) sufre una ligera modificación. **B.** Estructura de los aminoácidos importantes del sitio catalítico. Las principales modificaciones residen en la orientación de la Cys318 y en el cambio en el residuo 326.



**Figura 21. Las electromicrografías de hoja demuestran que en la mutante *los2* expuesta a NaCl la integridad y organización de las membranas celulares se altera.** La sección media de hojas de *A. thaliana* de tipo silvestre (**WT**) y de plantas mutantes (***los2***), control (**C**) y expuestas a 75 mM de NaCl por 4 días (**S**), fueron procesadas como se describe en la sección de Material y Métodos para su observación en microscopía electrónica. Fotografías representativas de tres experimentos independientes, en los que se tomaron muestras de distintas zonas de la hoja. Las flechas indican la disposición anormal de los cloroplastos, así como la desorganización de distintas membranas.

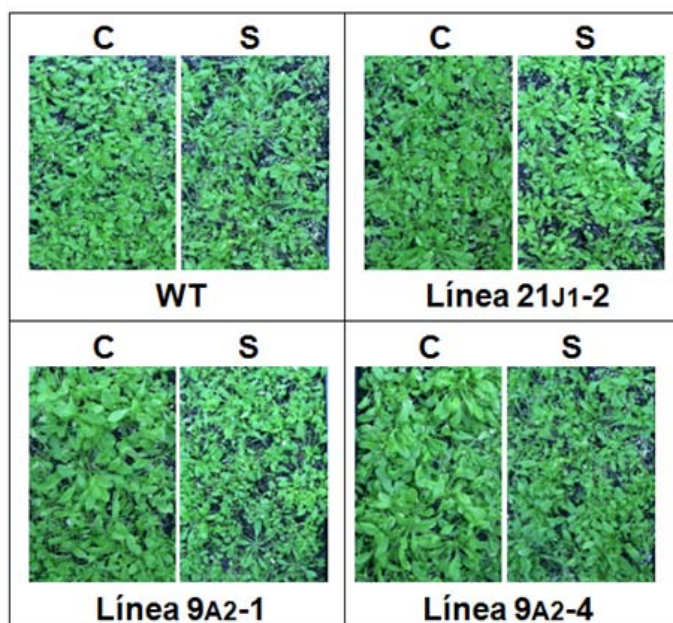
Las imágenes obtenidas de la zona media de las hojas muestran que bajo exposición a NaCl las plantas de tipo silvestre presentan expansión de la vacuola debido al incremento en turgor celular (Fricke, 1997), provocando que el citoplasma y el resto de los organelos se encuentren limitados en una pequeña banda entre la membrana plasmática y el tonoplasto. Los cloroplastos, por tanto, son replegados hacia la membrana plasmática y presentan un forma elongada (Fig. 21, panel superior). Por el contrario, en las imágenes obtenidas a partir de muestras de plantas tipo *los2* expuestas a NaCl el turgor celular es menor y los cloroplastos se encuentran separados de la membrana plasmática, pareciendo incluso embebidos en la vacuola y con formas más redondeadas. En las membranas internas de los

cloroplastos, así como en el tonoplasto y en la membrana plasmática, hay desorganización y daño. Lo cual varía de ligero a grave, según la zona de la hoja observada (Fig. 21, extremo derecho). En contraste, en condiciones control no se observa diferencia entre las muestras de tipo silvestre y las plantas mutantes *los2* (Fig. 21, WTC, *los2*-C).

### 9.15 La mutante *Salk\_080758* no presenta un fenotipo distinto al de plantas de tipo silvestre.

Tres de las líneas caracterizadas genótipicamente como homocigóticas para la inserción de T-DNA en el gen At4g26530 que codifica para la aldolasa (Fig. 5) fueron expuestas al tratamiento con sal (75 mM de NaCl durante 4 días), para determinar su sensibilidad al estrés.

Al igual que las plantas de tipo silvestre, las plantas de las líneas 21J1-2, 9A2-1 y 9A2-4 son afectadas por la exposición a sal, mostrándose marchitas y de menor tamaño. Sin embargo, no se observó diferencia entre las plantas mutantes y de tipo silvestre. De igual forma, en condiciones control, las plantas de las líneas 21J1-2, 9A2-1 y 9A2-4 muestran un fenotipo normal, similar al de plantas de tipo control crecidas bajo las mismas condiciones (Fig. 22).



**Figura 22. Las plantas de las líneas *Salk\_080758* no presentan un fenotipo distinto al de plantas de tipo silvestre.** Plantas adultas de tipo silvestre (WT) y plantas mutantes, con inserción homocigótica de T-DNA en el gen At4g26530 que codifica para la aldolasa (Líneas 21J1-2, 9A2-1 y 9A2-4) fueron crecidas en presencia (S) ó en ausencia (C) de 75 mM de NaCl durante 4 días.

## 10. DISCUSIÓN.

La respuesta de las plantas a la salinidad es un proceso complejo que involucra la expresión de diversos genes y la regulación de proteínas para restablecer la homeostasis celular iónica y osmótica (Mahajan, et al. 2008). En dicho proceso participan la V-ATPasa como un elemento necesario para el secuestro de iones en la vacuola (Narasimhan, et al. 1991; Barkla, et al. 1995), el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , *AtNHX1*, que media el transporte de  $\text{Na}^+$  hacia el interior de la vacuola (Gaxiola, et al. 1999), y el co-transportador de  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , HKT1, involucrado en la toma de  $\text{Na}^+$  hacia las raíces (Rubio, et al. 1995); así como las proteínas de señalización en respuesta a estrés salino, SOS2/CIPK24 y SOS3/CBL4, las cuales regulan la actividad del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (SOS1/NHX7) de la membrana plasmática (Liu & Zhu, 1998; Shi, et al. 2000; Halfter, et al. 2000). A pesar de que en la literatura se ha encontrado que estos elementos están presentes en las plantas sometidas al estrés salino, no se conocen los mecanismos exactos que regulan la compleja red de activación de los mismos.

Recientemente, mediante ensayos de proteómica comparativa y pruebas bioquímicas hemos demostrado que en plantas de *Mesembryanthemum crystallinum* expuestas a la salinidad, las enzimas glicolíticas enolasa y aldolasa se acoplan a la V-ATPasa para activarla (Barkla, et al. 2009), lo cual nos permite sugerir que dichas enzimas participan en la tolerancia al estrés salino, particularmente en el proceso de compartimentalización de iones en la vacuola.

En este estudio demostramos que además de la presencia de la aldolasa y de la enolasa en el tonoplasto de *Arabidopsis thaliana*, una especie glicófita (Fig.10), existe regulación positiva de la V-ATPasa en respuesta a la sal (Fig.18 B), lo que nos indica que la participación de estas enzimas en la tolerancia a la salinidad se extiende a todas las especies vegetales y que no es un mecanismo exclusivo de las halófitas. En la literatura, se han reportado numerosos mecanismos relacionados con la tolerancia a la salinidad en las halófitas que también están presentes en las

glicófitas, tales como los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la familia NHX (Yokoi, et al. 2002), las proteínas regulatorias de la vía SOS (Quintero, et al. 2002) y la participación del transportador de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , HKT (Rubio, et al. 1995), por mencionar algunos. Sin embargo, la diferencia en la tolerancia a salinidad entre especies halófitas y glocófitas podría residir en la regulación de estos mecanismos de respuesta al estrés salino y en el conjunto de diferencias fisiológicas y anatómicas de las plantas. Esto es interesante no solamente por el hecho de que los resultados obtenidos en *M. crystallinum* sean confirmados en *A. thaliana*, sino también porque abre la posibilidad de estudiar la participación de las enzimas glicolíticas en la respuesta a la salinidad en un modelo más conveniente, para el que se cuenta con una amplia colección de mutantes, incluyendo a las mutantes de aldolasa (*Salk\_080758*) y de enolasa (*los2*), y se pueden utilizar diversas herramientas genéticas y moleculares.

### **10.1 El uso de mutantes de *Arabidopsis* para los genes de la aldolasa y de la enolasa ayuda a descifrar el papel de las enzimas en la respuesta a salinidad.**

El uso de mutantes es una herramienta que ha permitido el estudio de las bases genéticas y moleculares de diversos aspectos en la biología de plantas (Somerville & Koornneef, 2002). Ejemplo de ello es la identificación de genes involucrados en la regulación de ABA, *ABI1* y *ABI2* a partir de un búsqueda en mutantes generadas con EMS (Gosti, 1999); así como el uso de mutantes generadas por T-DNA para demostrar la función de las cinasas CIPK's en respuesta a estrés abiótico (Pandey, et al. 2007), entre muchos otros. Actualmente, los bancos de semillas y la disponibilidad de bases de datos en torno a *A. thaliana* constituyen una interesante opción para trabajar con la especie.

Bajo condiciones control y de exposición a 75 mM de NaCl (Fig. 23), las mutantes del gen de la aldolasa At4g26530 no mostraron un fenotipo distinto al de plantas de tipo silvestre. Estos resultados no son sorprendentes ya que se conoce que en *A. thaliana* existen al menos 8 genes que pueden codificar para esta enzima (Fig.4), por lo que uno o varios de ellos podrían ser capaces de compensar la pérdida del

gen At4g26530, como se ha mostrado en otros genes pertenecientes a grandes familias génicas (Gebert, et al. 2009). El genoma de *A. thaliana* ha mostrado poseer una gran cantidad de duplicaciones génicas (Alonso, et al. 2003), y en muchos casos se ha documentado la redundancia entre genes que participan en diversos procesos, tales como el desarrollo floral (Ishihara, et al. 2005) o el transporte (Mäser, et al. 2001).

La mutante *los2* de enolasa fue aislada y caracterizada por su respuesta a bajas temperaturas por el grupo del Dr. Jian-Kang Zhu. Ésta presenta una mutación puntual cercana al sitio catalítico, la cual fue generada por exposición a EMS que provocó el cambio de la glicina 326 por una serina, impidiendo una adecuada respuesta al frío en la mutante (Lee, et al. 2002).

En condiciones control, la mutante *los2* no presenta un fenotipo distinto al de las plantas de tipo silvestre, lo que nos confirma que los procesos generales de glicólisis no están afectados en las plantas. Sin embargo, las hojas de plantas adultas de la mutante *los2* tratadas con 75 mM de NaCl presentan un mayor marchitamiento que las de plantas de tipo silvestre crecidas bajo las mismas condiciones (Fig.14 A), lo que indica que las células son menos turgentes. Aunado a esto, las hojas de las plantas *los2* poseen más lesiones cloróticas y presentan un mayor grado de senescencia que las plantas de tipo silvestre (Fig.14 A), fenotipo característico de las plantas que sufren una toxicidad iónica generada por el incremento de Na<sup>+</sup> en los tejidos (Tester & Davenport, 2003). Tal como ocurre con la mutante *los2* expuesta a NaCl, la cual acumula mayores concentraciones del ion Na<sup>+</sup> en la savia de tejidos aéreos (Fig. 16 A) y presenta una elevada osmolaridad (Fig. 16 B) en comparación con plantas de tipo silvestre crecidas bajo las mismas condiciones. La mayor acumulación de Na<sup>+</sup> en las plantas puede exceder la habilidad de las células para compartimentalizar el sodio en la vacuola, provocando así una elevada concentración del ión en el citoplasma, lo cual lleva como consecuencia a una toxicidad metabólica y por ende a un desequilibrio osmótico (Moller & Tester, 2007). De esta forma, la mutación en la enolasa podría estar

afectando la respuesta adecuada a la salinidad, la compartimentalización de los iones u otros aspectos de la señalización al estrés.

La sensibilidad a la sal observada en plantas adultas *los2* también se manifiesta en etapas tempranas del desarrollo. Las plántulas *los2* germinadas en presencia de sal muestran un menor porcentaje de germinación y crecimiento, tanto de raíces como de la parte aérea (Fig.14 B). Esto se puede considerar como un reflejo del estrés osmótico generado por el incremento en los solutos en el medio, el cual dificulta la toma de agua e incrementa la pérdida de la misma en las células (Tester & Davenport, 2003). Dicha pérdida de volumen y de turgencia celular ocasionan una reducción en la elongación y conducen a una disminución en las tasas de crecimiento (Munns, et al. 2000). Además, las plántulas germinadas en presencia de NaCl muestran una pigmentación más clara en hojas que plantas crecidas en condiciones control (Fig. 14 B), así como reducción en el contenido de clorofila (Tabla 4), lo que nos permite sugerir que existe un efecto sobre la capacidad fotosintética de ambos tipos de plantas. Sin embargo, la diferencia en el crecimiento de las plantas *los2* en presencia de NaCl, con respecto a plantas de tipo silvestre crecidas en las mismas condiciones (Fig. 14 B), sugiere la participación de otro factor como limitante del crecimiento e indica que la mutación en la enolasa podría estar involucrada.

A diferencia de las plántulas de tipo silvestre, las mutantes *los2* expuestas a NaCl mostraron ausencia de pigmentación rojiza en las hojas y dado que los resultados obtenidos para el contenido de carotenoides (Tabla 4) demostraron valores similares de esos pigmentos en ambos tipos de plantas, sugerimos que la diferencia en la pigmentación podría estar relacionada con las antocianinas. Se sabe que las antocianinas, además de encontrarse almacenadas en la vacuola (Wagner, 1979), son potentes antioxidantes que evitan la producción de radicales libres (Chalker-Scott, 1999), situación común provocada por la toxicidad de los iones de  $\text{Na}^+$  (Tester & Davenport, 2003). Aunque se han estudiado los factores que influyen en el crecimiento después de una prolongada exposición a la salinidad, tales como la

toxicidad metabólica producto del incremento de  $\text{Na}^+$  o la señalización por hormonas provenientes de la raíz (principalmente ABA), los mecanismos que limitan el crecimiento bajo estrés salino no están del todo claros (Munns, 2002). Sin embargo, en nuestro caso, la presencia de la enolasa y la estabilidad del tonoplasto podrían estar relacionadas con un menor crecimiento.

La sensibilidad a la sal observada en las plántulas y en las plantas adultas *los2* podría estar relacionada con una menor capacidad para compartimentalizar los iones en la vacuola en la mutante. En plantas *los2*, la actividad hidrolítica de la V-ATPasa es similar al de plantas de tipo silvestre en condiciones control. Sin embargo, bajo estrés salino cuando la bomba debe ser más activa para generar el gradiente de protones adicional para dirigir la compartimentalización de los iones de sodio, la actividad de la V-ATPasa de las plantas mutantes disminuye y ni alcanza los mismos niveles de actividad que la observada en plantas de tipo silvestre (Fig. 17). En estas condiciones la capacidad de la V-ATPasa para generar el gradiente de protones podría verse rebasada, ocasionando la creciente acumulación de iones en el citoplasma. Esto además contrasta con la actividad medida en plantas de tipo silvestre tratadas con NaCl, donde la actividad es regulada positivamente (Fig 17).

## **10.2 La enolasa y su posible función en el tonoplasto.**

La disminución en la abundancia de la proteína enolasa específicamente en la fracción del tonoplasto de plantas *los2* expuestas a sal (Fig.15 A), nos indica una relación directa entre la mutación puntual que genera el cambio de la glicina 326 a serina y la incapacidad de la proteína para localizarse/asociarse en el tonoplasto en presencia de NaCl. Por lo que la condición de estrés parece ser un factor desestabilizante en la mutante. En trabajos previos, se ha reportado la asociación de la enolasa a la vacuola de levadura, y se le ha asignado un papel en la regulación y estabilización de la misma y de sus componentes (Decker & Wickner, 2006; Wiederhold, et al. 2009), lo que nos conduce a sugerir que la enzima podría participar en la regulación de la integridad del tonoplasto. Así mismo, la ausencia de cambio en los niveles de enolasa observados en extractos de proteína total (Fig.15



F) nos confirma que se trata de un efecto localizado específicamente en la vacuola.

La enolasa es una proteína citoplasmática sin regiones o dominios hidrofóbicos (Fig. 19), que faciliten su asociación a la membrana, por lo que podría requerir de proteínas de andamiaje para localizarse en el tonoplasto. En eritrocitos de humano se ha demostrado que la proteína *banda3* es responsable de unir a las enzimas glicolíticas a la membrana plasmática (Campanella, et al. 2005). De igual forma, en el trabajo de Decker y Wickner (2006) previamente mencionado, se propone que la proteína homóloga de *banda3*, *Bor1*, es la responsable de reclutar a la enolasa a la vacuola de levadura. En *A. thaliana*, existen al menos 7 proteínas homologas a *Bor1* de *S. cereviceae*, *BOR1*, *BOR2*, *BOR3*, *BOR4*, *BOR5*, *BOR6* y *BOR7* (Blast NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con porcentajes de similitud en aminoácidos de 28-32%. Aunque se ha caracterizado a la proteína *AtBOR1* (At2g47160) como un transportador de boro localizado en la membrana plasmática durante condiciones de deficiencia del ión (Takano, et al. 2002), la función y localización del resto de las proteínas homólogas no se ha establecido.

La débil asociación de la enolasa al tonoplasto de *A. thaliana* observada bajo tratamiento caotrópico (Fig.13 B), podría ser un indicio de la existencia de otra(s) proteínas, necesarias para unir a la enolasa al tonoplasto. La asociación de la enolasa con la 14-3-3 (Lab. Dra. Oecking; [www.uni-tuebingen.de/?id=5088](http://www.uni-tuebingen.de/?id=5088), datos no publicados), una proteína de señalización y andamiaje que se une a residuos de ser/thr fosforilados (Chevalier, et al. 2009), así como la fosforilación de la enzima en diversas especies como *Zea maiz* (Lal, et al. 1998) y *Escherichia coli* (Dannelly, et al. 1989), aportan evidencia a este hecho. No obstante, los resultados obtenidos previamente en la halófito *M. crystallinum* difieren con lo mencionado, donde la enolasa está fuertemente unida a la membrana (Barkla, et al. 2009), y un tratamiento caotrópico similar no remueve a la enzima asociada al tonoplasto. Los resultados obtenidos con el tratamiento para las proteínas aldolasa, VHA-B y VHA-E son similares en ambas especies, en las que la fuerza de asociación es fuerte y, aunque en *A. thaliana* la aldolasa y la subunidad B disminuyen su abundancia

después del tratamiento caotrópico, es posible detectarlas en la fracción del tonoplasto (Fig.13). Por ello se sugiere que los mecanismos de tolerancia y respuesta a la sal están presentes en todas las plantas, pero que es su regulación diferencial lo que distingue una planta tolerante de una sensible.

En diferentes especies se ha demostrado que la exposición a NaCl estimula la actividad de la V-ATPasa (Ayala, et al. 1996; Barkla, et al. 1995; Wang, et al. 2001; Vera-Estrella, et al. 2005) lo que se ha explicado como una estrategia para aumentar el transporte de protones hacia el interior de la vacuola e incrementar la capacidad de secuestro del sodio (Amtmann & Sanders, 1998). A pesar de que las proteínas y mecanismos involucrados en dicho proceso están presentes en diferentes especies, su actividad parece ser distinta. Evidencia de ello es la diferencia en el valor absoluto de la actividad hidrolítica de la V-ATPasa entre *M. crystallinum* (Barkla, et al. 2009) y los resultados obtenidos mediante la misma técnica para *A. thaliana* en este trabajo (Fig.17) bajo condiciones control. Mientras que la actividad hidrolítica obtenida para la halófito, fue de 120  $\mu\text{mol}$  de  $\text{P}_i$  liberados  $\text{mg}^{-1}$  de proteína  $\text{min}^{-1}$ , para *A. thaliana* se obtuvo una actividad total de 25  $\mu\text{mol}$  de  $\text{P}_i$  liberados  $\text{mg}^{-1}$  de proteína  $\text{min}^{-1}$ .

El fenotipo observado a nivel subcelular de plantas *los2* tratadas con sal (Fig.21), nos ofrece más evidencia de la relación de la enolasa con la estabilidad de las membranas en plantas. Bajo tratamiento con NaCl, la mutante *los2* muestra cambios en la forma y la localización de los cloroplastos, así como alteraciones en las membranas. En estas condiciones, la integridad de la vacuola podría verse afectada, dificultando la compartimentalización de los iones y provocando toxicidad en orgánulos como los cloroplastos. En el trabajo donde se identificó y caracterizó a la mutante *los2* por su incapacidad para tolerar frío, Lee y colaboradores (2002) demostraron desorganización de las membranas de plantas *los2* expuestas a frío, lo que consideran evidencia de muerte celular. No obstante, tanto en sus resultados como en los nuestros, es difícil determinar si el daño celular observado es resultado directo del estrés -ejem. muerte celular como afirman- o una consecuencia de la

mutación –ejem. desestabilización de las membranas-.

### **10.3 ¿Es la función catalítica de la enolasa relevante para su actividad en el tonoplasto?**

Los resultados de nuestro trabajo nos permiten sugerir que la actividad catalítica de la enolasa no es necesaria para la función que desempeña la enzima en el tonoplasto. Las plantas *los2* crecidas bajo condiciones control mantienen los mismos niveles de actividad catalítica de la enolasa en fracciones de tonoplasto que las muestras de plantas de tipo silvestre en las mismas condiciones (Fig. 18 B), y solamente se observó una disminución en la actividad enzimática en extractos de tonoplasto de plantas *los2* expuestas a NaCl, misma condición en que se identificó una menor abundancia de la proteína en esas fracciones de tonoplasto (Fig.15 A). Por lo que la menor actividad observada parece estar vinculada a una menor cantidad de la enzima en la fracción del tonoplasto y no a que su capacidad catalítica se encuentre afectada. De igual forma, la simulación de la proteína nos ofrece evidencia de que la mutación no afecta directamente a los aminoácidos implicados en la actividad catalítica de la enzima (Fig. 19) y apunta a que la orientación de asas externas podría modificarse (Fig. 20), que podrían estar involucradas en la asociación de la enzima con otras proteínas o con los lípidos de la membrana vacuolar.

Esto coincide con lo reportado para la enolasa de levadura, donde la proteína de enolasa inactiva catalíticamente mostró el mismo efecto para estimular la fusión homotípica de las vacuolas *in vitro*, que las proteínas con actividad catalítica *Eno1p* y *Eno2p* (Decker & Wickner, 2006). Así mismo, en el trabajo de Lu y colaboradores (2007) donde identificaron a la aldolasa como un componente regulatorio del ensamblaje de la V-ATPasa en levadura, se determinó que la región catalítica no es relevante para la asociación de la enzima con la subunidad B de la V-ATPasa; y, de manera similar, en *M. sativa* se demostró que la actividad enzimática de la aldolasa no es necesaria para su interacción con el dominio MADS de la proteína NMH7, un factor de transcripción involucrado en la nodulación (Páez-Valencia, et al. 2008).

Junto con estas evidencias existen múltiples estudios que demuestran la diversidad funcional de proteínas glicolíticas, en la que la función alternativa no está relacionada con su actividad catalítica, sino con una actividad secundaria o con un sitio de unión a otras proteínas (Kim & Dang, 2005).

Es posible que la asociación de la enolasa al tonoplasto se encuentre entonces mediada por un sitio alternativo al de la unión con su sustrato en la glicólisis, o que tenga una función novedosa en dicho sitio alterno. Para ello, la estructura de la proteína podría tener una función relevante. La incapacidad de la enolasa de levadura para restablecer la estimulación de la actividad hidrolítica de la V-ATPasa en la mutante *los2* o para estimular su actividad en plantas de tipo silvestre, similar a lo observado con la aldolasa, (Fig.17) puede ser atribuida a la diferencia estructural en las regiones terminales amino y carboxilo de la proteína de distintas especies. Mientras que el sitio catalítico de la enolasa está altamente conservado entre especies distantes evolutivamente, con una homología en la secuencia de aminoácidos de la región catalítica de 75% entre *A. thaliana* y *S. cereviceae*, de 82% entre *A. thaliana* y el crustáceo *Palinurus elephas* y de 96% entre *A. thaliana* y *M. crystallinum* (Blast NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), las regiones periféricas son altamente variables (Sugahara, et al. 1998). Se ha sugerido que las regiones externas al sitio catalítico de las enzimas podrían haber evolucionado la capacidad de realizar otras funciones al ofrecer sitios con menor presión evolutiva, lo que las hace capaces de albergar mutaciones (Kim & Dang, 2005), y si el sitio de unión de la enolasa al tonoplasto se encontrara en una región poco conservada como ésta, difícilmente se podría lograr la complementación entre especies.

Por otra parte, la presencia de varias enzimas glicolíticas agrupadas en torno a distintas regiones celulares ha llevado a formular una hipótesis acerca de la existencia de microdominios energéticos, constituidos por enzimas glicolíticas cuya función sería la de proveer de energía en forma de ATP a procesos celulares que así lo requieran (Dhar-Chowdhury, et al. 2007). Mediante un estudio proteómico de la mitocondria en *Arabidopsis thaliana* se identificó la asociación a la membrana

mitocondrial de siete de las 10 enzimas que conforman la vía glicolítica (*hexocinasa, aldolasa, enolasa, triosafosfato isomerasa, piruvato cinasa y fosfoglicerato mutasa*) y se confirmó la actividad catalítica secuencial de ellas (Geigé, et al. 2003). Posteriores estudios demostraron que su presencia en dicho organelo se regula positivamente en situaciones de alta demanda respiratoria y se comprobó su asociación al canal VDAC, presente en la membrana externa de la mitocondria (Graham, et al. 2007).

La asociación de la fosfofructocinasa-1 con la subunidad a de la V-ATPasa (Su, et al. 2003) aporta evidencia de la posibilidad de que exista un microdominio energético en torno a la bomba de protones, integrado por distintas enzimas glicolíticas y cuyo propósito sería maximizar la eficiencia en el suministro de energía. No obstante, se requiere de más evidencia que lo demuestre. Y aunque los resultados de nuestro trabajo nos conducen a proponer una función en la respuesta a la salinidad, independiente de glicólisis, la ocurrencia de una función para las proteínas no excluiría a la otra, tal como se ha mostrado mediante trabajos sobre diversidad funcional proteica (Jeffery, 2004; Moore, 2004; Kim & Dang, 2005; Gancedo & Flores, 2008) (Tabla 1). Con el fin de clarificar este asunto, es necesario realizar experimentos que nos permitan establecer si la mutante *los2* conserva su actividad catalítica y si ésta es importante para la función que desempeña en el tonoplasto.

#### **10.4 ¿Es un complejo proteico el que se encuentra unido al tonoplasto?**

En el trabajo realizado previamente en *M. crystallinum* se demostró la asociación de la aldolasa y de la enolasa a la subunidad B de la V-ATPasa mediante ensayos de inmunoprecipitación (Barkla, et al. 2009). Así mismo, en levadura se ha demostrado la asociación simultánea de la aldolasa a las subunidades a, B y E de la V-ATPasa a través de ensayos de precipitación *in vitro* (Lu, et al. 2004). Mediante su unión con los dominios  $V_1$  y  $V_0$  de la bomba de protones *in vivo*, la enzima regula el ensamblaje y actividad de la bomba de protones (Lu, et al. 2007). De acuerdo con esto, en plantas la adición *in vitro* de aldolasa exógena de planta genera un

incremento de la actividad hidrolítica de la V-ATPasa y de su transporte de protones (Barkla, et al. 2009). Sin embargo, la ausencia de enolasa en el tonoplasto de la mutante *los2* muestra una menor estimulación por aldolasa en la actividad hidrolítica de la bomba (Fig.18), lo que apunta a que la falta de un componente podría afectar el correcto funcionamiento del resto de las proteínas involucradas. No obstante, esta hipótesis no se ve reflejada en el hecho de que la abundancia proteica de la aldolasa, la VHA-B y la VHA-E presente en el tonoplasto no se altere en plantas mutantes *los2* (Fig. 15). Lo que sugiere que el mecanismo es mucho más complejo y que quizá se requiera de una red proteica para que estas enzimas puedan regular la actividad de la V-ATPasa.

## 11. CONCLUSIONES.

- Las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa están asociadas al tonoplasto de *A. thaliana*.
- La aldolasa, la enolasa y la VHA-B son reguladas positivamente por exposición a 75 mM de NaCl por 4 días.
- La enolasa está unida débilmente al tonoplasto de *A. thaliana*, mientras que la aldolasa, la VHA-B y la VHA-E están fuertemente unidas.
- La mutante *los2* muestra mayor sensibilidad al tratamiento con sal, tanto en plantas adultas como en plántulas germinadas en presencia de 75 mM de NaCl.
- Bajo exposición a sal, las plantas mutantes *los2* acumulan mayores concentraciones de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en los tejidos aéreos, que plantas de tipo silvestre.
- En la mutante *los2*, la abundancia de la proteína enolasa disminuye bajo exposición a 75 mM de NaCl por 4 días. Lo que no afecta la presencia y/o la abundancia del resto de las proteínas probadas.
- La exposición a 75 mM de NaCl y la adición de aldolasa estimulan la actividad hidrolítica de la V-ATPasa, tanto en plantas silvestres como en la mutante *los2*. Sin embargo, la actividad hidrolítica en la mutante *los2* expuesta a sal, es significativamente menor a la actividad observada en plantas control expuestas a las mismas condiciones.
- La integridad de las membranas, así como la distribución de los cloroplastos se ve afectada en la mutante *los2* expuesta a sal.
- Las plantas mutantes *Salk\_080758* con inserción de T-DNA en el gen *At2g36530* que codifica para la aldolasa, no muestran un fenotipo distinto al de plantas de tipo silvestre.

## 12. PERSPECTIVAS.

Con el fin de caracterizar a fondo la presencia de las enzimas glicolíticas aldolasa y enolasa en el tonoplasto de *A. tahaliana* es necesario realizar estudios de inmunoprecipitación que nos permitan determinar su asociación con diversas subunidades de la V-ATPasa y nos conduzcan a confirmar si, al igual que ocurre en *M. crystallinum*, la aldolasa y la enolasa se encuentran unidas a la subunidad B de la bomba de protones. Así mismo, se requiere de estudios que nos permitan determinar la interacción directa entre ambas enzimas glicolíticas.

Dado que el estudio realizado con la mutante *los2* deja muchas interrogantes respecto a la función de la enolasa en la respuesta y tolerancia a la salinidad, como primer paso es importante determinar si la enolasa de la mutante *los2* conserva su actividad catalítica, pues ello nos permitiría tener una idea clara de la importancia de dicha actividad y de la diversidad funcional de la enzima. Para ello se propone la expresión de la enolasa mutante *LOS2* en levadura, su purificación y su estudio enzimático. Otro punto prioritario en la investigación es el estudio de la unión de la enolasa con la V-ATPasa en la mutante *los2*, por lo que se propone investigar la presencia de las enzimas aldolasa y enolasa en tonoplasto de las plantas de tipo silvestre y de tipo mutante *los2* mediante inmunolocalización en microscopía. Esto nos permitiría determinar si la estabilidad de la unión es afectada por la mutación y complementar nuestros estudios para determinar la posible función alterna de la enolasa y la participación de los procesos glicolíticos en ello. Así mismo, sería conveniente realizar construcciones en levadura con la enolasa para determinar mediante ensayos de dos híbridos su posible interacción con otras proteínas, tales como las proteínas Bor o la 14-3-3. Para complementar estudios realizados en este trabajo, es importante medir el transporte de protones de la V-ATPasa en vesículas selladas de tonoplasto de plantas *los2* y de tipo silvestre, mediante ensayos de disminución de la fluorescencia utilizando la quinacrina. Pues esto nos permitiría establecer el nivel al que se afecta la actividad de la bomba de protones en la mutante *los2* bajo condiciones de estrés salino. Así como determinar el contenido de antocianinas en plántulas *los2* crecidas bajo estrés salino para establecer una afectación en su acumulación y aportar evidencia sobre la integridad de la vacuola.

Por otro lado, para comenzar el estudio de la aldolasa es necesario corroborar el número de inserciones de T-DNA en la mutante *Salk\_080758*, mediante ensayos tipo "Southern Blot", determinar la actividad catalítica de la aldolasa y la actividad hidrolítica de la V-ATPasa en las mutantes *Salk\_080758* y someter a la mutante de aldolasa, *Salk\_080750*, a distintos estreses con el fin de revelar si en alguna condición existe un fenotipo. Sin embargo, tendríamos que obtener una mutante múltiple de los genes de aldolasa para estudiar su fenotipo bajo estrés salino o trabajar con otra especie vegetal que presente pocas isoenzimas para la aldolasa.



### 13. BIBLIOGRAFÍA.

- Ahuatzi, D., Herrero, P., de la Cera, T., & Moreno, F. (2004). The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. *J. Biol. Chem.* 279:14440-14446.
- Ahuatzi, D., Riera, A., Pelaez, R., Herrero, P. & Moreno, F. (2007). Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. *J. Biol. Chem.* 282:4485–4493.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T.J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C. & Ecker, J. R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653–657.
- Ames, B.N. (1966). Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.* 8: 115–118.
- Amtmann, A. & Sanders, D. (1998). Mechanisms of Na<sup>+</sup> uptake by plant cells. *Adv Bot Res.* 29:76–112.
- Anderson, L. E. & Levin, D. A. (1970). Chloroplast aldolase is controlled by a nuclear gene. *Plant Physiol.* 46: 819-820.
- Anderson, L. E., Li, A. D. & Stevens, F. J. (1998). The enolase of ice plant and *Arabidopsis* contain a potential disulphide and are redox sensitive. *Phytochemistry.* 47: 707-713.
- Anderson, L. E., Ringenber, M. R., Brown, V. K. & Carol, A. A. (2005). Both chloroplastic and cytosolic phosphofructoaldolase isozymes are present in the pea leaf nucleus. *Protoplasma.* 225: 235–242
- Apse, M. P., Sottosanto, J. B. & Blumwald, E. (2003). Vacuolar cation/H<sup>+</sup> exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the *Arabidopsis* vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Plant J.* 36: 229-239.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 22:195-201.
- Ayala, F., O'Leary, J. W. & Schumaker, K. S. (1996). Increased vacuolar and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activities in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *J. Exp. Bot.* 47:25-32.
- Bai, Z. G., Dent, D. L., Olsson, L. & Schaeppman, M. E. (2008). Global assessment

- of land degradation and improvement 1: identification by remote sensing. Report 2008/01, FAO/ISRIC – Rome/Wageningen.
- Barkla, J. B., Zingarelli, L., Blumwald, E. & Smith, A. C. (1995).** Tonoplast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity and its energization by the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* 109: 549-556.
- Barkla, J. B., Vera-Estrella, R., Camacho-Emiterio, J. & Pantoja, O. (2002).** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* is associated with cellular sites of Na<sup>+</sup> storage. *Func. Plant Biol.* 29:1017-1024.
- Barkla, J. B., Vera-Estrella, R., Hernández-Coronado, M. & Pantoja, O. (2009).** Quantitative Proteomics of Free Flow Zonal Electrophoresis Tonoplast Fractions from the Halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* Reveals Novel Associations and Functions of Glycolytic Enzymes in Plant Salt Tolerance. *Plant Cell.* 21:4044-4058.
- Bartels, D. & Sunkar, R. (2005).** Drought and Salt Tolerance in Plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24:23-58.
- Batelli, G., Verslues, P. E., Agius, F., Qiu, Q., Fujii, H., Pan, S., Schumaker, K. S., Grillo, S. & Zhu, J-K. (2007).** SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and upregulating its transport activity. *Mol. Cell Biol.* 27:7781–7790.
- Binzel, M. & Ratajczak, R. (2002).** Functions of membrane transport systems under salinity: tonoplast. En *Salinity: environment-plants-molecules. A. Lauchli & U. Luttge (editores), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands.* Págs. 423-450.
- Blakeley, S. D., Dekroon, C., Cole, K. P., Kraml, M. & Dennis, D. T. (1994).** Isolation of a full-length cDNA encoding cytosolic enolase from *Ricinus communis*. *Plant Physiol.* 105: 455-456.
- Blumwald, E., Aharon, G. S. & Apse, M. P. (2000).** Sodium transport in plant cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1465:140-151
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
- Brown, D., Paunescu, T. G., Breton, S. & Marshansky, V. (2009).** Regulation of the V-ATPase in kidney epithelial cells: dual role in acid-base homeostasis and vesicle trafficking. *J Exp Biol.* 212: 1762-1772
- Campanella, M. E., Chu, H. & Low, P. S. (2005).** Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. *PNAS.* 102: 2402-2407.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E.L., Girke, T., & Raikhel, N.V. (2004).** The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and

- unexpected proteins. *Plant Cell*. 16: 3285–3303.
- Chalker-Scott L. (1999).** Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem. Photobiol.* 70:1-9.
- Chaput, M., Claes, V., Portetelle, D., Cludts, I., Cravador, A., Burny, A., Gras, H. & Tartar, A. (1988).** The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase. *Nature*. 332:454-455.
- Chen, S. H., Bubb, M. R., Yarmola, E. G., Zuo, J., Jiang, J., Lee, B. S., Lu M; Gluck, S. L., Hurst, I. R. & Holliday, L. S. (2004).** Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase binding to microfilaments: regulation in response to phosphatidylinositol 3-kinase activity and detailed characterization of the actin-binding site in subunit B. *J. Biol. Chem.* 279:7988-7998.
- Chevalier, D., Morris, E. R. & Walker, J. C. (2009).** 14-3-3 and FHA domains mediate phosphoprotein interactions. *Annu Rev Plant Biol.* 60: 67–91.
- Cho, Y.-H., Yoo, S.-D. & Sheen, J. (2006).** Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signalling. *Cell*. 127, 579–589.
- Clausen, C., Ilkavets, I., Thomson, R., Philippar, K., Vojta, A., Möhlmann, T., Neuhaus, E., Fulgosi, H. & Soll, J. (2004).** Intracellular localization of VDAC proteins in plants. *Planta*. 220: 30–37.
- Cushman, J.C., Tillett, R.L., Wood, J.A., Branco, J.M. & Schlauch K. A. (2008).** Large-scale mRNA expression profiling in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*, performing C3 photosynthesis and Crassulacean acid metabolism (CAM). *J Experimental Botany*. 59:1875-1894.
- Danial, N. N., Gramm, C. F., Scorrano, L., Zhang, C. Y., Krauss, S., Ranger, A. M., Datta, S. R., Greenberg, M. E., Licklider, L. J., Lowell, B. B., Gygi, S. P. & Korsmeyer, S. J. (2003).** BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*. 424:952-956.
- Dannelly, H. K., Duclos, B., Cozzone, A.J. & Reeves, H. C. (1989).** Phosphorylation of *Escherichia coli* enolase. *Biochemie*. 71:1095-1100.
- Decker, B. L. & Wickner, W. T. (2006).** Enolase activates homotypic vacuole fusion and protein transport to the vacuole in yeast. *J. Biol. Chem.* 281: 14523–14528.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. & Hicks, J.B. (1983).** A plant DNA miniprep: version 2. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-22.
- Dhar-Chowdhury, P., Malestera, B., Rajacica, P., & Coetzee, W.A. (2007).** The regulation of ion channels and transporters by glycolytically derived ATP. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 3069–3083.
- Duan, H., Ding, X., Song, J., Duan, Z., Zhou, Y. & Zhou C. (2009).** Effects of kanamycin on growth and development of *Arabidopsis thaliana* seedling, cotyledon and leaf. *Pakistan. J. Bot.* 41: 1611-1618.

- Endler, A., Reiland, S., Gerrits, B., Schmidt, U.G., Baginsky, S., & Martinoia, E. (2009).** In vivo phosphorylation sites of barley tonoplast proteins identified by a phosphoproteomic approach. *Proteomics* 9:310–321.
- FAO. (2008).** FAO Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>.
- Flechner, A., Gross, W., Martin, W. F. & Schnarrenberger, C. (1999).** Chloroplast class I and class II aldolases are bifunctional for fructose-1,6-biphosphate and sedoheptulose-1,7-biphosphate cleavage in the Calvin cycle. *FEBS letters*. 447: 200-202.
- Fletcher, L., Ridder, C. C. & Taylor, C. B. (1976).** Enolase isoenzymes. III. Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase. *Biochim Biophys Acta*. 452:245-252
- Fukuda, A., Nakamura, A., Tagiri, A., Tanaka, H., Miyao, A., Hirochika, H. & Tanaka, Y. (2004).** Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from rice. *Plant Cell Physiol*. 45:146-59.
- Forsthoefel, N.R., Cushman, M.A. & Cushman, J. C. (1995).** Posttranscriptional and posttranslational control of enolase expression in the facultative crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol*. 108: 1185-1 195
- Forgac, M. (2007).** Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 8:917-29
- Fricke, W. (1997).** Cell turgor, osmotic pressure and water potential in the upper epidermis of barley leaves in relation to cell location and in response to NaCl and air humidity. *J. Exp. Botany*. 48:45–58.
- Gancedo, C., & Flores, C. L. (2008).** Moonlighting proteins in yeasts *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72:197-210.
- Gaxiola, R. A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S. L., & Fink, G.R. (1999).** The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *PNAS*. 96:1480-1485.
- Gebert, M., Meschenmoser, K., Svidová, S., Weghuber, J., Schweyen, R., Eifler, K., Lenz, H., Weyand, K. & Knoop, V. (2004).** A Root-Expressed Magnesium Transporter of the *MRS2/MGT* Gene Family in *Arabidopsis thaliana* Allows for Growth in Low-Mg<sup>2+</sup> Environments. *Plant Cell*. 21: 4018-4030.
- Giegé, P., Heazlewood, J.L., Roessner-Tunali, U., Millar, A.H., Fernie, A.R., Leaver, C.J. & Sweetlove, L.J. (2003).** Enzymes of Glycolysis Are Functionally Associated with the Mitochondrion in *Arabidopsis* Cells. *Plant Cell*. 15: 2140–2151.
- Gosti, F., Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A. A. R., Vartanian, N. & Giraudat, J. (1999).** ABI1 Protein Phosphatase 2C Is a Negative Regulator of Abscisic

- Acid Signaling. *Plant Cell*. 11:1897–1909.
- Gottlieb, D. L. (1982).** Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science*. 216: 373-380.
- Graham, J. W. A., Williams, T. C. R., Morgan, M., Fernie, A. R., Ratcliffe, R. G. & Sweetlove, L. J. (2007).** Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. *Plant Cell*. 19: 3723-3738.
- Guex, N. & Peitsch, M. C. (1997).** Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.
- Halfter, U., Ishitani, M. & Zhu, J. K. (2000).** The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *PNAS*. 97:3735-3740.
- Hatefi, Y. & Hanstein, W. G. (1974).** Destabilization of membranes with chaotropic ions. *Method Enzymol*. 31: 770-790.
- Herbette, S., Taconnat, L., Hugouvieux, V., Piette, L., Magniette, M-L. M., Cuine, S., Auroy, P., Richaud, P., Forestier, C., Bourguignon, J., Renou, J-P., Vavasseur, A. & Leonhardt, N. (2006).** Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of Arabidopsis roots and shoots. *Biochimie*. 88:1751-65.
- Hittinger, C.T. & Carroll, S. B. (2007).** Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. *Nature*. 449:677-681.
- Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. (1938).** The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Exp. Stn. Circ.* 347: 1-39.
- Huber, E., Bäumert, H.G., Spatz-Kümbel, G. & Schubert, D. (1996).** Associations between erythrocyte band 3 protein and aldolase in detergent solution. Determining their stoichiometry by analytical ultracentrifugation, *Eur. J. Biochem*. 242: 293–300.
- Hüther, F. J., Psarros, N. & Duschner, H. (1999).** Isolation, characterization, and inhibition kinetics of Enolase from *Streptococcus rattus* FA-1. *Infect. Immun*. 1043-1047.
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C. S., Shi, W. & Zhu, J. K. (2000).** SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell*. 12: 1667-1678.
- Iida, H. & Yahara, I. (1985).** Yeast heat-shock protein of Mr 48,000 is an isoprotein of enolase. *Nature*. 315: 688-690.
- Jeffery, C. J. (1999).** Moonlighting Proteins. *Trends Biochem Sci*. 24:8-11.
- Jeffery C.J. (2004).** Moonlighting proteins:Complications and implications for proteomics research. *Drug Discov Today: TARGETS*. 3:71-78.
- Kang, H. J., Jung, S-K., Kim, S. J. & Chung, S. J. (2008).** Structure of human  $\alpha$ -enolase (hENO1), a multifunctional glycolytic enzyme. *Biol. Crystal*. D64:

651-657.

- Kabala, K. & Klobus, G. (2008).** Modification of vacuolar proton pumps in cucumber roots under salt stress. *Plant Physiol.* 165:1830-1837.
- Kane, P. M., Yamashiro, C. T. & Stevens, T. H. (1989).** Biochemical characterization of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 264:19236-19244.
- Kennedy, M. C., Mende-Mueller, L., Blondin G. A. & Beinert, H. (1992).** Purification and characterization of cytosolic aconitase from beef liver and its relationship to the iron-responsive element binding protein. *PNAS.* 89:11730-11734.
- Keutgen, A. J. & Pawelzic, E. (2008).** Impacts of NaCl stress on plant growth and mineral nutrient assimilation in two cultivars of strawberry. *Env. and Exp. Botany.* doi:10.1016/j.envexpbot.2008.08.002
- Khandelwal, A., Chandu, D., Roe, C. M., Kopan, R & Quatrano, R. S. (2007).** Moonlighting activity of presenilin in plants is independent of gamma-secretase and evolutionarily conserved. *PNAS.* 104:13337-13342.
- Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L. & Schwede, T. (2009).** The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 37: D387-D392.
- Kim, J. W. & Dang, C. V. (2005).** Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci.* 30:142-150.
- Kluge, C., Seidel, T., Bolte, S., Sharma, S., Hanitzsch, M., Satiat-Jeunemaitre, B., Ross, J., Sauer, M., Goldack, D. & Dietz, K. J. (2004).** Subcellular distribution of the V-ATPase complex in plant cells, and in vivo localisation of the 100 kDa subunit VHA-a within the complex. *BMC Cell Biol.* 5: 29.
- Klychnikov, O.I., Li, K.W., Lill, H. & de Boer, A.H. (2007).** The V-ATPase from etiolated barley (*Hordeum vulgare* L.) shoots is activated by blue light and interacts with 14-3-3 proteins. *J. Exp. Bot.* 58:1013-1023.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lal, S. K., Lee, C. & Sachs, M. M. (1998).** Differential regulation of enolase during anaerobiosis in maize. *Plant physiol.* 118: 1285-1293.
- Lebherz, H. G., Leadbetter, M. M. & Bradshaw, R. A. (1984).** Isolation and characterization of the cytosolic and chloroplast forms of spinach leaf fructose diphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.* 259:1011-1017.
- Lee, H., Guo, Y., Ohta, M., Xiong, L., Stevenson, B. & Zhu, J. K. (2002).** *los2*, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *EMBO J.* 21, 2692-2702.
- Lehninger, A., Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2004).** Lehninger: Principles of Biochemistry. Cuarta edición. W. H. Freeman Company. EU.
- Lichtenthaler, H. K. (1987).** Chlorophylls and carotenoids: pigments of

- photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148:350-382.
- Lichtenthaler, H. K. & Buschmann, C. (2001).** Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Curr. Prot. Food Anal. Chem.* F4.3.1-F4.3.8.
- Liu, G. S., Chen, S., Chen, J. & Wang, X.C. (2004).** Identification of the phosphorylation site of the V-ATPase subunit a in maize roots. *Acta Bot. Sin.* 46:428–435.
- Lu, M., Sautin, Y., Holliday, S. & Gluck, S. L. (2004).** The glycolytic enzyme aldolase mediates assembly, expression and activity of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 279: 8732–8739.
- Lu, M., Ammar, D., Ives, H., Albrecht, F. & Gluck, S. L. (2007).** Physical interaction between aldolase and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase is essential for the assembly and activity of the proton pump. *J. Biol. Chem.* 282: 24495–24503.
- Mahajan, S., Pandey, G. K. & Tuteja, N. (2008).** Calcium and salt stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Arch Biochem Biophys.* 471:146–158.
- Marsh, J. J. & Lebherz, H. G. (1992).** Fructose-biphosphate aldolases: an evolutionary history. *Trends Biochem. Sci.* 17:110–113.
- Matschinsky, F. M. & Ellerman, J. E. (1968).** Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. *J Biol Chem.* 243:2730-2736.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J. I., Ward, J. M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I. N., Amtmann, A., Maathuis, F. J. M. & Sanders D. (2001).** Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiology.* 126:1646-1667.
- McAlister, L. & Holland, M. J. (1982).** Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. *JBC.* 257: 7181-7188.
- Merzendorfer, H., Graf, R., Huss, M., Harvey, W.R. & Wiczorek, H. (1997).** Regulation of proton-translocating V-ATPases. *J. Exp. Bio.* 200:225–235.
- Meyer-Siegler, K., Mauro, D.J., Seal, G., Wurzer, J., deRiel, J.K. & Sirover, M.A. (1991).** A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *PNAS.* 88:8460-8464.
- Miernyk, J. A. & Dennis, D.T. (1992).** A developmental analysis of the enolase isozymes from *Ricinus communis*. *Plant Physiol.* 99:748–750.
- Miki, B. & McHugh, S. (2004).** Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol.* 107:193-232.
- Moller, I. S. & Tester, M. (2007).** Salinity tolerance of Arabidopsis: a good model for cereals? *Trends Plant Sci.* 12:534-540.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W-H., Liu, Y-X., Hwang, I., Jones, T. & Sheen, J. (2003).** Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science.* 300: 332-336.
- Moore, B. (2004).** Bifunctional and moonlighting enzymes: lighting the way to

- regulatory control. *Trends Plant Sci.* 9:221-228.
- Morita, T., Kawamoto, H., Mizota, T., Inada, T. & Aiba, H. (2004).** Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 54: 1063-1075.
- Munns, R., Passioura, J. B., Guo, J., Chazen, O. & Cramer, G. R. (2000).** Water relations and leaf expansion: importance of time scale. *J. Exp. Bot.* 51: 1495–1504.
- Munns, R. (2002).** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25:239-50.
- Munns, R. & Tester, M. (2008).** Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:651–81.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* 15:473–479.
- Nakagawa, T., Hirano, Y., Inomata, A., Yokota, S., Miyachi, K., Kaneda, M., Umeda, M., Furukawa, K., Omata, S. & Horigome, T. (2003).** Participation of a fusogenic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in nuclear membrane assembly. *J. Biol. Chem.* 278:20395-20404.
- Narahari, J., Ma, R., Wang, M. & Walden, W. E. (2000).** The aconitase function of iron regulatory protein 1: genetic studies in yeast implicate its role in iron-mediated redox regulation. *J Biol Chem.* 275:16227-16234.
- Narasimhan, M. L., Binzel, M. L., Perez-Prat, E., Chen, Z., Nelson, D. E., Singh, N. K., Bressan, R. A. & Hasegawa, P. M. (1991).** NaCl regulation of tonoplast ATPase 70-kilodalton subunit mRNA in tobacco cells. *Plant Physiol.* 97: 562-568
- Nass, R., Cunningham, K. W. & Rao, R. (1997).** Intracellular sequestration of sodium by a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272:26145–26152.
- Nelson, D.E., Glaunsinger, B. & Bohnert, H.J. (1997).** Abundant accumulation of the calcium-binding molecular chaperone calreticulin in specific floral tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 114:29–37.
- O'Malley, R. C., Alonso, J. M., Kim, C. J., Lisse, T. J. & Ecker, J. R. (2007).** An adapter ligation-mediated PCR method for high-throughput mapping of T-DNA inserts in the *Arabidopsis* genome. *Nat. Protoc.* 2: 2910–2917.
- Ozimek, P. R., van Dijk, K., Latchev, C., Gancedo, D. Y., Wang, I. J., van der Klei, & M. Veenhuis. (2003).** Pyruvate carboxylase is an essential protein in the assembly of yeast peroxisomal oligomeric alcohol oxidase. *Mol. Biol. Cell.* 14:786-797.
- Páez-Valencia, J., Valencia-Mayoral, P., Sanchez-Gomez, C., Contreras-Ramos, A., Hernandez-Lucas, I., Martinez-Barajas, E. & Gamboa-DeBuen, A., (2008).** Identification of Fructose-1,6-bisphosphate aldolase cytosolic class I



- as an NMH7 MADS domain associated protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 376: 700–705.
- Pagliari, L. & Taylor, D. L. (1988).** Aldolase exists in both the fluid and solid phases of cytoplasm. *J. Cell Biol.* 107: 981 - 991.
- Pandey, G. K., Cheong, Y. H., Kim, B. G., Grant, J. J., Li, L. & Luan, S. (2007).** CIPK9, a calcium sensor-interacting protein kinase required for low-potassium tolerance in *Arabidopsis*. *Cell Res.* 17:411–421.
- Parry, M. A., Andralojc, P. J., Khan, S., Lea, P.J. & Keys, A. J. (1989).** Rubisco Activity: Effects of Drought Stress. *Ann Bot.* 89: 833-839
- Peitsch, M. C. (1995).** Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology.* 13: 658-660.
- Philpott, C.C., Klausner, R.D. & Rouault, T.A. (1994).** The bifunctional iron-responsive element binding protein/cytosolic aconitase: the role of active-site residues in ligand binding and regulation. *PNAS.* 91:7321-7325.
- Plaxton, W. C. (1996).** The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:185–214.
- Prabhakar, V., Löttgert, T., Gigolashvili, T., Bell, K., Flügge, U. & Häusler, R. E. (2009).** Molecular and functional characterization of the plastid-localized phosphoenolpyruvate enolase (ENO1) from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* doi:10.1016/j.febslet.2009.02.017
- Putney, L. K., Denker, S. P. & Barber, D. L. (2002).** The changing face of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 42:527–552.
- Quintero, F. J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J-K. & Pardo. J. M. (2002).** Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na<sup>+</sup> homeostasis. *PNAS.* 99:9061-9066.
- Ratajczak, R., Richter, J. & Luttge, U. (1994).** Adaptation of the tonoplast V-type H<sup>+</sup>-ATPase of *Mesembryanthemum crystallinum* to salt stress, C3-CAM transition and plant age. *Plant, Cell and Env.* 17:1101 -1112.
- Riccardi, F., Gazeau, P., de Viene, D. & Zivy, M. (1998).** Protein changes in response to progressive water deficit in maize. *Plant Physiol.* 117: 1253-1263.
- Rodríguez-Rosales, M. P., Jiang, X. J., Gálvez, F. J., Aranda, M. N., Cubero, B. & Venema, K. (2008).** Overexpression of the tomato K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. *New Phytol.* 179:366-77.
- Rodríguez-Rosales, M. P., Gálvez, F. J., Huertas, R., Aranda, N. R., Baghour, M., Cagnac, O. & Venema, K. (2009).** Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signal Behav.* 4:265-276.
- Rolland, F., Moore, B. & Sheen, J. (2002).** Sugar Sensing and Signaling in Plants. *Plant Cell.* 14: S185-S205.
- Ronai, Z. (1993).** Glycolytic enzymes as DNA binding proteins. *Int. J. Biochem.*

25:1073–1076.

- Rubio, F., Gassmann, W., Schroeder, J. I. (1995).** Sodium-Driven Potassium Uptake by the Plant Potassium Transporter HKT1 and Mutations Conferring Salt Tolerance. *Science* 270:1660-1663.
- Rutter, W. J. (1964).** Evolution of aldolase. *Fed. Proc.* 23:1248-1257.
- Sawa, A., Khan, A., Hester, L.D. & Synder, S.H. (1997).** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *PNAS.* 94:11669-11674.
- Schmidt, U.G., Endler, A., Schelbert, S., Brunner, A., Schnell, M., Neuhaus, H.E., Marty-Mazars, D., Marty, F., Baginsky, S. & Martinoia, E. (2007).** Novel tonoplast transporters identified using a proteomic approach with vacuoles isolated from cauliflower buds. *Plant Physiol.* 145: 216–229.
- Schmidt M, Luff M, Mollwo A, Kaminski M, Mittag M, Kreimer G (2007).** Evidence for a specialized localization of the chloroplast ATP-synthase subunits alpha, beta, and gamma in the eyespot apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlorophyceae*). *J Phycol.* 43: 284–294.
- SEMARNAP. (1999).** Evaluación de la degradación del suelo causada por el hombre. Inventario Nacional de Suelos, Dirección General de Restauración y Conservación de Suelos. [www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/312/sueloedo.html](http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/312/sueloedo.html)
- Seol, J. H., Shevchenko, A., Shevchenko, A. & Deshaies, R. J. (2001).** Skp1 forms multiple protein complexes, including RAVE, a regulator of V-ATPase assembly. *Nature Cell Biol.* 3:384-391.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. & Zhu, J. K. (2000).** The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *PNAS.* 97:6896-6901.
- Shi, H. & Zhu, J. K. (2002).** Regulation of expression of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene AtNHX1 by salt stress and ABA. *Plant Mol Biol.* 50:543-550.
- Smardon, A. M., Tarsio, M. & Kane, P. M. (2002).** The RAVE complex is essential for stable assembly of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 277:13831-13839.
- Sobhanian, H., Motamed, N., Jazii, F.R., Nakamura, T. & Komatsu, S. (2010).** Salt Stress Induced Differential Proteome and Metabolome Response in the Shoots of *Aeluropus lagopoides* (Poaceae), a Halophyte C4 Plant. *J. Prot. Res.* 9:2882-2897.
- Somerville, C. & Koornneef, M. (2002).** A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant. *Nat. Rev. Genet.* 3:883–889.
- Su, Y., Zhou, A., Al-Lamki, R. S. & Karet, F. E. (2003).** The "a" subunit of the V-type H<sup>+</sup>-ATPase interacts with phosphofructokinase-1 in humans. *J Biol Chem* 278: 20013–20018.

- Sugahara, T., Shimizu, S., Abiru, M., Matsuoka, S. & Sasaki, T. (1998).** A novel function of enolase from rabbit muscle; an immunoglobulin production stimulating factor. *Bioche. Biophys. Acta.* 1380:163-176.
- Suzuki, M., Hashioka, A., Mimura, T. & Ashihara, H. (2005).** Salt stress and glycolytic regulation in suspension-cultured cells of the mangrove tree, *Bruguiera sexángula*. *Physiol Plantarum.* 123: 246–253.
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yonneyama, T. & Fujiwara, T. (2002).** Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature.* 420: 337–340.
- Tester, M. & Davenport, R. (2003).** Na<sup>+</sup> Tolerance and Na<sup>+</sup> Transport in Higher Plants. *Ann. Bot.* 91: 503-527.
- Tsiantis, M. S., Bartholomew, D. M. & Smith, A. C. (1996).** Salt regulation of transcript levels for the c subunit of a leaf vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J.* 9:729-736
- Tsutsumi, K., Kagaya, Y., Hidakab, S., Suzuki, J., Tokairin, Y., Hirai, T., Hua, D., Ishikawa, K. & Ejiri, S. (1994).** Structural analysis of the chloroplastic and cytoplasmic aldolase-encoding genes implicated the occurrence of multiple loci in rice. *Gene.* 141: 215-220.
- UNEP. (2002).** GEO:Global Environment Outlook 3. Past, present and future perspectives. [mwww-cger.nies.go.jp/geo/geo3/index.htm](http://mwww-cger.nies.go.jp/geo/geo3/index.htm)
- Van der Kop, D. A. M., Schuyer, M., Pinas, J. E., Van der Zaal, B. J. & Hooykaas, J. J. (1999).** Selection of *Arabidopsis* mutants overexpressing genes driven by the promoter of an auxin-inducible glutathione S-transferase gene. *Plant Mol. Biol.* 39: 979–990.
- Vasilyeva, E., Liu, Q., MacLeod, K.J., Baleja, J. D. & Forgac, M. (2000).** Cysteine Scanning Mutagenesis of the Noncatalytic Nucleotide Binding Site of the Yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 275: 255-260.
- Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., Bohnert, H. J., Pantoja, O. (1999).** Salt stress in *Mesembryanthemum crystallinum* L. cell suspensions activates adaptive mechanisms similar to those observed in the whole plant. *Planta.* 207: 426-435
- Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., García-Ramírez, L. & Pantoja, O. (2005).** Salt Stress in *Thellungiella halophila* Activates Na<sup>+</sup> Transport Mechanisms Required for Salinity Tolerance. *Plant Physiol.* 139: 1507-1517.
- Villalba, J. M., Palmgren, M. G., Berberian, G. E., Ferguson, C. & Serrano, R. (1992).** Functional expression of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in yeast endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 267: 12341–12349-
- Vitavska, O., Merzendorfer, H. & Wiczorek, H. (2005).** The V-ATPase subunit C binds to polymeric F-actin as well as to monomeric G-actin and induces cross-linking to actin filaments. *J. Biol. Chem.* 280:1070-1076.

- Wagner, G. J. (1979).** Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiol.* 64: 88-93.
- Wang, B., Lüttge, U. & Ratajczak, R. (2001).** Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa* *J. Exp. Bot.* 52:2355-2365.
- Ward, J. M., Reinders, A., Hsu, H. T. & Andsze, H. (1992).** Dissociation and reassembly of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase complex from oat roots. *Plant Physiol.* 99, 161-169.
- Watanabe, H., Takehana, K., Date, M., Shinozaki, T. & Raz, A. (1996).** Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Res.* 56:2960-2963.
- Weigel, D. & Glazebrook, J. (2006).** Kanamycin Selection of Transformed Arabidopsis. *Cold Spring Harb. Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot4669
- Wiederhold, E., Gandhi, T., Permentier, H.P., Breitling, R., Poolman, B. & Slotboom, D.J. (2009).** The yeast vacuolar membrane proteome. *Mol. Cell. Proteomics.* 8: 380–392.
- Wistow, G. & Piatigorsky, J. (1987).** Recruitment of enzymes as lens structural proteins. *Science.* 236:1554.
- Xiong, L., Schumaker, K. & Zhu, J.-K. (2002).** Cell signaling during cold, drought and salt stress. *Plant Cell.* 14:S165-S183.
- Xu, W., Seiter, K., Feldman, E., Ahmed, T. & Chiao J.W. (1996).** The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase. *Blood.* 87: 4502-4506.
- Yamada, S., Komori, T., Hashimoto, A., Kuwata, S., Imaseki, H. & Kubo, T. (2000).** Differential expression of plastidic aldolase gene in *Nicotiana* plants under salt stress. *Plant Sci.* 154:61-69.
- Yokoi, S., Quintero, F.J., Cubero, B., Ruiz, M. T., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. & Pardo, J. M. (2002).** Differential expression and function of Arabidopsis thaliana NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *Plant Journal* 30:529–539.
- Yoshida, K., Kawachi, M., Mori, M., Maeshima, M., Kondo, M., Nishimura, M. & Kondo, T. (2005).** The involvement of tonoplast proton pumps and Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchangers in the change of petal colour during flower opening of Morning Glory, *Ipomea tricolor* cv. Heavenly Blue. *Plant Cell Physiol.* 46:407-15.
- Yuan, W., Tuttle, D.L., Shi, Y.J., Ralph, G.S. & Dunn, W.A. (1997).** Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the alpha-subunit of phosphofructokinase. *J. Cell Sci.* 110:1935-1945.
- Zelenaya-Troitskaya, O., Perlman, P. S. & Butow, R. A. (1995).** An enzyme in yeast mitochondria that catalyzes a step in branched-chain amino acid

biosynthesis also functions in mitochondrial DNA stability. *EMBO J.* 14: 3268-3276.

**Zhang, J., Vasilyeva, E., Feng, Y. & Forgac, M. (1995).** Inhibition and labeling of the coated vesicle V-ATPase by 2-azido-[<sup>32</sup>P]ATP. *J Biol Chem.* 270:15494-15500.

**Zhu, J. K. (2003).** Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Plant Biol.* 6:441-445.