



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN SUBCITOPLASMÁTICA DE LAS
PIROFOSFATAS INORGÁNICAS SOLUBLES DE *Arabidopsis thaliana*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

FRANCISCA MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Sonia Vázquez Santana
Facultad de Ciencias

Dr. Eleazar Martínez Barajas
Facultad de Química

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

enero, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento de los proyectos de investigación otorgados por:

CONACyT INFRA-2015-01 252001.

PAPIIT-DGAPA-UNAM IN216815.

PAIP-FQ-UNAM (04290-09) y (5000-9122)

LANCAD-UNAM-DGTIC SC16-1-IR-111 Y 2017-215

También gracias el financiamiento otorgado por CONACyT para realizar los estudios de doctorado a través de la beca: 269392.

Gracias al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), que mediante su financiamiento fue posible presentar este trabajo en un congreso.

ÍNDICE

1. ABSTRACT.....	1
2. RESUMEN.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
4. ANTECEDENTES.....	8
4.1. El pirofosfato.....	8
4.2. Las pirofosfatasas.....	10
4.2.1. Las pirofosfatasas de H ⁺	11
4.2.2. Pirofosfatasas pertenecientes a la superfamilia deshalogenasa de haloácido.....	13
4.2.3. Pirofosfatasas inorgánicas solubles.....	14
4.3. Función de las pirofosfatasas inorgánicas en plantas.....	17
4.4. Pirofosfatasas en Arabidopsis.....	20
4.4.1. Pirofosfatasas inorgánicas solubles en Arabidopsis.....	21
4.5. Localización subcelular de las pirofosfatasas inorgánicas solubles.....	25
5. HIPÓTESIS.....	29
6. OBJETIVO GENERAL.....	30
7. OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
8.1. Selección y crecimiento de plantas transgénicas.....	31
8.2. SDS-PAGE – <i>Inmunoblot</i>	32
8.3. Análisis y separación mediante cromatografía.....	33
8.4. Actividad pirofosfatasa.....	34

8.5. Microscopia confocal de fluorescencia	35
8.6. Inmunocitoquímica con partículas de oro	37
8.7. Transformación por biobalística.....	38
8.8. Inmunoprecipitación de proteínas.....	39
8.9. Medición de fluorescencia de Chl a fotosistema 2 (PS II) en hojas de plantas de <i>A. thaliana</i>	41
9. RESULTADOS.....	42
9.1. Selección de plantas transformadas.....	42
9.2. Cromatografía y análisis de la actividad pirofosfatasa de las transformantes.....	44
9.3. Localización citoplasmática de las isoformas uno, cinco y seis de las pirofosfatasas inorgánicas solubles en plantas de 14 días de edad	51
9.4. Localización citoplasmática de las isoformas uno, dos, tres y cinco de la pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>A. thaliana</i> a los 28 días de edad...	53
9.5. Inmunolocalización de las isoformas uno, dos, tres y cinco de la pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>A. thaliana</i>	60
9.6. Expresión transitoria de AtPPa1-CFP en epidermis de cebolla.....	63
9.7. Localización subcelular de la isoforma cuatro de pirofosfatasas inorgánicas solubles de <i>A. thaliana</i>	64
9.8. Localización subcelular de la isoforma seis de pirofosfatasas inorgánicas solubles de <i>A. thaliana in vivo</i>	70
9.8.1. Alteración de la morfología de los cloroplastos en plantas de Arabidopsis transformadas con la construcción 35S::AtPPa6-YFP	72

9.8.2. Análisis del fotosistema 2 de plantas transformadas AtPPa4-CFP y AtPPa6-YFP	74
9.9. Localización celular de las isoformas cuatro, cinco y seis en raíces de <i>A. thaliana</i>	75
9.10. Inmunoprecipitación de las isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles de <i>A. thaliana</i>	79
10. DISCUSIÓN	85
11. CONCLUSIONES	103
12. PERSPECTIVAS	104
13. ARTÍCULOS PUBLICADOS	107
14. REFERENCIAS	108
ANEXOS.....	125

ABREVIATURAS

Abreviatura Significado

PPi	Pirofosfato inorgánico
Pi	Fosfato inorgánico
PPasa	Pirofosfatasas inorgánicas
PPa	Pirofosfatasa inorgánica soluble
H ⁺ -PPasa	Pirofosfatasa inorgánica de protones
HAD	Superfamilia de halogenasa de haloácido
PS2	Phosphate-Starvation 2 pirofosfatasa
PPv	Pirofosfatasa de protones vacuolar
AtPPa1	Pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>Arabidopsis thaliana</i> isoforma 1
AtPPa2	Pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>Arabidopsis thaliana</i> isoforma 2
AtPPa3	Pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>Arabidopsis thaliana</i> isoforma 3
AtPPa4	Pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>Arabidopsis thaliana</i> isoforma 4
AtPPa5	Pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>Arabidopsis thaliana</i> isoforma 5
AtPPa6	Pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>Arabidopsis thaliana</i> isoforma 6
NTP	Nucleótidos trifosfatados
NMP	Nucleótidos monofosfatados
CFP	Proteína cian fluorescente
YFP	Proteína amarilla fluorescente
GFP	Proteína verde fluorescente
ddg	Días después de la germinación
uf	Unidades de fluorescencia
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
PS II	Fotosistema II
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (High-performance liquid chromatography)

1. **ABSTRACT**

The pyrophosphate (PPi) is very important during the development of a plant. It is generated in key processes of the cell, in addition to participate as a donor of energy. The hydrolysis of the pyrophosphate (PPi) to inorganic phosphate (Pi) is catalyzed by the inorganic pyrophosphatases (PPases) and this work is focused on the soluble forms (PPa; EC 3.6.1.1). PPa are present in all cellular organisms and their involvement in the metabolism of carbohydrates has been proposed, although its specific contribution is still under discussion. On the other hand, a phylogenetic analysis conducted with representatives of the various groups of organisms in Viridiplantae (true plants) found two or more PPa present in all taxa of terrestrial plants. In *Arabidopsis*, there are six isoforms of PPa, (called AtPPa1 to AtPPa6). Isoforms 1 to 5 are classified as prokaryote-type, and are considered to be cytoplasmic, while the eukaryote-type isoform is considered chloroplastic.

In this work, the subcellular localization of the different isoforms of soluble inorganic pyrophosphatases from *Arabidopsis thaliana* was studied by confocal and transmission electron microscopy, using transgenic plants that express a PPa as a C-terminal fusion to a fluorescent protein (CFP or YFP), and under the control of the CAMV 35S. According to the evidence, the AtPPa2 and AtPPa3 isoforms have a cytoplasmic localization, with a perivacuolar distribution, while the AtPPa1 isoform presents a cytoplasmic distribution closer to the nucleus. The AtPPa5 was also a cytoplasmic isoform, but it tends to appear close to the chloroplasts (but not within). In contrast, the intrachloroplastic location of isoform AtPPa6 was

corroborated *in vivo*. On the other hand, AtPPa4 isoform in addition to its localization in the cytoplasm was found in the cell wall and in the intercellular space. This is the first report of an isoform of PPa located at the cell wall and intercellular space. However, its role in these compartments is unclear, and is probably related to the very active metabolism of apoplast and cell walls during development. The pyrophosphatase activity of crude extracts after chromatographic fractionation revealed no significant differences in the profile of the transgenic plants, as compared to the wild type. Pull-down experiments revealed the association of some isoforms of PPa with enzymes of primary metabolism. This result suggests an association perhaps related to the regulation of the metabolism of carbohydrates. Future studies will be needed to explore this and other possibilities.

2. RESUMEN

El pirofosfato (PPi) es muy importante en el desarrollo de las plantas, ya que se genera en procesos vitales en la célula, además de participar como donador de energía. La hidrólisis del pirofosfato (PPi) a fosfato inorgánico (Pi) es catalizada por las pirofosfatasas inorgánicas (PPasas) y este trabajo se enfoca en las formas solubles (PPa; EC 3.6.1.1). Las PPa están presentes en todos los organismos. Se ha propuesto que participan en el metabolismo de carbohidratos, aunque su contribución específica aún está en discusión. Por otro lado, un análisis filogenético realizado con representantes de los diversos grupos de organismos en Viridiplantae (plantas verdaderas) encontró a dos o más PPa presentes en todos los taxa de plantas. En *Arabidopsis* se encuentran seis isoformas de PPa, (denominadas AtPPa1 a AtPPa6), de las cuáles las isoformas 1 a 5 se clasifican de tipo procarionte, y son consideradas citoplasmáticas y una de tipo eucarionte, considerada cloroplástica.

En este trabajo, la localización subcelular de las diferentes isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles de *Arabidopsis thaliana* se realizó mediante microscopía confocal y electrónica de transmisión, con plantas transgénicas que expresan una PPa fusionada en el C-terminal a una proteína fluorescente (CFP O YFP), bajo el control del promotor 35S. La evidencia indicó que las isoformas AtPPa2 y AtPPa3 tienen una localización citoplasmática con una distribución perivacuolar, mientras que la isoforma AtPPa1 presenta una distribución citoplasmática cercana al núcleo y la isoforma AtPPa5 también citoplasmática,

cerca de los cloroplastos (aunque no dentro). En contraste, la ubicación intracloroplástica de la isoforma AtPPa6 fue corroborada *in vivo*. Por otro lado, la isoforma AtPPa4 además de su localización en el citoplasma, se encontró en la pared celular y en el espacio intercelular. Esta es la primera vez que se reporta la presencia de una isoforma de PPa en la pared celular y el espacio intercelular. Su función en dichos compartimentos no es clara, pero en el apoplasto o la pared celular hay un metabolismo muy activo. La actividad pirofosfatasa del fraccionamiento cromatográfico no reveló diferencias importantes en el perfil de las plantas transgénicas, respecto de la planta silvestre. Experimentos de inmunoprecipitación revelaron la asociación de algunas isoformas de PPa con enzimas del metabolismo primario. Este resultado sugiere que dicha asociación podría relacionarse con la regulación del metabolismo de carbohidratos. Se requerirán más estudios futuros para explorar dicha posibilidad.

3. INTRODUCCIÓN

El pirofosfato (PPi) es un compuesto que se produce en forma activa durante el desarrollo de las células y se genera como subproducto de la biosíntesis de carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Kornberg, 1962). El PPi está presente de manera abundante en el citoplasma de las plantas y en condiciones de estrés sus concentraciones varían muy poco (Weiner et al, 1987; Dancer et al, 1990; Huang et al, 2008).

El PPi es hidrolizado a dos moléculas de ortofosfato mediante la reacción catalizada por las pirofosfatasas (PPasa). Estas enzimas son altamente específicas para el PPi como sustrato (Sivula et al, 1999; Navarro de la Sancha et al, 2007). En las plantas, existen tres grupos de PPasa: (i) las pirofosfatasas de protones (H^+ -PPasa), (ii) las pirofosfatasas inorgánicas solubles (PPa) y (iii) las pertenecientes a la superfamilia de deshalogenasa de haloácido (HAD), también conocidas como PS2 (*phosphate-starvation 2*) en plantas. En el caso específico de las PPa, este es el único grupo que se subdivide en dos familias (familia I y familia II), dependiendo de su especificidad por el catión. En el presente trabajo se estudiaron las pirofosfatasas inorgánicas solubles de la familia I, las cuales usan como activador fisiológico al Mg^{2+} . Esta familia se encuentra ampliamente distribuida, pero su estructura cuaternaria varía en los diversos grupos filogenéticos (Teplyakov et al, 1994; Baykov et al, 1995), en el caso específico de las plantas son monómeros (Gómez-García, et al, 2006; Navarro de la Sancha et al, 2007).

Además de su función primaria en la hidrólisis de pirofosfato, a las enzimas pirofosfatasas se les ha relacionado con un papel en la regulación de la homeostasis de PPI en la célula, pero aún no está claro si en plantas cumplen funciones adicionales, aunque sí influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas, por lo que otras posibles funciones aún están en discusión (Ferjani et al, 2011; Osorio et al, 2013; Li et al, 2014).

Se conoce poco sobre el papel específico de las PPa, sin embargo las pirofosfatasas de H⁺ vacuolar (PPv) han sido ampliamente estudiadas y se conoce que tienen relevancia en la tolerancia a estrés salino, hídrico, por deficiencia de fosfato, entre otros (Gaxiola et al, 2011). Para las PPa se ignora su relevancia en la regulación del desarrollo (Hernández-Domínguez et al, 2012), aunque la hidrólisis del pirofosfato es necesaria debido a que genera un impulso termodinámico y se sabe que su total ausencia resulta letal en levaduras y bacterias (Lundin et al, 1991). En plantas, la pérdida de la expresión de las PPa tiene efectos negativos durante el desarrollo (Ferjani et al, 2011; Perales Baños, 2008; DeVillafranca-Casas, 2011). En *A. thaliana*, se han identificado seis genes que codifican para isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles de la familia I denominadas AtPPa1 a AtPPa6. En base al análisis *in vitro*, en cloroplastos aislados donde se observa la internalización de la isoforma se ha propuesto a la isoforma AtPPa6 como la isoforma de cloroplasto (Schulze et al, 2004), aunque no se ha comprobado su localización *in vivo* y no es claro si es exclusivamente cloroplástica o puede localizarse también en citoplasma y/o mitocondrias. Esta isoforma es la única verdaderamente esencial para la supervivencia de la planta (George et al, 2010) y parece ser la que aporta la mayor proporción de la actividad

extraíble (Weiner et al, 1987). AtPPa6 presenta una relación filogenética con las PPa catalogadas como de tipo eucarionte, en contraste con las restantes isoformas que están más emparentadas con las proteínas consideradas como de origen procarionte (Gómez-García et al, 2006; Hernández-Domínguez et al, 2012). Respecto a la localización subcelular de las otras cinco isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles (AtPPa1-AtPPa5), se ha propuesto que podrían ser citoplasmáticas (Öztürk et al, 2014), sin embargo, debido a que los autores usaron un sistema heterólogo y no se reportan muchos detalles de la distribución en el citoplasma hace falta evidencia más detallada que indique las diferencias en la distribución subcitoplasmática de las isoformas.

En el presente trabajo confirmamos la localización cloroplástica de la isoforma AtPPa6 y presentamos evidencia de la localización extracelular de la isoforma AtPPa4, además de proveer más detalle sobre la localización subcitoplasmática de las diferentes isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles de tipo procarionte en *A. thaliana in vivo*.

4. ANTECEDENTES

4.1. *El pirofosfato*

El Pirofosfato (PPi; Fig. 1) es un compuesto muy importante en los organismos, se forma como subproducto de la biosíntesis de macromoléculas del metabolismo ya sea del ADN, ARN, carbohidratos, lípidos, proteínas y de metabolitos secundarios como carotenos (Kornberg, 1962; Nelson y Cox, 2009; Plaxton, 2011). El PPi se descubrió alrededor del siglo 19 (Heinonen, 2001) y se describió por primera vez como una molécula de sistemas biológicos por Cori y colaboradores en 1941, quienes encontraron que durante la conversión de fructosa a glucosa en el hígado de rata se formaban como intermediarios la fructosa-1-fosfato y el PPi (Cori et al, 1951). Posteriormente Kornberg, en 1948, describe por primera vez el papel que juega el PPi en la síntesis del ATP a partir de NAD⁺ y PPi, en extracto de levadura (Heinonen, 2001). Sin embargo, no fue hasta mediados de los años ochenta que Stitt y colaboradores (1988) describieron por primera vez el papel del PPi en la vía de síntesis de los carbohidratos en las plantas.

El PPi se puede formar *in vitro* por la condensación de dos grupos fosfato y se sintetiza a partir de sales de sodio y potasio de ortofosfato (Heinonen, 2001). La reacción de la hidrólisis del pirofosfato es altamente exergónica, el ΔG^0 de la hidrólisis calculado en condiciones fisiológicas intracelulares de células de plantas se estimó en -23.7 kJ/mol, la cuál superó al ΔG^0 de hidrólisis del ATP (Davies et al, 1993). Por esta razón las reacciones de biosíntesis acopladas a la hidrólisis

posterior de PPI, se consideran reacciones irreversibles (Kornberg, 1962). Se han descrito aproximadamente 197 reacciones metabólicas en las cuales se produce PPI y Heinonen (2001) las ha clasificado en 5 categorías de acuerdo a cada reacción en el metabolismo: (i) síntesis y modificación de macromoléculas y pared celular (71 reacciones); (ii) síntesis de moléculas pequeñas (58 reacciones); (iii) síntesis y oxidación de lípidos (40 reacciones); (iv) regulación del metabolismo (13 reacciones); (v) otras funciones o funciones desconocidas (8 reacciones).

La producción del pirofosfato (PPI) es mayor durante el desarrollo de las plantas (Kornberg, 1962). A pesar de la presencia de pirofosfatasas activas en las células vegetales y en contraste con los tejidos animales, la acumulación de PPI en las células animales es de 0.02 mM, mientras que en las células vegetales alcanza concentraciones de hasta 0.3 mM y tiende a permanecer constante (Weiner et al, 1987; Heinonen, 2001). Además, se ha observado que bajo condiciones de estrés, las concentraciones de PPI en la célula vegetal cambia sutilmente (Dancer et al, 1990; Huang et al, 2008). En plantas transgénicas en las que el metabolismo de PPI fue alterado por la expresión de una pirofosfatasa inorgánica soluble de *E. coli*, se observan cambios en el crecimiento de la planta, los cuales están aparentemente relacionados con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos (Farré et al, 2001; Farré et al, 2006). Además, se ha propuesto que el PPI puede actuar como un donador de energía en diversos organismos y que se puede sintetizar activamente a expensas del transporte de electrones mitocondrial (Mansurova, 1989; Heinonen, 2001).

4.2. *Las pirofosfatasas*

Las pirofosfatasas (PPasa; EC 3.6.1.1) catalizan la hidrólisis del pirofosfato a dos moléculas ortofosfato (Fig. 1). Estas enzimas son esenciales en el metabolismo, ya que regulan la concentración del pirofosfato para que las reacciones no se vuelvan irreversibles. Existen tres grupos principales de PPasa: (i) las pirofosfatasas de protones (H^+ -PPasa), (ii) las pirofosfatasas inorgánicas solubles (PPa) y (iii) las pertenecientes a la superfamilia de la deshalogenasa de haloácido (HAD).

Una característica general de todas las pirofosfatasas es que utilizan cationes divalentes activadores; el Magnesio (Mg^{2+}) participa como activador fisiológico para la mayoría de las pirofosfatasas pertenecientes a estos grupos (Weiner et al, 1987; Zyryanov et al, 2002; Teplyakov et al, 1994; Chanson and Pilet, 1998; May et al, 2011), aunque en el caso de las pirofosfatasas pertenecientes a la superfamilia de la deshalogenasa de haloácido, (HAD), el Mg^{2+} no es esencial para la actividad (May et al, 2011). A las pirofosfatasas se les ha relacionado con la regulación de la homeostasis de PPI, sin embargo, aún no está claro si presentan otras funciones, y claramente juegan un papel importante en el metabolismo de la célula.

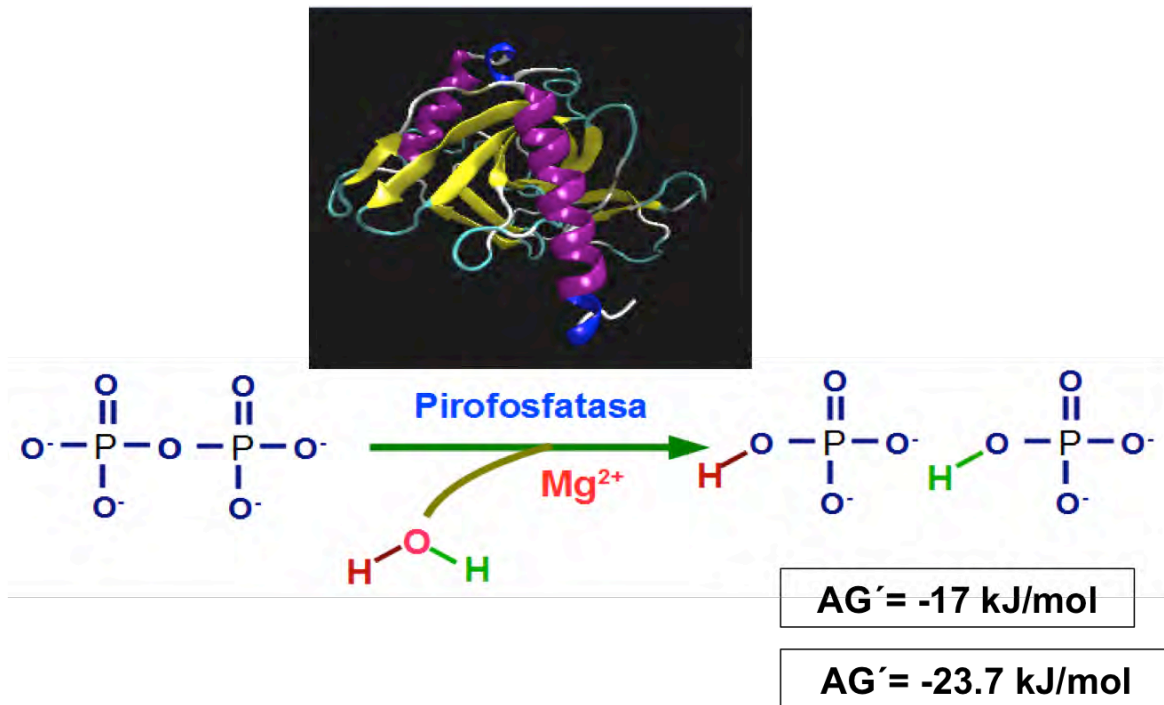


Figura 1. Hidrólisis del pirofosfato. Reacción catalizada por las pirofosfatasas mediante la hidrólisis de una molécula de pirofosfosfato a dos moléculas de ortofosfato. Las pirofosfatasas utilizan un catión divalente como activador, en este caso la pirofosfatasa inorgánica soluble utiliza el Mg^{2+} . Esta reacción es altamente exergónica. El valor de $\Delta G' = -17 \text{ kJ/mol}$ de la hidrólisis de PPI equivale a las condiciones simuladas en hígado de ratón *in vivo*; El valor $\Delta G' = -23.7 \text{ kJ/mol}$ en la hidrólisis de PPI, equivale al cálculo matemático predicho, imitando las condiciones del citoplasma de las células vegetales (Heinonen, 2001).

4.2.1. Las pirofosfatasas de H^+

Las pirofosfatasas inorgánicas de protones (H^+ -PPasas; Fig. 2), son un grupo de pirofosfatasas altamente hidrofóbicas que se encuentran embebidas en la membrana. Están relacionadas con la obtención de energía mediante la hidrólisis del pirofosfato, así como el transporte de protones a través de la membrana acoplado a la energía de la hidrólisis de PPI (Maeshima et al, 1991; Lundin et al, 1992; Gould and Winget, 1973). Son homodiméricas y se ha reportado que se

localizan en las membranas celular, vacuolar, aparato de Golgi, lisosomas y en los acidocalcinomas dependiendo del organismo (Pérez-Catiñeira et al, 2011; Serrano et al, 2007). Las H⁺- PPasas se encuentran ampliamente distribuidas en todos los dominios de la vida. Principalmente se han estudiado en las plantas, en los eucariontes fotosintéticos y en las bacterias fotosintéticas, pero no en los hongos (Serrano et al, 2007). Las H⁺- pirofosfatasas de plantas han sido ampliamente estudiadas, tienen aproximadamente 85 % de identidad en su secuencia de aminoácidos, se encuentran localizadas en la membrana plasmática, el aparato de Golgi, tonoplasto y en la membrana del xilema (Gaxiola et al, 2007; Páez-Valencia et al, 2011; Maeshima et al, 1991; Mitsuda et al, 2001). En plantas se encuentran dos tipos de PPasas de H⁺, tipo 1 y tipo 2, las cuales difieren en su sensibilidad al K⁺, sin embargo ambos tipos requieren de Mg²⁺ como activador esencial (Gaxiola et al, 2007). El papel de la PPasa de H⁺ en plantas ha sido ampliamente estudiada y se ha analizado a detalle la función de la enzima, para lo cuál se han utilizado plantas mutantes que carecen o que sobreexpresan a la PPasa de H⁺ vacuolar (AVP1) de *A. thaliana* principalmente y se ha observado que esta enzima tiene un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo (Gaxiola et al, 2007).

Se ha reportado que en plantas de Arabidopsis que sobreexpresan AVP1 hay un aumento en la división celular, hiperplasia e incremento en el transporte de auxinas, además, se observa una mayor tolerancia a estrés hídrico y salino, tolerancia a deficiencia de nutrientes como Pi y N, así como cambios en la morfología (Li et al 2005; Gaxiola et al, 2007; Li et al, 2008; Li et al, 2014; Zhang et al, 2011). Aparte la AVP1 también participa en el transporte activo de nitratos (Krebs et al, 2010), además, se ha observado que la expresión de la PPasa de H⁺

vacuolar de arroz aumenta en condiciones de anoxia (Liu et al, 2010). Por otra parte en mutantes nulas *avp1-1* se observa una alteración en el desarrollo de la planta y de la raíz, además de que se reduce el transporte de auxinas (Gaxiola et al, 2007). Sin embargo, estos resultados han sido recientemente cuestionados porque las mutantes empleadas en algunos de estos trabajos (*fugu5-1*) presentan una segunda mutación en una proteína involucrada en translocación polarizada de los transportadores membranales de células de la raíz (Kriegel et al, 2015).

4.2.2. Pirofosfatasas pertenecientes a la superfamilia deshalogenasa de haloácido

Las pirofosfatasas pertenecientes a la superfamilia deshalogenasa de haloácido conocidas como PS2 (Fig. 2), pertenecen a un grupo muy amplio de fosfatasas de esta superfamilia, reconocen al PPI como sustrato específico, (Bennett et al, 1973; May et al, 2011; Huang et al, 2011) y utilizan Mg^{2+} como activador, una característica de la mayoría de las pirofosfatasas, aunque en este caso no es su activador esencial. En *Arabidopsis*, única planta en la que se han estudiado proteínas de esta superfamilia con actividad pirofosfatasa, se encontró como una proteína tetramérica de 120 KDa y se han reportado dos isoformas, mientras que en tomate y otras solanáceas se han reportado tres isoformas. Este grupo de pirofosfatasas fue reportado inicialmente como un gen que estaba sobrepresado en plantas sometidas a estrés por deficiencia de Pi y se había considerado que tenían funciones de fosfatasa ácida (Baldwin et al, 2001), sin embargo en

Arabidopsis se encontró que una proteína de este grupo presentaba actividad pirofosfatasa (May et al. 2011).

4.2.3. Pirofosfatasas inorgánicas solubles

El tercer tipo de pirofosfatasas inorgánicas corresponde a las pirofosfatasas inorgánicas solubles (PPa; Fig. 2). Estas enzimas tienen alta especificidad por el PPI (Sivula et al, 1999; Navarro de la Sancha et al, 2007). En general, se dividen en dos familias basadas en su especificidad por el catión divalente (Cooper, 1992). Corresponden a dos familias no homólogas: la familia I presente en una amplia variedad de organismos y la familia II que se ha encontrado en un número limitado de bacterias y arqueas. Las familias se diferencian en muchas propiedades funcionales. En la familia I, el activador esencial más efectivo y el considerado fisiológico es el Mg^{2+} , y se ha observado que, en presencia de su activador, estas PPa despliegan una especificidad muy alta por el PPI (Zyryanov et al, 2002). En cambio, la familia II utiliza el Mn^{2+} y/o Co^{2+} como activadores esenciales fisiológicos y es en presencia de estos activadores es como adquieren su mayor actividad y una alta especificidad (Young et al, 1998; Shintani, 1998). Sus estructuras tridimensionales y secuencias de aminoácidos son muy diferentes (Salminen et al 2006), sin embargo, el sitio activo parece estar conservado en ambas familias siendo un buen ejemplo de evolución convergente (Fabrichniy et al, 2007).

Dentro de la familia I, se han estudiado principalmente la PPa de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) como prototipo de las de tipo eucarionte, la cual es un homodímero (Teplyakov et al, 1994) y la de *Escherichia coli*, como prototipo procarionte y cuya forma activa es hexamérica (Teplyakov et al, 1994; Baykov et al, 1995). Ambos tipos de enzimas tiene ortólogos en plantas, aunque las enzimas de plantas funcionan como monómeros (Gómez-García et al, 2006; Navarro de la Sancha et al, 2007). Hasta donde se ha explorado, las PPa de la familia I de bacterias y arqueas son homohexámeros con subunidades cuyas masas moleculares se encuentran entre 19 y 22 kDa. Las PPa en eucariontes son homodímeros (como la levadura) o monómeros (como en las plantas) y la masa molecular de la subunidad varía entre 25 y 34 kDa (Fig. 2; Gómez-García et al, 2006).

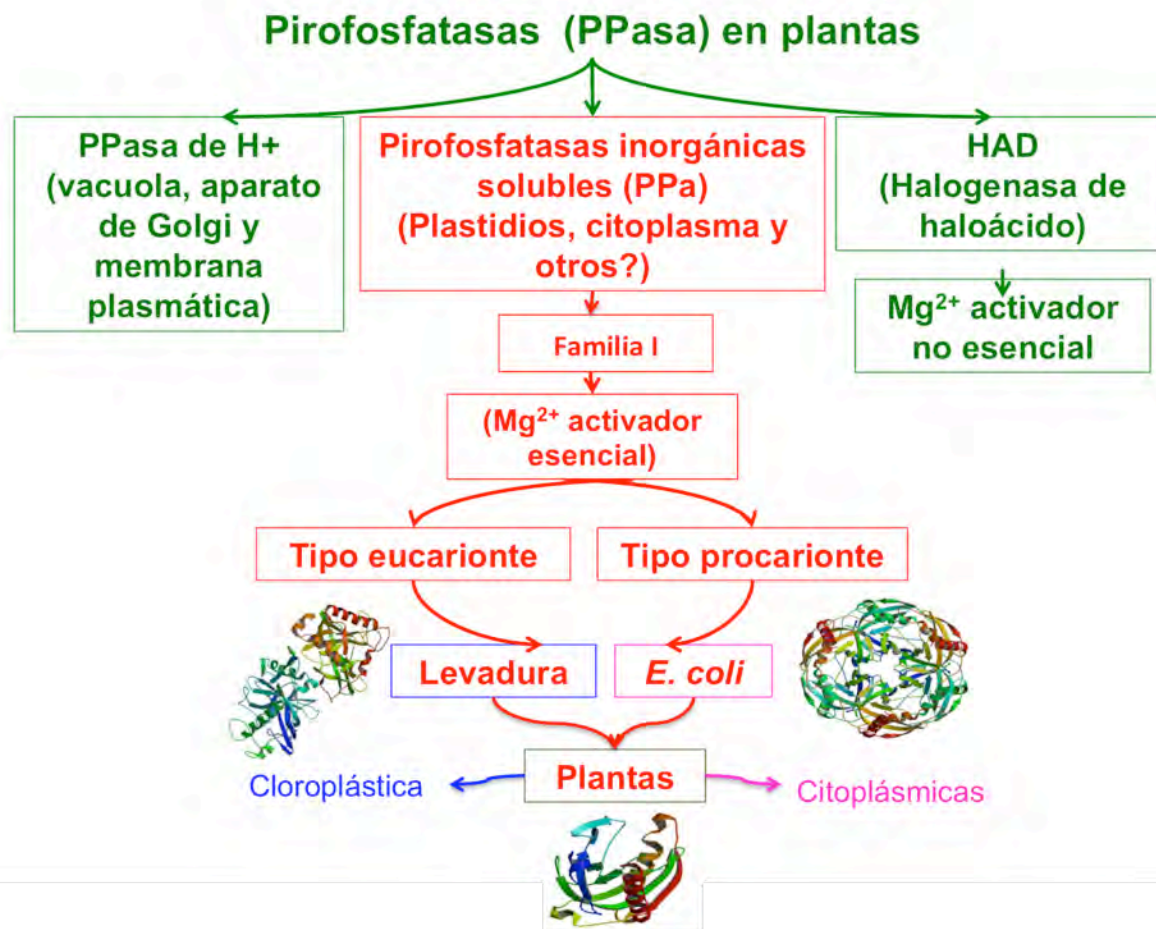


Figura 2. Pirofosfatasas en plantas. En plantas se encuentran tres grupos de pirofosfatasas las pirofosfatasas de protones (PPasa de H⁺), las pirofosfatasas inorgánicas solubles (familia I) y las pirofosfatasas pertenecientes a la superfamilia deshalogenasa de haloácido. Las diferencias entre los grupos radican en su estructura proteica, su localización y su activador esencial. La familia I de pirofosfatasas inorgánicas solubles, utilizan Mg²⁺ como activador esencial y son de estructura monomérica. Adaptado de Gómez-García et al, 2007; Zyryanov et al, 2002; Rantanen et al, 2007; May et al, 2011.

4.3. Función de las pirofosfatasas inorgánicas en plantas

Inicialmente, en una revisión clásica, Kornberg (1962) propuso que la función de las PPa consistía en la eliminación del PPI intracelular. Dado que la hidrólisis de PPI es altamente exergónica, desde el punto de vista metabólico, la reacción catalizada por las PPasa resulta irreversible. Así, la remoción del PPI proporciona un impulso termodinámico a reacciones de biosíntesis asociadas a la conversión de nucleótidos trifosfatados (NTP) en nucleótidos monofosfatados (NMP) y PPI (Kornberg, 1962), dado que en la mayoría de los casos, se trata de reacciones que pueden ocurrir en ambas direcciones, pues su ΔG^0 es cercano a cero en condiciones fisiológicas (Fig. 3).

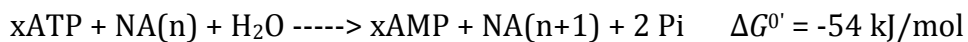
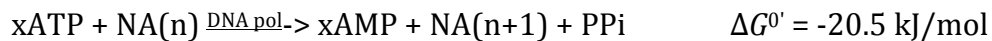


Figura 3. Importancia de la hidrólisis de pirofosfato (PPI) en el bioenergética de la reacción de síntesis de ácidos nucleicos (NA). Cada monómero añadido por la polimerasa (DNA pol) requiere un nucleótido trifosfatado (xATP) y produce un nucleótido monofosfatado más PPI como subproducto, que debe ser hidrolizado a fosfato (Pi), por las pirofosfatasas inorgánicas (PPasa) para desplazar la reacción hacia la formación de polímero.

La figura 3 resume la razón por la que la presencia de las PPasas resulta esencial para la vida (Lundin et al, 1992). Sin embargo, contra lo que se predeciría a partir

del planteamiento anterior, la sobreexpresión de una PPa de *E. coli* en el citosol de plantas transgénicas, sí reduce los niveles de la poza citoplasmática de PPi, pero lejos de estimular el crecimiento, altera la distribución de esqueletos carbonados entre la síntesis de sacarosa en el citosol y de almidón en el cloroplasto, con una subsecuente reducción en el aporte de carbohidratos a los tejidos de demanda (principalmente raíces tallos, flores y frutos), que afecta el desarrollo (Geigenberger et al, 1996). La sobreexpresión de dicha PPa resulta en la acumulación de sacarosa y UDP-glucosa en las hojas, así como en una caída en los niveles de hexosas-fosfato y glicerato-3-fosfato. El incremento de la hidrólisis de PPi también afecta aspectos generales de la actividad de la célula como los niveles de proteína y nucleótidos (Geigenberger et al, 1996).



Figura 4. Importancia de la hidrólisis de pirofosfato (PPi) en formación de precursores para la síntesis de poli- u oligosacáridos (vgr. almidón, sacarosa, fructanas). El precursor (ADP-glc) se forma por transferencia de una glucosa-1-fosfato (glc1P) al carbono de un nucleótido trifosfatado (ATP) y produce PPi como subproducto, que debe ser hidrolizado a fosfato (Pi), por las pirofosfatasas inorgánicas (PPasa) para desplazar la reacción hacia la formación de polímero. La enzima que cataliza la reacción se nombra ADP-glucosa pirofosforilasa por la reacción en el sentido fosforolítico. *Valor tomado y modificado de Boussiengui-Boussiengui, 2005.

Por otro lado, una planta transgénica que expresa el RNA antisentido del mRNA para la ADP-glucosa pirofosforilasa, enzima que participa en la síntesis de almidón

en el cloroplasto y en otros plastidios y que da como subproducto pirofosfato, (Fig. 4), muestra bajos niveles de PPI citoplásmicos, asociado tanto a un incremento en el consumo de PPI y al decremento en su producción. El incremento en el consumo de PPI se explica por un incremento en el recambio de UDP-glucosa, un aumento de la actividad de la fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa dependiente de PPI (PFP) y un incremento en la actividad de la PPv (Farré et al, 2001).

También se ha observado que las plantas transgénicas que expresan ectópicamente (fuera del tonoplasto) la PPv de Arabidopsis (AVP1) toleran más el estrés salino y el estrés hídrico, acompañado del aumento en el número de células, lo que se ve reflejado en el tamaño de las plantas. Estudios sobre el balance iónico demuestran que la sobreexpresión de AVP1 eleva la tasa de intercambio vacuolar de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$, y se observa una acumulación de solutos en la vacuola y retención de agua por la célula (Gaxiola et al, 2002). De hecho, la relación del balance iónico a través del tonoplasto está claramente implicado en la tolerancia de levaduras a la salinidad (Gaxiola et al, 1999) y se ha visto que la expresión de la PPv de *A. thaliana* está regulada por mecanismos de respuesta a estrés salino en plantas (Ligaba and Katsuhara, 2010; Park et al, 2009; Fukuda and Tanaka, 2006). Diversas plantas transgénicas que sobreexpresan proteínas de tipo PPv han mostrado una fuerte correlación entre la actividad de esta proteína en el tonoplasto y la capacidad de la planta para tolerar la sal (Gaxiola et al, 2001; Pasapula et al, 2011; Schilling et al, 2014; Li et al, 2010; Gou et al, 2006; Brini et al, 2007). Sin embargo, tanto las PPa citoplasmáticas, como las PPv, emplean la misma poza de PPI y se desconoce cómo se coordina la actividad de estas dos

proteínas en el metabolismo basal de la planta o, mucho menos, en relación con la tolerancia a condiciones de estrés.

4.4. Pirofosfatasas en *Arabidopsis*

En *A. thaliana* se encuentran genes que codifican tanto para pirofosfatasas inorgánicas solubles como para pirofosfatasas de H^+ . En lo que se refiere a las pirofosfatasas inorgánicas solubles, no hay mucha información sobre la función específica que realizan en la planta, aunque se ha demostrado que podrían estar jugando un papel muy importante en el metabolismo de los carbohidratos (Farré et al, 2001; Geigenberger et al, 1996). Como se discutió antes, las pirofosfatasas de H^+ en *Arabidopsis* participan en el desarrollo y tolerancia a estrés abiótico (Gaxiola et al, 2001), en el transporte de fotosintatos a través del floema y en el metabolismo de carbohidratos (Pizzio et al, 2015; Ferjani et al, 2011). Entre todas las pirofosfatasas, las pirofosfatasas de protones son de las proteínas mejor estudiadas. Mucho menos estudiadas son las pirofosfatasas pertenecientes a la superfamilia de las deshalogenasas de haloácido de las cuales, hasta el momento, se han reportado dos isoformas en *Arabidopsis*, denominadas PS1 y PS2. Su caracterización en *Arabidopsis* es muy reciente y aún no se conoce su función específica (May et al, 2011), pero se sabe que la expresión de la isoforma PS2 es muy baja en condiciones normales y se incrementa notablemente bajo deficiencia de fósforo (Baldwin et al, 2008; Tian et al, 2007; Miura et al, 2005).

4.4.1. Pirofosfatasas inorgánicas solubles en Arabidopsis

En *A. thaliana*, están presentes seis isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles de la familia I. De acuerdo a un estudio de análisis del nivel de expresión de RNAm de las seis isoformas (Fig. 5) obtenidos a partir de la iniciativa TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*), se observó que los genes de las pirofosfatasas presentan una expresión constitutiva en todos los órganos y durante todos los estadios del desarrollo de la planta. Sin embargo, en el caso de la isoforma AtPPa3, la expresión del transcrito es muy baja en los órganos somáticos en estadios tempranos del desarrollo, pero se observa que alcanza su pico máximo de expresión en estadios maduros de la planta, específicamente durante la floración y formación de silicuas, teniendo una mayor expresión en los órganos reproductivos y que nuevamente baja la expresión en la etapa tardía de la reproducción, cuando la semilla ya esta formada (Fig. 5; Navarro de la Sancha, 2009). Estas diferencias en la expresión del RNAm de las pirofosfatasas nos podrían indicar el papel que juega cada una de las isoformas en la planta, sugiriendo que las isoformas no son redundantes.

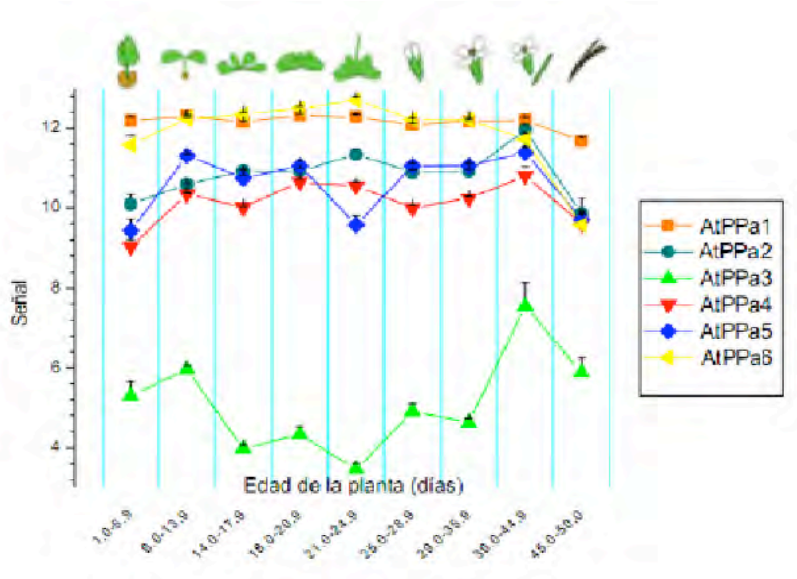


Figura 5. Expresión de las pirofosfatasa inorgánicas solubles en plantas. Nivel de expresión del RNAm de las seis isoformas de AtPPa en los diferentes estados del desarrollo de *A. thaliana* (<http://www.geneninvestigator.ethz/>). Imagen tomada de Navarro-de la Sancha, 2009.

En estudios realizados en el laboratorio del Dr. Rogelio Rodríguez Sotres con plantas de *A. thaliana* que tienen silenciados los genes de las diferentes isoformas de pirofosfatasa inorgánicas solubles, se han observado alteraciones en el fenotipo de la planta, como disminución en el crecimiento, retraso en el desarrollo, mayor número de hojas y silicuas, disminución en la producción de semillas, retardo en la aparición de órganos florales y producción de semillas inviables; lo que sugiere que eliminar la expresión de esta isoforma resulta letal para la planta. Un ejemplo de la producción de semillas inviables es la isoforma seis, de la cuál no se ha logrado seleccionar plantas F1 (Valencia-Turcotte; datos no publicados). En el caso de las mutantes para isoformas de PPa de tipo procarionte, el silenciamiento o la expresión reducida resulta en cambios fenotípicos sutiles pero diferenciales. Por ejemplo, la mutante nula para la isoforma uno y en plantas

mutantes con baja expresión de la isoforma cuatro, se observó, que hay una disminución en el tamaño de los tallos florales y un retardo en el crecimiento. Este fenotipo es más marcado en el caso de la isoforma cuatro (Fig. 6A). Además, la mutante de baja expresión de la isoforma cuatro (no está claro que sea nula) no es fértil y no se producen semillas más allá de la F1, por lo que no se han logrado obtener plantas homocigas (Fig. 6A; Perales-Baños, 2008). En el caso de mutantes silenciadas de la isoforma 2, estas plantas presentan problemas de desarrollo, observándose un retardo en la aparición de los tallos florales con respecto a la variedad silvestre, e incluso con respecto a las mutantes nulas en otras isoformas que también presentan un retraso en el desarrollo (Fig. 6A; De Villafranca-Casas, 2011). Más aún, la mutante silenciada de la isoforma cinco, aunque si tiene un retraso en el desarrollo y una disminución en la longitud del tallo floral, estas plantas también presentan un aumento en el número de tallos y hojas (Fig. 6A; De Villafranca-Casas, 2011). Por otro lado, estas plantas mutantes, se sometieron a diferentes tipos de estrés, como estrés salino, choque térmico, exceso de fosfato y deficiencia de fosfato. En general, todas las plantas mutantes nulas en alguna isoforma de PPa, con las que se ha realizado algún tipo de caracterización, presenta una tolerancia aumentada a estrés abiótico, aunque en diferentes proporciones (Fig. 6B; Perales-Baños, 2008; De Villafranca-Casas, 2011).

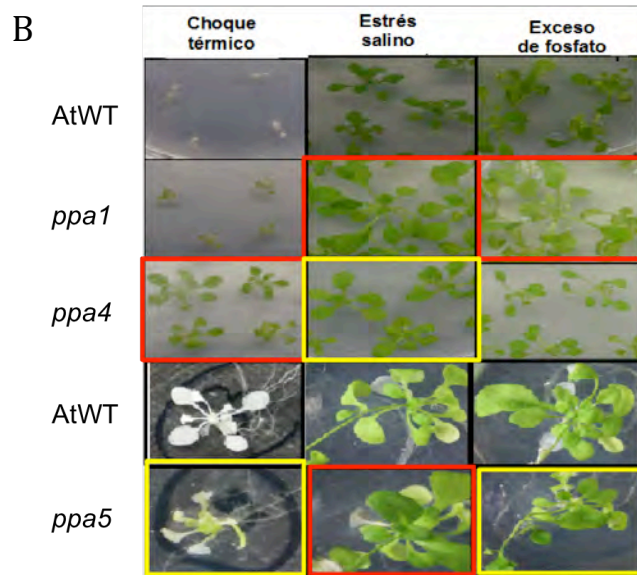
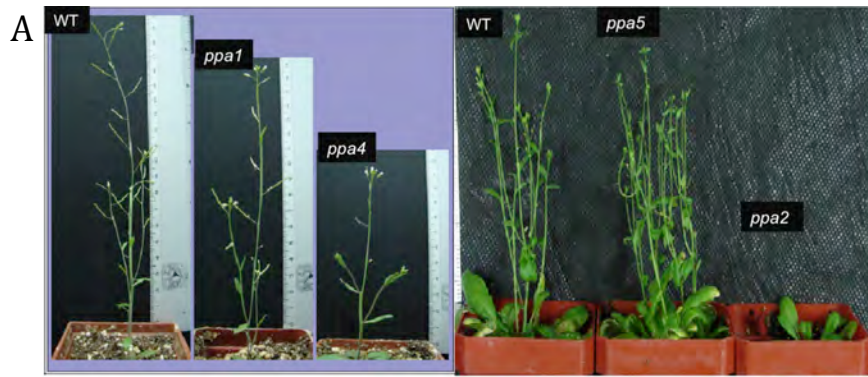


Figura 6. Fenotipos y tolerancia a estrés observados en plantas mutantes de diferentes isoformas pirofosfatasas inorgánicas solubles. En plantas mutantes de Arabidopsis por inserción de T-DNA en genes codificantes para pirofosfatasas inorgánicas solubles, las mutantes de las isoformas uno, dos, cuatro y cinco, presentan cambios en el fenotipo, como aumento en el número de hojas y tallos florales (A). Además, las plantas mutantes también presentan tolerancia diferencial a diferentes tipos de estrés como estrés salino (NaCl, 35 mM), exceso de fosfato (K_2HPO_4 , 2.5 mM) y choque térmico ($45\text{ }^{\circ}C$, 1 h) (B). Las cajas rojas representan una mayor tolerancia al tipo de estrés representado con respecto a las otras mutantes y las cajas amarillas una tolerancia media. (Perales-Baños, 2008; De Villafranca-Casas, 2011)

4.5. Localización subcelular de las pirofosfatasa inorgánicas solubles.

De las seis isoformas de pirofosfatasa inorgánicas solubles de *Arabidopsis*, las isoformas AtPPa1 a AtPPa5 han sido caracterizadas *in silico* y experimentalmente como citoplasmáticas, mientras que AtPPa6 como cloroplástica. Schulze y colaboradores (2004) demostraron que el péptido señal de la isoforma AtPPa6 recombinante era internalizado por los cloroplastos aislados de espinaca (Schulze et al, 2004), y sus propiedades bioquímicas no parecen diferir notoriamente de las que exhiben las isoformas del citoplasma (Navarro de la Sancha et al, 2007). Esta isoforma parece ser esencial para la supervivencia de la planta (George et al, 2010) y paradójicamente, presenta una relación filogenética con las PPa catalogadas como de tipo eucarionte, en contraste con las restantes isoformas que están más emparentadas con las proteínas consideradas como de origen procarionte (Gómez-García et al, 2006; Hernández-Domínguez et al, 2012). A pesar de que se ha demostrado que su péptido de tránsito a cloroplasto es funcional *in vitro* (Schulze et al, 2004), la localización subcelular de esta proteína no ha sido confirmada *in vivo*. En un estudio reciente, en el que se realizó la expresión transitoria de las diferentes isoformas de PPa de *A. thaliana* en plantas de tabaco, se reportó la localización citoplasmática de las isoformas 1 a 5, y la localización cloroplástica de la isoforma seis (Fig. 7), además se propuso la posible localización nuclear de varias de las isoformas, aunque no se aclara cuál o cuáles de las isoformas podrían ser nucleares (Öztürk et al, 2014). En este estudio no se mencionan detalles de la distribución específica de ninguna de las

isoformas, no se demuestra que la isoforma 6 sea exclusiva del cloroplasto y, además, las proteínas fueron expresadas en un sistema heterólogo. En cuanto a raíces no hay reportes previos sobre la localización de las pirofosfatasas inorgánicas solubles, sin embargo Orozco-Neri (2017) encontró diferencias en el proteoma de raíces tanto en condiciones normales como en deficiencia de fósforo en plantas mutantes *ppa4* y plantas sobreexpresoras (35S:AtPPa4-CFP). Este trabajo es el único en donde se explora el papel de las pirofosfatasas en raíces y se desconoce a que se deben esas diferencias. Tanto en hojas como en raíces aún quedan preguntas abiertas que no fueron resueltas.

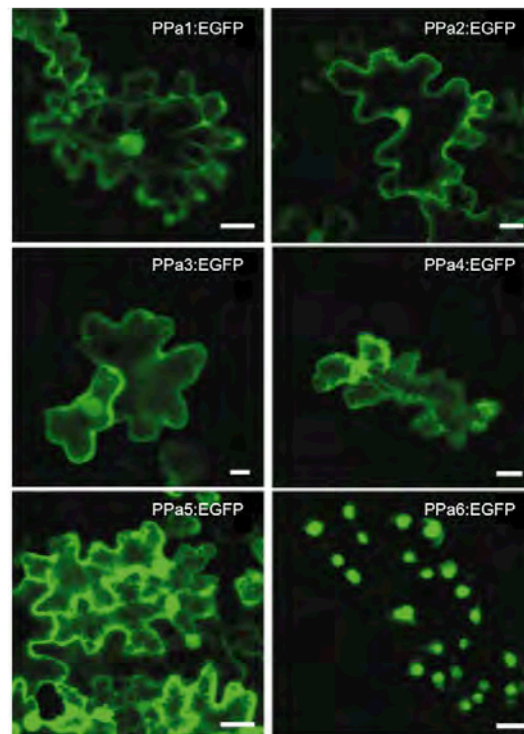


Figura 7 Localización subcelular de las diferentes isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles de *A. thaliana* en células de tabaco transformadas transitoriamente. Imágen tomada de Öztürk et al, 2014.

En un trabajo previo en el laboratorio del Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, se realizó la transformación estable de plantas de *A. thaliana* con la construcción de las proteínas de fusión correspondiente a las seis diferentes isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles de *A. thaliana* fusionadas a proteínas fluorescentes (CFP, YFP y GFP) bajo el control del promotor 35S (Navarro de la Sancha, 2009). Con algunas de las plantas transformadas F1 se realizaron análisis de la posible localización subcelular de las diferentes pirofosfatasas en estas plantas mediante microscopía confocal, aunque estos estudios fueron preliminares, permitieron observar a grandes rasgos la localización diferencial de las pirofosfatasas inorgánicas solubles en las células, y se encontró que la localización subcelular de las isoformas AtPPa1 a AtPPa5 era citoplasmática, aunque con un patrón de distribución diferente (Fig. 8; Navarro de la Sancha, 2009). Sin embargo, tanto en el trabajo de Navarro de la Sancha (2009) como en el de Öztürk y colaboradores (2014) no se había reportado con detalle su distribución específica dentro del citoplasma, además, en los reportes previos sobre la localización de AtPPa6 (Schulze, 2004) no estaba claro si la localización de esta isoforma era exclusivamente en cloroplasto; por lo que era necesario realizar análisis con técnicas más sensibles que permitieran observar con más detalle la distribución de cada una de las isoformas dentro del citoplasma y del cloroplasto. En lo referente a raíces no hay información previa sobre la localización y probable función de las pirofosfatasas inorgánicas solubles, por lo que el estudio de su localización en este órgano resulta novedoso.

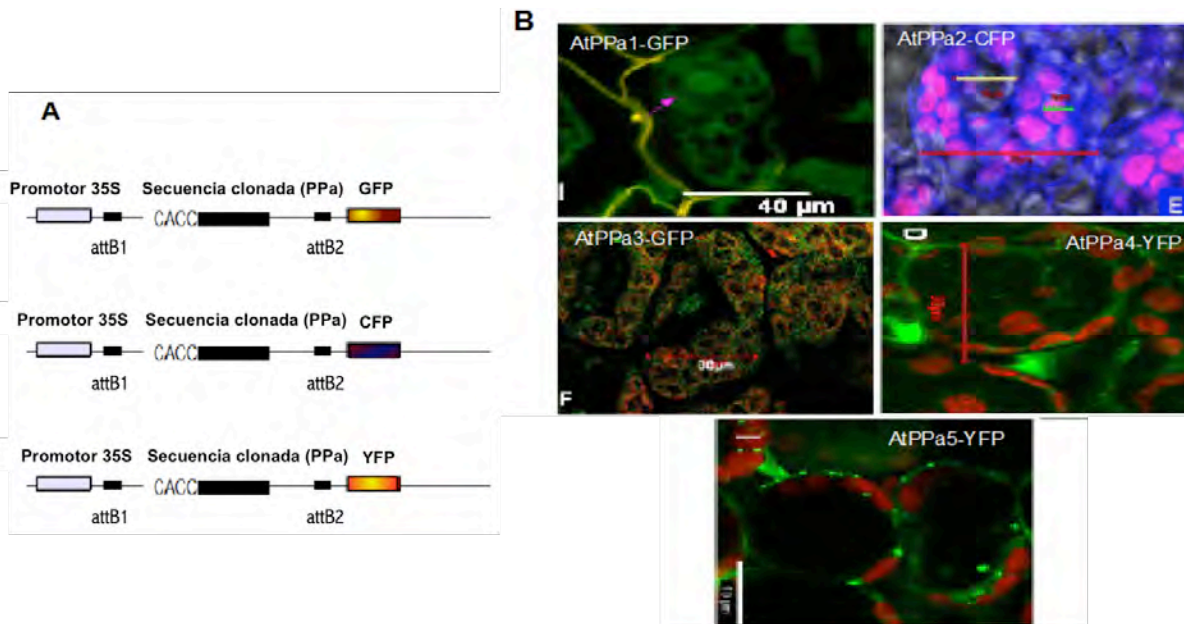


Figura 8. Localización subcelular de las isoformas AtPPa1 a AtPPa5 en Arabidopsis. A) Esquema de la construcción para la expresión de la pirofosfatasa como fusión transcripcional en el C-terminal a una proteína fluorescente B) Localización subcelular de las isoformas AtPPa1-5 en tejido fresco de *A. thaliana* mediante transformación estable (F1). Tomado de Navarro de la Sancha, 2009.

5. HIPÓTESIS

Las isoformas citoplasmáticas de las pirofosfatasas inorgánicas solubles de *Arabidopsis thaliana* presentan una distribución subcelular diferencial y la isoforma seis se encuentra localizada exclusivamente en cloroplasto, dicha distribución podría estar relacionado con la función específica de cada una de las seis isoformas dentro de la célula.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la distribución subcitoplasmática de las pirofosfatasas inorgánicas solubles AtPPa1 a AtPPa5 y confirmar la localización subcelular de la isoforma AtPPa6 *in vivo*.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar la selección de las plantas transgénicas de *A. thaliana* ya existentes que expresan las proteínas de fusión AtPPa1 a AtPPa5 con las proteínas fluorescentes.
- Obtener líneas transgénicas que expresen la proteína de fusión AtPPa6 con la proteína fluorescente.
- Demostrar la expresión de las proteínas de fusión en las plantas transformadas.
- Evaluar la actividad pirofosfatasa de las plantas transformadas con las proteínas de fusión.
- Determinar la distribución subcelular de las diferentes isoformas citoplasmáticas de pirofosfatasas inorgánicas solubles de *A. thaliana*.
- Demostrar la localización de la isoforma seis en cloroplasto *in vivo*.
- Comprobar la localización subcelular de las isoformas AtPPa1 y AtPPa4 en un sistema heterólogo.
- Determinar la distribución de las pirofosfatasas inorgánicas solubles en raíces de *A. thaliana*.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Selección y crecimiento de plantas transgénicas

Las plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo COL-0) con la inserción del transgene de las isoformas uno a seis de pirofosfatasa inorgánica solubles fusionadas a la proteína cian fluorescente (CFP) y amarilla fluorescente (YFP) bajo el control del promotor 35S (Navarro de la Sancha, 2009), se seleccionaron y crecieron hasta recuperar líneas estables. Las semillas de las plantas transgénicas fueron expuestas al herbicida BASTA mediante el método establecido por Harrison et al, 2006. Las transformantes positivas fueron seleccionadas y crecidas *in vitro* y en maceta hasta la edad adulta y hasta obtener la F4. Las semillas se esterilizaron superficialmente con 95 % de etanol (v/v) durante 5 minutos y 20 % de hipoclorito de sodio (comercial) (v/v) durante 5 min. Posteriormente se hicieron seis lavados con agua desionizada estéril y se colocaron en cajas petri con medio MS 0.2x (Murashige and Skoog *basal salts mixture*, PhytoTechnology Laboratories). Las plantas de *Arabidopsis* se colocaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad bajo condiciones controladas de luz y temperatura ($200 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ y a una temperatura de 22°C). Las plantas seleccionadas como material de trabajo fueron las transformantes AtPPa1-CFP (AT1G01050 CDS), AtPPa2-CFP (AT2G18230 CDS), AtPPa3-CFP (AT2G46860 CDS), AtPPa4-CFP (AT3G53620 CDS), AtPPa4-YFP (AT3G53620 CDS) la cual se recuperó hasta F1, AtPPa5-YFP (AT4G01480 CDS) y AtPPa6-YFP (AT5G09650 CDS), que había sido previamente reportada

como una posible isoforma cloroplástica (Schulze et al, 2006). Como control se utilizaron plantas de *A. thaliana* transformadas con 35S:GFP (pMDC83 gatewayTM vector) donadas por la Dra. Patricia Coello Coutiño de la UNAM.

8.2. SDS-PAGE – Inmunoblot

Plantas de *Arabidopsis* de 28 días después de la germinación (ddg) fueron pulverizadas con un homogeneizador FastPrep (Fast-Prep-24 Instrument, MP Biomedicals) utilizando perlas de ceramica (*lysing matrix beads*, Mp Bio Lysing Matrix Tubes, MP Biomedicals). El tejido pulverizado fue colocado en cuatro volúmenes de buffer TRIS-HCl pH 7.5 (Tris-HCl 0.1 M, EDTA 1mM, MgCl₂ 3mM) por gramo de tejido y el inhibidor de proteasas (de acuerdo a las instrucciones del proveedor; Complete, protease inhibitor cocktail tablets, ROCHE). El homogenado fue centrifugado a 13,000 rpm durante 30 min a 4°C. El contenido de proteína se cuantificó mediante el método de Bradford (Biorad) con placas multipozo de 96 pozos con capacidad de 0.25 mL. La separación electroforética de las proteínas se realizó mediante un gel SDS-PAGE 12 %. Para el inmunoblot, las proteínas separadas en un gel de poliacrilamida-SDS fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa usando la solución de Tris 25 mM pH 8.4, con glicina 192 mM, SDS 3.5 mM, metanol 20 % (v/v). Para la inmunodetección se usó el anticuerpo anti-GFP (Santa Cruz, dilución 1/5,000) diluído en una solución de buffer PBS 1x, Tween 1 % y leche 5 %, y se incubó durante toda la noche y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (dilución 1/10,000) diluído en una solución de buffer PBS 1x, Tween 1 % y leche 5 %, incubado

durante 1 h. Los blots fueron revelados usando el kit quimioluminiscencia Immobilon™ Western (Millipore) y se documentó con un sistema de procesamiento de imágenes ChemiDoc (Biorad).

8.3. Análisis y separación mediante cromatografía

Un gramo de hojas de plantas transgénicas fué lavado con agua destilada y homogeneizadas con un FastPrep (Fast-Prep-24 Instrument, MP Biomedicals) utilizando perlas de cerámica (*lysing matrix beads*, Mp Bio Lysing Matrix Tubes, MP Biomedicals), en solución Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, EDTA 1mM, MgCl₂ 3mM suplementada con inhibidor de proteasas según las indicaciones del proveedor (Complete, *protease inhibitor cocktail tablets*, ROCHE). Al homogenado se le agregó sulfato de amonio para una concentración final de 0.5 M y se centrifugó durante 20 min a 15,000 rpm en un rotor Beckman JA20 y se filtró a través de un filtro Millipore de 0.2 Ø. El sobrenadante se aplicó a una columna de fenil-sefarosa (Phenyl Sepharose High Performance, GE Healthcare), usando un sistema HPLC Water Breeze acoplado a un detector de fluorescencia y a un colector de fracciones Readyfrac (BioRad) y se eluyó con un gradiente de 0.5-0 M sulfato de amonio/0-50 % etilenglicol. La señal de fluorescencia fue monitoreada a las longitudes de onda 515/527 nm (YFP), 458/490 nm (CFP) y 488/510 nm (GFP) (excitación/emisión). Para la cromatografía de exclusión molecular, el sobrenadante filtrado se aplicó a una columna Superdex75, usando el sistema de HPLC Water Breeze, y se eluyó con la solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, EDTA 1mM, MgCl₂ 3mM. Se detectó la emisión de fluorescencia a la longitud de onda de

280/340 nm (excitación/emisión). En las fracciones recuperadas se determinó la actividad pirofosfatasa.

8.4. Actividad pirofosfatasa

La actividad pirofosfatasa se determinó estimando la producción de fosfato mediante verde de malaquita (RVM). Este ensayo consiste en evaluar la concentración de fosfato libre producto de la hidrólisis de pirofosfato por unidad de tiempo. El reactivo RVM consta de tres soluciones básicas: solución A, la cual contiene 0.45 % de verde de malaquita en 4 N de HCl (w/v), que se deja reposar por 24 h antes de usar; solución B, 12.4 % de Molibdato de Amonio en 6 M de HCl; y por último la solución C, NaCl 4 M con 3 % de Brij 37. Previo al ensayo de actividad se mezclaron 2 mL de solución A, 1 mL de solución B, 9 mL de agua y al final se agregó 1 mL de la solución C. Se ajustó con HCl. Para medir la actividad pirofosfatasa se preparó una solución de ensayo que contenía Tris-HCl 0.2 M pH 7.5, EDTA 2 mM y $MgCl_2$ 6 mM y 160 μM de pirofosfato; de esta solución se agregaron 25 μL en el pozo de reacción y se adicionaron de 1 a 25 μL de las fracciones que contenían la proteína y agua hasta completar 50 μL de volumen de reacción de forma que la concentración final de la solución de ensayo fue Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, EDTA 1 mM y $MgCl_2$ 3 mM y 80 μM de pirofosfato. Los ensayos se hicieron con y sin $MgCl_2$ 3 mM. Después de 5 a 30 min la reacción se detuvo con 200 μL de RVM y la cantidad de fosfato liberado fue determinada con una curva estándar de 0.1 mM Na_2HPO_4 y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (Biorad-Benchmark). La actividad medida en presencia de Mg^{+2}

menos la medida en su ausencia se consideró como la actividad pirofosfatasa dependiente de Mg^{2+} . En algunos ensayos, la actividad fue medida en paralelo en presencia de 10 mM NaCl o 10 mM NaF en el medio, las diferencias de Pi liberado entre ambas medidas fue considerado como la actividad pirofosfatasa sensible a Fluoruro.

8.5. Microscopia confocal de fluorescencia

Hojas de plantas silvestres o transgénicas de *A. thaliana* de 28 ddg (AtPPa1-CFP, AtPPa2-CFP, AtPPa3-CFP, AtPPa4-CFP, AtPPa5-YFP, AtPPa6-YFP y 35S:GFP) se sometieron a un tratamiento de fijación, incubándose toda la noche en formaldehído 4 % en PBS (10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , 2.7 mM de KCl y 137 mM NaCl, pH 7.2) a 4°C. Se hicieron 5 lavados de 10 min con PBS. Las muestras se deshidrataron con concentraciones ascendentes de etanol (30, 50, 70, 85, 96, 100 y 100 EtOH/H₂O v/v) durante 30 min en cada concentración. Las muestras deshidratadas se incubaron en una solución de etanol:citosolv (Fisher Scientific) 1:1 (v/v) durante 1 h y se pasaron a citosolv durante 5 min. Los cortes de hoja se pasaron a una mezcla de citosolv-parafina 1:1 (v/v) y se incubaron durante 15 h a 56°C, y se transfirieron a parafina pura durante 36 horas (se realizó un cambio de parafina pura a las 12 h), a 56°C. Las muestras se incluyeron en parafina pura a temperatura ambiente y se hicieron cortes de 9 μ m en un microtomo. Una vez realizados los cortes y colocados en el portaobjetos se comenzó el proceso de desparafinar, el cual se llevó a cabo a 60°C durante 2 h. La rehidratación se realizó con 3 cambios de citosolv puro de 3 min cada uno, un

lavado con citrosolv-etanol 1:1 (v/v) durante 3 min y lavados de etanol a concentraciones descendentes (100, 96, 85, 70, 50 y 30 v/v) durante 3 min cada uno. Por último se hizo un lavado con PBS durante 3 min. Después del último lavado con PBS las muestras se montaron, se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con barniz de uñas comercial.

Hojas frescas de plantas de *A. thaliana* de 28 ddg fueron seccionadas en cortes finos con una navaja de acero de hoja delgada. Los cortes fueron mezclados con PBS 1X, cubiertos con un cubreobjetos y observados inmediatamente. Todas las muestras fueron observadas en un microscopio confocal de fluorescencia Olympus FV 1000 en el área de Microscopía Confocal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química de la UNAM. Se realizaron varias repeticiones de cada muestra. Las observaciones de las muestras se realizaron a las longitudes de onda correspondientes a las proteínas fluorescentes CFP ($\lambda_{EX}:458/\lambda_{EM}:490$ nm), YFP ($\lambda_{EX}:515/\lambda_{EM}:527$ nm) y GFP ($\lambda_{EX}:488/\lambda_{EM}:510$ nm) y a cada muestra de interés se le restó la fluorescencia basal intrínseca del tejido. Se realizaron de 15 a 20 preparaciones de diferentes hojas de cada planta, todas fueron digitalizadas y se tomaron imágenes a diferentes magnificaciones (10x, 40x y 60x). Cada sesión se realizó en promedio 10 veces para cada línea transgénica y se seleccionaron las imágenes representativas de la localización observada en al menos el 90% de las preparaciones.

Para observar raíces, se utilizaron plantas de *A. thaliana* de 14 ddg. La raíz completa de la planta se colocó en un portaobjetos, se le adicionó amortiguador de

fosfatos, y se cubrieron con un cubreobjetos para ser observadas en el microscopio confocal en las condiciones mencionadas anteriormente.

8.6. Inmunocitoquímica con partículas de oro

Para obtener imágenes de alta resolución sobre la distribución subcelular de las pirofosfatasas inorgánicas solubles en fusión con las proteínas fluorescentes, se realizaron inmunolocalizaciones con el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con partículas de oro de 15 nm (*Immunogold conjugate* EM.GOAT ANTIRABBIT IgG 15 nm, BB International). Se fijaron fragmentos de hoja de 5 mm² obtenidos de plantas transformantes adultas (28 ddg) de *Arabidopsis* en una solución de glutaraldehído 3 % durante 2 h, se realizó un lavado con una solución amortiguadora de fosfatos y se deshidrataron en concentraciones ascendentes de una solución etanol:agua (40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 %, v/v) durante 15 min cada uno a 4°C, así como tres cambios de etanol absoluto durante 15 min cada uno a temperatura ambiente. Las muestras se transfirieron a una mezcla de L.R. White:etanol (1:1, v/v) durante 24 h a temperatura ambiente en rotación y posteriormente a la resina L.R. White pura durante 4 h en rotación. Las muestras se incluyeron con L.R. White en cápsulas de gelatina y se incubaron a 60°C toda la noche. Se hicieron los cortes ultrafinos de 80 y 90 nm en un ultramicrotomo Reichert-Jung con una navaja de diamante y se montaron en rejillas de Niquel recubiertas con colodion.

Inmulocalización ultraestructural: Las rejillas se bloquearon con la solución TBST (20 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 20 mM azida de sodio, 1 % Tween 20, 5

%, BSA y 5 % NGS) durante 1 h, y se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario (anticuerpo anti-GFP: TBST, 1:10). Se hicieron tres lavados con TBST (20 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 20 mM Azida de sodio, 1% Tween 20, 5 %, BSA y 5 % NGS) de 15 min (cada uno) y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro coloidal de 15 nm (*Immunogold conjugate* EM.GOAT ANTIRABBIT IgG 15 nm, BBIInternational) en una dilución 1:20 con TBST, durante 2 h a temperatura ambiente. Se enjuagaron 3 veces con TBST durante 15 min c/u y una vez con agua desionizada durante 10 min y se dejaron secar las rejillas a temperatura ambiente (modificado de Busot et al. 2008). El contraste de las muestras se realizó con citrato de plomo y acetato de uranilo en el laboratorio de imagenología del Instituto de Fisiología Celular. Las imágenes presentadas en este trabajo corresponden a imágenes representativas de 5 experimentos independientes. Como controles se utilizaron plantas de *A. thaliana* silvestre y plantas 35S:GFP (donadas por la Dra. Patricia Coello) sometidas al mismo tratamiento de fijación e inmunolocalización.

8.7. Transformación por biobalística

Los plásmidos 35S:AtPPa4-YFP, 35S:AtPPa1-CFP y 35S:GFP-GUS (*gateway vector* pBGWFS7.0-35S:GFP-GUS, control), fueron purificados de células transformadas de *E. coli* usando un kit comercial (HiSpeed plasmid Midi kit, Qiagen). Una cebolla pequeña se desinfectó en 25 mL de una solución 1 % de hipoclorito de sodio con 0.1 % de Tween 20 (v/v) y 0.75 mL de desinfectante de verduras comercial (solución de nitrato de plata coloidal) durante 15 min, con

agitación constante. Después se hicieron 3 lavados con agua desionizada estéril durante 10 min cada uno. Se obtuvieron cuadros de 1 cm² de las capas de la cebolla y se extrajo la capa de la epidermis. La capa de epidermis de cebolla se colocó en una caja petri con medio MS. Se prepararon balas de tungsteno de 40.4 nm tratadas a las que se les agregó 1 M CaCl₂, 16 mM de espermidina y 40 µg/mL de plásmido purificado. Se hicieron lavados con etanol al 70 % y al 100 %. El macroportador fue cargado con una suspensión de etanol con 500 mg de balas cargadas con 830 ng de DNA aproximadamente y se dejó evaporar el solvente. Se realizaron dos disparos a 1100 psi (PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System, BioRad) a cada caja petri conteniendo la epidermis de cebolla, usando Helio como gas acarreador. Después de 10-12 h de incubación a 25°C, las secciones de epidermis de cebolla se incubaron con 1M de NaCl durante 10 min y se transfirieron a una solución PBS 1X. Se observaron en el microscopio confocal como se describió en la sección de Microscopia Confocal de Fluorescencia. Las muestras que no se sometieron a plasmólisis únicamente se transfirieron a PBS sin el tratamiento de NaCl.

8.8. *Inmunoprecipitación de proteínas*

Un gramo de hojas de plantas transformantes de *A. thaliana* con las diferentes proteínas de fusión de 28 ddg se homogeneizaron con cuatro volúmenes de Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, EDTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM adicionando inhibidor de proteasas a las concentraciones indicadas por el proveedor (Complete, protease inhibitor cocktail tablets, ROCHE) en un FastPrep (Fast-Prep-24 Instrument, MP

Biomedicals) utilizando perlas de cerámica (*lysing matrix beads*, Mp Bio Lysing Matrix Tubes, MP Biomedicals). El homogeneizado se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 min a 4°C. El contenido de proteínas totales se cuantificó mediante el método de Bradford. Para la inmunoprecipitación, a la proteína A agarosa se le adicionaron 500 µL de PBS y 10 µL de BSA (10 mg/mL), se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y agitación lenta. Se desechó el sobrenadante y se adicionó anticuerpo anti-GFP a una concentración de 200 µg/µL y se llevó a un volumen final de 500 µL con amortiguador de unión (50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 % glicerol, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0.02 % Triton X-100). La mezcla se incubó 1 h a temperatura ambiente con agitación lenta, se eliminó el sobrenadante, se adicionaron 800 µg de proteína obtenida de las diferentes plantas transgénicas (con las proteínas de fusión), así como de los controles de plantas transformadas con GFP y plantas AtW. Se llevó a un volumen final de 500 µL con amortiguador de unión, al control sin proteína únicamente se le agregó el amortiguador de unión, a todas las muestras se le adicionaron inhibidores de proteasas *Complete* (según las indicaciones de proveedor), y se incubó toda la noche a 4°C. Se realizaron tres lavados con amortiguador de lavado (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 % glicerol, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0.02 % Triton X-100). La separación electroforética se realizó en geles de poliacrilamida-SDS 10 %, y una vez concluída la corrida los geles se tiñeron con plata de acuerdo al método reportado por Sambrook et al, 1989. Para las muestras en disolución, los inmunoprecipitados se lavaron con PBS, las perlas se resuspendieron en solución llamada "*soft elution*" (0.2 % SDS, 0.1 % Tween-20, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0), se incubó durante 15 min a 25°C en agitación por rotación.

Se recuperaron las perlas, se adicionó 1 mL de acetona (-20°C) y se incubó durante 4 h a -20°C para precipitar la proteína. Se centrifugó a 10,000 x g durante 5 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y el precipitado (proteína) se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió en solución Tris-HCl, pH 7.5 (Antrobus et al, 2011) y se realizó un análisis por LC-MSMS de las proteínas eluidas en solución en el área de Espectrometría de Masas de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII), Facultad de Química, UNAM. Como controles se realizaron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-GFP utilizando extractos proteicos de plantas 35S:GFP, AtWT y sin proteína.

8.9. Medición de fluorescencia de Chl a fotosistema 2 (PS II) en hojas de plantas de *A. thaliana*.

Se crecieron 20 plantas transformadas con la construcción 35S:AtPPa4-CFP y 35S:AtPPa6-YFP, así como plantas AtWT hasta 28 ddg. Las plantas transformadas y las silvestres se mantuvieron durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente, después de este tiempo se midió la fluorescencia de la clorofila *a* (*Chl a*) de las hojas, tomando dos hojas por planta, utilizando un fluorómetro Hansatech modelo Handy PEA (Plant Efficiency Analyser). Cada hoja se iluminó durante 5 s con luz roja de $\lambda = 650$ nm con una intensidad alta de alrededor de $3000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, utilizando un clip que define el área de medición de la muestra. Los resultados de la fluorescencia de la clorofila *a* fueron analizados con los programas Handy PEA y Origin 6.0 para determinar la actividad fotosintética.

9. RESULTADOS

9.1. Selección de plantas transformadas

En el laboratorio del Dr. Rogelio Rodríguez Sotres se cuenta con una colección de semillas transformadas de las seis diferentes isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles de *A. thaliana* (AtPPa1-6) fusionadas a proteínas fluorescentes bajo el control del promotor 35S (Navarro de la Sancha, 2009). Para el estudio de la localización subcelular, se seleccionaron las plantas transformadas de las seis isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles mediante la resistencia al herbicida BASTA®, debido a que la construcción porta un gen de resistencia a este herbicida. Se usaron para todos los análisis transformantes crecidas y seleccionadas hasta la F4 de AtPPa1-CFP, AtPPa2-CFP, AtPPa3-CFP, AtPPa4-CFP, AtPPa5-YFP y AtPPa6-YFP (Navarro de la Sancha, 2009; Fig. 8A). Las plantas transgénicas que sobreexpresaban cualquiera de los seis transgenes mostraron diferencias en su tamaño y biomasa, así como retraso de una semana o más en su desarrollo con respecto a las plantas silvestres (datos no mostrados). Esta alteración no se observó en plantas que expresan la fusión de GFP-GUS bajo el control del mismo promotor. Si bien el patrón parece sugerir un efecto de la sobreexpresión sobre el crecimiento, no se caracterizaron suficientes eventos transgénicos independientes como para permitir una conclusión definitiva. Estudios futuros podrían abordar este tema con técnicas más dirigidas, como por

ejemplo: alterando los promotores endógenos para estimular una desregulación de cada uno de estos genes.

La expresión de las proteínas de fusión, se analizó con una inmunoréplica utilizando el anticuerpo anti-GFP. Se identificó una banda que todas las plantas transgénicas presentaban con un peso esperado entre 45 y 50 kDa (Fig. 9), la cual estaba ausente en las plantas AtWT, lo que nos indica que la proteína de fusión está presente y se encuentra razonablemente estable. No se observaron otras bandas abundantes que indicaran la degradación acelerada de esta proteína.

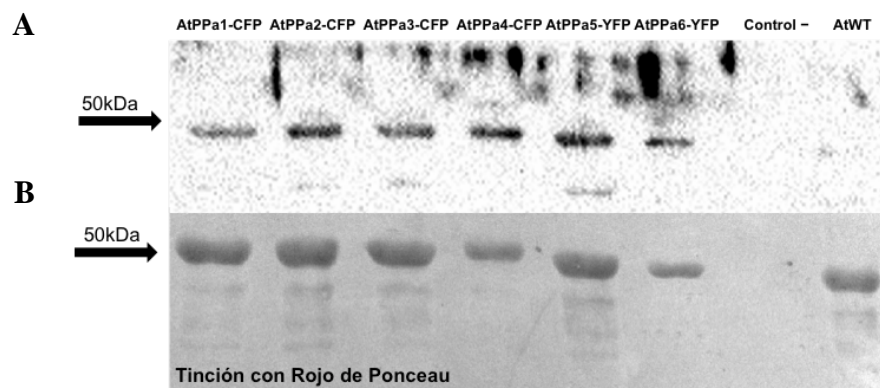


Figura 9. Inmunoréplica tipo western de extracto proteico soluble de hojas de plantas de *Arabidopsis thaliana*. A) Detección de las proteínas de fusión por inmunoréplica, usando anticuerpo Anti-GFP y el extracto proteico soluble de hojas. B) Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau previo a la inmunodetección. Los carriles corresponden a: AtPPa1-CFP, AtPPa2-CFP, AtPPa3-CFP, AtPPa4-CFP, AtPPa5-YFP, AtPPa6-YFP, Buffer libre de proteína y AtWT.

9.2. Cromatografía y análisis de la actividad pirofosfatasa de las transformantes

Para determinar los posibles cambios en la actividad de pirofosfatasa en las plantas transformadas se extrajo proteína soluble y se realizó el fraccionamiento de los extractos proteicos totales mediante cromatografía de líquidos (HPLC) usando una columna de fenil-sefarosa. La detección de las proteínas se realizó con un detector de fluorescencia a las longitudes de onda correspondientes a cada proteína fluorescente CFP(λ_{EX} :458/ λ_{EM} :490 nm), YFP (λ_{EX} :515/ λ_{EM} :527 nm) y GFP (λ_{EX} :488/ λ_{EM} :510 nm). Se obtuvieron los perfiles de elución de la proteína así como los de fluorescencia. Las fracciones eluidas de la columna se analizaron para detectar actividad de pirofosfatasa dependiente de Mg^{2+} .

Encontramos sutiles cambios en los perfiles de fluorescencia y de actividad de las diferentes plantas transformantes con respecto a la plantas AtWT (Fig. S1 B-I, Gutiérrez-Luna, et al. 2016). En los perfiles de fluorescencia de plantas transformadas con la proteína fluorescente CFP observamos dos picos de fluorescencia, el primer pico de elución corresponde al lavado de la columna, donde eluyen las proteínas que tienen poca o nula interacción con la resina, así como un segundo pico que eluye con 50 % etilenglicol. En todos los casos el primer pico de fluorescencia mostró mayor abundancia que el segundo. Sin embargo, la emisión de fluorescencia a esta longitud de onda entre las diferentes transformantes varió ligeramente (Fig. S1 B-E, Gutiérrez-Luna et al. 2016). En los perfiles de fluorescencia correspondientes a las plantas transformadas con AtPPaX-YFP, se observan patrones de fluorescencia muy similares entre ambas

transformantes (AtPPa5-YFP y AtPPa6-YFP). En ambos casos se observaron dos picos de fluorescencia, uno correspondiente al lavado de la columna y un segundo pico correspondiente a la elución con 50 % etilenglicol, ambos casos con un patrón similar (Fig. S1 F y G, Gutiérrez-Luna et al. 2016). Las abundancias de los dos picos de fluorescencia detectados en las plantas transformadas con YFP y CFP tuvieron un patrón de detección característico, aunque en ambos casos se detectan dos picos en el perfil, tuvo mayor abundancia el primer pico en el caso de las plantas transformadas con CFP, mientras que en el caso de las plantas transformadas con YFP el pico mayoritario fue el segundo. Sin embargo este patrón de abundancias es similar entre plantas transformadas con la misma proteína fluorescente, aunque las señales de AtPPaX-YFP fueron mayores que las señales de AtPPaX-CFP. Esto se pudo deber a los niveles de fluorescencia intrínseca de la planta en la longitud de onda a la que emite YFP en comparación con aquella en que emite CFP (λ_{max}). Con respecto a las plantas AtWT, las plantas transgénicas sí presentan mayores niveles de fluorescencia. Las diferencias en los perfiles de elución de las plantas transformantes con respecto a su correspondiente AtWT (Fig. S1 I, Gutiérrez-Luna et al, 2016), seguramente incluyen los cambios en expresión debidos a los transgenes, sin embargo no es posible concluir algo concreto.

En cuanto a la actividad pirofosfatasa evaluada en las fracciones recuperadas de las diferentes plantas transgénicas, se observan cambios sutiles en el patrón de actividad. En general, se observó un patrón característico con dos grupos de actividad, la primera correspondió a las fracciones que eluyeron en los primeros minutos (sulfato de amonio como eluyente) y presentó de uno a dos picos, con

variaciones dependiendo de la transgénica analizada. Un segundo grupo de picos de actividad correspondió a los últimos minutos de elución (etilenglicol como eluyente) y consistió de un patrón de 3 a 5 picos de actividad.

La actividad de los extractos crudos totales se determinó con el método de verde de malaquita. En los ensayos de actividad de los extractos totales no se observaron cambios significativos de actividad en las plantas transformadas con las diferentes isoformas de pirofosfatasa inorgánicas solubles. La actividad total de los extractos crudos (Tabla S2, Gutiérrez-Luna et al, 2016), cambió relativamente poco respecto a lo esperado por la sobreexpresión de las proteínas transgénicas, incluso en algunos casos disminuyó claramente la actividad total con respecto a la silvestre (100 %), como en el caso de la transgénica que sobreexpresaba la isoforma AtPPa6 (34 %) o GFP (29 %). De hecho, si se considera el valor de la actividad de la transgénica sobreexpresando GFP como control, podría considerarse que la actividad de las otras transgénicas incrementó en todos los casos, aunque, comparada con la silvestre, sólo aumentó en dos de los casos (AtPPa1 y AtPPa4). En los ensayos de inhibición de la actividad pirofosfatasa de los extractos crudos, los extractos totales se incubaron con PPI, $MgCl_2$ y fluoruro durante 10, 20 y 30 min y se determinó su actividad mediante el ensayo de verde de malaquita. Los ensayos arrojaron una inhibición tiempo-dependiente desde los 20 min de incubación con el inhibidor, observándose la inhibición total de la actividad a los 30 min de incubación con NaF (Tabla 1), lo cuál corresponde a lo reportado previamente (Baykov et al, 1977). La inhibición total de la actividad a los 30 min indicó que la actividad cuantificada correspondía a la actividad pirofosfatasa. También se determinó la actividad pirofosfatasa en

ausencia de NaF, en presencia de NaCl 10 mM y en presencia de NaF 10 mM durante 10 min, observándose una disminución importante de la actividad en presencia de NaF, pero no en presencia de NaCl con respecto a los extractos crudos con MgCl₂ a los 10 min de incubación (Tabla 1A; ANEXOS). La sensibilidad a NaF ha sido empleada como un marcador de la actividad de pirofosfatasa debida a la PPa y no a otras actividades inespecíficas de fosfatasa, capaces de hidrolizar el pirofosfato (Kasho et al, 1982). Sin embargo, este podría ser una propiedad discutible, porque existen varias fosfatasas que también son sensibles a fluoruro (Maksel et al, 2001).

Tabla 1. Inhibición por fluoruro de la actividad de pirofosfatasa en extractos crudos de hojas de plantas transgénicas para PPa

Tiempo de incubación (min)	0	10	20	30
Planta	Actividad pirofosfatasa (μmol Pi min⁻¹ mg prot.⁻¹)			
AtPPa1-CFP	0.288	1.284	1.08	0
AtPPa2-CFP	0.260	2.947	2.720	0
AtPPa3-CFP	0.395	1.535	1.415	0
AtPPa4-CFP	0	2.424	2.035	0
AtPPa5-YFP	0.344	1.704	1.678	0
AtPPa6-YFP	0.426	2.889	2.613	0
GFP	0.090	3.073	2.876	0
WT	0	1.472	1.370	0

*Los extractos crudos dializados de plantas transgénicas fueron incubados en presencia de 3 mM MgCl₂, 80 μM pirofosfato de sodio y 10 mM NaF. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que fueron diluida 5 veces en el medio de ensayo estándar y la actividad fue determinada (ver Materiales y Métodos sección 8.4).

Se realizó un ensayo cualitativo de la presencia de la proteínas fluorescentes, mediante un análisis de espectrofluorimetría, detectando la emisión de luz fluorescente característica de las proteínas cian fluorescente (CFP;

$\lambda_{EX}:458/\lambda_{EM}:490$ nm) y de la proteína amarilla fluorescente (YFP; $\lambda_{EX}:515/\lambda_{EM}:527$ nm). Se encontraron valores de 4.0 unidades de fluorescencia (uf) para la isoformas fusionadas a la proteína CFP y 1.0 para las isoformas fusionadas a la proteína YFP. En el caso de las proteínas extraídas de las plantas AtWT se obtuvo una intensidad de fluorescencia de 0.1 y 0.2 uf, respectivamente (Fig. S1 A, Gutiérrez-Luna et al, 2016). Dado que en todos los casos la expresión se encontraba controlada por un mismo promotor, es posible que las diferencias en fluorescencia se debieran a diferencias en la emisión de CFP y YFP y no a diferencias de expresión. Sin embargo, también es posible que ocurriesen a nivel traduccional, o a nivel de la degradación de la proteína.

Este análisis indicó que aunque las plantas AtWT tienen fluorescencia intrínseca a esas longitudes de onda; las plantas transformadas con las proteínas de fusión presentan una mayor emisión de fluorescencia y las plantas AtPPaX -CFP ó AtPPaX–YFP tienen un comportamiento similar entre ellas.

Mediante cromatografía de interacción hidrofóbica no se pudo determinar cuál pico correspondía a cada una de las diferentes isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles y por lo tanto tampoco la proteína de fusión, por lo que se decidió realizar cromatografía de exclusión molecular usando una resina Superdex75. Sin embargo, con esta metodología tampoco fue posible separar los picos correspondientes a las isoformas intrínsecas de la proteína de fusión. Esta técnica de cromatografía permitió la separación de dos picos de proteínas, el primer pico correspondiente a proteínas de alto peso molecular, el cual fue muy abundante y un segundo pico correspondiente a las proteínas de bajo peso molecular, que fue poco abundante (Fig.10.). Las abundancias de los picos son similares entre las

diferentes transformantes (entre 4 y 6); sin embargo, en los ensayos de actividad pirofosfatasa de las fracciones obtenidas de la separación cromatográfica de los extractos proteicos obtenidas de las seis plantas transgénicas, únicamente se detectó un pico de actividad que correspondió al primer pico de separación de la cromatografía. Es por esto que no se pudo corroborar el pico de actividad correspondiente a la proteína de fusión. Es importante mencionar que en estos ensayos de actividad también se observó que la actividad pirofosfatasa de las plantas transgénicas era menor que en la planta silvestre (entre 4 y 6.5 nmol PPI min⁻¹; Fig. 10 A, B, C y E). Únicamente en el caso de las plantas transformadas con la proteína de fusión de la isoforma 4, la actividad fue igual a la de la planta silvestre (8 y 8.5 nmol PPI min⁻¹, respetivamente; Fig. 10 D y H), como se había observado anteriormente, nuevamente la actividad de AtPPa6 y GFP fue baja (2.0 y 2.5 nmol PPI min⁻¹, respectivamente; Fig. 10 F y G). Todos estos datos sugieren la existencia de una respuesta de las proteínas con actividad pirofosfatasa como resultado de la expresión de la pirofosfatasa inorgánica soluble fusionada a la proteína fluorescente.

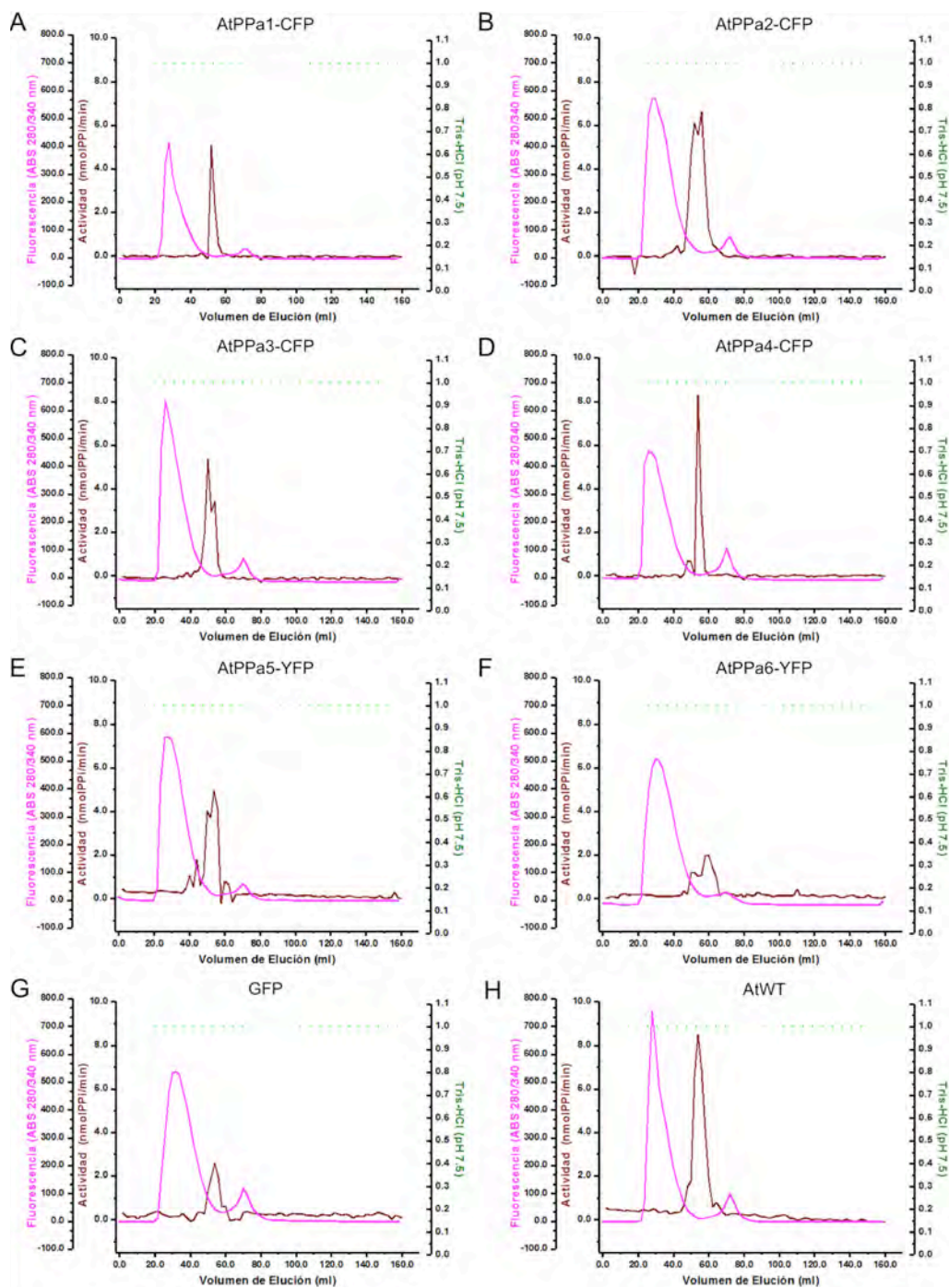


Figura 10. Actividad y fluorescencia de proteínas soluble de plantas transgénicas de *A. thaliana* (28 ddg) expresando cada una de las isoformas de AtPPa fusionada a proteínas fluorescentes (CFP y YFP). Un mg de proteína soluble de plantas transgénicas AtPPa1-CFP, AtPPa2-CFP, AtPPa3-CFP, AtPPa4-CFP, AtPPa5-YFP, AtPPa6-YFP, GFP, así como de plantas silvestres (AtWT) fueron fraccionadas en una columna Superdex 75. Las líneas discontinuas indican el amortiguador de elución Tris-HCl a lo largo de la elución (línea de puntos verdes, ---). La línea continua café (—) indica la actividad pirofosfatasa dependiente de Mg^{2+} medida con la técnica de verde de malaquita. La línea continua rosa (—) representa la fluorescencia recuperada de la emisión y excitación máxima correspondiente a la proteína medida a la longitud de onda $\lambda_{EX}:280/\lambda_{EM}:340$ nm.

9.3. Localización citoplasmática de las isoformas uno, cinco y seis de las pirofosfatasa inorgánicas solubles en plantas de 14 días de edad

Se realizó la observación de plantas transformadas con las diferentes isoformas de PPa mediante microscopía confocal para determinar la localización subcelular de las seis diferentes proteínas, con plantas de 10 ddg. Sin embargo, no se observó la expresión de ninguna de las isoformas a esta edad, por lo que se decidió realizar observaciones en plantas de mayor edad. A los 14 ddg, la expresión de la proteína fue muy baja para todas las isoformas y en algunos casos indetectable en microscopía confocal (Tabla 2). En el caso de las isoformas AtPPa1-CFP, AtPPa5-YFP y AtPPa6-YFP la fluorescencia de la proteína de fusión fue suficiente para realizar observaciones. La isoforma AtPPa1-CFP se localizó en el citoplasma (Fig. 11 A-C); sin embargo, de acuerdo a la distribución de la señal de fluorescencia en la célula, también se detectó señal aparentemente en núcleo (Fig. 11 A-C), sin embargo no se utilizó ningún marcador nuclear que lo confirmara. La localización nuclear para algunas isoformas ya ha sido reportada previamente y se ha sugerido que la isoforma uno podría estar localizada en este organelo (Koroleva et al, 2005); sin embargo, en este trabajo esta observación sólo se presentó en plantas jóvenes (Fig. 11 A-C; Tabla 2). Por otro lado, no está claro si la fluorescencia está dentro del núcleo o rodeando al núcleo. La isoforma AtPPa5-YFP se observó con una localización citoplasmática y en este caso, con una señal importante rodeando los cloroplastos (Fig. 11 D-I), aunque como se verá más adelante, esta proteína no parece localizarse dentro del cloroplasto. En el caso de la isoforma AtPPa6-YFP, se localizó en los cloroplastos exclusivamente

(Fig. 11 J-L) y como se verá más adelante, esta proteína parece ser exclusivamente intracloroplástica.

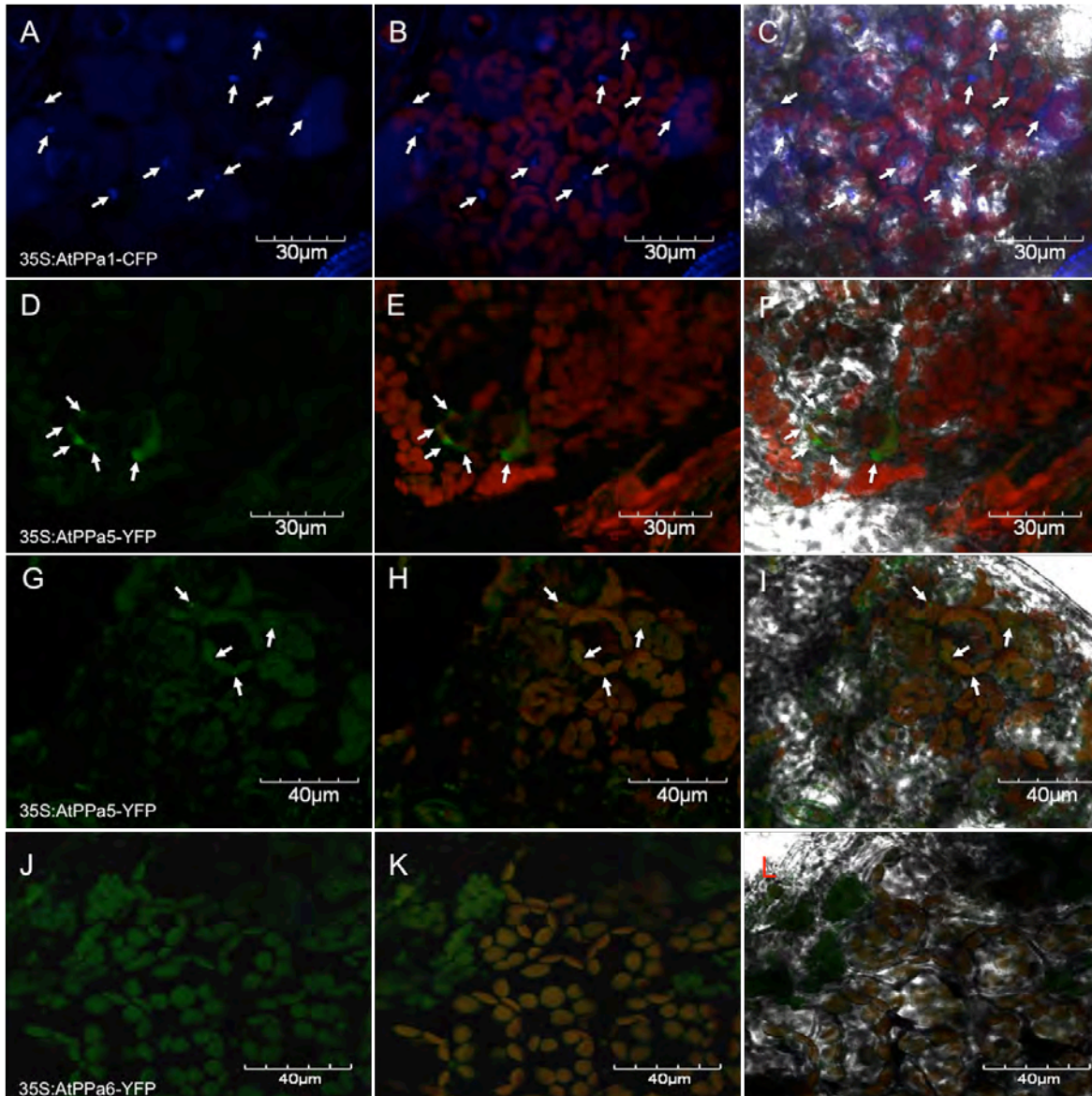


Figura 11. Imágenes de microscopía confocal de plantas transgénicas de 14 ddg. Los paneles corresponden a AtPPa1-CFP (A-C), 40X zoom 2.5X. AtPPa5-YFP (D- F y G-I), 40X zoom 2.5X y AtPPa6-YFP (J-L), 40X zoom 4X. Emisión de fluorescencia de CFP y YFP (A, D, G y J). Sobreposición de la emisión de CFP/YFP con la autofluorescencia de la clorofila (B, E, H y K). Sobreposición de CFP/YFP, autofluorescencia de cloroplastos y contraste de fases (C, F, I y L). Las flechas blancas indican la localización nuclear en el caso de la isoforma uno y cerca de los cloroplastos de la isoforma cinco. Las imágenes de confocal fueron tomadas en múltiples planos superpuestos (eje Z).

9.4. Localización citoplasmática de las isoformas uno, dos, tres y cinco de la pirofosfatasa inorgánica soluble de *A. thaliana* a los 28 días de edad.

Debido a que en plantas jóvenes no fue posible realizar la localización de todas las isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles se utilizaron plantas adultas (Tabla 2). Para este estudio, la localización de las proteínas de fusión de las pirofosfatasas inorgánicas solubles también se realizó en hojas de plantas transformantes de 28 días después de la germinación (ddg), debido a que la expresión fue mayor a esta edad, lo que permitió observar mejor la fluorescencia de las proteínas de fusión y su localización mediante microscopía confocal. Sin embargo, desconocemos si las diferencias en la expresión en las diferentes edades sea debido a regulaciones propias de la planta por la expresión constitutiva de la proteína.

Tabla 2. Localización subcelular en plantas jóvenes y adultas de las isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles.

Isoformas	Localización subcelular	
	Plantas jóvenes (14 ddg)	Plantas adultas (28 ddg)
AtPPa1-CFP	Nuclear	Citosólica cerca del núcleo
AtPPa2-CFP	No identificada	Citoplasmática cerca del tonoplasto
AtPPa3-CFP	No identificada	Citoplasmática cerca del tonoplasto
AtPPa4-CFP	No identificada	Citoplasmática cerca del tonoplasto, pared celular, espacio intercelular
AtPPa5-YFP	Citoplasmática cerca de los cloroplastos	Citoplasmática cerca de los cloroplastos
AtPPa6-YFP	Cloroplástica	Cloroplástica

En tejido fresco de hoja de plantas transgénicas adultas y maduras, AtPPa1-CFP, se localizó en el citoplasma de las células foliares (Fig. 12). La isoforma AtPPa2-CFP, se encontró distribuida de manera uniforme en todo el citoplasma de la célula (Fig. 13). AtPPa3-CFP, al igual que AtPPa2-CFP, se distribuyó uniformemente en el citoplasma de la célula, pero en este caso la emisión de fluorescencia fue muy baja, además de tener un patrón de acumulación de la fluorescencia en ciertas áreas aún no identificadas del citoplasma (Fig. 14). La isoforma AtPPa5-YFP tuvo una localización citoplasmática (Fig. 15), aunque encontramos un patrón de distribución diferente al de las otras isoformas, debido a que únicamente en estas plantas transformantes se observó su señal concentrada rodeando los cloroplastos (Fig. 15 y 16, flechas blancas). Las imágenes no son consistentes con la presencia de esta isoforma dentro del cloroplasto, como se puede observar más a detalle en los acercamientos que se muestran en la Figura 16. Por lo tanto, las diferencias en los patrones de distribución de las isoformas AtPPa1-CFP, AtPPa2-CFP, AtPPa3-CFP y AtPPa5-YFP, si bien citoplasmáticos para todas, no fueron iguales, lo que sugiere alguna forma de control de su ubicación subcitoplasmática. En ninguno de los casos se sobrepuso la fluorescencia observada con la autofluorescencia de los cloroplastos, lo que nos indica que no están siendo importadas al cloroplasto. Además, los patrones de distribución observados para AtPPa1, AtPPa2, AtPPa3 y AtPPa5 no fueron causados por la proteína fluorescente (CFP y YFP), ya que su localización en las plantas control transformadas únicamente con la proteína fluorescente GFP no coincidió con ninguna de las proteínas de fusión (Fig. 17). Todas las

observaciones se realizaron en células parenquimatosas fotosintéticas del mesófilo foliar.

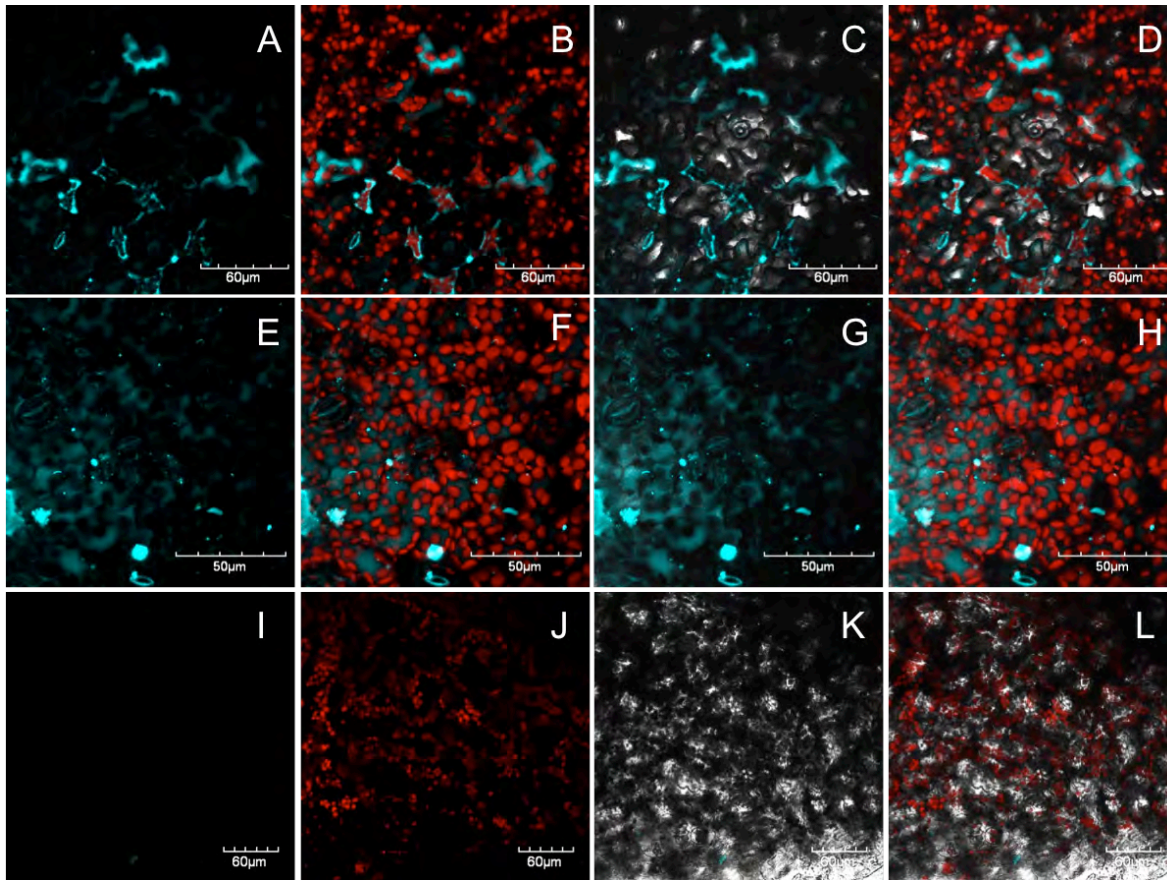


Figura 12. Localización subcelular de AtPPa1-CFP. Imágenes de microscopía confocal de tejido fresco de hojas de plantas de *Arabidopsis thaliana* de 28 ddg transformadas con el gene de la pirofosfatasa inorgánica soluble AtPPa1 fusionado a la proteína fluorescente CFP bajo el control del promotor 35S con expresión estable. Secciones de hojas frescas de plantas de 28 ddg fueron observadas en microscopía confocal a las longitudes de onda de excitación y emisión de CFP. (A-D) AtPPa1-CFP, 40X zoom 2X. (E-H) AtPPa1-CFP, 40X zoom 2.5X. (I-L) AtWT, 40X. Emisión de fluorescencia de CFP (A, E e I). Sobreposición de la emisión de CFP con la autofluorescencia de los cloroplastos (B, F y J). Sobreposición de tejido en contraste de fases con fluorescencia de CFP (C, G y K). Sobreposición de fluorescencia de CFP, autofluorescencia de los cloroplastos y contraste de fases (D, H y L). Todas la imágenes corresponden a células parenquimatosas fotosintéticas. Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas en múltiples planos superpuestos (eje Z).

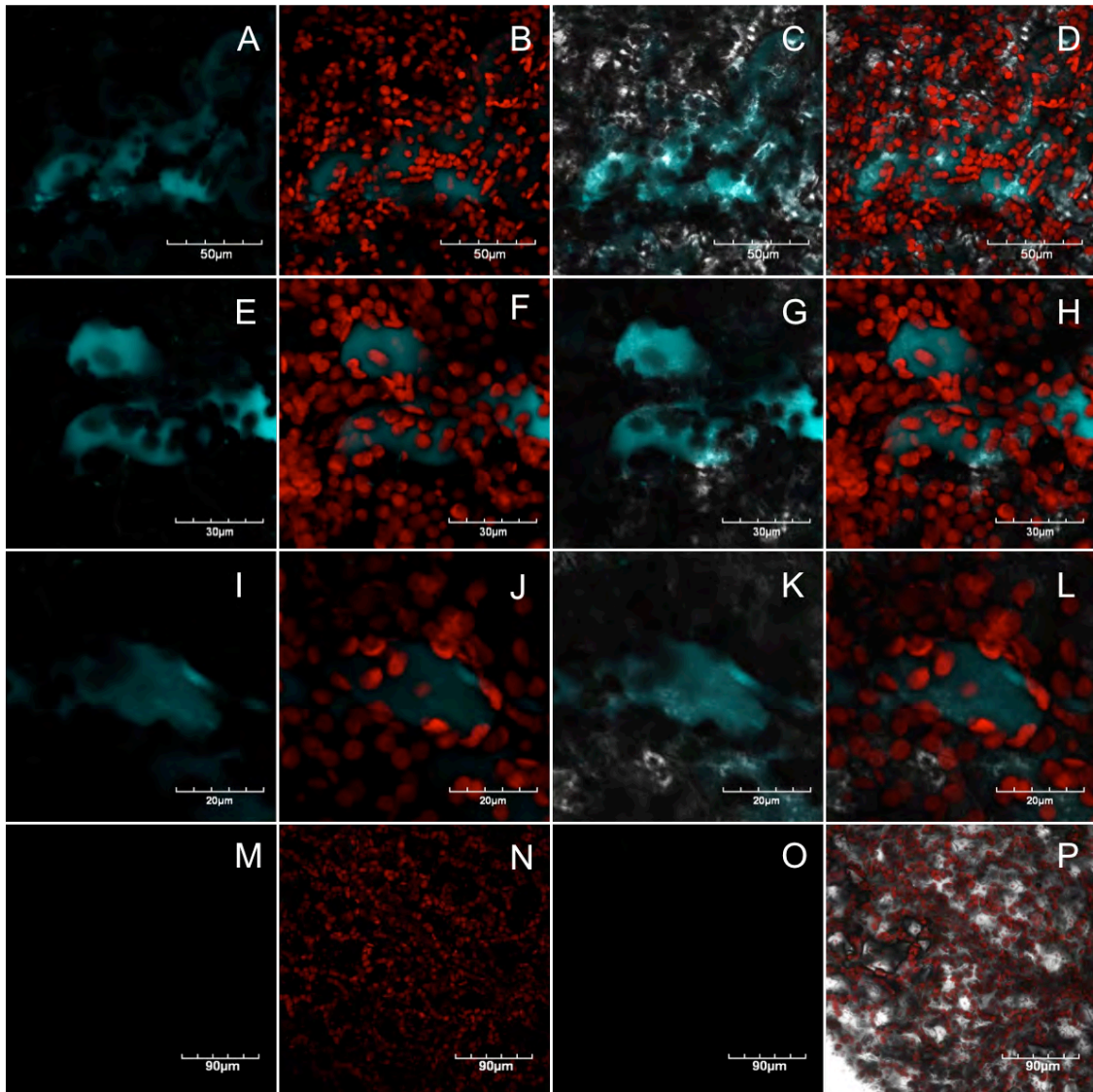


Figura 13. Localización subcelular de AtPPa2-CFP. Detección mediante microscopía confocal de la pirofosfatasa inorgánica soluble AtPPa2 fusionada a la proteína fluorescente CFP expresada establemente bajo el control del promotor 35S, en plantas transgénicas de *A. thaliana*. Secciones de hojas frescas de plantas de 28 ddg fueron observadas en microscopía confocal a las longitudes de onda de excitación y emisión de CFP. Imágenes de microscopía confocal de tejido fresco de plantas AtPPa2-CFP de 28ddg. (A-D) AtPPa2-CFP, 40X zoom 2.5X. (E-H) AtPPa2-CFP 40X zoom 5.8X. (I-L) AtPPa2-CFP 40X zoom 6X. (M-P) AtWT 40X. Emisión de fluorescencia de CFP (A, E, I y M). Sobreposición de CFP y autofluorescencia de los cloroplastos (B, F, J y N). Sobreposición de fluorescencia de CFP y contraste de fases (C, G, K y O). Sobreposición de fluorescencia de CFP, autofluorescencia de los cloroplastos y contraste de fases (D, H, L y P). Todas la imágenes corresponden a células parenquimatosas fotosintéticas. Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas en múltiples planos superpuestos (eje Z).

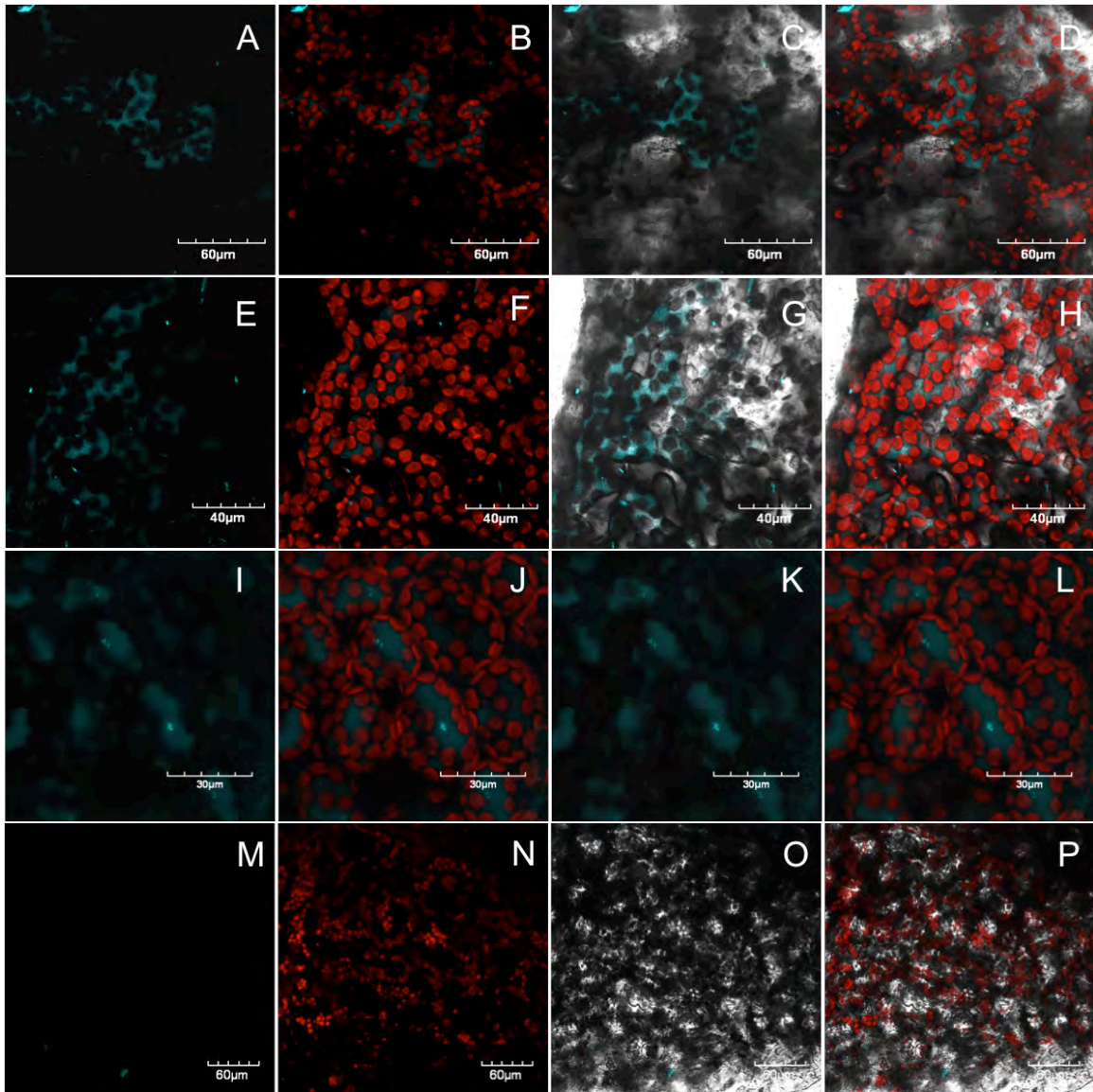


Figura 14. Detección mediante microscopía confocal de la pirofosfatasa inorgánica soluble AtPPa3-CFP. Las imágenes se tomaron en hojas de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan establemente la construcción de la pirofosfatasa inorgánica soluble AtPPa3 fusionada a la proteína fluorescente CFP bajo el control del promotor 35S. Secciones de hojas frescas de plantas de 28 ddg fueron observadas en microscopía confocal a las longitudes de onda de excitación y emisión de CFP. (A-D) AtPPa3-CFP, 40X zoom 2.5X. (E-H) AtPPa3-CFP 40X zoom 5.8X. (I-L) AtPPa3-CFP 40X zoom 6X. (M-P) AtWT 40X. Emisión de fluorescencia de CFP (A, E, I y M). Sobreposición de CFP y autofluorescencia de los cloroplastos (B, F, J y N). Sobreposición de fluorescencia de CFP y contraste de fases (C, G, K y O). Sobreposición de fluorescencia de CFP, autofluorescencia de los cloroplastos y contraste de fases (D, H, L y P). Todas la imágenes corresponden a células parenquimatosas fotosintéticas. Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas en múltiples planos superpuestos (eje Z).

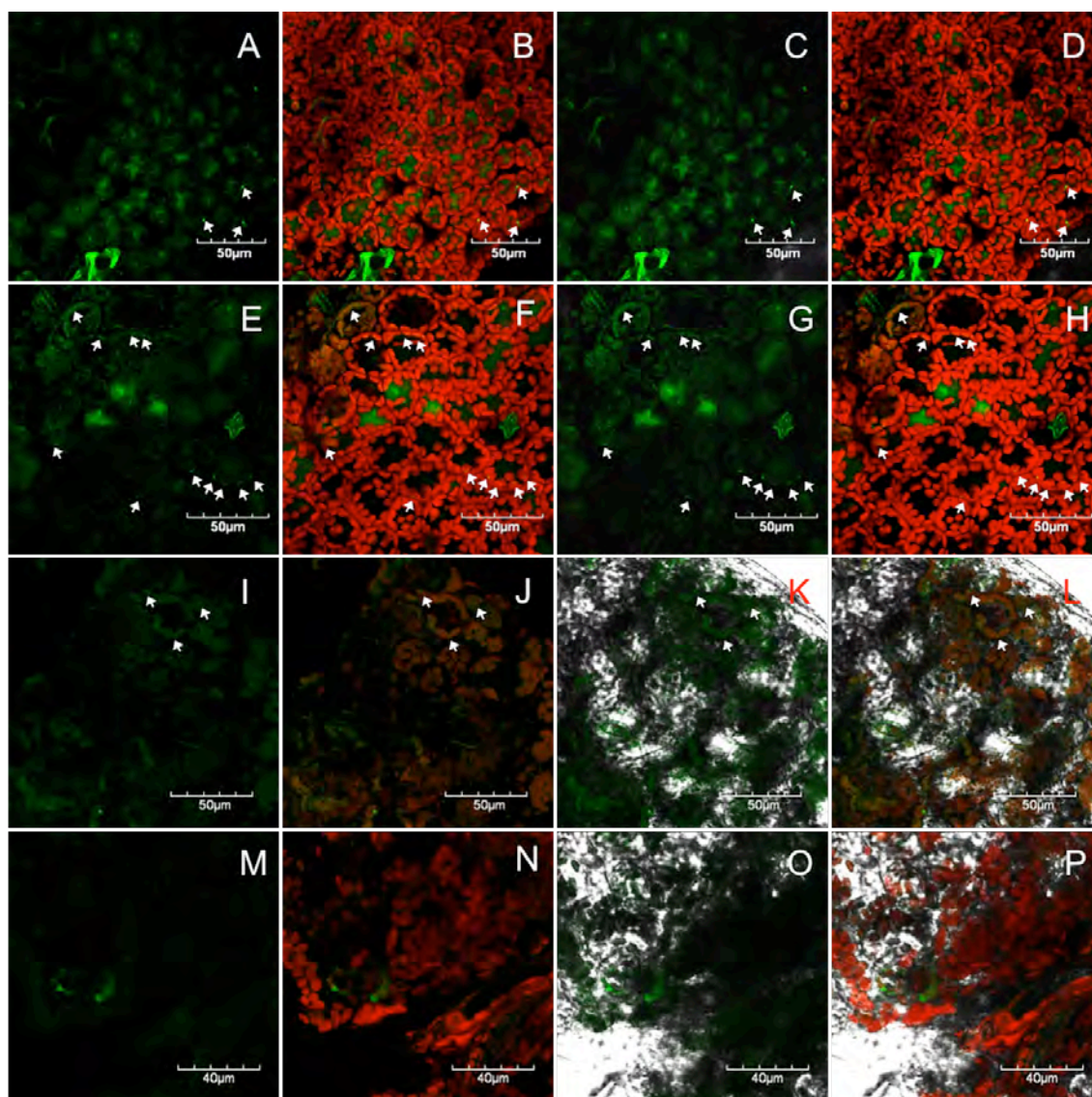


Figura 15. Detección mediante microscopía confocal de la pirofosfatasa inorgánica soluble AtPPa5-YFP. Las imágenes se tomaron en hojas de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan establemente la construcción de la pirofosfatasa inorgánica soluble AtPPa5 fusionada a la proteína fluorescente YFP bajo el control del promotor 35S. Secciones de hojas frescas de plantas de 28 ddg fueron observadas en microscopía confocal a las longitudes de onda de excitación y emisión de YFP. (A-D) AtPPa5-YFP, 40X. (E-H) AtPPa5-YFP, 40X zoom 2.5X. (I-L) AtPPa5-YFP 40X zoom 2.5X. (M-P) AtPPa5-YFP 40X zoom 4X. Emisión de fluorescencia de YFP (A, E, I y M). Sobreposición de YFP y autofluorescencia de los cloroplastos (B, F, J y N). Sobreposición de fluorescencia de YFP y contraste de fases (C, G, K y O). Sobreposición de fluorescencia de YFP, autofluorescencia de los cloroplastos y contraste de fases (D, H, L y P). Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas en múltiples planos superpuestos (eje Z). Todas la imágenes corresponden a células parenquimatosas fotosintéticas. Las flechas blancas indican la cercanía de la señal de AtPPa5 a los cloroplastos.

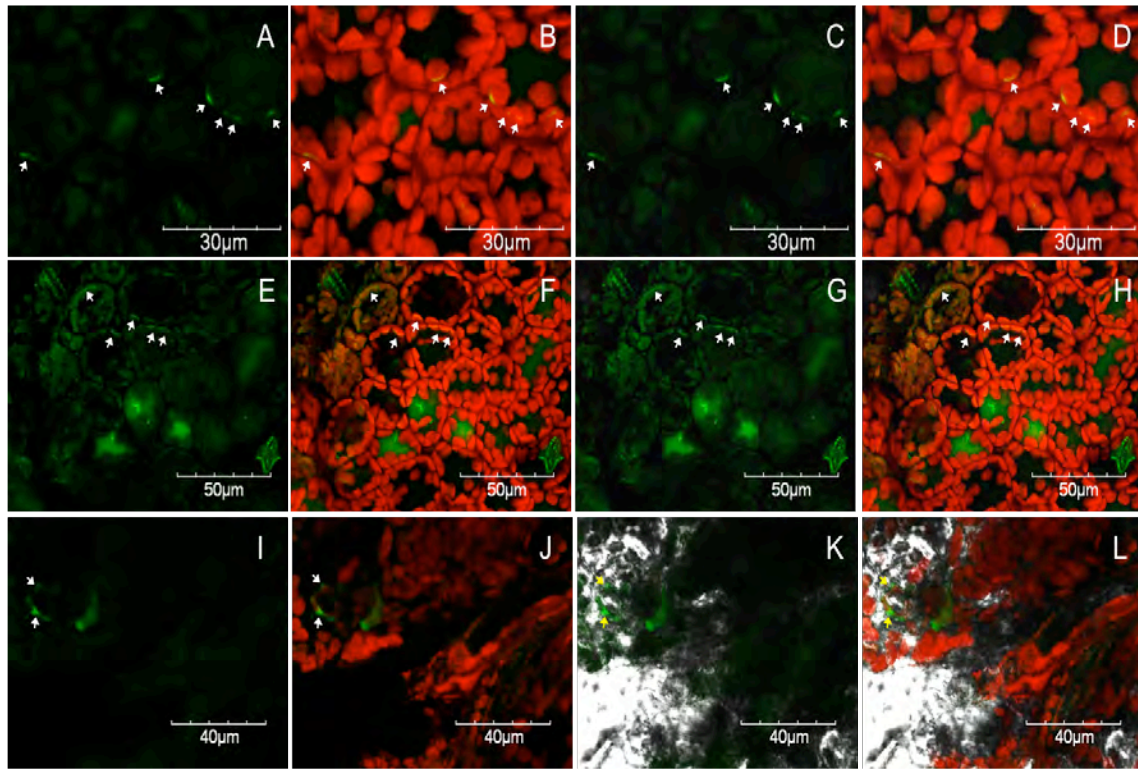


Figura 16. Imágenes de microscopía confocal magnificadas de hojas de *A. thaliana* transgénicas que expresan en forma estable la fusión AtPPa5-YFP, bajo el control de promotor 35S. Secciones de hojas frescas de plantas de 28 ddg fueron observadas en microscopía confocal a las longitudes de onda de excitación y emisión de YFP. (A-D) AtPPa5-YFP, 40X zoom 7X. (E-H) AtPPa5-YFP, 40X zoom 5X. (I-L) AtPPa5-YFP 40X zoom 6X. Emisión de fluorescencia de YFP (A, E, I y M). Sobreposición de YFP y autofluorescencia de los cloroplastos (B, F, J y N). Sobreposición de fluorescencia de YFP y contraste de fases (C, G, K y O). Sobreposición de fluorescencia de YFP, autofluorescencia de los cloroplastos y contraste de fases (D, H, L y P). Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas en múltiples planos superpuestos (eje Z). Las flechas blancas indican la cercanía de la señal de AtPPa5 a los cloroplastos. Estas imágenes corresponden a acercamientos de la figura 15.

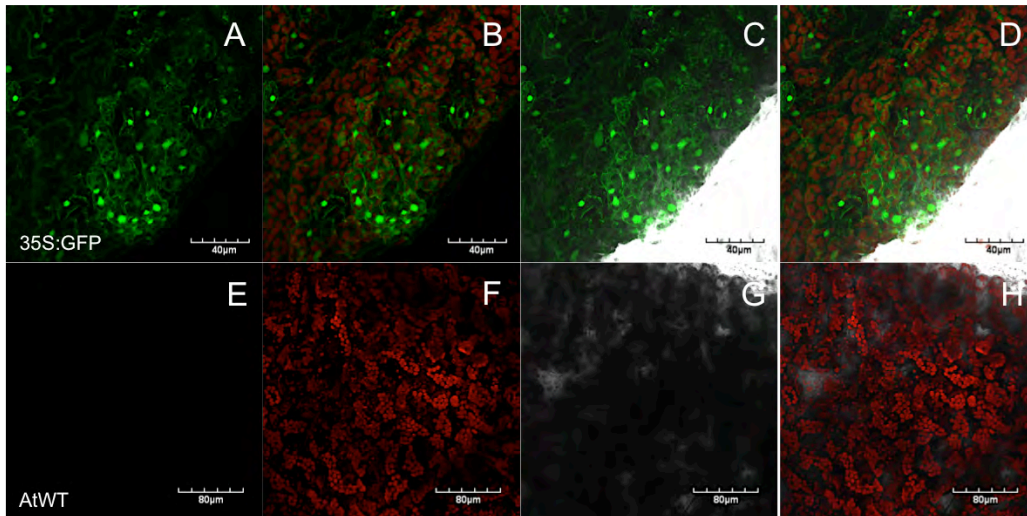


Figura 17. Detección mediante microscopía confocal de la señal de fluorescencia de GFP. Las imágenes se tomaron en hojas de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan establemente la construcción de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor 35S. Secciones de hojas frescas de plantas de 28 ddg fueron observadas en microscopía confocal a las longitudes de onda de excitación y emisión de GFP. (A-D) GFP, 40X. (E-H) AtWT, 40X. Emisión de fluorescencia de GFP (A y E). Sobreposición de GFP y autofluorescencia de los cloroplastos (B y F). Sobreposición de fluorescencia de GFP y contraste de fases (C y G). Sobreposición de fluorescencia de GFP, autofluorescencia de los cloroplastos y contraste de fases (D y H). Todas la imágenes coresponden a células parenquimatosas fotosintéticas. Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas en múltiples planos superpuestos (eje Z).

9.5. Inmunolocalización de las isoformas uno, dos, tres y cinco de la pirofosfatasa inorgánica soluble de *A. thaliana*

Para realizar análisis más detallados sobre la localización citoplasmática de las AtPPa1, AtPPa2, AtPPa3 y AtPPa5, se realizaron ensayos de inmunolocalización con anticuerpos marcados con partículas de oro, usando microscopía electrónica de transmisión (Fig. 18). Para la inmunolocalización se utilizaron nuevamente hojas de plantas transformadas de *Arabidopsis* de 28 ddg. En el caso de AtPPa1-CFP la marca de inmunolocalización fue escasa, encontrando su localización citoplasmática (Fig. 18 A), aunque en algunas células

se localizó cerca del núcleo (Fig. 18 B), aunque no dentro. Estas observaciones coinciden con los resultados de microscopía confocal. Por lo que nuestra conclusión es que esta proteína no se encuentra dentro del núcleo. En el caso de AtPPa2-CFP se localizó en el citoplasma y frecuentemente cerca de la vacuola (Fig. 18 C y D). AtPPa3-CFP también tuvo una distribución citoplásmica y cerca de la vacuola, aunque con un patrón de distribución diferente con respecto a las otras isoformas (Fig. 18 E y F). AtPPa5-YFP, al igual que las otras dos isoformas, mostró distribución citoplasmática (Fig. 18 G) con una distribución perivacuolar (Fig. 18 H), aunque en este caso también pudimos observar la marca de oro en el citoplasma muy cerca de los cloroplastos (Fig. 18 G), coincidiendo con lo observado en microscopía confocal para esta isoforma. Hay que mencionar que aunque se localizó marca de oro en la vacuola para todas las isoformas, el patrón de distribución fue diferente entre ellas. Además, la marca no se observó directamente en el espacio vacuolar, si no en pequeñas islas citoplasmáticas embebidas en el tonoplasto formadas por las proyecciones del citoplasma en la vacuola debido a la invaginación del tonoplasto, sugiriendo que la localización de estas isoformas en el citoplasma cercano en la vacuola (perivacuolar) pero no dentro de la vacuola. La señal de GFP fue poca y estuvo distribuida en toda la célula (Fig. 18 I y J).

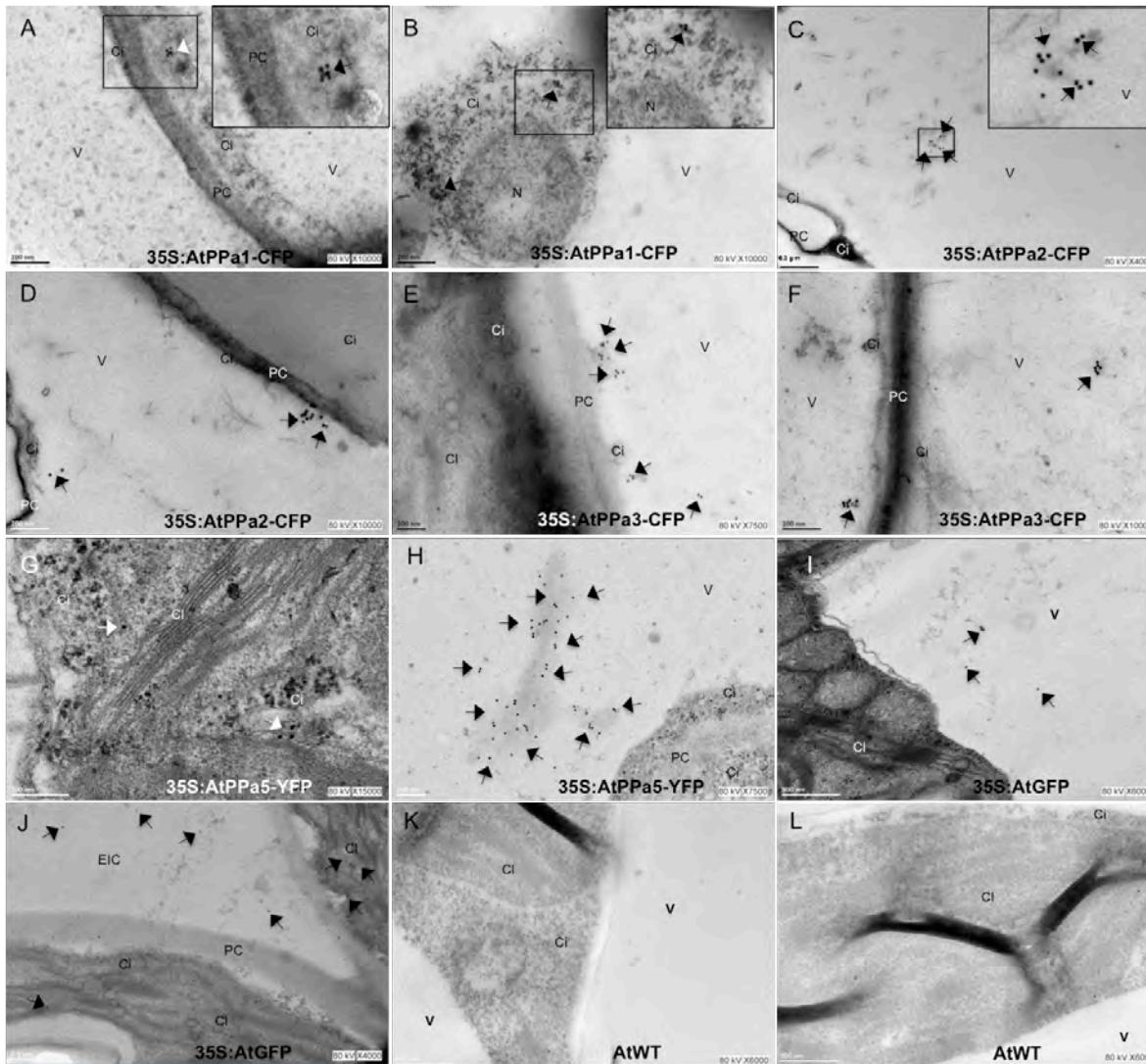


Figura 18. Inmunolocalización con partículas de oro y microscopía electrónica de transmisión de pirofosfatasas inorgánicas solubles de *Arabidopsis thaliana* fusionada a una proteína fluorescente y expresada establemente en plantas transgénicas de *A. thaliana* bajo el control del promotor 35S, usando anticuerpo anti-GFP y anticuerpo conjugados a partículas de oro de 15 nm. Los paneles corresponden a: AtPPa1-CFP (A y B), AtPPa2-CFP (C y D), AtPPa3-CFP (E y F), AtPPa5-YFP (G y H), GFP (I y J), AtWT (K y L). Secciones transversales de hojas frescas de plantas de 28 ddg fueron preparadas y teñidas con anticuerpo secundario conjugado a partículas de oro. Las flechas indican las partículas de oro (puntos densos). Cloroplasto (Cl), Vacuola (V), Citoplasma (Ci), Pared celular (PC), Núcleo (N), Espacio intercelular (EIC).

9.6. *Expresión transitoria de AtPPa1-CFP en epidermis de cebolla*

Aunque en reportes previos se había mencionado la posible localización nuclear de la isoforma AtPPa1 y debido a que nosotros la observamos en el citoplasma cerca del núcleo, pero no dentro, quisimos comprobar la localización extranuclear de esta isoforma y evaluar si la localización observada en plantas transgénicas de *Arabidopsis* era producto del evento de transformación y del modelo utilizado. Se decidió utilizar otro modelo, para esto, se realizó transformación transitoria en epidermis de cebolla, usando la construcción 35S:AtPPa1-CFP, así como la tinción con ioduro de propidio como marcador del núcleo. En la epidermis de cebolla se corroboró la localización de esta isoforma en el citoplasma y nuevamente sin indicios de que hubiera señal en el núcleo o cerca del núcleo (Fig. 19 A-D), debido a que no se observó superposición de las señales de ioduro de propidio y fluorescencia de CFP (Fig. 19 B). Como control se utilizó epidermis de cebolla transformada transitoriamente con 35S:GFP-GUS (Fig. 19 E-H) y sin DNA (Fig. 19 I-L).

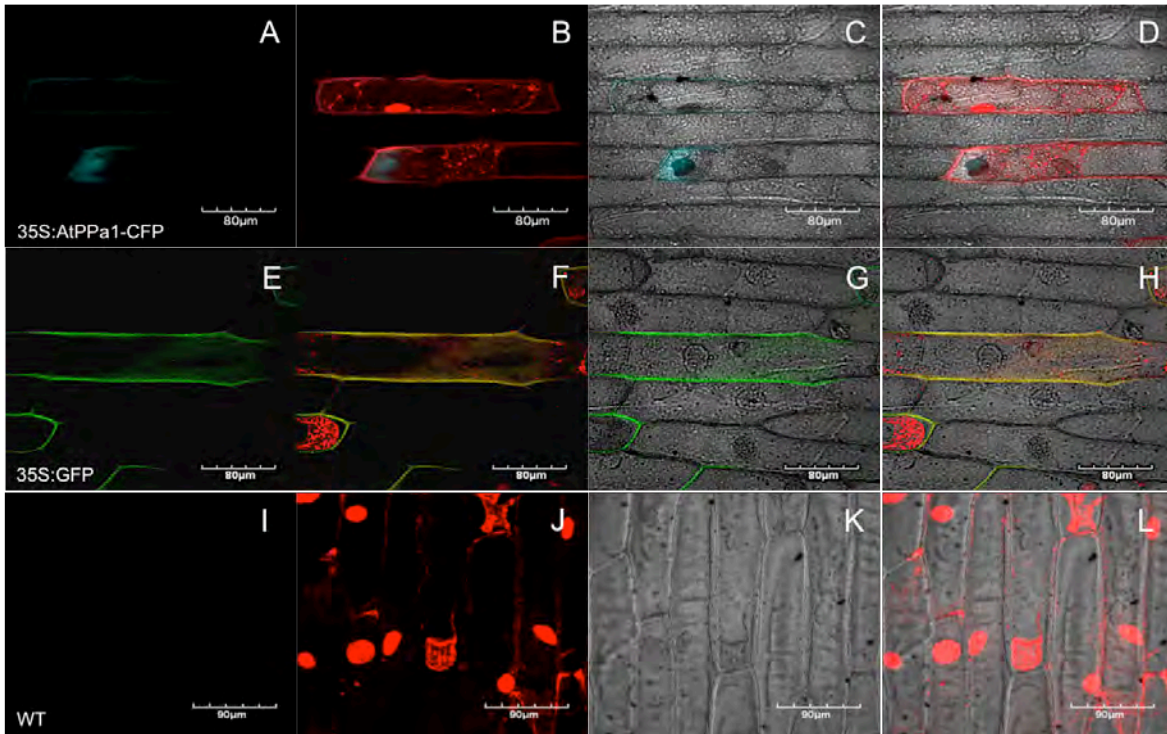


Figura 19. Expresión transitoria de AtPPa1-CFP en epidermis de cebolla bombardeada con la construcción 35S:AtPPa1-CFP (A-D), o con la construcción 35S: GFP-GUS (E-H) y balas sin DNA (I-L). La detección mediante microscopía confocal de la señal de fluorescencia de CFP (A) y GFP (E) fue superpuesta con la señal de ioduro de propidio de la pared celular y núcleo (B, E y J, respectivamente), superposición de la señal de fluorescencia y contraste de fases (C, G y K) y superposición de la señal de fluorescencia, ioduro de propidio y contraste de fases (D, H y L, respectivamente). Para obtener estas imágenes no se utilizó el tratamiento con NaCl hipertónico. Las imágenes corresponden a múltiples planos superpuestos (eje Z).

9.7. Localización subcelular de la isoforma cuatro de la pirofosfatasa inorgánica soluble de *A. thaliana*

En plantas transformantes de *A. thaliana*, encontramos señal de fluorescencia de AtPPa4-CFP dentro de la célula, indicando su distribución en el citoplasma (Fig. 20 A-D), pero también encontramos señal de fluorescencia fuera de la célula (Fig. 21 A-P). Este patrón fue reproducible sin evidencia de daño a la célula o a las células adyacentes, descartando que la distribución intercelular de la isoforma 4 se debiera a una fuga del material citoplasmático. Con los ensayos de inmunolocalización con anticuerpos marcados con partículas de oro, pudimos

observar este mismo patrón. En las micrografías se observó señal de oro correspondiente a esta proteína en el citoplasma (Fig. 22 A, B y H), incluso en una de las micrografías se pudo detectar la señal de oro en compartimentos aparentemente vesiculares (Fig. 22 A y B). También se observó marca en el espacio intercelular (Fig. 22 C-D), así como en la pared celular (Fig. 22 G-J). Estas observaciones fueron consistentes con las imágenes de microscopía confocal.

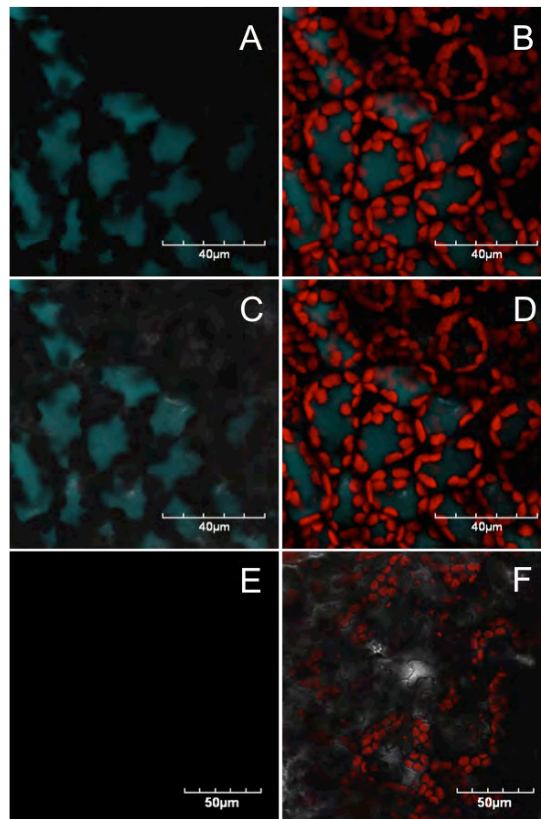


Figura 20. Localización citoplasmática de AtPPa4. Detección mediante microscopía confocal de la señal de fluorescencia de CFP. Las imágenes se tomaron en hojas de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan establemente la construcción de la pirofosfatasa inorgánica soluble fusionada a la proteína cian fluorescente (CFP) bajo el control del promotor 35S. Secciones de hojas frescas de plantas de 28 ddg fueron observadas en microscopía confocal a las longitudes de onda de excitación y emisión de CFP. (A-D) AtPPa4-CFP, 40X zoom 2.5X. (E-F) AtWT, 40X. Emisión de fluorescencia de CFP (A, C y E). Sobreposición de fluorescencia de CFP, autofluorescencia de los cloroplastos y contraste de fases (B, D y F). Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas en múltiples planos superpuestos (eje Z).

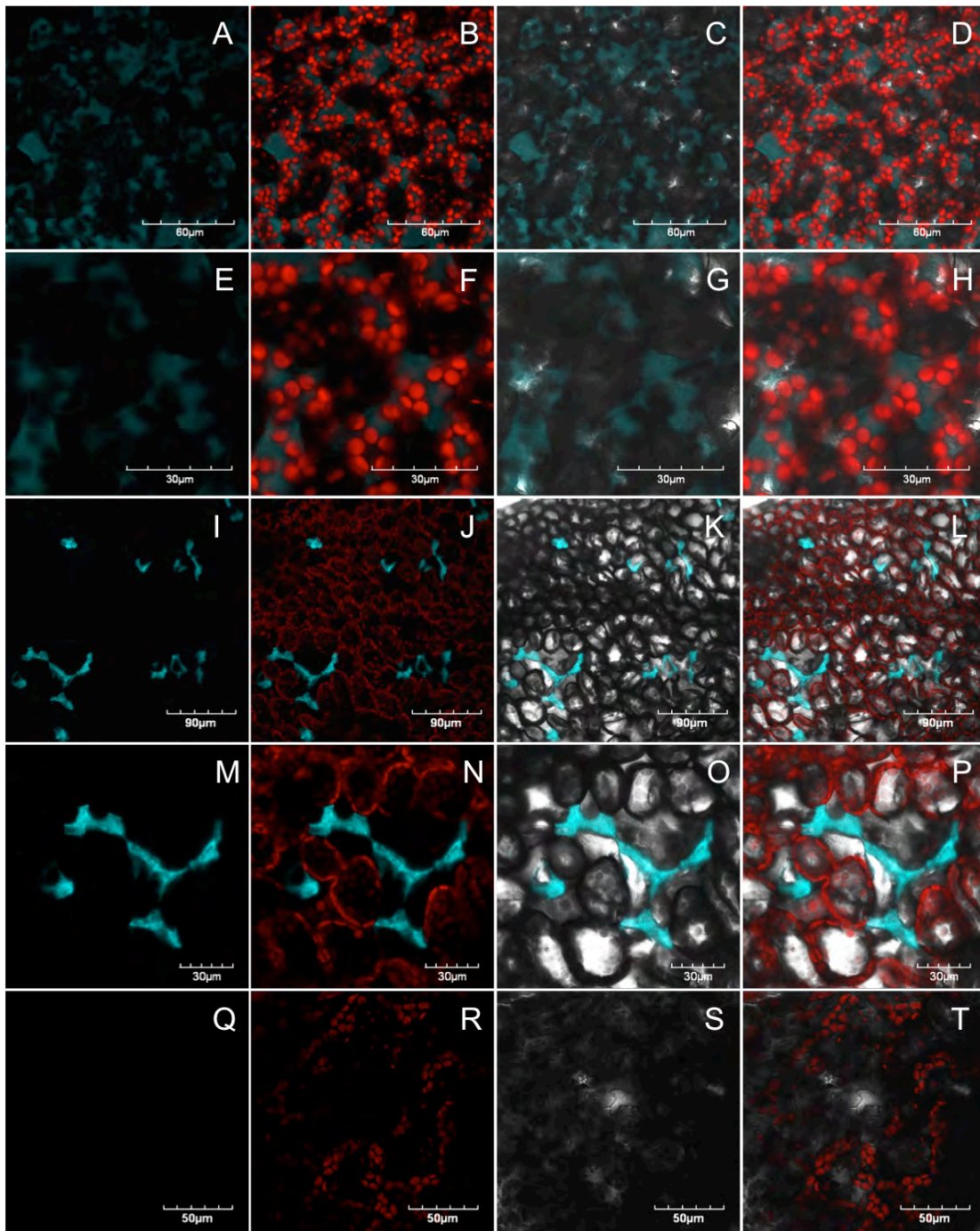


Figura 21. Localización intercelular de AtPPa4. Detección de la pirofosfatasa inorgánica soluble de *Arabidopsis thaliana*, isoforma 4, fusionada a proteína fluorescente CFP y expresada estable en plantas transgénicas de *A. thaliana* bajo el control del promotor 35S, mediante microscopía confocal (A-P), de secciones de hoja fresca de plantas de 28 ddd a longitudes de onda correspondientes a la emisión u excitación de CFP. (A-D) AtPPa4-CFP, 40X zoom 2X. (E-H) AtPPa4-CFP, 40X zoom 6X. (I-L) AtPPa4-CFP, 40X. AtPPa4-CFP, 40X zoom 3X AtWT, 40X zoom 2X. Emisión de fluorescencia de CFP (A, E, I, M y Q). Sobreposición de CFP y autofluorescencia de los cloroplastos (B, F, J, N y R). Sobreposición de fluorescencia de CFP y contraste de fases (C, G, K, O y S). Sobreposición de fluorescencia de CFP, autofluorescencia de los cloroplastos y contraste de fases (D, H, L, P y T). Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas en múltiples planos superpuestos (eje Z).

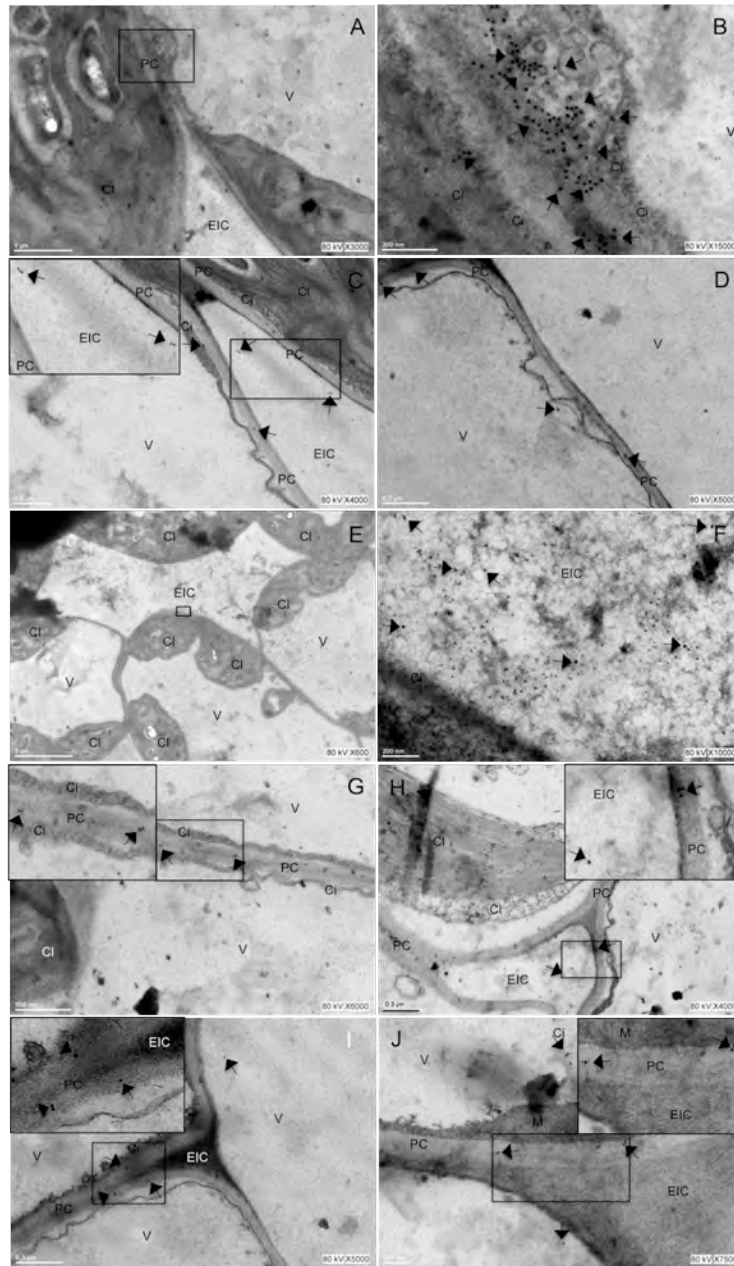


Figura 22. Inmuloalización de AtPPa4 mediante microscopía electrónica de transmisión. (A-D) Las plantas transgénicas de 28 ddg de *Arabidopsis thaliana*, expresando en forma estable la fusión AtPPa4-CFP, bajo el control del promotor 35S, se fijaron, se seccionaron y se revelaron con anticuerpo anti-GFP y anticuerpo secundario conjugados a partículas de oro de 15 nm. (A) Imágenes de dos células en contacto y su espacio intercelular. (B) Magnificación del área marcada con el cuadro negro. (C) Detalle del espacio intracelular entre dos células. (D) Detalle de la pared celular y el citoplasma en el dominio lateral de dos células vecinas. (E) Vista del espacio intracelular entre varias células. (F) Magnificación del área marcada con el cuadro negro. (G) Vista de dos células en contacto, se destaca la pared celular y citoplasma. (H) Imágenes de dos células en contacto, la pared celular y su espacio intercelular. (I) Imágenes de dos células en contacto y su espacio intercelular. (J) Imágenes de dos células en contacto y la pared celular. Los cuadros negros pequeños enmarcan el área magnificada dentro del cuadro grande. Todas la imágenes corresponden a células parenquimatosas fotosintéticas. Las flechas indican las partículas de oro (puntos densos). Cloroplasto (Cl), Vacuola (V), Citoplasma (Ci), Pared celular (PC), Núcleo (N), Espacio intercelular (EIC).

Se recabó evidencia adicional de la presencia de esta isoforma en los sitios de distribución observados en la pared celular, el espacio intercelular y un poco en el citoplasma en *Arabidopsis* mediante la expresión transitoria en epidermis de cebolla (Fig. 23 A-C). Su presencia clara en los extremos polares de la célula fue evidente (Fig. 23 A) y se reprodujo consistentemente en varios experimentos independientes (no mostrados). Como controles, también se transformó epidermis de cebolla con 35S:GFP-GUS (Fig. 23 D-F) y sin DNA (Fig. 23 G-I). La fluorescencia de las transformantes con GFP-GUS se observó en el citoplasma y en la membrana plasmática, descartando que la distribución de AtPPa4-YFP fuese debido a la proteína fluorescente. La epidermis de cebolla transformada fue sometida a plasmólisis con 1 M de NaCl con el objetivo de contraer el citoplasma y que se separara de la pared celular. Con todos estos datos se corroboró que la pirofosfatasa inorgánica soluble isoforma cuatro de *A. thaliana* es citoplasmática pero además se localiza en la pared celular y el espacio intercelular. Se enfatiza que esta es la primera vez que esta isoforma se ubica en la pared celular y el espacio intercelular.

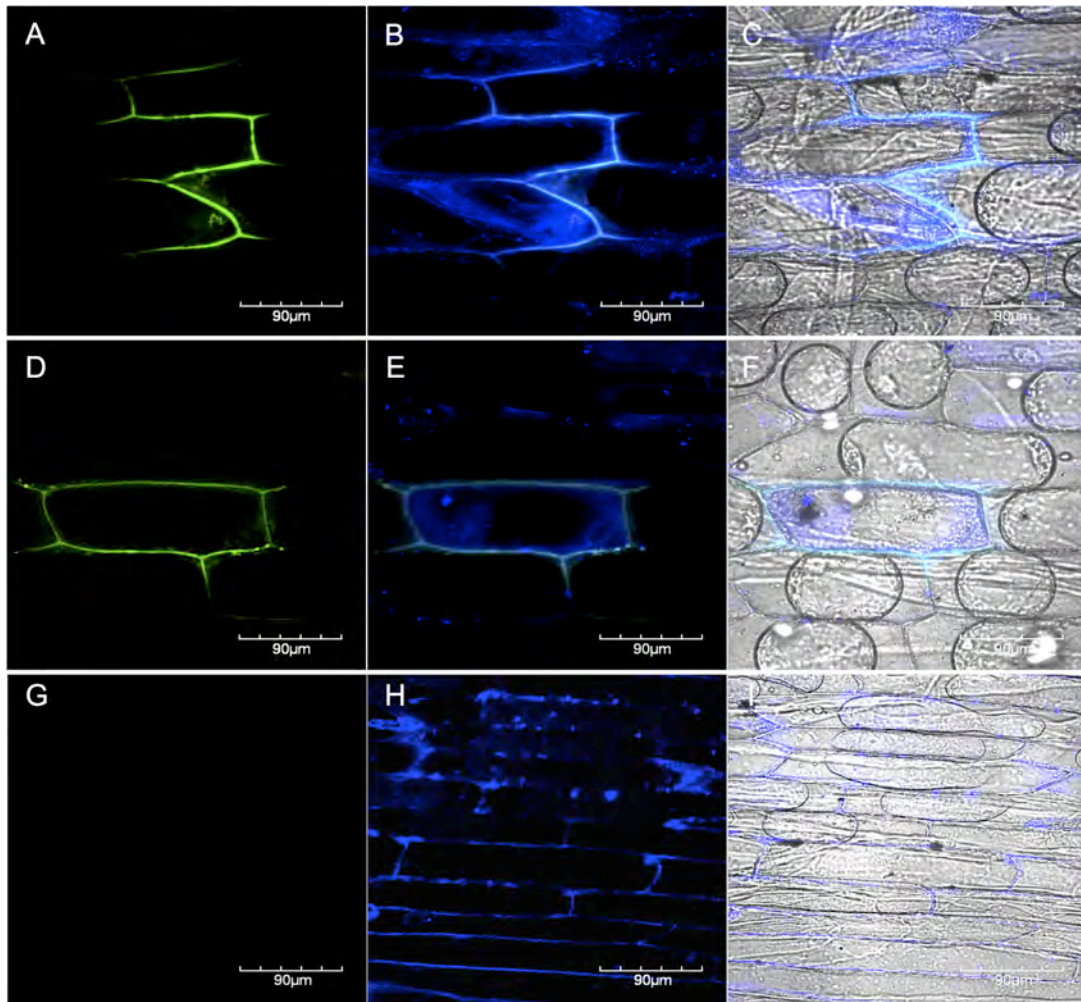


Figura 23. Expresión transitoria de AtPPa4-YFP en células de epidermis de cebolla bombardeadas con balas cargadas con la construcción 35S:AtPPa4-YFP (**A-C**), o con la construcción 35S: GFP-GUS (**D-F**), o con balas sin DNA (**G-I**). La detección mediante microscopía confocal de la señal de fluorescencia de YFP (A) y GFP (D) fue superpuesta con la señal de calcofluor de la pared celular (**B, E y H**, respectivamente) y con las imágenes de contraste de fases (**C, F e I**, respectivamente). El tejido fue tratado con 1M de NaCl. La plasmólisis de las células se indica con las flechas. Las imágenes corresponden a múltiples planos superpuestos (eje Z).

9.8. Localización subcelular de la isoforma seis de la pirofosfatasa inorgánica soluble de *A. thaliana* in vivo

Para localizar subcelularmente a la isoforma seis, se analizaron tejidos frescos y fijado de hojas de plantas transgénicas adultas (28 ddg) que expresaban la construcción AtPPa6-YFP (Fig. 24 y 25). Esta isoforma se considera la única pirofosfatasa inorgánica soluble de cloroplasto en *Arabidopsis*. La señal de fluorescencia tanto en tejido fijo como en tejido fresco fue la misma, observándose una acumulación exclusiva en los cloroplastos (Fig. 24), consistente con los reportes previos. Los análisis de inmunolocalización (Fig. 25) realizados con microscopía electrónica de transmisión confirmaron la localización observada mediante microscopía confocal (Fig. 24).

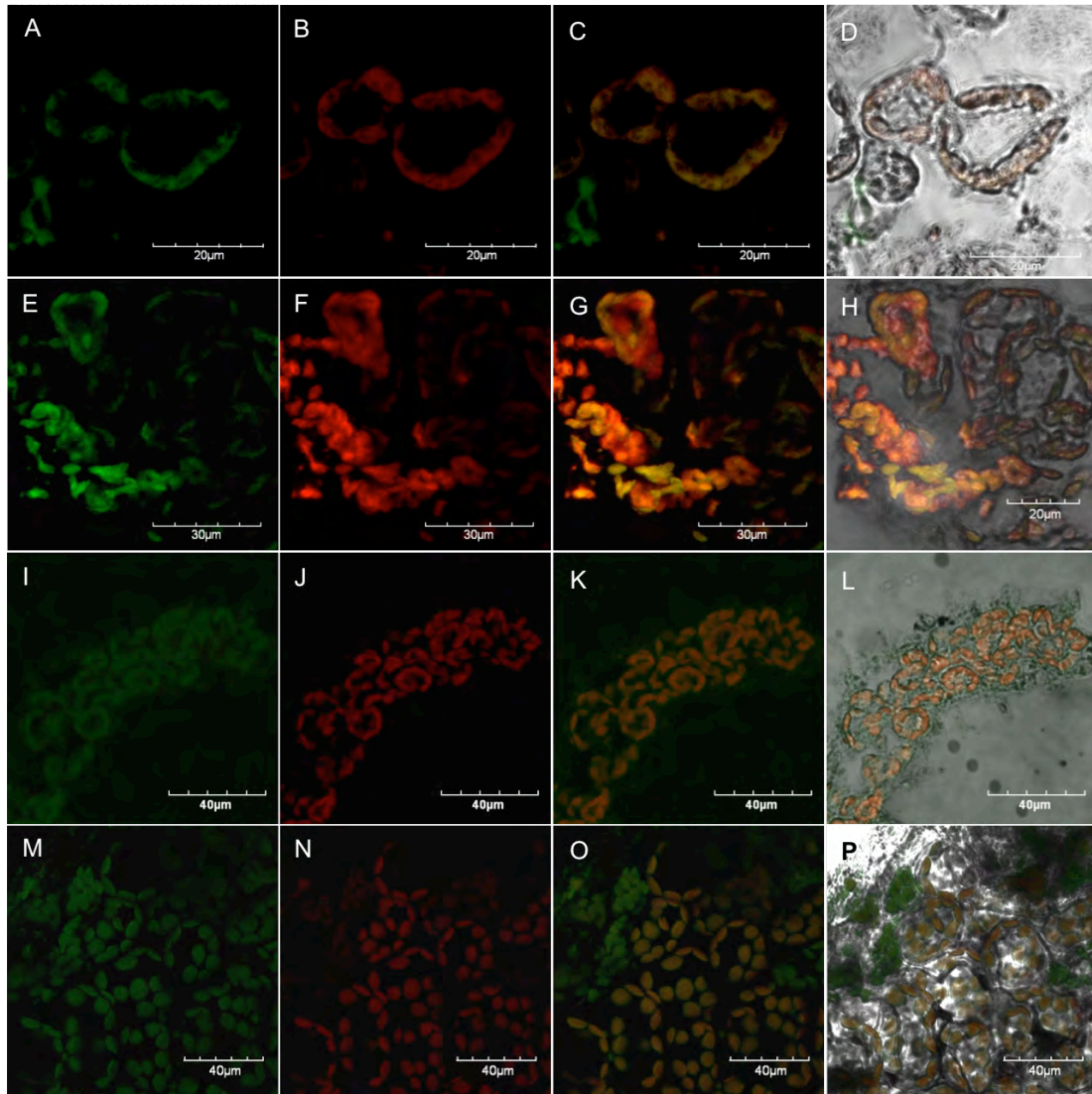


Figura 24. Localización en el cloroplasto *in vivo* de AtPPa6. Detección mediante microscopía confocal de la pirofosfatasa inorgánica soluble de *Arabidopsis thaliana*, isoforma 6, fusionada a la proteína amarilla fluorescente con expresión estable en plantas transgénicas de *A. thaliana* bajo el control del promotor 35S. Secciones de hoja de plantas de *A. thaliana* (28 ddg) como preparaciones frescas (M-P; 40X zoom 2.5X) y después de la fijación (A-L; A-D, 60X zoom 5X; E-H 60X; I-L, 40X) fueron observadas en microscopía confocal. La emisión de fluorescencia de YFP se muestra en verde (A, E, I y M), la fluorescencia intrínseca de los cloroplastos se muestra en rojo (B, F, J y N), la superposición de YFP y la fluorescencia intrínseca de los cloroplastos (C, G, K y O) y la superposición de YFP y la fluorescencia intrínseca de los cloroplastos y contraste de fases (D, H, L y P). Las imágenes fueron en múltiples planos superpuestos (eje Z).

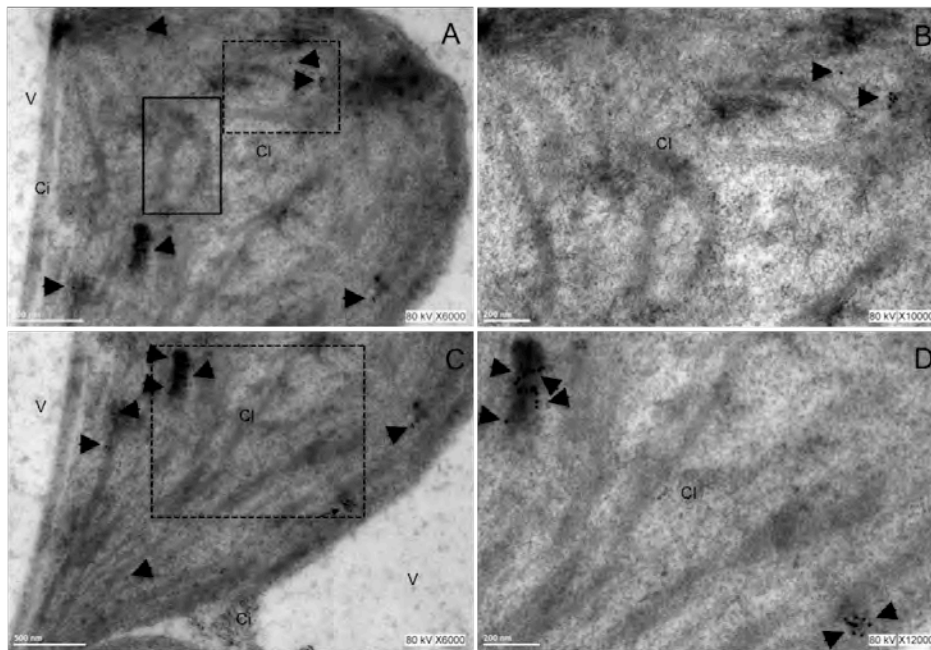


Figura 25. Detección mediante microscopía electrónica de transmisión de AtPPa6. Hojas de plantas transgénicas de *A. thaliana* de 28 ddg expresando la pirofosfatasa AtPPa6 fusionada a YFP en forma estable bajo el promotor 35S fueron fijadas, seccionadas y reveladas con anticuerpo anti-GFP y anticuerpo secundario conjugado a partículas de oro (15 nm) (A-D). Las flechas negras indican la marca de oro. Los cuadros de líneas continuas (A) enmarcan los tilacoides con morfología alterada, los cuadro con la línea punteada enmarcan el área magnificada en (B) Cloroplasto (Cl), Vacuola (V), Citoplasma (Ci), Pared celular (PC), Núcleo (N), Espacio intercelular (EIC).

9.8.1. Alteración de la morfología de los cloroplastos en plantas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción 35S::AtPPa6-YFP

En todas las imágenes de microscopía electrónica de la isoforma AtPPa6-YFP, los cloroplastos presentaron alteraciones en su morfología en la línea transgénica (Fig. 26 A y B). Aunque los tilacoides formaban las grana de manera normal, se observaron alteraciones como el acomodo desordenado en el apilamiento de los tilacoides (Fig. 26 B y C), así como un aumento en su volumen (Fig. 26 C), además de una distribución anormal de la grana (Fig. 26 C). Pese a estas

alteraciones de los cloroplastos, las plantas transgénicas presentaron un desarrollo y coloración normales (comparadas con el resto de las transgénicas aquí empleadas o a la silvestre), no hubo evidencia de la acumulación de las antocianinas, aunque crecieron lentamente (comparado a las plantas silvestres). Es decir, no hubo indicios de que los cloroplastos fuesen disfuncionales.

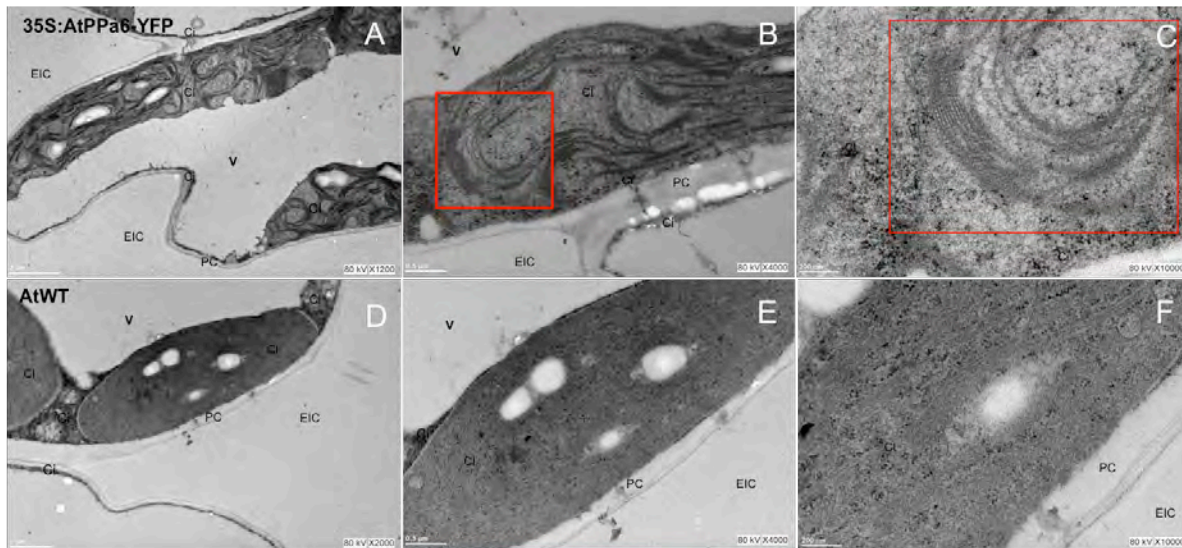


Figura 26. Micrografías electrónicas de transmisión de plantas transgénicas AtPPa6-YFP (**A-C**) y AtWT (**D-F**). Los niveles de magnificación aumentan de derecha a izquierda mostrando los detalles generales de la célula (**A**, 1200x; **D**, 2000x), haciendo un acercamiento al cloroplasto (**B**, **E** 4000x) y a la grana (**C**, **F** 10000x). Los cuadros rojos dentro de las imágenes de la derecha (**B** y **E**) indican la región magnificada para registrar la imagen a su derecha (**C** y **D**, respectivamente). Cloroplasto (Cl), Vacuola (V), Citoplasma (Ci), Pared celular (PC), Espacio intercelular (EIC).

9.8.2. Análisis del fotosistema 2 de las plantas transformadas con la construcción AtPPa4-CFP y AtPPa6-YFP

Debido a que las alteraciones en la morfología de los cloroplastos no reflejaban alteraciones fisiológicas evidentes en la plantas, siendo sus partes aéreas verdes y sin antocianinas u otros signos de estrés obvio, se evaluó si los cloroplastos tenían algún daño, para lo que se analizó la fluorescencia de la Chl *a* del fotosistema 2 (PSII). El perfil de emisión de fluorescencia de PSII registrado con plantas transgénicas AtPPa6-YFP fue muy similar al de las silvestres con valores de fluorescencia relativa (F_V/F_M) de 0.836 y 0.829 respectivamente (Fig. 27 A). Como control, para descartar que algunas de las alteraciones fueran por la transformación, decidimos utilizar plantas transformadas con AtPPa4-CFP y evaluar su fluorescencia de Chl *a*, obteniendo un valor de F_V/F_M de 0.831 (Fig. 27 A), lo que indicó nulas diferencias significativas en la fluorescencia en las diferentes plantas (Fig. 27 B), Estos resultados indican que dichas plantas tienen un fotosistema 2 funcional y, probablemente, su fotosíntesis sea normal, si bien, una conclusión definitiva sólo podría plantearse luego de un análisis más detallado de la función fotosintética, y la morfología utilizando más líneas transgénicas.

Planta	F_0	F_M	F_V/F_M
AtWT	203 ± 14 ^a	995 ± 106 ^a	0.829 ± 0.015 ^a
AtPPa6-YFP	205 ± 13 ^a	1044 ± 70 ^{ab}	0.836 ± 0.010 ^a
AtPPa4-CFP	226 ± 14 ^b	1097 ± 54 ^b	0.831 ± 0.006 ^a

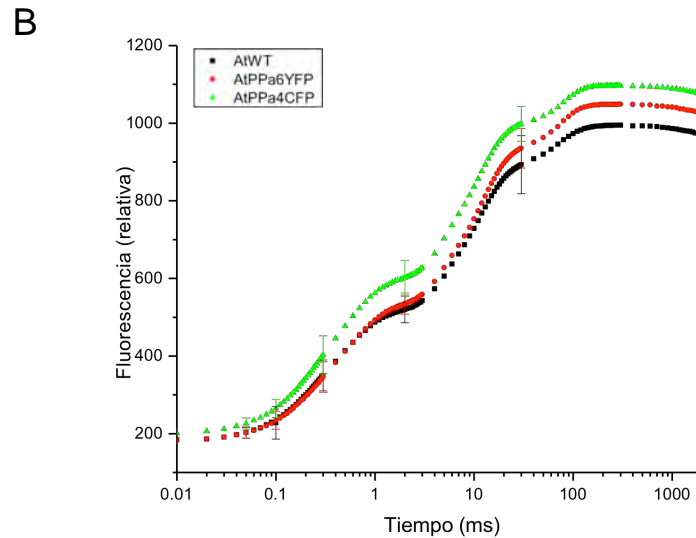


Figura 27. Análisis de la fluorescencia del fotosistema II en hojas intactas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (AtWT; cuadros negros) y las líneas transgénicas AtPPa4-CFP (triángulos verdes) y AtPPa6-YFP (círculos rojos). (A) Fluorescencia basal (F_0), Fluorescencia media (F_M) y proporción de variación de la fluorescencia media (F_V/F_M). (B) Fluorescencia relativa vs tiempo después de la iluminación. La fluorescencia fue determinada usando un espectrofluorímetro Hansatech. Los análisis estadísticos para F_0 , F_M , y F_V/F_M , se realizaron con One-Way ANOVA. Las diferentes letras nos muestran las diferencias estadísticas (Turkey post hoc, $p=0.05$, $n=20$).

9.9. Localización celular de las isoformas cuatro, cinco y seis en raíces de *A. thaliana*

No hay ningún reporte previo donde se analice la distribución celular y subcelular de las diferentes isoformas de pirofosfatasa inorgánica solubles en raíces, por lo que este es el primer trabajo donde se realizó la localización celular de las PPa en raíces de plantas transformantes. Para este estudio se utilizaron plantas transgénicas de todas las isoformas fusionadas a proteínas fluorescentes, sin

embargo no fue posible detectar señal confiable en todas, por lo que únicamente se reporta la localización en raíces de AtPPa4-YFP, AtPPa5-YFP y AtPPa6-YFP en plantas de 14 ddg. En la raíz primaria se observaron diferencias en ciertas zonas y en diferentes tipos celulares dependiendo de la isoforma. La fluorescencia en raíces de AtPPa4-YFP se observó en la zona de diferenciación celular, aparentemente en todos los tipos celulares, aunque no se observó fluorescencia en los pelos radiculares y tampoco en raíces secundarias (Fig. 28 B y C). La localización subcelular de esta isoforma en las raíces fue evidente tanto en la pared celular, como en el citoplasma, (Fig. 28 B y C). En plantas transformadas con AtPPa5-YFP, la fluorescencia se detectó en células del cortex y el periciclo (Fig. 28 E y Fig. 29 C y D) y en la zona de diferenciación celular de la raíz primaria (Fig. 28 D y E; Fig. 29 A-D), mientras que en plantas AtPPa6-YFP se observó en células del cortex, la endodermis y el periciclo (Fig. 29 E-L) y en las zonas de elongación y diferenciación de la raíz primaria (Fig. 28 F y G; Fig. 29 E-L). Tanto en raíces primarias de AtPPa5-YFP como de AtPPa6-YFP su distribución fue aparentemente en toda la célula, lo que parece indicar una distribución citoplasmática para ambas isoformas en la raíz (Fig. 29), sin embargo será necesario realizar observaciones con mayor acercamiento de la raíz que nos permita ver con detalle la distribución intracelular de estas isoformas, así como realizar análisis de la distribución subcelular de AtPPa6, ya que en este trabajo la señal se detecta aparentemente en el citoplasma, sin embargo en hojas esta isoforma es exclusivamente de cloroplasto. Además de las isoformas antes mencionadas, también se detectó señal de fluorescencia de AtPPa2-CFP y AtPPa3-CFP (Fig. 5A; ANEXOS), sin embargo, debido a la débil señal obtenida no

se realizó un análisis de localización con mayor detalle. En ningún caso se observó señal de fluorescencia en las raíces secundarias y tampoco en los pelos radiculares.

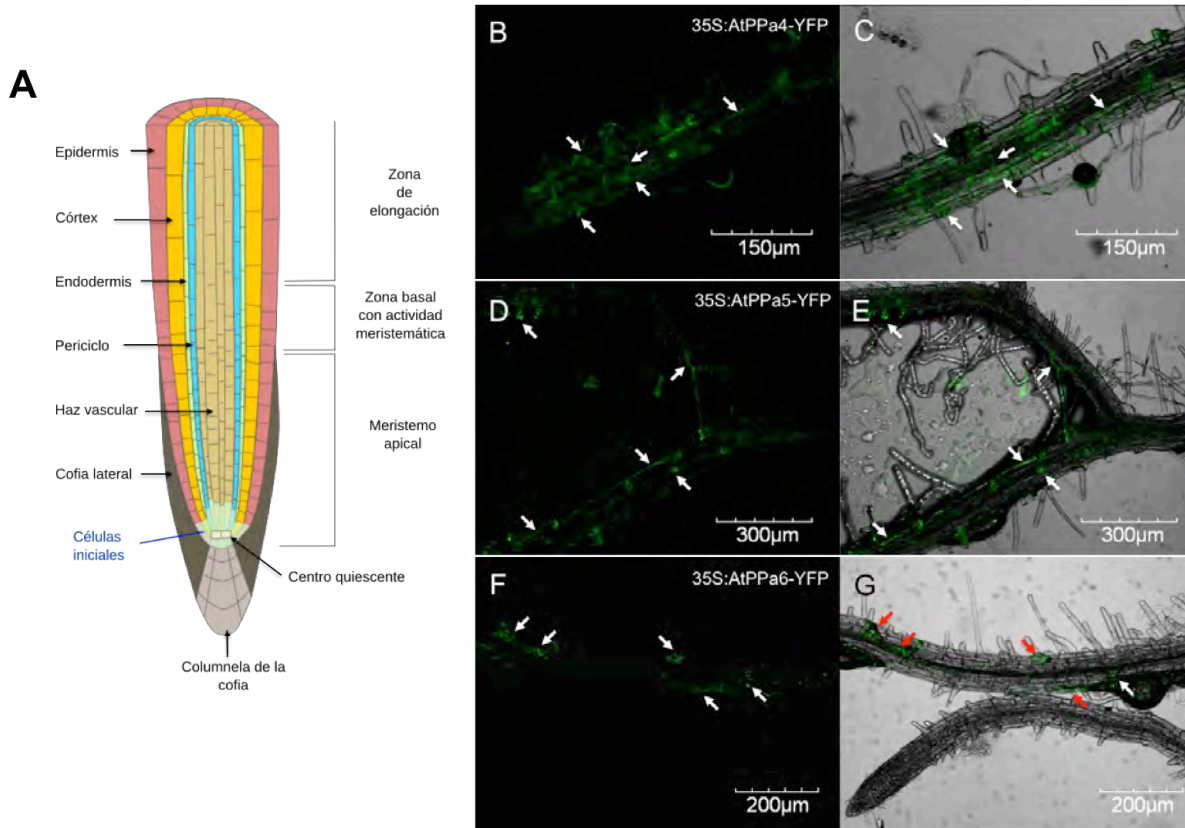


Figura 28. Detección mediante microscopía confocal de la pirofosfatasa inorgánica soluble, isoformas AtPPa4, AtPPa5 y AtPPa6, en la raíz primaria intacta de plantas transgénicas de *A. thaliana* expresando las construcciones 35S::AtPPa4-YFP, 35S::AtPPa5-YFP y 35S::AtPPa6-YFP en forma estable. A) Imagen de la división de la raíz primaria en las diferentes zonas de crecimiento y los tipos celulares (tomada y modificada de https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-v/guiada_o_v_rprimario.php). B) Raíces completas de plantas de 14 ddg fueron observadas en microscopía confocal a las longitudes de onda de excitación y emisión de YFP. (A-B) AtPPa4-YFP, 10X. (C-D) AtPPa5-YFP, 10X. (E-F) AtPPa6-YFP 10X. Emisión de fluorescencia de YFP (A, C y E). Sobreposición de fluorescencia de YFP y contraste de fases (B, D y F). Las imágenes de confocal fueron tomadas en múltiples planos superpuestos (eje Z). Las flechas indican la localización de la fluorescencia de las pirofosfatasas.

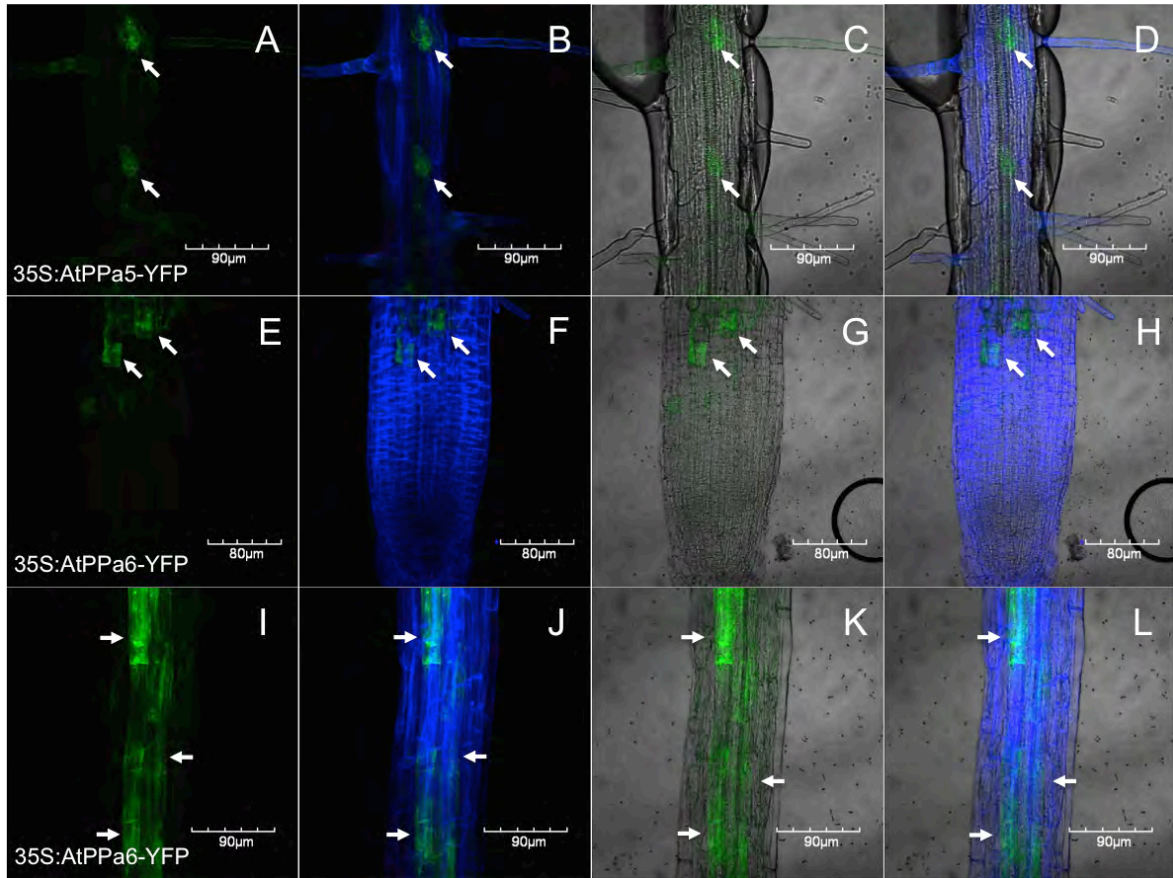


Figura 29. Detección mediante microscopía confocal de las pirofosfatasa inorgánica solubles, isoformas AtPPa5 y AtPPa6, en la raíz primaria intacta de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* expresando las construcciones 35S::AtPPa5-YFP y 35S::AtPPa6-YFP en forma estable. Raíces completas de plantas de 14 ddg fueron observadas en microscopía confocal a las longitudes de onda de excitación y emisión de YFP. **(A-D)** Localización de AtPPa5-YFP en la zona de diferenciación de la raíz, 40X. **(E-H)** Localización de AtPPa6-YFP en la zona de división celular de la raíz, 40X. **(I-L)** Localización de AtPPa6-YFP en la zona de elongación de la raíz, 40X. Emisión de fluorescencia de YFP **(A, E y I)**. Sobreposición de fluorescencia de YFP y la señal de calcofluor de la pared celular **(B, F y J)** Sobreposición de fluorescencia de YFP y contraste de fases **(C, G y K)**. Sobreposición de fluorescencia de YFP, la señal de calcofluor de la pared celular y contraste de fases **(D, H y L)**. Las imágenes de confocal fueron tomadas en múltiples planos superpuestos (eje Z). Las flechas blancas indican la localización de la fluorescencia de las pirofosfatasa.

9.10. Inmunoprecipitación de las isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles de *A. thaliana*

Con la intención de entender el posible patrón de localización de las diferentes isoformas de las pirofosfatasas inorgánicas solubles y la relación de su localización con su interacción con otras proteínas, y debido a que no hay información sobre este tema, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando extractos proteicos obtenidos de plantas transgénicas AtPPa1-CFP, AtPPa2-CFP, AtPPa3-CFP, AtPPa4-CFP, AtPPa5-YFP y AtPPa6-YFP de 28 ddg, así como de los controles obtenidos de plantas transformadas con GFP, plantas AtWT y un tratamiento sin proteína vegetal, utilizando anticuerpos Anti-GFP. Con los inmunoprecitados obtenidos, se realizaron análisis de *western blot*, así como geles SDS-PAGE teñidos con plata. Se analizó el patrón diferencial en el número de bandas en geles de SDS-PAGE teñidos con plata y se observó mayor abundancia de proteínas en la inmunoprecipitación de AtPPa2-CFP y AtPPa5-YFP (Fig. 30 A y B), si bien, aunque en menor abundancia también se observaron bandas en los inmunoprecitados de las otras isoformas. Además de las diferencias en las abundancias de proteínas, también se observaron bandas presentes en los inmunoprecitados de algunas isoformas aparentemente ausentes con otras isoformas (Fig. 30 A; marcas en color rojo). Sin embargo, las diferencias en el patrón electroforético entre las diferentes inmunoprecitados de las isoformas y la AtWT fueron ligeras, aunque no hay certeza que las proteínas presentes en las bandas fueron iguales en todos los casos, debido a que se pudieron inmunoprecipitar proteínas diferentes con tamaños similares, sin

embargo con una electroforesis de una dimensión no es posible saberlo. Para un análisis más detallado de los patrones de proteínas observados en geles de una dimensión, se decidió hacer un gel 2D SDS-PAGE de los inmunoprecipitados de AtPPa5-YFP y AtWT. Se escogió esta isoforma debido a que fue donde se observó mayor abundancia de proteínas asociadas a las PPa, relevante para la técnica de 2D que necesita de una gran cantidad de proteínas. En los geles 2D se encontraron diferencias en el número de manchas entre la silvestre y AtPPa5-YFP, así como en la distribución de estas (Fig. 31; círculos rojos) y aunque en la AtWT se observaron manchas que podrían corresponder a uniones inespecíficas o a las IgG, también se encontraron manchas en AtPPa5-YFP que no coinciden con las observadas en AtWT. Es importante mencionar que se presentan pocas manchas pero fue consistente con la pobre recuperación de proteína en los inmunoprecipitados, lo cual mejora las oportunidades de detectar interacciones proteína-proteína fisiológicamente significativas, debido a que se reduce la posibilidad de uniones inespecíficas por las altas concentraciones de proteína. Los geles se tiñeron con plata para mejorar la sensibilidad, lo que influyó en la recuperación de fragmentos para identificación mediante los análisis de espectrometría de masas.

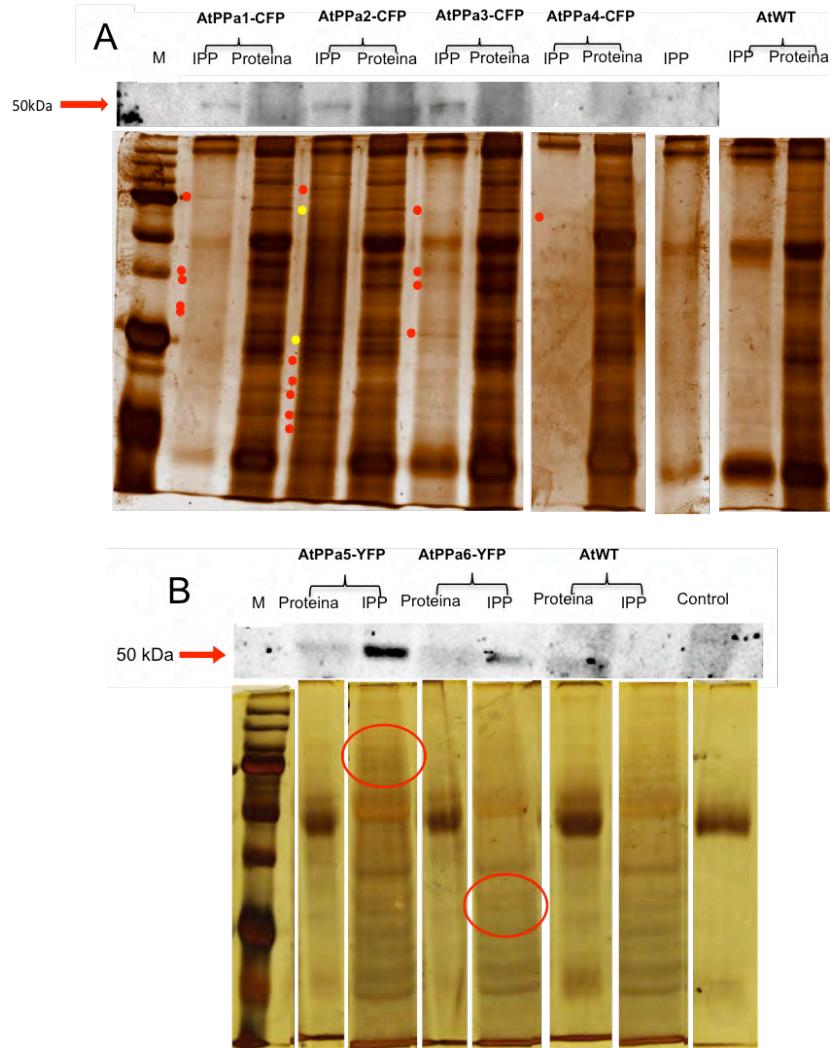


Figura 30. Inmunoprecipitación de proteínas. Los inmunoprecipitados se realizaron con extractos proteicos obtenidos de plantas transformadas con la proteína de fusión AtPPa1-CFP, AtPPa2-CFP, AtPPa3-CFP, AtPPa4-CFP, AtPPa5-YFP, AtPPa6-YFP, así como plantas AtWT. Los geles corresponden a geles SDS-PAGE teñidos con plata (**A** y **B**). La detección de las proteínas de fusión por inmunoblot de los inmunoprecipitados, usando anticuerpo Anti-GFP (**A** y **B**). **A**) Geles e inmunoblot de AtPPa1-CFP, AtPPa2-CFP, AtPPa3-CFP, AtPPa4-CFP y AtWT (Inmunoprecipitados (IPP) y proteína). **B**) Geles e inmunoblot de AtWT, AtPPa5-YFP y AtPPa6-YFP (Inmunoprecipitados (IPP) y proteína). Los inmunoprecipitados se realizaron con 800 µg de proteína. Plantas de 28 ddg. Los círculos rojos señalan las diferencias en el patrón de bandas en **B**. Las marcas rojas señalan las diferencias en el patrón de bandas en los inmunoprecipitados (**A**).

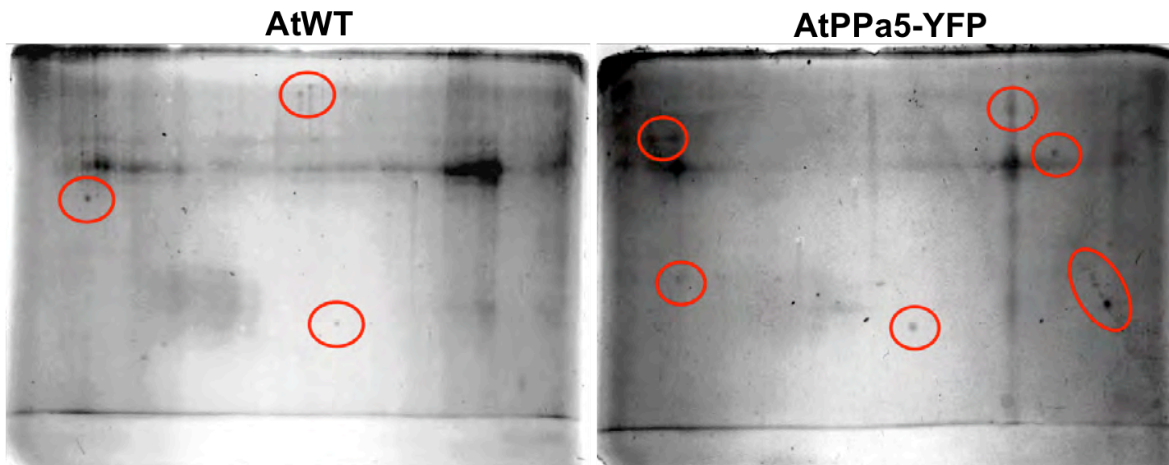


Figura 31. Geles 2D-SDS-PAGE de inmunoprecipitados de AtPPa5-YFP y AtWT. Los inmunoprecipitados se realizaron con extractos proteicos obtenidos de plantas transformadas con la proteína de fusión AtPPa5-YFP y de plantas AtWT de 28 ddg. Los geles corresponden a geles SDS-PAGE teñidos con plata. Los inmunoprecipitados se realizaron con 800 µg de proteína. Los círculos rojos señalan las manchas correspondientes a proteínas en cada gel 2D-SDS-PAGE.

Los inmunoprecipitados de AtPPa1-CFP, AtPPa2-CFP, AtPPa3-CFP, AtPPa4-CFP, AtPPa5-YF, AtPPa6-YFP, GFP y el control con AtWT se recuperaron conforme a lo descrito en la sección 8.8 (Materiales y Métodos) y se enviaron a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI), Facultad de Química, UNAM, para su identificación mediante espectrometría de masas. Se incluyó un tratamiento testigo sin proteína vegetal, pero con las IgG. No en todos los casos se logró identificar proteínas con confiabilidad suficiente, debido a que los parámetros como el *score*, la cobertura o la abundancia fueron muy bajos, además en el caso de la isoforma AtPPa6-YFP no se encontró ninguna proteína; sin embargo, los casos en que fue posible tal identificación se resumen en la Tabla 3. Una de las proteínas identificadas en el inmunoprecipitado de AtPPa4-CFP fue la Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Esta proteína es una enzima

glucolítica (Muñoz-Bertomeu et al, 2009) que juega un papel regulador en la síntesis de aminoácidos (Muñoz-Bertomeu et al, 2010), es central en el ciclo de Calvin en el cloroplasto (Anoman et al, 2016) y su expresión responde a diversas formas de estrés abiótico (Yang et al, 1993) lo cual la relaciona con las pirofosfatasa inorgánicas solubles, que, como se ha discutido, son importantes en el crecimiento y las respuestas a estrés (vease apartado 4.4.1). Por otro lado, en los inmunoprecipitados de 35S::AtPPa3-CFP se identificaron las proteínas Ribulosa bifosfato carboxilasa subunidad 2 y un fragmento de una proteína de sarcoplasma. En los inmunoprecipitados de 35S::AtPPa2-CFP, se identificó una proteína involucrada en estabilizar el cluster de Mn^{2+} en la proteína que se encarga de producir O_2 a partir de H_2O (complejo envolvente de O_2). Para el análisis se tomaron en cuenta las proteínas que se identificaron únicamente en los inmunoprecipitados obtenidos de las plantas transgénicas con las isoformas y se desecharon las proteínas que se encontraban en los controles. Si bien estos resultados sugieren una posible interacción de algunas enzimas AtPPa con proteínas del metabolismo primario, se requerirán más estudios para fundamentar tal propuesta.

Tabla 3. Secuencias de proteínas identificadas mediante espectrometría de masas de los inmunoprecipitados de extractos proteicos obtenidos de plantas transgénicas expresando las proteínas de fusión AtPPa1-CFP, AtPPa2-CFP, AtPPa3-CFP, AtPPa4-CFP, AtGFP, así como plantas AtWT y un testigo control sin proteína vegetal.

	Acceso	Proteína	Cobertura (%)	mW (Da)
AtPPa1-CFP	DTD_JANSC	D aminoacyl tRNA deacylase	29.2517	15513
	E4MVI7_EUTHA	mRNA clone RTFL01 06 B11	16.1654	27058
	A0A0Q6WDR2_9BURK	Aldolase	19.6787	27199
	A0A0Q9LH50_9BACL	Uncharacterized protein	15.2542	32979
AtPPa2-CFP	PSBQ1_ARATH	Oxygen evolving enhancer protein 3 1 chloroplastic	32.1429	
	T5C9P6_AJEDE	Proteasome subunit alpha	13.468	31992
AtPPa3-CFP	SCP_CHIOP	Sarcoplasmic calcium binding protein Fragment	100	
	RBS2B_ARATH	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain 2B chloroplastic	17.6796	
	C7DGQ4_MICA2	Putative uncharacterized protein Fragment	59.4937	8628
	RS12_HYDS0	30S ribosomal protein S12	35.5556	14697
AtPPa4-CFP	G3PA_SINAL	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase A chloroplastic Fragment	10.7296	
AtGFP	***	***	***	***
AtWT	***	***	***	***
IgG	***	***	***	***

* Las inmunoprecipitados en solución fueron sometidos a tripsinización y los fragmentos fueron identificados por espectrofotometría de masas, Aquos-nanoLC-ESI-MS-MS (quadropole/time of light, synapt G2 high definition mass spectrometer, Waters Corporation) equipado con una fuente de ion NanoLockSpray y acoplado en línea a un nano Acquity Ultra Performance liquid chromatograph (UPLC). Los fragmentos fueron detectados con una columna BEH, C18 UPLC (1.7µm, 75µm x 100mm, Waters Corporation). Para la identificación de los fragmentos, los datos DDA se procesaron en el servidor global ProteinLynx versión 2.4 y el software (PLGS, Waters Corporation) y se realizó la comparación con la base de datos UniprotSprot.

*** No se identificaron señales que pudieran adscribirse a alguna proteína conocida.

10. DISCUSIÓN

En las plantas terrestres se ha reportado la presencia de tres o más isoformas de proteínas PPa (Gutiérrez-Luna et al, 2016) y al menos una isoforma parece estar presente en todos los eucariontes fotosintéticos. A pesar de que parecen ser esenciales (George et al, 2010), sus funciones en el metabolismo de las plantas no han sido del todo esclarecidas. La relevancia de la hidrólisis de PPi en la reacciones principales del metabolismo y la necesidad de reciclar el fósforo no están en duda (Kornberg, 1962; Lundin et al, 1991), pero hasta qué punto las diversas isoformas de PPa son requeridas para dicha función no es claro, ya que existe la actividad de las enzimas membranales (PPv; Gaxiola et al, 2009), las enzimas PS2 han sido muy poco estudiadas en este contexto (May et al, 2011) y el panorama se complica por la presencia de múltiples isoformas de cada uno de estos grupos de proteínas. En el caso de las PPa, es posible que funciones específicas de cada una de las isoformas pudieran estar relacionadas con la localización y distribución subcelular. Esta tesis explora la localización subcelular de las 6 diferentes isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles de la familia I en *A. thaliana*. Además se comprueba la localización cloroplástica de la isoforma 6 *in vivo* y se obtuvo evidencia que su localización es exclusiva de este último organelo en hoja.

Durante el proceso de selección y crecimiento de las plantas, se observaron algunas diferencias entre las plantas transgénicas y la variedad silvestre (WT). Estas diferencias fueron muy notables ya que en general todas las plantas transformadas con la proteína de fusión presentaban una disminución del tamaño

con respecto a la variedad WT, retraso en el desarrollo de al menos una semana y en el crecimiento del tallo floral, así como hojas más pequeñas y algunas presentaron baja producción de semilla, particularmente AtPPa4-CFP y AtPPa6-YFP, que producen muy pocas semillas por planta con baja tasa de germinabilidad. Aunque estas observaciones no fueron objeto de una documentación sistemática, ni de un análisis cuantitativo es recomendable abordar los fenotipos con mayor detalle en el futuro.

Es importante recalcar que en el laboratorio ya ha sido reportado que en plantas mutantes nulas o con baja expresión de los genes que codifican para alguna de las PPa causan cambios en la morfología, como alteración en el número de tallos florales, silicuas y producción de semillas. Incluso, en el caso de plantas mutantes por inserción de T-DNA en el gen codificante para la proteína *AtPPa4* no hay desarrollo de silicuas, ni producción de semillas más allá de la T1 (Perales-Baños, 2008 ; De Villafranca-Casas, 2011).

El hecho de que tanto la eliminación de la expresión, como los intentos de sobreexpresión tengan consecuencias negativas en la planta habla de la necesidad de una regulación estricta en el nivel de expresión de estas proteínas y, dado que las seis transgénicas estables expresando alguna PPa bajo el control del promotor 35S se comportaran de manera semejante, es posible que exista regulación de la expresión de estas proteínas a nivel transcripcional, por miRNA y/o a nivel traduccional, sin embargo se desconoce la regulación en la expresión de estos genes. Será necesario seguir realizando estudios más detallados sobre el papel de las PPa en la fisiología de las plantas para explorar éstas y otros interrogantes.

Por otro lado, se determinó la expresión de la proteína de fusión observándose una banda correspondiente al peso esperado de la proteína de fusión (AtPPax-XFP; 45-50 kDa) de cada una de las transgénicas y la misma banda estaba ausente en las plantas WT (Fig. 9) y no hubo indicios de degradación de alguna de las proteínas. El uso de anticuerpos anti-GFP se debe a que no ha sido posible obtener anticuerpos específicos para cada una de las pirofosfatasa, lo cual no es sorprendente, pues el porcentaje de identidad entre las diferentes isoformas es muy alto (70-75%), y las diferencias más marcadas, que se concentran en la región del extremo amino no son suficientes para elegir una región inmunogénica diferencial de un tamaño adecuado (datos no mostrados). Se evaluó la actividad pirofosfatasa con la intención de explorar si la expresión de estas proteínas alteraba el perfil de actividad pirofosfatasa en las plantas transgénicas. Se esperaba observar un aumento en la actividad de las plantas, sin embargo los sutiles cambios fueron indicando una baja expresión de estas pirofosfatasa, a pesar de estar bajo un promotor de sobreexpresión (CaMV35S). Esta probable regulación también se reflejó en la baja señal de fluorescencia que se observó durante la localización subcelular de las proteínas y la cuál fue adjudicada a una baja síntesis y acumulación de las pirofosfatasa. Incluso en las plantas control que expresan la proteína fluorescente GFP bajo el control del promotor 35S, se observó una menor actividad relativa a la AtWT (29% reducción), si bien no tenemos una explicación para esta observación. Se conoce poco sobre la regulación postraducciona de las PPa, sin embargo las concentraciones altas y constantes de PPI en las células de las plantas sugieren una forma de regulación muy fina de la actividad, probablemente mediada por pH, niveles de Ca^{2+} y Mg^{2+}

(Navarro de la Sancha, 2007) o mediante la asociación con otras proteínas u otros factores desconocidos. Se ha reportado que hay una disminución de la actividad de la isoforma AtPPa1 en presencia de Pi (Carranza-Trinidad, 2016), además en un análisis fosfoproteómico se encontraron fosforiladas las isoformas AtPPa1, AtPPa3 y AtPPa5 en respuesta a deficiencia de hierro (Lan et al, 2012), lo que sugiere formas de regulación mediadas por el producto o por modificaciones postraduccionales, aunque aún son necesarios más estudios. Claramente hacen falta más estudios para clarificar estos aspectos. Lo que sí es destacable es que los perfiles de actividad de las plantas transgénicas de cada una de las pirofosfatasa son diferentes entre sí (Fig S1, Gutiérrez-Luna et al, 2016; Fig. 10), lo que nos sugiere una respuesta regulatoria de la planta en la expresión de las pirofosfatasa que le permita mantener la homeóstasis de pirofosfato en la célula. Desafortunadamente, las isoformas no pudieron ser fraccionadas por otra técnica y no hemos logrado establecer una correspondencia entre los picos de actividad y fluorescencia con las diferentes isoformas. Los datos de proteómica realizados con *Capsicum annum* L. indican que una misma isoforma puede estar presente en más de un pico (Rocío Andrade Luna, tesis de licenciatura), lo que sugiere la presencia de modificaciones postraduccionales.

También se intentó separar las actividades por medio de cromatografía de filtración en gel, pero desafortunadamente la resolución de la técnica no fue la adecuada para separar los picos esperados (50 y 25 kDa) con suficiente claridad. Es posible que la proteína de fusión no se encuentre activa, o bien que las isoformas endógenas presentes en los extractos crudos se asocien a otras

proteínas y eluyan de la columna en forma anómala. Resolver estos aspectos requerirá de estudios bioquímicos mas detallados.

En este trabajo se demostró que las seis isoformas de PPa de Arabidopsis tienen una localización subcelular diferente, aunque se confirma que su ubicación principal es citoplasmática, menos para la isoforma seis. En plantas de 10 días no fue posible observar señal de fluorescencia de las proteínas de fusión y en plantas de 14 ddg sólo se pudo observar la señal de algunas isoformas como es el caso de la isoforma AtPPa1-CFP, AtPPa5-YFP y AtPPa6-YFP (Fig. 11). En el caso de las isoformas AtPPa5-YFP y AtPPa6-YFP se observó el mismo patrón de señal de fluorescencia que observamos en plantas de 28 ddg (Fig. 15 y 24; Tabla 2). Sin embargo AtPPa1-CFP si presentó diferencias en su distribución en plantas jóvenes comparada con plantas adultas (Fig. 11 y 15; Tabla 2). Estos resultados sugieren que existe una regulación de la acumulación de estas proteínas en función de la edad, a pesar de que todas las construcciones se encuentran bajo el control de un mismo promotor, o que la zona inserción del transgene en estas líneas transgénicas no favorezca la expresión a edades tempranas, sin embargo nuestra evidencia es escasa, por lo que será necesario realizar análisis más detallados de la expresión tanto de la proteína como de los transcritos en plantas de las diferentes edades y con más líneas transgénicas.

En el caso de la proteína AtPPa1-CFP se observó la señal de fluorescencia en el núcleo o cerca del núcleo en plantas jóvenes, aunque nosotros no tenemos evidencia de la localización intranuclear de esta isoforma en plantas adultas, donde presentó una distribución uniforme dentro del citoplasma, y aunque si se observó señal cerca del núcleo en la inmunolocalización no hubo evidencia de que

estuviera dentro de este organelo (Fig. 12 y 18). En un reporte previo en donde se realizó la localización subcelular masiva de proteínas se reportó a la isoforma uno fusionada a GFP como nuclear (Koroleva et al, 2005). Además, en otros trabajos también se ha sugerido la localización en el núcleo de la isoforma uno e incluso de otras isoformas, tal es el caso del análisis *in silico* realizado con el programa de predicción de localización celular SLPFA por Navarro de la Sancha (2009) donde se predice la posible localización nuclear de AtPPa1 o el trabajo reportado por Oztürk y colaboradores (2014). Sin embargo no hay evidencia sólida de que esta isoforma tenga una secuencia de localización nuclear y tampoco de la asociación con proteínas en el núcleo y en el trabajo de Oztürk y colaboradores sólo se realizaron observaciones en una condición y no es claro si la proteína se encontraba o no en el interior del núcleo. El patrón de fluorescencia nuclear únicamente se detectó en plantas jóvenes, y es posible, que esta isoforma se pueda translocar al núcleo bajo ciertas condiciones. También es probable que se encuentre fuera del núcleo, pero rodeándolo, ya que en plantas adultas de 28 ddg, se observó cerca pero no dentro del núcleo, sin embargo en epidermis de cebolla transformada con 35S:AtPPa1-CFP nuevamente se observó la señal de fluorescencia únicamente en el citoplasma (Fig. 19), por lo que la evidencia que sugiere su localización nuclear no fue confirmada en este trabajo.

La información sobre la localización subcelular de las isoformas dos y tres en plantas es escasa, y se ha reportado a estas isoformas como citoplasmáticas (Navarro de la Sancha, 2009; Öztürk et al, 2014), sin embargo no hay reportes previos sobre su distribución dentro de los compartimentos celulares. En este trabajo se encontró que las isoformas AtPPa2-CFP y AtPPa3-CFP tienen una

distribución dentro del citoplasma muy similar y ambas isoformas están cerca del tonoplasto (Fig. 13 y 14), en lo que parecen ser proyecciones de citoplasma invaginadas transitoriamente en la vacuola y seccionadas por el microtomo durante la fijación y preparación del tejido (Fig. 18 C-F). Hay evidencia de la presencia de una pirofosfatasa de protones en el tonoplasto, la cual tiene un papel relevante en el desarrollo de la planta y la respuesta a estrés (Gaxiola et al, 2007; Li et al, 2005; Zhang et al, 2011), sin embargo desconocemos si las isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles que se encuentran cerca de la vacuola estén interactuando con las pirofosfatasas de protones y si en conjunto realicen una función específica. Una diferencia entre las isoformas dos y tres fue la intensidad de la señal detectada en microscopía confocal, que resultó menor para la isoforma 3. Las plantas transgénicas que expresan AtPPa3-CFP presentaron evidencia de expresión muy pobre de la proteína tanto en microscopía confocal, como electrónica. Esto coincide con la escasa alteración del patrón de actividad en el fraccionamiento cromatográfico y correlaciona con el hecho de que esta proteína se reporta como expresada únicamente en órganos florales (Navarro de la Sancha, 2009). Aunque se realizó el análisis mediante microscopía confocal de la semilla, pétalos, cepalos, silicuas y polen en plantas AtPPa3-CFP no se detectó señal de fluorescencia en estos órganos. Sin embargo desconocemos si existe una regulación postranscripcional por parte de la planta capaz de controlar la expresión del promotor 35S, por lo que se requerirían más estudios para demostrar este hecho. Por otro lado, AtPPa5-YFP tuvo una distribución citoplasmática, pero a diferencia de las isoformas 2 y 3, la isoforma 5 tiene una distribución citosólica más extendida e interesantemente, esta isoforma aparece

concentrada cerca pero no dentro de los cloroplastos (Fig. 15 y 16). Es de hacer notar que la localización de la isoforma AtPPa5 cerca de los cloroplastos no se observa en todas las células, pero su frecuencia es igual tanto en plantas jóvenes como adultas. No hay evidencia previa de la localización cercana a los cloroplastos de ninguna de las isoformas citoplasmáticas de pirofosfatasas inorgánicas solubles, únicamente hay reportes de la isoforma seis que se trasloca a cloroplasto (Shulze et al, 2004) y se ha reportado que esta isoforma presenta una alevada actividad de hidrólisis del PPI en este orgánulo (Weiner et al 1987), sin embargo nuestros datos parecen sugerir una interacción entre el cloroplasto y el citoplasma que podría estar relacionado con el metabolismo del PPI aunque no tenemos evidencia de ello.

Aunque hay reportes de la localización citoplasmática de las isoformas uno a cinco de *Arabidopsis* (Navarro de la Sancha, 2009; Öztürk et al, 2014), en ninguno estudio previo se ha determinado la distribución subcelular de cada una de las isoformas, por lo que la distribución única dentro del citoplasma reportada en este trabajo podría indicar el papel único que tiene cada una de las isoformas en la célula. Sin embargo en un futuro será necesario realizar más estudios que nos permita entender el papel que juegan cada una de estas isoformas en el metabolismo de la célula relacionado con su sitio de distribución.

La isoforma cuatro (AtPPa4) también se localizó en el citoplasma, como se había reportado (Öztürk et al, 2014), y al igual que las isoformas 2 y 3 su distribución fue en islas citoplasmáticas enveidas en el tonoplasto, como se observó tanto en microscopía confocal como en inmunolocalización con oro (Fig. 20). Sin embargo se encontró señal de fluorescencia en la pared celular y en el espacio intercelular

(Fig. 21), lo cuál se comprobó mediante inmunolocalización, pues mediante esta técnica también se encontró señal de esta isoforma en citoplasma, la pared celular y el espacio intercelular (Fig. 22). La localización de esta isoforma en el espacio intercelular y pared celular fue consistente en todas las plantas analizadas, además se pudo observar que en el espacio intercelular que se encontraba entre varias células, únicamente se detectaba señal en el espacio intercelular correspondiente a dos células (Fig. 22 E-F), indicando una distribución específica dentro del mismo espacio intercelular. Por otro lado también se pudo detectar señal en el citoplasma en una estructura que parece ser una vesícula (Fig. 22 A-B), lo que indica que probablemente esta proteína se podría estar moviendo al espacio intercelular mediante vesículas, lo cuál explicaría que esta isoforma no tenga un péptido señal o de tránsito en su secuencia de aminoácidos que le permita transportarse fuera de la célula. La localización intercelular de esta isoforma no se observó con ninguna de las otras isoformas, lo que indica que es una característica particular de esta proteína.

Para comprobar esta distribución novedosa de la isoforma AtPPa4, se utilizó expresión transitoria en epidermis de cebolla con una construcción que expresa a la proteína de fusión con YFP, en lugar de CFP, así como un marcador de pared celular como es el calcofluor. Nuevamente se encontró que la isoforma cuatro de *Arabidopsis* se localiza en el espacio intercelular además del citoplasma como se esperaba, además se observó que en todas las imágenes la señal de fluorescencia se acumulaba en los extremos polares de la célula (Fig. 23). La aparición de una isoforma de pirofosfatasa inorgánica soluble fuera de la células no se había indicado en ningún reporte previo a nivel de proteína. Sin embargo, sí

hay un reporte de la presencia de actividad enzimática de pirofosfatasa asociada a la pared celular, la cual no pudo ser despegada de los componentes insolubles y su caracterización se realizó sólo a nivel de las propiedades enzimáticas del catalizador (Quiroga et al, 1981). Hasta la fecha no se conocen funciones para las pirofosfatasas inorgánicas solubles de plantas en el apoplasto y tampoco hay evidencia de que ésta proteína tenga un péptido señal en su secuencia de aminoácidos que le permita moverse fuera de la célula. Sin embargo, en el espacio intercelular se llevan a cabo diversas reacciones metabólicas relacionadas con la síntesis de la pared celular (Carpita, 2011; Bieniawska et al, 2007) y se ha propuesto que alguna pirofosfatasa inorgánica soluble podría tener un papel funcional en el floema de plantas de *Arabidopsis* (Pizzio et al, 2015; Geigenberger et al, 1996).

Por otro lado, plantas de tabaco que sobreexpresan en el floema una pirofosfatasa inorgánica soluble de *E. coli* presentan una seria afectación en el metabolismo de fotoasimilados, así como en el crecimiento (Geigenberger et al, 1996). Se ha reportado que la enzima PPv puede aparecer en la pared celular de células acompañantes y en el floema de plantas de *Arabidopsis*, permitiendo la adquisición y un transporte eficiente de nutrientes, así como un mejor balance hídrico (Páez-Valencia et al, 2011). También hay evidencia de que líneas transgénicas que expresan un RNA de interferencia contra las isoformas AtPPa1 y AtPPa4 presentan alteraciones de la acumulación de los lípidos de reserva (Meyer et al, 2012). Sin embargo, este reporte pone más énfasis en el papel de la AtPPa1 y su control en la acumulación de lípidos y no describe cuál sería el papel de AtPPa4. En el espacio extracelular, durante la biosíntesis y modificación de los

componentes de la pared celular, un subproducto de la catálisis de las enzimas azúcar-nucleótido pirofosforilasas es el pirofosfato (Carpita, 2011). Una de estas enzimas es la sacarosa sintasa, una de sus isoformas ha sido reportada en la pared celular de *A. thaliana* mediante un análisis proteómico (Bayer et al, 2006). En la biosíntesis de polisacáridos de la pared celular se requiere que exista comunicación entre el simplasto y el apoplasto y esta comunicación se lleva a cabo mediante la ruta de secreción (Leucci et al, 2007), por lo que el pirofosfato podría estar produciendo durante la síntesis de polisacáridos en la pared celular, tanto en vesículas de secreción, cuyo contenido se secretaría al apoplasto, o bien, directamente en el apoplasto. Estos mecanismos justificarían la presencia de una pirofosfatasa en cualquiera de estos compartimentos celulares si bien, la evidencia no es concluyente.

La pirofosfatasa inorgánica soluble isoforma seis es la única de *Arabidopsis* que presenta un péptido con características de señal de tránsito al cloroplasto y, en un trabajo previo, se demostró que dicha isoforma se importaba al cloroplasto de espinaca *in vitro* en organelos aislados (Schulze *et al.* 2004). Además esta isoforma también se observó en el cloroplasto en expresión transitoria en células de tabaco bajo el microscopio confocal. Sin embargo, ninguno de estos trabajos demuestran que la proteína se localice sólo en el cloroplasto, ya que algunas proteínas del cloroplasto pueden permanecer también en el citoplasma, como el caso de AKIN10 (Fragoso et al, 2009), o bien, proteínas para las que un mismo péptido de tránsito las dirige a mitocondria y cloroplasto por igual (Peeters and Small, 2001). Era pues de interés obtener evidencia confirmatoria de la localización cloroplástica de esta proteína *in vivo*, en la misma planta de la que se

tomó el gene y determinar si esta misma proteína podía también ubicarse en otro organelo. Los análisis realizados en este trabajo, tanto mediante microscopía confocal como inmunolocalización nos indican que esta isoforma es exclusivamente de cloroplasto (Fig. 24 y Fig. 25), no hay evidencia de su presencia en ningún otro organelo. Si bien, es de esperarse que la proteína se sintetice como precursor en ribosomas del citoplasma, la abundancia de tal precursor debe ser muy baja y debe translocarse rápidamente. Aunque estos resultados no son suficientes para garantizar la ausencia de la AtPPa6 en otros sitios de la célula, de estarlo, su abundancia tendría que estar por debajo de los límites de detección de las técnicas empleadas.

Durante los análisis de inmunolocalización con MET de AtPPa6 se observó que en el 90 % de las plantas de la línea transgénica los cloroplastos parecían más alargados y rugosos, pues sus tilacoides no mostraban un apilamiento compacto, y daban lugar a un arreglo anormal de la grana (Fig. 26). Esta alteración no se observó con el resto de las transgénicas empleadas, lo que indica que no se debe al método de transformación o alguna peculiaridad del plásmido empleado. Sin embargo, los parámetros fisiológicos de la función fotosintética no sugieren ninguna afectación funcional, al menos a nivel de PSII (Fig. 27). En otras palabras, la alteración de la morfología del cloroplasto no parece tener consecuencia en la fisiología de la planta en la línea transgénica analizada, aunque queda pendiente analizar que esta pasando a nivel de fosforilación de los fotosistemas PSII y PSI. Puede especularse que la enzima AtPPa6 corresponde a la más activa de la planta, pues se ha reportado que el cloroplasto posee la mayor actividad (Weiner, et al, 1987) y esta es la única PPa que tiene esta localización. Sin embargo, en

este trabajo las plantas transgénicas sobreexpresando esta isoforma fueron las que presentaron una menor actividad y no puede descartarse que las pirofosfatasa de otro tipo pudieran contribuir a la actividad medida en el cloroplasto con las técnicas de fraccionamiento celular no-acuoso. Es notorio que a pesar de la elevada actividad reportada (Weiner et al, 1987), los niveles de transcritos medidos con microarreglos para esta isoforma son similares a los que presenta la isoforma AtPPa1 (Navarro de la Sancha et al, 2007) y no existe evidencia de algún tipo de modificación post-transduccional que regule la actividad de la proteína. Esto podría contestarse con el estudio de la proteína *in vitro* para determinar sus parámetros cinéticos, sin embargo en el laboratorio no se ha logrado expresar la proteína activa en un sistema heterólogo y los estudios de purificación de la misma a partir de la planta no garantizan la ausencia de contaminación por otras pirofosfatasa inorgánicas solubles.

No hay reportes previos sobre la expresión o localización celular de las pirofosfatasa en raíces de Arabidopsis, por lo que este trabajo es el primero donde se lleva a cabo un estudio sobre la localización celular de las diferentes isoformas de pirofosfatasa inorgánicas solubles en raíz, y aunque se analizaron plantas transgénicas que expresan las proteínas de fusión de todas las isoformas, únicamente fue posible observar la localización de las isoformas AtPPa4-YFP, AtPPa5-YFP y AtPPa6-YFP, debido a que en el caso de las isoformas AtPPa2-CFP y AtPPa3-CFP la señal fue muy baja para analizar su localización y en el caso de la isoforma AtPPa1-CFP no se detectó señal. En el caso de la isoforma AtPPa4-YFP, la fluorescencia se detectó en la zona de diferenciación celular y en todos los tipos celulares, sin embargo no se detectó fluorescencia en los pelos

radiculares ni en la zona de elongación ni en la de proliferación celular. La isoforma AtPPa5-YFP también se detectó en la zona de diferenciación celular, pero a diferencia de la isoforma AtPPa4-YFP, su localización fue en las células del cortex. Por último, la isoforma AtPPa6-YFP se localizó en células de la endodermis y el periciclo en la zona de elongación (Fig. 28). La localización intracelular de las isoformas AtPPa4-YFP, AtPPa5-YFP y AtPPa6-YFP presenta diferencias, ya que la isoforma AtPPa4-YFP presenta una distribución aparentemente en el pared celular coincidiendo con su localización en hoja, mientras que las isoformas AtPPa5-YFP y AtPPa6-YFP tienen una localización aparentemente citoplasmática, sin embargo nuestro estudio no nos permiten definir la distribución específica dentro de la célula de cada una de las isoformas por lo que será necesario realizar observaciones de microscopia con mayor acercamiento que nos permita ver con detalle su localización subcelular, así como estudios con herramientas de separación de orgánulos para comprobar la distribución en el citoplasma, sobre todo de la isoforma AtPPa6 que aparentemente en raíz esta en el citoplasma pero en hoja es exclusivamente de colorplasto y aunque se ha reportado la presencia de plastidios en células de raíz como leucoplastos y amiloplastos (Pyke, 1999; Itoh et al, 2010) no tenemos explicación para su localización citoplasmática.

Por otro lado, la localización de las tres isoformas de PPa analizadas en raíces tienen una localización diferencial, sobre todo en los tipos celulares, y hasta este trabajo no hay ningún reporte sobre su localización y distribución en la raíz; tampoco se ha reportado nada sobre su probable función en este órgano. Sin embargo, la raíz es el primer contacto de la planta con su ambiente y la provee de

agua y otros nutrientes tomados del suelo. Se ha reportado que en respuesta a cambios en la disponibilidad de nutrientes como fósforo y nitrógeno, se ve alterado el metabolismo de los carbohidratos, la cadena respiratoria y la síntesis de aminoácidos, principalmente, además de cambios morfológicos a nivel celular y radicular (Wang et al, 2003; Cloutier et al, 2007; Wanke et al, 1998). Además, en la raíz se llevan a cabo muchos procesos metabólicos en los que podrían estar relacionadas las pirofosfatasas, como la síntesis de carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos o en la respuesta a estrés. Es de hacer notar que en este estudio observamos de manera general que la acumulación de la proteína depende del tejido y de la edad de la planta. Nuevamente, se esperaría que bajo el control del promotor 35S todas las proteínas tuviesen un nivel semejante de expresión y que tal expresión no fuera tan dependiente de la edad o el tejido, si bien el promotor 35S sí tiene diferente fuerza en los diferentes tejidos de raíz y partes aéreas (Yang and Christou, 1989; Sunilkumar et al, 2002). En este caso, sin embargo, las diferencias indican que debe existir otra forma de control de la síntesis y acumulación de estas proteínas que va más allá del promotor, ya sea un control adicional de la actividad transcripcional que se encuentra en la secuencia codificante, una diferente velocidad de traducción, un control ejercido por miRNAs, un control traduccional, o un control de la degradación que elimina rápidamente la proteína (Fig. 9 A), aunque no hay evidencia que indique que esta sucediendo. Claramente son necesarios estudios adicionales para responder a todas estas interrogantes.

Por último se realizaron ensayos de inmunoprecipitación para todas las isoformas, para los cuales se usaron anticuerpos anti-GFP. Se observaron mediante geles de

poliacrilamida teñidos con plata, que se presentaban cambios en el patrón de bandas (Fig. 30) en los inmunoprecipitados recuperados de las diferentes isoformas, sin embargo debido a la baja cantidad de proteína recuperada, no fue posible analizar los inmunoprecipitados de todas las isoformas mediante espectrometría de masas, por lo que únicamente se reportan los resultados de las isoformas AtPPa1-CFP, AtPPa2-CFP, AtPPa3-CFP y AtPPa4-CFP. La dificultad de hacer análisis de masas con cantidades pequeñas de proteínas es que las proteínas que se identifican son muy pocas. Sin embargo, se lograron recuperar algunas proteínas que podrían ser el inicio para realizar posteriormente ensayos más detallados de la posible interacción entre estas proteínas con las pirofosfatasa. Los resultados de inmunoprecipitación, identificaron proteínas relacionadas con el metabolismo primario, como la proteína D aminoacyl tRNA deacylase. Esta enzima se encarga de reciclar los D-aminoacil-tRNAs, hidrolizando el enlace ester entre el polinucleótido y el D-aminoácido y que en Arabidopsis se ha relacionado con la resistencia a etanol (Wydau et al, 2007). En lo que se refiere al metabolismo de carbohidratos, en todas las isoformas se identificaron proteínas de la síntesis y degradación de carbohidratos, como la Aldolasa (AtPPa1-CFP), la Ribulosa bifosfato carboxilasa, mejor conocida como Rubisco (AtPPa3-CFP) y Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa (AtPPa4-CFP). Además se identificaron proteínas como la subunidad alfa del proteasoma (AtPPa2-CFP). Es importante mencionar que en un trabajo previo de proteómica realizado en nuestro laboratorio, con una mutante de baja expresión *atppa4* y en la transgénica AtPPa4-CFP se observaron modificaciones en la expresión de proteínas como el potenciador de sistema productor de O₂ (Oxygen evolving

enhancer), la cual nosotros identificamos en AtPPa2-CFP, así como en las Ribulosa bifosfato carboxilasa (AtPPa3-CFP) o la Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (AtPPa4-CFP; Orozco-Neri, 2017, Tesis Licenciatura). Aunque en el trabajo los cambios observados en el análisis proteómico fueron para la isoforma AtPPa4, y en este trabajo fueron identificadas en los inmunoprecipitados de varias de las isoformas, resulta interesante que en ambos casos se hayan identificado estas proteínas, lo que podrían indicar el papel que están jugando las pirofosfatasa en el metabolismo. Por otro lado, en lo que se refiere al metabolismo del PPI, como ya se ha mencionado anteriormente el PPI es subproducto de diversas reacciones en el metabolismo y las PPa se encargan de mantener su homeóstasis debido a que se esta produciendo constantemente en las diferentes vías metabólicas, por lo que la presencia de las PPa en diferentes vías metabólicas y la relación de éstas enzimas con otras proteínas es muy importante. En este trabajo muchas de las proteínas recuperadas mediante inmuprecipitación se relacionan directa o indirectamente, mediante la vía metabólica en la que participan, con la producción de PPI como subproducto, tal es el caso de la Aldolasa y la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa las cuáles participan en la vía de la glucólisis (Moorhead and Plaxton, 1992; Nielsen, 1995; Muñoz-Bertomeu et al, 2010). En la fijación del carbono también se produce PPI y la Ribulosa bifosfato carboxilasa (Jordan et al, 1983; Hatch et al, 1980) y la Oxygen evolving enhancer (Ok et al, 2000) participan en esta vía. La síntesis de proteínas es una de las vías principales donde se forma PPI como subproducto y en este trabajo se identificó a la proteína D amoniacil tRNA deacilasa, la cuál es una enzima que participa en esta vía (Richardson et al, 2015; Deana et al, 2008;

Routh et al, 2016). Otra proteína identificada en cuya vía metabólica se genera PPI, es la subunidad alfa del proteasoma (Zeng et al, 2006; Perales et al, 2006; Burger et al, 2004), la cuál también esta relacionada con la respuesta a estrés de la planta (Pangestuti, 2009; Zeng et al, 2006). Por último, se tiene que resaltar que los ensayos de inmunoprecipitación se realizaron con anticuerpo anti-GFP, aunque lo ideal hubiera sido realizarlos con anticuerpos específicos para cada una de las isoformas, pero, como ya se mencionó anteriormente, no ha sido posible obtener los anticuerpos, por lo tanto quedan pendientes ensayos más detallados de la interacción de las diferentes isoformas con otras proteínas, probablemente utilizando otras técnicas bioquímicas, como análisis proteómicos que nos permitan identificar proteínas como ya se realizó con la isoforma cuatro, así como realizar ensayos de complementación *in vivo* para detectar la interacción de las proteínas identificadas mediante inmunoprecipitación con las isoformas de las PPa utilizando el sistema Gateway: Compatible Biomolecular Fluorescence Complementation (BiFC).

11. CONCLUSIONES

- Se confirmó la localización citoplasmática de las pirofosfatasa inorgánicas solubles isoformas AtPPa1 a AtPPa5, observándose una distribución única para cada una de las diferentes isoformas.
- AtPPa1 se localizó en el citoplasma pero no dentro del núcleo. En este trabajo no se encontró la localización en el núcleo de la isoforma AtPPa1 en plantas adultas, pero no se descarta que en estadíos jóvenes se pudiera translocar en respuesta a estímulos aún por describir y mediante mecanismos aún no identificados.
- AtPPa2 y AtPPa3 se distribuyen uniformemente en el citoplasma y con una localización citosólica perivacuolar.
- Se encontró evidencia de la presencia de AtPPa4 en el citosol así como en el espacio intercelular y en la pared celular, lo que sugiere que esta isoforma podría tener un papel importante en el metabolismo extracelular aún por describir.
- AtPPa5 se detectó tanto en citosol cerca de la vacuola, como en el citoplasma alrededor de los cloroplastos.
- Se confirmó la localización exclusiva en cloroplasto de la isoforma AtPPa6 *in vivo*.
- Nuestros datos de localización sugieren una función específica de las diferentes isoformas de acuerdo a su distribución dentro del citoplasma.

12. PERSPECTIVAS

- Realizar el análisis de la morfología en diferentes líneas transgénicas sobreexpresando las pirofosfatasas inorgánicas solubles, como tamaño de las plantas, número de semillas, número de tallos florales, tamaño y número de silicuas, número y tamaño de las hojas.
- Obtener anticuerpos específicos para cada una de las pirofosfatasas inorgánicas solubles.
- Evaluar la expresión a nivel de genes y proteínas de las pirofosfatasas inorgánicas solubles en plantas silvestres, mutantes y sobreexpresoras de *A. thaliana* para determinar si hay cambios.
- Evaluar la regulación de los genes de pirofosfatasas inorgánicas solubles mediante la alteración de promotores endógenos.
- Obtener el fluido apoplástico para confirmar la presencia y funcionalidad de AtPPa4 en el espacio intercelular mediante inmunoblot y actividad pirofosfatasa.
- Realizar observaciones en diferentes condiciones de crecimiento y etapas del desarrollo de plantas transgénicas AtPPa1 fusionadas a proteínas fluorescentes.

- Analizar el fotosistema 1 (PS1), así como otros componentes del fotosistema como la cadena transportadora de electrones o el complejo ATP sintasa que permita descartar daños en los cloroplastos de plantas transgénicas AtPPa6.
- Evaluar los cloroplastos de más líneas transgénicas de AtPPa6.
- Evaluar con más detalle la localización subcelular de las diferentes isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles en raíces de plantas de *A. thaliana*.
- Utilizar técnicas bioquímicas adicionales que confirmen las interacciones proteicas de las pirofosfatasas inorgánicas solubles con las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas.

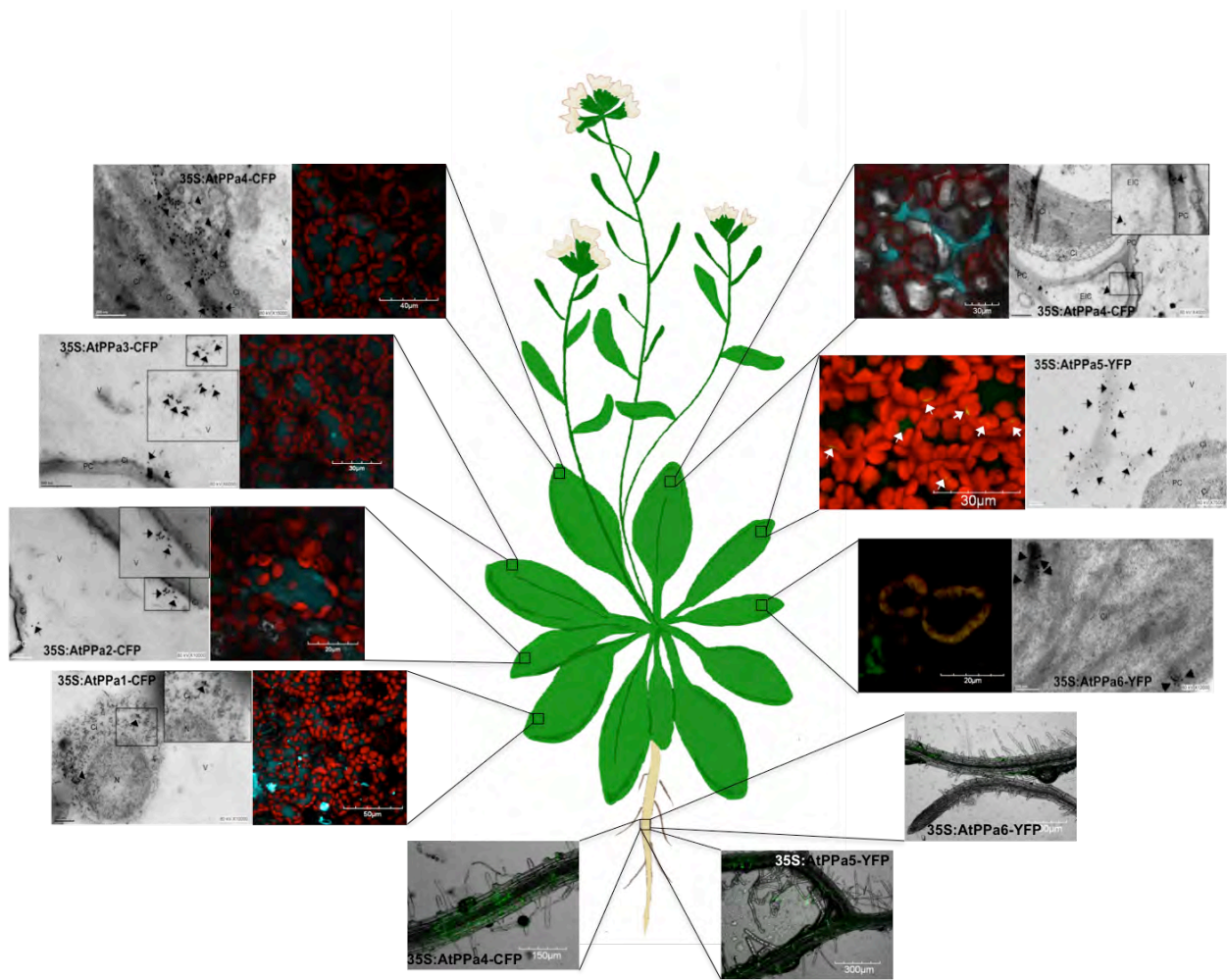


Figura 31. Esquema de la localización de las seis isoformas de pirofosfatasa inorgánica soluble en *Arabidopsis*. Se utilizaron plantas transformantes estables de *Arabidopsis* que expresan la proteína de fusión AtPPa1-CFP, AtPPa2-CFP, AtPPa3-CFP, AtPPa4-CFP, AtPPa4-YFP, AtPPa5-YFP y AtPPa6-YFP, tanto en hoja como en raíz. La localización se realizó mediante microscopía confocal e inmunolocalización con partículas de oro con microscopía electrónica de transmisión (MET). En la imagen se observa la localización citoplasmática en hoja de AtPPa1-CFP, AtPPa2-CFP, AtPPa3-CFP y AtPPa5-YFP, así como la localización tanto citoplasmática como en pared celular y el espacio intercelular de la isoforma AtPPa4-CFP y la localización exclusivamente en el cloroplasto de la isoforma AtPPa6-YFP. Mientras que en raíz se destaca la localización diferencial en los diferentes tipos celulares de las isoformas AtPPa4-YFP, AtPPa5-YFP y AtPPa6-YFP.

13. ARTÍCULOS PUBLICADOS

Plant Science 253 (2016) 229–242



Contents lists available at ScienceDirect

Plant Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plantsci



Evidence for a non-overlapping subcellular localization of the family I isoforms of soluble inorganic pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana*



Francisca Morayna Gutiérrez-Luna^{a,c}, Ernesto Navarro de la Sancha^{a,c},
Lilián Gabriela Valencia-Turcotte^{a,c}, Sonia Vázquez-Santana^{b,c},
Rogelio Rodríguez-Sotres^{a,c,*}

^a Departamento De Bioquímica, Facultad De Química, UNAM, Av. Universidad 3000, Col. Cd. Universitaria, C.p. 04510, Ciudad De Mexico, Mexico

^b Departamento De Biología Comparada, Facultad De Ciencias, UNAM, Av. Universidad 3000, Col. Cd. Universitaria, C.p. 04510, Ciudad De Mexico, Mexico

^c Universidad Nacional Autónoma De México, Av. Universidad 3000, Col. Cd. Universitaria, C.p. 04510, Ciudad De Mexico, Mexico

Plant Science 267 (2018) 11–19



Contents lists available at ScienceDirect

Plant Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plantsci



Review article

Review: “Pyrophosphate and pyrophosphatases in plants, their involvement in stress responses and their possible relationship to secondary metabolism”



Francisca Morayna Gutiérrez-Luna^a, Eric Edmundo Hernández-Domínguez^b,
Lilián Gabriela Valencia-Turcotte^a, Rogelio Rodríguez-Sotres^{a,*}

^a FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, Ave. Universidad 3000, Cd. Universitaria, Del. Coyoacán, P.C. 04510, Mexico City, Mexico

^b INSTITUTO DE ECOLOGÍA A.C., Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, Xalapa, P.C. 91070 Veracruz, Mexico

14. REFERENCIAS

Anoman AD, Flores-Tornero M, Rosa-Tellez S, Muñoz-Bertomeu J, Segura J and Ros R (2016) The Specific Role of Plastidial Glycolysis in Photosynthetic and Heterotrophic Cells under Scrutiny Through the Study of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase. *Plant Signal Behav.* 11(3):e1128614.

Baldwin JC, Karthikeyan AS and Raghothama KG (2001) LEPS2, a Phosphorus Starvation-Induced Novel Acid Phosphatase from Tomato. *Plant Physiol.* 125(2): 728-737.

Baldwin JC, Karthikeyan AS, Cao A and Raghothama KG (2008) Biochemical and Molecular Analysis of LePS2;1:a Phosphatase Starvation Induced Protein Phosphatase Gene from Tomato. *Planta.* 228(2): 273-280.

Bayer EM, Bottrill AR, Walshaw J, Vigouroux M, Naldrett MJ, Thomas CL, Maule AJ (2006) Arabidopsis Cell Wall Proteome Defined Using Multidimensional Protein Identification Technology. *Proteomics.* 6: 301–311.

Baykov A.A, Artjukov AA and Avaeva SM (1977) Fluoride Inhibition of Inorganic Pyrophosphatase III. Dependence on the Nature of Substrate and Metal Ion Cofactor. *Biochim. Biophys. Acta.* 481: 195-201.

Baykov AA, Dudarenkov VY, Käpylä J, Salminen T, Hyytiä T, Kasho VN, Husgafvel S, Cooperman BS, Goldman A and Lahti R (1995) Dissociation of Hexameric *Escherichia coli* Inorganic Pyrophosphatase into Trimers on His-136-->Gln or His-140-->Gln Substitution and its Effect on Enzyme Catalytic Properties. *J. Biol. Chem.* 270:30804-30812.

Bennett VL, Ristrophe DL, Hamming JJ and Butler LG (1973) Maize Leaf Inorganic Pyrophosphate: Isozymes, Specificity for Substrates, Inhibitors, and Divalent Metal Ions, and pH Optima. *Biochim. Biophys. Acta.* 293: 232-241.

Bieniawska Z, Paul Barratt DH, Garlick AP, Thole V, Kruger NJ, Martin C, Zrenner R, Smith AM (2007) Analysis of the Sucrose Synthase Gene Family in *Arabidopsis*. *Plant J.* 49:810-828.

Boussiengui-Boussiengui G (2005) Remobilization of Sucrose from the Culm During Germination of Sugarcane Setts. Master of Science at the University of Stellenbosch. South African Sugarcane Research Institute. South Africa.

Brini F, Hanin M, Mezghani I, Berkowitz GA and Masmoudi K (2007) Overexpression of Wheat Na⁺/H⁺ Antiporter TNH1 and H⁺ pyrophosphatase TVP1 Improve Salt- and Drought-stress Tolerance in *Arabidopsis thaliana* Plants. *J Exp. Bot.* 58: 301-308.

Burger AM and Seth AK (2004) The Ubiquitin-mediated Protein Degradation in Cancer: Therapeutic Implications. *Eur J Cancer.* 40:2217-2229.

Busot GY, McClure B, Ibarra-Sánchez CP, Jiménez-Durán K, Vázquez-Santana S and Cruz-García F (2008) Pollination in *Nicotiana glauca* Stimulates Synthesis and Transfer to the Stigmatic Surface of NaStEP, a Vacuolar Kunitz Proteinase Inhibitor Homologue. *J Exp Bot.* 59: 3187-3201.

Carpita NC (2011) Update on Mechanisms of Plant Cell Wall Biosynthesis: How Plants Make Cellulose and Other (1 → 4)-β-D-glycans. *Plant Physiol.* 155: 171–184.

Carranza-Trinidad X (2016) Comparación de la Sensibilidad a Fosfato en las Pirofosfatasas de Chile Serrano y Arabidopsis empleando un Ensayo Novedoso con Nanopartículas de Oro. Tesis de Licenciatura. Químico en Alimentos, FQ, UNAM, México D.F.

Chanson A and Pilet PE (1988) Characterization of the Pyrophosphate-Dependent Proton Transport in Microsomal Membranes from Maize Roots. *Physiol. Plantarum* 74: 643–650.

Cloutier M, Perrier M and Jolicoeur M. (2007) Dynamic Flux Cartography of Roots Primary Metabolism. *Phytochemistry*. 68: 2393-2404.

Cooperman BS, Baykov AA and Lahti R (1992) Evolutionary Conservation of the Active Site of Soluble Inorganic Pyrophosphatase. *Trends Biochem Sci*. 17(7):262-6.

Cori GT, Ochoa S, Slein MW and Cori CF (1951) The Metabolism of Fructose in Liver. Isolation of Fructuosa-I-Phosphate and Inorganic Pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*. 7: 304-317.

Dancer J, Veith R, Feil R, Komor E and Stitt M (1990). Independent changes of inorganic pyrophosphate and the ATP/ADP or UTP/UDP ratios in plant cell suspension cultures. *Plant Sci*. 66:59-63.

Davies JM, Poole RJ and Sanders D (1993) The Computed Free Energy Change of Hydrolysis of Inorganic Pyrophosphate and ATP: Apparent Significance for Inorganic Pyrophosphate-driven Reactions of Intermediary Metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*. 1141: 29-36.

Deana A, Celesnik H and Belasco JG (2008) The Bacterial Enzyme RppH Triggers Messenger RNA degradation by 5'Pyrophosphate Removal. *Nature* 451: 355-359.

De Villafranca-Casas MJ (2011) Alteraciones en la Expresión Génica de Mutantes de *Arabidopsis thaliana* como Resultado de la Deficiencia de una Pirofosfatasa Inorgánica Soluble. Tesis de Licenciatura. Ingeniería Química, FQ, UNAM, México D.F.

Fabrichniy IP, Lehtio L, Tammenkoski M, Zyryanov AB, Oksanen E, Baykov AA, Lathi R and Goldman A (2007) A Trimetal Site and Substrate Distortion in a Family II Inorganic Pyrophosphatase. *JBC*. 282(2): 1422-1431.

Farré EM, Bachmann A, Willmitzer L and Trethewey RN (2001) Acceleration of Potato Tuber Sprouting by the Expression of a Bacterial Pyrophosphatase. *Nat biotechnol*. 19:268-72.

Farré EM, Tech S, Trethewey RN, Fernie AR and Willmitzer L (2006) Subcellular Pyrophosphate Metabolism in Developing Tubers of Potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Mol Biol*. 62:165-79.

Ferjani A, Segami S, Horiguchi G, Muto Y, Maeshima M and Tsukaya H (2011) Keep an Eye on PPI: the Vacuolar-type H⁺-Pyrophosphatase Regulates Postgerminative Development in Arabidopsis. *Plant Cell*. 23(8):2895-908.

Gaxiola RA, Palmgren MG and Schumacher K (2007) Plant Proton Pumps. *FEBS Lett*. 581: 2204-2214.

Fragoso S, Espíndola L, Páez-Valencia J, Gamboa A, Camacho Y, Martínez-Barajas E and Coello P (2009) SnRK1 Isoforms AKIN10 and AKIN11 are Differentially Regulated in Arabidopsis Plants under Phosphate Starvation. *Plant Physiol.* 149(4): 1906-16.

Fukuda A and Tanaka Y (2006) Effects of ABA, Auxins and Gibberellin on the Expression of Genes for Vacuolar H⁺-Inorganic Pyrophosphatase, H⁺-ATPase Subunit A, and Na⁺/H⁺ Antiporter in Barley. *Plant Physiol. Biochem.* 44(5-6):351-358.

Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL and Fink GR (1999) The *Arabidopsis thaliana* Proton Transporters, AtNhx1 and Avp1, Can Function in Cation Detoxification in Yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(4):1480-1485.

Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL and Fink GR (2001) Drought- and Salt-tolerant Plants Result from Overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 11444–11449.

Gaxiola RA, Fink GR and Hirschi KD (2002) Genetic Manipulation of Vacuolar Proton Pumps and Transporters. *Plant Physiol.* 129: 967–973.

Gaxiola RA, Palmgren MG and Shumacher K (2007) Plant Proton Pumps. *FEBS Lett.* 581:2204-2214.

Gaxiola RA, Edwards M and Elser JJ (2011) A Transgenic Approach to Enhance Phosphorus use Efficiency in Crops as Part of a Comprehensive Strategy for Sustainable Agriculture. *Chemosphere.* 84(6):840-5.

Geigenberger P, Lerchi J, Stitt M and Sonnewald U (1996) Phloem-specific Expression of Pyrophosphatase Inhibits Long Distance Transport of Carbohydrates and Amino Acids in Tobacco Plants. *Plant Cell Environ.* 19: 43–55.

George GM , van der Merwe MJ , Nunes-Nesi A , Bauer R , Fernie AR , Kossmann J and Lloyd JR (2010) Virus-induced Gene Silencing of Plastidial Soluble Inorganic Pyrophosphatase Impairs Essential Leaf Anabolic Pathways and Reduces Drought Stress Tolerance in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* 154(1):55-66.

Gómez-García MR, Losada M and Serrano A (2006). A Novel Subfamily of Monomeric Inorganic Pyrophosphatases in Photosynthetic Eukaryotes. *Biochem. J.* 395:211-221.

Gómez-García MR, Losada M and Serrano A (2007) Comparative Biochemical and Functional Studies of Family I Soluble Inorganic Pyrophosphatases from Photosynthetic Bacteria. *FEBS J.* 274: 3948-3959.

Gould JM and Winget GD (1973) A Membrane-bound Alkaline Inorganic Pyrophosphatase in Isolated Spinach Chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 154:606-613.

Guo S, Yin H, Zhang X, Zhao F, Li P, Chen S, Zhao Y and Zhang H (2006) Molecular Cloning and Characterization of a Vacuolar H⁺-pyrophosphatase Gene, SsVP from the Halophyte *Suaeda salsa* and its Overexpression Increases Salt and Drought Tolerance of *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 60:41-50.

Gutiérrez-Luna FM, Navarro de la Sancha E, Valencia-Turcotte LG, Vázquez-Santana S and Rodríguez-Sotres R (2016) Evidence for non-Overlapping Subcellular Localization of Family I Isoforms of Soluble Inorganic Pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 253: 229-242.

Harrison SJ, Mott EK, Parsley K, Aspinall S, Gray JC and Cottage A (2006) A Rapid and Robust Method of Identifying Transformed *Arabidopsis thaliana* Seedlings Following Floral dip Transformation. *Plant Methods*. 2: 19-25.

Hatch AL and Jensen RG (1980) Regulation of Ribulose-1-5-Biphosphate Carboxylase from Tobacco: Changes in pH Response and Affinity for CO₂ and Mg²⁺ Induced by Chloroplast Intermediates. *Arch Biochem Biophys*. 205(2): 587-594.

Heinonen JK. (2001) Biological Role of Inorganic Pyrophosphate. (p.250). Springer US.

Hernández-Domíguez EE, Valencia-Turcotte LG and Rodríguez-Sotres R (2012) Changes in Expression of Soluble Inorganic Pyrophosphatases of *Phaseolus vulgaris* under Phosphate Starvation. *Plant Sci*. 187: 39–48.

Huang H, Patskovsky Y, Toro R, Farelli JD, Pandya C, Almo SC, Allen KN and Dunaway-Mariano D (2011) Divergence of Structure and Function in the Haloacid Dehalogenase Enzyme Superfamily: *Bacteroides thetaiotaomicron* BT2127 is an Inorganic Pyrophosphatase. *Biochem-US*. 50:8937-8949.

Huang S, Colmer TD and Millar AH (2008) Does Anoxia Tolerance Involve Altering the Energy Currency Towards PPI?. *Trends plant sci*. 13:221-7.

Itoh RD and Fujiwara MT (2010) Regulation of Leucoplast Morphology in Roots. Interorganellar signaling from Mitochondria?. *Plant Signal. Behav*. 5(7): 856-859.

Jordan DB, Chollet R and Ogren WL (1983) Binding of Phosphorylated Effectors by Active and Inactive Forms of Ribulose-1,5-biphosphate Carboxylase. *Biochem*. 22: 3410-3418.

Kasho VN, Baykov AA and Avaeva SM (1982) Comparative Effects of Fluoride of Three Pyrophosphate-hydrolyzing Enzymes: Acid and Alkaline Phosphatases and Inorganic Pyrophosphatase. *Biokhimiya*. 47(8):1289-1292.

Krebs M, Beyhl D, Görlich E, Al-Rasheid KAS, Marten I, Stierhof Y, Hedrich R and Schumacher K (2010) Arabidopsis V-ATPase Activity at the Tonoplast is Required for Efficient Nutrient Storage but not for Sodium Accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(7): 3251-6.

Kriegel A, Andrés Z, Medzihradzky A, Krüger F, Scholl S, Delang S, Patir-Nebioglu MG, Gute G, Yang H, Murphy AS, Peer WA, Pfeiffer A, Krebs M, Lohmann JU and Schumacher K (2015) Job Sharing in the Endomembrane System: Vacuolar Acidification Requires the Combined Activity of V-ATPase and V-PPase. *Plant Cell*. 27: 3383-3396.

Kornberg A (1962) On the Metabolic Significance of Phosphorylic and Pyrophosphorylic Reactions. (p. 251-264). In Kasha M and Pullman B. eds, *Horizons in Biochem Acad Press New York*.

Koroleva OA, Tomlinson ML, Leader D, Shaw P and Doonan JH (2005) High-throughput Protein Localization in Arabidopsis Using Agrobacterium-mediated Transient Expression of GFP-ORF Fusions.

Leucci MR, Di Sansebastiano G-P, Gigante M, Dalessandro G and Piro G (2007) Secretion Marker Proteins and Cell-Wall Polysaccharides Move Through Different Secretory Pathways. *Planta*. 225: 1001–1017. *Plant J*. 41:162-174.

Li J, Yang H, Peer WA, Richter G, Blakeslee G, Bandyopadhyay A, Titapiwantakun B, Undurraga S, Khodakovskaya M, Richards EL, Krizek B, Murphy AS, Gilroy S and Roberto Gaxiola (2005) Arabidopsis H⁺-PPase AVP1 Regulates Auxin-Mediated Organ Development. *Science* 310:121-125.

Li B, Wei A, Song C, Li N and Zhang J (2008) Heterologous Expression of the TsVP Gene Improves the Drought Resistance of Maize. *Plant Biotechnol J.* 6: 146–159.

Li X, Guo Ch, Gu J, Duan W, Zhao M, Ma Ch, Du X, Lu W and Xiao K (2014) Overexpression of *VP*, a Vacuolar H⁺-pyrophosphatase Gene in Wheat (*Triticum aestivum* L.), Improves Tobacco Plant Growth under Pi and N Deprivation, High Salinity, and Drought. *J Exp Bot.* 65(2): 683-696.

Li Z, Baldwin CM, Hu Q, Liu H and Lou H (2010) Heterologous Expression of Arabidopsis H⁺-pyrophosphatase Enhances Salt Tolerance in Transgenic Creeping Bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.). *Plant Cell Environ.* 33(2):272-289.

Ligaba A and Katsuhara M (2010) Insights into the Salt Tolerance Mechanism in Barley (*Hordeum vulgare*) from Comparisons of Cultivars that Differ in Salt Sensitivity. *J Plant Res.* 123(1):105-118.

Liu Q, Zhang Q, Burton RA, Shirley NJ and Atwell BJ (2010) Expression of Vacuolar H⁺-pyrophosphatase (*OVP3*) is Under Control of an Anoxia-inducible Promoter in Rice. *Plant Mol Biol.* 72: 47-60.

Lundin M, Baltscheffsky H and Ronne H (1991) Yeast PPA2 Gene Encodes a Mitochondrial Inorganic Pyrophosphatase that is Essential for Mitochondrial Function. *J Biol Chem.* 266(19):12168-72.

Lundin M, Deopujari S, Lichko L, da Silva L and Baltscheffsky Ha (1992) Characterization of a Mitochondrial Inorganic Pyrophosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. 1098:217-23.

Maeshima M (1991) H(+)-translocating Inorganic Pyrophosphatase of Plant Vacuoles. Inhibition by Ca^{2+} , Stabilization by Mg^{2+} and Immunological Comparison With Other Inorganic Pyrophosphatases. *Eur J Biochem*. 196(1):11-7.

Maksel D, Gooley PR, Swarbrick JD, Guranowski A, Gange C, Blackburn GM and Gayler KR (2001) Characterization of Active-Site Residues in Diadenosine Tetraphosphate Hydrolase from *Lupinus angustifolius*. *Biochem. J*. 357:399-405.

Mansurova SE (1989) Inorganic Pyrophosphatase in Mitochondrial Metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*. 977:237-247.

May A, Berger S, Hertel T and Köck M (2011) The *Arabidopsis thaliana* Phosphate Starvation Responsive Gene AtPPsPase1 Encodes a Novel Type of Inorganic Pyrophosphatase. *Biochim et Biophys Acta (BBA) - General Subjects*. 1810(2):178 - 185.

Meyer K, Stecca KL, Ewell-Hicks K, Allen SM and Everard JD (2012) Oil and Protein Accumulation in Developing Seeds is Influenced by the Expression of a Cytosolic Pyrophosphatase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 159: 1221–1234.

Mitsuda N, Enami K, Nakata M, Takeyasu K and Sato MH (2001) Novel Type *Arabidopsis thaliana* H(+)-PPase is Localized to the Golgi apparatus. *FEBS Lett*. 488:29-33.

Miura K, Rus A, Sharkhuu A, Yokoi S, Karthikeyan AS, Raghothama KG, Baek D, Koo yd, Jin JB, Bressan RA, Yun D and Hasegawa PM (2005) The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 Controls Phosphate Deficiency Responses. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 102(21):7760-7765.

Moorhead GBG and Plaxton WC (1992) Evidence for an Interaction Between Cytosolic Aldolase and the ATP- and Pyrophosphate-dependent Phosphofructokinases in Carrot Storage Roots. FEBS Lett. 313(3): 277-280.

Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Mulet JM, Baroja-Fernández E, Pozueta-Romero J, Kuhn JM, Segura J and Ros R (2009) Plastidial Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Deficiency Leads to Altered Root Development and Affects the Sugar and Amino Acid Balance in Arabidopsis. Plant Physiol. 151(2):541-58.

Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Alaiz M, Segura J and Ros R (2010) A Critical Role of Plastidial Glycolytic Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase in the Control of Plant Metabolism and Development. Plant Signal Behav. 5(1):67-9.

Navarro De la Sancha E, Coello-Coutiño MP, Valencia-Turcotte LG, Hernández-Domínguez EE, Trejo-Yepes G and Rodríguez-Sotres R (2007) Characterization of Two Soluble Inorganic Pyrophosphatases from *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci. 172(4):796-807.

Navarro de la Sancha E. (2009) Localización Intracelular de Algunas Isoenzimas de Pirofosfatasa en Plantas. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. FQ, UNAM, México D.F.

Nelson DL and Cox (2009) Lehninger Principles of Biochemistry. (p. 1158). 5th. Edition. W.H. Freeman and Company New York.

Nielsen TH (1995) Fructose-1,6-biphosphate is and Allosteric Activator of Pyrophosphate:Fructose-6-phosphate 1-Phosphotransferase. Plant Physiol. 108: 69-73.

Ok S, Chung YS, Um BY, Park MS, Bae J-M, Lee SJ and Shin JS (2000) Identification of Expressed Sequence Tags of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Leaf at the Vegetative Stage. Plant Cell Rep. 19: 932-937.

Orozco-Neri F (2017) Análisis Proteómico de la Respuesta a Deficiencia de Fósforo en Plantas de *Arabidopsis thaliana* Como Efecto de la Expresión Diferencial de una Pirofosfatasa Inorgánica Soluble. Tesis de Licenciatura. Químico de Alimentos, FQ, UNAM, México D.F.

Osorio S, Nunes-Nesi A, Stratmann M and Fernie AR (2013) Pyrophosphatase Leves Strongly Influence Ascorbate and Starch Content in Tomato Fruit. Front Plant Sci. 4:308.

Öztürk ZN, Greiner S, and Rausch T (2014) Subcellular Localization and Developmental Regulation of Cytosolic Soluble Pyrophosphatase Isoforms in *Arabidopsis thaliana*. Turk J Bot. 38: 1036-1049.

Paez-Valencia J, Patron-Soberano A, Rodriguez-Leviz A, Sanchez-Lares J, Sanchez-Gomez C, Valencia-Mayoral P, Diaz-Rosas G and Gaxiola R (2011) Plasma Membrane localization of the type I H⁺-PPase AVP1 in sieve element-companion cell complexes from *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci. 181:23-30.

Pangestuti R (2009) An Investigation Into the Role of the Ubiquitin-Proteasome System in Plant Defence. Master of Science Thesis. Faculty of Biomedical and life Science. University of Glasgow.

Pasapula V, Shen G, Kuppu S, Páez-Valencia J, Mendoza M, Hou P, Chen J, Qiu X, Zhu L, Zhang X, Auld D, Blumwald E, Zhang H, Gaxiola R and Payton P (2011) Expression of an Arabidopsis Vacuolar H⁺-pyrophosphatase Gene (AVP1) in Cotton Improves Drought- and Salt Tolerance and Increases Fibre Yield in the Field Conditions. *Plant Biotechnol. J.* 9(1):88-99.

Park M, Chung M, Koh H, Lee DJ, Ahn S and Kim CS (2009) Isolation and Functional Characterization of the Arabidopsis Salt-Tolerance 32 (AtSAT32) Gene Associated with Salt Tolerance and ABA Signaling. *Physiol. Plant* 135(4):426-435.

Peeters N and Small I (2001) Dual Targeting to Mitochondria and Chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Mol. Cell Res.* 1541(1):54-63.

Perales M, Pórtoles S and Más P (2006) The Proteasome-dependent Degradation of CKB4 is Regulated by the Arabidopsis Biological Clock. *Plant J.* 46: 849-860.

Perales-Baños LR. (2008) Caracterización de Mutantes de *Arabidopsis thaliana* y su Respuesta a Condiciones de Estrés. Tesis de Licenciatura. Químico Fármaco Biólogo, FQ, UNAM, México D.F.

Pérez-Castiñeira JR, Hernández A, Drake R and Serrano A (2011) A Plant Proton-Pumping Inorganic Pyrophosphatase Functionally Complements the Vacuolar ATPase Transport Activity and Confers Bafilomycin Resistance in Yeast. *Biochem. J.* 437: 269-278.

Pizzio GA, Paez-Valencia J, Khadilkar AS, Regmi K, Patron-Soberano A, Zhang S, Sanchez-Lares J, Furstenau T, Li J, Sanchez-Gomez C, Valencia-Mayoral P, Yadav UP, Ayre BG and Gaxiola RA (2015) Arabidopsis Type I Proton-Pumping Pyrophosphatase Express Strongly in Phloem, Where It Is Required for Pyrophosphate Metabolism and Photosynthate Partitioning. *Plant Physiol.* 167:1541-1553.

Zeng L-R, Vega-Sánchez ME, Zhu T and Wang G-L (2006) Ubiquitination-mediated Protein Degradation and Modification: an Emerging Theme in Plant-microbe Interactions. *Nature.* 16: 413-426.

Plaxton WC and Tran HT (2011) Metabolic Adaptations of Phosphate-Starved Plants. *Plant Physiol.* 156(3):1006-15.

Pyke KA (1999) Plastid Division and Development. *Plant Cell.* 11: 549-556.

Quiroga EN, Re de Maxud T, Arias de Flores E and Sampietro AR (1981) Cell wall Pyrophosphatase from Higher Plants. *Plant Physiol. Biochem.* 22: 891–898.

Richardson ChJ and First E (2015) Expanding a tyrosyl-tRNA Synthetase Assay to Other Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Data Brief.* 4: 253-256.

Routh SB, Pawar KI, Ahmad S, Singh S, Suma K, Kumar M, Kuncha SK, Yadav K, Kruparani SP and Sankaranarayanan R (2016) Elongation Factor Tu Prevents Misediting of Gly-tRNA(Gly) Caused by the Design Behind the Chiral Proofreading Site of D-Aminoacyl-tRNA Deacylase. *PLOS Biol.* DOI:10.1371/journal.pbio.1002465.

Salminen A, Ilias M, Belogurov GA, Baykov AA, Lathi R and Young T (2006) Two Soluble Pyrophosphatases in *Vibrio cholerae*: Transient Redundancy or Enduring Cooperation?. *Biochem (Moscow)*. 71(9): 978-982.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. (p. 1626) 2nd Edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schilling RK, Marschner P, Shayrukov Y, Berger B, Tester M, Roy SJ and Plett DC (2014) Expression of the Arabidopsis Vacuolar H⁺-pyrophosphatase Gene (AVP1) Improves the Shoot Biomass of Transgenic Barley and Increases Grain Yield in a Saline Field. *Plant Biotechnol. J.* 12(3):378-386.

Serrano A, Pérez-Castiñeira JR, Baltscheffsky M and Baltscheffsky H (2007) H⁺-PPases: Yesterday, Today and Tomorrow. *IUBMB* 59(2): 76-83.

Shintani T (1998) Cloning and Expression of a Unique Inorganic Pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*: Evidence for a New Family of Enzymes. *FEBS Lett.* 439(3):263-266.

Schulze S, Mant A, Kossmann J and Lloyd JR (2004). Identification of an Arabidopsis Inorganic Pyrophosphatase Capable of Being Imported into Chloroplasts. *FEBS Lett.* 565:101-105.

Sivula T, Salminen A, Parfenyev AN, Pohjanjoki P, Goldman A, Cooperman BS, Baykov AA and Lahti R (1999) Evolutionary Aspects of Inorganic Pyrophosphatase. *FEBS Lett.* 454(1-2):75-80.

Stitt M and Vasella A (1988) Biological Action of Phosphonate Analogs of Fructose 2,6-Bisphosphate on Enzymes from Higher Plants. FEBS Lett. 228(1):60-64.

Sunilkumar G, Mohr LeA, Lapata-Finch E, Emani Ch and Rafhore KS (2002) Developmental and Tissue-Specific Expression of CaMV 35S Promoter in Cotton as Revealed by GFP. Plant Mol. Biol. 50:463-474.

Teplyakov A, Obmolova G, Wilson KS, Ishii K, Kaji H, Samejima T and Kuranova I (1994). Crystal Structure of Inorganic Pyrophosphatase from *Thermus thermophilus*. Protein Sci. 3:1098-1107.

Tian J, Venkatachalam P, Liao H, Yan X and Raghothama K (2007) Molecular Cloning and Characterization of Phosphorus Starvation Responsive Genes in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Planta 227:151-165.

Wang R, Okamoto M, Xing X and Crawford NM. (2003) Microarray Analysis of the Nitrate Response in Arabidopsis Roots and Shoots Reveals over 1,000 Rapidly Responding Genes and New Linkages to Glucose, Trehalose-6-Phosphate, Iron, and Sulfate Metabolism. Plant Physiol. 132: 556- 567.

Wanke M, Ciereszko I, Podbielkowska M and Rychter AM. (1998) Response to Phosphate Deficiency in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Roots. Respiratory Metabolism, Sugar Localization and Changes in Ultrastructure of Bean Roots Cells. Ann Bot-London. 82: 809-819.

Weiner H, Stitt M and Heldt HW (1987). Subcellular Compartmentation of Pyrophosphate and Alkaline Pyrophosphate in Leaves. Biochim et Biophys Acta. 893:13-27.

Wydau S, Ferri-Fioni M-L, Blanquet S and Plateau P. (2007) GEK1, a Gene Product of *Arabidopsis thaliana* Involved in Ethanol Tolerance, is a D-aminoacyl-tRNA Deacylase. *Nucleic Acids Res.* 35(3): 930-938.

Yang NS and Christou P (1990) Cell Type Specific Expression of a CaMV 35S-GUS Gene in Transgenic Soybean Plants. *Dev. Genet.* 11:289-293.

Yang Y, Kwon HB, Peng HP and Shih MC (1993) Stress Responses and Metabolic Regulation of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 101(1):209-16.

Young TW, Kuhn NJ, Wadeson A, Ward S, Burges D and Cooke GD (1998) *Bacillus subtilis* ORF yybQ Encodes a Manganese-Dependent Inorganic Pyrophosphatase with Distinctive Properties: the First of a New Class of Soluble Pyrophosphatase?. *Microbiology.* 144(9): 2563-2571.

Zhang H , Shen G , Kuppu S , Gaxiola R and Payton P (2011) Creating Drought- and Salt-Tolerant Cotton by Overexpressing a Vacuolar Pyrophosphatase Gene. *Plant Signal Behav.* 6(6):861-3.

Zhen RG, Kim EJ and Rea PA (1994) Localization of Cytosolically Oriented Maleimide-Reactive Domain of Vacuolar H⁽⁺⁾ -Pyrophosphatase, *J. Biol. Chem.* 269: 23342–23350.

Zyryanov AB, Shestakov AS, Lathi R and Baykov AA (2002). Mechanism by Which Metal Cofactors Control Substrate Specificity in Pyrophosphatase. *Biochem J.* 367:901-906.

ANEXOS

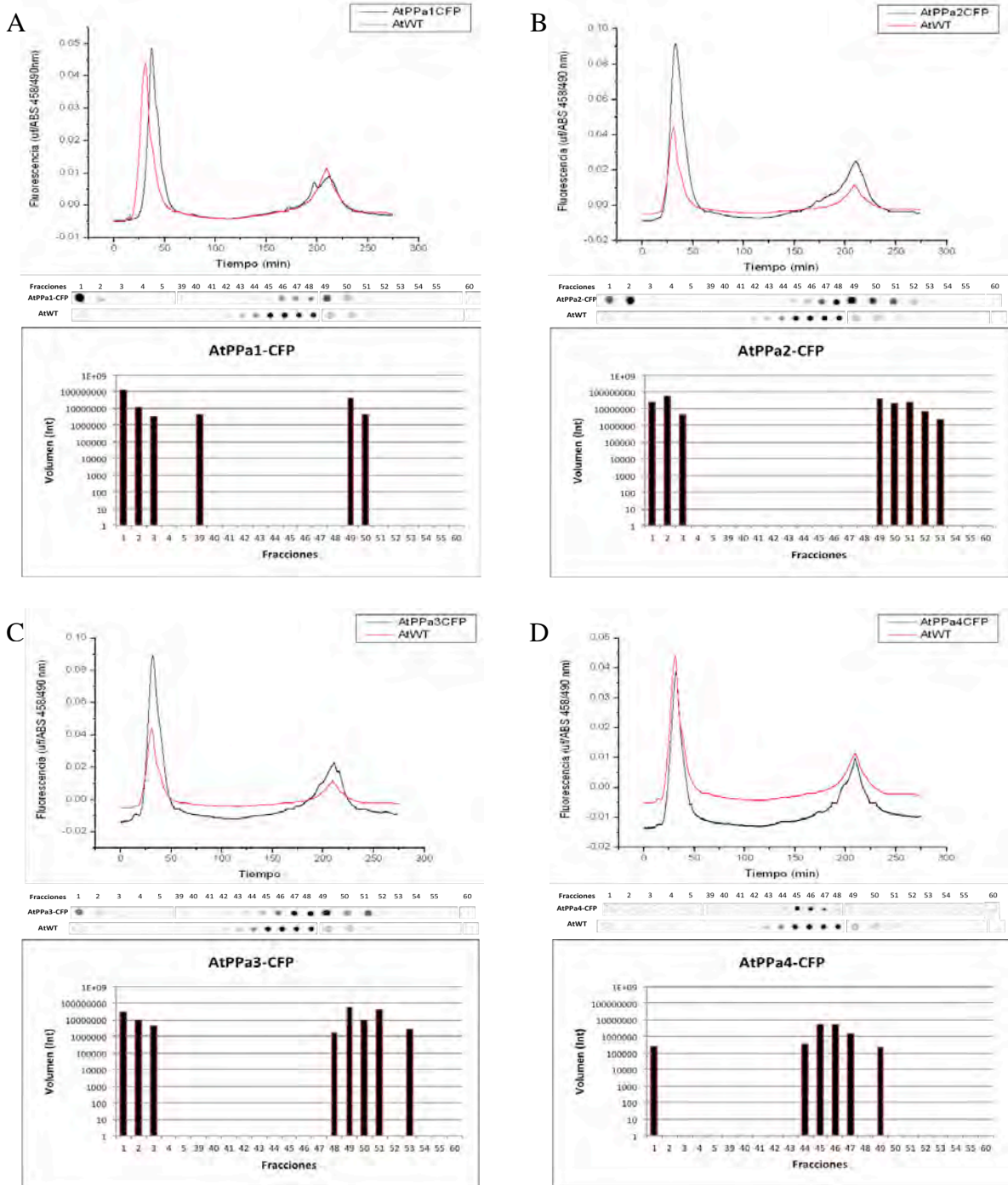


Figura 1A. Fluorescencia y dot blot de proteínas solubles de plantas transgénicas de *A. thaliana* (28 ddg) expresando cada una de las isoformas de AtPPa fusionada a proteína fluorescente CFP. Un mg de proteína soluble de plantas transgénicas AtPPa1-CFP (A), AtPPa2-CFP (B), AtPPa3-CFP (C), AtPPa4-CFP (D) y AtWT, fueron fraccionadas con un columna fenil-sefarosa mediante HPLC (ver materiales y métodos). La fluorescencia fue detectada a la longitud de onda de emisión y excitación de CFP (λ_{EX} :458/ λ_{EM} :490 nm). Las línea continua negra (--), representa la fluorescencia recuperada de la emisión y excitación máxima de la planta transgénica. La línea continua roja (- -) indica la fluorescencia recuperada de la emisión y excitación máxima de la planta silvestre. El análisis de dot blot se realizó con las diferentes fracciones obtenidas mediante el fraccionamiento, tomando aproximadamente 5 μ g de proteína y la detección se realizó utilizando anticuerpo antiGFP. La análisis densitométricos se realizaron empleando el programa ImageLab.

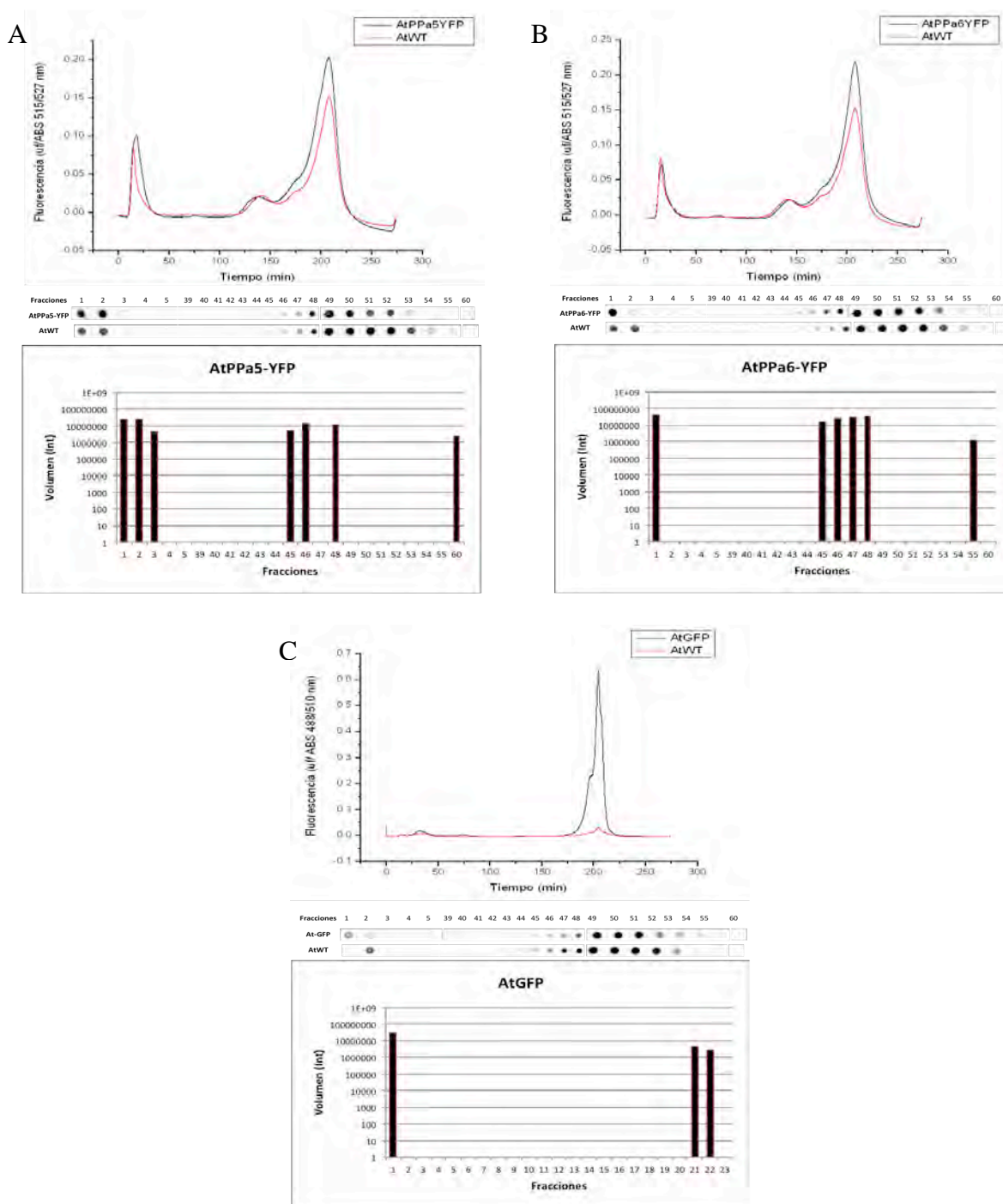


Figura 2A. Fluorescencia y dot blot de proteínas solubles de plantas transgénicas de *A. thaliana* (28 ddg) expresando cada una de las isoformas de AtPPa fusionada a proteína fluorescente CFP. Un mg de proteína soluble de plantas transgénicas AtPPa5-YFP (A), AtPPa6-YFP (B), GFP (C) y AtWT, fueron fraccionadas con un columna fenil-sefarosa mediante HPLC (ver materiales y métodos). La fluorescencia fue detectada a la longitud de onda de emisión y excitación de YFP ($\lambda_{EX}:515/\lambda_{EM}:527\text{nm}$) y GFP ($\lambda_{EX}:488/\lambda_{EM}:510\text{nm}$). Las línea continua negra (—), representa la fluorescencia recuperada de la emisión y excitación máxima de la planta transgénica. La línea continua roja (—) indica la fluorescencia recuperada de la emisión y excitación máxima de la planta silvestre. El análisis de dot blot se realizó con las diferentes fracciones obtenidas mediante el fraccionamiento, tomando aproximadamente 5 μg de proteína y la detección se realizó utilizando anticuerpo antiGFP. La análisis densitométricos se realizaron empleando el programa ImageLab.

Tabla 1A. Inhibición de la actividad pirofosfatasa en extractos crudos.

Planta	MgCl ₂	NaCl	NaF
	Actividad pirofosfatasa ($\mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$)		
AtPPa1-CFP	5.699	4.310	0.640
AtPPa2-CFP	3.818	2.759	0.447
AtPPa3-CFP	5.931	4.891	1.015
AtPPa4-CFP	6.400	4.702	1.165
AtPPa5-YFP	2.112	1.673	0.418
AtPPa6-YFP	2.965	2.376	0.919
GFP	3.110	3.490	0.092
WT	4.594	2.455	0.877

*Extractos crudos dializados de plantas transgénicas fueron incubados en presencia de 3 mM MgCl₂, 80 μM pirofosfato de sodio, 10 mM NaCl y 10 mM NaF. Se tomaron alícuotas las cuales fueron diluidas 5 veces en el medio de ensayo estándar y la actividad fue determinada en un tiempo de incubación de 10 min.

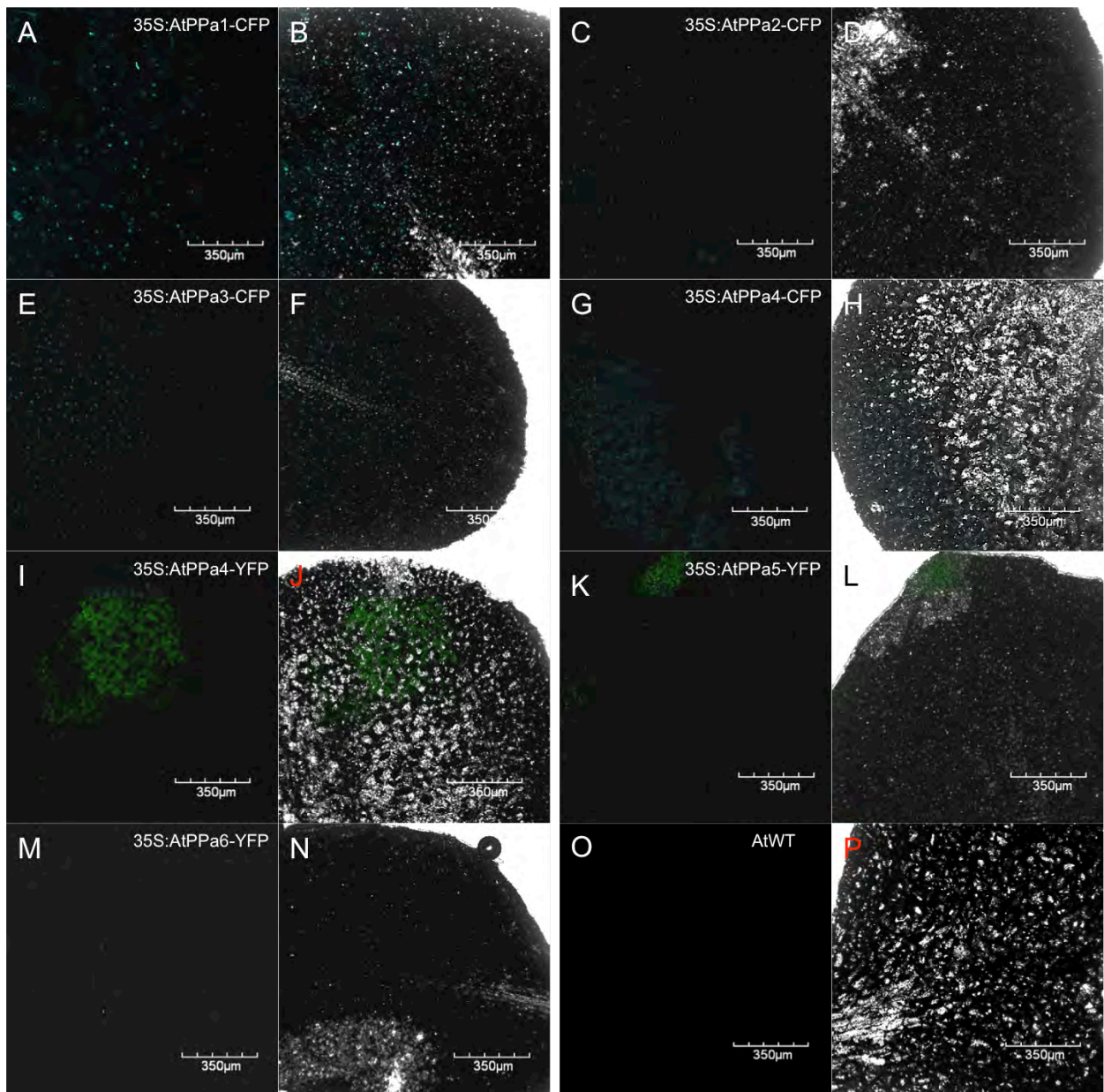


Figura 3A. Localización de las seis isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles en hojas completas de *Arabidopsis*. Imágenes de microscopía confocal de tejido fresco de hojas completas de plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana* de 10 ddg expresando la pirofosfatasa inorgánica soluble fusionada a proteína fluorescente bajo el control del promotor 35S con expresión estable. AtPPa1-CFP (A y B), AtPPa2-CFP (C y D), AtPPa3-CFP (E y F), AtPPa4-CFP (G y H), AtPPa5-YFP (I y J), AtPPa6-YFP (K y L) y AtWT (O y P). Fluorescencia correspondiente a la proteína de fusión AtPPax-XFP (A, C, E, G, I, K, M y O). Sobreposición de XFP y contraste de fases (B, D, F, H, J, L, N y P). Las imágenes fueron tomadas en 10x y corresponden a múltiples planos superpuestos (eje Z). En las imágenes se observa una distribución diferencial de la fluorescencia correspondiente a la proteína de fusión entre las diferentes isoformas.

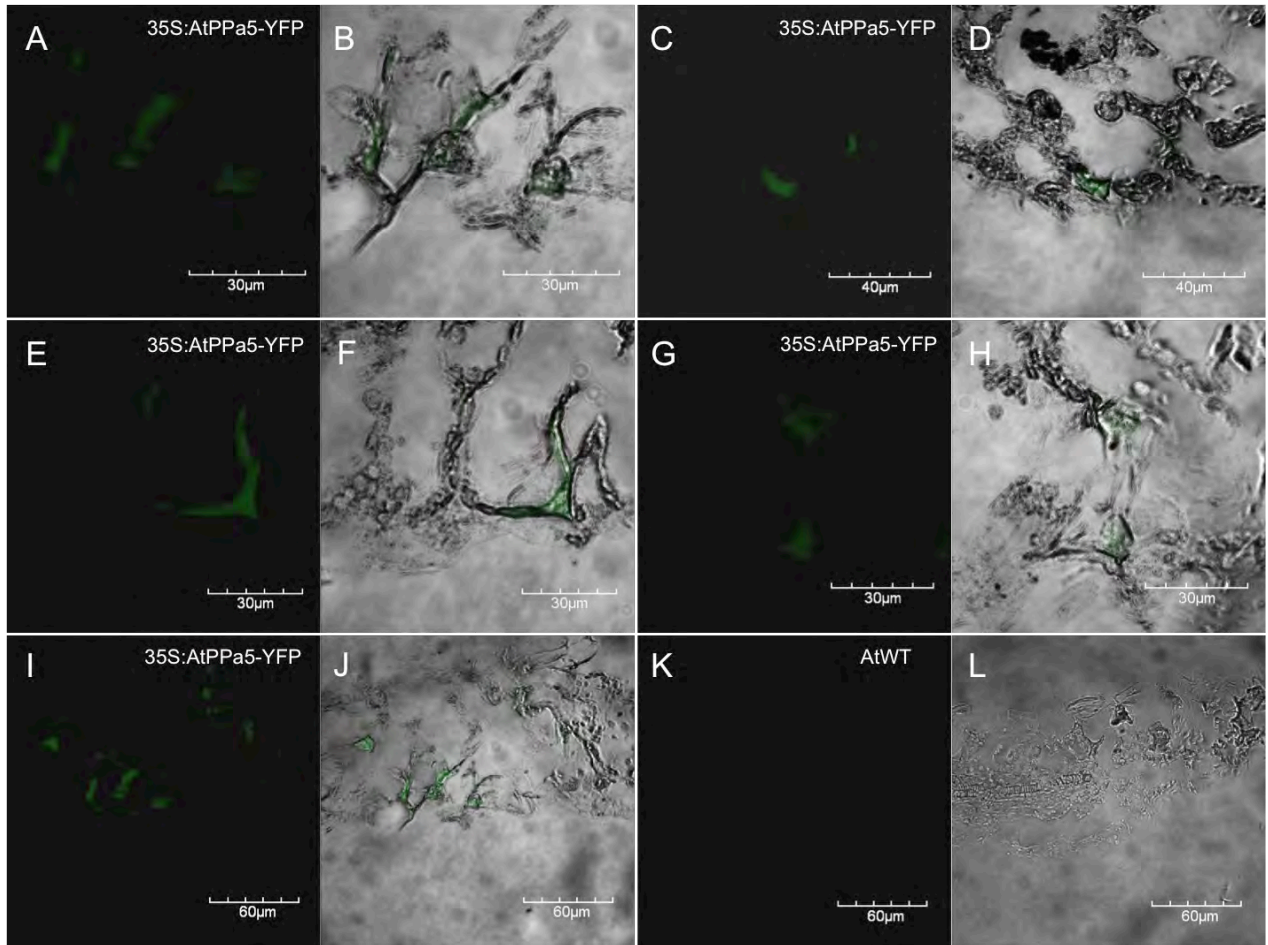


Figura 4A. Localización subcelular de AtPPa5-YFP en tejido fijado. Imágenes de microscopía confocal de tejido fijo de hojas de plantas de 28 ddg transformadas de *Arabidopsis thaliana* expresando la pirofosfatasa inorgánica soluble fusionada a proteína amarilla fluorescente bajo el control del promotor 35S con expresión estable. Secciones de hojas frescas fueron sometidas a un tratamiento de fijación, corte y montaje (ver Materiales y Métodos) para su observación. Los cortes fueron observados en un microscopio confocal a las longitudes de onda de excitación y emisión de YFP. (A-H) AtPPa5-YFP, 40X zoom 2.5X. (I-J) AtPPa5-YFP, 40X. (K-L) AtWT, 40X. Emisión de fluorescencia de YFP (A, C, E, G, I y K). Sobreposición de tejido en contraste de fases con fluorescencia de YFP (B, D, F, H, J y L). Las imágenes de confocal fueron tomadas en múltiples planos superpuestos (eje Z). La localización de la fluorescencia de la proteína de fusión corresponde a la zona del citoplasma de las células.

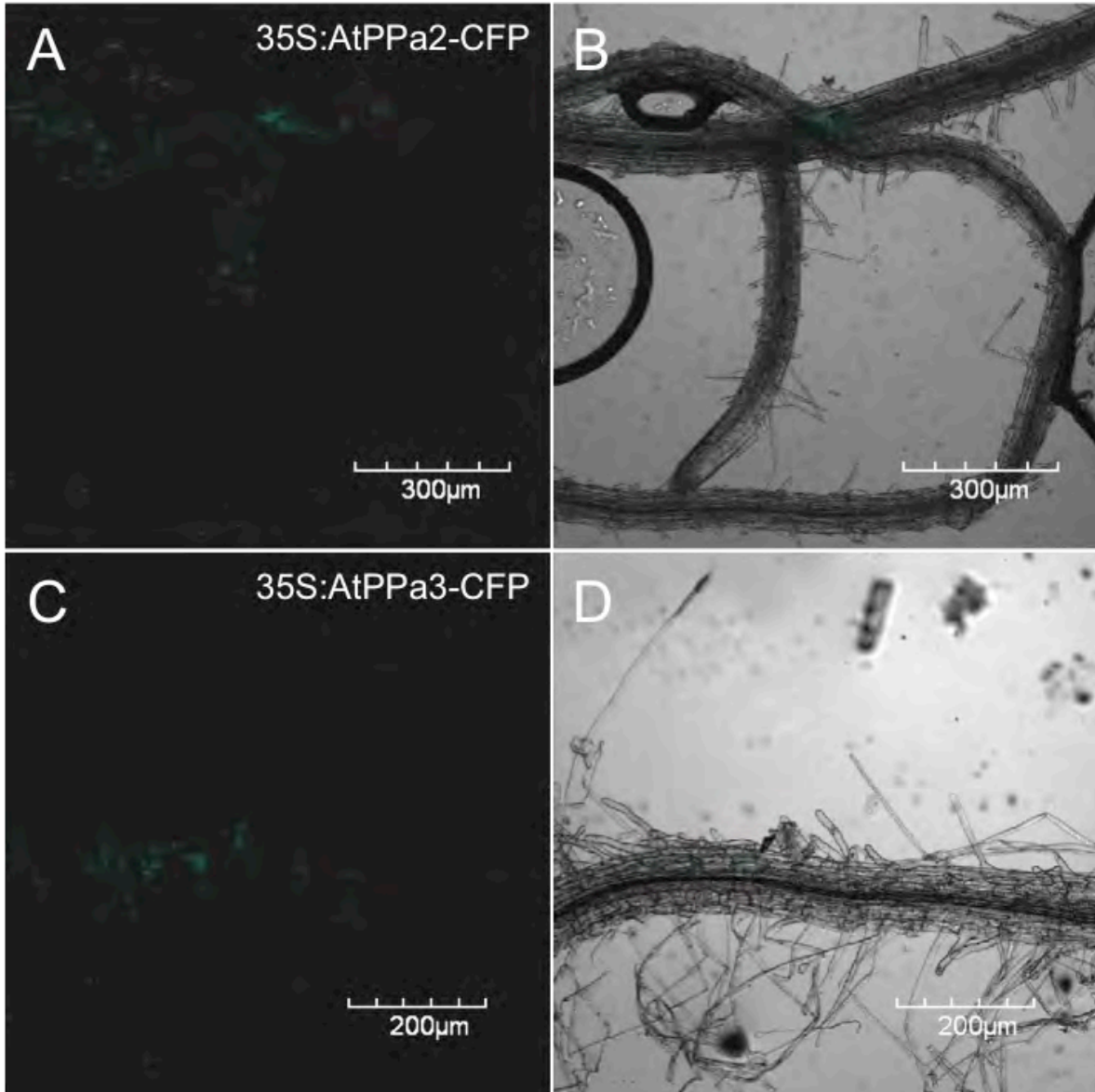


Figura 5A. Localización de proteína de fusión de las isoformas AtPPa2-CFP y AtPPa3-CFP en la raíz completa de *Arabidopsis thaliana*. Detección mediante microscopia confocal de las isoforma dos y tres de pirofosfatasa inorgánica soluble en raíces. Las imágenes se tomaron en raíces de plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan establemente la construcción de la pirofosfatasa inorgánica soluble fusionada a proteína cian fluorescente bajo el control del promotor 35S. Raíces completas de plantas de 14 ddg fueron observadas en microscopia confocal a las longitudes de onda de excitación y emisión de CFP. (A-B) AtPPa2-CFP, 10X. (C-D) AtPPa3-CFP, 10X. Emisión de fluorescencia de CFP (A y C). Sobreposición de fluorescencia de CFP y contraste de fases (B y D). Las imágenes de confocal fueron tomadas en múltiples planos superpuestos (eje Z).

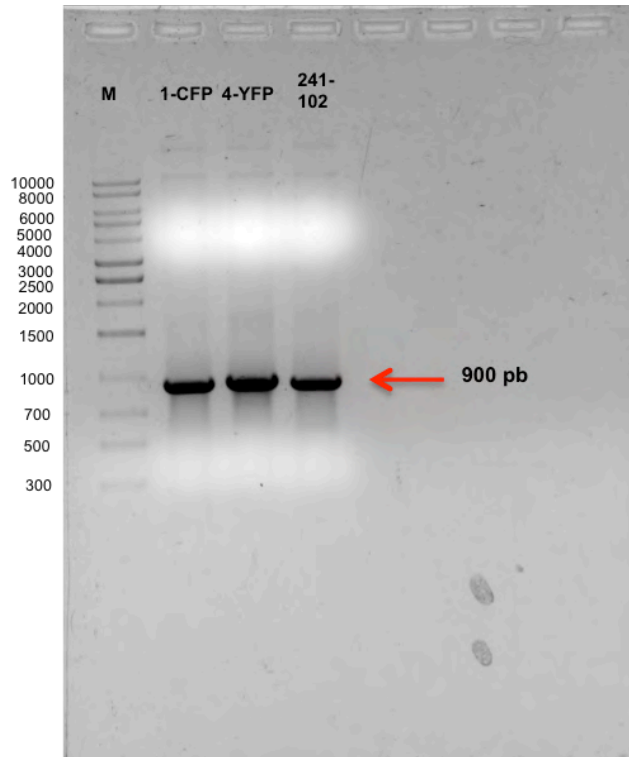


Figura 6A. Amplificación de la secuencia codificante de AtPPa1-CFP, AtPPa4-YFP. Se realizó la amplificación de los plásmidos pEarlyGate-102 y 103 con la inserción del producto de PCR correspondiente a la amplificación de la secuencia codificante de las pirofosfatasas inorgánicas solubles, isoformas AtPPa1 (1-CFP y 241-102) y AtPPa4 (4-YFP). Los productos de amplificación corresponden a la secuencia codificante de las pirofosfatasas inorgánicas solubles y de un fragmento de la proteína fluorescente (YFP y CFP, respectivamente) con un tamaño esperado de 900 pb (flecha roja). Para la amplificación se utilizaron oligonucleótidos que reconocen un fragmento de la secuencia codificante de cada una de las isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles en el extremo 5' (forward) y un fragmento del gene de la proteína fluorescente en el extremo 3' (reverse), los cuales fueron diseñados específicamente para la amplificación del producto de la transformación de la proteína de fusión. Los plásmidos en los que realizó la amplificación fueron extraídos y purificados de células de *E. coli* DH5 α transformadas.

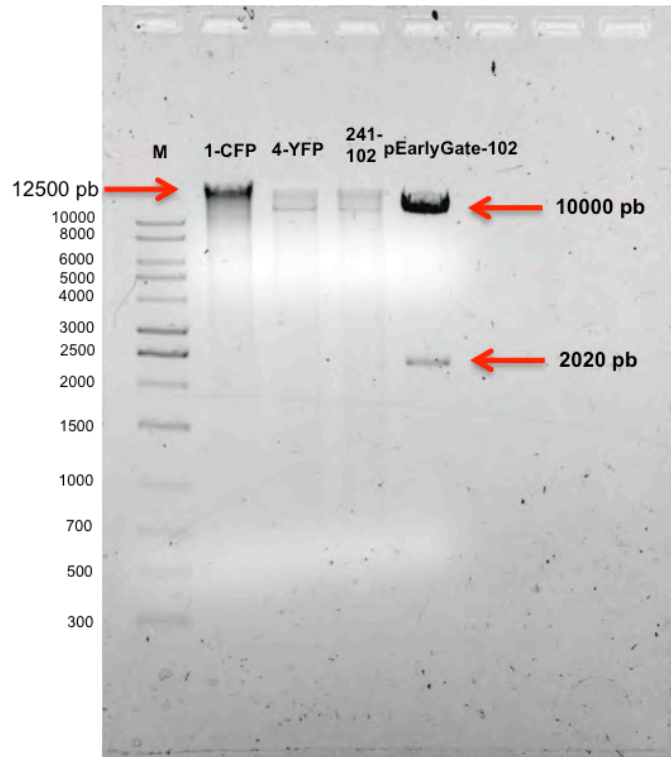


Figura 7A. Productos de digestión de los plásmidos con MluI. Gel de electroforesis del producto de la digestión de los plásmidos pEarlyGate-102 y 103 con la inserción del producto de PCR correspondiente a la amplificación de la secuencia codificante de las pirofosfatasas inorgánicas solubles, isoformas AtPPa1 (1-CFP y 241-102) y AtPPa4 (4-YFP), así como el plásmido vacío (pEarlyGate-102), con la enzima de restricción MluI. En el plásmido vacío se esperaban dos fragmentos de 10000 y 2020 pb (flechas rojas de la derecha) correspondientes a los dos sitios de corte de dicha enzima. En los plásmido con el inserto se esperaba únicamente un fragmento de un tamaño 12500 pb (flecha roja de la izquierda), correspondiente al plásmido linearizado, debido a que el inserto interrumpe uno de los sitios de restricción de la enzima MluI. Los plásmidos digeridos fueron extraídos y purificados de células *E. coli* DH5 α transformadas. Estos plásmidos fueron utilizados para realizar la transformación transitoria de epidermis de cebolla.

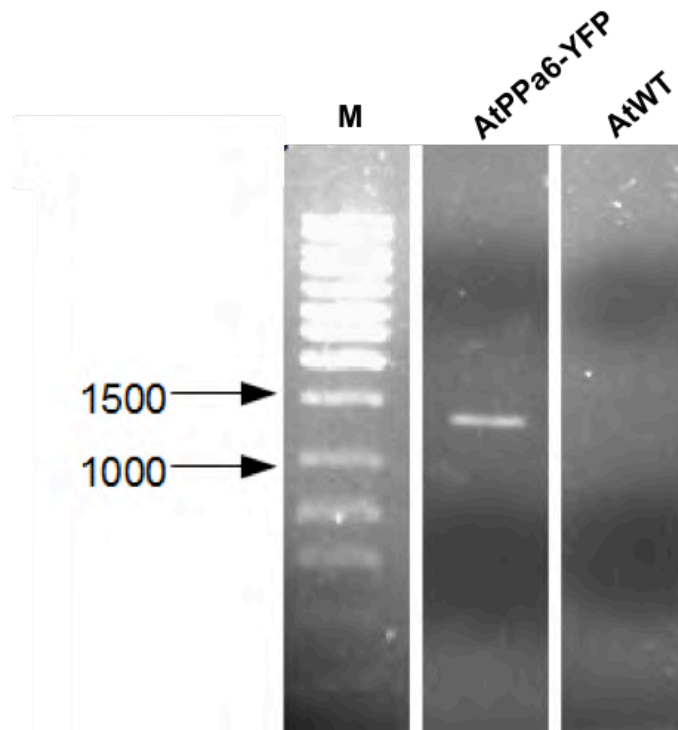


Figura 8A. Comprobación de la expresión de AtPPa6-YFP en plantas transformadas. Amplificación mediante PCR de cDNA obtenido de RNAm de plantas transgénicas de 28 ddg. El producto de amplificación corresponde a la secuencia codificante de la pirofosfatasa inorgánica soluble isoforma seis y de un fragmento de la proteína fluorescente (YFP) con un tamaño esperado de aproximadamente 1200 pb. Para la amplificación se utilizaron oligonucleótidos que reconocen un fragmento de la secuencia codificante de cada una de las isoformas de pirofosfatasas inorgánicas solubles en el extremo 5' (*foward*) y un fragmento del gene de la proteína fluorescente en el extremo 3' (*reverse*), los cuales fueron diseñados específicamente para la amplificación del producto de la transformación de la proteína de fusión.