

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
FOSFATASAS ÁCIDAS CON ACTIVIDAD  
5'-NUCLEOTIDASA EN EJES DE JUDÍA**  
*(Phaseolus vulgaris)*



**Universidad de Córdoba**  
Facultad de Ciencias



**Juan Miguel Cabello Díaz**  
**TESIS DOCTORAL**  
**Córdoba 2013**

TITULO: *IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FOSFATASAS ÁCIDAS  
CON ACTIVIDAD 5'-NUCLEOTIDASA EN EJES DE JUDÍA (Phaseolus  
vulgaris)*

AUTOR: *JUAN MIGUEL CABELLO DÍAZ*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---

# UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal  
Sección de Fisiología Vegetal



## Identificación y caracterización de fosfatasas ácidas con actividad 5'-nucleotidasa en ejes de judía (*Phaseolus vulgaris*)

Juan Miguel Cabello Díaz

Córdoba, 2013



# UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal  
Sección de Fisiología Vegetal



## Identificación y caracterización de fosfatasas ácidas con actividad 5'-nucleotidasa en ejes de judía (*Phaseolus vulgaris*)

Memoria presentada por Juan Miguel Cabello Díaz para optar al grado  
de Doctor en Fisiología Vegetal por la Universidad de Córdoba

Directores del Trabajo

Dr. Manuel Pineda Priego  
Catedrático de Universidad

Dr. Pedro Piedras Montilla  
Profesor Titular





**TÍTULO DE LA TESIS:** IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FOSFATASAS ÁCIDAS CON ACTIVIDAD 5'-NUCLEOTIDASA EN EJES DE JUDÍA (*Phaseolus vulgaris*)

**DOCTORANDO/A:** JUAN MIGUEL CABELLO DÍAZ

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El trabajo de Tesis Doctoral de D. Juan Miguel Cabello Díaz se ha realizado en el Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal, en el grupo "Biotecnología de plantas superiores y algas verdes" (BIO-115). Durante la realización de la Tesis, el doctorando ha trabajado de forma constante para conseguir los objetivos marcados en el plan de trabajo, y ha adquirido el conocimiento de un gran abanico de técnicas en Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología Vegetal. El Ldo. D. Juan Miguel Cabello Díaz ha presentado una gran capacidad crítica para el diseño de experimentos, interpretación de resultados y en la difusión de los mismos. El doctorando ha mostrado una gran actitud docente. Durante estos años ha colaborado en la preparación e impartición de clases prácticas en varias asignaturas de la Licenciatura de Biología, así como en la supervisión de varios alumnos colaboradores de nuestro departamento.

Parte de los resultados de su trabajo han sido presentados en varios congresos científicos y han sido ya publicados en la revista internacional *Plant Physiology and Biochemistry*, situada en el primer cuartil del *Journal Citation Reports*, categoría temática de *Plant Sciences*.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 16 de Abril de 2013

Firma del/de los director/es

Fdo.:  Fdo.: 



Parte de los resultados que se presentan en esta Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes libros y revistas científicas:

**Cabello-Díaz, J. M.**, Quiles, F. A., Lambert, R., Pineda, M. y Piedras, P. (2012). Identification of a novel phosphatase with high affinity for nucleotides monophosphate from common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Physiology and Biochemistry* 53: 54-60.

Pineda, M., Piedras, P., Alamillo, J. M., Aguilar, M., Gálvez-Valdivieso, G., Fernández-Álvarez, J., Raso, M. J., Quiles, F. A., Sánchez-Moran, V., **Cabello-Díaz, J. M.**, Díaz-Leal, J. L. y Lambert, R.; "Bio-115. Biotecnología de plantas superiores y algas verdes. Metabolismo de ureidos en judía.". En: Jurado-Carpio, J., Roldán-Ruiz, M. D., Llamas-Azúa, A. IV jornadas de divulgación de la investigación en Biología Molecular, Celular, Genética y Biotecnología. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba. 2009.

Así mismo se han presentado en los siguientes congresos:

Piedras, P., Alamillo, J. M., Gálvez-Valdivieso, G., Aguilar M, Quiles, F.A., **Cabello-Díaz, J. M.**, Díaz-Leal, J. L., Lambert, R., Colet-Reyes, I., Jurado, L. P. y Pineda, M. Metabolismo de ureidos en judía (*Phaseolus vulgaris*). V Jornada de Divulgación de la Investigación en Biología Molecular, Celular y Biotecnología, Córdoba (España), 2012.

**Cabello-Díaz, J. M.**, Quiles, F. A., Lambert, R., Pineda, M. y Piedras, P. Caracterización de una fosfatasa con alta afinidad por los

nucleótidos en *Phaseolus vulgaris*. XI Reunión nacional del metabolismo del nitrógeno, Cáceres (España), 2012.

**Cabello-Díaz, J. M.**, Lambert, R., Quiles, F. A., Pineda, M. y Piedras, P. Purificación y caracterización de una fosfatasa resistente a molibdato de ejes embrionarios de judía. XIX Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. XII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal, Castellón (España), 2011.

Lambert, R., **Cabello-Díaz, J. M.** Quiles, F. A., y Piedras, P. Efecto del estrés salino sobre el metabolismo de ureidos durante la germinación y el desarrollo postgerminativo de judía. X Reunión nacional del metabolismo del nitrógeno, Benalauría (Málaga, España), 2010.

**Cabello-Díaz, J. M.**, Lambert, R., Quiles, F. A., Pineda, M. y Piedras, P. Purificación parcial y caracterización de la actividad nucleotidasa de plántulas de judía. X Reunión nacional del metabolismo del nitrógeno, Benalauría (Málaga, España), 2010.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo, colaboración y paciencia de muchas personas. Por esta razón es probable que olvide mencionar a algunas de ellas en estas líneas, por lo que pido disculpas por adelantado.

Quisiera comenzar dando las gracias a los directores de este trabajo. Al Prof. Manuel Pineda Priego por haberme acogido en su grupo de investigación cuando aún era un estudiante, lo que me permitió conocer el mundo de la investigación y posteriormente por darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral. En el futuro espero y deseo seguir contando con tu ayuda y colaboración. Al Prof. Pedro Piedras Montilla quiero agradecerle su ayuda, paciencia y dedicación en el día a día de este trabajo. La verdad es que éste no hubiera sido posible sin sus consejos tanto a nivel profesional como personal.

Son innumerables los avances que hoy en día disfrutamos gracias al trabajo procedente de investigaciones científicas. Sin embargo, para investigar se necesita dinero y aunque los científicos seamos personas raras, también comemos y pagamos facturas. Por esta razón es preciso dar las gracias a la Consejería de Innovación, Ciencias y Empresa (Junta de Andalucía) por la financiación de la Beca Predoctoral (P06-CVI-01761) que he disfrutado y al Ministerio de Ciencia e Innovación por la financiación de este trabajo (BIO2006-09366 y AGL2009-11290).

Gracias a los compañeros de laboratorio, empezando por la Dra Josefa Alamillo, sus charlas-consejos sobre cómo funciona un laboratorio y “la vida en general” han sido de gran utilidad. Gracias a Juan Luis compañero de carrera, laboratorio y sobre todo un buen amigo. A Fran, gracias por guiarme y enseñarme en los primeros días cuando ni siquiera sabía usar una pipeta, ha sido un placer trabajar a tu lado día a día. Sé

que me llevo un buen amigo. A Rocío por su amistad, buen humor y sus múltiples anécdotas. A Goyi, compañero de laboratorio y tertulias futboleras por su gran ayuda en los experimentos de biología molecular. A Javi por ofrecerme su ayuda siempre que la he necesitado. A Marta por su organización en el trabajo y estar siempre dispuesta para echar una mano. A Inma y Luis por ser unos estupendos compañeros de trabajo y a las nuevas adquisiciones Cristina, Fernando y Almudena les deseo mucha suerte en el camino que ahora comienzan. No me olvido de Víctor, Isa, M<sup>a</sup> Paz y Eva, del “grupo de bacterias” y de Bryan, Mari y Tina del “grupo de veterinaria”; a todos ellos, gracias por amenizar las comidas y por el intercambio de conocimientos y material, sobre todo del agitador.

A mis amigas de la pandilla: Rocío Pérez, Rocío Calvo, Puri, Pepa, Laura, M<sup>a</sup> Carmen, Tania, Reyes... “Verás la que me cae como me olvide de alguna”. Y amigos: José Baena, José Luis (el hermano), Miguel Ángel y Quique. No se me olvida agradecerse a mi familia elegida Gugu, Paco y Carmona “Los Mazcos”. Gracias a todos por saber que puedo contar con vosotros.

Todo esto no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de toda mi familia: mis padres Pedro y Carmeli, mis hermanos y cuñados Mari Carmen y Juan, Pedro y Choni y Rafael y Lola y mis sobrinos Juanma, Rafa, Germán, David y Carmen. Gracias por animarme siempre en mi trabajo, a pesar de que aún no he sido capaz de explicarles que los geles de proteínas ni se comen ni sirven para la ducha.

En último lugar quiero dar las gracias a mi María; sin ella todo este esfuerzo no tendría sentido. Gracias por aguantarme y quererme todo este tiempo.

A mi familia

A María



## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	XXI
ABREVIATURAS.....	XXVII
RESUMEN.....	XXXI
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1. GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y DESARROLLO POSTGERMINATIVO TEMPRANO .....	3
2. PAPEL DE LOS NUCLEÓTIDOS EN PLANTAS.....	11
3. METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS DURANTE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO POSTGERMINATIVO.....	15
4. UREIDOS DURANTE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO POSTGERMINATIVO DE JUDÍA.....	19
5. FOSFATASAS ÁCIDAS EN PLANTAS.....	22
6. PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS FOSFATASAS ÁCIDAS EN PLANTAS .....	26
II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	29
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1. MATERIAL VEGETAL.....	35
2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES.....	35
3. CULTIVOS BACTERIANOS .....	36
3.1. Estirpes bacterianas .....	36

3.2. Condiciones de cultivo .....	36
3.3. Medios de cultivo .....	36
3.4. Obtención de células competentes.....	36
3.5. Transformación de células competentes.....	37
4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS .....	38
4.1. Determinación de la concentración de proteína .....	38
4.2. Determinación del contenido de ureidos en extractos.....	38
4.3. Determinación de la concentración de fosfato .....	39
5. ENSAYOS ENZIMÁTICOS.....	39
5.1. Determinación de las actividades fosfatasas .....	39
5.1.1. Determinación <i>in vitro</i> .....	39
5.1.2. Determinación en gel.....	40
6. ELECTROFORESIS .....	41
6.1. Electroforesis de ADN.....	41
6.2. Electroforesis de ARN.....	42
6.3. Separación electroforética de proteínas.....	42
6.4. Tinción de los geles de acrilamida .....	43
6.4.1. Coomassie estándar .....	43
6.4.2. Coomassie un paso .....	44
6.4.3. Tinción de plata .....	44
7. ELECTROTRANSFERENCIA Y ENSAYO DE WESTERN BLOT..	45
8. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE GELES DE ACRILAMIDA ...	46
9. SEPARACIÓN DE LAS ACTIVIDADES FOSFATASAS MAYORITARIAS DE EJES EMBRIONARIOS DE JUDÍA .....	46
10. PURIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA RESISTENTE A MOLIBDATO .....	47
10.1 Cromatografía de intercambio iónico .....	47
10.2. Concentración y cromatografía de exclusión molecular .....	48
10.3. Tratamiento térmico .....	48
10.4. Cromatografía de afinidad.....	48

11. PURIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA SENSIBLE A MOLIBDATO .....	49
11.1. Cromatografía de intercambio iónico .....	49
11.2. Cromatografía de afinidad .....	50
11.3. Cromatografía en Phenyl Sepharose.....	50
12. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA RESISTENTE A MOLIBDATO DE PLÁNTULAS DE JUDÍA .....	50
12.1. Determinación de la temperatura óptima.....	50
12.2. Estabilidad térmica .....	51
12.3. Efecto de los cationes .....	51
12.4. Determinación del pH óptimo .....	51
12.5. Determinación de los valores de $K_m$ aparente y $V_{max}$ .....	52
12.6. Efecto de los inhibidores .....	52
12.7. Especificidad de sustrato .....	52
13. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA SENSIBLE A MOLIBDATO DE EJES DE JUDÍA .....	52
13.1. Determinación de la temperatura óptima.....	52
13.2. Estabilidad térmica .....	53
13.3. Efecto de los cationes .....	53
13.4. Determinación del pH óptimo .....	53
13.5. Determinación de los valores de $K_m$ aparente y $V_{max}$ .....	53
13.6. Efecto de los inhibidores .....	53
13.7. Especificidad de sustrato .....	54
14. EXPERIMENTOS FISIOLÓGICOS .....	54
14.1. Actividades fosfatasas durante la germinación y desarrollo .....	54
14.2. Tratamientos con compuestos nitrogenados.....	54
14.3. Tratamientos con fosfato y molibdato .....	55
14.4. Tratamientos con NaCl.....	55
14.4.1. Tratamientos desde el inicio de la imbibición.....	55
14.4.2. Tratamientos sobre plántulas en desarrollo .....	55

14.5. Tratamientos con hemina.....	56
14.5.1. Efecto de la hemina .....	56
14.5.2. Tratamiento con NaCl en plántulas incubadas con hemina.....	56
14.6. Tratamientos de estrés hídrico.....	56
14.7. Tratamientos con metil-jasmonato .....	56
14.8. Efecto de la etiolizació .....	57
15. IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD FOSFATASA POR HUELLA PEPTÍDICA (MALDI-TOF).....	57
16. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	58
16.1. Aislamiento de ARN de plántulas de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	58
16.2. Aislamiento de ADN plasmídico.....	58
16.3. Cuantificación de ácidos nucleicos .....	59
17. SÍNTESIS DE ADNc .....	59
18. CLONACIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN EN VECTORES PLASMÍDICOS.....	60
18.1. Ligación de moléculas de ADN en pGEM-T (Promega) .....	60
18.2. Selección de transformantes con pGEM-T.....	60
18.3. Ligación de moléculas de ADN en pET30b(+) (Novagen).....	61
18.4. Selección de transformantes con pET30b(+) .....	61
18.5. Análisis por PCR .....	61
19. SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	62
20. CLONACIÓN DEL ADNc QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA IDENTIFICADA MEDIANTE MALDI-TOF .....	62
21. EXPRESIÓN EN <i>ESCHIRICHIA COLI</i> Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	63
21.1. Clonación de la secuencia codificante del ADNc en el vector pET30b+ .....	63
21.2 Expresión de la proteína recombinante .....	64
21.3. Purificación de la proteína recombinante .....	65

22. BASES DE DATOS Y SOFTWARE DE PREDICCIÓN Y ANÁLISIS .....	66
22.1. Bases de datos.....	66
22.2. Software de predicción y análisis .....	66
IV. RESULTADOS .....	67
CAPÍTULO I. ANÁLISIS DE LAS ACTIVIDADES FOSFATASAS ÁCIDAS DURANTE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO POSTGERMINATIVO DE PLÁNTULAS DE JUDÍA .....	67
1.1. Actividades fosfatasa durante la germinación y desarrollo postgerminativo de judía.....	69
1.2. Análisis de la actividad fosfatasa resistente a molibdato en plántulas de judía.....	71
1.3. Análisis de la actividad fosfatasa sensible al molibdato en ejes de judía .....	73
1.4. Efecto de la inclusión de compuestos nitrogenados en las actividades fosfatasa de ejes de plántulas de judía.....	74
1.5. Efecto del fosfato y molibdato en las actividades fosfatasa de ejes de plántulas de judía .....	76
CAPÍTULO II. PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD FOSFATASA ÁCIDA RESISTENTE A MOLIBDATO CON ALTA AFINIDAD POR LOS NUCLEÓTIDOS .....	79
2.1. Purificación de la actividad fosfatasa resistente a molibdato de ejes embrionarios de judía.....	81
2.2. Caracterización de la actividad fosfatasa resistente a molibdato .....	84
2.3. Identificación de la proteína con actividad 5'-nucleotidasa mediante MALDI-TOF .....	90

CAPÍTULO III. PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD FOSFATASA INESPECÍFICA INDUCIDA DURANTE EL DESARROLLO POSTGERMINATIVO DE JUDÍA .....	97
3.1. Purificación de la actividad fosfatasa sensible a molibdato de ejes embrionarios de judía.....	99
3.2. Caracterización de la actividad fosfatasa sensible a molibdato de ejes de judía.....	100
3.3. Identificación de la proteína con actividad fosfatasa ácida mediante MALDI-TOF .....	105
CAPÍTULO IV. ACTIVIDADES FOSFATASAS Y CONTENIDO EN UREIDOS EN PLÁNTULAS DE JUDÍA SOMETIDAS A CONDICIONES ADVERSAS .....	113
4.1. Efecto de la salinidad sobre las actividades fosfatasas y el contenido de ureidos durante la germinación y el desarrollo postgerminativo de judía .....	115
4.2. Efecto de la hemina sobre las actividades fosfatasas y el contenido de ureidos durante la germinación y el desarrollo postgerminativo de judía .....	121
4.3. Efecto del estrés hídrico en las actividades fosfatasas y el contenido de ureidos durante el desarrollo postgerminativo de judía .....	125
4.4. Efecto de la etiolización en las actividades fosfatasas y el contenido de ureidos en plántulas de judía.....	127
4.5. Efecto del metil-jasmonato en las actividades fosfatasas y el contenido de ureidos en plántulas de judía .....	128

CAPÍTULO V. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA PROTEÍNA IDENTIFICADA COMO 5'-NUCLEOTIDASA DE JUDÍA EN <i>E. COLI</i> .....	131
5.1. Expresión del ADNc de la secuencia identificada como posible nucleotidasa de <i>Phaseolus vulgaris</i> en <i>E. coli</i> .....	133
5.2. Purificación de la proteína recombinante .....	136
V. DISCUSIÓN .....	139
1. ESTUDIO DE LAS FOSFATASAS ÁCIDAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS DE EJES EMBRIONARIOS DE JUDÍA.....	141
2. PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA RESISTENTE A MOLIBDATO DE EJES EMBRIONARIOS DE JUDÍA .....	145
3. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA SENSIBLE A MOLIBDATO DE EJES EMBRIONARIOS DE JUDÍA .....	152
4.- ACTIVIDADES FOSFATASAS EN PLÁNTULAS DE JUDÍA EN CONDICIONES ADVERSAS .....	153
VI.CONCLUSIONES.....	159
VII. BIBLIOGRAFÍA .....	163



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.-</b> Esquema de las fases de la germinación y desarrollo postgerminativo temprano .....	4
<b>Figura 2.-</b> Representación de los principales nucleótidos de purina y pirimidina.....	13
<b>Figura 3.-</b> Catabolismo de Purinas .....	18
<b>Figura 4.-</b> Actividades fosfatasa en extractos de cotiledones (A) y ejes (B) de plántulas de judía de 6 días .....	70
<b>Figura 5.-</b> Actividades fosfatasa en plántulas de judía durante la germinación y el desarrollo postgerminativo temprano.....	70
<b>Figura 6.-</b> Actividad fosfatasa resistente a molibdato a lo largo del desarrollo de plántulas de judía.....	71
<b>Figura 7.-</b> Actividad fosfatasa resistente a molibdato en ejes embrionarios durante la germinación .....	72
<b>Figura 8.-</b> Actividad fosfatasa resistente a molibdato en las distintas partes de plántulas de judía.....	72
<b>Figura 9.-</b> Actividad fosfatasa sensible a molibdato a lo largo del desarrollo en plántulas de judía.....	73
<b>Figura 10.-</b> Actividad fosfatasa sensible a molibdato en tejidos de plántulas de judía .....	74
<b>Tabla 1.-</b> Efecto de varios compuestos nitrogenados sobre las actividades fosfatasa y en el contenido de ureidos en ejes de 5 días.....	75
<b>Tabla 2.-</b> Efecto del fosfato y del molibdato sobre las actividades fosfatasa y en el contenido de ureidos en ejes de judía.....	77
<b>Tabla 3.-</b> Purificación de la actividad fosfatasa resistente a molibdato de ejes embrionarios de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	81
<b>Figura 11.-</b> Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel....	82
<b>Figura 12.-</b> Análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de la fosfatasa resistente a molibdato purificada de <i>P. vulgaris</i> .....	83

<b>Tabla 4.-</b> Especificidad de sustrato de la actividad fosfatasa resistente a molibdato .....	84
<b>Tabla 5.-</b> Propiedades cinéticas de la actividad fosfatasa resistente a molibdato con varios nucleótidos .....	85
<b>Figura 13.-</b> Determinación de la $K_m$ y $V_{max}$ de la actividad fosfatasa resistente a molibdato con IMP y AMP como sustratos .....	86
<b>Tabla 6.-</b> Efecto del EDTA y de varios cationes divalentes sobre la actividad fosfatasa resistente a molibdato .....	86
<b>Figura 14.-</b> Efecto de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad de la fosfatasa resistente a molibdato purificada de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	87
<b>Figura 15.-</b> Efecto del pH sobre la actividad fosfatasa resistente a molibdato purificada con varios nucleótidos como sustrato.....	88
<b>Figura 16.-</b> Efecto del pH sobre la $K_m$ de la actividad fosfatasa resistente a molibdato purificada con IMP y AMP como sustratos.....	88
<b>Tabla 7.-</b> Efecto de varios compuestos sobre la actividad fosfatasa resistente a molibdato .....	89
<b>Figura 17.-</b> Efectos del <i>p</i> -HMB y del DTT sobre la actividad resistente a molibdato de ejes de judía.....	90
<b>Tabla 8.-</b> Resultados del análisis de la identificación mediante huella peptídica.....	91
<b>Figura 18.-</b> Espectro de la identificación por huella peptídica (MALDI-TOF).....	92
<b>Figura 19.-</b> Secuencia de la proteína Phvulv091001267m de <i>Phaseolus vulgaris</i> identificada por huella peptídica (MALDI-TOF) y análisis de los datos MS/MS.....	93
<b>Figura 20.-</b> Comparación de los motivos I y II de la superfamilia HAD entre nucleotidasas de distintos organismos y la proteína purificada de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	94
<b>Figura 21.-</b> Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida para la nucleotidasa de judía con las de varias proteínas de plantas .....	95

<b>Figura 22.-</b> Distancias filogenéticas entre varias de las proteínas homólogas .....	96
<b>Tabla 9.-</b> Grado de identidad y divergencia a nivel proteico entre varias de las proteínas homologas a la de <i>P. vulgaris</i> en estudio.....	96
<b>Tabla 10.-</b> Purificación de la fosfatasa sensible a molibdato de ejes embrionarios de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	99
<b>Figura 23.-</b> Cromatografía de afinidad en concanavalina-A .....	100
<b>Figura 24.-</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fosfatasa sensible a molibdato purificada de <i>P. vulgaris</i> .....	101
<b>Figura 25.-</b> Efecto de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad de la fosfatasa sensible a molibdato purificada de <i>Phaseolus vulgaris</i> .	102
<b>Figura 26.-</b> Efecto del pH sobre la actividad fosfatasa sensible a molibdato de judía .....	102
<b>Tabla 11.-</b> Especificidad de sustrato de la actividad fosfatasa sensible a molibdato.....	103
<b>Tabla 12.-</b> Propiedades cinéticas de la actividad fosfatasa sensible a molibdato .....	104
<b>Figura 27.-</b> Determinación gráfica de la $K_m$ y $V_{max}$ de la actividad fosfatasa .....	104
<b>Tabla 13.-</b> Efecto de varios compuestos sobre la actividad fosfatasa sensible a molibdato de judía. ....	105
<b>Tabla 14.-</b> Resultados del análisis de la identificación mediante huella peptídica.....	106
<b>Tabla 15.-</b> Resultado del análisis MS/MS de los péptidos identificados por MALDI-TOF .....	107
<b>Figura 28.-</b> Localización de los péptidos identificados por MALDI-TOF y MS/MS en la secuencia aminoacídica identificada .....	107
<b>Figura 29.-</b> Análisis de la secuencia de aminoácidos de la fosfatasa ácida identificada en ejes de judía.....	109

<b>Figura 30.-</b> Alineamiento de la secuencia aminoacídica de judía identificada por MALDITOF-TOF con varias PAP .....	110
<b>Figura 31.-</b> Distancias filogenéticas entre varias proteínas homólogas .	111
<b>Tabla 16.-</b> Grado de identidad y divergencia a nivel proteico entre varias de las proteínas homólogas a <i>P. vulgaris</i> en estudio .....	111
<b>Figura 32.-</b> Efecto de NaCl en el desarrollo postgerminativo de judía ..	115
<b>Figura 33.-</b> Actividades fosfatasas de plántulas de judía de 7 DDI desarrolladas en presencia de distintas concentraciones de NaCl .....	116
<b>Figura 34.-</b> Efecto de NaCl en el crecimiento de plántulas de judía .....	117
<b>Tabla 17.-</b> Actividades fosfatasas en cotiledones y ejes de judía en desarrollo tratadas con NaCl.....	118
<b>Figura 35.-</b> Actividades fosfatasas en gel en ejes de judía de 5 DDI bajo condiciones de estrés salino .....	118
<b>Tabla 18.-</b> Concentración de fosfato inorgánico en plántulas de 5 días de desarrollo tratadas durante 24 h con NaCl.....	119
<b>Tabla 19.-</b> Actividades fosfatasas en raíces y parte aérea de plántulas en desarrollo tratadas con NaCl.....	119
<b>Figura 36.-</b> Actividades fosfatasas en gel en partes aéreas y raíces de plántulas de judía de 7 DDI bajo condiciones de estrés salino .....	120
<b>Tabla 20.-</b> Actividades fosfatasas y contenido de ureidos en raíces de plántulas de judía tratadas con NaCl 500 mM.....	121
<b>Figura 37.-</b> Contenido de ureidos y actividades fosfatasas en ejes en desarrollo de judía tratadas con hemina.....	122
<b>Tabla 21.-</b> Actividades fosfatasas y contenido de ureidos en raíces de plántulas de judía tratadas con hemina .....	123
<b>Figura 38.-</b> Incremento del eje embrionario en plántulas de judía tratadas con hemina y sometidas a estrés salino .....	124
<b>Tabla 22.-</b> Actividades fosfatasas y contenido de ureidos en raíces de plántulas de judía incubadas con hemina 10 $\mu$ M y sometidas a estrés salino .....	125

<b>Figura 39.-</b> Actividades fosfatasas y contenido de ureidos en raíces de plántulas sometidas a déficit hídrico.....	126
<b>Figura 40.-</b> Actividades fosfatasas en extractos de raíces de plántulas de judía sometidas a déficit hídrico .....	127
<b>Figura 41.-</b> Actividades fosfatasas y contenido de ureidos en plántulas etioladas .....	128
<b>Figura 42.-</b> Actividades fosfatasas y contenido de ureidos en ejes de plántulas tratadas con metil-jasmonato.....	129
<b>Figura 43.-</b> Actividades fosfatasas en extractos de raíces de plántulas tratadas con metil-jasmonato .....	130
<b>Figura 44.-</b> Secuencia nucleotídica correspondiente al ADNc de pvntdsa y la secuencia aminoacídica deducida .....	134
<b>Figura 45.-</b> Sobreexpresión de la proteína recombinante.....	135
<b>Figura 46.-</b> Actividad nucleotidasa en los extractos crudos de E. coli...	136
<b>Figura 47.-</b> Purificación de la proteína recombinante .....	137



## ABREVIATURAS

A	absorbancia
ABA	ácido abscísico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ADP	adenosina difosfato
AMP	adenosina monofosfato
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
APS	persulfato de amonio
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosina trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato
CMP	citocina monofosfato
Con-A	concanavalina A
DEAE	dietilaminoetil
DO	densidad óptica
DOC	desoxicolato sódico
DDI	días después de la imbibición
DTT	1, 4-ditiotreitol
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
<i>g</i>	aceleración de la gravedad
GAs	giberalinas
GMP	guanosina monofosfato
IMP	inosina monofosfato
IPTG	isopropil-D-tiogalactósido
ITP	inosina trifosfato
kDa	kiloDalton

kb	kilobase
K <sub>m</sub>	constante de Michaelis-Menten
LB	medio de Luria-Bertani
mA	miliAmperio
MES	ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
NBT	azul de tetrazolio (nitroblue tetrazolium)
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PF	peso fresco
<i>p</i> -HMB	<i>para</i> - hidroximercurobenzoato
<i>p</i> -NPP	<i>para</i> -nitrofenil fosfato
P <sub>pi</sub>	pirofosfato
PVDF	difluoruro de polivinilideno
p:v	peso:volumen
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
RT	retrotranscripción
SDS	dodecil-sulfato sódico
TEA	trietanolamina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
T <sub>m</sub>	temperatura de fusión
TRIS	tris-(hidroximetil)-aminometano
T-TBS	twen-TRIS tampón salino
UMP	uridina monofosfato
U	unidad internacional de actividad enzimática
UV	ultravioleta
VSP	proteínas de reserva vegetativa
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- -D-galactopiranosido

XMP

xantosina monofosfato



## Resumen

Las plántulas de judía (*Phaseolus vulgaris*) acumulan ureidos durante el desarrollo postgerminativo temprano, los cuales provienen de la degradación de nucleótidos de purinas. El primer paso de esta ruta está catalizado por una fosfatasa que transforma los nucleótidos en nucleósidos, enzima que hasta la fecha no ha sido identificada.

En este trabajo se han identificado, purificado y caracterizado las dos actividades fosfatasas con masas moleculares de 55 y 100 kDa mayoritarias en ejes en desarrollo de judía. Ambas se inducen tras la germinación de las semillas y se diferencian por su sensibilidad al molibdato, un inhibidor de fosfatasas ácidas. La actividad de la proteína de 55 kDa fue resistente a molibdato y presentó mayor constante de afinidad por los nucleótidos. La actividad de 100 kDa fue sensible a molibdato y presentó mayor afinidad por fosfoenol piruvato, tirosina-P y pirofosfato. Ambas proteínas se han identificado mediante MALDI-TOF/TOF y la proteína de 55 kDa se ha expresado como proteína recombinante en *Escherichia coli*. Se han analizado las implicaciones fisiológicas de ambas actividades durante el desarrollo postgerminativo de judía y en plántulas expuestas a condiciones de estrés y se han relacionado con el contenido de ureidos en los mismos tejidos y condiciones.

## Summary

After germination and during postgerminative development, common bean (*Phaseolus vulgaris*) accumulates ureides derived from degradation of purines nucleotides. The first step in the conversion of purines to ureides is the removal of the 5' phosphate group by a phosphatase that has not been established yet.

In this work two main phosphatase activities with molecular mass of 55 and 100 kDa were identified, purified and characterized in embryonic axes of common bean. Both activities were induced after radicle protrusion, and they differed in their sensibility to molybdate, a common phosphatase inhibitor. The enzyme of 55 kDa was resistant to molybdate and showed the highest phosphatase activity with the nucleotides as substrates. The enzyme of 100 kDa was sensitive to molybdate and showed the highest activity with phosphoenol pyruvate, tyrosine phosphate and pyrophosphate. A putative candidate gene coding for the enzyme of 55 kDa was cloned and overexpressed in *Escherichia coli*. The physiological implications for both activities and the ureides levels were analyzed during postgerminative development of common bean and in seedlings exposed to several stress conditions.



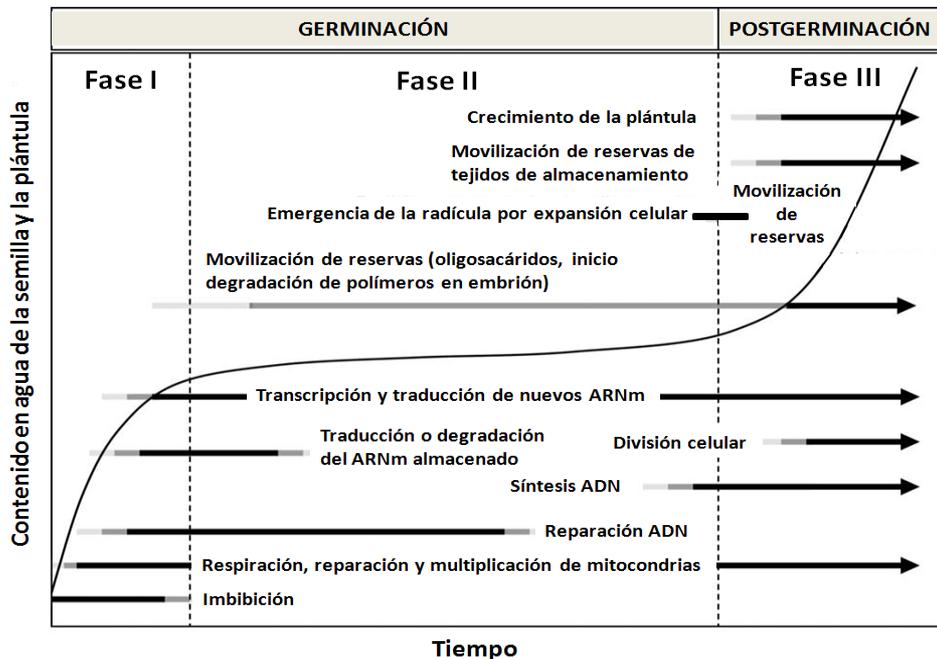
## **I. INTRODUCCIÓN**



## **1. GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y DESARROLLO POSTGERMINATIVO TEMPRANO**

La germinación de la semilla y el desarrollo postgerminativo es un periodo crucial en el ciclo de vida de plantas superiores. La germinación es un proceso complejo durante el cual la semilla debe recuperar rápidamente la actividad fisiológica perdida durante su maduración, incrementar la intensidad del metabolismo, completar los eventos celulares que permitan la emergencia del embrión y prepararse para el posterior crecimiento de la plántula (Nonogaki et al., 2010). Por definición, la germinación es el periodo que comienza con la toma de agua por la semilla seca y termina con la elongación del eje embrionario. Los procesos que ocurren tras la emergencia radicular están relacionados con el crecimiento de la plántula (Bewley, 1997). Para que la germinación tenga lugar es necesario que se den una serie de condiciones ambientales favorables como son: un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia y una temperatura adecuada para los distintos procesos metabólicos y para el desarrollo de la plántula. Sin embargo, hay ocasiones en las que la semilla es incapaz de germinar a pesar de que las condiciones para ello sean las adecuadas, debido a que se encuentra en estado de latencia o dormición. La transición entre semillas durmientes y germinación es una fase crítica en el ciclo de vida de las plantas y de gran importancia ecológica y económica. Algunas hormonas, giberelinas (GAs) y el ácido abscísico (ABA), tienen un importante papel en este proceso. El ABA induce y mantiene la latencia de las semillas, mientras que las GAs tienen el efecto contrario. Un balance dinámico de síntesis y catabolismo de estas dos hormonas antagonistas controla el equilibrio entre germinación y latencia (Rodríguez-Gacio et al., 2009).

En el proceso de germinación y desarrollo postgerminativo temprano se pueden distinguir tres fases (Figura 1): hidratación, germinación y postgerminación (Nonogaki et al., 2010). En la primera fase tiene lugar una intensa absorción de agua (imbibición) por los distintos tejidos de la semilla y un aumento paralelo de la actividad respiratoria. En la segunda fase se produce una ralentización en la absorción de agua y representa la germinación propiamente dicha. En esta fase se producen las transformaciones metabólicas necesarias para el correcto desarrollo de la plántula. La tercera fase o fase de desarrollo postgerminativo se inicia con la emergencia del embrión y en ella vuelve a aumentar la tasa de absorción de agua y la actividad respiratoria. Las semillas en estado de dormición no completan la germinación por lo que permanecen en la Fase II.



**Figura 1.- Esquema de las fases de la germinación y desarrollo postgerminativo temprano.** Se muestran los diversos acontecimientos físicos y metabólicos que tienen lugar durante la germinación y desarrollo postgerminativo. El rango de tiempo varía entre horas y semanas dependiendo de la especie y las condiciones de germinación. En la figura se representa la curva de absorción de agua. Adaptado de Nonogaki et al., 2010.

El incremento exponencial en la toma de agua durante la Fase I se debe a un incremento en el número de células que se hidratan más que a un incremento de la hidratación de todas las células de forma uniforme (Nonogaki et al., 2010). La entrada de agua en las células de semillas secas durante la Fase I produce perturbaciones temporales en sus estructuras, especialmente en membranas, lo que lleva a la pérdida rápida de solutos y metabolitos de bajo peso molecular al medio que rodea la semilla (Bewley, 1997). Esto se debe a la transición de los fosfolípidos que componen la membrana del estado gel alcanzado durante la maduración y desecación hasta un estado normal de hidratación líquido cristalino. Este cambio se realiza en un corto periodo de tiempo, restringiéndose así la pérdida excesiva de solutos. El mecanismo por el que se reparan los daños producidos en las membranas y orgánulos por los procesos de desecación y rehidratación de la semilla es aún desconocido. Durante la germinación de semillas de algodón, la cantidad de N-acetil-fosfatidil-etanolamina, un fosfolípido con propiedades estabilizadoras de membrana, se incrementa al igual que su síntesis. Esta molécula podría estar implicada en el mantenimiento y mejora de la integridad de las membranas (Sandoval et al., 1995). En este periodo de imbibición también se han observado daños en la estructura de las proteínas. Estos daños podrían ser debidos a la formación anormal de aminoácidos durante el almacenamiento y desecación de la semilla. Tras la hidratación de la semilla, estos aminoácidos defectuosos podrían resultar en un mal plegamiento de las proteínas, causando una reducción o la pérdida de la función de la proteína. La proteína L-isoaspartil metiltransferasa (PIMT) juega un papel importante en la reparación de las proteínas dañadas en las semillas (Dinkins et al., 2008).

Uno de los primeros cambios que tienen lugar durante la imbibición es la recuperación de la actividad respiratoria. Los tejidos de semillas secas maduras contienen mitocondrias, aunque están poco diferenciadas como consecuencia de la desecación durante la maduración. Sin embargo, pocas horas después de la imbibición hay presentes suficientes enzimas del ciclo de Krebs y oxidasas terminales como para poder generar ATP (Hourmant et al., 1981). Estas enzimas mitocondriales podrían estar protegidas en las semillas secas por unas proteínas LEA específicas de mitocondrias (Tolleter et al., 2007). Cuando se ha completado la imbibición, en la Fase II, se produce un aumento de las reacciones de oxidación intracelulares. Este aumento es debido a la reparación de mitocondrias ya existentes y a la producción de nuevas mitocondrias. Hay descritos dos patrones de desarrollo en las mitocondrias que dependen del tipo de reservas almacenadas. En semillas que acumulan almidón predomina la reparación y activación de orgánulos preexistentes, mientras que las semillas oleaginosas suelen producir nuevas mitocondrias (Morohashi, 1986; Morohashi y Bewley, 1980).

Las otras dos rutas respiratorias, glucólisis y la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, también se encuentran activas durante la imbibición. En este periodo muchas semillas producen etanol como resultado de una deficiencia interna de oxígeno causada por la restricción a la difusión de gases de las estructuras que rodean el embrión y por la densidad de la estructura interna (Kennedy et al., 1992). Esta deficiencia en oxígeno disminuye las actividades del ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones, lo que da lugar a una mayor producción de piruvato (Bewley, 1997).

Los compuestos nitrogenados, como el nitrato, provocan la salida de semillas del estado de dormición (Hendricks y Tailorson, 1974),

actuando supuestamente como aceptores de electrones, lo que afecta a la cadena de transporte de electrones, o bien causando la oxidación del NADPH, una coenzima de la de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que es un enlace clave entre la vía de la glucólisis y la ruta de las pentosas-fosfato. La eficacia del nitrato para promover la germinación se ejerce a través de su reducción a nitrito, hidroxilamina o el óxido nítrico (Nonogaki et al., 2010). El óxido nítrico es un importante componente de transducción de señales, y podría acelerar el flujo metabólico a través de la ruta de las pentosas-fosfato, al aumentar indirectamente la oxidación de NADPH (Bethke et al., 2007 a), aunque también podría estimular la germinación a través de otras vías como las relacionadas con el metabolismo de las hormonas; por ejemplo, en *Arabidopsis*, el óxido nítrico promueve la síntesis de GAs (Bethke et al., 2007 b), que como se ha indicado anteriormente está implicada en la salida de la dormición de las semillas.

Las semillas embebidas generan especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la toma de agua (Wojtyla et al., 2006). A éstas también se las ha implicado en la salida del estado de dormición (Oracz et al., 2007; Oracz et al., 2009). Sin embargo, también se han descrito, en semillas secas, una serie de actividades asociadas a la eliminación de las especies reactivas de oxígeno (superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa...) que podrían actuar sobre las ROS generadas durante la imbibición (Wojtyla et al., 2006).

Todos los componentes necesarios para la reanudación de la síntesis de proteínas están presentes en las células de embriones maduros, excepto los polisomas. Éstos se forman tras el inicio de la imbibición, lo que conlleva un descenso en el número de ribosomas libres. Por tanto, la síntesis inicial de proteínas es dependiente de los ribosomas

preexistentes en la semilla seca, aunque pocas horas después se forman y utilizan nuevos ribosomas (Bewley, 1997). Hasta la fecha no se ha demostrado si las semillas secas son capaces de transcribir ADN y de sintetizar proteínas. Sin embargo, se han encontrado más de 12.000 especies de ARNm en semillas secas de *Arabidopsis* (Nakabayashi et al., 2005) y cebada (Sreenivasulu et al., 2008), y este número sobrepasa los 17.000 en arroz (Howell et al., 2009). En tabaco se han descrito niveles bajos de transcripción y traducción durante el inicio de la imbibición (Leubner-Metzger, 2005). Muchos de los mensajeros de semillas secas están asociados con el proceso previo de maduración, por lo que han sido denominados mensajeros almacenados o residuales (Nonogaki et al., 2010). Muchos de estos genes presentan elementos de respuesta al ABA en sus regiones promotoras, como el motivo ACGT, y normalmente son activados durante la maduración de la semilla (Nakabayashi et al., 2005). La ubicación de estos ARNm en la semilla seca no se conoce, aunque se cree que podrían estar formando complejos con ribonucleoproteínas en el citoplasma, como ocurre durante la embriogénesis de alfalfa (Pramanik y Bewley, 1996). Estos mensajeros almacenados también podrían ser utilizados transitoriamente durante los estadios iniciales de la germinación (Figura 1). La participación de estos ARNm almacenados durante la germinación en la síntesis de proteínas se comprobó por experimentos realizados en *Arabidopsis*, utilizando inhibidores de la traducción y de la transcripción. La  $\alpha$ -amanitina, que es un inhibidor de la transcripción, no inhibió la germinación mientras que la cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, impidió la aparición de la radícula (Rajjou et al., 2004). Esto indica que las proteínas sintetizadas *de novo* a partir del ARNm almacenado permiten completar la germinación y que el ARNm almacenado es esencial para completar la germinación (Nonogaki et al., 2010). Los mensajeros

residuales que codifican proteínas importantes durante la maduración y pérdida de agua de la semilla, como las proteínas LEA, serían degradados rápidamente tras la imbibición, mientras que los que codifican para proteínas necesarias serían sustituidos por nuevos mensajeros durante el inicio de la germinación (Jiang y Kermodé, 1994; Han et al., 1997). En *Arabidopsis*, la mayoría de los genes inducidos tras 3 horas de imbibición están asociados con el metabolismo primario, lo que corrobora el hecho de que el restablecimiento de la actividad respiratoria es uno de los primeros pasos tras la entrada de agua en la célula (Preston et al., 2009). Este proceso se lleva a cabo en semillas durmientes y no durmientes. Sin embargo, los genes que codifican proteínas ribosomales se inducen sólo en semillas no durmientes, lo que sugiere que la síntesis de nuevos ribosomas es un paso necesario para completar la germinación (Preston et al., 2009). En arroz se ha realizado un estudio combinado de transcriptómica y metabolómica durante las primeras horas de imbibición (Howell et al., 2009) y se han observado cambios en la expresión de 64 mensajeros durante la primera hora y de 2.500 entre la primera y tercera hora desde el inicio de la imbibición. El estudio metabolómico reveló un gran cambio durante la primera hora de imbibición, predominantemente en metabolitos asociados con el metabolismo del carbono (Howell et al., 2009). La regulación de la germinación podría consistir en la suma de dos procesos, la eliminación selectiva de determinados transcritos y la síntesis *de novo* de otros. En la actualidad, la búsqueda de proteínas marcadores con un papel exclusivo en la germinación continúa.

La extensión de la radícula a través de las estructuras que rodean el embrión es el evento con el que termina la germinación y marca el comienzo de la Fase III o de desarrollo postgerminativo. La mayoría de los reguladores genéticos caracterizados actúan al final de la Fase II, ya

sea para promover o para inhibir la entrada de las semillas en la fase final. La transición entre la Fase II y la Fase III aún no se conoce con exactitud, aunque está claro que las GAs desempeñan un papel clave, al menos en las semillas intactas, como se ha comprobado en las semillas que no producen GA y no pueden completar la germinación (Nonogaki et al., 2010). Sin embargo, cuando los embriones están separados de las estructuras circundantes no necesitan GA para completar la germinación. En un experimento con embriones aislados de mutantes de *Arabidopsis* y tomate deficientes en GA (*gib-1*), la germinación se completó en agua, mientras que los embriones con las semillas intactas necesitaron de la hormona GA para germinar. Por lo tanto, el requisito de GA es un fenómeno de la semilla intacta, que quizás sea utilizado para inducir los mecanismos necesarios para superar las limitaciones mecánicas o inhibiciones (químicas/hormonales) impuestas por las estructuras circundantes. El crecimiento de la radícula tiene lugar por la modificación de la presión de turgencia y la eliminación de la resistencia que ejercen los tejidos de la radícula y los que la rodean. Las semillas de *Medicago trunculata* completaron la germinación en presencia de un inhibidor de la mitosis (Gimeno-Gilles et al., 2009), lo que sugiere que la extensión de la radícula es consecuencia de la expansión de las células por la entrada de agua. Esta entrada de agua en la célula se debe a los cambios en el potencial osmótico de las células de la radícula que podría volverse más negativo por la acumulación de solutos provenientes de la hidrólisis de los polímeros almacenados. Aunque los mecanismos utilizados para la toma de agua por la célula no se conocen con exactitud, se cree que deben de estar implicadas las acuaporinas. Así, el tratamiento de *Arabidopsis* con un inhibidor de las acuaporinas (mercurio) retrasó la germinación entre 25 y 30 horas (Vander Willigen et al., 2006). La acción de hidrolasas como xiloglucano

endotransglicosilasa (XTH),  $\beta$ -glucanasas y endo- $\beta$ -mananasas actuarían debilitando los tejidos que rodean la radícula (Bewley, 1997). Igualmente, las expansinas actuarían sobre los puentes de hidrógeno entre los polímeros de la pared celular provocando la extensión de la pared celular de las células de la radícula y, en consecuencia, la elongación de ésta (Chen et al., 2001; Gimeno-Gilles et al., 2009).

Durante el desarrollo postgerminativo, las plántulas dependen de las sustancias de reserva almacenadas en la semilla. Cuando la semilla se encuentra lo suficientemente hidratada se activa la síntesis proteica formándose, entre otras proteínas, enzimas que hidrolizan las sustancias de reserva almacenadas en cuerpos intracelulares ricos en lípidos, proteínas y carbohidratos. Su movilización requiere un proceso previo de hidrólisis y en muchos casos de transformaciones metabólicas que facilitan su transporte hasta los órganos en desarrollo de la plántula. El eje embrionario utiliza los nutrientes digeridos y absorbidos desde los cotiledones para su respiración, división celular y elongación. El desarrollo de las plántulas continúa con el crecimiento del eje embrionario que formará la radícula y su primer brote. Antes de que las reservas de nutrientes se agoten, las plántulas deben pasar de un comportamiento heterótrofo a un comportamiento autótrofo. El desarrollo postgerminativo finaliza con la formación de la planta joven, que es aquella capaz de vivir totalmente independiente de las reservas de la semilla.

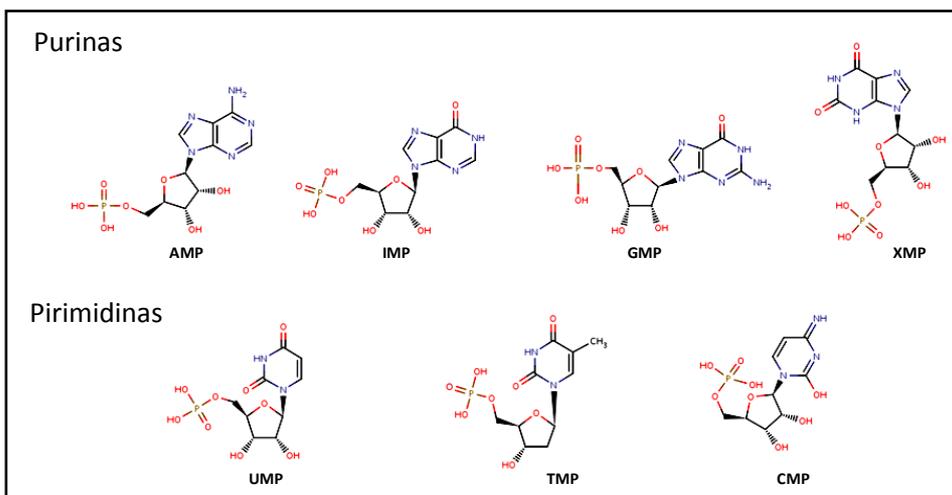
## **2. PAPEL DE LOS NUCLEÓTIDOS EN PLANTAS**

El metabolismo de nucleótidos ha sido más estudiado en animales que en plantas debido a sus aplicaciones médicas en el desarrollo de fármacos anticancerígenos y en la investigación de enfermedades hereditarias

(Zrenner et al., 2006). En plantas, sólo recientemente se ha profundizado en el conocimiento de las rutas de biosíntesis, degradación y reciclaje de nucleótidos (Stasolla et al., 2003; Zrenner et al., 2006; Werner y Witte, 2011). Los nucleótidos también se han estudiado en relación con el metabolismo de la cafeína (Ashihara y Susuki, 2004; Ashihara et al., 2008 a), de citoquininas (Schoor y Moffatt, 2004) y de ureidos (Ashihara et al., 2008 b). Además, en los últimos años se ha avanzado mucho en la caracterización funcional de los transportadores de nucleótidos, nucleósidos y nucleobases en plantas (Desimone et al., 2002; Bürkle et al., 2003; Mohlman et al., 2010; Bernard et al., 2011).

Los nucleótidos de purina y pirimidina (Figura 2) participan en múltiples procesos del metabolismo primario y secundario, siendo un conjunto de compuestos cruciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los nucleótidos son los constituyentes de los ácidos nucleicos y juegan un papel esencial en el almacenamiento y recuperación de la información. El ARN ribosomal y transferente son componentes esenciales para la maquinaria de síntesis de proteínas. Los nucleótidos también actúan como precursores directos para la síntesis de vitaminas de clase-B como son la riboflavina, tiamina y los folatos (Crozier et al., 2000; Herz et al., 2000; Hanson y Gregory, 2002) y de varias coenzimas esenciales como la nicotiamida adenina dinucleótido (NAD), flavina adenina dinucleótido (FAD) y S-adenosil- metionina (SAM). El ATP es la principal molécula utilizada para conservar la energía química y se genera a partir de ADP y fosfato inorgánico durante la fotosíntesis y la respiración. Aparte de su papel como donador principal de energía en muchas reacciones metabólicas, el ATP se usa para generar precursores activados para la síntesis de macromoléculas, incluyendo ADP-glucosa para la síntesis de almidón y AMP-aminoácidos para la síntesis de proteínas. En plantas, los nucleótidos de pirimidinas también poseen importantes funciones

como co-sustratos: UTP y UDP están directamente involucrados en la síntesis y degradación de la sacarosa, y la UDP-glucosa es el precursor de la síntesis de varios polisacáridos como la celulosa, glicoproteínas y fosfolípidos. La UDP-glucosa también actúa como un donador de glucosa en la síntesis de metabolitos secundarios y hormonas en las reacciones catalizadas por las UDP-glucosa glicosiltransferasa (Lim y Bowles, 2004).



**Figura 2.- Representación de los principales nucleótidos de purina y pirimidina.**

El metabolismo de nucleótidos puede dividirse en cuatro fases: (I) síntesis *de novo*, (II) degradación de nucleótidos, (III) rutas de reciclaje de nucleobases y nucleósidos y (IV) reacciones de fosfotransferencia para convertir nucleótidos mono y difosfato en trifosfato (Zrenner et al., 2006). Además, algunos nucleósidos son modificados, como los desoxinucleótidos utilizados en la síntesis de ADN o en la adición de cadenas para la producción de nucleótidos poco frecuentes que forman parte del ARN transferente. Los nucleótidos individuales y sus intermediarios también actúan como precursores de metabolitos secundarios y hormonas. Todo este conjunto de reacciones metabólicas

de los nucleótidos hace que su metabolismo sea considerablemente complejo.

Una propiedad importante de los nucleótidos es que contienen fosfato en su molécula. De hecho, la incorporación inicial de fosfato a los compuestos orgánicos ocurre casi de forma exclusiva mediante la conversión de ADP en ATP durante la fotosíntesis o la fosforilación a nivel del sustrato. Los nucleótidos también desempeñan un papel importante en la transferencia de fosfato a macromoléculas como los ácidos nucleicos y los fosfolípidos. Uno de los primeros cambios que se observan en respuesta al exceso o déficit de fosfato es cambio en el contenido de nucleótidos (Raghothama, 1999), lo que relaciona el metabolismo de nucleótidos con el de fosfato.

Los nucleótidos en plantas pueden proceder de la síntesis *de novo* o de las reacciones de recuperación y reciclaje a partir de los nucleósidos y las nucleobases. Ambas rutas parecen tener una importancia similar en el metabolismo de plantas. Sin embargo, la síntesis *de novo* de nucleótidos es muy costosa energéticamente en relación a la estrategia de reutilizar nucleósidos y bases nitrogenadas procedentes del reciclaje. Parece ser que la gran demanda de nucleótidos en las células en división y crecimiento es mantenida por la síntesis *de novo* mientras que en el resto de las células el reservorio de nucleótidos puede mantenerse por la reutilización de nucleósidos preformados, y sólo un pequeño porcentaje de los nucleótidos proceden de la síntesis *de novo* para compensar los procesos de degradación.

### 3. METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS DURANTE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO POSTGERMINATIVO

Los nucleótidos tienen un papel crucial durante la germinación y el desarrollo de la plántula y su disponibilidad durante las primeras fases de imbibición parece ser un factor crítico para el éxito de la germinación (Stasolla et al., 2003). Los nucleótidos participan en numerosos procesos bioenergéticos requeridos para la movilización de los productos de reserva durante el desarrollo postgerminativo además de ser sustratos necesarios para la síntesis de nuevos ácidos nucleicos. Por tanto, existe una estricta regulación entre las rutas de síntesis, reciclaje y degradación de nucleótidos durante la germinación (Stasolla et al., 2003).

La maquinaria enzimática responsable de la producción de purinas no está disponible durante las primeras etapas de la germinación y los nucleótidos de pirimidina se sintetizan a muy baja velocidad (Mohlmann et al., 2010). Por tanto, la síntesis de nucleótidos durante esta primera fase tiene lugar por la vía de reciclaje, en la que nucleósidos y nucleobases se convierten en nucleótidos por acción de quinasas y fosforribosil-transferasas (Mohlmann et al., 2010). Una ventaja importante de esta ruta es el ahorro energético con respecto a la síntesis *de novo*, lo que resulta clave ya que en esta primera fase se ha establecido una relación positiva entre la concentración de ATP y la viabilidad de las semillas (Stasolla et al., 2003). En *Arabidopsis* se ha observado un retraso severo en la germinación y desarrollo de plántulas en organismos mutados en la fosforilasa que produce GTP y UTP (Maingu et al., 2009).

La síntesis *de novo* de nucleótidos toma mayor importancia conforme avanza la germinación, ya que son necesarios para hacer frente a los requerimientos de síntesis de ácidos nucleicos: ARNm para la síntesis de

nuevas proteínas y ADN para las células en división (Bewley et al., 1997). La síntesis *de novo* de purinas consta de diez reacciones enzimáticas secuenciales que partiendo de fosforribosil-pirofosfato (PRPP) generan IMP, que es el primer producto con un anillo purínico completo (Smith y Atkins, 2002). El primer paso de la ruta está catalizado por la fosforribosil-pirofosfato amidotransferasa (PRAT; EC 2.4.2.14) y es el paso clave en la síntesis de purinas (Mohlmann et al., 2010). Esta enzima está sometida a retroinhibición por los productos finales de la síntesis de purinas (Reynolds et al., 1984) y es inducida por glutamina, producto de la asimilación del nitrógeno fijado y sustrato de la reacción (Kim et al., 1995). La ruta de síntesis hasta IMP se lleva a cabo en los plastidios y mitocondrias. El IMP sintetizado es transformado en AMP, forma en la que es transportado al citosol, donde se genera el resto de nucleótidos de purinas (XMP y GMP), Figura 2, (Zrenner et al., 2006). La ruta de síntesis *de novo* de los nucleótidos de pirimidina se define como la formación de UMP a partir de carbamil-fosfato. Esta ruta, conocida como ruta del orotato, consiste en 6 reacciones enzimáticas. Las primeras 3 enzimas de la ruta se encuentran formando un complejo enzimático en mamíferos y otros muchos eucariotas (Stasolla et al., 2003), aunque en plantas este complejo no ha sido detectado hasta la fecha. Las cuatro primeras enzimas están reguladas por los niveles de UMP, producto final de la ruta. Las dos últimas enzimas se encuentran formando un complejo proteico tanto en animales como en plantas. El UMP es fosforilado por una quinasa hasta UTP, a partir del cual se generan el resto de nucleótidos de pirimidinas (Stasolla et al., 2003).

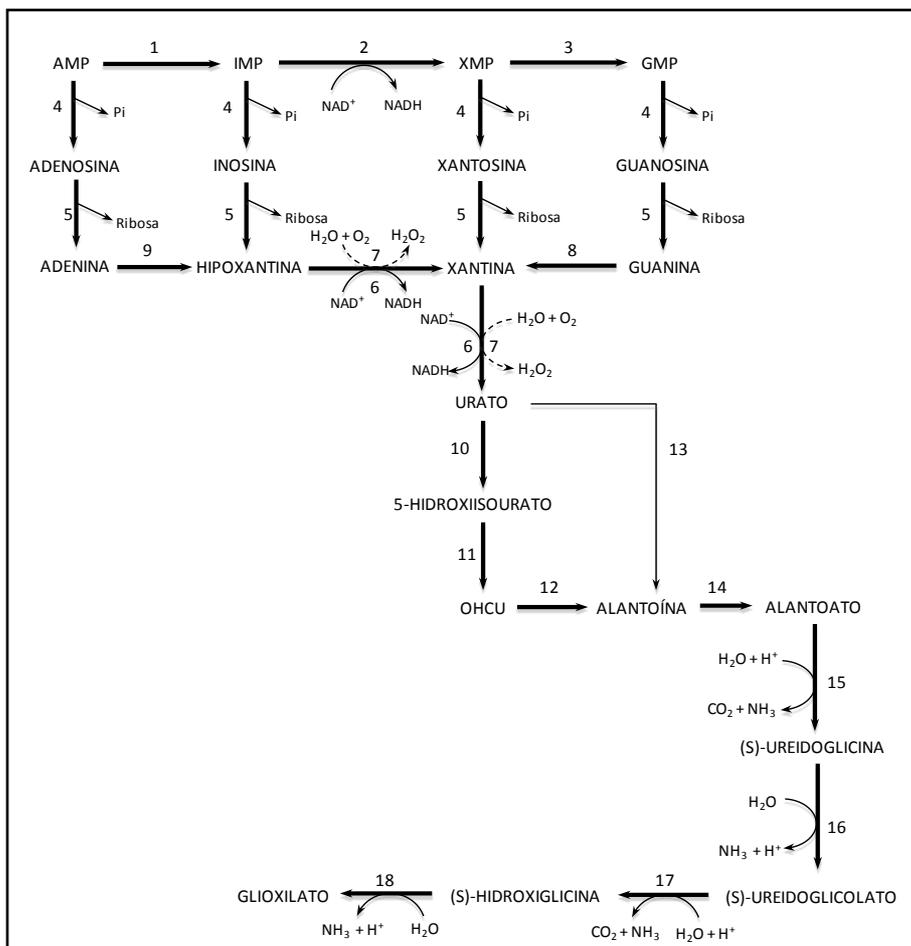
El catabolismo de nucleótidos tiene gran importancia en la germinación y en el desarrollo de las plántulas. Las plantas tienen la posibilidad de reciclar o degradar los nucleótidos según las necesidades metabólicas en

cada momento. Las plantas tienen la capacidad de degradar los nucleótidos hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ , que es reutilizado para la formación de nuevos compuestos y de esta forma se reutiliza el nitrógeno, que suele ser un factor limitante en el desarrollo de las plantas (Zrenner et al., 2006). En *Arabidopsis*, el catabolismo de pirimidinas tiene lugar por la degradación de timidina y uridina en tres pasos secuenciales hasta  $\beta$ -alanina y  $\beta$ -aminoisobutirato, respectivamente (Stasolla et al., 2003). La citidina se transforma previamente en uridina, y ya sigue la ruta de degradación. En ambas rutas se libera  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$  (Stasolla et al., 2003).

El catabolismo de purinas en plantas se ha estudiado fundamentalmente en el proceso de fijación de nitrógeno que tiene lugar en los nódulos de leguminosas (Figura 3). La enzima IMP deshidrogenasa (EC 1.1.1.205) cataliza la oxidación del IMP a XMP, el cual se transforma en xantina mediante la acción de una fosfatasa ácida y una 3'-nucleosidasa. El gen de la IMP deshidrogenasa se expresa específicamente en el nódulo y la actividad de la proteína está regulada por ciertos factores relacionados con la fijación del nitrógeno (Cao y Schubert, 2001). El IMP puede ser transformado a hipoxantina en una ruta independiente de la IMP deshidrogenasa, mediante la intervención directa de la fosfatasa ácida y de la 3'-nucleosidasa.

La actividad fosfatasa cataliza la hidrólisis del grupo fosfato de los nucleósidos monofosfato. En los nódulos de las leguminosas ureídicas y en condiciones de fijación, esta actividad intervendría en la síntesis de ureidos a través de la desfosforilación de XMP a xantosina, mientras que en otros tejidos la actividad podría actuar sobre los distintos nucleósidos monofosfato. La enzima responsable de este paso no se ha establecido aún en plantas. Este paso podría estar catalizado por una fosfatasa ácida inespecífica (EC 3.1.3.2) o por una 5'-nucleotidasa específica (EC

3.1.3.5). En plantas, se han purificado varias actividades clasificadas como nucleotidasas en cotiledones de judía (Lai et al., 1971), de cacahuete (Mittal et al., 1988; Gupta y Sharma, 1996) y en nódulos de soja (Ostergaard et al., 1991). También en cotiledones de cacahuete se han purificado dos nucleotidasas, una de Golgi y otra de membrana plasmática, ambas con alta especificidad frente a nucleósidos monofosfato de purinas (Gupta y Sharma, 1996).



**Figura 3.- Catabolismo de Purinas.** Las enzimas mostradas son: (1), AMP desaminasa; (2), IMP deshidrogenasa; (3), GMP sintasa; (4), 5' nucleotidasa; (5), 3' nucleosidasa; (6), xantina deshidrogenasa; (7), xantina oxidasa; (8), guanina desaminasa; (9), adenina desaminasa; (10), urato oxidasa; (11), hidroxiiisourato hidrolasa; (12), OHCU descarboxilasa; (13), alantoína sintasa; (14), alantoinasa; (15), Alantoato amidohidrolasa; (16), ureidoglicina aminohidrolasa; (17), ureidoglicolato amidohidrolasa; (18), no enzimático.

La actividad 3'-nucleosidasa cataliza la hidrólisis del nucleósido produciendo la liberación de la base nitrogenada y la ribosa. En plantas, esta actividad se encontró en discos de patata (Katahira y Ashihara, 2002, 2006) y se purificó y caracterizó a partir de hojas jóvenes de café (Campos et al., 2005) y altramuz (Szuwart et al., 2006). La secuenciación del genoma de *Arabidopsis* permitió la identificación de dos genes (*URH1* y *URH2*) relacionados con la actividad nucleosidasa. El producto del gen *URH1* se purificó y mostró actividad, en orden decreciente, frente a los sustratos uridina, inosina y adenosina (Jung et al., 2009). Recientemente, un estudio realizado con plantas de *Arabidopsis* mutantes para los genes *URH1* y *URH2* ha revelado la necesidad de ambas actividades para la hidrólisis de inosina y xantósina (Riegler et al., 2011).

La degradación de los distintos nucleótidos de purinas confluye en la base xantina. En la degradación de la xantina hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$  se generan unos compuestos intermediarios conocidos como ureidos, la alantoína y el ácido alantoico.

#### **4. UREIDOS DURANTE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO POSTGERMINATIVO DE JUDÍA**

Los ureidos (alantoína y alantoato) son compuestos orgánicos procedentes de la oxidación enzimática de las purinas y que poseen una serie de características que les permite actuar como moléculas ideales para el transporte y almacenamiento de nitrógeno. Su principal ventaja es que constituyen una forma concentrada de nitrógeno orgánico al tener en su molécula el mismo número de átomos de nitrógeno y carbono, lo que puede suponer un ahorro significativo de carbono (Smith y Atkins, 2002).

Los ureidos tienen un papel crucial como moléculas de transporte de nitrógeno fijado en los nódulos de las leguminosas ureídicas como judía o soja. Cuando estas plantas se encuentran en condiciones de fijación de nitrógeno transportan el nitrógeno fijado en los nódulos a las partes aéreas fundamentalmente en forma de ureidos, que proceden de la síntesis *de novo* en los nódulos radicales. De esta forma, los ureidos constituyen casi el 90% del nitrógeno transportado por el xilema de judía en condiciones de fijación (Díaz-Leal et al., 2012). Por tanto, la casi totalidad del nitrógeno que obtienen las partes aéreas de estas plantas para su desarrollo proceden de la degradación de los ureidos. Los ureidos también podrían ser importantes en otros procesos de elevada movilidad de nitrógeno, como por ejemplo la germinación y desarrollo postgerminativo de plántulas. Se ha demostrado que semillas secas de judía acumulan ureidos (Quiles et al., 2009). Estos podrían ser consecuencia del papel de los ureidos durante la formación de frutos. Las leguminosas ureídicas utilizan el nitrógeno contenido en los ureidos para sintetizar las proteínas de reserva de la semilla. Durante la germinación de la semilla, sus reservas proteicas se usarían como fuente de nitrógeno para el desarrollo de la plántula. Recientemente se ha descrito que las plántulas de judía sintetizan y acumulan ureidos tanto en ejes como en cotiledones durante el desarrollo postgerminativo (Quiles et al., 2009). Estos ureidos podrían proceder de la síntesis *de novo* a partir de las reservas proteicas de las semillas puesto que las proteínas contienen la mayoría del nitrógeno de las semillas de las leguminosas. Los ureidos acumulados durante el desarrollo postgerminativo también podrían proceder de la vía del reciclaje. Muchos ácidos nucleicos transcritos durante la maduración de la semilla se conservan en semillas secas antes de la germinación (Bewley, 1997). El ARN almacenado puede usarse de forma transitoria para la síntesis de proteínas durante las primeras etapas de la germinación. A medida que la germinación progresa, este ARN es

reemplazado y la síntesis de proteínas se hace más dependiente de nuevos transcritos (Bewley, 1997). El contenido de ácidos nucleicos de las semillas secas también podría ser utilizado como fuente de material para la síntesis de nuevos ácidos nucleicos en los ejes en desarrollo. Por tanto, no se debe descartar que los ácidos nucleicos de las semillas constituyan una reserva de nitrógeno y el incremento en la concentración de ureidos durante la germinación de judía podría apoyar esta hipótesis.

Esta síntesis y acumulación de ureidos durante la germinación y desarrollo postgerminativo también podría tener un papel adicional a la de simple reserva de nitrógeno. En los últimos años, se ha observado que los ureidos alantoína y alantoato podrían actuar como compuestos antioxidantes eliminando las distintas especies reactivas de oxígeno producidas en plantas bajo condiciones de estrés. En hojas de *Arabidopsis* sometidas a estrés por oscuridad se ha observado un incremento en los niveles de ureidos (Brychkova et al., 2008). Además, las plantas de *Arabidopsis* deficientes en la actividad xantina deshidrogenasa fueron más sensibles a estrés abiótico y acumularon una mayor cantidad de  $H_2O_2$ . Sin embargo, al añadir alantoína o alantoato a las plantas, los síntomas de estrés revertían en las plantas deficientes en la enzima XDH (Brychkova et al., 2008). Estas mismas plantas de *Arabidopsis* deficientes en XDH mostraron mayor sensibilidad al estrés hídrico y acumularon mayor cantidad de  $H_2O_2$  (Watenabe et al., 2010). En este caso, los efectos observados por el estrés hídrico revertían al añadir urato a las plantas. Todos estos datos sugieren un posible papel protector de los ureidos en plantas sometidas a condiciones de estrés.

## 5. FOSFATASAS ÁCIDAS EN PLANTAS

Las fosfatasa son unas enzimas ubicuas que catalizan la hidrólisis de ésteres de fosfato inorgánico. Las fosfatasa se han clasificado tradicionalmente como fosfatasa ácidas o alcalinas según el pH óptimo de catálisis esté por encima o por debajo de 7 (Vincent et al., 1992). Las fosfatasa alcalinas de plantas muestran generalmente una especificidad absoluta por el sustrato, mientras que las fosfatasa ácidas no muestran esta especificidad. No obstante, entre las fosfatasa ácidas se podrían distinguir dos categorías, en el primer grupo estarían aquellas enzimas sin especificidad por el sustrato, mientras que las fosfatasa del segundo grupo muestran cierta especificidad aunque no absoluta. El primer grupo podrían tener una función crucial en la producción, transporte y reciclaje de fosfato, mientras que para el segundo se ha propuesto otras funciones metabólicas (Duff et al., 1994).

La baja especificidad de sustrato de las fosfatasa ácidas así como su ubicuidad dificulta enormemente la asignación de un papel fisiológico para estas enzimas (Duff et al., 1994). La hidrólisis de un amplio rango de compuestos fosforilados, tanto naturales como sintéticos, ha sido estudiada con varias fosfatasa ácidas de distintos organismos. El compuesto sintético *p*-nitro-fenil-fosfato (*p*-NPP) es el sustrato más frecuentemente utilizado para estudiar estas enzimas (Duff et al., 1994; Zhu et al., 2009; Tran et al., 2010). El  $\beta$ -naftil-fosfato suele también utilizarse como sustrato sintético (García et al., 2004). Aunque la utilización de estos compuestos es útil para la determinación rutinaria de la actividad fosfatasa, la poca especificidad de estas enzimas por el sustrato hace necesario el estudio de parámetros cinéticos para los compuestos fosforilados con importancia metabólica. La especificidad de sustrato de estas enzimas se ha asignado en ocasiones mediante la

determinación de parámetros cinéticos como la  $V_{\max}$  y la  $K_m$  con varios sustratos (Duff et al., 1994). Entre los posibles sustratos fisiológicos estarían, entre otros, los compuestos energéticos, los azúcares fosfato y los aminoácidos fosforilados (Hoehamer et al., 2005; Veljanovski et al., 2006). Los parámetros cinéticos como pH óptimo, requerimientos de cofactores, efecto de metales, y especificidad de sustrato tienen una importancia directa en la asignación de función para las fosfatasa y otras enzimas sin especificidad de sustrato.

En plantas, las fosfatasa ácidas se han descrito en una amplia variedad de especies, tejidos y compartimentos celulares, y se han descrito diversas isoenzimas que varían en sus características físicas y cinéticas. Fosfatasa ácidas de plantas se han estudiado a partir de hojas (Staswick et al., 1994), plúmulas (Guo y Pesacreta, 1997), nódulos (Penheiter et al., 1997), semillas (Ferreira et al., 1998; Granjeiro et al., 1999; Roknabadi et al., 1999), pared celular (Kaida et al., 2008), tallo (Al-Omair, 2010), vacuolas celulares (Veljanovski et al., 2006), plántulas y cultivos celulares (Bozzo et al., 2006). La disponibilidad de genomas completos ha permitido identificar el número de genes que codifican las proteínas responsables de esta actividad enzimática. En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado más de cincuenta genes que codificarían posibles fosfatasa ácidas, entre las que se incluyen 29 fosfatasa ácidas púrpuras (PAPs), 10 proteínas de reserva vegetal (VSPs) tipo fosfatasa ácida, 4 fosfatasa de ácido fosfatídico (PPAPs), y una fosfatasa ácida dependiente de histidinas (Tran et al., 2010).

Las fosfatasa ácidas púrpuras (PAP) son de gran interés para las plantas. Estas enzimas son metalohidrolasa que tienen dos iones metálicos heterovalentes en el centro catalítico. Muchas de éstas muestran un característico color púrpura debido a la transferencia de carga desde el

residuo de la Tyr al Fe (III) (Mitic, 2006). Por esta característica son conocidas como fosfatasas ácidas púrpuras (PAPs), también se conocen como fosfatasas ácidas resistentes a tartrato (TRAPs) por ser su actividad resistente al ion L(+)-tartrato (Anand et al., 2012). Estas proteínas están formadas por varias subunidades, que pueden ser homo o heterodiméricas (Schenk et al., 2000; Olczak et al., 2003). En judía se caracterizó una PAP formada por dos subunidades de 55 kDa (Strater et al., 1995), mientras que una PAP de tomate inducida por déficit de fosfato es un heterodímero compuesto de dos subunidades de 63 y 57 kDa (Bozzo et al., 2004 b). Generalmente, las PAPs contienen dos iones metálicos formando dos esferas de coordinación con siete aminoácidos altamente conservados ligados al centro activo (Schenk et al., 2005). Este patrón específico (**DXG/ GDXXY/ GNH(D/E)/ VXXH/ GHXH**) donde se muestran señalados los siete aminoácidos en negrita es una característica exclusiva de las PAPs/TRAPs, siendo un motivo conservado entre muchas especies desde eucariotas a procariotas (Schenk et al., 2000). En las PAPs, uno de los dos iones metálicos que está involucrado en la transferencia de carga con los residuos de Tyr es  $Fe^{3+}$ , mientras que el segundo metal divalente puede ser  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , o  $Mn^{2+}$ . Las TRAPs de mamíferos contienen  $Fe^{2+}$  como segundo metal (Wang et al., 1991), mientras que las PAPs de plantas y procariotas tienen  $Zn^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  (Durmus et al., 1999; Schenk et al., 2001; Yeung et al., 2009). El ion  $Fe^{3+}$  se coordina con una tirosina, una histidina y un aspartato, y el segundo ion metálico se coordina con una asparragina y dos residuos de histidina (Shenk et al., 2008; Coleman et al., 2010).

La mayoría de las fosfatasas ácidas son glicoproteínas y la presencia de los oligosacáridos es necesaria para el correcto plegamiento y conseguir una estructura tridimensional activa de la proteína (Penheiter et al., 1998). Hasta la fecha, todas las PAPs identificadas contienen un péptido

señal para dirigir la proteína hacia el retículo y poder ser glicosiladas. En judía se han identificado cinco sitios de N-glicosilación, localizados en las Asn108, 136, 170, 238 y 423 (Klabunde et al., 1994) y de forma similar en la PAP de *Lupinus luteus* en las Asn105, 367, y 424 (Olczak y Watorek, 1998). Esta glicosilación de las fosfatasas podría dar lugar a la identificación de varias proteínas en plantas como consecuencia de un grado diferente de glicosilación más que la existencia de varias isoformas como consecuencia de la expresión de distintos genes y esto podría suponer un mecanismo de control de las fosfatasas (Duff et al., 1994).

La actividad de las fosfatasas ácidas se afectan generalmente por la inclusión de metales en las mezclas de ensayo, y el efecto puede ser tanto activador como inhibidor. La fosfatasa ácida purificada de nódulos de raíces y hojas de *Phaseolus vulgaris* se inactiva por los iones  $Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  y  $Al^{3+}$  (García et al., 2004). Zhu y col. (2009) observaron que la fosfatasa ácida de *Stichopus japonicas* exhibe un considerable incremento en la actividad en presencia del ion  $Mg^{2+}$  mientras que la actividad disminuye en presencia de  $Zn^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ . El ion molibdato junto con el vanadato son potentes inhibidores frecuentemente utilizados para la caracterización de las fosfatasas ácidas (Gellatly et al., 1994; Bozzo et al., 2002) Generalmente, los metales pesados disminuyen la actividad porque desestabilizan su conformación nativa o desactivan los residuos del centro activo. Sin embargo pocos metales se han identificado como activadores de estas enzimas.

## 6. PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS FOSFATASAS ÁCIDAS EN PLANTAS

Aunque se han realizado numerosas investigaciones y estudios sobre las fosfatasas ácidas de plantas, sus papeles fisiológicos son poco conocidos. En *Arabidopsis*, de las más de 50 secuencias de fosfatasas ácidas sólo tres, las PAPs AtPAP15, AtPAP23 y AtPAP26, han sido caracterizadas en detalle (Zhu et al., 2005; Kuang et al., 2009; Hurley et al., 2010). La gran diversidad en plantas superiores y el hecho de que no todas las fosfatasas ácidas funcionen como enzimas metabólicas complican el estudio de sus funciones metabólicas. Por ejemplo, una VSP de soja supone más de 40% de la proteína total soluble en hojas sin fruto, pero contribuye con menos del 1 % de la actividad fosfatasa extraíble. Sin embargo una mutación puntual puede incrementar su actividad más de 20 veces (Leelapon et al., 2004). Se puede asumir que las fosfatasas ácidas en plantas actúan como productores de fosfato, siendo la movilización mayor durante el crecimiento o bajo condiciones de estrés como sequía o carencia de fosfato (Duff et al 1994; Bozzo et al 2002), ayudando en el mantenimiento del reservorio energético requerido para los procesos metabólicos y regulando la actividad de varios metabolitos.

El fósforo es un componente esencial en muchas biomoléculas. Las fosfatasas ácidas de plantas hidrolizan fosfoésteres y proporcionan fosfato libre, teniendo así un papel crucial en la obtención y reciclaje de fosfato (Li et al., 2002; Bozzo et al., 2006). Tanto las fosfatasas ácidas secretadas como las intracelulares se inducen por carencia de fosfato y también durante diferentes estados de desarrollo como floración y germinación (Duff et al., 1994; Bozzo et al., 2002). Las fosfatasas ácidas extracelulares hidrolizan los fosfoésteres del suelo, mientras que las fosfatasas ácidas intracelulares rompen metabolitos fosforilados

citoplasmáticos y proporcionan fosfato a las plantas. Se ha descrito mayores niveles de PAP en respuesta a condiciones de estrés de fosfato en varias especies vegetales como *Brassica nigra* (Lefebvre et al., 1990), *Lycopersicon esculentum* (Bozzo et al., 2006) y *Arabidopsis* (Tran y Plaxton, 2008). En plántulas de *Arabidopsis* desarrolladas en condiciones de déficit de fosfato se ha observado una inducción de la AtPAP 26, con el fin de obtener fosfato. Esta enzima es una PAP intracelular que podría ser secretada durante periodos de escasez de fosfato en plantas y se ha considerado como una de las principales fosfatasas ácidas inducibles por déficit de fosfato (Tran et al., 2010). En otras condiciones de movilización de metabolitos como la senescencia de hojas también se ha descrito aumento de actividad para movilizar fosfato hacia las hojas jóvenes en crecimiento (Kouas et al., 2009).

Aparte de los requerimientos de fosfato en plantas, las fosfatasas ácidas también estarían involucradas en la regulación de las funciones de ciertas proteínas metabólicas. En este sentido, una fosfatasa ácida extracelular de tabaco se ha implicado en la síntesis de la pared celular (Kaida et al., 2010). Esta enzima regula la actividad de proteínas de la pared celular como la  $\alpha$ -xilosidasa y  $\beta$ -glucosidasa mediante desfosforilación. Otro grupo de fosfatasas ácidas tienen una actividad fundamentalmente con fosfotirosina y otros fosfoaminoácidos, y por tanto podrían actuar en la transducción de señales (Gellatly et al., 1994; Bozzo et al., 2002; Bozzo et al., 2004 a, 2004 b; Veljanovski et al., 2006).

Además, varias PAPs tienen una actividad peroxidasa alcalina que no se ve afectada por los inhibidores de fosfatasas ácidas (Bozzo et al., 2002; Bozzo et al., 2004 b); Veljanovski et al., 2006; del Pozo et al., 1999). Los dos tipos de actividades que despliega la AtACP5 sugiere que esta PAP tiene dos papeles fisiológicos distintos. Así, la actividad fosfatasa

probablemente refleja un papel en la movilización de fosfato, mientras que la actividad de peroxidasa sugiere que AtACP5 pudiera intervenir en el metabolismo del oxígeno (del Pozo et al., 1999).

Otra categoría especializada de fosfatasas ácidas de plantas consiste en aquéllas que despliegan una clara pero no absoluta especificidad por sustrato, tales como la 3-fosfoglicerato fosfatasa, la fosfoenolpiruvato (PEP) fosfatasa y la fitasa, entre otras. Se piensa que estas fosfatasas tienen diversas funciones metabólicas (Turner y Plaxton, 2001). La AtPAP15 es el único miembro de la familia AtPAP que se ha demostrado que tiene actividad fitasa (Kuang et al 2009; Zhang et al 2008), además de estar involucrada en la síntesis de ácido ascórbico vía mioinositol (Zhang et al 2008).

## **II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



La judía común, *Phaseolus vulgaris*, es una de las leguminosas más cultivadas del mundo. La enorme utilidad de este cultivo radica en el alto contenido proteico de sus semillas, lo que la convierte en una importante fuente de alimento para animales y humanos. Además de los valores nutricionales, su cultivo presenta ventajas económicas y ecológicas que radican fundamentalmente en su capacidad de conseguir la mayor parte del nitrógeno que necesita para su crecimiento gracias a la simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno. La fijación biológica de nitrógeno es un proceso de gran interés agronómico y ecológico puesto que el nitrógeno es, junto con el agua, el nutriente más limitante del crecimiento vegetal y por tanto de la producción de los cultivos. En los nódulos de las leguminosas ureídicas, el nitrógeno fijado por las bacterias se utiliza para la síntesis de purinas. A través de una serie de reacciones enzimáticas, las purinas se oxidan hasta alantoína y alantoato. Los ureidos sintetizados en los nódulos se transportan a las partes aéreas donde deben ser degradados para que su contenido nitrogenado pueda ser reasimilado.

El catabolismo de ureidos también podría tener un papel fisiológico durante el desarrollo postgerminativo de judía. Plántulas de judía acumulan ureidos tras la germinación y simultáneamente se produce un incremento de las actividades enzimáticas implicadas en su catabolismo (Quiles et al., 2009). Los niveles de estas actividades enzimáticas en los ejes de judía fueron similares a los encontrados en frutos en desarrollo de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno (Raso, 2008: Tesis doctoral), proceso donde el metabolismo de ureidos es crucial. En ambos casos, estos ureidos proceden de la degradación de las purinas, el primer paso en la conversión de nucleótidos de purinas a ureidos consiste en la eliminación del grupo 5'-fosfato catalizado por una fosfatasa que produce nucleósidos a partir de dichos nucleótidos. A pesar

de los avances de los últimos años en el conocimiento de los genes y enzimas relacionadas con la síntesis de ureidos, aún no ha sido identificada esta actividad fosfatasa responsable de la eliminación del fosfato en la ruta de degradación de nucleótidos y que conduciría a la síntesis de ureidos.

La hipótesis que se planteó es que deben existir fosfatasas que se encarguen de manera específica de la degradación de los nucleótidos de purina como paso previo a la síntesis de ureidos por oxidación de las purinas libres.

Para demostrar esta hipótesis se plantearon una serie de objetivos concretos, a saber:

1. Analizar las actividades fosfatasas durante la germinación y desarrollo postgerminativo de plántulas de judía.
2. Purificar, caracterizar e identificar las principales fosfatasas de ejes de judía que catalizan la desfosforilación de nucleótidos de purina.
3. Identificar y clonar el gen que codifica la enzima candidata y responsable de catalizar la desfosforilación de los nucleótidos de purina.
4. Estudiar las actividades fosfatasas en plántulas de judía sometidas a diferentes condiciones de estrés.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. MATERIAL VEGETAL

Se han utilizado semillas de judía (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Great Northern) suministradas por el profesor A. de Ron (Misión Biológica de Galicia, CSIC, Pontevedra). Las semillas fueron esterilizadas en la cámara de flujo laminar mediante un lavado de 30 s con etanol absoluto, seguido de otro lavado con solución acuosa de NaClO al 0,2% (p/v) durante 10 min. A continuación, las semillas se enjuagaron con agua destilada al menos 6 veces. Una vez esterilizadas se colocaron en placas de Petri de 120 mm de diámetro sobre tres discos de papel humedecidos con 10 ml de agua destilada estéril. El número de semillas por placa nunca fue superior a 10. Las semillas se cubrieron con un cuarto disco de papel humedecido con 3 ml de agua destilada estéril. La humedad se mantuvo por adición regular de agua. Las placas se colocaron en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 14 h de luz a una temperatura de 26 °C y 10 h de oscuridad a 20 °C y humedad constante del 70%.

## 2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES

Se utilizó material fresco recogido directamente de la cámara de cultivo. El material se trituró a 4 °C en un mortero con arena de mar lavada tras añadir tampón de extracción en una relación variable de 4 a 10 ml/g de peso fresco. A menos que se indique lo contrario, el tampón de extracción fue TES-NaOH 50 mM (pH 7) y DOC 0,15% (p/v). La suspensión homogénea obtenida se incubó en hielo durante 15 min. Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 12.000 g y el sobrenadante resultante se separó en partes alícuotas que se congelaron a -20 °C para determinaciones posteriores.

### **3. CULTIVOS BACTERIANOS**

#### **3.1. Estirpes bacterianas**

Se utilizaron dos cepas diferentes del organismo *Escherichia coli*. Para las tareas de clonación se utilizó la estirpe DH5 $\alpha$  (*supE44*,  $\Delta$ *lacU169*, ( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ *M15*), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*) y para las tareas de sobreexpresión se utilizó la estirpe BL21 (DE3) (*hsdS*, *gal* ( $\lambda$ cIts857, *ind-1*, *Sam7*, *nin-5*, *lacUV5-T7 gene 1*)).

#### **3.2. Condiciones de cultivo**

Las dos cepas se cultivaron a 37 °C a menos que se indique lo contrario. El cultivo en medio líquido para el aislamiento de plásmidos se realizó con agitación a 240 rpm en un agitador orbital termostatzado y en recipientes de crecimiento con una cámara de aire de aproximadamente 4/5 partes del volumen total durante aproximadamente 14 h.

#### **3.3. Medios de cultivo**

Los cultivos de *E. coli* se realizaron en medio LB (Luria-Bertani) compuesto por 10 g de NaCl, 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y agua hasta un volumen de 1 l esterilizado en autoclave. A los medios líquidos se les añadieron los suplementos una vez enfriados. A los medios sólidos se les añadió agar al 1,5% (p/v) antes de ser esterilizados en el autoclave y los suplementos se añadieron tras enfriar a 50 °C, distribuyéndose posteriormente en placas de Petri estériles.

#### **3.4. Obtención de células competentes**

La estirpe bacteriana se cultivó en medio LB en agitación a 240 rpm y 37 °C durante aproximadamente 14 h. Con este cultivo se inoculó medio LB

fresco (volumen inicial:  $V_i$ ) y se incubó a 37 °C en agitación a 200 rpm hasta una  $DO_{600}$  aproximada de 0,5. El cultivo se enfrió en hielo durante 10 min y a partir de ese momento todo el proceso se realizó a 4 °C. Las células se recogieron por centrifugación a 2.800 g durante 5 min y se resuspendieron en  $CaCl_2$  50 mM estéril y frío utilizando un volumen igual a  $1/2 V_i$ . Tras 30 min de incubación, se centrifugó a 2.800 g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en  $CaCl_2$  50 mM frío en un volumen igual a  $1/10 V_i$ . Estas células competentes se conservaron a 4 °C por un periodo de tiempo máximo de 24 h, o se almacenaron a -80 °C tras añadir glicerol a una concentración final del 10% (v/v).

### **3.5. Transformación de células competentes**

Se mezcló una parte alícuota de células competentes (0,1 ml) con un volumen pequeño de solución de ADN plasmídico ( $\geq 3$  ng) y se incubó en hielo durante 30 min. Seguidamente, las células se sometieron a un choque térmico a 42 °C durante 2 min e inmediatamente se enfriaron en hielo. A continuación, se añadieron 0,9 ml de medio SOC estéril y se incubó a 37 °C durante 60 min. Las células se recogieron por centrifugación a 1.500 g durante 1 min y se resuspendieron en 0,15 ml de medio SOC. Por último, se sembraron en placas de LB suplementado según el plásmido utilizado.

#### **Reactivos**

- El medio SOC está formado por la mezcla a partes iguales de la solución I, que contenía NaCl 8,6 mM, bacto-triptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l y KCl 2,5 mM esterilizada en el autoclave, y la solución II, que contenía glucosa 20 mM y  $MgCl_2$  10 mM esterilizada por filtración en poro de 0,2  $\mu m$ . El pH final del medio se ajustó a 7,0.

## **4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

### **4.1. Determinación de la concentración de proteína**

La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo de Bio-Rad basado en el método de Bradford (1976) utilizando seroalbúmina bovina como patrón. La concentración de proteína en los perfiles cromatográficos se estimó mediante la medida directa de la absorbancia a 280 nm.

### **4.2. Determinación del contenido de ureidos en extractos**

Los ureidos alantoína y alantoato se determinaron mediante el procedimiento descrito por Vogels y van der Drift (1970). Este método consiste en la determinación de glioxilato, por lo que los distintos compuestos ureidos deben transformarse en glioxilato. Para la determinación de la concentración de ureidos totales se mezcló una cantidad adecuada de extracto con agua destilada hasta un volumen final de 0,6 ml y se añadió 0,2 ml de NaOH 0,5 M. Esta mezcla se incubó a 100 °C durante 10 min para transformar la alantoína en alantoato. Tras enfriar en un baño a 4 °C, se le añadieron 0,2 ml de HCl 0,65 N y la mezcla se incubó de nuevo durante 10 min a 100 °C para transformar el alantoato a glioxilato. Después de enfriar, se determinó el glioxilato para lo cual sobre esta mezcla se añadieron 0,2 ml de tampón fosfato 0,4 M (pH 7,0) y 0,2 ml de fenilhidrazina-HCl 22,8 mM (0,33%, p/v). Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente se le añadió 1 ml de HCl 12 N a 4 °C y 0,2 ml de ferricianuro potásico 48,6 mM (1,6%, p/v). Después de 15 min a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 520 nm. El coeficiente de extinción molar del producto final (difencilformazán del glioxilato) fue de  $42,36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 4.3. Determinación de la concentración de fosfato

La concentración de fosfato inorgánico presente en los extractos se determinó según el método del azul de molibdeno descrito por Katewa y Katyare (2003) con pequeñas variaciones. Al extracto se añadió agua destilada hasta un volumen total de 0,6 ml, seguidamente se añadieron 0,2 ml de ácido sulfúrico 3 N y se mezcló. A continuación, se añadieron 0,1 ml de molibdato amónico al 2,5% (p/v) disuelto en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 N y 0,1 ml de solución reductora. Esta solución reductora estaba formada por ácido ascórbico e hidracina sulfato al 2% (p/v) disueltos en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N. Los tubos se agitaron y tras 50 min de incubación a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 820 nm. El coeficiente de extinción molar fue de 19 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

## 5. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 µmol de producto por minuto.

### 5.1. Determinación de las actividades fosfatasas

#### 5.1.1. Determinación *in vitro*

Para determinar las actividades fosfatasas ácidas inespecíficas *in vitro* se siguió el aumento de la concentración de fosfato inorgánico presente en la mezcla de reacción según el método de Katewa y Katyare (2003) que se describe en el apartado anterior. La mezcla de reacción estaba formada por tampón MES 50 mM (pH 5,5) y el sustrato correspondiente a una concentración de 5 mM. Para la actividad fosfatasa resistente a molibdato se utilizaron los distintos nucleósidos monofosfato y se añadió a la mezcla de reacción molibdato sódico (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) 5 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM como cofactor. Para la actividad fosfatasa sensible a molibdato, se

utilizó *p*-NPP como sustrato en ausencia de molibdato. El cálculo de dicha actividad se realizó restando al valor obtenido la actividad resistente a molibdato. En ambos casos, la reacción comenzó con la adición de una cantidad adecuada de preparación enzimática y se incubó a 37 °C. A distintos tiempos se tomaron partes alícuotas de 0,2 ml y se llevaron a viales de 1,5 ml que contenían 0,4 ml de agua y 0,2 ml de ácido sulfúrico 3 N, donde se determinó la concentración de fosfato como se describe en el apartado anterior.

### 5.1.2. Determinación en gel

Los extractos se mezclaron con tampón de carga (Laemmli, 1970) en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol y se cargaron directamente sin calentar en los geles de acrilamida al 7,5 o 10% preparados como se describe más adelante. La electroforesis se llevó a cabo a 30 mA y a 4 °C. Tras ésta, el gel se sometió a dos lavados de 10 min cada uno con tampón MES-NaOH 50 mM (pH 5,5), en agitación suave y a 4 °C, para retirar el SDS y ajustar al pH de ensayo. A continuación, el gel se sumergió en la mezcla de reacción compuesta por MES-NaOH 50 mM (pH 5,5), *p*-NPP o un nucleósido monofosfato a concentración final de 5 mM como sustrato y en presencia o ausencia de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  5 mM. Se realizó una incubación inicial de 10 min a 4 °C y en agitación leve, seguida de una final a 37 °C y sin agitación por un periodo de tiempo variable dependiendo de la actividad de los extractos. Después de la incubación se eliminó la mezcla de reacción y el fosfato inorgánico liberado en el gel se determinó según el método descrito por Simonovic y col. (2004), que consiste en la precipitación de los fosfatos liberados durante la reacción enzimática. Los geles se lavaron brevemente en agua desionizada y se colocaron en la solución de revelado PPR. Cuando las bandas de actividad aparecieron, se retiró la solución PPR y se detuvo la

reacción de revelado lavando los geles con abundante agua. Por último los geles fueron digitalizados.

### **Reactivos**

- La solución PPR se preparó disolviendo 1,06 g de heptamolibdato amónico tetrahidratado en 80 ml de agua, seguido de la adición de 8,2 ml de HCl, 1,37 ml de trietilamina y agua hasta los 100 ml, obteniéndose una concentración final de molibdato amónico de 1% (p/v), trietilamina 100 mM y HCl 1 M.

## **6. ELECTROFORESIS**

### **6.1. Electroforesis de ADN**

La separación electroforética del ADN se llevó a cabo de forma horizontal empleando geles de agarosa, a un porcentaje que osciló entre el 0,7 y 2% (p/v), en tampón TBE (1x) suplementado con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). El ADN se cargó en el gel tras mezclar con un volumen adecuado de solución de carga. El tampón de electroforesis fue TBE (1x) y la separación se realizó a un voltaje comprendido entre 30 y 120 voltios (en función del tamaño de las moléculas y contenido en agarosa del gel), y durante un tiempo también variable e inversamente proporcional al voltaje empleado. Como patrones del tamaño y cantidad de las moléculas de ADN se usaron 500 ng de ADN del fago λ digerido con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (MBI-Fermentas) o el marcador de masa molecular 100 bp Ladder (Biotools). La visualización de las moléculas de ADN se realizó tras exposición del gel a luz ultravioleta en un transiluminador.

### **Reactivos**

- El tampón TBE estaba formado por TRIS-HCl 90 mM (pH 8,0), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 90 mM y EDTA-Na<sub>4</sub> 2 mM.

- La solución de carga para electroforesis de ácidos nucleicos (6x) estaba formada por TRIS-HCl 10 mM pH 7,6, azul de bromofenol al 0,03% (p/v), xilen-cianol FF al 0,03% (p/v), glicerol al 60% (v/v) y EDTA 60 mM.

## 6.2. Electroforesis de ARN

La integridad de las preparaciones de ARN tras la extracción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en tampón TBE (1x) suplementado con bromuro de etidio (0,5 µg/ml), utilizando el mismo tampón como electrolito. La muestra de ARN (2 µg) se aplicó al pocillo del gel tras mezclarla con un volumen adecuado de solución de carga de ARN y calentar a 65 °C durante 10 min. La electroforesis se realizó a 50 voltios durante el tiempo necesario para que las bandas correspondientes al ARN ribosómico se separaran suficientemente. La visualización de las moléculas de ARN se realizó tras exposición del gel a luz ultravioleta en un transiluminador.

### Reactivos

- La solución de carga para electroforesis de ARN (6x) estaba formada por MOPS-NaOH 20 mM pH 7,0, azul de bromofenol al 0,03% (p/v), xilen-cianol FF al 0,03% (p/v), formamida (desionizada) al 66% (v/v), formaldehído al 23% (v/v) y EtBr al 0,004% (p/v).

## 6.3. Separación electroforética de proteínas

Las electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS se realizaron según Laemmli (1970) en células de electroforesis Mini Protean II y III de Bio-Rad. La composición del gel separador fue: TRIS-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS al 0,1% (p/v), persulfato amónico (APS) 0,05% (p/v), N,N,N',N'-tetrametildiamina (TEMED) al 0,1% (p/v) y acrilamida/bis-acrilamida al 8 ó 10%. La composición del gel concentrador fue tampón TRIS-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS al 0,1%

(p/v), APS al 0,05% (p/v), TEMED al 0,1% (p/v) y acrilamida/bis-acrilamida 4%.

En condiciones desnaturalizantes y reductoras, las muestras se mezclaron con tampón de carga con agentes reductores en una proporción 1/1 (v/v) y se calentaron a 100 °C durante 3 min. En condiciones no reductoras, las muestras se mezclaron con tampón de carga en ausencia de agentes reductores y no se calentaron. En las electroforesis se usaron marcadores preteñidos para SDS-PAGE de Bio-Rad: miosina (201,2 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (120,3 kDa), seroalbúmina bovina (100,2 kDa), ovoalbúmina (55,9 kDa), anhidrasa carbónica (38,3 kDa), inhibidor de tripsina de soja (29,7 kDa), lisozima (20,7 kDa) y aprotinina (7,0 kDa); también se utilizaron péptidos de la marca Fermentas (170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 y 10 kDa). Las electroforesis se realizaron a 30 mA durante 1 h.

#### **Reactivos**

- El tampón de electroforesis estaba formado por: TRIS 0,25 M, glicina 0,52 M y SDS al 0,1% (p/v). El pH final se ajustó 8,3.
- El tampón de carga Laemmli en condiciones reductoras estaba formado por: TRIS-HCl 0,1 M (pH 6,8),  $\beta$ -mercaptoetanol 71,5 mM, SDS al 2% (p/v), azul de bromofenol al 0,02% (p/v) y glicerol al 10% (v/v).
- El tampón de carga Laemmli en condiciones no reductoras estaba formado por: TRIS-HCl 0,1 M (pH 6,8), SDS al 2% (p/v), azul de bromofenol al 0,025% (p/v) y glicerol al 10% (v/v).

## **6.4. Tinción de los geles de acrilamida**

### **6.4.1. Coomassie estándar**

Los geles de acrilamida se sumergieron en la solución de tinte durante 1 h. Posteriormente se realizaron una serie de lavados con solución de destinte hasta alcanzar el grado de tinción deseado.

### **Reactivos**

- La solución de teñido estaba formado por etanol al 40% (v/v), ácido acético al 10% (v/v) y Coomassie R-250 al 0,1% (p/v).
- La solución de desteñido estaba formado por metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v)

#### 6.4.2. Coomassie un paso

Los geles de acrilamida se sumergieron en la solución de teñido que estaba formada por etanol al 10% (v/v), ácido acético al 5% (v/v) y Coomassie R-250 al 0,0016% (p/v) hasta alcanzar el grado de tinción deseado (Zehr et al., 1989).

#### 6.4.3. Tinción de plata

En los casos en que la cantidad de proteína a detectar era muy baja, se usó la tinción con nitrato de plata (Heukeshoven y Dernick, 1985). El gel se incubó en una solución de agua mili-Q:etanol:ácido acético (55:30:15, v:v:v) durante al menos 1 h en agitación para fijar las proteínas. Después se pasó a una solución de agua mili-Q:etanol:glutaraldehído (75:25:0,125; v:v:v) que contenía acetato sódico 0,5 M y tiosulfato sódico 8,3 mM, y se dejó agitando entre 1 y 12 h. Se lavó 3 veces, durante 10 min cada lavado, con agua mili-Q. Se tiñó con una solución acuosa de nitrato de plata 6 mM y formaldehído al 0,011% (p/v) durante 30 min en agitación. Tras dos lavados cortos de 10 s con agua mili-Q se reveló mediante agitación en una solución acuosa de carbonato sódico 236 mM y formaldehído al 0,011% (p/v). Cuando se alcanzó la coloración deseada, se paró el revelado con EDTA 50 mM.

## **7. ELECTROTRANSFERENCIA Y ENSAYO DE WESTERN BLOT**

Después de la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF (Sigma-Aldrich) mediante electrotransferencia en una célula Mini-TransBlot (Bio-Rad) o por transferencia semiseca en TE 70 ECL Semi-Dry Transfer Unit (Amersham Biosciences).

La membrana de PVDF se activó con un lavado en metanol absoluto durante 3 min y se mantuvo en tampón de transferencia hasta su uso. La transferencia se realizó a un amperaje constante de 240 mA durante 60 min a 4 °C, independientemente del sistema utilizado. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó con tampón T-TBS y se bloqueó con T-TBS suplementado con un 5% (p/v) de leche desnatada en polvo durante al menos 30 min, a temperatura ambiente y en agitación constante. A continuación, el gel se incubó con el anticuerpo primario anti-histidinas (H1029, Sigma-Aldrich) a un título de 1:5.000 en T-TBS suplementado con un 0,5% (p/v) de leche desnatada en polvo, durante 1 h y a temperatura ambiente. A continuación se lavó 3 veces con T-TBS durante 10 min cada lavado. Se aplicó el anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de ratón (A3562, Sigma-Aldrich) desarrollado en cabra y conjugado con fosfatasa alcalina a un título de 1:10.000 en T-TBS durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó 3 veces con T-TBS durante 10, 10 y 5 min, consecutivamente. La actividad fosfatasa alcalina asociada a los anticuerpos secundarios se desarrolló mediante la adición de la solución de revelado sobre la membrana de PVDF y, una vez desarrollado el color púrpura, la reacción se paró mediante varios lavados con agua destilada.

### **Reactivos**

- El tampón de electrotransferencia estaba formado por: TRIS 0,25 M, glicina 0,52 M y metanol al 20% (v/v).
- El tampón T-TBS estaba formado por: TRIS-HCl 24,8 mM (pH 7,4), KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, Tween-20 al 0,1% (v/v).
- La solución de revelado estaba formada por: TRIS-HCl 100 mM (pH 9,5),  $MgCl_2$  5 mM, fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indol (BCIP) 0,4 mM y azul de nitrotetrazolio (NBT) 0,37 mM.

## **8. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE GELES DE ACRILAMIDA**

La fracción del gel en la que se encuentra la proteína de interés se recortó utilizando una cuchilla limpia y se introdujo en un tubo de 1,5 ml. Se añadieron 0,2 ml de T-TBS y se desmenuzó con ayuda de un bastoncillo hasta conseguir la disgregación del gel. A continuación, se incubó durante 30 min en hielo. El homogenado conseguido se colocó en un sistema de concentración Nanosep(R) Centrifugal Devices (PALL) con un corte de paso de 300 kDa. Se centrifugó durante 3 min a 12.000 g en una centrifuga a 4 °C, lo que permitió separar la proteína de la acrilamida que quedó retenida en el filtro. Opcionalmente se utilizó un Nanosep(R) con un corte de paso de 3 kDa para concentrar o dializar la proteína extraída.

## **9. SEPARACIÓN DE LAS ACTIVIDADES FOSFATASAS MAYORITARIAS DE EJES EMBRIONARIOS DE JUDÍA**

Los ejes embrionarios de plántulas de judía de 6 días de desarrollo se homogeneizaron en un mortero a 4 °C utilizando como tampón de extracción TES-NaOH 50 mM (pH 7), que contenía DOC al 0,15% (p/v) y  $MgCl_2$  1 mM. El tampón de extracción se añadió en una relación de 5 ml/g de tejido fresco. El homogenado obtenido se centrifugó a 22.000 g

durante 10 min a 4 °C en una centrifuga Beckman Avanti J-25. El sobrenadante obtenido se sometió a cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sephacel (7,5 x 2 cm, Sigma-Aldrich). La cromatografía se realizó a 4 °C y a un flujo de 20 ml/h y utilizando como tampón de trabajo TES-NaOH 50 mM (pH 7) suplementado con MgCl<sub>2</sub> 1 mM. La columna se preparó previamente lavando de forma sucesiva con 4 volúmenes de agua desionizada, 5 volúmenes de tampón de trabajo suplementado con NaCl 1 M, y 10 volúmenes de tampón de trabajo. Una vez cargada la proteína en la columna se realizó un lavado con 4 volúmenes de tampón de trabajo suplementado con NaCl 0,1 M. A continuación se realizó un primer gradiente continuo de 15 volúmenes desde 0,1 hasta a 0,3 M de NaCl en tampón de trabajo y un segundo gradiente de 7 volúmenes desde 0,3 a 1 M de NaCl en el mismo tampón. Se recogieron fracciones de 7 ml en las que se determinaron la concentración de proteína y la actividad fosfatasa usando IMP como sustrato en presencia y ausencia de molibdato 5 mM.

## **10. PURIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA RESISTENTE A MOLIBDATO**

Todos los pasos de purificación se realizaron entre 0 y 4 °C utilizando como tampón de trabajo: TES-NaOH 50 mM (pH 7) suplementado con MgCl<sub>2</sub> 1 mM.

El extracto crudo se obtuvo como se ha indicado en el apartado 9.

### **10.1 Cromatografía de intercambio iónico**

El extracto crudo se sometió a cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel como se ha indicado en el apartado 9. En las fracciones obtenidas se determinó la concentración de proteína y la actividad

fosfatasa con IMP como sustrato y en presencia de molibdato 5 mM. Las fracciones con actividad se reunieron y se utilizaron en el siguiente paso de purificación.

### **10.2. Concentración y cromatografía de exclusión molecular**

La preparación enzimática anterior se concentró mediante precipitación con sulfato amónico al 75% (p/v). Para lo cual, el sulfato se añadió poco a poco y en agitación suave. Tras 30 min en agitación suave, la suspensión se centrifugó a 22.000 g durante 20 min. El sedimento resultante se resuspendió en el mínimo volumen posible de tampón de trabajo. La solución concentrada se sometió a una cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephacryl S-300HR (82 x 2,6 cm; GE Healthcare). La cromatografía se llevó a cabo con el tampón de trabajo a un flujo constante de 50 ml/h y se recogieron fracciones de 5 ml aproximadamente, en las que se determinó la actividad fosfatasa y la concentración de proteína. Las fracciones que mostraron actividad se reunieron para continuar con la purificación.

### **10.3. Tratamiento térmico**

A la preparación enzimática procedente de la cromatografía de exclusión molecular se le añadió MgCl<sub>2</sub> hasta alcanzar una concentración de 5 mM y se sometió a un tratamiento térmico durante 30 min a 60 °C. Seguidamente, se enfrió en hielo durante 20 min y se centrifugó a 22.000 g durante 25 min.

### **10.4. Cromatografía de afinidad**

El sobrenadante del paso anterior se sometió a una cromatografía de afinidad en Concanavalina-A (ConA-Sepharose, 1,5 x 3,5 cm, GE

Healthcare). La columna se activó previamente utilizando tampón Tris 0,02 M (pH 7,4) que contenía NaCl 0,5 M y MgCl<sub>2</sub> 1 mM. A continuación la columna se equilibró utilizando 5 volúmenes de columna del tampón de trabajo. Después de cargar la muestra, se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón de trabajo. Las proteínas unidas a la resina se eluyeron con un gradiente lineal de metil  $\alpha$ -D-manopiranososa entre 0,05 y 0,3 M en 30 volúmenes de columna. Todo el proceso se realizó a un flujo de 1 ml/min y se recogieron fracciones de 2,5 ml. Las fracciones con actividad fueron reunidas y esta preparación fue usada como fuente de proteína pura.

## **11. PURIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA SENSIBLE A MOLIBDATO**

Todos los pasos de purificación se realizaron entre 0 y 4 °C utilizando como tampón de trabajo TES-NaOH 50 mM (pH 7).

El extracto crudo se obtuvo como se ha indicado en el apartado 9, salvo que los tampones utilizados carecían de magnesio.

### **11.1. Cromatografía de intercambio iónico**

El extracto crudo se sometió a cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel como se ha indicado en el apartado 9 salvo utilizando como tampón de trabajo TES-NaOH 50 mM (pH 7). En las fracciones obtenidas se determinó la concentración de proteína y la actividad fosfatasa en presencia y ausencia de molibdato. Las fracciones con actividad fosfatasa sensible a molibdato se reunieron y se utilizaron en el siguiente paso de purificación.

## **11.2. Cromatografía de afinidad**

La preparación enzimática obtenida tras la cromatografía de intercambio iónico se sometió a una cromatografía de afinidad en ConA-Sepharose (1,5 x 3,5 cm, GE Healthcare). La columna fue previamente activada en tampón Tris 0,02 M (pH 7,4) que contenía NaCl 0,5 M y MgCl<sub>2</sub> 1 mM. A continuación, la columna se equilibró con 5 volúmenes de tampón de trabajo. La cromatografía se realizó a un flujo de 1 ml/min. Las proteínas unidas a la resina se eluyeron a un flujo de 1 ml/min en un gradiente de 0 a 0,5 M de metil  $\alpha$ -D-manopiranososa y se recogieron fracciones de 2 ml.

## **11.3. Cromatografía en Phenyl Sepharose**

Las fracciones con actividad fosfatasa sensible a molibdato procedente de la cromatografía anterior se reunieron y se les añadió sulfato amónico hasta alcanzar una concentración final de 1 M. Esta preparación se cargó en una columna de Phenyl Sepharose (1,5 x 3,5 cm, GE Healthcare) que previamente se había equilibrado con tampón de trabajo que contenía sulfato amónico 1 M. La elución se realizó a un flujo de 1 ml/min en un gradiente de 30 volúmenes de columna desde 1 a 0 M de sulfato amónico en tampón de trabajo. Se recogieron fracciones de 2 ml en las que se midió la actividad y concentración de proteína. Las fracciones con actividad se reunieron y se usaron como fuente de proteína pura.

## **12. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA RESISTENTE A MOLIBDATO DE PLÁNTULAS DE JUDÍA**

### **12.1. Determinación de la temperatura óptima**

La actividad se determinó como se ha descrito anteriormente, pero realizando el ensayo a distintas temperaturas (30, 40, 50, 60, 65 y 70 °C).

Para cada temperatura se determinó la liberación no enzimática de fosfato.

### **12.2. Estabilidad térmica**

Partes alícuotas de la preparación enzimática se incubaron durante 30 min a distintas temperaturas (30, 40, 50, 60, 65, y 70 °C) en presencia o ausencia de  $\text{MgCl}_2$  1 mM. Tras el tratamiento térmico, las muestras se enfriaron en hielo y se centrifugaron en frío a 12.000 g durante 10 min. La actividad se determinó en los sobrenadantes en condiciones estándar de ensayo.

### **12.3. Efecto de los cationes**

La preparación enzimática se incubó con EDTA 10 mM durante 1,5 h a temperatura ambiente y se dializó utilizando membranas de celulosa para diálisis (Sigma-Aldrich). Las membranas se prepararon para su uso lavándolas en abundante agua desionizada y a continuación se colocaron en agua miliQ durante aproximadamente 14 h y en agitación continua a 4 °C para eliminar el EDTA y el  $\text{Mg}^{2+}$ . Partes alícuotas de la preparación dializada se incubaron a 4 °C durante 1,5 h en presencia de varios iones metálicos ( $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$ ) a una concentración final de 1 mM en tampón TES-NaOH 50 mM (pH 7). A continuación se determinó la actividad de manera habitual salvo con una concentración final de 1 mM del correspondiente ion.

### **12.4. Determinación del pH óptimo**

Se preparó una mezcla de tampones compuesta por MES-TES-succinato, 50 mM de cada uno, y se ajustó a distintos valores de pH con HCl o NaOH (entre pH 4 y 8). La actividad se determinó en estos tampones de

manera habitual utilizando como sustratos varios nucleósidos monofosfato.

### **12.5. Determinación de los valores de $K_m$ aparente y $V_{max}$**

La actividad fosfatasa se ensayó en mezclas de reacción que contenían como sustrato alguno de los diferentes nucleótidos de purinas y pirimidinas a concentraciones comprendidas entre 0 y 5 mM, en presencia de 1mM de  $MgCl_2$ . El ensayo se realizó en tampón MES-NaOH 50 mM a pH 5,5 y en TES-NaOH 50 mM a pH 7. El tiempo de incubación fue de 10 min, usando una adecuada cantidad de enzima.

### **12.6. Efecto de los inhibidores**

La actividad enzimática se ensayó de forma habitual en mezclas de reacción suplementadas con diversos compuestos a una concentración final de 1 mM. En todos los casos se determinó la liberación no enzimática de fosfato.

### **12.7. Especificidad de sustrato**

La actividad se determinó de forma estándar utilizando los compuestos fosforilados indicados como sustratos a una concentración final de 5 mM en la mezcla de reacción a excepción del nucleótido AMP que se ensayó a una concentración de 0,25 mM.

## **13. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA SENSIBLE A MOLIBDATO DE EJES DE JUDÍA**

### **13.1. Determinación de la temperatura óptima**

Se determinó como se ha descrito en el apartado 12.1 para la actividad fosfatasa resistente a molibdato.

### **13.2. Estabilidad térmica**

Varias partes alícuotas de la preparación enzimática se incubaron a distintas temperaturas (30, 40, 50 y 60 °C) durante 10, 20, 30 y 40 min. Las muestras se enfriaron en hielo y se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min. La actividad se determinó en condiciones estándar en los sobrenadantes obtenidos.

### **13.3. Efecto de los cationes**

Se determinó como se ha descrito anteriormente en el apartado 12.3.

### **13.4. Determinación del pH óptimo**

La actividad se determinó en una mezcla de tampones compuesta por succinato-MES-TES, 50 mM de cada uno, ajustando los valores de pH entre 4 y 9. La actividad se determinó de manera habitual.

### **13.5. Determinación de los valores de $K_m$ aparente y $V_{max}$**

La actividad fosfatasa se ensayó en mezclas de reacción que contenían como sustratos varios compuestos fosforilados a concentraciones entre 0 y 5 mM. El ensayo se realizó de la manera habitual, usando una adecuada cantidad de enzima y un tiempo de incubación de 10 min.

### **13.6. Efecto de los inhibidores**

La actividad enzimática se ensayó de manera estándar en presencia de varios posibles inhibidores a una concentración de 1 mM. Se realizaron controles para cada efector utilizado.

### **13.7. Especificidad de sustrato**

La actividad se realizó con varios compuestos fosforilados como sustratos a una concentración final de 5 mM en la mezcla de reacción.

## **14. EXPERIMENTOS FISIOLÓGICOS**

Las extracciones se realizaron el mismo día de la obtención del material y los extractos crudos se repartieron en partes alícuotas y se congelaron a -20 °C. Los extractos se obtuvieron como se describe en el apartado 2.1, utilizando el tampón de extracción en una relación de 10 a 1 (v/p). Todos los experimentos se realizaron por duplicado y se repitieron un mínimo de tres ocasiones, determinándose los siguientes parámetros:

- Peso fresco y longitud de los ejes embrionarios.
- Contenido de ureidos y de fosfato inorgánico.
- Análisis de las actividades fosfatasas ácidas tanto in vitro como en gel.
- Determinación de la proteína soluble.

### **14.1. Actividades fosfatasas durante la germinación y desarrollo**

Los extractos crudos se obtuvieron a partir de cotiledones y ejes embrionarios de plántulas de judía desde el momento de la imbibición de las semillas (0 DDI) hasta el día 7 (7 DDI). En las plántulas de 7 días de desarrollo los extractos se obtuvieron a partir de los cotiledones, radículas, hipocotilos y epicotilos.

### **14.2. Tratamientos con compuestos nitrogenados.**

Tras la esterilización, las semillas se dividieron en grupos homogéneos y se colocaron en placas de Petri que contenían discos de papel

humedecidos en agua (control), con distintos precursores de los ureidos (IMP, AMP, adenosina o alantoína) o con nitrato. La humedad de las placas de germinación se mantuvo diariamente mediante la adición de la correspondiente solución. A los 5 DDI se extrajeron los ejes embrionarios como se indica en el apartado 2.

### **14.3. Tratamientos con fosfato y molibdato**

Tras la esterilización, las semillas se dividieron en grupos homogéneos y se colocaron en placas de Petri que contenían discos de papel humedecidos en agua (control) o con diferentes concentraciones de molibdato sódico o fosfato potásico. Se procedió como se ha indicado en el apartado 14.2.

### **14.4. Tratamientos con NaCl**

#### 14.4.1. Tratamientos desde el inicio de la imbibición

Las semillas de judía se germinaron y desarrollaron en placas de Petri con diferentes concentraciones de NaCl (0, 25, 50 y 100 mM), manteniendo la humedad a diario con la solución correspondiente. Las plántulas se analizaron a los 7 días de desarrollo.

#### 14.4.2. Tratamientos sobre plántulas en desarrollo

Plántulas de judía a diferentes estadios de desarrollo se pasaron a placas de Petri con discos de papel humedecidos con varias soluciones de NaCl. A los tiempos indicados se extrajeron las distintas partes de las plántulas.

## **14.5. Tratamientos con hemina**

### 14.5.1. Efecto de la hemina

Las semillas de judía se esterilizaron como se indicó en el apartado 1 y se dividieron en tres grupos homogéneos que se colocaron sobre placas de Petri en discos de papel humedecidos con 0, 1 y 10  $\mu\text{M}$  de hemina durante 24 h. A continuación se sustituyeron los discos de papel y la humedad se mantuvo por adición de agua estéril. Las plántulas se analizaron a lo largo del desarrollo.

### 14.5.2. Tratamiento con NaCl en plántulas incubadas con hemina

El tratamiento salino (200 mM durante 48 h) se realizó sobre dos grupos de plántulas de 4 días de desarrollo. Un grupo son plántulas desarrolladas en condiciones estándar y el otro de plántulas incubadas durante las primeras 24 h de imbibición con solución de hemina 10  $\mu\text{M}$ .

## **14.6. Tratamientos de estrés hídrico**

Plántulas desarrolladas en condiciones estándar hasta el día 5 de desarrollo se dividieron en dos grupos, uno de éstos se pasó a placas de Petri correctamente hidratadas y el otro se colocó en placas que contenían discos de papel sin humedecer. Las plántulas se analizaron a diferentes tiempos de tratamiento.

## **14.7. Tratamientos con metil-jasmonato**

Plántulas desarrolladas en condiciones estándar hasta el día 5 de desarrollo se pasaron a placas con papel humedecidas con una solución de metil-jasmonato 50  $\mu\text{M}$ . Las plántulas se analizaron a las 24 h de

tratamiento y se compararon con plántulas mantenidas en condiciones estándar.

#### **14.8. Efecto de la etiolización**

Las plántulas de judía se mantuvieron hasta el momento de análisis en placas de Petri humedecidas y envueltas en papel de aluminio para impedir la entrada de luz y se compararon con plántulas desarrolladas en condiciones estándar.

### **15. IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD FOSFATASA POR HUELLA PEPTÍDICA (MALDI-TOF)**

Las proteínas purificada se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida y, tras someter a tinción con Coomassie, los fragmentos del gel de acrilamida se recortaron y se enviaron al Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba (UCO) para someterse a un proceso de identificación de proteínas por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, obteniéndose un espectro de masas (MS) denominado “Huella Peptídica”. Adicionalmente, se obtuvieron espectros de fragmentación (MS/MS) de las 3-5 masas mayoritarias dentro de cada una de las huellas peptídicas. El equipo utilizado fue un Espectrómetro de Masas MALDI-TOF/TOF (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems).

La identificación de las proteínas se realizó automáticamente mediante el sistema GPS (Global Protein Server) acoplado a los datos del TOF-TOF, combinando ambos tipos de espectros (MS-MS/MS) obtenidos para cada muestra y usando como motor de búsqueda MASCOT (MatrixScience, UK) sobre bases de datos públicas de secuencias de proteínas.

## **16. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### **16.1. Aislamiento de ARN de plántulas de *Phaseolus vulgaris***

Todo el material de trabajo se esterilizó en el autoclave para evitar contaminaciones con ribonucleasa. El material vegetal fresco (600 mg de tejido aproximadamente) se trituró utilizando N<sub>2</sub> líquido y un mortero de porcelana hasta conseguir un polvo fino, evitando que se descongelase la muestra mediante la adición continua de N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente, se añadieron 3 ml del reactivo comercial TRI REAGENT™ (Sigma-Aldrich), se mezcló inmediatamente utilizando el agitador vórtex y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se añadieron 0,6 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 2-15 min. A continuación, se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4 °C. Se recogió la parte superior acuosa que se pasó a otro tubo y se precipitó por adición de 1,5 ml de isopropanol e incubación a temperatura ambiente durante 5-10 min. Se centrifugó de nuevo a 12.000 g durante 10 min a 4 °C. El precipitado de ARN se lavó añadiendo 3 ml de etanol al 75% (v/v), agitando vigorosamente y centrifugando a 12.000 g durante 5 min a 4 °C. El precipitado final de ARN se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 0,1 ml de agua mili-Q estéril.

### **16.2. Aislamiento de ADN plasmídico**

Se empleó el kit comercial MINITOOLS Miniprep Extraction Kit (Biotools), siguiendo las indicaciones del fabricante.

### 16.3. Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción para el ADN bicatenario es de  $50 \mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{ml}$  y para el ARN de  $40 \mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{ml}$  (Sambrook et al., 1989). Paralelamente se determinó la absorbancia de las muestras a 230 nm y 280 nm, para determinar la presencia en las mismas de contaminantes de naturaleza glucídica y proteínica, respectivamente (cocientes  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} \leq 2$  y  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} \leq 2$ , de forma respectiva). El ARN también se cuantificó mediante un espectrofotómetro NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Nucliber) mediante el programa *NanoDrop 3.0.0*.

### 17. SÍNTESIS DE ADNc

Para la síntesis de ADNc se utilizó la enzima retrotranscriptasa del kit comercial SuperScript<sup>™</sup> II Reverse. Como molde se utilizó ARN de ejes embrionarios de judía aislado como se describe en el apartado 16.1.

- En un tubo se mezclaron los siguientes componentes: 3  $\mu\text{g}$  de ARN, 2  $\mu\text{l}$  de Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (20  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{l}$  dNTPs (10 mM) y agua miliQ hasta 13  $\mu\text{l}$ . A continuación se incubó durante 5 min a 65 °C, y se centrifugó a 12.000 g varios segundos y se mantuvo a 4 °C. Sobre el mismo tubo se añadieron: 4  $\mu\text{l}$  de tampón de síntesis de primera cadena (5x), 1  $\mu\text{l}$  de DTT 0,1 M y 1  $\mu\text{l}$  de agua miliQ. Esta mezcla se incubó durante 2 min a 42 °C y se añadió 1  $\mu\text{l}$  de la enzima SuperScript II. Seguidamente se incubó durante 30 min a 50 °C y posteriormente 15 min a 70 °C. El ADNc generado se conservó a -20 °C hasta su uso.

## **18. CLONACIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN EN VECTORES PLASMÍDICOS**

### **18.1. Ligación de moléculas de ADN en pGEM-T (Promega)**

La clonación de los fragmentos amplificados mediante PCR se realizó en el vector pGEM-T. Este plásmido es de alto número de copias y se comercializa en forma abierta después de haber sido digerido enzimáticamente mediante la endonucleasa *EcoRV* y haber sido modificado químicamente mediante la adición de dos restos de timidina en la posición 3' de los dos extremos romos. Estos residuos permiten la ligación directa de los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR con ADN polimerasas termoestables que añaden sistemáticamente un residuo de deoxiadenosina a los extremos 3'.

La cantidad adecuada de inserto se mezcló con pGEM-T, ADN ligasa de T4 y tampón de ligación (2x) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y se incubó a 14 °C durante aproximadamente 14 h. Las células competentes se transformaron con el producto de la ligación como se ha indicado en el apartado 3.5.

### **18.2. Selección de transformantes con pGEM-T**

La selección de transformantes positivos se realizó sembrando las células transformadas sobre placas LB-agar suplementado con ampicilina 0,1 mg/ml, IPTG 0,3 mM y X-gal 0,02 mg/ml. Estas placas se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 14 h y las colonias obtenidas se seleccionaron inicialmente por color. Las colonias blancas seleccionadas se cultivaron en medio líquido y la presencia del inserto correcto se comprobó mediante PCR y mediante secuenciación del plásmido aislado.

### **18.3.- Ligación de moléculas de ADN en pET30b(+) (Novagen)**

Para la sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli* se utilizó el vector pET30b(+). Este plásmido es de bajo número de copias y añade a uno o ambos extremos de la proteína recombinante una cola de histidinas que permite su purificación e identificación. Una vez determinados los volúmenes de inserto y vector necesarios, se mezclaron con 1 µl de ADN ligasa de T4 y 1,5 µl de tampón de ligación (10x) en un volumen final de 15 µl. La mezcla se incubó a 14 °C durante unas 14 h. Posteriormente se realizó la transformación de células competentes de la cepa de *E. coli* elegida.

### **18.4.- Selección de transformantes con pET30b(+)**

La selección de transformantes positivos para las construcciones derivadas del vector pET30b(+) se realizó sembrando las células transformadas sobre placas LB-agar que contenían 0,03 mg/ml de kanamicina. Estas placas se incubaron a 37 °C durante unas 14 h. Las colonias obtenidas se analizaron mediante PCR y aquellos clones en los que se amplificó un fragmento del tamaño esperado se secuenciaron para confirmar la secuencia introducida y la ausencia de mutaciones en el plásmido recombinante.

### **18.5. Análisis por PCR**

El fragmento de ADN clonado en el vector se amplificó por PCR y el producto de esta PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. El ADN molde se obtuvo directamente de las colonias bacterianas o bien se utilizó ADN plasmídico obtenido como se indica en el apartado 16.2. Como cebadores se utilizaron el SP6 (GATTTAGGTGACACTATAG) y el T7 (TAATACGACTCACTATAGGG)

para el vector pGEM-T y el T7 y el T7-Ter (GCTAGTTATTGCTCAGCGG) para el vector pET30b(+), o bien se utilizaron oligonucleótidos específicos del fragmento clonado. Estas reacciones de PCR se hicieron generalmente utilizando la polimerasa *GoTaq DNA Polymerase* (Promega), en una mezcla de reacción compuesta por: 4 µl de tampón (5x), 1,2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µl de mezcla de dNTPs (10 mM de cada uno), 1 µl de oligonucleótido 1 (10 µM), 1 µl de oligonucleótido 2 (10 µM), 0,1 µl (0,5 U) de ADN polimerasa, 0,25 µg de plásmido o un fragmento de la colonia y agua miliQ hasta 20 µl. Las condiciones para estas PCRs fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min seguida de 35 ciclos compuestos por desnaturalización del ADN a 95 °C durante 30 s, unión de los cebadores a una temperatura específica para cada pareja de oligonucleótidos (T<sub>m</sub>) durante 30 s y extensión a 72 °C durante 1 min por cada kb del fragmento de ADN a amplificar; y una extensión final a 72 °C durante 10 min.

## **19. SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

La secuenciación se realizó en el Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba; para ello se usaron entre 0,2 y 0,4 µg de ADN plasmídico y 3,2 pmoles de cebador.

## **20. CLONACIÓN DEL ADN<sub>c</sub> QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA IDENTIFICADA MEDIANTE MALDI-TOF**

El ADN<sub>c</sub> completo del gen que codifica la posible nucleotidasa se obtuvo mediante PCR sobre ADN<sub>c</sub> de ejes de judía utilizando los oligonucleótidos Ntdsa F1 (5'-CTAACAGTTTTCCGGCGATG-3') y

Ntdsa R1 (5'-CAGATTTCTGAGAAGACATTGCTA-3') utilizando el siguiente programa: una desnaturalización a 94 °C durante 3 min seguida de 35 ciclos de 94 °C durante 1 min, 62 °C durante 1 min y 72 °C durante 2 min; y una extensión final a 72 °C durante 10 min.

## **21. EXPRESIÓN EN *ESCHIRICHIA COLI* Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE**

### **21.1. Clonación de la secuencia codificante del ADNc en el vector pET30b+**

A ambos lados de la región codificante del ADNc que codifica la posible nucleotidasa se introdujeron sitios de corte para enzimas de restricción *SalI* y *NotI* mediante la amplificación por PCR utilizando la mezcla de polimerasas suministradas con el kit Advantage 2 PCR (Clontech) junto con los oligonucleótidos NTE1 (5'-GTCGACATGGATTCCGGC GTGTGTCTGTTG-3') y NTE2 (5'-TGCGGCCGCCTATGGAAT ATAGTACATT-3'). NTE1 contiene los 18 primeros nucleótidos de la región codificante y un sitio de restricción para la enzima *SalI* en el extremo 5', y el oligonucleótido NTE2, que corresponde al codón de terminación y a los 15 nucleótidos precedentes más un sitio de restricción para la enzima *NotI* en el extremo 5'. La mezcla de reacción de PCR contenía: 2 µl de tampón (10x); 0,4 µl de mezcla de dNTPs (10 mM de cada); 0,4 µl de Advantage ADN polimerasas; 1 µl del cebador NTE1 (10 µM); 1 µl del cebador NTE2 (10 µM); 0,5 µg del plásmido que contiene el ADNc completo y agua mili-Q estéril hasta 20 µl. Las condiciones de PCR fueron: una desnaturalización a 95 °C durante 1 min seguida de 35 ciclos de 95 °C durante 1 min, 70 °C durante 1 min y 72 °C durante 90 s; y una extensión final a 72 °C durante 10 min.

El fragmento de ADN amplificado obtenido tras la reacción de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa, se recortó y se purificó del gel. El producto de PCR purificado se introdujo en el vector pGEM-T mediante ligación. Se transformaron células DH5 $\alpha$  y los transformantes seleccionados por color se analizaron mediante PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos internos del vector pGEM-T (SP6 y T7) y la pareja de oligonucleótidos específicos NTE1 y NTE2.

Los plásmidos aislados de los transformantes positivos y el vector pET30b(+) se sometieron a digestión con las enzimas de restricción *NotI* y *SalI*. A continuación se resolvieron mediante electroforesis de ADN en gel de agarosa y se extrajeron y purificaron los fragmentos de interés. Ambas moléculas de ADN se unieron mediante ligación como se ha indicado en el apartado anterior y con el producto de esta ligación se transformaron células de *E. coli* BL21. Los transformantes obtenidos se confirmaron mediante PCR con la pareja de oligonucleótidos NTE1 y NTE2. Los plásmidos de los transformantes positivos se secuenciaron para comprobar la ausencia de mutaciones.

## **21.2 Expresión de la proteína recombinante**

Las células de *E. coli* que contenían el plásmido recombinante pET30b(+) para la nucleotidasa se cultivaron en matraces con 25 ml de medio de cultivo compuesto por LB líquido, kanamicina 0,03 mg/ml y glucosa al 1% (p/v), en agitación a 200 rpm y a 37 °C. Alcanzada una densidad óptica de 0,6 a 595 nm, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM. Los cultivos se incubaron durante diferentes tiempos y a diferentes temperaturas. La inducción rutinaria se realizó a 30 °C durante 2 h. Terminada la inducción, las bacterias se recogieron por

centrifugación a 2.000 g a 4 °C y se utilizaron directamente para su lisis o se congelaron a -20 °C.

Las bacterias obtenidas de 25 ml de cultivo líquido se resuspendieron en 4 ml de tampón de lisis y se rompieron por ultrasonidos en un equipo Vibra Cell (Sonics and Materials INC., Danbury, Connecticut, USA) aplicando 6 pulsos de 5 s cada uno, manteniéndose en todo momento las muestras en hielo. El homogenado se centrifugó a 12.000 g durante 15 min y a 4 °C, y el sobrenadante obtenido se denominó extracto crudo de lisis. En condiciones no desnaturalizantes, no se añadió urea al tampón de lisis.

### **21.3.- Purificación de la proteína recombinante**

La proteína expresada se purificó por unión a Ni<sup>+2</sup> en columna de Chelating sepharose (GE Healthcare) de 8 ml preparada siguiendo las instrucciones del fabricante. Se aplicaron 5 ml de extracto crudo de lisis sobre la columna, se lavó con 7 volúmenes de tampón de lavado y por último se aplicaron 3 volúmenes de tampón de elución. Las fracciones obtenidas se mantuvieron a 4 °C para su posterior análisis mediante SDS-PAGE y Western blot. En condiciones no desnaturalizantes, no se añadió urea a los tampones utilizados.

#### **Reactivos**

- El tampón de lisis estaba formado por TRIS-HCl 50 mM pH 7,8 que contenía PMSF 1 mM y NaCl 500 mM.
- El tampón de lavado estaba formado por TRIS-HCl 50 mM pH 7,8 que contenía NaCl 500 mM e imidazol 50mM.
- El tampón de elución estaba formado por TRIS-HCl 50 mM pH 7,8 que contenía NaCl 500 mM e imidazol 500 mM.

## 22. BASES DE DATOS Y SOFTWARE DE PREDICCIÓN Y ANÁLISIS

### 22.1. Bases de datos

- NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- ISI Web of Knowledge (<http://wokinfo.com/>).
- Brenda, enzyme database (<http://www.brenda-enzymes.org/>).
- The DFCI *Medicago truncatula* Gene Index Computational Biology and Functional Genomics Laboratory at the Dana-Farber Cancer Institute and Harvard School of Public Health (<http://compbio.dfci.harvard.edu/index.html>).
- Web Phytosome (<http://www.phytosome.net/>).

### 22.2. Software de predicción y análisis

- HCPolya  
([http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwHC\\_polya.html](http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwHC_polya.html))  
(Milanesi et al., 1999)
- TargetP Server v1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)  
(Emanuelsson et al., 2000).
- SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)  
(Petersen et al., 2011)
- Conserved Domain Database and Search Service,  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)  
(Marchler-Bauer et al., 2011).
- NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
- FindPept tool, ExPASy - SIB Bioinformatics Resource Portal-  
(<http://web.expasy.org/findpept/>) (Gasteiger et al., 2003).
- NetN Glyc1.0 Server  
(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

## **IV. RESULTADOS**

### **CAPÍTULO I**

#### **1. ANÁLISIS DE LAS ACTIVIDADES FOSFATASAS ÁCIDAS DURANTE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO POSTGERMINATIVO DE PLÁNTULAS DE JUDÍA**

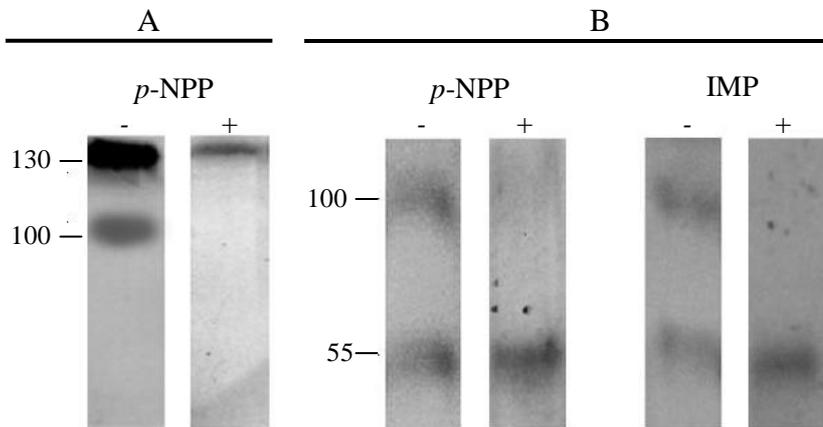


### **1.1. Actividades fosfatasas durante la germinación y desarrollo postgerminativo de judía**

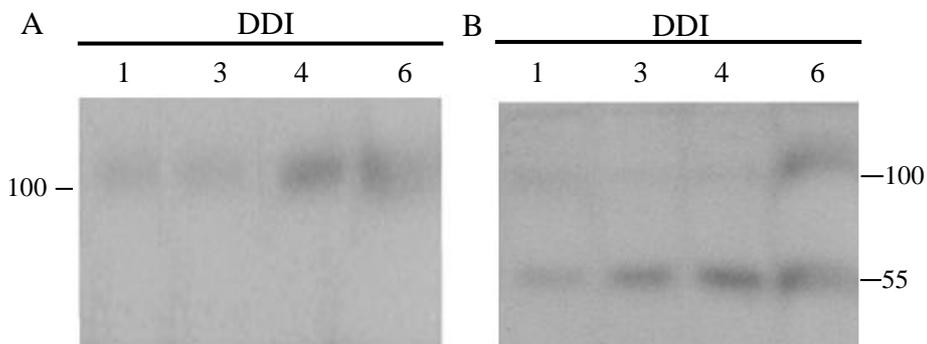
Con el objetivo de identificar la actividad fosfatasa implicada en la síntesis de ureidos en plántulas de judía, se han determinado las actividades fosfatasas durante la germinación y el desarrollo postgerminativo utilizando un ensayo en gel. Las actividades fosfatasas se analizaron en extractos crudos de plántulas de judía de 6 días utilizando como sustratos *p*-NPP (sustrato sintético no específico utilizado para la caracterización de actividades fosfatasas tanto ácidas como alcalinas) y el nucleósido monofosfato IMP. En extractos de cotiledones se detectaron dos actividades mayoritarias que corresponden a proteínas con masas moleculares de 100 y 130 kDa (Figura 4 A). En los extractos de ejes en desarrollo no se detectó la actividad de 130 kDa y sí dos actividades que correspondían con proteínas de un tamaño aproximado de 55 y 100 kDa (Figura 4 B) independientemente del sustrato utilizado, *p*-NPP o IMP. La inclusión de molibdato en la mezcla de reacción inhibió totalmente la actividad de la proteína de 100 kDa sin efecto aparente sobre la actividad de la enzima de 55 kDa.

Las actividades fosfatasas se determinaron en extractos crudos de plántulas de judía a lo largo del desarrollo temprano con IMP como sustrato (Figura 5). La emergencia de la radícula se produjo entre el día 2 y 3 tras la imbibición, delimitando este hecho el fin de la germinación y el comienzo del desarrollo postgerminativo. En los extractos de cotiledones la proteína de masa molecular aproximada de 130 kDa no mostró actividad con este sustrato. A partir del día 4 de desarrollo se detectó actividad para la proteína de 100 kDa, que fue aumentando durante el desarrollo postgerminativo temprano (Figura 5 A). En los extractos de ejes en desarrollo se detectó desde el primer día de

desarrollo la actividad resistente a molibdato de 55 kDa mientras que la actividad de 100 kDa sensible a molibdato se detectó tras la emergencia radicular (Figura 5 B).



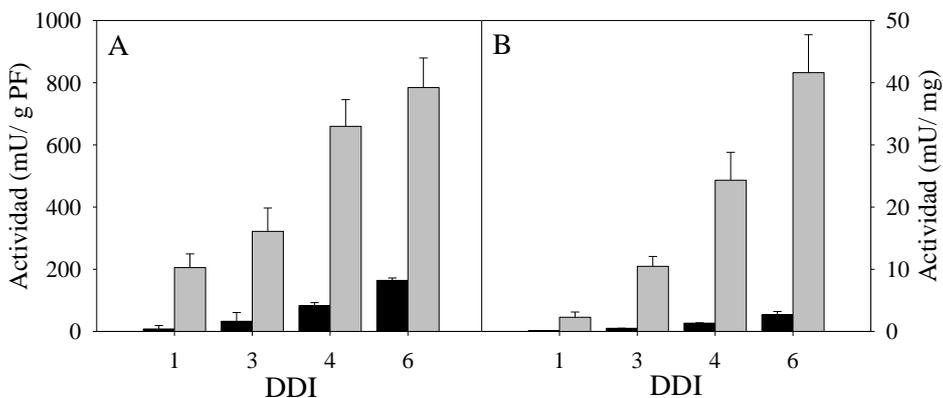
**Figura 4.- Actividades fosfatasa en extractos de cotiledones (A) y ejes (B) de plántulas de judía de 6 días.** La actividad se determinó con los sustratos indicados (*p*-NPP o IMP) en ausencia (-) o presencia (+) de molibdato 5 mM en extractos crudos obtenidos a partir de cotiledones (A) o ejes embrionarios (B) a los 6 días después de la imbibición. El tamaño de las proteínas con actividad fosfatasa se indica en el margen izquierdo de la figura.



**Figura 5.- Actividades fosfatasa en plántulas de judía durante la germinación y el desarrollo postgerminativo temprano.** Los ensayos se realizaron con IMP como sustrato en ausencia de molibdato utilizando extractos crudos de cotiledones (A) y ejes embrionarios (B) a los días después de la imbibición (DDI) indicados. En cada pocillo del gel de acrilamida se cargó la misma cantidad de extracto crudo. El tamaño de las proteínas con actividad fosfatasa se indica en el margen de la figura.

## 1.2. Análisis de la actividad fosfatasa resistente a molibdato en plántulas de judía

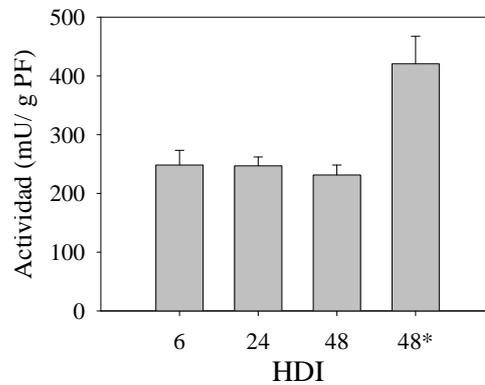
La actividad fosfatasa resistente a molibdato se determinó mediante el ensayo *in vitro* en los extractos crudos obtenidos de ejes embrionarios y cotiledones durante la germinación y desarrollo postgerminativo de judía (Figura 6 A). El ensayo se realizó con IMP como sustrato y en presencia de molibdato, condiciones en las que se determinó una única actividad mediante el ensayo en gel. La actividad fosfatasa resistente a molibdato expresada por peso fresco fue mayor en ejes en desarrollo en relación a cotiledones y en ambos tejidos la actividad incrementó a lo largo del desarrollo (Figura 6 A). El patrón de la actividad *in vitro* fue el mismo al observado mediante el ensayo en gel. La actividad específica también aumentó a lo largo del desarrollo (Figura 6 B).



**Figura 6.- Actividad fosfatasa resistente a molibdato a lo largo del desarrollo de plántulas de judía.** La actividad fosfatasa se determinó con IMP 5 mM como sustrato y en presencia de molibdato 5 mM en extractos crudos obtenidos a partir de cotiledones (barras negras) y ejes (barras grises) a los días después de la imbibición (DDI) indicados. La actividad enzimática se expresó frente a gramo de peso fresco (A) y frente a mg de proteína soluble total (B).

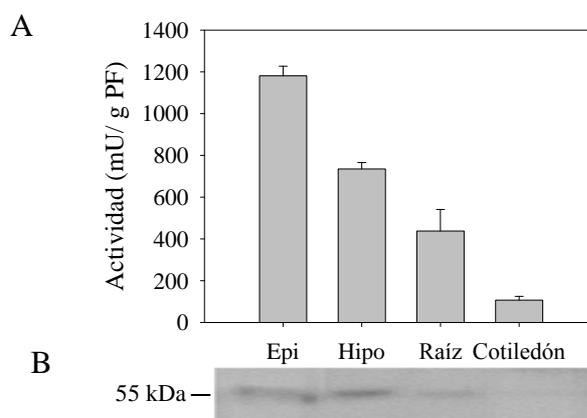
La actividad fosfatasa resistente a molibdato se analizó en los ejes embrionarios durante el proceso de germinación propiamente dicho (Figura 7). La actividad se mantuvo constante durante la germinación

con un valor aproximado de 250 mU/g de peso fresco aumentando una vez que se ha producido la emergencia de la radícula (Figura 7).



**Figura 7.- Actividad fosfatasa resistente a molibdato en ejes embrionarios durante la germinación.** La actividad fosfatasa se determinó en presencia de molibdato con IMP 5 mM como sustrato en extractos crudos obtenidos de ejes a las h después del inicio de la imbibición (HDI) indicadas. A las 48 h de desarrollo, los ejes se obtuvieron a partir de semillas no germinadas (48) o germinadas (48\*).

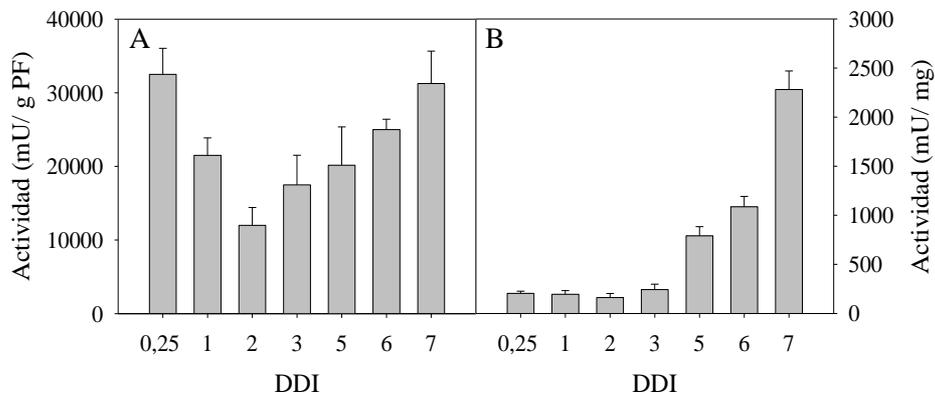
La actividad fosfatasa resistente a molibdato se determinó en las distintas partes de las plántulas de 6 días de desarrollo mediante ambos sistemas de ensayo (Figura 8). Los mayores valores de actividad se encontraron en epicotilos en desarrollo. En todas las partes del eje embrionario los valores de actividad fueron superiores a los determinados en cotiledones.



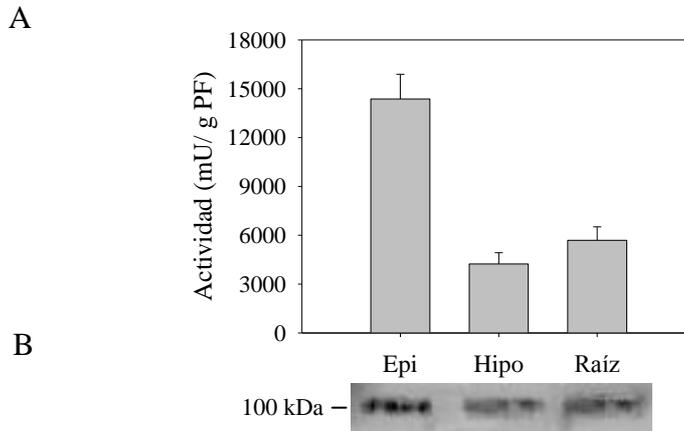
**Figura 8.- Actividad fosfatasa resistente a molibdato en las distintas partes de plántulas de judía.** La actividad fosfatasa se determinó con IMP como sustrato y en presencia de molibdato en los extractos obtenidos a partir de los tejidos indicados de plántulas de 6 días de desarrollo. (A) Actividad in vitro. (B) Actividad en gel. La masa molecular deducida para la proteína con actividad se indica al margen.

### 1.3. Análisis de la actividad fosfatasa sensible al molibdato en ejes de judía

La actividad fosfatasa sensible a molibdato normalizada por peso fresco disminuyó durante la germinación propiamente dicha, aunque la actividad específica permaneció constante debido al descenso en la cantidad de proteína en ejes durante la germinación (Figura 9). Tras la emergencia de la radícula, la actividad fosfatasa aumentó tanto normalizada por peso fresco como por cantidad de proteína (Figura 9). Entre las distintas partes del eje embrionario, la actividad fosfatasa sensible a molibdato fue superior en los epicotilos cuando se analizó en plántulas de 7 días (Figura 10). El patrón de actividad entre las distintas partes coincidió cuando la actividad se ensayó in vitro o en gel.



**Figura 9.- Actividad fosfatasa sensible a molibdato a lo largo del desarrollo en plántulas de judía.** La actividad fosfatasa se determinó en extractos crudos obtenidos de ejes a los días después de la imbibición (DDI) indicados. La actividad enzimática se determinó con *p*-NPP 5 mM como sustrato y los valores se expresaron frente a gramo de peso fresco (A) y frente a cantidad de proteína soluble total (B).



**Figura 10.- Actividad fosfatasa sensible a molibdato en tejidos de plántulas de judía.** La actividad fosfatasa se determinó con *p*-NPP 5 mM como sustrato en los extractos obtenidos a partir de las distintas partes de plántulas de 7 días de desarrollo. (A) Actividad *in vitro*. (B) Actividad en gel. La masa molecular deducida para la proteína con actividad se indica al margen.

#### 1.4. Efecto de la inclusión de compuestos nitrogenados en las actividades fosfatasas de ejes de plántulas de judía

Las actividades fosfatasas se determinaron en ejes de judía de plántulas de 5 días desarrolladas en presencia de alantoína o de varios compuestos precursores de su síntesis como los nucleótidos IMP o AMP, y el nucleósido adenosina. Todos los compuestos se añadieron al medio de imbibición a una concentración de 5 mM. También se estudió el efecto de nitrato a una concentración de 20 mM para igualar la cantidad de nitrógeno aportada por los nucleótidos. En los mismos extractos se determinó la concentración de ureidos para comparar sus valores con los de las actividades fosfatasas. Ninguno de los compuestos nitrogenados utilizados afectó a la tasa de germinación ni al desarrollo de las plántulas. El contenido en proteína soluble de los ejes embrionarios tampoco se afectó. Las semillas desarrolladas en presencia de los nucleótidos IMP y AMP mostraron mayor actividad fosfatasa resistente a molibdato (nucleotidasa) mientras que la actividad fosfatasa sensible a

molibdato no varió (Tabla 1). Este incremento de actividad se correspondió con un aumento en el contenido de ureidos en los ejes de la plántula (Tabla 1). El mayor efecto se obtuvo con AMP, que aumentó el contenido de ureidos en un 40 % respecto al control. El efecto fue distinto cuando se añadió al medio de imbibición el nucleósido adenosina (Tabla 1). La concentración de ureidos en los ejes embrionarios aumentó también, aunque este incremento no se asoció a la actividad resistente a molibdato (nucleotidasa) ya que se observó un ligero descenso de esta actividad (Tabla 1). La actividad fosfatasa sensible a molibdato no se afectó por adenosina ni por los nucleótidos (Tabla 1). La inclusión en el medio de imbibición de alantoína o nitrato no produjo cambios significativos en ninguna de las actividades fosfatasas.

**Tabla 1.- Efecto de varios compuestos nitrogenados sobre las actividades fosfatasas y en el contenido de ureidos en ejes de 5 días.** Las semillas se germinaron y desarrollaron en presencia de los compuestos indicados a una concentración de 5 mM, a excepción del nitrato que se utilizó a 20 mM. A los 5 días de desarrollo, se obtuvieron los extractos crudos de los ejes y se determinaron las actividades fosfatasas resistente y sensible a molibdato y el contenido de ureidos. Los valores se normalizaron frente a la cantidad de proteína de los extractos. Los valores corresponden a la media  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes y análisis por duplicado de cada extracto. Los valores de las medias de una misma columna que presentan una letra distinta son significativamente diferentes ( $P \geq 0,05$ ) de acuerdo con el análisis Scheffe.

	Actividad 5'-Nucleotidasa (%)	Actividad Fosfatasa (%)	Ureidos (%)
Control	100 <sup>b</sup> $\pm$ 9	100 <sup>ab</sup> $\pm$ 8	100 <sup>c</sup> $\pm$ 9
AMP	132 <sup>a</sup> $\pm$ 11	99 <sup>ab</sup> $\pm$ 7	137 <sup>a</sup> $\pm$ 14
IMP	117 <sup>ab</sup> $\pm$ 4	90 <sup>b</sup> $\pm$ 6	120 <sup>ab</sup> $\pm$ 11
Adenosina	82 <sup>c</sup> $\pm$ 9	86 <sup>b</sup> $\pm$ 6	125 <sup>ab</sup> $\pm$ 10
Alantoína	97 <sup>b</sup> $\pm$ 6	105 <sup>ab</sup> $\pm$ 4	114 <sup>bc</sup> $\pm$ 8
Nitrato	105 <sup>b</sup> $\pm$ 9	98 <sup>ab</sup> $\pm$ 9	91 <sup>c</sup> $\pm$ 11

### **1.5. Efecto del fosfato y molibdato en las actividades fosfatasas de ejes de plántulas de judía**

El fosfato es un inhibidor de las actividades fosfatasas implicadas en el metabolismo del fósforo y el ion molibdato es un potente inhibidor de las actividades fosfatasas, aunque la actividad fosfatasa de 55 kDa descrita anteriormente no se inhibió por este ion. La inclusión de fosfato 5 mM en el medio de imbibición no alteró la germinación ni el desarrollo postgerminativo de judía. Sin embargo, la inclusión de molibdato 5 mM no afectó a la germinación de la semilla pero sí impidió el desarrollo postgerminativo del eje embrionario. Cuando el ion molibdato se añadió a concentraciones de hasta 1 mM, el desarrollo del eje embrionario fue normal. Las actividades fosfatasas se analizaron en extractos crudos obtenidos a partir de ejes de plántulas desarrolladas en presencia de fosfato 5 mM o molibdato 0,5 mM en la mezcla de imbibición (Tabla 2). La concentración de proteína soluble en los extractos crudos no se afectó por estos tratamientos. La adición de fosfato 5 mM no causó cambios significativos en los valores de las actividades ni de la concentración de ureidos (Tabla 2). Sin embargo, la actividad fosfatasa sensible a molibdato fue inferior en plántulas desarrolladas en presencia de molibdato 0,5 mM (un 40 % inferior), mientras que la actividad nucleotidasa (fosfatasa resistente a molibdato) no se vio afectada ni tampoco el contenido de ureidos de los ejes embrionarios (Tabla 2).

**Tabla 2.- Efecto del fosfato y del molibdato sobre las actividades fosfatasas y el contenido de ureidos en ejes de judía.** Al medio de imbibición de las semillas se añadió fosfato 5 mM o molibdato 0,5 mM. A los 5 días de desarrollo, se obtuvieron los extractos crudos de los ejes y se determinaron las actividades fosfatasas resistente y sensible a molibdato y el contenido de ureidos. Los valores se normalizaron frente a la cantidad de proteína de los extractos. Los valores corresponden a la media  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes y análisis por duplicado de cada extracto. Los valores de las medias de una misma columna que presentan una letra distinta son significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ) de acuerdo al análisis Scheffe.

	Actividad 5'-Nucleotidasa (%)	Actividad Fosfatasa (%)	Ureidos (%)
Control	100 <sup>a</sup> $\pm$ 9	100 <sup>a</sup> $\pm$ 8	100 <sup>a</sup> $\pm$ 9
Pi	105 <sup>a</sup> $\pm$ 9	113 <sup>a</sup> $\pm$ 9	110 <sup>a</sup> $\pm$ 10
MoO <sub>4</sub>	88 <sup>a</sup> $\pm$ 5	67 <sup>b</sup> $\pm$ 5	89 <sup>a</sup> $\pm$ 9



## **CAPÍTULO II**

### **2. PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD FOSFATASA ÁCIDA RESISTENTE A MOLIBDATO CON ALTA AFINIDAD POR LOS NUCLEÓTIDOS**



## 2.1. Purificación de la actividad fosfatasa resistente a molibdato de ejes embrionarios de judía

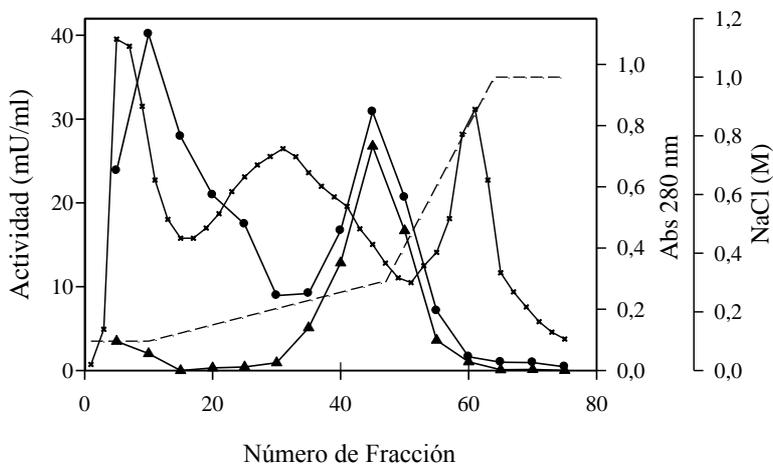
El análisis previo de la actividad fosfatasa resistente a molibdato en ejes en desarrollo de judía indicó que los ejes completos de judía de 7 días de desarrollo constituirían un material indicado para su purificación. El proceso de purificación hasta homogeneidad electroforética se resume en la Tabla 3.

*Tabla 3.- Purificación de la actividad fosfatasa resistente a molibdato de ejes embrionarios de Phaseolus vulgaris. El extracto crudo se obtuvo a partir de 37 gramos de ejes embrionario de plántulas de siete días después de la imbibición (ver Materiales y métodos para más detalles). La actividad se determinó en presencia de molibdato con IMP 5 mM como sustrato*

	<b>Actividad total (U)</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>Actividad específica (U/mg)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Factor de purificación</b>
Extracto crudo	3,81	321,00	0,01	100,0	1
DEAE	4,36	20,85	0,21	114,46	18
Sephacryl	2,84	7,70	0,37	74,48	31
Choque térmico	2,22	2,10	1,06	58,17	89
Concanavalina-A	0,55	0,03	18,13	14,46	1527

El primer paso de purificación consistió en una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel, obteniéndose dos picos de actividad fosfatasa cuando el análisis de las fracciones obtenidas se realizó en ausencia de molibdato. El primer pico de actividad eluyó con una concentración de NaCl aproximada a 110 mM y el segundo pico eluyó a una concentración de NaCl de 295 mM (Figura 11). Cuando el ensayo de actividad se realizó en presencia de molibdato se obtuvo únicamente el segundo pico. El análisis de las fracciones cromatográficas mediante el ensayo de actividad en gel corroboró que el

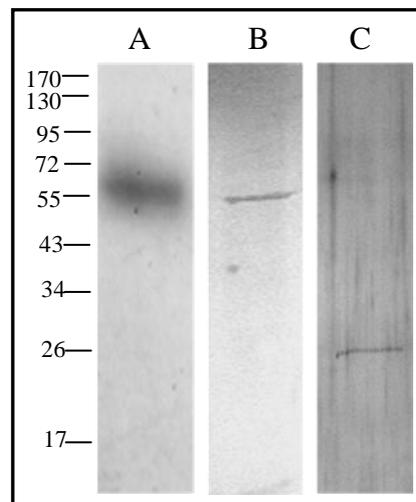
primer pico de actividad, sensible a molibdato, correspondía con la actividad de un tamaño aproximado de 100 kDa, mientras que el segundo pico de actividad, resistente a molibdato, correspondía con la actividad de 55 kDa. La purificación se continuó con las fracciones correspondientes a este segundo pico. La cromatografía de afinidad en concanavalina-A fue el paso más efectivo en el proceso de purificación con un factor de purificación de 17 y un rendimiento del 25 %. El factor de purificación del proceso total fue de aproximadamente 1500 y el rendimiento final del 14,5 %. La actividad específica de la fosfatasa purificada fue de 18,1 U/mg de proteína (Tabla 3). Este valor de actividad específica implica un número de recambio  $990 \text{ min}^{-1}$  con IMP como sustrato.



**Figura 11.- Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel.** El extracto crudo se cargó en una columna de DEAE-Sephacel. Después de lavar con tampón de trabajo suplementado con 0,1 M de NaCl, las proteínas se eluyeron con dos gradientes lineales de 0,1-0,3 y 0,3-1,0 M de NaCl (representado por la línea discontinua). Se recogieron fracciones de 6,8 ml en las que se determinó el contenido en proteínas (absorbancia a 280 nm) y la actividad fosfatasa con *p*-NPP como sustrato en ausencia (círculos) y presencia de molibdato (triángulos).

El análisis de la proteína purificada mediante electroforesis en SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes dio lugar a una única banda

con una masa molecular de 55 kDa y que presentó actividad fosfatasa (Figura 12 A). El análisis de la proteína en condiciones desnaturalizantes (incubando la muestra durante 5 min a 100 °C en presencia de DTT) dio lugar a una única banda del mismo tamaño (Figura 12 B), lo que indicaría que la enzima es un monómero de 55 kDa. Sin embargo, la inclusión de urea 8 M en el tampón de carga y tratando la muestra a 100 °C durante 15 min resultó en la aparición de una única banda con un tamaño aproximado de 28 kDa (Figura 12 C), lo que indicaría que la proteína con actividad fosfatasa podría ser un dímero.



**Figura 12.-Análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de la fosfatasa resistente a molibdato purificada de *P. vulgaris*.** A) Ensayo de actividad. La proteína se mezcló con tampón de carga con SDS y se sometió a electroforesis en SDS-PAGE. A continuación se realizó un ensayo de actividad en gel con IMP como sustrato. B) Determinación de la masa molecular en condiciones desnaturalizantes. La proteína se mezcló con tampón de carga con SDS y DTT y se hirvió durante 5 min, luego se sometió a electroforesis en SDS-PAGE y el gel se tiñó con plata. C) Determinación de la masa molecular en presencia de urea. La proteína se mezcló con tampón de carga con SDS y urea 8M y se hirvió durante 15 min, a continuación se sometió a electroforesis en SDS-PAGE y el gel se tiñó con plata. Las posiciones de los marcadores de peso moleculares se muestran en la parte izquierda de la figura.

## 2.2. Caracterización de la actividad fosfatasa resistente a molibdato

La actividad de la fosfatasa purificada se ensayó frente a una variedad de sustratos fosforilados, todos a una concentración final de 5 mM excepto el AMP que se utilizó a una concentración final de 0,25 mM (Tabla 4). La mayor actividad fosfatasa se obtuvo con el sustrato artificial *p*-NPP, seguida de los nucleótidos (IMP, GMP, XMP, UMP, CMP y AMP), y la actividad fue mucho menor con otros compuestos fosforilados (Tabla 4).

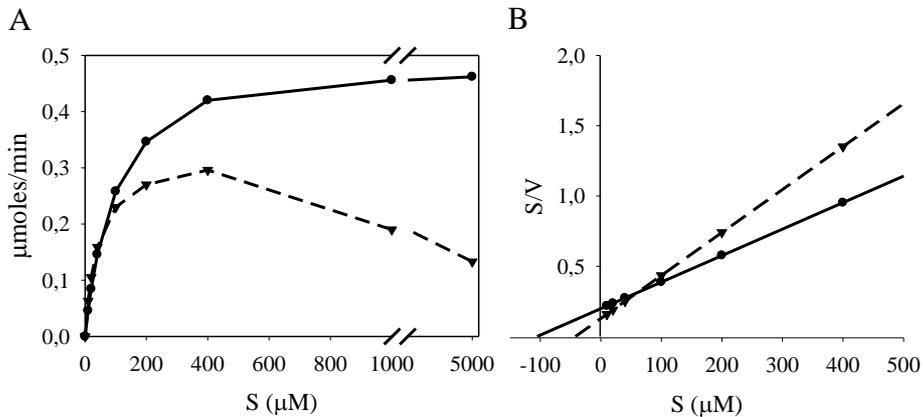
**Tabla 4.- Especificidad de sustrato de la actividad fosfatasa resistente a molibdato.** La actividad se determinó con los sustratos indicados a una concentración final de 5 mM excepto el AMP que se utilizó a 0,25 mM. La actividad con IMP se tomó como el 100 %. Los datos son valores medios ( $\pm$  DE) de cuatro determinaciones independientes.

Sustrato	Actividad
<i>p</i> -NPP	100 $\pm$ 2
IMP	63 $\pm$ 3
GMP	64 $\pm$ 4
AMP	44 $\pm$ 3
XMP	46 $\pm$ 3
UMP	47 $\pm$ 4
CMP	46 $\pm$ 4
Tirosina-P	3 $\pm$ 1
Serina-P	0
Ácido fítico	0
Fosfoenolpiruvato	9 $\pm$ 2
Glicerol-P	4 $\pm$ 2
ITP	5 $\pm$ 1
ATP	16 $\pm$ 1
ADP	7 $\pm$ 1
BCIP	6 $\pm$ 1
Naftil-P	5 $\pm$ 1
Glucosa 6-P	1 $\pm$ 1

Puesto que la mayor actividad fosfatasa de la enzima purificada se obtuvo con los nucleótidos, las características cinéticas se determinaron con estos compuestos como sustratos. Cuando la actividad enzimática se determinó utilizando concentraciones crecientes de sustrato, la actividad mostró una cinética hiperbólica para todos a excepción de AMP. Los valores de  $K_m$  se determinaron mediante la representación gráfica de la ecuación de Hanes-Woolf. Los valores de  $K_m$  oscilaron entre 0,042 mM para el AMP y 0,180 mM para XMP. La afinidad de la enzima por los sustratos se estimó como el cociente entre  $K_{cat}/K_m$ , y el mayor valor se obtuvo con AMP como sustrato, lo que indica que es el nucleótido por el que la enzima muestra mayor afinidad (Tabla 5). La actividad fosfatasa de la proteína purificada con AMP como sustrato disminuyó a concentraciones superiores a 0,4 mM, lo que indicaría una inhibición por sustrato (Figura 13).

**Tabla 5.- Propiedades cinéticas de la actividad fosfatasa resistente a molibdato con varios nucleótidos.** La actividad se ensayó con concentraciones crecientes de cada uno de los nucleótidos. Los valores de  $K_m$  se calcularon de acuerdo con la representación de Hanes-Woolf.

	$K_m$ ( $\mu M$ )	$K_{cat}$ ( $min^{-1}$ )	$K_{cat}/K_m$ ( $\mu M^{-1} min^{-1}$ )
IMP	105	946,0	9,0
AMP	42	588,5	14,0
GMP	104	946,0	9,1
XMP	180	632,5	3,5
UMP	152	764,5	5,0
CMP	140	632,5	4,5



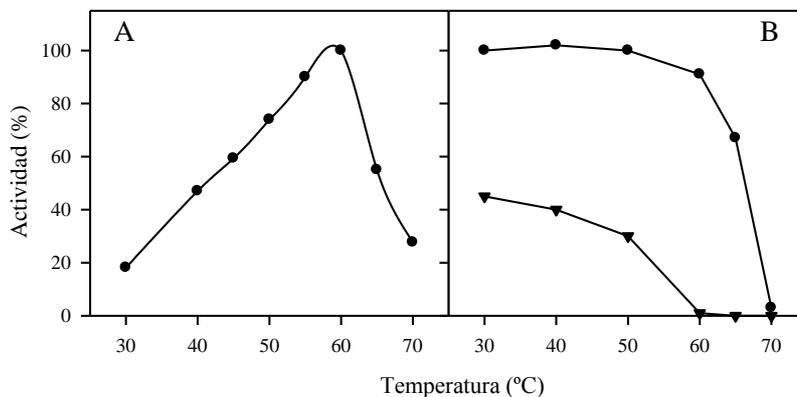
**Figura 13.- Determinación de la  $K_m$  y  $V_{max}$  de la actividad fosfatasa resistente a molibdato con IMP y AMP como sustratos.** La actividad resistente a molibdato se determinó utilizando cantidades crecientes de IMP (círculos negros) y AMP (triángulos negros). A) Representación de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato. B) Representación gráfica de Hanes-Woolf. Los datos son la media de 4 determinaciones y la desviación estándar fue menor del 10 %.

El efecto del agente quelante EDTA y de varios metales sobre la actividad de la proteína purificada se determinó con IMP como sustrato utilizando tampones sin magnesio (Tabla 6). La actividad se inhibió ligeramente cuando se incubó con EDTA, lo que sugiere que los iones juegan un papel en la actividad. Entre los cationes ensayados, el  $\text{Ca}^{2+}$  inhibió la actividad enzimática de manera similar al EDTA, mientras que la inclusión del catión  $\text{Mg}^{2+}$  duplicó la actividad. El resto de cationes ensayados no tuvieron efecto sobre la actividad (Tabla 6).

**Tabla 6.- Efecto del EDTA y de varios cationes divalentes sobre la actividad fosfatasa resistente a molibdato.** La actividad enzimática se ensayó en presencia de los compuestos indicados a una concentración de 1 mM, correspondiendo el Control (100 %) al valor de la actividad en ausencia de compuesto. Los datos corresponden a los valores medios y la desviación típica de cuatro determinaciones independientes.

	Actividad (%)
Control	100 ± 9
EDTA	62 ± 8
$\text{Mg}^{2+}$	202 ± 19
$\text{Mn}^{2+}$	116 ± 11
$\text{Ca}^{2+}$	65 ± 6
$\text{Zn}^{2+}$	115 ± 17
$\text{Ni}^{2+}$	94 ± 8

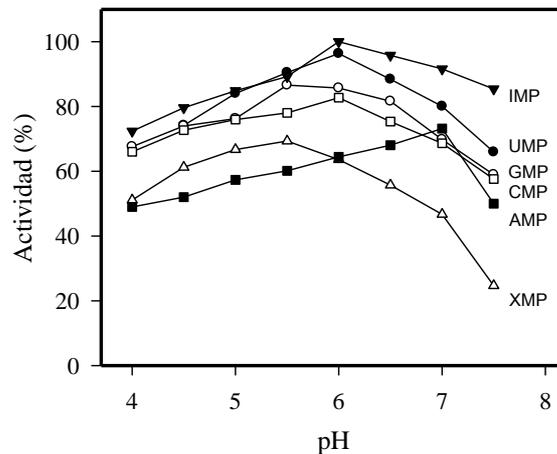
La temperatura óptima para la reacción enzimática *in-vitro* fue de 60 °C (Figura 14 A), y los valores de energía de activación y  $Q_{10}$  obtenidos fueron de 32,7 kJ mol<sup>-1</sup> y 1,49, respectivamente. La enzima mostró una elevada estabilidad térmica manteniendo el total de la actividad tras 30 min a 60 °C y más del 60 % de actividad después de 30 min a 70 °C en presencia del catión magnesio en las preparaciones enzimáticas. En ausencia de magnesio, la enzima perdió toda su actividad tras incubarse durante 30 min a 60 °C (Figura 14 B). Esta mayor estabilidad en presencia de Mg<sup>2+</sup> podría indicar un papel de éste en el mantenimiento de la estructura de la enzima



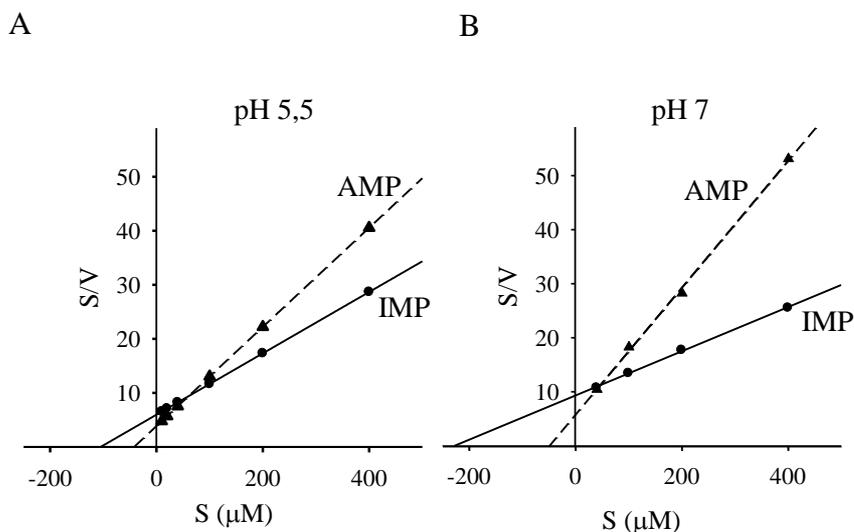
**Figura 14.- Efecto de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad de la fosfatasa resistente a molibdato purificada de *Phaseolus vulgaris*.** A) La actividad se determinó a las temperaturas indicadas y se referenció frente a la actividad máxima obtenida. B) Preparaciones enzimáticas se incubaron a la temperatura indicada durante 30 min en presencia (círculos) y ausencia de Mg<sup>2+</sup> (triángulos). Tras enfriar las muestras, se midió la actividad bajo condiciones de ensayo estándar y los valores de actividad se referenciaron frente al valor máximo de actividad obtenido.

La actividad enzimática mostró valores de pH óptimo de 5,5 ó 6 para todos los nucleótidos ensayados excepto para AMP, sustrato con el cual se obtuvo un valor óptimo de pH de 7 (Figura 15). El valor del pH del tampón de ensayo también afectó a las constantes cinéticas de la proteína purificada de forma distinta para el AMP y el IMP (Figura 16). Con AMP se obtuvo el menor valor de  $K_m$  (42  $\mu$ M) y no se afectó por el pH

del medio. Mientras que con IMP el valor de  $K_m$  a pH 7 fue de 226  $\mu\text{M}$ , muy superior al obtenido a pH 5,5 que fue de 105  $\mu\text{M}$  (Figura 16 A y B).



**Figura 15.- Efecto del pH sobre la actividad fosfatasa resistente a molibdato purificada con varios nucleótidos como sustrato.** La actividad se determinó en una mezcla de tampones succinato-MES-TES (50 mM de cada uno) a los valores de pH indicados. La actividad se determinó en condiciones normales con los sustratos a una concentración final de 5 mM a excepción de AMP que se ensayó a 0,25 mM.



**Figura 16.- Efecto del pH sobre la  $K_m$  de la actividad fosfatasa resistente a molibdato purificada con IMP y AMP como sustratos.** Los ensayos de actividad se realizaron con cantidades crecientes de IMP (círculos) y AMP (triángulos) a pH 5,5 (panel A) y a pH 7 (panel B). Los valores de  $K_m$  corresponden al punto de corte con el eje de abscisas según la representación gráfica de Hanes-Woolf. Los datos son la media de 3 determinaciones y la desviación estándar fue menor del 10 %.

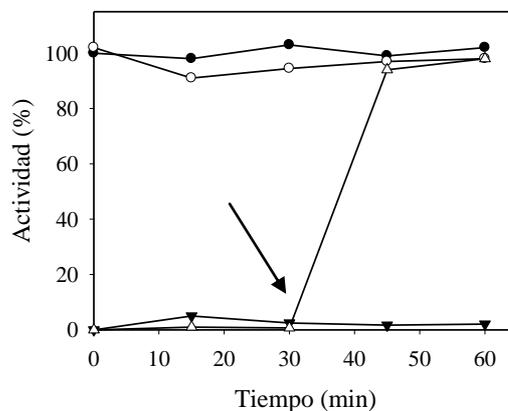
El efecto de varios inhibidores sobre la actividad fosfatasa de la proteína purificada se analizó utilizando IMP como sustrato (Tabla 7). La actividad fosfatasa no se afectó por la inclusión en la mezcla de ensayo de inhibidores clásicos de fosfatasas como molibdato, tartrato o fosfato a concentraciones de 1 mM, pero sí por vanadato (Tabla 7). La actividad enzimática se inhibió de forma significativa por la presencia en la mezcla de reacción de nucleósidos, siendo adenosina el que ejerció mayor efecto inhibitor (Tabla 7).

**Tabla 7.- Efecto de varios compuestos sobre la actividad fosfatasa resistente a molibdato.** La actividad se realizó en presencia de los compuestos indicados a una concentración de 1 mM utilizando IMP 5 mM como sustrato. El valor de actividad en ausencia de compuestos se consideró como el 100 % (Control). Los datos son la media  $\pm$  DE de cuatro determinaciones independientes.

	Actividad (%)
Control	100 $\pm$ 9
Molibdato	96 $\pm$ 8
Fluoruro	81 $\pm$ 9
Vanadato	62 $\pm$ 8
Tartrato	87 $\pm$ 6
Fosfato	93 $\pm$ 7
Adenosina	19 $\pm$ 5
Inosina	75 $\pm$ 7
Guanosina	53 $\pm$ 4
AMP c	62 $\pm$ 13
Con-A	30 $\pm$ 11
<i>p</i> -HMB	2 $\pm$ 1
DTT	99 $\pm$ 4

La actividad fosfatasa también se redujo fuertemente en presencia de concanavalina-A, una lecitina que posee la capacidad de unirse específicamente a glicoproteínas y glicolípidos. Esto indica que la

actividad fosfatasa resistente a molibdato es una glicoproteína. El reactivo de grupos sulfidrilos *p*-HMB inhibió fuertemente la actividad fosfatasa, que fue insensible a la presencia de altas concentraciones del agente reductor DTT en la mezcla de reacción. El efecto inhibitorio de *p*-HMB se eliminó cuando la preparación enzimática se incubó simultáneamente con *p*-HMB y con DTT; además, la adición de DTT recuperó la actividad en preparaciones enzimáticas inactivadas mediante pretratamiento con *p*-HMB durante 30 min a 37 °C (Figura 17). Estos resultados sugieren que los grupos SH son necesarios para la estabilidad y actividad de la enzima.



**Figura 17.- Efecto del *p*-HMB y del DTT sobre la actividad resistente a molibdato.** Las preparaciones enzimáticas se incubaron a 37 °C en tampón de trabajo (círculos negros) suplementado con DTT 10 mM (círculos blancos) o *p*-HMB 1 mM (triángulos blancos y negros). Al tiempo indicado por la flecha se añadió DTT hasta una concentración final de 10 mM a una de las preparaciones que contenía *p*-HMB 1 mM (triángulos blancos). La actividad se determinó a los tiempos indicados de incubación utilizando como sustrato IMP.

### 2.3. Identificación de la proteína con actividad 5'-nucleotidasa mediante MALDI-TOF

La proteína de 55 kDa purificada se aisló a partir de un gel de acrilamida tras someter la muestra a electroforesis en SDS-PAGE en condiciones

reductoras y tinción con azul de Coomassie. A continuación, se realizó una identificación combinada en la que se tienen en cuenta tanto los espectros de las masas de todos los péptidos generados en la digestión con tripsina (fingerprint o huella peptídica), como la fragmentación de algunos de estos péptidos generados (identificación tandem MS) como se indica en los materiales y métodos. Empleando el motor de búsqueda MASCOT y la base de datos NCBIInr se identificaron varias proteínas con una puntuación inferior al valor de significación que fue de 71 ( $p < 0,05$ ) aunque algunas correspondían a fosfatasa ácida (Tabla 8).

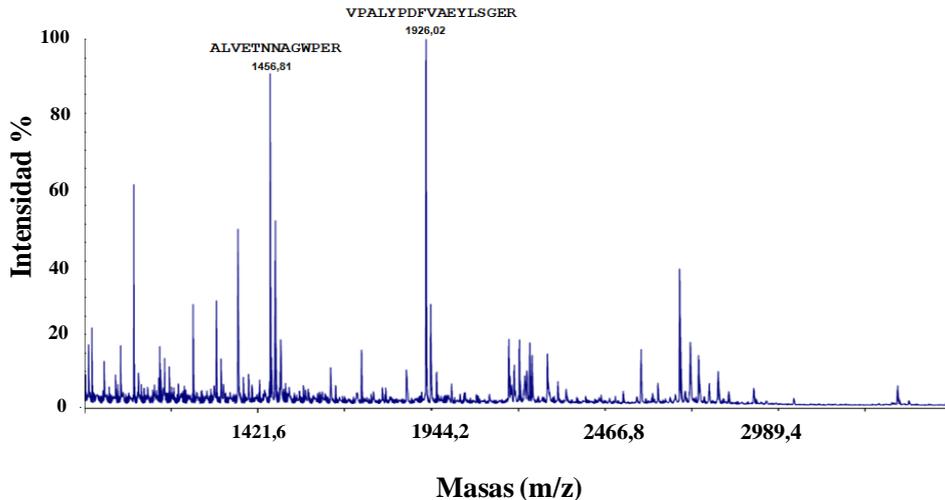
**Tabla 8.- Resultados del análisis de la identificación mediante huella peptídica.** Los fragmentos obtenidos tras la digestión con tripsina se utilizaron para realizar un búsqueda en la base de datos utilizando el motor MASCOT como se indica en Materiales y Métodos

Nombre	Especie	Masa (kDa)	Puntuación*	Nº de péptidos	Nº de acceso
Posible proteína	<i>Vitis vinifera</i>	13,80	64	5	<u>147798643</u>
Posible proteína	<i>Ricinus communis</i>	14,34	63	2	<u>255578771</u>
Desconocida	<i>Picea sitchensis</i>	33,37	62	1	<u>116794345</u>
Fosfatasa ácida	<i>Ricinus communis</i>	31,49	60	1	<u>255539863</u>
Fosfatasa ácida	<i>Picea abies</i>	19,54	57	1	<u>167859865</u>

\* El término puntuación de la proteína se define como  $-10 \cdot \log(P)$ , siendo  $P$  la probabilidad de que la equivalencia establecida entre la proteína problema y la obtenida de la base de datos sea un evento aleatorio.

Los péptidos de mayor intensidad obtenidos tras la digestión con tripsina se sometieron a espectrometría de masas LC ESI MSMS y se analizaron mediante el programa PEAKS. Los resultados de mayor confianza corresponden a dos de los precursores que se muestran en la Figura 18.

Estos dos péptidos alinearon con una proteína de soja con posible actividad fosfatasa (XP\_003529064.1). La proteína homóloga a esta secuencia se identificó en la base de datos del genoma de *Phaseolus vulgaris* (www.phytozome.com), correspondiendo a la secuencia *Phvulv091001267m* que codificaría una proteína de 28,5 kDa.



**Figura 18.- Espectro de la identificación por huella peptídica (MALDI-TOF).** En el espectro se indican las masas y las secuencias de los péptidos candidatos obtenidos por análisis de LC ESI MSMS con el motor de búsqueda PEAKS.

Utilizando la herramienta Find Pept del software informático Aldente (ExPASy, Bioinformatics Resource Portal) se compararon las masas obtenidas mediante la digestión con tripsina de la proteína purificada frente a la digestión *in silico* de la proteína de judía *Phvulv091001267m*. Las masas de 10 de los péptidos obtenidos se ajustaron con los previstos para la proteína de *Phaseolus vulgaris*, lo que corresponde con más del 50 % de la secuencia (Figura 19).

1- M D S G V C L L S L L V A L S T L S H V L S E P  
 25- I L R L P S E K **A I S S D Y C D S W R L A V E T**  
 49- **N N A G P W E R V P A N C V D F V A E Y I S G E**  
 73- R Y R R **D C E V V G N L S L A F A R S V R L V G**  
 97- D G R D A W V F D I D E T L L S N V P Y Y E D I  
 121- G F G F E I F N E T S F D A W V N S A A A P A L  
 145- V P N L I L Y N E L K E L G F R **I F L L T G R S**  
 169- **E Y Q R N A T E A N L M L S G Y R N W E R L I L**  
 193- R **E S Y D K G K P A I S Y K S E K R E E L E N E**  
 217- **G Y R I H G S S G D Q W S D L W G Y A V A A R S**  
 241- F K L P N P M Y Y I P

**Figura 19.-** Secuencia de la proteína *Phvulv091001267m* de *Phaseolus vulgaris* identificada por huella peptídica (MALDI-TOF) y análisis de los datos MS/MS. Los péptidos candidatos del programa PEAKS aparecen subrayados. En rojo se muestran los péptidos identificados mediante el software informático Aldente (ExPASy).

Mediante el análisis de la secuencia aminoacídica con el programa TargetP Server v1.1 (ver Materiales y Métodos) se identificó una secuencia que codificaría para un péptido señal de transporte hacia la ruta de secreción. El análisis con el programa Conserved Domain Database and Search Service (v2.16) reveló dominios característicos de la superfamilia “Haloacid dehalogenase-like hydrolases”, de la familia de las fosfatasas acidas de plantas, de la subfamilia de las fosfatasas ácidas IIIB y también se localizaron los dominios característicos de las proteínas vegetales de reserva (VSP). En la Figura 20 se muestran los dos motivos que contienen aminoácidos clave para la actividad catalítica y que se encuentran muy conservados en todos los organismos, tanto inferiores como superiores. El primer Asp del M(I) **D**XDX[T/V][L/V/I], permite la unión del grupo fosfato para que sea hidrolizado. En el segundo motivo M(II) (§ § § [T/S], siendo § aminoácidos hidrofóbicos), la presencia de Ser o Thr es común a la superfamilia HAD, siendo relevante para las funciones catalíticas de las proteínas con actividad fosfatasa. Los motivos M(III) (K[§ § §], siendo § aminoácidos implicados en una alfa-hélice) y M(IV) (DD o GDx(3-4)D) completan

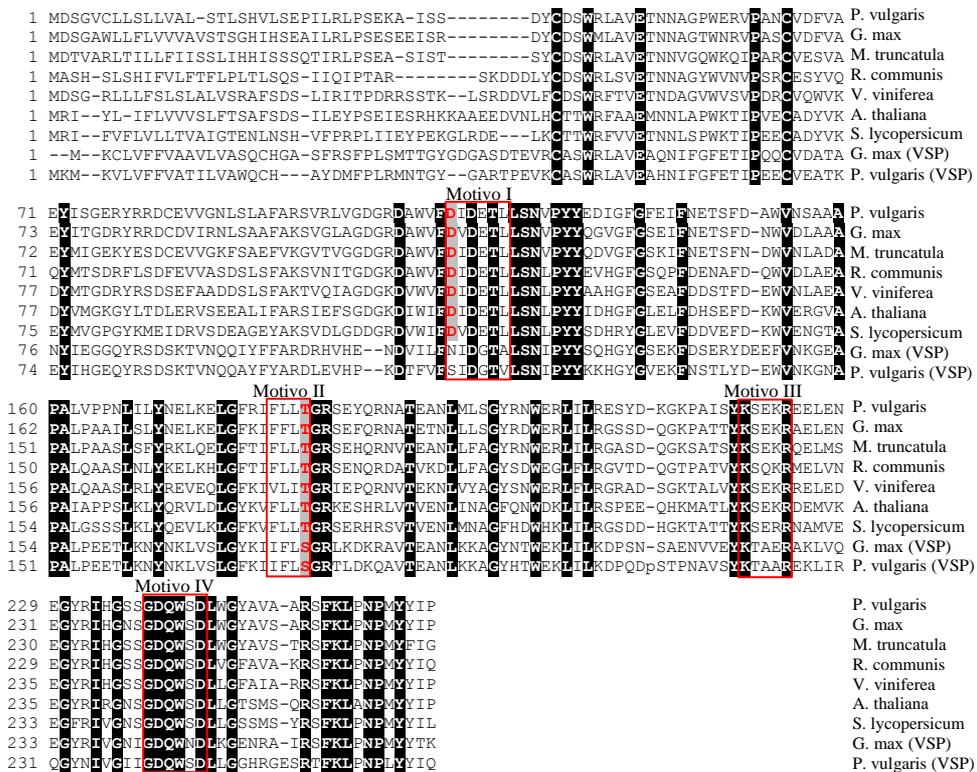
los cuatro motivos característicos de la superfamilia HAD (Burroughs et al., 2006).

		Motivo I													
101-	A W V F	D	I	D	E	T	L	L	S	N	V	P	Y	Y	<i>Phaseolus vulgaris</i>
39-	A V G F	D	I	D	D	T	V	L	F	S	S	P	G	F	<i>Escherichia coli</i>
84-	Q I I T	D	F	D	M	T	L	S	R	F	S	Y	K	G	<i>Homo sapiens</i>
105-	V W I F	D	I	D	E	T	L	L	T	N	I	D	Y	K	<i>Arabidopsis thaliana</i>
		Motivo II													
152-	N E L K E L G F R I	F	L	L	T	-	-	G	R	<i>Phaseolus vulgaris</i>					
97-	D M H V R R G D A I	F	F	V	T	-	-	G	R	<i>Escherichia coli</i>					
190-	D K L Q Q H S I P V	F	I	F	S	A	G	I	G	<i>Homo sapiens</i>					
156-	N A L K K L G F T I	I	L	L	T	-	-	G	R	<i>Arabidopsis thaliana</i>					

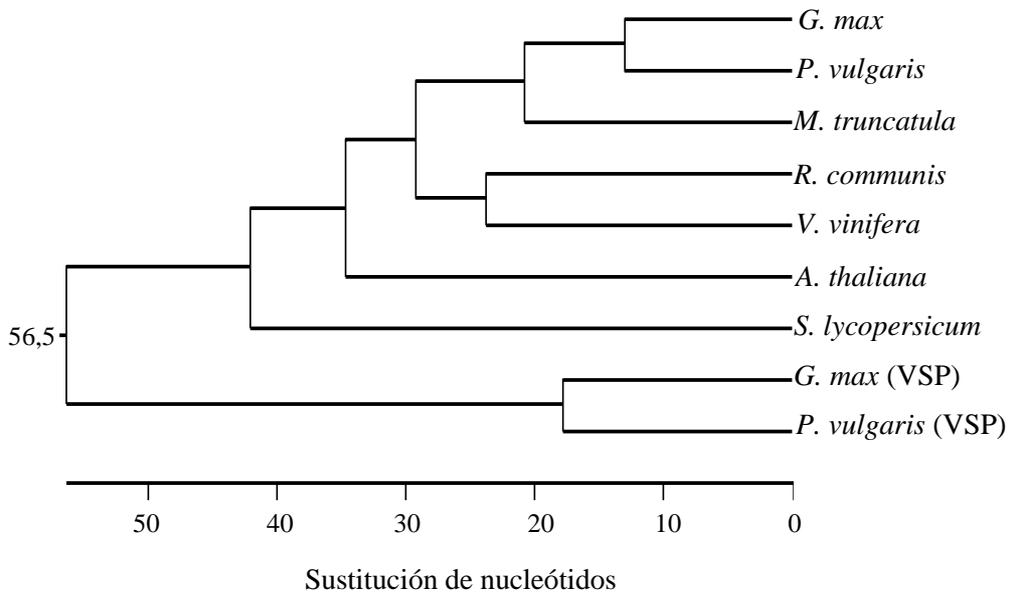
**Figura 20.- Comparación de los motivos I y II de la superfamilia HAD entre nucleotidasas de distintos organismos y la proteína purificada de *Phaseolus vulgaris*.** El alineamiento incluye las secuencias de judía (secuencia identificada por MALDITOF-TOF), la nucleotidasa citosólica de *Homo sapiens* (NP\_001159590.1), la fosfatasa de adenosina de *Escherichia coli* (GI:83754294) y la de *Arabidopsis thaliana* (NP\_194655.1).

En la Figura 21 se muestra el alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida para la nucleotidasa de judía con las secuencias con mayor homología obtenidas a partir de la base de datos GENBANK mediante búsqueda utilizando la técnica BLAST. Las secuencias con mayor homología identificadas correspondieron a proteínas de plantas con función fosfatasa ácida y proteínas vegetales de reserva (VSP). La comparación de la secuencia aminoacídica de la proteína de *Phaseolus vulgaris* puso de manifiesto la menor distancia filogenética con la secuencia de *Glycine max*, con la que presentó un 78,1 % de identidad (Figura 22). En la Tabla 9 se muestra la identidad en porcentajes, poniéndose de relieve la similitud existente entre la proteína de *Phaseolus* y el resto de plantas: un 51,2 % con *Arabidopsis* (cruciferae),

un 59,9 % con *Ricinus communis* (euphorbiaceae) y un 59,2 % con *Vitis vinifera* (vitaceae).



**Figura 21.- Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida para la nucleotidasa de judía con las de varias proteínas de plantas. El alineamiento se realizó por el método Clustal W2 del programa EMBL-EBI. Los aminoácidos conservados en todas las secuencias se muestran en fondo negro. Los rectángulos rojos engloban los motivos característicos, M(I), M(II), M(III) y M(IV) de la superfamilia HAD (Burroughs et al., 2006). Las letras en caracteres rojos identifican los residuos relacionados con el centro activo. El alineamiento incluye las secuencias de judía (secuencia identificada por MALDITOF-TOF), *Vitis vinifera* (XP\_002283385.1), *Ricinus communis* (XP\_002514195.1), *Arabidopsis thaliana* (NP\_194655.1), *Solanum lycopersicum* (NP\_001234071.1) *Glycine max* (XP\_003529064.1), *Medicago truncatula* (XP\_003620757.1) y las proteínas de reserva vegetal (VSP) de *Phaseolus vulgaris* (BAA23563.1) y de *Glycine max* (NP\_001238459.1).**



**Figura 22.- Distancias filogenéticas entre varias de las proteínas homólogas. Cladograma construido con el alineamiento múltiple de la Figura 20.**

**Tabla 9. Grado de identidad y divergencia a nivel proteico entre varias de las proteínas homólogas a la de *P. vulgaris* en estudio. Las secuencias analizadas son las mismas que las indicadas en la Figura 20.**

### Porcentaje de identidad

	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Divergencia	1		40,7	42,3	78,1	54,0	49,8	69,0	60,9	59,4	<i>G. max</i>
	2	109		71,6	44,3	39,0	39,9	41,2	35,2	39,1	<i>G. max</i> (VSP)
	3	103	35		43,1	40,6	39,2	40,5	37,5	40,2	<i>P. vulgaris</i> (VSP)
	4	26	96	100		51,2	48,6	66,9	59,9	59,2	<i>P. vulgaris</i>
	5	69	115	109	76		47,8	53,8	56,2	54,2	<i>A. thaliana</i>
	6	80	118	114	83	85		48,4	46,4	51,0	<i>S. lycopersicum</i>
	7	39	107	109	43	70	84		59,1	57,2	<i>M. truncatula</i>
	8	54	131	121	56	64	90	58		64,5	<i>R. communis</i>
	9	57	114	110	58	69	77	62	47		<i>V. vinifera</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		

### **CAPÍTULO III**

#### **3. PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD FOSFATASA INESPECÍFICA INDUCIDA DURANTE EL DESARROLLO POSTGERMINATIVO DE JUDÍA**

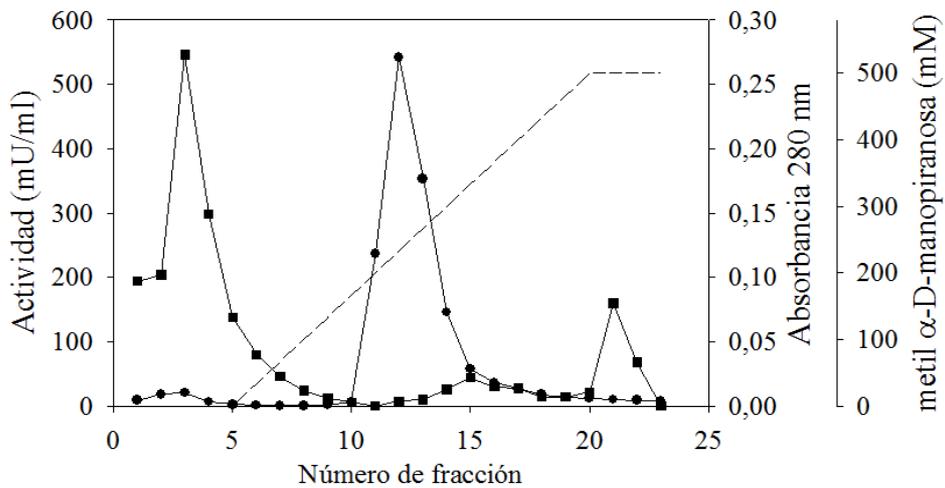


### 3.1. Purificación de la actividad fosfatasa sensible a molibdato de ejes embrionarios de judía

El primer pico de actividad fosfatasa sensible al molibdato identificado en la cromatografía de intercambio iónico (Figura 11, página 82), y que correspondía a una proteína de masa molecular aproximada de 100 kDa, se purificó hasta homogeneidad electroforética mediante el procedimiento resumido en la Tabla 10. La cromatografía de afinidad con concanavalina-A (Figura 23) fue el paso más efectivo en el proceso de purificación con un factor de 53,8. La mayor parte de la proteína presente en la preparación no se retuvo en la columna y la actividad fosfatasa eluyó a una concentración de 200 mM de metil  $\alpha$ -D-manopiranosido. Como último paso de purificación se realizó una cromatografía de interacción hidrofóbica en Phenyl Sepharose, paso que no mejoró el factor de purificación pero que fue necesario para eliminar proteínas contaminantes presentes tras la cromatografía en concanavalina A. El proceso total tiene un factor de purificación de 620 y resultó una preparación con una actividad fosfatasa específica de 192 U/mg.

**Tabla 10.- Purificación de la fosfatasa sensible a molibdato de ejes embrionarios de *Phaseolus vulgaris*. El extracto crudo se obtuvo a partir de 37 gramos de ejes embrionarios de plántulas de siete días después de la imbibición (ver Materiales y métodos para más detalles). La actividad se determinó con p-NPP 5 mM como sustrato.**

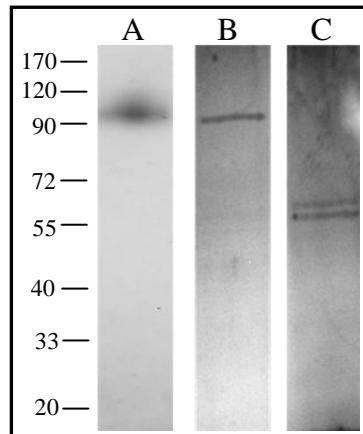
	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de Purificación
Extracto crudo	207,93	670,70	0,31	100	1
DEAE	174,22	49,15	3,54	83,78	11,43
Concanavalina-A	25,34	0,13	190,08	12,18	613,10
Phenyl Sepharose	16,15	0,08	192,22	7,76	620,12



**Figura 23.- Cromatografía de afinidad en concanavalina-A.** La preparación procedente de la cromatografía en DEAE-Sephacel se cargó en una columna de afinidad a concanavalina-A. La cromatografía se desarrolló a un flujo de 1ml/min y se recogieron fracciones de 2 ml. Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de metil  $\alpha$ -D-manopiranosido 0-0,5 M (representado por la línea discontinua) y en cada fracción se analizó el contenido en proteínas (cuadrados) y la actividad fosfatasa con *p*-NPP como sustrato en ausencia de molibdato (círculos).

### 3.2. Caracterización de la actividad fosfatasa sensible a molibdato de ejes de judía

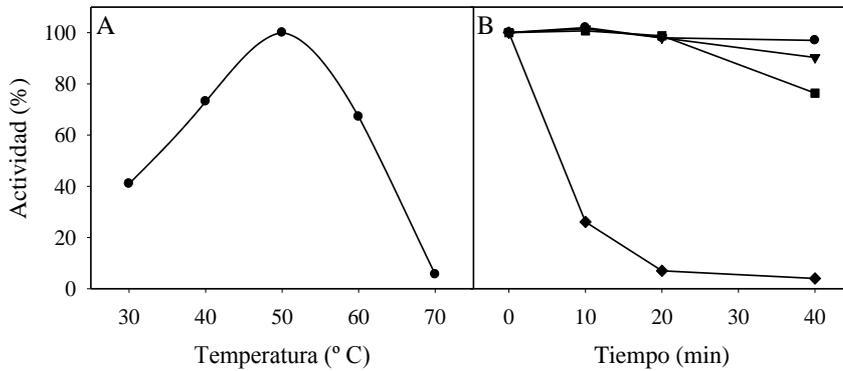
La proteína purificada se analizó mediante electroforesis en SDS en ausencia de calor y de agentes reductores, obteniéndose una única banda que corresponde a una proteína con una masa molecular de 104 kDa (Figura 24 B) y que mostró actividad fosfatasa en gel (Figura 24 A). Cuando la electroforesis en SDS-PAGE se llevó a cabo tras tratar la proteína purificada con agentes reductores y calor, aparecieron dos bandas que corresponderían a proteínas con masas moleculares de 57,5 y 52,5 kDa (Figura 24 C). Lo que indica que la proteína es un heterodímero.



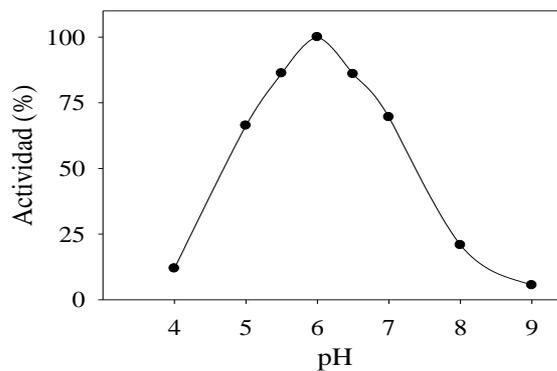
**Figura 24.-Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fosfatasa sensible a molibdato purificada de *P. vulgaris*.** La preparación enzimática obtenida se mezcló con tampón de carga con SDS en ausencia de agentes reductores y calor y se sometió a SDS-PAGE en gel al 10 % de acrilamida. Después de la electroforesis, uno de los carriles se usó para determinar la actividad fosfatasa en gel con *p*-NPP como sustrato (A) y otro se sometió a tinción de plata (B). Una parte alícuota de la preparación se mezcló con tampón de carga con SDS y DDT, se hirvió la mezcla durante 5 min, y se sometió a SDS-PAGE. Después de la electroforesis el gel se tiñó con plata (C). Las posiciones de los marcadores de peso molecular se muestran en la parte izquierda de la figura.

La reacción enzimática con *p*-NPP como sustrato mostró una temperatura óptima *in-vitro* de 50 °C (Figura 25 A), calculándose un valor de energía de activación de 48,3 kJ mol<sup>-1</sup> y un Q<sub>10</sub> (incremento en la velocidad de la reacción por aumento de la temperatura en 10° C) entre 40 y 50 °C de 1,78. La enzima mostró una elevada estabilidad térmica, ya que conservó casi toda su actividad tras ser incubada durante 20 min a 50 °C o 40 min a 40 °C (Figura 25 B). La enzima perdió casi toda su actividad fosfatasa tras incubación a temperaturas superiores a 60 °C.

La actividad fosfatasa mostró un pH óptimo de 6 (Figura 26). La actividad fue mínima cuando el ensayo se realizó a pH inferiores a 4 o superiores a 8 (Figura 26).



**Figura 25.- Efecto de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad de la fosfatasa sensible a molibdato purificada de *Phaseolus vulgaris*.** A) La actividad se determinó a las temperaturas indicadas. B) La preparación enzimática se sometió a tratamiento térmico a 30 (círculos), 40 (triángulos), 50 (cuadrados) y 60 °C (rombos) durante 10, 20 y 40 min. Seguidamente se ensayó la actividad en condiciones estándar.



**Figura 26.- Efecto del pH sobre la actividad fosfatasa sensible a molibdato de judía.** La actividad se determinó con *p*-NPP como sustrato en una mezcla de succinato-MES-*TES* (50 mM de cada uno) a los valores de pH indicados.

La actividad fosfatasa de la enzima purificada se ensayó utilizando varios compuestos fosforilados, todos a una concentración de 5 mM (Tabla 11). La mayor actividad se obtuvo con el sustrato artificial *p*-NPP y, a diferencia de la enzima de 55 kDa, presentó actividad significativa con una mayor diversidad de sustratos. En cambio, la enzima mostró valores bajos de actividad cuando se determinó con los nucleótidos como sustratos, tanto de purinas como de pirimidinas. La actividad

fosfatasa con fosfoenol-piruvato, pirofosfato inorgánico y tirosina-fosfato como sustratos fue muy similar a la obtenida con *p*-NPP (Tabla 11). Las características cinéticas se determinaron con los sustratos con los que se observó una mayor actividad (fosfoenol-piruvato, pirofosfato inorgánico y tirosina-fosfato) y se compararon con los valores obtenidos para algunos nucleótidos (Tabla 12). La mayor constante de afinidad se obtuvo para fosfoenol-piruvato y tirosina-fosfato. La enzima mostró cinéticas Michaelianas con todos los sustratos ensayados y en la Figura 27 se muestra el cálculo de  $K_m$  para los dos sustratos con las que la enzima mostró mayor afinidad.

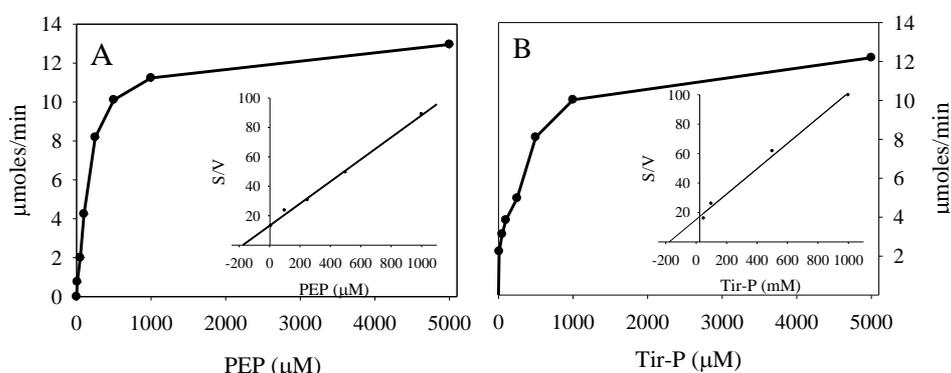
**Tabla 11.- Especificidad de sustrato de la actividad fosfatasa sensible a molibdato.** La actividad enzimática se determinó utilizando como sustrato los compuestos que se indican a una concentración final de 5 mM. Los datos están referidos al valor obtenido con *p*-NPP. Los datos son valores medios ( $\pm$  DE) de cuatro determinaciones independientes.

Sustrato	Actividad
<i>p</i> -NPP	100 $\pm$ 7
IMP	3 $\pm$ 1
GMP	12 $\pm$ 3
AMP	15 $\pm$ 5
UMP	14 $\pm$ 6
CMP	8 $\pm$ 3
Ppi	88 $\pm$ 5
Tirosina-P	80 $\pm$ 11
Fosfoenol piruvato	85 $\pm$ 3
Ácido fítico	8 $\pm$ 2
Glicerol-P	41 $\pm$ 3
ITP	40 $\pm$ 6
ATP	33 $\pm$ 11
ADP	58 $\pm$ 9
Naftil-P	56 $\pm$ 4
Glucosa 6-P	51 $\pm$ 12

La actividad fosfatasa purificada se inhibió fuertemente por la inclusión en la mezcla de ensayo de  $Zn^{2+}$  o  $Cu^{2+}$ , y se inhibió ligeramente por  $Mn^{2+}$  (Tabla 13). También se analizó el efecto de varios inhibidores de actividades fosfatasas (Tabla 13). La actividad se inhibió en presencia de molibdato, fluoruro, vanadato y fosfato inorgánico y sólo mostró resistencia al tartrato. La inclusión de nucleósidos en la mezcla de reacción no afectó a la actividad fosfatasa de la proteína purificada ensayada con *p*-NPP como sustrato.

**Tabla 12.- Propiedades cinéticas de la actividad fosfatasa sensible a molibdato.** La actividad se ensayó con concentraciones crecientes de los sustratos. Los valores de  $K_m$  se calcularon de acuerdo con la representación de Hanes-Woolf.

	$K_m$ ( $\mu M$ )	$K_{cat}$ ( $min^{-1}$ )	$K_{cat}/K_m$ ( $\mu M^{-1} \cdot min^{-1}$ )
PEP	180	17820	99
Tir-P	190	16720	88
Ppi	420	19470	46
AMP	510	2860	6
IMP	490	2090	4



**Figura 27.- Determinación gráfica de la  $K_m$  y  $V_{max}$  de la actividad fosfatasa.** Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  se calcularon a partir de la representación gráfica de Hanes-Woolf. La actividad fue medida utilizando la misma cantidad de enzima a distintas concentraciones de PEP(A) y Tir-P (B). Los datos son la media de 3 determinaciones y la desviación estándar fue menor del 10 %.

**Tabla 13.- Efecto de varios compuestos sobre la actividad fosfatasa sensible a molibdato de judía.** La actividad enzimática se ensayó en presencia de los compuestos indicados a una concentración de 1 mM. El valor de actividad en ausencia de compuestos fue tomado como el 100 % (Control). Los datos son la media  $\pm$  DE de cuatro determinaciones independientes.

	Actividad (%)
Control	100 $\pm$ 2
Mg <sup>2+</sup>	91 $\pm$ 14
Mn <sup>2+</sup>	71 $\pm$ 11
Ca <sup>2+</sup>	108 $\pm$ 6
Zn <sup>2+</sup>	15 $\pm$ 5
Cu <sup>2+</sup>	0 $\pm$ 0
Molibdato	1 $\pm$ 0
Fluoruro	2 $\pm$ 1
Tartrato	98 $\pm$ 6
Vanadato	10 $\pm$ 4
Pi 1 mM	85 $\pm$ 7
Adenosina	99 $\pm$ 1
Inosina	97 $\pm$ 2
Guanosina	99 $\pm$ 2

### 3.3. Identificación de la proteína con actividad fosfatasa ácida mediante MALDI-TOF

La proteína purificada se sometió a electroforesis en condiciones reductoras y, tras teñir el gel con azul de coomassie, las bandas se recortaron del gel y se sometieron a una identificación combinada en la que se tuvieron en cuenta las masas de todos los péptidos generados en la digestión con tripsina (*fingerprint* o huella peptídica) y los espectros de masas obtenidos mediante la fragmentación de algunos de estos péptidos (identificación *tandem MS*), tal como se indica en el apartado 15 de materiales y métodos. A continuación, se realizó una búsqueda en

la base de datos NCBIInr empleando MASCOT, lo que permitió identificar varias fosfatasa ácidas y púrpuras ácidas de distintas especies vegetales con una puntuación superior al de significación (valor de 71 con  $p < 0,05$ ) (Tabla 14). La máxima puntuación se obtuvo para una fosfatasa ácida de *Phaseolus vulgaris* (Tabla 14). De los péptidos obtenidos tras la digestión de la proteína con tripsina y determinados por MALDI-TOF, cinco se ajustaron en sus masas a los descritos para la fosfatasa ácida de judía, cubriendo con ellos un 30 % de la secuencia. De esos diez péptidos, cinco fueron analizados por MS/MS. Como se observa en la Tabla 15, cuatro de éstos presentaron una puntuación de ion superior al valor de significación o de referencia, que fue de 43 ( $p < 0.05$ ), lo que indica identidad o alta homología. Estos péptidos permitieron identificar en *P. vulgaris* una proteína con actividad fosfatasa ácida (BAD05166.1) cuya secuencia se muestra en la Figura 28.

**Tabla 14.- Resultados del análisis de la identificación mediante huella peptídica. Los fragmentos obtenidos tras la digestión con tripsina se utilizaron para realizar un búsqueda en la base de datos utilizando el motor MASCOT como se indica en Materiales y Métodos**

Nombre	Especie	Masa (kDa)	Puntuación*	Nº de péptidos	Nº de acceso
AP	<i>Phaseolus vulgaris</i>	52,94	605	5	<u>40217506</u>
PAP	<i>Glycine max</i>	59,69	392	2	<u>224142549</u>
AP	<i>Lupinus luteus</i>	55,05	324	1	<u>51477379</u>
PAP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	55,03	251	1	<u>226455744</u>

\* El término puntuación de la proteína se define como  $-10 \cdot \log(P)$ , siendo  $P$  la probabilidad de que la equivalencia establecida entre la proteína problema y la obtenida de la base de datos sea un evento aleatorio.

**Tabla 15. Resultado del análisis MS/MS de los péptidos identificados por MALDI-TOF.** Los espectros de fragmentación (MS/MS) y los datos obtenidos se analizaron a través del motor de búsqueda MASCOT.

Péptido	Peso observado	Peso calculado	Valor de referencia*	Puntuación ion
WDTWGR	820.38	819.37	43	35
THAIYHWR	1197,60	1196,58	43	75
FLDPQPEYSAFR	1469,72	1468,7	43	78
SAPVYITVGDGGNQEGLASK	1962,98	1961,97	43	120
GYNAPQQVHITQGDYDGK	1990,93	1989,92	43	151

\*El término Valor de referencia es el valor a partir del cual la secuencia obtenida se puede considerar idéntica (I).

1- M E R R V Q T M L L K F V L A S F V L L V S I R D G S  
28- A G I T S S F I R S E W P A V D I P L D H E A F A V P  
55- K G Y N A P Q Q V H I T Q G D Y D G K A V I I S W V T  
82- P D E P G P N H V Q Y G T S E S K F Q T S L E G T V T  
109- N Y T F Y E Y K S G Y I H H C V I E G L E Y K T K Y Y  
136- Y R I G S G D S S R E F W F E T P P K V D P D A S Y K  
163- F G I I G D L G Q T F N S L S T L E H Y I Q S G A E T  
190- V L F V G D L C Y A D R Y E Y N D V G L R W D T W G R  
217- F V E R S T A Y H P W I W A A G N H E I D Y M P Y M G  
244- E V V P F K N F L Y R Y T T P Y L A S N S S N P L W Y  
271- A V R R A S A H I I V L S S Y S P F V K Y T P Q Y M W  
298- L Q E E L K R V D R E K T P W L I V L M H V P L Y N S  
325- N G A H Y M E G E S M R S V F E S W F I K Y K V D V I  
352- F A G H V H A Y E R S Y R F S N I D Y N I T N G N R Y  
379- P L P D K S A P V Y I T V G D G G N Q E G L A S K F L  
406- D P Q P E Y S A F R E A S Y G H S T L E I K N R T H A  
433- I Y H W N R N D D G K K V P T D S F V L H N Q Y W

**Figura 28.- Localización de los péptidos identificados por MALDI-TOF y MS/MS en la secuencia aminoacídica identificada.** Las secuencias de color azul corresponden con los péptidos obtenidos tras la digestión con tripsina determinados por MALDI-TOF y en color rojo se identifican los péptidos obtenidos mediante MS/MS.

En el análisis con el programa Conserved Domain Database and Search Service (v2.16) se identificaron varios dominios conservados pertenecientes a la superfamilia de las metalofosfatasa. Las enzimas de esta superfamilia se caracterizan por presentar un sitio activo que consta de dos iones metálicos (por lo general  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ ) coordinados con geometría octaédrica con residuos de histidina, aspartato y asparragina. En la Figura 29 se muestra el patrón específico de siete aminoácidos involucrados en la unión con los iones metálicos (**DXG/GDXXY/GNH(D/E)/VXXH/GHXXH**), donde las letras en negrita representan los aminoácidos coordinados con los iones metálicos. Estos siete aminoácidos junto con la histidina del tercer motivo conservado constituyen el centro activo de la enzima.

La secuencia de aminoácidos deducida de la enzima se analizó usando el programa Signal P 4.0 con los algoritmos de la herramienta TargetP 1.1. Los resultados predicen la presencia de un péptido señal en la región N-terminal, con un probable sitio de rotura entre los aminoácidos de las posiciones 28 y 29 (Ala y Gly) (Figura 29). Con este mismo programa, pero utilizando la herramienta NetNGlyc 1.0, se identificaron dos sitios de N-glicosidación localizadas en las posiciones 263 (NSSN) y 371 (NITN). En la Figura 30 se muestra el alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína de judía (BAD05166.1) con otras fosfatasa ácidas de plantas disponibles actualmente en la base de datos GENBANK y que han sido identificadas mediante la técnica BLAST. Las secuencias presentan un gran número de aminoácidos conservados en donde se pueden localizar los dominios para las metalofosfatasa descritos anteriormente. La secuencia de aminoácidos de la fosfatasa ácida de judía presentó un alto grado de identidad con varias fosfatasa ácidas y fosfatasa ácidas purpuras identificadas en plantas. El porcentaje de identidad no bajó del 70% en las especies de plantas

estudiadas, obteniéndose la menor distancia filogenética (Figura 31) y la mayor homología (91,7 % de identidad) con la fosfatasa ácida púrpura de soja (NP\_001236677.1) (Tabla 16).

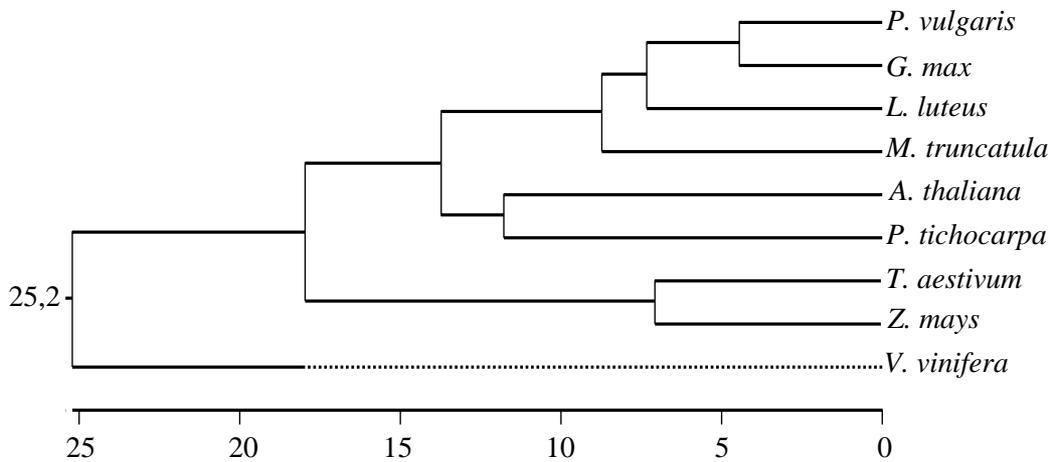
```

1-  M E R R V Q T M L L K F V L A S F V L L V S I R D G S
28-  A G I T S S F I R S E W P A V D I P L D H E A F A V P
55-  K G Y N A P Q Q V H I T Q G D Y D G K A V I I S W V T
82-  P D E P G P N H V Q Y G T S E S K F Q T S L E G T V T
109- N Y T F Y E Y K S G Y I H H C V I E G L E Y K T K Y Y
136- Y R I G S G D S S R E F W F E T P P K V D P D A S Y K
163- F G I I G D L G Q T F N S L S T L E H Y I Q S G A E T
190- V L F V G D L C Y A D R Y E Y N D V G L R W D T W G R
217- F V E R S T A Y H P W I W A A G N H E I D Y M P Y M G
244- E V V P F K N F L Y R Y T T P Y L A S N S S N P L W Y
271- A V R R A S A H I I V L S S Y S P F V K Y T P Q Y M W
298- L Q E E L K R V D R E K T P W L I V L M H V P L Y N S
325- N G A H Y M E G E S M R S V F E S W F I K Y K V D V I
352- F A G H V H A Y E R S Y R F S N I D Y N I T N G N R Y
379- P L P D K S A P V Y I T V G D G G N Q E G L A S K F L
406- D P Q P E Y S A F R E A S Y G H S T L E I K N R T H A
433- I Y H W N R N D D G K K V P T D S F V L H N Q Y W

```

**Figura 29.- Análisis de la secuencia de aminoácidos de la fosfatasa ácida identificada en ejes de judía.** La secuencia de color azul corresponde con el posible péptido señal. En color rojo se indica el motivo de unión a metales, estando sombreados los siete aminoácidos coordinados con los iones metálicos. Las dos posibles secuencias de glicosilación se muestran en color verde.





**Figura 31.- Distancias filogenéticas entre varias proteínas homólogas.** El cladograma ha sido construido con las secuencias del alineamiento múltiple de la Figura 29.

**Tabla 16.- Grado de identidad y divergencia a nivel proteico entre varias de las proteínas homólogas a P. vulgaris en estudio.** Las secuencias de las proteínas analizadas son las mismas que las indicadas en la Figura 29.

**Porcentaje de identidad**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
<b>Divergencia</b>	1		91,7	87,2	85,1	77,9	79,2	73,9	74,1	78,3	<i>P. vulgaris</i>
	2	9		86,3	85,2	74,2	78,7	71,2	71,8	76,7	<i>G. max</i>
	3	14	15		83,8	74,2	77,1	70,4	71,8	77,7	<i>L. luteus</i>
	4	16	16	18		72,8	76,5	70,2	71,2	76,2	<i>M.truncatula</i>
	5	26	31	32	33		75,7	72,6	71,7	76,6	<i>V. vinifera</i>
	6	24	25	27	28	29		70,6	72,0	79,8	<i>A. thaliana</i>
	7	32	36	37	38	34	37		87,2	72,4	<i>T. aestivum</i>
	8	31	35	35	36	35	35	14		72,5	<i>Z. mays</i>
	9	25	28	26	29	28	23	34	34		<i>P. trichocarpa</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		



## **CAPÍTULO IV**

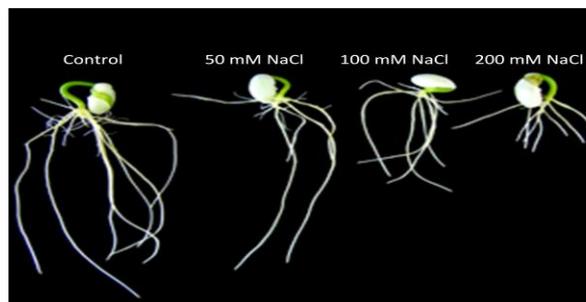
### **4. ACTIVIDADES FOSFATASAS Y CONTENIDO EN UREIDOS EN PLÁNTULAS DE JUDÍA SOMETIDAS A CONDICIONES ADVERSAS**



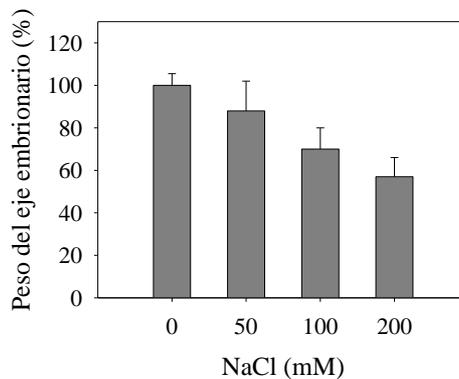
#### 4.1. Efecto de la salinidad sobre las actividades fosfatasas y el contenido de ureidos durante la germinación y el desarrollo postgerminativo de judía

En primer lugar, se analizó el efecto del cloruro sódico en el medio de imbibición durante la germinación y desarrollo postgerminativo de judía. La presencia de sal, hasta concentraciones de 200 mM, en el medio de imbibición no retrasó la aparición de la radícula ni afectó la tasa de germinación, pero el desarrollo postgerminativo se redujo en función de la concentración de sal a concentraciones a partir de 50 mM (Figura 32).

A

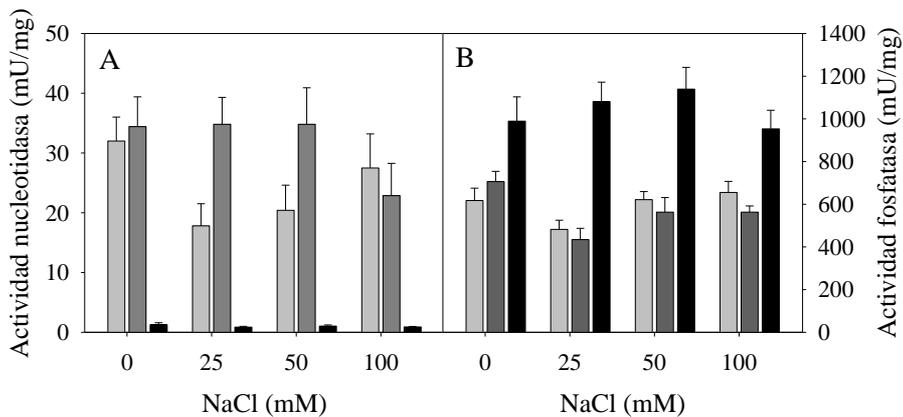


B



**Figura 32.- Efecto de NaCl en el desarrollo postgerminativo de judía.** Plántulas de judía se desarrollaron en presencia de las concentraciones de NaCl indicadas desde el inicio de la imbibición. A los 7 días de desarrollo se fotografiaron (A) y se determinó el peso fresco de los ejes embrionarios (B).

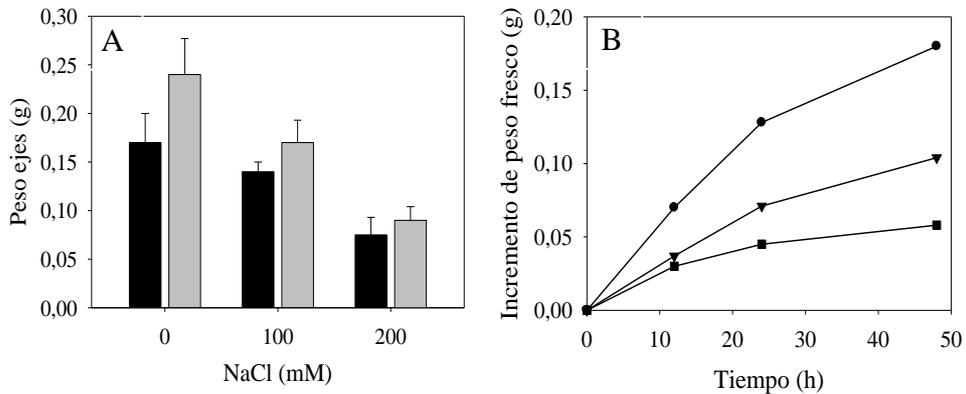
La actividad nucleotidasa específica fue inferior en las raíces de plántulas desarrolladas en presencia de sal; pero, curiosamente, la actividad específica fue menor cuando se utilizó una concentración de sal a la que no se afectaba el desarrollo (25 y 50 mM; Figura 33 A). Esta actividad nucleotidasa no se afectó en las partes aéreas de las plántulas hasta concentraciones de 50 mM mientras que descendió a concentraciones superiores a ésta (Figura 33 A). La actividad fosfatasa sensible a molibdato apenas varió en las raíces con excepción de las plántulas desarrolladas con 25 mM de NaCl, que mostraron menos actividad. En las partes aéreas de las plántulas tratadas, la actividad fosfatasa sensible a molibdato fue ligeramente inferior que en las plántulas sin tratar, y de nuevo la más baja se detectó con 25 mM de NaCl (Figura 33 B).



**Figura 33.- Actividades fosfatasas de plántulas de judía de 7 DDI desarrolladas en presencia de distintas concentraciones de NaCl.** Las actividades se determinaron en los extractos crudos obtenidos a partir de raíces (gris claro), parte aérea (gris oscuro) y cotiledones (negro). A) La actividad nucleotidasa se determinó usando IMP 5 mM como sustrato en presencia de molibdato 5 mM. B) La actividad fosfatasa se determinó usando p-NPP como sustrato en ausencia de molibdato. Los valores mostrados son la media de tres experimentos con su correspondiente valor de DE.

Por otra parte, la adición de altas concentraciones de sal (100 y 200 mM) a plántulas de 4 días provocó una fuerte ralentización en el desarrollo,

observándose una relación entre la concentración de sal y el peso fresco de los ejes en desarrollo (Figura 34 A). Así, el incremento en el peso fresco disminuyó tras 24 h de la adición de sal en un 45 y 65 % con 100 y 200 mM de sal, respectivamente (Figura 34 B).



**Figura 34.- Efecto de NaCl en el crecimiento de plántulas de judía.** A) Peso fresco de los ejes embrionarios a los 5 (barras negras) y 6 días (barras grises) de plántulas desarrolladas en presencia de NaCl 0, 100 y 200 mM. B) Plántulas de 4 días de desarrollo se expusieron a 0 (círculos), 100 (triángulos) o 200 mM (cuadrados) de NaCl durante el tiempo indicado. Se determinó el incremento en el peso fresco de los ejes con respecto al peso inicial.

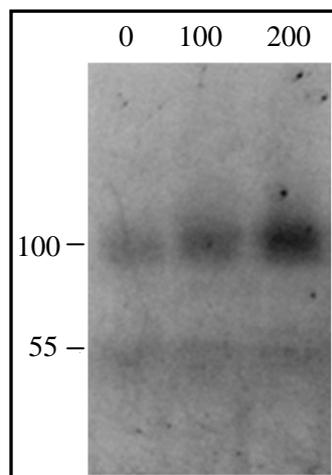
Las actividades fosfatasa se analizaron en plántulas de judía tratadas con estas concentraciones de sal durante 24 h. En los cotiledones, las actividades fosfatasa no variaron con respecto a las plántulas no tratadas cuando el ensayo se realizó tanto en presencia (nucleotidasa) como en ausencia de molibdato (Tabla 17). Sin embargo, en los ejes embrionarios, la actividad fosfatasa determinada en ausencia de molibdato incrementó con el tratamiento salino mientras que la actividad fosfatasa resistente a molibdato (nucleotidasa) no varió (Tabla 17).

Con el objeto de determinar las actividades fosfatasa inducidas por el tratamiento salino se realizó un ensayo de actividad fosfatasa en gel utilizando los extractos de ejes en desarrollo (Figura 35). El tratamiento

con sal indujo la actividad de la fosfatasa ácida de masa molecular de 100 kDa mientras que la actividad fosfatasa resistente a molibdato de 55 kDa (nucleotidasa) no cambió (Figura 35). El tratamiento de las plántulas con sal no provocó la aparición de nuevas actividades enzimáticas en el ensayo en gel.

**Tabla 17.- Actividades fosfatasas en cotiledones y ejes de judía en desarrollo tratadas con NaCl.** Plántulas de 4 días de desarrollo se trataron con NaCl durante 24 horas. Entonces las plántulas se separaron en cotiledones y ejes y en los extractos crudos se determinaron la actividad fosfatasa sensible y la resistente a molibdato (nucleotidasa). Los valores de actividad son la media  $\pm$  DE de 5 determinaciones y se expresan en mU/mg proteína.

NaCl (mM)	Cotiledones		Ejes	
	Nucleotidasa	Fosfatasa	Nucleotidasa	Fosfatasa
0	2,1 $\pm$ 0,1	813 $\pm$ 30	23 $\pm$ 3	556 $\pm$ 41
100	1,5 $\pm$ 0,1	892 $\pm$ 100	26 $\pm$ 3	836 $\pm$ 88
200	1,9 $\pm$ 0,1	874 $\pm$ 14	26 $\pm$ 4	1007 $\pm$ 76



**Figura 35.- Actividades fosfatasas en gel en ejes de judía de 5 DDI bajo condiciones de estrés salino.** La actividad fosfatasa en gel se determinó en los extractos crudos de los ejes en desarrollo indicados en la tabla 17. En cada pocillo del gel se cargó la misma cantidad de proteína y el ensayo se realizó con IMP como sustrato y en ausencia de molibdato.

En estas mismas muestras se determinó el contenido en fosfato inorgánico, y no se encontraron diferencias entre las plántulas control y las sometidas a estrés salino (Tabla 18).

**Tabla 18. Concentración de fosfato inorgánico en plántulas de 5 días de desarrollo tratadas durante 24 horas con NaCl.** La concentración de fosfato inorgánico se determinó en los extractos crudos utilizados en la Tabla 17. Los valores corresponden a  $\mu\text{moles/mg} \pm \text{DE}$  de 5 determinaciones.

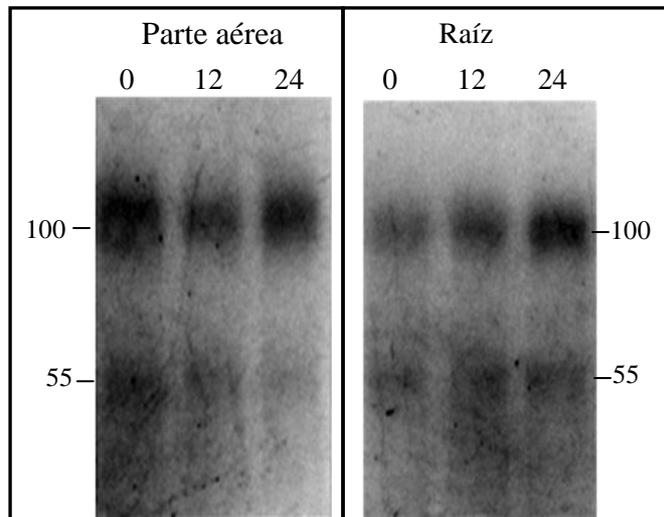
Tejido	NaCl (mM)		
	0	100	200
Ejes	$0,63 \pm 0,04$	$0,61 \pm 0,09$	$0,61 \pm 0,02$
Cotiledones	$0,36 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,02$

El análisis de las actividades fosfatasa en los ejes en desarrollo separados en raíz y parte aérea reveló un incremento de ambas actividades en las raíces de las plántulas tratadas, permaneciendo la actividad en la parte aérea sin grandes diferencias con respecto al control (Tabla 19).

**Tabla 19.- Actividades fosfatasa en raíces y parte aérea de plántulas en desarrollo tratadas con NaCl.** Plántulas de 6 días de desarrollo se trataron con NaCl 200 mM durante 12 ó 24 horas. Entonces las plántulas se separaron en raíces y parte aérea y en los extractos crudos se determinaron la actividad fosfatasa sensible y la actividad resistente a molibdato (nucleotidasa). Los valores de actividad son la media  $\pm \text{DE}$  de 5 determinaciones y se expresan en  $\text{mU/mg proteína}$ .

Tiempo (h)	Parte aérea		Raíz	
	Nucleotidasa	Fosfatasa	Nucleotidasa	Fosfatasa
0	$43,4 \pm 5,4$	$1016 \pm 45$	$37,2 \pm 3,4$	$608 \pm 30$
12	$47,8 \pm 4,8$	$1022 \pm 37$	$38,2 \pm 5,4$	$1020 \pm 40$
24	$42,2 \pm 5,7$	$920 \pm 24$	$62,0 \pm 4,2$	$1116 \pm 56$

En el ensayo de las actividades fosfatasas en gel se observó la inducción de la actividad fosfatasa de 100 kDa y de la actividad nucleotidasa de 55 kDa en las raíces de las plántulas sometidas a condiciones de estrés salino, mientras que la parte aérea permaneció sin cambios (Figura 36).



**Figura 36.- Actividades fosfatasas en gel en partes aéreas y raíces de plántulas de judía de 7 DDI bajo condiciones de estrés salino.** La actividad fosfatasa en gel se analizó en los mismos extractos crudos de la Tabla 19. En cada pocillo se cargó la misma cantidad de proteína y el ensayo se realizó con IMP como sustrato en ausencia de molibdato.

Las actividades fosfatasas también se indujeron en tratamientos cortos con elevadas concentraciones de NaCl (Tabla 20). Así, en raíces de plántulas de judía tratadas con NaCl 500 mM durante 3 h se observó un aumento en la actividad nucleotidasa por mg de proteína superior al 30 % y de más de un 20 % en la actividad fosfatasa. El contenido en ureidos también aumentó en más de un 30 % (Tabla 20).

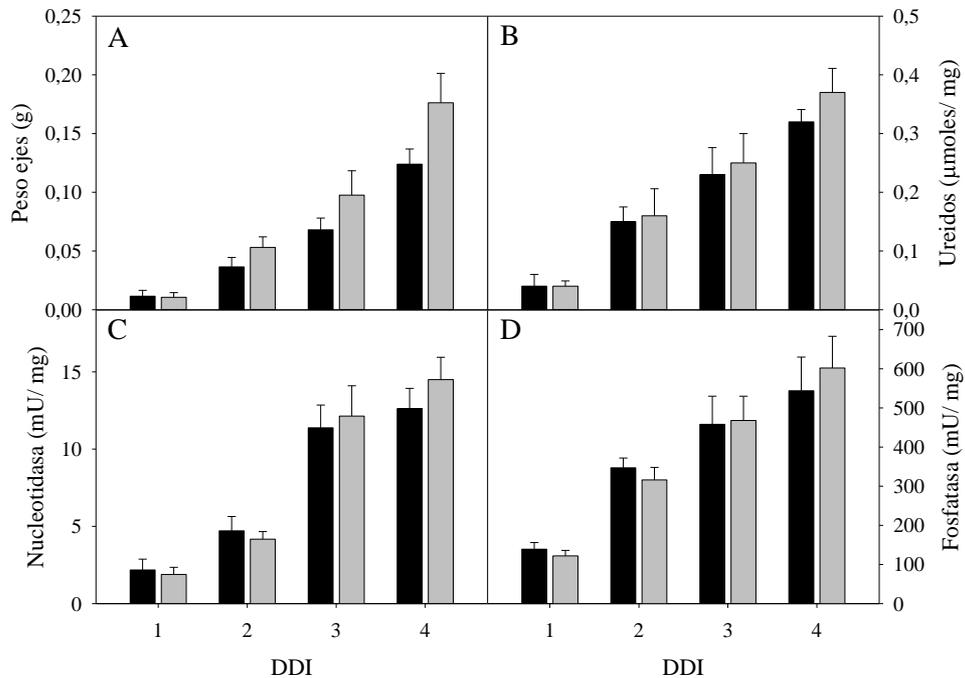
**Tabla 20.- Actividades fosfatasa y contenido de ureidos en raíces de plántulas de judía tratadas con NaCl 500 mM.** Plántulas de 5 días de desarrollo se trataron con NaCl 500 mM durante 1 y 3 h. En los extractos crudos de raíces se determinaron la actividad fosfatasa sensible y la actividad resistente a molibdato (nucleotidasa) y la concentración de ureidos. Los valores mostrados son la media  $\pm$  DE de tres determinaciones.

Tiempo (h)	Nucleotidasa (mU/mg)	Fosfatasa (mU/mg)	Ureidos ( $\mu$ moles/mg)
0	34 $\pm$ 2,1	426 $\pm$ 27	0,75 $\pm$ 0,05
1	36 $\pm$ 2,0	485 $\pm$ 35	0,85 $\pm$ 0,04
3	40 $\pm$ 3,5	520 $\pm$ 31	0,97 $\pm$ 0,07

#### **4.2. Efecto de la hemina sobre las actividades fosfatasa y el contenido de ureidos durante la germinación y el desarrollo postgerminativo de judía**

La hemina es un compuesto hemo que actúa como inductor de la enzima hemo-oxigenasa, cuya actividad participa en respuestas frente a estados de estrés oxidativo. Este compuesto se añadió al medio de imbibición de las semillas de judía durante las primeras 24 y 48 horas de imbibición a concentraciones finales de 1 y 10  $\mu$ M. La germinación no se afectó por este tratamiento mientras que si se observó un mayor desarrollo del eje embrionario. Este efecto sobre el desarrollo fue ligeramente superior con hemina 10  $\mu$ M e independiente del tiempo de incubación (24 o 48 horas), por lo que en los experimentos siguientes las semillas fueron tratadas con hemina 10  $\mu$ M durante 24 horas. El mayor desarrollo del eje embrionario se observó ya a las 48 horas tras el inicio de la imbibición, y a los 4 DDI el peso fresco de los ejes en desarrollo fue un 50% superior en las plántulas tratadas con hemina que en las plántulas sin tratar (Figura 37 A). El efecto del tratamiento con hemina fue particularmente notable en raíces, que presentaron un mayor desarrollo y también aumentó el número de raíces secundarias. El incremento en el desarrollo

de los ejes embrionarios en las plántulas tratadas no se relacionó con cambios significativos en el contenido de ureidos (Figura 37 B) ni en los valores de la actividad nucleotidasa (determinada en presencia de molibdato) (Figura 37 C) ni de la fosfatasa ácida (Figura 37 D).



**Figura 37.- Contenido de ureidos y actividades fosfatasa en ejes en desarrollo de judía tratadas con hemina.** Semillas de judía fueron pre-incubadas durante las primeras 24 h de imbibición con hemina 10  $\mu$ M. El contenido de ureidos y las actividades fosfatasa se analizaron en los extractos crudos de ejes desde el día 1 al 4 después de la imbibición (barras grises) y se compara con semillas no tratadas (barras negras).

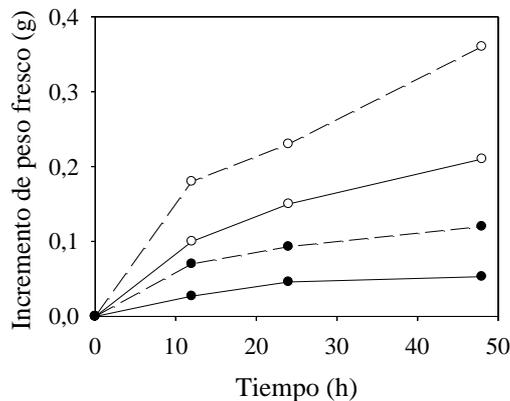
Puesto que el tratamiento de las semillas con hemina provocó mayor desarrollo de las raíces, se analizó el contenido de ureidos y las actividades fosfatasa en las raíces de plántulas pretratadas durante las primeras 24 h con hemina (Tabla 21). La concentración de ureidos en raíces de plántulas de 4 a 8 días fue superior en las raíces de las semillas tratadas con hemina (Tabla 21). La actividad fosfatasa resistente a molibdato (nucleotidasa) fue mucho mayor en las raíces de las plántulas

tratadas con hemina durante las primeras 24 h de imbibición (Tabla 21). Esta actividad permaneció con valor constante desde los 6 a los 8 días de desarrollo, mientras que en las raíces de plántulas no tratadas se observó un pico de actividad a los 6 días de desarrollo. La actividad fosfatasa sensible a molibdato también fue superior en las raíces de plántulas pretratadas, aunque ahora el porcentaje de inducción con respecto a la actividad de las raíces de plántulas no tratadas fue inferior y además en ambos casos se obtuvo un máximo de actividad en raíces de 6 días de desarrollo (Tabla 21).

**Tabla 21.- Actividades fosfatasas y contenido de ureidos en raíces de plántulas de judía tratadas con hemina.** Semillas de judía se incubaron durante las primeras 24 h de imbibición con hemina 10  $\mu\text{M}$  o sin tratamiento (control). Las actividades fosfatasas en presencia (nucleotidasa) y ausencia de molibdato así como el contenido de ureidos se determinaron en extractos crudos de raíces a los días después del inicio de la imbibición indicados. Los valores de actividad y de ureidos son la media  $\pm$  DE de 3 determinaciones y se expresan en mU/mg de proteína y  $\mu\text{moles/mg}$  de proteína respectivamente.

DDI	Nucleotidasa		Fosfatasa		Ureidos	
	Control	Hemina	Control	Hemina	Control	Hemina
4	14,6 $\pm$ 2,4	22,4 $\pm$ 3,5	553 $\pm$ 87	773 $\pm$ 54	0,41 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,08
6	37,0 $\pm$ 3,7	45,0 $\pm$ 2,9	693 $\pm$ 28	825 $\pm$ 49	0,71 $\pm$ 0,06	0,86 $\pm$ 0,04
8	26,2 $\pm$ 4,2	44,2 $\pm$ 3,6	462 $\pm$ 25	521 $\pm$ 31	0,65 $\pm$ 0,07	0,81 $\pm$ 0,07

El tratamiento con hemina en las semillas de judía podría preparar a las plántulas para enfrentarse a situaciones de estrés, ayudando a disminuir los daños causados durante estos periodos. Por esta razón se estudió el efecto del estrés salino en plántulas tratadas con hemina. Como se describió en el apartado anterior, las plántulas tratadas durante 24 h con NaCl 200 mM ralentizaron drásticamente su crecimiento (Figura 34). El tratamiento de las semillas con hemina 10  $\mu\text{M}$  redujo esa ralentización del desarrollo cuando se sometieron a estrés salino a los 4 días de desarrollo (Figura 38).



**Figura 38.- Incremento del eje embrionario en plántulas de judía tratadas con hemina y sometidas a estrés salino.** Semillas de judía se incubaron durante las primeras 24 h de imbibición con hemina 10 µM (líneas discontinuas) o sin tratamiento (líneas continuas). A los 4 días de desarrollo, ambos grupos de plántulas se repartieron en dos grupos a los que se les añadió agua (círculos vacíos) o NaCl 200 mM (círculos rellenos) a los medio de imbibición. El incremento de peso fresco de los ejes embrionarios con respecto al inicio del experimento se determinó para cada grupo de semillas.

La actividad fosfatasa resistente a molibdato (nucleotidasa) aumentó en las raíces de plántulas tanto tratadas con hemina como sometidas a estrés salino (Tabla 22). Esta actividad aumentó en los mismos niveles cuando las plántulas de judía se sometieron a ambos tratamientos conjuntamente. En contraposición, la actividad fosfatasa sensible a molibdato fue similar en las plantas tratadas con ambos compuestos a las no tratadas, mientras que ambos tratamientos por separado aumentaron sensiblemente esta actividad (Tabla 22). El contenido de ureidos en estas plántulas siguió el mismo patrón al descrito para la actividad nucleotidasa (Tabla 22).

**Tabla 22.- Actividades fosfatasas y contenido de ureidos en raíces de plántulas de judía incubadas con hemina 10  $\mu$ M y sometidas a estrés salino.** Semillas de judía se incubaron durante las primeras 24 h de imbibición con hemina 10  $\mu$ M o agua (control). A los 5 días de desarrollo, ambos grupos de plántulas se sometieron a estrés salino mediante la adición de NaCl 200 mM durante 24 h. Las actividades fosfatasas en presencia (nucleotidasa) y ausencia de molibdato así como el contenido de ureidos se determinaron en extractos crudos de raíces.

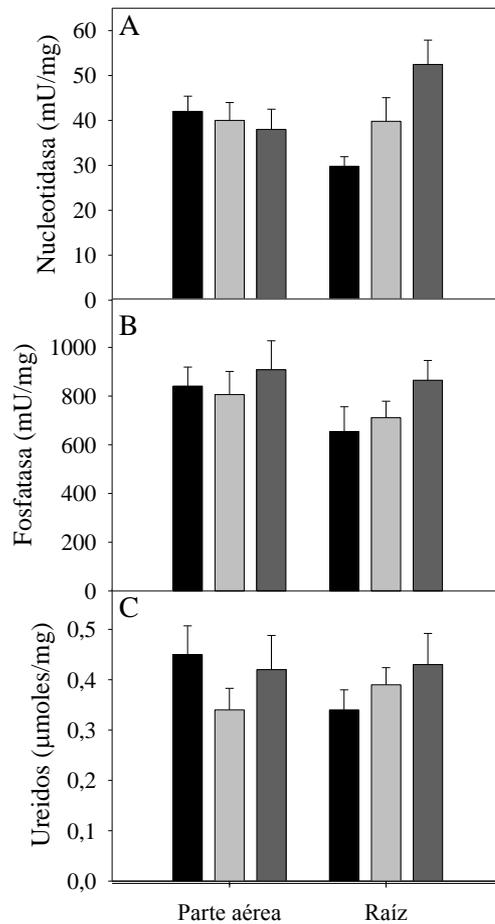
Tratamiento	Nucleotidasa (mU/mg)	Fosfatasa (mU/mg)	Ureidos ( $\mu$ moles/mg)
Control	18 $\pm$ 2,4	558 $\pm$ 24	0,65 $\pm$ 0,07
Hemina	26 $\pm$ 3,1	706 $\pm$ 19	0,72 $\pm$ 0,06
NaCl	29 $\pm$ 4,1	678 $\pm$ 27	0,70 $\pm$ 0,09
Hemina + NaCl	32 $\pm$ 3,5	555 $\pm$ 45	0,78 $\pm$ 0,07

#### 4.3. Efecto del estrés hídrico en las actividades fosfatasas y el contenido de ureidos durante el desarrollo postgerminativo de judía

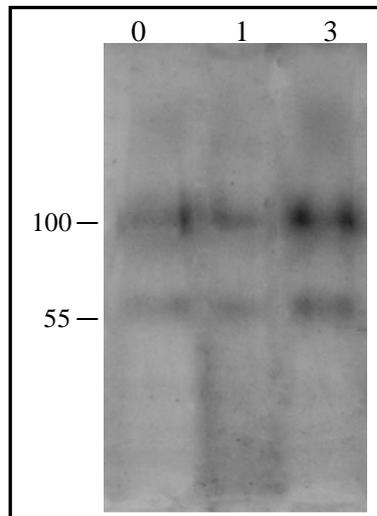
El déficit hídrico es otro de los factores críticos durante la germinación y el desarrollo postgerminativo temprano de plántulas. Las actividades fosfatasas se determinaron en plántulas de judía sometidas a déficit hídrico durante 3 h. En la parte aérea no se encontraron diferencias en la actividad nucleotidasa mientras que la actividad fosfatasa sensible a molibdato incrementó ligeramente (Figura 39). El comportamiento de estas actividades fue distinto en las raíces, donde ambas actividades fueron superiores en las plántulas sometidas a déficit hídrico, siendo el incremento superior en la actividad nucleotidasa (Figura 39). El efecto de la falta de agua sobre la concentración de ureidos en estos tejidos fue el mismo que sobre la actividad nucleotidasa, es decir, no varió en las partes aéreas mientras que incrementó en las raíces (Figura 39).

Las actividades fosfatasas en extractos de raíces se analizaron también mediante el sistema de ensayo en gel (Figura 40). Este ensayo reveló el aumento de la actividad fosfatasa de 100 kDa a partir de una hora de

tratamiento y de la actividad de 55 kDa, nucleotidasa resistente a molibdato, corroborando los datos obtenidos en el ensayo *in vitro*.



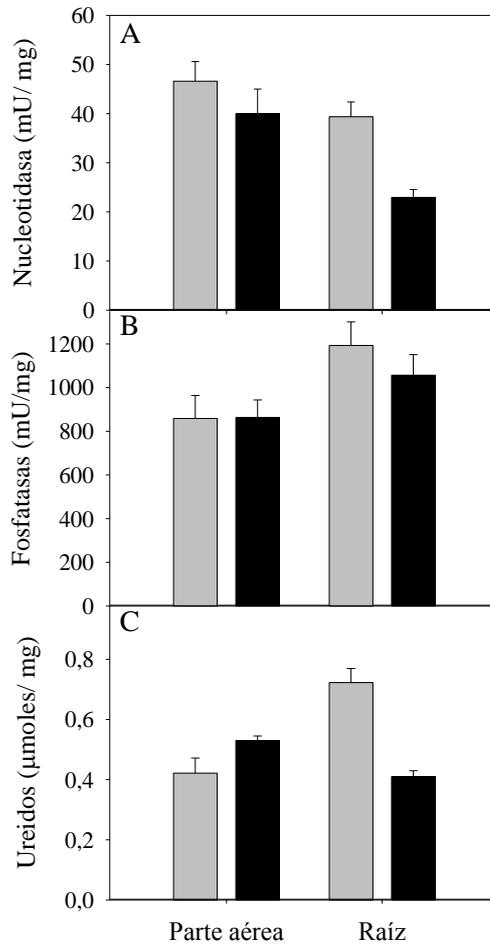
**Figura 39.- Actividades fosfatasas y contenido de ureidos en raíces de plántulas sometidas a déficit hídrico.** Plántulas de judía de 7 días de desarrollo se expusieron durante 0 (barras negras) 1 (barras grises claras) y 3 h (barras grises oscuras) a estrés hídrico. Las actividades nucleotidasa (A), fosfatasa sensible a molibdato (B), y la concentración de ureidos (C) se determinaron en los extractos crudos de las partes aéreas y de las raíces.



**Figura 40.- Actividades fosfatasas en extractos de raíces de plántulas de judía sometidas a déficit hídrico.** Las actividades fosfatasas se determinaron en extractos de raíces de 7 días sometidas a déficit hídrico durante 1 y 3 h. En cada pocillo se cargó la misma cantidad de proteína y el ensayo se realizó con IMP 5 mM como sustrato. En el margen izquierdo se indica el tamaño de las proteínas con actividad fosfatasa.

#### **4.4. Efecto de la etiolización en las actividades fosfatasas y el contenido de ureidos en plántulas de judía**

El desarrollo postgerminativo de judía en ausencia de luz dio lugar a la etiolización de las plántulas: ausencia de clorofilas, mayor desarrollo del eje embrionario e hipocotilos engrosados. Los valores de proteína soluble total por gramo de peso fresco fueron menores en la parte aérea de las plántulas etioladas mientras que no se encontraron diferencias en raíces. La actividad fosfatasa resistente a molibdato (nucleotidasa) fue inferior en las raíces de plántulas etioladas mientras que no se observaron cambios significativos en las partes aéreas (Figura 41). La actividad fosfatasa sensible a molibdato no varió con la etiolización en ninguno de las dos partes de plántulas analizadas (Figura 41). Los valores de ureidos fueron inferiores en las raíces de plántulas etioladas, de manera similar a lo observado para la actividad nucleotidasa (Figura 41).

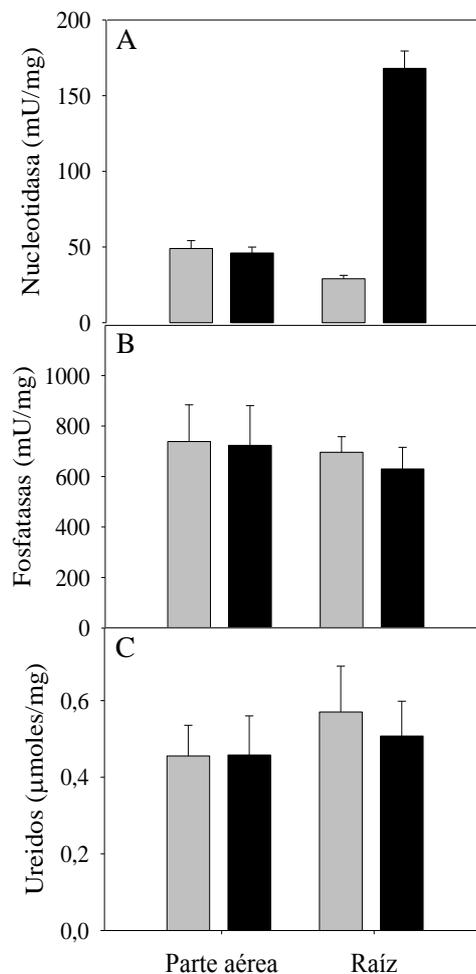


**Figura 41.- Actividades fosfatasa y contenido de ureidos en plántulas etioladas.** Plántulas de judía se sometieron a oscuridad durante la germinación y el desarrollo postgerminativo. A los 7 días de desarrollo se obtuvieron los extractos crudos de partes aéreas y raíces de estas plántulas etioladas (barras negras) así como de plántulas desarrolladas en condiciones estándar (barras grises). En estos extractos se determinaron la actividad fosfatasa resistente a molibdato (A), la actividad fosfatasa sensible a molibdato (B) y el contenido de ureidos (C).

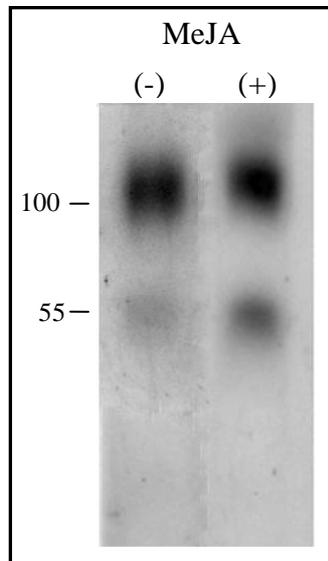
#### 4.5. Efecto del metil-jasmonato en las actividades fosfatasa y el contenido de ureidos en plántulas de judía

El tratamiento de plántulas de 6 días con metil-jasmonato durante 24 h no afectó al tamaño ni al peso de las plántulas pero sí al desarrollo de las raíces. El contenido de proteína soluble en las plántulas tratadas con metil-jasmonato fue ligeramente superior. Este tratamiento con metil-

jasmonato provocó un drástico incremento de la actividad nucleotidasa en raíces pero no en partes aéreas (Figura 42), mientras que no se afectaron ni la fosfatasa (Figura 42 B) ni la concentración de ureidos (Figura 42 C) en raíces o partes aéreas. El citado incremento de actividad nucleotidasa se debió a la mayor actividad de la proteína de 55 kDa como se demostró al realizar el ensayo de actividad fosfatasa en gel (Figura 43).



**Figura 42.- Actividades fosfatasa y contenido de ureidos en ejes de plántulas tratadas con metil-jasmonato.** Plántulas de judía de 6 días de desarrollo se trataron con metil-jasmonato 50  $\mu$ M durante 24 h. Se obtuvieron los extractos crudos de partes aéreas y raíces de estas plántulas tratadas (barras negras) así como de plántulas desarrolladas en condiciones estándar (barras grises). En estos extractos se determinaron la actividad fosfatasa resistente a molibdato (A), la actividad fosfatasa sensible a molibdato (B) y el contenido de ureidos (C).



**Figura43.- Actividades fosfatasas en extractos de raíces de plántulas tratadas con metil-jasmonato.** Se emplearon extractos de raíces de plántulas de 7 días tratadas con metil-jasmonato durante 24 h. La actividad se ensayó en gel utilizando como sustrato p-NPP 5 mM durante 30 min a 37 °C. En el margen izquierdo se indica el tamaño de las proteínas con actividad fosfatasa.

## **CAPÍTULO V**

### **5. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA PROTEÍNA IDENTIFICADA COMO 5'-NUCLEOTIDASA DE JUDÍA EN *E. COLI***



### 5.1. Expresión del ADNc de la secuencia identificada como posible nucleotidasa de *Phaseolus vulgaris* en *E. coli*

El análisis de la fosfatasa resistente a molibdato (nucleotidasa) mostró que podría corresponder a la secuencia *Phvulv091001267m* identificada en la base de datos del genoma de judía. Con el objetivo de clonar el ADNc que codifica esta secuencia se diseñaron los oligonucleótidos FNtdsa1 y RNtdsa1 con los que se amplificó, mediante PCR y utilizando como molde ADNc de ejes en desarrollo de 5 días, el ADNc completo de *pvNtdsa*. El ADNc clonado presentó una longitud de 1063 pb y se localizaron 2 cambios en pares de base, aunque estos cambios no afectaron al aminoácido codificado (Figura 44). Mediante la aplicación informática HCPolya se identificó una señal de poliadenilación para ARNs eucarióticos situada entre los nucleótidos 945 y 955 (Figura 44). El mayor marco abierto de lectura correspondió a un tamaño de 756 pb que codificaría un péptido de 251 aminoácidos con una masa molecular de 28,5 kDa, un punto isoeléctrico de 4,69 y una carga neta de -10,84 a pH 7,0.

La región codificante del ADNc clonado se insertó en el plásmido pET-30b+ siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. El plásmido resultante se introdujo en células de *E. coli* BL21, las cuales sobreexpresaron la proteína recombinante tras inducción con IPTG 1 mM (Figura 45 A). La proteína recombinante presenta una cola de histidinas en el extremo amino terminal para su detección mediante la técnica de Western blot y su purificación mediante cromatografía de afinidad a Ni<sup>+2</sup>. La proteína recombinante no se detectó en las células no transformadas ni en células no inducidas. La masa molecular de la proteína sobreexpresada fue de 37 kDa, que coincidió con la esperada. La proteína recombinante se encontró principalmente en la fracción

insoluble, lo que indica la formación de cuerpos de inclusión (Figura 45 B). La inducción con IPTG a una temperatura de 18 °C no aumentó la proporción de proteína soluble presente en los extractos con respecto a la obtenida cuando la inducción se realizó a 37 °C.

```

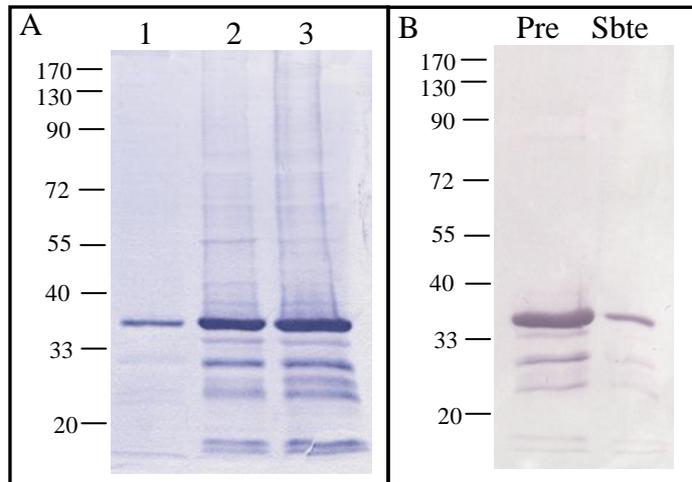
TTGAAAACCATTTTTTCTTTCTCTTTTATTTTATATATAGAAAAAGAAAAGAAAAGCAGTCGCCGGAGCC 75

CGGGTCCGTTCTGAGGCCCTAACAGTTTTCCGGCGATGATTCCGGCGTGTGTCTGTTGTCCCTGCTGGTGGCTCT 150
                M D S G V C L L S L L V A L
CTCAACGCTCAGCCACGTTCTTTCCGAGCCGATCCTCAGGTTGCCGTCGGAGAAGGCGATCTCGAGCGATTACTG 225
S T L S H V L S E P I L R L P S E K A I S S D Y C
GACAGCTGGAGGCTGGCGGTGGAGACGAACAATGCGGGGCCGTGGGAGCGCGTCCCGGCAATTGCGTGGATTT 300
D S W R L A V E T N N A G P W E R V P A N C V D F
CGTGGCTGAGTACATTTCCGGAGAGAGGTACCCGAGGGACTGCGAAGTGGTCCGGAATTTGTGCTGGCGTTCGC 375
V A E Y I S G E R Y R R D C E V V G N L S L A F A
GAGGAGCGTGAGATTGGTCCGAGACGGACGAGATGCGTGGGTGTTTCGATATCGATGAGACGCTCCTCCAACGT 450
R S V R L V G D G R D A W V F D I D E T L L S N V
GCCTTACTATGAAGACATTGGATTCCGGTTTGAGATCTTCAATGAGACTTCCTTTGATGCTTGGGTGAACCGGC 525
P Y Y E D I G F G F E I F N E T S F D A W V N S A
TGCTGCCCCAGCTTTGGTACCCAATTTGATTTTGTATAACGAGCTTAAGGAATGGGGTTCAGGATATTTCTCTT 600
A A P A L V P N L I L Y N E L K E L G F R I F L L
AACTGGGAGGAGTGAGTATCAAAGGAATGCCACGGAGGCAAACCTTATGCTTTCAGGGTACAGAAATGGGAGAG 675
T G R S E Y Q R N A T E A N L M L S G Y R N W E R
ACTTATCTTAAGAGAGTCTTATGATAAAGGCAAACCTGCCATTAGTTACAAGTCTGAGAAGAGAGAAGAGTTGGA 750
L I L R E S Y D K G K P A I S Y K S E K R E E L E
GAACGAAGGTTACAGGATTCATGGGAGCTCTGGGGATCAGTGGAGTATTTGTGGGGTTATGCAGTTGCTGCACG 825
N E G Y R I H G S S G D Q W S D L W G Y A V A A R
GTCTTTCAAACCCCAAACCAATGTACTATATCCATAGCAATGTCTTCTCAGAAATCTGTATTATGTTTCACG 900
S F K L P N P M Y Y I P
ATTGGATTGCTCAGTTGTTGTACCCTACCGTGATTTTCATGGTAAATATAATATATATGTTTGTGTCTGTGGAA 975
                AATATAATAT
CATGGTAATCTAAAACCGAGGAATGATTCTCTTCATTTTAGTGTACAATGGTGTGAGCTTGAATCTAGAATCT 1050

AGAAATCTCATGCA

```

**Figura 44.-** Secuencia nucleotídica correspondiente al ADNc de *pvntds* y la secuencia aminoacídica deducida. La secuencia nucleotídica se numera desde el primer codón de iniciación. Se representa el codón de inicio de traducción para el ORF de mayor tamaño. Los cuadrados rojos señalan los cambios en los nucleótidos en relación a la secuencia (*Phvulv091001267m*) depositada en la base de datos *Phytozome* y el rectángulo amarillo la posible señal de poliadenilación.

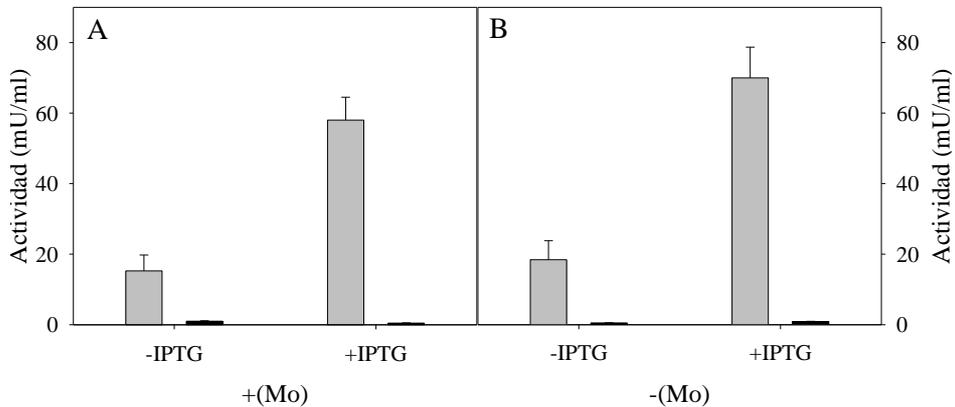


**Figura 45.- Sobreexpresión de la proteína recombinante.** (A) El clon que contenía la construcción PvNtdsa-pET se cultivó hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,5 y a continuación se indujo durante 3 h a 37 °C con IPTG 1 mM y se recogieron muestras cada hora. La suspensión de bacterias se mezcló directamente con tampón de carga y, tras hervir, la expresión se analizó mediante técnica de Western blot utilizando anticuerpos antihistidinas. (B) Tras inducir con IPTG durante 3 h a 37°C como se ha indicado en A, las células se rompieron mediante sonicación, se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min y se separaron la fracción soluble (Sbte) del precipitado (Pre), que se resuspendió en el mismo volumen de tampón. La expresión de la proteína recombinante se analizó mediante Western blot como se ha indicado anteriormente.

La proteína recombinante soluble presente en los extractos crudos bacterianos presentó actividad nucleotidasa (Figura 46). La inducción con IPTG de células transformadas con el plásmido PvNtdsa-pET produjo una mayor actividad fosfatasa, tanto con *p*-NPP como con los nucleótidos IMP y AMP como sustratos. El valor de actividad en la fracción insoluble fue insignificante, lo que indica que la proteína en cuerpos de inclusión no muestra actividad. La actividad fosfatasa del sobrenadante de las células no inducidas se debe a la actividad bacteriana.

El efecto del molibdato sobre la actividad nucleotidasa de los extractos de células de *E. coli* que sobreexpresan la proteína a partir del gen de

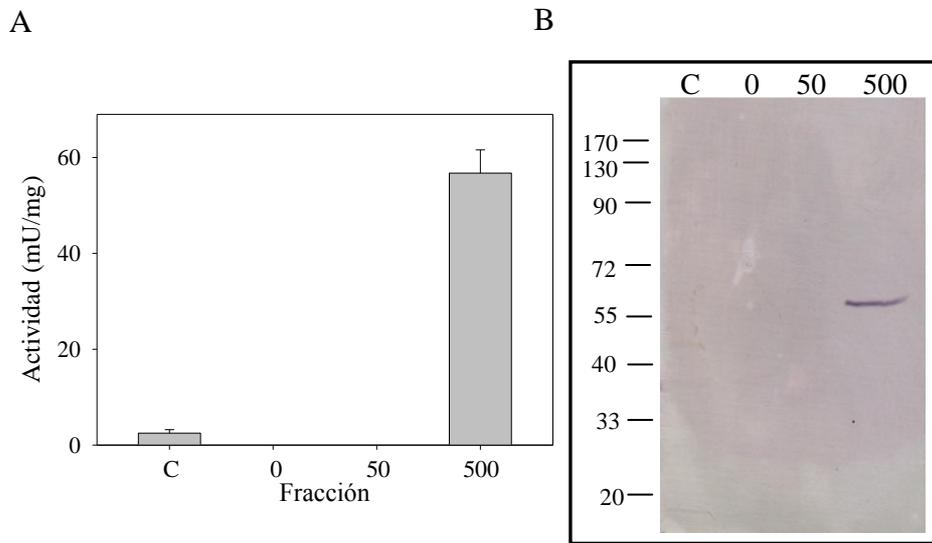
judía se analizó *in vitro*. La actividad nucleotidasa sobreexpresada mostró actividad en presencia de molibdato 5 mM. (Figura 46).



**Figura 46.- Actividad nucleotidasa en los extractos crudos de *E. coli*.** Las células de *E. coli* transformadas con el plásmido Pvn $t$ ds $a$ , no inducidas (-IPTG) o inducidas (+IPTG) durante 3 h a 37 °C se recogieron y lisaron como se ha indicado previamente. Tras centrifugar se recogieron los sobrenadantes (barras grises) y el precipitado se resuspendió en el mismo volumen de tampón (barras negras). La actividad fosfatasa se determinó con el sustrato *p*-NPP en presencia (A) o ausencia de molibdato 5 mM (B).

## 5.2. Purificación de la proteína recombinante.

La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad en condiciones no desnaturizantes, como se describe en el apartado 21.3 de Materiales y Métodos. En estas condiciones, la cantidad de proteína que se retuvo en la columna fue muy baja y, por tanto, el rendimiento de este sistema de purificación fue igualmente bajo (Figura 47). La proteína eluyó tras un lavado con imidazol 500 mM y se detectó mediante Western-blot como una proteína con un tamaño aproximado de 55 kDa. La proteína purificada mostró actividad fosfatasa en las condiciones de ensayo utilizadas en ausencia y presencia de molibdato.



**Figura 47.- Purificación de la proteína recombinante.** El extracto crudo procedente del sobrenadante de la lisis de las células inducidas con IPTG se aplicó a una columna de afinidad a  $\text{Ni}^{+2}$ . A) La actividad se determinó con IMP 5 mM como sustrato y en presencia de molibdato 5 mM en el eluyente procedente de la carga (C) y de los lavados con 0, 50 y 500 mM de imidazol. B) Los mismos eluyentes se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos anti- histidinas.



## **V. DISCUSIÓN**



## **1. ESTUDIO DE LAS FOSFATASAS ÁCIDAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS DE EJES EMBRIONARIOS DE JUDÍA**

Los ureidos juegan un papel esencial como transportadores de nitrógeno en algunas leguminosas en condiciones de fijación de nitrógeno y pueden llegar a constituir casi la totalidad del nitrógeno transportado por el xilema a las partes aéreas (Todd et al., 2006). Recientemente, se ha descrito que las plántulas de judía acumulan ureidos durante el desarrollo postgerminativo temprano y que éstos procederían de la degradación oxidativa de las purinas (Quiles et al., 2009). Como ya se indicó en la Introducción, el primer paso en la ruta de síntesis de ureidos a partir de los nucleótidos de purina consiste en la hidrólisis enzimática del grupo fosfato de los nucleótidos. Hasta la fecha no se ha identificado la actividad fosfatasa implicada y se ha sugerido que podría estar catalizado por una fosfatasa ácida inespecífica (EC 3.1.3.2) o por una 5'-nucleotidasa específica (EC 3.1.3.5). Resolver este dilema es un requisito importante para comprender la síntesis de ureidos. Igualmente, es interesante dilucidar si la fosfatasa de nucleótidos sería específica para cada nucleótido, distinta para los purínicos y pirimidínicos o si, por el contrario, es la misma actividad la que cataliza la desfosforilación de todos ellos. La dificultad para la identificación de la función de cada fosfatasa ácida radica en la amplia variedad de sustratos fosforilados que pueden utilizar estas fosfatasas (Duff et al., 1994) así como al gran número de actividades fosfatasas presentes en plantas. En este sentido, en el genoma de *Arabidopsis* se han identificado 112 secuencias con posible actividad fosfatasa (Kerk et al., 2002).

Varias fosfatasas ácidas que pueden metabolizar nucleótidos han sido descritas en distintas especies de leguminosas ureídicas (Penheiter et al., 1997; Ferreira et al., 1998; García et al., 2004; Yoneyama et al., 2004;

Lung et al., 2008). De estas actividades, solamente la actividad fosfatasa caracterizada en soja presenta cierta afinidad por los nucleótidos (Penheiter et al., 1997). Para el resto de las actividades no se observó ni especificidad de sustrato por nucleótidos ni mayor afinidad de la enzima por estos sustratos. No obstante, la actividad obtenida para estas actividades con nucleótidos como sustratos podría ser suficiente para soportar la síntesis de ureidos en tejidos con niveles bajos en este metabolismo.

El *p*-NPP es el compuesto que se utiliza ampliamente para la caracterización de actividades fosfatasas tanto ácidas como alcalinas (Takai y Mieskes, 1991). El análisis de la actividad mediante el sistema en gel proporciona información sobre el número de actividades fosfatasas y la actividad relativa de cada una de ellas. En los extractos de cotiledones aparecieron dos actividades principales con pesos moleculares de aproximadamente 100 y 130 kDa cuando el ensayo se realizó con *p*-NPP como sustrato (Figura 3 A). La proteína de elevada masa molecular podría corresponder con la actividad fitasa, cuya función sería movilizar las reservas de inositol hexafosfato presentes en los cotiledones durante la germinación y el desarrollo postgerminativo, proporcionando así el fósforo necesario para el crecimiento de la plántula (Hegeman y Grabau, 2001). En los ejes en desarrollo no se detectó esta actividad de 130 kDa puesto que estos tejidos no tienen función de reserva de nutrientes, pero sí dos actividades fosfatasas que correspondían con proteínas de un tamaño aproximado de 100 y 55 kDa (Figura 3 B).

Los ejes en desarrollo de judía se eligieron como material para identificar la fosfatasa implicada en la síntesis de ureidos puesto que se ha descrito incremento en el metabolismo de ureidos durante el desarrollo de estos órganos (Quiles et al., 2009). Cuando el ensayo de

actividad en gel se realizó con IMP como sustrato se determinaron las mismas actividades enzimáticas en los ejes en desarrollo de judía, y la diferencia radicó en la intensidad relativa de ambas. En el ensayo de actividad en gel con *p*-NPP como sustrato aumentaba la actividad relativa de la proteína de 100 kDa, mientras que con IMP como sustrato lo hacía la de la proteína de 55 kDa. Esto sugiere que la proteína de menor masa molecular posee mayor especificidad por el nucleótido. En la ruta de síntesis de novo de purinas, el IMP es el primer nucleótido en sintetizarse y a partir de éste se forma el resto de purinas (Zrenner et al., 2006). Las mismas actividades fosfatasa se determinaron utilizando otros nucleótidos como sustrato.

Las dos actividades fosfatasa presentes en los extractos crudos de ejes de judía se diferenciaron por su respuesta a la presencia del ion molibdato en la mezcla de ensayo. La actividad de la proteína de 55 kDa mantuvo su actividad en presencia de molibdato mientras que la proteína de 100 kDa la perdió (Figura 3 B), y esta propiedad permitió distinguirlas (Figura 3 B). La inhibición por molibdato es una característica muy frecuente de la mayoría de las actividades fosfatasa (Duff et al., 1994), aunque este compuesto fue previamente utilizado para la determinación de una 5'-nucleotidasa de nódulos de raíces de soja (Doremus y Blevins, 1988). Soja es una leguminosa ureídica al igual que judía y, por tanto, sus nódulos tienen una elevada tasa de síntesis de ureidos a partir de las purinas procedentes de la asimilación del dinitrógeno fijado. En los ejes en desarrollo, la actividad de la proteína de 55 kDa fue superior durante la germinación y el desarrollo postgerminativo temprano. Además, la actividad de esta proteína aumentó tras la emergencia radicular, coincidiendo con el incremento en el contenido de ureidos en ejes, y su patrón de actividad coincidió con el patrón de acumulación de ureidos descrito previamente (Quiles et al.,

2009). La actividad fosfatasa sensible a molibdato de 100 kDa fue prácticamente indetectable hasta el día 6 de desarrollo cuando el ensayo en gel se realizó con nucleótidos como sustratos. Todo lo anterior sugiere que la fosfatasa de 55 kDa podría ser la responsable de la desfosforilación de nucleótidos en la ruta de síntesis de ureidos.

La implicación de las actividades fosfatasas en el metabolismo de ureidos también se estudió desarrollando plántulas de judía en medios de imbibición suplementados con varios compuestos precursores de los ureidos. La adición de varios nucleótidos y nucleósidos de purina provocaron un aumento en el contenido en ureidos en los ejes en desarrollo de las plántulas, lo que sugiere que éstas incorporaban esos compuestos y lo metabolizaban a ureidos. En el caso de los nucleótidos, el aumento en el contenido de ureidos se acompañó de incrementos en la actividad 5'-nucleotidasa (fosfatasa resistente a molibdato) mientras que la fosfatasa ácida sensible a molibdato no se afectó. En contraposición, el incremento en la concentración de ureidos no se correspondió con mayores valores de actividad fosfatasa resistente a molibdato cuando el compuesto añadido al medio fue el nucleósido adenosina, que es producto de la reacción fosfatasa cuando la adenosina monofosfato es el sustrato. En el principal proceso fisiológico donde ocurre una gran síntesis de ureidos, la fijación biológica de nitrógeno en nódulos de leguminosas ureídicas, también se ha descrito una fuerte inducción de la actividad nucleotidasa (Christensen y Jochimsen, 1983). El inhibidor utilizado para diferenciar entre ambas actividades fosfatasas, el molibdato, también se ha utilizado en estos ensayos in vivo. El molibdato tuvo un efecto negativo sobre el desarrollo de las plántulas, de forma que cuando se añadió a una concentración en la que el desarrollo no se afectó significativamente, se observó una inhibición de la fosfatasa

ácida sensible a molibdato, pero que no cambió ni el contenido de ureidos ni la actividad nucleotidasa.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que la acumulación de ureidos durante el desarrollo postgerminativo temprano de judía procede del catabolismo de nucleótidos (Quiles et al., 2009) y sugieren que la actividad fosfatasa resistente a molibdato de 55 kDa sería la enzima responsable del catabolismo de nucleótidos implicada en la síntesis de ureidos.

## **2. PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA RESISTENTE A MOLIBDATO DE EJES EMBRIONARIOS DE JUDÍA**

La proteína de 55 kDa con actividad fosfatasa resistente a molibdato se ha purificado a partir de ejes de judía en desarrollo. La resistencia a molibdato es una propiedad específica para esta enzima que no es compartida por la mayoría de las actividades fosfatasas (Duff et al., 1994). Para nuestro conocimiento, esta es la primera vez que una fosfatasa ácida resistente a molibdato es purificada a partir de material vegetal. La actividad fue purificada 1.527 veces, lo que sugiere que la enzima podría representar sólo un 0,07 % del total de la proteína presente en los ejes embrionarios de judía. El factor de purificación conseguido fue 5 veces mayor que el de la purificación de la enzima de nódulos de raíces de soja (Penheiter et al., 1997) y la actividad específica de la fosfatasa purificada ( $18,1 \text{ U mg}^{-1}$  proteína) fue menos de la mitad que la de nódulos de soja ( $45 \text{ U mg}^{-1}$  proteína, Penheiter et al., 1997). Estos datos sugerirían que los ejes en desarrollo tienen una capacidad de desfosforilar nucleótidos que es aproximadamente un orden de magnitud inferior a la de nódulos de leguminosas ureídicas, donde todo el nitrógeno que va a utilizar la planta adulta procede de la síntesis de novo

de purinas y ureidos en nódulos. Dos proteínas distintas con actividad fosfatasa han sido purificadas y caracterizadas a partir de nódulos de leguminosas ureídicas, concretamente de nódulos de judía (García et al., 1994) y de soja (Penheiter et al., 1997). La actividad fosfatasa purificada a partir de los nódulos de *Phaseolus vulgaris* tiene un peso molecular de 120 kDa y es sensible al molibdato (García et al., 2004), mientras que la de nódulos de soja tiene un tamaño de 70 kDa (Penheiter et al., 1997). En soja, los autores sugirieron que la enzima purificada se trataba de una 5'-nucleotidasa involucrada en la generación de 5'-nucleosidos a partir de 5'-nucleótidos durante la síntesis de ureidos en los nódulos. Sin embargo, el efecto del molibdato sobre la proteína purificada no fue indicado.

La proteína purificada presentó una masa molecular de 55 kDa cuando se analizó mediante SDS-PAGE tanto en condiciones reductoras (en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol y 5 minutos a 100 °C) como en condiciones no reductoras. Sin embargo, cuando la muestra fue sometida a condiciones desnaturizantes más severas (15 min a 100 °C en presencia de urea 8 M) se obtuvo una única banda de aproximadamente 28 kDa (Figura 11), lo que sugiere que la proteína es un homodímero. Este tamaño de subunidad entra dentro de los tamaños descritos para las fosfatasas ácidas de bajo peso molecular (Duff et al., 1994; Tran et al., 2010). Esta resistencia a la desnaturización puede deberse a la inaccesibilidad de los agentes reductores a los puentes disulfuro (Oria et al., 1995). La actividad fosfatasa resistente a molibdato se unió a la concanavalina-A, lo que sugiere que esta enzima es una glicoproteína al igual que la mayoría de fosfatasas (Anand et al., 2012). La proteína concanavalina-A es una lecitina que posee la capacidad de unirse específicamente a glicoproteínas y glicolípidos. Esta unión entre la fosfatasa purificada y la concanavalina-A se ha utilizado como paso de

purificación eficiente ya que produjo un factor de purificación de 17. La enzima purificada es una metaloproteína como se deduce de la activación por el catión magnesio, así como por la protección de la enzima frente a la desnaturalización térmica, al igual que se ha descrito para la fosfatasa purificada de nódulos de soja (Penheiter et al., 1997).

Además de al molibdato, la enzima presentó resistencia al tartrato. Esta propiedad es característica de las fosfatasas púrpuras ácidas (PAPs) de plantas, que también se caracterizan por el color púrpura que presentan las enzimas purificadas (Duff et al., 1994). Las PAPs forman un gran grupo de fosfatasas ácidas (solamente en el genoma *Arabidopsis* hay 29 secuencias, Tran et al., 2010), aunque la enzima purificada de ejes embrionarios de judía mostró claras diferencias con las PAPs, indicando que no pertenece a este grupo. Las PAPs son inhibidas por molibdato (Cashikar et al., 1997; Lung et al., 2008; Tran et al., 2010) y muestran mayor actividad con otros sustratos que con AMP (Cashikar et al., 1997; Lung et al., 2008; Liang et al., 2010; Tran et al., 2010).

La enzima de 55 kDa purificada mostró la máxima actividad utilizando como sustratos nucleótidos y no se observaron diferencias significativas entre los nucleótidos purínicos o pirimidínicos. Con respecto a los valores de  $K_m$  para estos nucleótidos tampoco se obtuvieron diferencias entre los purínicos o pirimidínicos y los valores obtenidos fueron similares a los descritos para la enzima de nódulos de soja (Penheiter et al., 1997; 1998). Entre los distintos nucleótidos ensayados, el AMP fue con el que se obtuvo una mayor constante de afinidad ( $9 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Asimismo resulta interesante la inhibición de la actividad por los productos de la reacción, los nucleósidos, siendo la inhibición por adenosina mucho mayor que la del resto de nucleósidos. Además, únicamente con AMP la enzima presentó inhibición por sustrato, lo que sugiere que esta nucleotidasa podría tener un papel regulador en el metabolismo de

nucleótidos. En el citosol, la síntesis de los nucleótidos de purina tiene lugar a partir del AMP procedente de la síntesis *de novo* en mitocondrias y plastidios (Zrenner et al., 2006). La inhibición de la nucleotidasa por adenosina y altas concentraciones de AMP en el citosol de la célula podría facilitar la síntesis del resto de purinas, así como la posible formación de citoquininas. Otra explicación a esta inhibición por sustrato podría estar relacionada con el balance energético celular, regulado por la proporción ATP/AMP. También hay que destacar el hecho de que la actividad mostrara un pH óptimo de 7 para este sustrato, mientras que para el resto de nucleótidos el valor de pH óptimo estuvo entre 5,5 y 6. Esto podría indicar que *in vivo* actuaría como una fosfatasa no ácida. Una posible explicación para este comportamiento diferencial de las propiedades de la enzima frente al AMP sería la presencia del grupo amida en la nucleobase del AMP a diferencia del resto de las bases de los nucleótidos.

La mayoría de las fosfatasas ácidas se inhiben competitivamente por fosfato inorgánico, lo que indica que el principal papel de las fosfatasas ácidas en plantas es el de mantener una adecuada nutrición de fosfato cuando sus niveles intracelulares se agotan en periodos de escasez (Duff et al., 1994; Tran et al., 2010). Sin embargo, la enzima purificada sólo se inhibió ligeramente por fosfato inorgánico y a concentraciones elevadas, y como ya se ha mencionado la actividad se inhibió por nucleósidos, que son los productos de la reacción cuando se utilizan nucleótidos como sustratos. Estos datos apoyan la idea de que los nucleótidos son el sustrato natural de la enzima resistente a molibdato y que la movilización de nucleótidos es una función principal de la enzima en lugar de un papel en la nutrición del fosfato.

En varias especies de plantas se han purificado proteínas con actividad fosfatasa y que se han caracterizado como nucleotidasas (Lai et al.,

1971; Carter y Tipton, 1986; Sharma et al., 1986; Mittal et al., 1988). Estas proteínas se han purificado a partir de distintos tejidos vegetales y presentan distintas localizaciones celulares. Así, en microsomas de tallo de plántulas de maíz, se ha descrito la purificación de una actividad nucleotidasa que cataliza la hidrólisis de todos los nucleótidos, aunque la actividad fue mayor con nucleótidos purínicos que con pirimidínicos (Carter y Tipton, 1986). A partir de cotiledones de cacahuete se han purificado dos actividades 5'-nucleotidasa, una a partir de membrana plasmática (Sharma et al., 1986) y otra de aparato de Golgi (Mittal et al., 1988); como ocurre con una nucleotidasa descrita en judía (Lai et al., 1971), estas dos nucleotidasas pueden catalizar la hidrólisis de AMP pero no la del resto de nucleótidos.

La información relativa a los genes que codifican estas actividades 5'-nucleotidasa en plantas es muy escasa, a pesar de disponer de los genomas completos de varias especies vegetales. El uso de las bases de datos permite identificar dominios conservados en las distintas secuencias estudiadas. La identificación de éstos puede ser la única pista hacia la función celular o molecular de una proteína, ya que indica similitud local o parcial a otras proteínas, algunas de las cuales pueden haber sido caracterizadas experimentalmente (Marchler-Bauer et al., 2011). En el caso de plantas, los genes identificados con función nucleotidasa no han sido caracterizados experimentalmente y la función ha sido asignada por similitud de dominios con los genes de nucleotidasa de humanos y ratón ya caracterizados. Otra alternativa al conocimiento de la secuencia que codifica una proteína purificada sería el análisis de la huella peptídica de la proteína o la identificación de secuencias de aminoácidos mediante la técnica MALDI-TOF/TOF.

La proteína de 55 kDa fue identificada mediante análisis MALDI-TOF/TOF como una fosfatasa ácida. El análisis de la secuencia

aminoacídica con el programa Conserved Domain Database and Search Service (v2.16) indica que tiene dominios similares a los presentes en la superfamilia “Haloacid dehalogenase-like hydrolases”, grupo que engloba, entre otras proteínas, hidrolasas, fosfatasas, nucleotidasas y diversas fosfotransferasas (Bogan y Brenner, 2010). Todas ellas poseen un Asp nucleofílico en la reacción de transferencia del grupo fosfato y un dominio altamente conservado alfa/beta. En la secuencia se localizaron los motivos M(I) (DxDx[T/V][L/V/I]), M(II) (§ § § [T/S], siendo § aminoácidos hidrofóbicos), M(III) (K[§ § §]), siendo § aminoácidos implicados en una alfa-helice) y M(IV) (DD o GDx(3-4)D), característicos de la superfamilia HAD (Burroughs et al., 2006). Sin embargo no se localizaron ni el Motivo S (Px(7-8)[R/K]xGF[W/L]) descrito en nucleotidasas de humanos (Rinaldo-Matthis et al., 2002) ni los dominios descritos para la familia UMPH (5´nucleotidasa de pirimidinas tipo 1), los cuales sí están presentes en los genes de plantas asignados como nucleotidasas en las bases de datos. En la proteína identificada por MALDI-TOF/TOF también se localizaron dominios característicos de las fosfatasas ácidas de plantas que están estrechamente relacionadas con las fosfatasas ácidas no específicas de clase B OlpA (TIGR01533, las cuales se cree que son 5´-nucleotidasas) y algo más distante de las fosfatasas de clase B AphA (TIGR01672). Estas tres infrafamilias definen la subfamilia IIIB (pfam03767), para la cual se ha descrito que los mejores sustratos serían los 5´-nucleósidos-fosfato de purina. Esto estaría de acuerdo con la asignación de la proteína Q4QNY4.1 *H. influenzae* hel (TIGR01533) como una 5´-nucleotidasa (Reidl et al., 2000). Sin embargo, hasta ahora no hay más evidencia para apoyar esta función específica para estas fosfatasas de plantas.

La secuencia aminoacídica de la secuencia identificada mostró alta homología con proteínas de reserva de plantas. Muchos genes de la familia de las fosfatasas ácidas de plantas han sido clasificados como proteínas vegetativas de reserva debido a su elevada homología con estos genes previamente caracterizados y cuya expresión es muy elevada en hojas (De Wald et al., 1992). Sin embargo, las proteínas de reserva vegetales tienen cambiado el residuo nucleófilo aspartato por serina, glicina o asparragina, lo que conlleva la pérdida de la actividad fosfatasa (Leelapon et al., 2004). La secuencia identificada también mostró homología con fosfatasas ácidas de bacterias clase B y otras fosfatasas ácidas de plantas, aunque la mayor identidad la mostró con la proteína de nódulos de soja purificada y caracterizada (Penheiter et al., 1997) y expresada en *Pichia pastoris* (Penheiter et al., 1998).

El ADNc de la secuencia identificada se sobreexpresó como proteína recombinante con colas de histidina en la bacteria *Escherichia coli*. La proteína se encontró mayoritariamente en cuerpos de inclusión y una pequeña fracción como proteína soluble. A diferencia de la fosfatasa ácida de nódulos de soja expresada en *E.coli*, que no tenía actividad fosfatasa (Penheiter et al., 1998), la proteína soluble presentó actividad nucleotidasa en los extractos crudos y en la preparación purificada tanto con nucleótidos de purinas como de pirimidinas y la actividad fue resistente al molibdato. La proteína purificada tras cromatografía de afinidad en níquel exhibió actividad fosfatasa y presentó un tamaño superior a los 55 kDa en condiciones reductoras. Como se ha mencionado anteriormente, su secuencia aminoacídica presenta homología con proteínas de reserva de plantas. En embriones de maíz, las proteínas de reserva están constituidas por monómeros de 19 kDa que se agregan en dímeros y trímeros (Cabra et al., 2006). Estos dímeros y trímeros se obtienen al analizar la proteína mediante SDS-PAGE en

condiciones desnaturalizantes y los monómeros se obtuvieron sólo al añadir urea 5 M a la muestra (Cabra et al., 2006). En estas mismas proteínas de reserva se ha descrito la formación de oligómeros estables a los agentes reductores tras incubar la proteína a altas temperaturas (Nunes et al., 2005).

### **3. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA SENSIBLE A MOLIBDATO DE EJES EMBRIONARIOS DE JUDÍA**

La actividad fosfatasa sensible a molibdato de 100 kDa e identificada en los ejes en desarrollo de judía fue purificada también hasta homogeneidad electroforética. Las dos actividades fosfatasas identificadas mediante el ensayo en gel en ejes de judía se separan mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sephacel como se ha indicado previamente. La actividad de 100 kDa también se une a la resina de concanavalina A y esta cromatografía fue el paso más efectivo arrojando un factor de purificación de 55. La enzima fue purificada 620 veces y resultó una preparación con una actividad de 192 U/mg con *p*-NPP como sustrato y el proceso tuvo un rendimiento del 8%.

La proteína es un dímero formado por dos subunidades de 57,5 y 52,5 kDa. Este tamaño de subunidad coincide con el de las fosfatasas ácidas de plantas de alto peso molecular (Vincent et al., 1992). Aunque la proteína purificada no presentó el color púrpura, la actividad fue resistente a tartrato, lo que permite clasificarla como una fosfatasa ácida púrpura (Anand y Srivastava, 2012). Además, la actividad es sensible a los iones molibdato y vanadato, características muy frecuentes en las actividades fosfatasas ácidas de plantas (Duff et al., 1994). La unión a concanavalina A sugiere que la proteína está glicosilada, lo que parece

ser una característica común a todas las PAPs, ya que en todas las secuencias de PAP analizadas se han encontrado péptidos de tránsito y que dirigirían las proteínas inicialmente hacía el aparato de Golgi para ser glicosiladas (Tran et al., 2010). La actividad presentó un pH óptimo entre 5,5 y 6 y, al igual que otras fosfatasa ácidas, presentó actividad con una gran variedad de sustratos sin mostrar una gran especificidad por ninguno (Duff et al., 1994). La mayor actividad se obtuvo con fosfoenol piruvato, tirosina-fosfato y pirofosfato, mientras que la actividad fue mínima con los nucleótidos de purinas y pirimidinas.

La proteína fue identificada mediante huella peptídica como una fosfatasa ácida púrpura (PAP) de ejes embrionarios de judía que previamente había sido purificada y caracterizada (Yoneyama et al., 2004).

#### **4. ACTIVIDADES FOSFATASAS EN PLÁNTULAS DE JUDÍA EN CONDICIONES ADVERSAS**

La salinidad es uno de los principales factores que afectan al proceso de germinación de las semillas (Al-karaki, 2001). El efecto varía según la especie, e incluso se pueden presentar comportamientos diferentes para las distintas variedades dentro de una misma especie. Así, distintas variedades de lechuga presentan comportamientos totalmente opuestos (Nasri et al., 2011). En semillas de trigo expuestas a sal se observó una disminución de la tasa de germinación (Xu et al., 2011). En semillas de pimiento se produjo un retraso en la germinación sin que se afectara la tasa de germinación (Chartzoulakis y Klapaki, 2000), y en semillas de arroz se afectó tanto la tasa de germinación como el tiempo de germinación (Khan et al., 1997). Las semillas de judía de la variedad Great Northern no se afectaron ni en la velocidad ni en la tasa de

germinación hasta concentraciones de NaCl de 200 mM, aunque si se observó un severo retraso en el desarrollo postgerminativo (Figura 31). Esta disminución del desarrollo de los ejes se ha observado en otras especies como el caupi (Gomes et al., 2008). La salinidad, además de generar toxicidad iónica, provoca un estrés osmótico, reduciendo la disponibilidad de agua y produciendo un desequilibrio en la nutrición mineral (Grattan y Grieve, 1999). En estas condiciones, la movilización de las sustancias de reservas desde el cotiledón hacia los ejes en desarrollo se reduce impidiendo el normal desarrollo de éstos últimos (Voigt et al., 2009).

El fósforo es un macronutriente esencial que juega un papel importante como elemento estructural y regulador en el crecimiento de plantas en desarrollo. A diferencia del nitrógeno, que disminuye su absorción en suelos salinos, la disponibilidad de este elemento en condiciones de estrés salino no está clara. Se ha descrito que la salinidad induce la deficiencia de fósforo y este efecto podría reducir la tolerancia al estrés salino (Gibson, 1988; Kaya, 2001); por otro lado, se han descrito casos de acumulación de fósforo que pueden incluso causar toxicidad en el tallo (Nieman y Clarck, 1976; Cerdá et al., 1977). Una adecuada nutrición de fósforo podría minimizar la toxicidad por iones y disminuir los efectos del estrés hídrico (Kaya 2001 y Shubhra, 2004). En las plántulas de judía desarrolladas bajo condiciones de estrés salino no se observaron cambios en la concentración de fosfato, aunque sí una fuerte inducción de las actividades fosfatasas, principalmente de la fosfatasa sensible al molibdato de 100 kDa en las raíces de estas plántulas. La mayoría de las plantas responden al déficit de fosfato con una inducción de las actividades fosfatasas. Sin embargo, un estudio de la familia génica de las PAPs en *Arabidopsis* muestra que alguno de los genes no responden a los niveles de fosfato, habiéndose sugerido otra función

fisiológica para ellos (Li et al., 2002). Lo mismo podría ocurrir con la actividad fosfatasa ácida inducida en plántulas de judía sometidas a estrés salino. En la literatura se han descrito varias fosfatasas ácidas, como la fosfatasa púrpura de soja GmPAP3, cuya expresión se induce por estrés salino sin cambios en las concentraciones de fosfato inorgánico (Liao et al., 2003). En este sentido, Li y col (2008) localizaron la primera enzima con actividad fosfatasa ácida en mitocondrias y demostraron su participación en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno que se originan en condiciones de estrés salino. La actividad fosfatasa ácida de ejes embrionarios de judía inducida por estrés salino podría estar relacionada con la adaptación de las plántulas a este estrés.

Otra condición adversa para el desarrollo de las plántulas es el déficit hídrico. En estas condiciones, junto con la de salinidad, las células vegetales deben ajustar su potencial osmótico para mantener la turgencia y evitar pérdidas de agua. Esto lo consiguen aumentando la concentración de solutos, bien tomándolos desde el exterior o bien sintetizándolos y acumulándolos en el interior celular. Entre estos solutos que intervienen en el mantenimiento osmótico destacan los compuestos nitrogenados (Mansour, 2000). En las raíces de plántulas de judía sometidas a déficit hídrico durante 3 horas se observó un incremento en la concentración de ureidos (Figura 38 C). Esta acumulación de ureidos podría tener como función el aumento de la presión osmótica de los tejidos para evitar la pérdida de agua. También se ha sugerido que el ahorro en el gasto de esqueletos carbonados para el transporte de nitrógeno puede ser crítico en la supervivencia de la planta bajo condiciones de estrés (Sagi, 1998). Los ureidos poseen una elevada relación nitrógeno:carbono, lo que supone un ahorro de esqueletos carbonados que puede ser crucial en condiciones de déficit de carbono

(Buchanan-Wollaston, 1997; Gepstein, 2004; Zrenner et al., 2006). En respuesta a este estrés, ambas actividades fosfatasas se indujeron en las raíces de las plántulas, apoyando la hipótesis de que la fosfatasa de 100 kDa podría tener una función en la respuesta a estrés abiótico y la mayor actividad de la proteína de 55 kDa podría estar relacionada con el incremento en la concentración de ureidos.

Los cambios en las actividades fosfatasas en respuesta a los estreses abióticos utilizados se produjeron fundamentalmente en las raíces. Se han descrito incrementos en el desarrollo de las raíces en semillas de trigo, pepino y arroz tratadas con hemina (Xu et al., 2011; Chen et al., 2012; Xuan et al., 2012). Este mismo efecto se observó en las semillas de judía incubadas con hemina 10  $\mu$ M durante las primeras 24 horas de imbibición (Figura 36). Este tratamiento provocó también un mayor desarrollo de la parte aérea de la plántula. Se ha sugerido que el incremento en el desarrollo podría ser consecuencia del aumento en el número de raíces laterales, lo que permite una mejor absorción de nutrientes y agua y un mejor soporte físico (Chen et al., 2012). La hemina induce la actividad hemo-oxigenasa que participa en respuestas frente a estados de estrés oxidativo (Xie et al., 2011). De nuevo, el tratamiento de las plántulas provocó cambios en las actividades fosfatasas en las raíces mientras que los valores no cambiaron en las partes aéreas de las plántulas. Las raíces de plántulas de judía tratadas con hemina durante las primeras 24 h presentaron mayor concentración de ureidos así como mayores valores de las actividades fosfatasas estudiadas cuando se analizaron desde los 4 a los 8 días de desarrollo. Esto se podría relacionar con una situación de estrés oxidativo. El pretratamiento con hemina redujo parcialmente los efectos negativos en el desarrollo de los ejes de judía en respuesta a estrés salino (Figura 37) de manera similar a lo observado en plántulas de trigo (Xie et al., 2011).

La actividad fosfatasa resistente a molibdato de judía se induce en las raíces de plántulas de judía tratadas con metil-jasmonato, aunque en esta ocasión no se relacionó con un incremento en la concentración de ureidos (Figura 41 A). El ácido jasmónico y sus ésteres como el metil-jasmonato son un grupo de fitohormonas que participan en la regulación del desarrollo de la planta y están involucradas en la señalización de distintos tipos de estreses tanto abióticos como bióticos (Matsuda et al., 2009). Los jasmonatos son unos potentes inductores de las actividades antioxidantes (Noriega et al., 2012) y, al igual que la hemina, inducen la actividad hemo-oxigenasa (Xie et al., 2011). Es bien conocido que las situaciones de estrés abiótico causan daños oxidativos en los tejidos (Zhu et al., 2001). Recientemente se han publicado varios trabajos en plantas sugiriendo que los ureidos podrían proteger de los daños producidos por las especies reactivas de oxígeno (ROS) en diversas situaciones de estrés (Nakagawa et al., 2007; Brychkova et al., 2008). El tratamiento con metil-jasmonato no afectó la actividad fosfatasa sensible a molibdato ni en raíces ni en partes aéreas. Una de las respuestas más rápidas que se producen en las proximidades de la zona afectada por una herida o ataque de patógeno es la producción de ácido jasmónico (Strassner et al., 2002). Berger y colaboradores (1995) describieron la acumulación de una proteína homologa a la VSP (proteínas de reserva vegetativa) de soja en hojas y raíces de *Arabidopsis* tras el tratamiento con metil-jasmonato. Como ya se ha comentado, la proteína de judía con actividad nucleotidasa presenta gran similitud con las VSP  $\alpha$  y  $\beta$  de soja. Estas proteínas presentan patrones temporales de síntesis y degradación según las necesidades de nitrógeno en los tejidos vegetativos. En soja se ha observado que las proteínas VSP $\alpha$  y VSP $\beta$  se acumulan cuando la planta pierde su sumidero de nitrógeno (Staswick et al., 1994). Estas proteínas no tienen actividad fosfatasa y su principal papel fisiológico se ha relacionado con el metabolismo del nitrógeno. Sin embargo, se ha

descrito la inducción por metil-jasmonato de una VSP en *Arabidopsis* (AtVSP2) con actividad fosfatasa y que tiene además propiedades insecticidas (Liu et al., 2005). Sin embargo, la característica de todas las VSP es la pérdida del Asp del motivo I necesario para la actividad fosfatasa y, por tanto, estas VSP serían inactivas (Leelapon et al., 2004). Este residuo está presente en la proteína AtVSP2, por lo que no se trata de una verdadera VSP. Recientemente, en *Populus* se ha descrito una fosfatasa ácida que sufre una fuerte inducción por heridas causadas por herbívoros (Veljanovski et al., 2010), y que muestra una gran homología a la fosfatasa ácida de nódulos de soja (Penheiter et al., 1997) y a la AtVSP2 de *Arabidopsis* (Liu et al., 2005). El tratamiento con metil-jasmonato no aumentó la concentración de ureidos en las plántulas de judía a pesar de la fuerte inducción de la actividad fosfatasa resistente a molibdato de 55 kDa. Esto podría deberse a que a la vez que incrementa la síntesis de ureidos aumenta también su catabolismo y, por tanto, la concentración permanece constante, a que la enzima tenga otro papel fisiológico o a que la actividad inducida por metil-jasmonato sea un proteína distinta con una masa molecular semejante y con propiedades similares.

## **VI. CONCLUSIONES**



1. En ejes en desarrollo de judía hay dos actividades fosfatasas ácidas que catalizan la desfosforilación de nucleósidos. Ambas actividades enzimáticas se diferencian en la masa molecular (55 y 100 kDa) y en su sensibilidad al molibdato. La cinética de desarrollo y los experimentos fisiológicos indican que la enzima de 55 kDa resistente a molibdato podría ser la implicada en la síntesis de ureidos.
2. La presencia de molibdato durante el desarrollo de la plántula causó una inhibición de la fosfatasa sensible a molibdato sin afectar ni al contenido de ureidos ni a la actividad nucleotidasa. Estos resultados sugieren que la actividad fosfatasa resistente a molibdato (nucleotidasa) sería la enzima responsable del catabolismo de nucleótidos implicada en la síntesis de ureidos.
3. Por primera vez en plantas se ha purificado e identificado una proteína con actividad fosfatasa resistente a molibdato. Esta característica es inusual entre las fosfatasas ácidas. La proteína mostró mayor afinidad por los nucleótidos y se inhibió fuertemente por nucleósidos, lo que sugiere que la enzima estaría implicada en el metabolismo de nucleótidos y en la síntesis de ureidos.
4. El ADNc identificado a partir de la proteína purificada de 55 kDa, codifica una proteína con actividad 5'-nucleotidasa resistente a molibdato.
5. La actividad fosfatasa de 100 kDa sensible a molibdato es la actividad mayoritaria en ejes de judía y corresponde a una fosfatasa ácida púrpura. La caracterización cinética indica que esta fosfatasa no estaría relacionada con el metabolismo de nucleótidos.

6. En respuesta a condiciones adversas, ambas actividades fosfatasas se indujeron en las raíces de las plántulas, apoyando la hipótesis de que la fosfatasa de 100 kDa podría tener una función en la respuesta a estrés abiótico y la mayor actividad de la proteína de 55 kDa podría estar relacionada con el incremento en la concentración de ureidos.

**VII. BIBLIOGRAFÍA**



- Al-Karaki, G. N. (2001). Germination, sodium, and potassium concentrations of barley seeds as influenced by salinity. *Journal of Plant Nutrition* 24: 511-22.
- Al-Omair, M. A. (2010). Purification and biochemical characterization of acid phosphatase from *Vigna aconitifolia*. *American Journal of Plant Physiology* 5: 361-370.
- Anand, A. y Srivastava, P. K. (2012). A molecular description of acid phosphatase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167: 2174-97.
- Ashihara, H. y Suzuki, T. (2004). Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. *Frontiers in Bioscience* 9: 1864-76.
- Ashihara, H., Sano, H. y Crozier, A. (2008 a). Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry* 69: 841-56.
- Ashihara, H., Luit, B., Belmonte, M. y Stasolla, C. (2008 b). Metabolism of nicotinamide, adenine and inosine in developing microspore-derived canola (*Brassica napus*) embryos. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 752-759.
- Berger, S., Bell, E., Sadka, A. y Mullet, J. E. (1995). *Arabidopsis thaliana* Atvsp is homologous to soybean VSP a and VSP b, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. *Plant Molecular Biology* 27: 933-42.
- Bernard, C., Traub, M., Kunz, H. H., Hach, S., Trentmann, O. y Möhlmann, T. (2011). Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) is critical for pollen germination and vegetative growth in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 62: 4627-37.
- Bethke, P. C., Libourel, I. G. L. y Jones, R. L. (2007 a). Nitric oxide in seed dormancy and germination, in: Bradford, K. J. y Nonogaki

- H. (Eds.), Seed development, dormancy and germination. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 153–175.
- Bethke, P. C., Libourel, I. G. L., Aoyama, N., Chung, Y.-Y., Still, D.W. y Jones, R.L. (2007 b). The *Arabidopsis* aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiology* 143: 1173–1188.
- Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-66.
- Bozzo, G. G., Raghothama, K. G. y Plaxton, W. C. (2002). Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *European Journal of Biochemistry* 269: 6278-86.
- Bozzo, G. G., Raghothama, K. G. y Plaxton, W. C. (2004 a). Structural and kinetic properties of a novel purple acid phosphatase from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *Biochemical Journal* 377: 419-28.
- Bozzo, G. G., Singh, V. K. y Plaxton, W. C. (2004 b). Phosphate or phosphite addition promotes the proteolytic turnover of phosphate-starvation inducible tomato purple acid phosphatase isozymes. *Febs Letters* 573: 51-54.
- Bozzo, G. G., Dunn, E. L. y Plaxton, W. C. (2006). Differential synthesis of phosphate-starvation inducible purple acid phosphatase isozymes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) suspension cells and seedlings. *Plant Cell and Environment* 29: 303-13.
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54.

- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. y Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus spp.*) model food legumes. *Plant and Soil* 252: 55-128.
- Brychkova, G., Alikulov, Z., Fluhr, R. y Sagi, M. (2008). A critical role for ureides in dark and senescence induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1 Arabidopsis* mutant. *Plant Journal* 54: 496-509.
- Buchanan-Wollaston, V. (1997). The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 48: 181–199
- Bürkle, L., Cedzich, A., Döpke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kühn, C. y Frommer, W. B. (2003). Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 34: 13-26.
- Cabra, V., Arreguin, R., Vazquez-Duhalt, R. y Farres, A. (2006). Effect of temperature and ph on the secondary structure and processes of oligomerization of 19 kDa alpha-zein. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1764: 1110-18.
- Campos, A., Rijo-Johansen, M. J., Carreiro, M. F. y Fevereiro, P. (2005). Purification and characterisation of adenosine nucleosidase from *Coffea arabica* young leaves. *Phytochemistry* 66: 147-51.
- Cao, Y. J. y Schubert, K. R. (2001). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding soybean nodule IMP dehydrogenase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* 1520: 242-46.
- Cao, Z., Geng, B., Xu, S., Xuan, W., Nie, L., Shen, W., Liang, Y. y Guan, R. (2011). *BnHO1*, a haem oxygenase-1 gene from *Brassica napus*, is required for salinity and osmotic stress-

- induced lateral root formation. *Journal of Experimental Botany* 62: 4675-89.
- Carter, S. G. y Tipton, C. L. (1986). Purification and characterization of a 5-nucleotidase from *Zea mays* microsomes. *Phytochemistry* 25: 33-37.
- Cashikar, A. G., Kumaresan, R. y Rao, N. M. (1997). Biochemical characterization and subcellular localization of the red kidney bean purple acid phosphatase. *Plant Physiology* 114: 907-15.
- Cerda, A., Bingham, F. T. y Hoffman, G. J. (1977). Interactive effect of salinity and phosphorus on sesame. *Soil Science Society of America Journal* 45: 915-18.
- Coba de la Pena, T. y Pueyo, J. J. (2012). Legumes in the reclamation of marginal soils, from cultivar and inoculant selection to transgenic approaches. *Agronomy for Sustainable Development* 32: 65-91.
- Coleman, F., Hynes, M. J. y Erxleben, A. (2010). Ga-III Complexes as models for the M-III site of purple acid phosphatase: ligand effects on the hydrolytic reactivity toward bis (2,4-dinitrophenyl) phosphate. *Inorganic Chemistry* 49: 6725-33.
- Crozier, A., Burns, J., Aziz, A. A., Stewart, A. J., Rabiasz, H. S, Jenkins, G. I., Edwards, C. A. y Lean, M. E. J. (2000). Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biological Research* 33: 79-88.
- Chartzoulakis, K. y Klapaki, G. (2000). Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Scientia Horticulturae* 86: 247-60.
- Chen, F., Dahal, P. y Bradford, K. J. (2001). Two tomato expansin genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination. *Plant Physiology* 127: 928-36.

- Chen, Y., Chao, Y., Hsu, Y. Y., Hong, C. y Kao, C. (2012). Heme oxygenase is involved in nitric oxide and auxin induced lateral root formation in rice. *Plant Cell Reports* 31: 1085-91.
- Christensen, T. y Jochimsen, B. U. (1983). Enzymes of ureide synthesis in pea and soybean. *Plant Physiology* 72: 56-59.
- Del Pozo, J. C., Allona, I., Rubio, V., Leyva, A., de la Pena, A., Aragoncillo, C. y Paz-Ares, J. (1999). A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising oxidative stress conditions. *Plant Journal* 19: 579-89.
- Desimone, M., Catoni, E., Ludewig, U., Hilpert, M., Schneider, A., Kunze, R., Tegeder, M., Frommer, W.B. y Schumacher, K. (2002). A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 847-56.
- De Wald, D. B., Mason, H. S. y Mullet, J. E. (1992). The soybean vegetative storage proteins VSP-alpha and VSP-beta are acid-phosphatases active on polyphosphates. *Journal of Biological Chemistry* 267: 15958-64.
- Diaz-Leal, J., Galvez-Valdivieso, G., Fernandez, J., Pineda, M. y Alamillo, J. M. (2012). Developmental effects on ureide levels are mediated by tissue-specific regulation of allantoinase in *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany* 63: 4095-106.
- Dinkins, R. D., Majee, S. M., Nayak, N. R., Martin, D., Xu, Q., Belcastro, M. P., Houtz, R. L., Beach, C. M. y Downie, A. B. (2008). Changing transcriptional initiation sites and alternative 5'- and 3'-splice site selection of the first intron deploys *Arabidopsis* protein isoaspartyl methyltransferase2 variants to different subcellular compartments. *Plant Journal* 55: 1-13.

- Doremus, H. D. y Blevins, D. G. (1988). Nucleoside diphosphatase and 5-nucleotidase activities of soybean root nodules and other tissues. *Plant Physiology* 87: 36-40.
- Duff, S. M. G., Sarath, G. y Plaxton, W. C. (1994). The role of acid-phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiologia Plantarum* 90: 791-800.
- Durmus, A., Eicken, C., Sift, B. H., Kratel, A., Kappl, R., Huttermann, J. y Krebs, B. (1999). The active site of purple acid phosphatase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*), metal content and spectroscopic characterization. *European Journal of Biochemistry* 260: 709-16.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. y von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology* 300: 1005-1006.
- Ferreira, C. V., Granjeiro, J. M., Taga, E. M. y Aoyama, H. (1998). Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatases. *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 487-94.
- Garcia, N. A. T., Olivera, M., Iribarne, C. y Lluch, C. (2004). Partial purification and characterization of a non-specific acid phosphatase in leaves and root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 585-91.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. y Bairoch, A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* 31: 3748-3788.
- Gellatly, K. S., Moorhead, G. B. G., Duff, S. M. G., Lefebvre, D. D. y Plaxton, W. C. (1994). Purification and characterization of a potato tuber acid phosphatase having significant phosphotyrosine phosphatase activity. *Plant Physiology* 106: 223-32.

- Gepstein, S. (2004). Leaf senescence not just a wear and tear phenomenon. *Genome Biology* 5: 212-215.
- Gepts, P. y Bliss, F. A. (1988). Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II Europe and Africa. *Economic Botany* 42: 86-104.
- Gibson, T. S. (1988). Carbohydrate metabolism and phosphorus salinity interactions in wheat (*Triticum aestivum* L). *Plant and Soil* 111: 25-35.
- Gimeno-Gilles, C., Lelievre, E., Viau, L., Malik-Ghulam, M., Ricoult, C., Niebel, A., Leduc, N. y Limami, A. M. (2009). ABA-Mediated inhibition of germination is related to the inhibition of genes encoding cell wall biosynthetic and architecture: modifying enzymes and structural proteins in *Medicago truncatula* embryo axis. *Molecular Plant* 2: 108-19.
- Gomes-Filho, E, Farias Machado Lima, C. R., Costa, J. H., Marinho da Silva., A. C. Silva Lima, M., Feitosa de Lacerda, C. Prisco, J. T. (2008). Cowpea ribonuclease: properties and effect of NaCl salinity on its activation during seed germination and seedling establishment. *Plant Cell Reports* 27: 147-57.
- Granjeiro, P. A., Ferreira, C. V., Granjeiro, J. M., Taga, E. M. y Aoyama, H. (1999). Purification and kinetic properties of a castor bean seed acid phosphatase containing sulfhydryl groups. *Physiologia Plantarum* 107: 151-58.
- Grattan, S. R. y Grieve, C. M. (1999). Salinity mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae* 78: 127-57.
- Guo, J. y Pesacreta, T. C. (1997). Purification and characterization of an acid phosphatase from the bulb of *Allium cepa* L var Sweet Spanish. *Journal of Plant Physiology* 151: 520-27.

- Gupta, A. y Sharma, C. B. (1996). Purification to homogeneity and characterization of plasma membrane and Golgi apparatus-specific 5-adenosine monophosphatases from peanut cotyledons. *Plant Science* 117: 65-74.
- Han, B., Hughes, D. W., Galau, G. A., Bewley, J. D. y Kermodé, A. R. (1997). Changes in late-embryogenesis-abundant (LEA) messenger RNAs and dehydrins during maturation and premature drying of *Ricinus communis* L seeds. *Planta* 201: 27-35.
- Hanson, A. D. y Gregory, J. F. (2002). Synthesis and turnover of folates in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 244-49.
- Hegeman, C. E. y Grabau, E. A. (2001). A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. *Plant Physiology* 126: 1598-608.
- Hendricks, S. B. y Taylorson, R. B. (1974). Promotion of seed germination by nitrate, nitrite, hydroxylamine, and ammonium salts. *Plant Physiology* 54: 304-309.
- Herz, S., Eberhardt, S. y Bacher, A. (2000). Biosynthesis of riboflavin in plants. The ribA gene of *Arabidopsis thaliana* specifies a bifunctional GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *Phytochemistry* 53: 723-31.
- Heukeshoven, J. y Dernick, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6: 103-12.
- Hoehamer, C. F., Mazur, C. S. y Wolfe, N. L. (2005). Purification and partial characterization of an acid phosphatase from *Spirodela oligorrhiza* and its affinity for selected organophosphate pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 90-97.

- Hourmant, A. y Pradet, A. (1981). Oxidative phosphorylation in germinating lettuce seeds (*Lactuca sativa*) during the first hours of imbibition. *Plant Physiology* 68 631–635.
- Howell, K. A., Narsai, R., Carroll, A., Ivanova, A., Lohse, M., Usadel, B., Millar, A. H. y Whelan, J. (2009). Mapping metabolic and transcript temporal switches during germination in rice highlights specific transcription factors and the role of RNA instability in the germination process. *Plant Physiology* 149: 961-80.
- Hurley, B. A., Tran, H. T., Marty, N. J., Park, J., Snedden, W. A., Mullen, R. T. y Plaxton, W. C. (2010). The dual targeted purple acid phosphatase isozyme AtPAP26 is essential for efficient acclimation of *Arabidopsis* to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiology* 153: 1112-22.
- Ishibashi, N. y Minamikawa, T. (1990). Molecular cloning and characterization of stored messenger-RNA in cotyledons of *Vigna-unguiculata*. *Plant and Cell Physiology* 31: 39-44.
- Jiang, L. y Kermodé, A. R. (1994). Role of desiccation in the termination of expression of genes for storage proteins. *Seeds Science Research* 4: 149-173
- Jung, B., Floerchinger, M., Kunz, H., Traub, M., Wartenberg, R., Jeblick, W., Neuhaus, H. E. y Moehlmann, T. (2009). Uridine-ribohydrolase is a key regulator in the uridine degradation pathway of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 876-91.
- Kaida, R., Hayashi, T. y Kaneko, T. S. (2008). Purple acid phosphatase in the walls of tobacco cells. *Phytochemistry* 69: 2546-51.
- Kaida, R., Serada, S., Norioka, N., Norioka, S., Neumetzler, L., Pauly, M., Sampedro, J., Zarra, I., Hayashi, T. y Kaneko, T. S. (2010). Potential role for purple acid phosphatase in the dephosphorylation of wall proteins in tobacco cells. *Plant Physiology* 153: 603-10.

- Katahira, R. y Ashihara, H. (2002). Profiles of pyrimidine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (*Solanum tuberosum* L.) Tubers. *Planta* 215: 821-28.
- Katahira, R. y Ashihara, H. (2006). Profiles of purine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (*Solanum tuberosum* L.) Tubers. *Planta* 225: 115-26.
- Katewa, S. D. y Katyare, S. S. (2003). A simplified method for inorganic phosphate determination and its application for phosphate analysis in enzyme assays. *Analytical Biochemistry* 323: 180-87.
- Kaya, C., Kirnak, H., y Higgs, D. (2001). Effects of supplementary potassium and phosphorus on physiological development and mineral nutrition of cucumber and pepper cultivars grown at high salinity (NaCl). *Journal of Plant Nutrition* 24: 1457-71.
- Kennedy, R. A., Rumpho, M. E. Fox, T. C. (1992). Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiology* 100: 1-6.
- Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D. W., Barsam, B., Veretnik, S. y Gribskov, M. (2002). The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129: 908-25.
- Khan, M. S. A., Hamid, A. y Karim, M. A. (1997). Effect of sodium chloride on germination and seedling characters of different types of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift Fur Acker Und Pflanzenbay* 179: 163-69.
- Kim, J. H., Delauney, A. J. y Verma, D. P. S. (1995). Control of de-novo purine biosynthesis genes in ureide producing legumes: induction of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase gene and characterization of its cDNA from soybean and vigna. *Plant Journal* 7: 77-86.
- Klabunde, T., Stahl, B., Suerbaum, H., Hahner, S., Karas, M., Hillenkamp, F., Krebs, B. y Witzel, H. (1994). The aminoacid

- sequence of the red kidney bean Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase. Determination of the amino acid sequence by a combination of matrix-assisted laser-desorption ionization mass-spectrometry and automated edman sequencing. *European Journal of Biochemistry* 226: 369-75.
- Klabunde, T., Strater, N., Krebs, B. y Witzel, H. (1995). Structural relationship between the mammalian Fe(III)-Fe(II) and the Fe (III)-Zn(II) plant purple acid phosphatases. *Febs Letters* 367: 56-60.
- Kouas, S., Debez, A., Slatni, T., Labidi, N., Drevon, J. J. y Abdelly, C. (2009). Root proliferation, proton efflux, and acid phosphatase activity in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under phosphorus shortage. *Journal of Plant Biology* 52: 395-402.
- Kuang, R. B., Chan, K. H., Yeung, E. y Lim, B. L. (2009). Molecular and biochemical characterization of AtPAP15, a purple acid phosphatase with phytase activity, in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151: 199-209.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lai, Y. F., Thompson, J. E. y Barrell, R. W. (1971). Changes in 5-nucleotidase and glucose-6-phosphatase of *Phaseolus vulgaris* cotyledon tissue during germination. *Phytochemistry* 10: 41-49.
- Leelapon, O., Sarath, G. y Staswick, P. E. (2004). A single amino acid substitution in soybean VSP alpha increases its acid phosphatase activity nearly 20-fold. *Planta*, 219: 1071-79.
- Lefebvre, D. D., Duff, S. M. G., Fife, C. A., Julieninsingh, C. y Plaxton, W. C. (1990). Response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cells. Enhancement of intracellular, cell-surface, and secreted phosphatase-activities compared to increases in Pi-absorption rate. *Plant Physiology* 93: 504-11.

- Leubner-Metzger, G. (2005).  $\beta$ -1,3-Glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. *Plant Journal* 41: 133-45.
- Li, D. P., Zhu, H. F., Liu, K. F., Liu, X., Leggewie, G., Udvardi, M. y Wang, D. W. (2002). Purple acid Phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. *Journal of Biological Chemistry* 277: 27772-81.
- Li, W. Y. F., Shao, G. y Lam, H. M. (2008). Ectopic expression of GmPAP3 alleviates oxidative damage caused by salinity and osmotic stresses. *New Phytologist* 178: 80-91.
- Liang, C. Y., Tian, J., Lam, H. M., Lim, B. L., Yan, X. L. y Liao, H. (2010). Biochemical and molecular characterization of PvPAP3, a novel purple acid phosphatase isolated from common bean enhancing extracellular ATP utilization. *Plant Physiology* 152: 854-65.
- Liao, H., Wong, F. L., Phang, T. H., Cheung, M. Y., Li, W. Y. F., Shao, G., Yan, X. L. y Lam, H. M. (2003). GmPAP3, a novel purple acid phosphatase-like gene in soybean induced by NaCl stress but not phosphorus deficiency. *Gene* 318: 103-11.
- Lim, E. K. y Bowles, D. J. (2004). A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *EMBO Journal* 23: 2915-22.
- Linkies, A. y Leubner-Metzger, G. (2012). Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Reports* 31: 253-70.
- Liu, Y. L., Ahn, J. E., Datta, S., Salzman, R. A., Moon, J., Huyghues-Despointes, B., Pittendrigh, B., Murdock, L. L., Koiwa, H. y Zhu-Salzman, K. (2005). *Arabidopsis* vegetative storage protein is an anti-insect acid phosphatase. *Plant Physiology* 139: 1545-56.

- Lung, S. C., Leung, A., Kuang, R., Wang, Y., Leung, P. y Lim, B. L. (2008). Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase. *Phytochemistry* 69: 365-73.
- Mansour, M. M. F. (2000). Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biologia Plantarum* 43: 491-500.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., De Weese-Scott, C., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwads, M., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C. J., Lu, F., Marchler, G. H., Mullokandov, M. V., Omelchenko, M. V., Robertson, C. L., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C. y Bryant, S. H. (2011). CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research* 39: 225-229.
- Matsuda, O., Sakamoto, H., Nakao, Y., Oda, K. E iba, K. (2009). CTD phosphatases in the attenuation of wound induced transcription of jasmonic acid biosynthetic genes in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 57: 96-108.
- Milanesi, L., D'Angelo, D. y Rogozin I. (1999). GeneBuilder: interactive *in silico* prediction of gene structure. *Bioinformatics* 15: 612:621.
- Mitic, N., Smith, S. J., Neves, A., Guddat, L. W., Gahan, L. R. y Schenk, G. (2006). The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. *Chemical Reviews* 106: 3338-63.
- Mittal, R., Das, J. y Sharma, C. B. (1988). Purification and characterization of 5-nucleotidase from the Golgi apparatus of peanut cotyledons. *Plant Science* 55: 93-101.

- Mohlmann, T., Bernard, C., Hach, S. y Neuhaus, H. E. (2010). Nucleoside transport and associated metabolism. *Plant Biology* 12: 26-34.
- Morohashi, Y. y Bewley, J. D. (1980). Development of mitochondrial activities in pea cotyledons: influence of desiccation during and following germination of the axis. *Plant Physiology* 66: 637–640.
- Morohashi, Y. (1986). Patterns of mitochondrial development in reserve tissues of germinated seeds: a survey. *Physiologia Plantarum* 66: 653–658.
- Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshihara, T., Kamiya, Y. Nambara, E. (2005). Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant Journal* 41: 697-709.
- Nakagawa, A. Sakamoto, S., Takahashi, M., Morikawa, H. y Sakamoto, A. (2007). The RNAi-mediated silencing of xanthine dehydrogenase impairs growth and fertility and accelerates leaf senescence in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant and Cell Physiology* 48: 1484-1495.
- Nasri, N., Kaddour, R., Rabhi, M., Plassard, C. y Lachaal, M. (2011). Effect of salinity on germination, phytase activity and phytate content in lettuce seedling. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 935-942.
- Nicolas, G. y Aldasoro, J. J. (1979). Activity of the pentose-phosphate pathway and changes in nicotinamide nucleotide content during germination of seeds of *Cicer arietinum*-L. *Journal of Experimental Botany* 30: 1163-70.
- Nieman, R. H. y Clark, R. A. (1976). Interactive effects of salinity and phosphorus nutrition on concentrations of phosphate and phosphate esters in mature photosynthesizing corn leaves. *Plant Physiology* 57: 157-61.

- Nonogaki, H., Bassel, G. W. y Bewley, J. D. (2010). Germination-Still a mystery. *Plant Science* 179: 574-81.
- Noriega, G., Santa Cruz, D., Batlle, A., Tomaro, M. y Balestrasse, K. (2012). Heme oxygenase is involved in the protection exerted by jasmonic acid against cadmium stress in soybean roots. *Journal of Plant Growth Regulation* 31: 79-89.
- Nunes, A., Correia, I., Barros, A. y Delgadillo, I. (2005). Characterization of kafirin and zein oligomers by preparative sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 639-43.
- Olczak, M. y Watorek, W. (1998). Oligosaccharide and polypeptide homology of lupin (*Lupinus luteus* L.) acid phosphatase subunits. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 360: 85-92.
- Olczak, M., Morawiecka, B. y Watorek, W. (2003). Plant purple acid phosphatases genes, structures and biological function. *Acta Biochimica Polonica* 50: 1245-56.
- Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Farrant, J. M. Cooper, K. Belghazi M., Job, D. Job, C., Corbineau, F. y Bailly, C. (2007). ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant Journal* 50: 452-465.
- Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek, R., Corbineau, F. y Bailly, C. (2009). The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiology* 150: 494-505.
- Oria, M. P., Hamaker, B. R. y Shull, J. M. (1995). Resistance of sorghum alpha-kafirins, beta-kafirins, and gamma-kafirins to pepsin digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2148-53.

- Ostergaard, J., Larsen, K. y Jochimsen, B. U. (1991). 5-Nucleotidase from soybean (*Glycine max*) root nodules partial purification and characterization regulation in sterile tissue culture. *Journal of Plant Physiology* 138: 387-93.
- Penheiter, A. R., Duff, S. M. G. y Sarath, G. (1997). Soybean root nodule acid phosphatase. *Plant Physiology* 114: 597-604.
- Penheiter, A. R., Klucas, R. V. y Sarath, G. (1998). Purification and characterization of a soybean root nodule phosphatase expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 14: 125-130.
- Pramanik, S. K. y Bewley, J. D. (1996). Post-transcriptional regulation of protein synthesis during alfalfa embryogenesis: proteins associated with the cytoplasmic polysomal and non-polysomal mRNAs (messenger ribonucleoprotein complex). *Journal of Experimental Botany* 47: 1871–1879.
- Preston, J., Tatematsu, K., Kanno, Y., Hobo, T., Kimura, M., Jikumaru, Y., Yano, R., Kamiya, Y. y Nambara, E. (2009). Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds: A comparative study on dormant and non-dormant accessions. *Plant and Cell Physiology* 50: 1786-800.
- Quiles, F. A., Raso, M.J., Pineda, M. y Piedras, P. (2009). Ureide metabolism during seedling development in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiologia Plantarum* 135: 19-28.
- Raghothama, K. G. (1999). Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 665-93.
- Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Vandekerckhove, J., Job, C. y Job, D. (2004). The effect of alpha-amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and

- neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiology* 134: 1598-613.
- Raso, M. J. (2008). Catabolismo de la alantoina y el alantoato en *phaseolus vulgaris*. Tesis Doctoral: Universidad de Córdoba.
- Reidl, J., Schlor, S., Kraiss, A., Schmidt-Brauns, J., Kemmer, G. y Soleva, E. (2000). NADP and NAD utilization in *Haemophilus influenzae*. *Molecular Microbiology* 35: 1573-81.
- Reynolds, P. H. S., Blevins, D. G. y Randall, D. D. (1984). 5-Phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from soybean root nodules kinetic and regulatory properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 229: 623-31.
- Riegler, H., Geserick, C. y Zrenner, R. (2011). *Arabidopsis thaliana* nucleosidase mutants provide new insights into nucleoside degradation. *New Phytologist* 191: 349-59.
- Rinaldo-Matthis, A., Rampazzo, C., Reichard, P., Bianchi, V. y Nordlund, P. (2002). Crystal structure of a human mitochondrial deoxyribonucleotidase. *Nature Structural Biology* 9: 779-787.
- Rodríguez-Gacio, M., Matilla-Vázquez, M. A., Matilla, A. J. (2009). Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on. *Plant Signaling & Behavior* 4:1035-1049.
- Roknabadi, S. M., Bose, S. K. y Taneja, V. (1999). A histidine thiol 100 kDa, tetrameric acid phosphatase from lentil, *Lens esculenta*, seeds with the characteristics of protein tyrosine phosphatases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1433: 272-80.
- Sagi, M., Omarov, R. T. y Lips, S. H. (1998). The Mo-hydroxylases xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase in ryegrass as affected by nitrogen and salinity. *Plant Science* 135: 125-35.

- Salon, C., Raymond, P. y Pradet, A. (1988). Quantification of carbon fluxes through the tricarboxylic acid cycle in early germinating lettuce embryos. *Journal of Biological Chemistry* 263: 12278-87.
- Sandoval, J. A., Huang, Z. H., Carrett, D. C., Gage, D. A. y Chapman K. D. (1995). N-Acylphosphatidylethanolamine in dry and imbibing cotton seeds. Amounts, molecular species, and enzymatic synthesis. *Plant Physiology* 109: 269-275.
- Schenk, G., Guddat, L. T., Ge, Y. Carrington, L. E., Hume, D. A., Hamilton, S. y de Jersey, J. (2000). Identification of mammalian like purple acid phosphatases in a wide range of plants. *Gene* 250: 117-25.
- Schenk, G., Boutchard, C. L., Carrington, L. E., Noble, C. J., Moubaraki, B., Murray, K. S., de Jersey, J., Hanson, G. R. y Hamilton, S. (2001). A purple acid phosphatase from sweet potato contains an antiferromagnetically coupled binuclear Fe-Mn center. *Journal of Biological Chemistry* 276: 19084-88.
- Schenk, G., Gahan, L. R., Carrington, L. E., Mitic, N., Valizadeh, M., Hamilton, S. E., de Jersey, J. y Guddat, L. W. (2005). Phosphate forms an unusual tripod complex with the Fe-Mn center of sweet potato purple acid phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 273-78.
- Schenk, G., Elliott, T. W., Leung, E., Carrington, L. E., Mitic, N., Gahan, L. R. y Guddat, L. W. (2008). Crystal structures of a purple acid phosphatase, representing different steps of this enzymes catalytic cycle. *Bmc Structural Biology* 8: 1-13.
- Schoor, S. y Moffatt, B. A. (2004). Applying high throughput techniques in the study of adenosine kinase in plant metabolism and development. *Frontiers in Bioscience* 9: 1771-81.

- Sharma, C. B., Mittal, R., y Tanner, W. (1986). Purification and properties of a glycoprotein adenosine 5-monophosphatase from the plasma membrane fraction of *Arachis hypogaea* cotyledons. *Biochimica Et Biophysica Acta* 884: 567-77.
- Shubra, Dayal, J., Goswami, C. L. y Munjal, R. (2004). Influence of phosphorus application on water relations, biochemical parameters and gum content in cluster bean under water deficit. *Biologia Plantarum* 48: 445-48.
- Simonovic, A. D., Gaddameedhi, S. y Anderson, M. D. (2004). In-gel precipitation of enzymatically released phosphate. *Analytical Biochemistry* 334: 312-17.
- Singh, U. (1999). Cooking quality of pulses. *Journal of Food Science and Technology-Mysore* 36: 1-14.
- Smith, P. M. C. y Atkins, C. A. (2002). Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology* 128: 793-802.
- Sreenivasulu, K., Raghu, P., Ravinder, P. y Nair, K. M. (2008). Effect of dietary ligands and food matrices on zinc uptake in Caco-2 Cells: Implications in assessing zinc bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 10967-72.
- Stasolla, C., Katahira, R., Thorpe, T. A. y Ashihara, H. (2003). Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 160: 1271-95.
- Staswick, P. E., Papa, C., Huang, J. F. y Rhee, Y. (1994). Purification of the major soybean leaf acid phosphatase that is increased by seed pod removal. *Plant Physiology* 104: 49-57.
- Strassner, J., Schaller, F., Frick, U. B., Howe, G. A., Weiler, E. W., Amrhein, N., Macheroux, P. y Schaller, A. (2002). Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for

- octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant Journal* 32: 585-601.
- Strater, N., Klabunde, T., Tucker, P., Witzel, H. y Krebs, B. (1995). Crystal structure of a purple acid phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active site. *Science* 268: 1489-92.
- Szuwart, M., Starzynska, E., Pietrowska-Borek, M. y Guranowski, A. (2006). Calcium stimulated guanosine inosine nucleosidase from yellow lupin (*Lupinus luteus*). *Phytochemistry* 67: 1476-85.
- Takai, A. y Mieskes, G. (1991). Inhibitory effect of okadaic acid on the *para*-nitrophenyl phosphate phosphatase activity of protein phosphatases. *Biochemical Journal* 275: 233-39.
- Todd, C. D., Tipton, P. A., Blevins, D. G., Piedras, P., Pineda, M. y Polacco, J. C. (2006). Update on ureide degradation in legumes. *Journal of Experimental Botany* 57: 5-12.
- Tolleter, D., Jaquinod, M., Mangavel, C. Passirani, C. Saulnier, P. Manon, S. Teyssier, E. Payet, N. Avelange-Macherel, M.-H. y Macherel, D. (2007). Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *Plant Cell* 19: 1580–1589.
- Tran, H. T., Hurley, B. A. y Plaxton, W. C. (2010). Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. *Plant Science* 179: 14-27.
- Tran, Hue T. y Plaxton, William C. (2008). Proteomic analysis of alterations in the secretome of *Arabidopsis thaliana* suspension cells subjected to nutritional phosphate deficiency. *Proteomics* 8: 4317-4326.
- Turner, W. L. y Plaxton, W. C. (2001). Purification and characterization of banana fruit acid phosphatase. *Planta* 214: 243-49.
- Vander Willigen, C., Postaire, O., Tournaire-Roux, C., Boursiac, Y. y Maurel, C. (2006). Expression and inhibition of aquaporins in

- germinating. *Arabidopsis* seeds *Plant and Cell Physiology* 47:1241-50.
- Veljanovski, V., Major, I. T., Patton, J. J., Bol, E., Louvet, S., Hawkins, B. J. y Constabel, C. P. (2010). Induction of acid phosphatase transcripts, protein and enzymatic activity by simulated herbivory of hybrid poplar. *Phytochemistry* 71: 619-26.
- Veljanovski, V., Vanderbeld, B., Knowles, V. L., Snedden, W. A. y Plaxton, W. C. (2006). Biochemical and molecular characterization of AtPAP26, a vacuolar purple acid phosphatase up regulated in phosphate deprived *Arabidopsis* suspension cells and seedlings. *Plant Physiology* 142: 1282-93.
- Vincent, J. B., Crowder, M. W. y Averill, B. A. (1992). Hydrolysis of phosphate monoesters a biological problem with multiple chemical solutions. *Trends in Biochemical Sciences* 17: 105-10.
- Vogels, G. D. y Vanderdrift, C. (1970). Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Analytical Biochemistry* 33: 143-157.
- Voigt, E. L., Almeida, T. D., Chagas, R. M., Ponte, L. F. A., Viegas, R. A. y Silveira, J. A. G. (2009). Source-sink regulation of cotyledonary reserve mobilization during cashew (*Anacardium occidentale*) seedling establishment under NaCl salinity. *Journal of Plant Physiology* 166: 80-89.
- Wang, D. L., Holz, R. C., David, S. S., Que, L. y Stankovich, M. T. (1991). Electrochemical properties of the di-iron core of uteroferrin and its anion complexes. *Biochemistry* 30: 8187-94.
- Watanabe, S., Nakagawa, A., Izumi, S., Shimada, H. y Sakamoto, A. (2010). RNA interference-mediated suppression of xanthine dehydrogenase reveals the role of purine metabolism in drought tolerance in *Arabidopsis*. *Febs Letters* 584: 1181-86.

- Werner, A. K. y Witte, C. P. (2011). The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. *Trends in Plant Science* 16: 381-87.
- Wojtyla, L., Garnczarska, M., Zalewski, T., Bednarski, W., Ratajczak, L., y Jurga, S. (2006). A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. *Journal of Plant Physiology* 163: 1207–1220.
- Xie, Y. J., Cui, W. T., Yuan, X. X., Shen, W. B. y Yang, Q. (2011). Heme oxygenase-1 is associated with wheat salinity Acclimation by modulating reactive oxygen species homeostasis. *Journal of Integrative Plant Biology* 53: 653-70.
- Xu, S., Lou, T. L., Zhao, N., Gao, Y., Dong, L. H., Jiang, D. J., Shen, W. B., Huang, L. Q. y Wang, R. (2011). Presoaking with hemin improves salinity tolerance during wheat seed germination. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 1173-83.
- Xuan, W., Xu, S., Li, M., Han, B., Zhang, B., Zhang, J., Lin, Y., Huang, J., Shen, W. y Cui, J. (2012). Nitric oxide is involved in hemin induced cucumber adventitious rooting process. *Journal of Plant Physiology* 169: 1032-39.
- Yeung, S., Cheng, C., Lui, T. K. O., Tsang, J. S. H., Chan, W. y Lim, B. L. (2009). Purple acid phosphatase like sequences in prokaryotic genomes and the characterization of an atypical purple alkaline phosphatase from *Burkholderia cenocepacia* J2315. *Gene* 440: 1-8.
- Yoneyama, T., Shiozawa, M., Nakamura, M., Suzuki, T., Sagane, Y., Katoh, Y., Watanabe, T. y Ohyama, T. (2004). Characterization of a novel acid phosphatase from embryonic axes of kidney bean exhibiting vanadate dependent chloroperoxidase activity. *Journal of Biological Chemistry* 279: 37477-84.

- Zhang, W., Gruszewski, H. A., Chevone, B. I. y Nessler, C. L. (2008). An *Arabidopsis* purple acid phosphatase with phytase activity increases foliar ascorbate. *Plant Physiology* 146: 431-40.
- Zhu, B. W., Yu, Z., Zhang, D. Y., Zhou, J.F., Yang, D. M. y Murata, Y. (2009). Purification and partial characterization of an acid phosphatase from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Process Biochemistry* 44: 875-879.
- Zhu, H., Qian, W., Lu, X., Li, D., Liu, X., Liu, K. y Wang, D. (2005). Expression patterns of purple acid phosphatase genes in *Arabidopsis* organs and functional analysis of AtPAP23 predominantly transcribed in flower. *Plant Molecular Biology* 59: 581–594
- Zhu, J. K. (2001). Cell signaling under salt water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 401-06.
- Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U. y Boldt, R. (2006). Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 805-36.

Las plántulas de judía (*Phaseolus vulgaris*) acumulan ureidos durante el desarrollo postgerminativo temprano, los cuales provienen de la degradación de nucleótidos de purinas. El primer paso de esta ruta está catalizado por una fosfatasa que transforma los nucleótidos en nucleósidos, enzima que hasta la fecha no ha sido identificada.

En este trabajo se han identificado, purificado y caracterizado las dos actividades fosfatasas con masas moleculares de 55 y 100 kDa mayoritarias en ejes en desarrollo de judía. Ambas se inducen tras la germinación de las semillas y se diferencian por su sensibilidad al molibdato, un inhibidor de fosfatasas ácidas. La actividad de la proteína de 55 kDa fue resistente a molibdato y presentó mayor constante de afinidad por los nucleótidos. La actividad de 100 kDa fue sensible a molibdato y presentó mayor afinidad por fosfoenol piruvato, tirosina-P y pirofosfato. Ambas proteínas se han identificado mediante MALDI-TOF/TOF y la proteína de 55 kDa se ha expresado como proteína recombinante en *Escherichia coli*. Se han analizado las implicaciones fisiológicas de ambas actividades durante el desarrollo postgerminativo de judía y en plántulas expuestas a condiciones de estrés y se han relacionado con el contenido de ureidos en los mismos tejidos y condiciones..



After germination and during postgerminative development, common bean (*Phaseolus vulgaris*) accumulates ureides derived from degradation of purines nucleotides. The first step in the conversion of purines to ureides is the removal of the 5' phosphate group by a phosphatase that has not been established yet. In this work two main phosphatase activities with molecular mass of 55 and 100 kDa were identified, purified and characterized in embryonic axes of common bean. Both activities were induced after radicle protrusion, and they differed in their sensibility to molybdate, a common phosphatase inhibitor. The enzyme of 55 kDa was resistant to molybdate and showed the highest phosphatase activity with the nucleotides as substrates. The enzyme of 100 kDa was sensitive to molybdate and showed the highest activity with phosphoenol pyruvate, tyrosine phosphate and pyrophosphate. A putative candidate gene coding for the enzyme of 55 kDa was cloned and overexpressed in *Escherichia coli*. The physiological implications for both activities and the ureides levels were analyzed during postgerminative development of common bean and in seedlings exposed to several stress conditions.



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal  
Sección de Fisiología Vegetal