

Tesis Doctoral

Caracterización bioquímica y molecular de nucleósido difosfato quinasa de *Solanum tuberosum* (StNDPKs): análisis de su expresión en la planta de papa en respuesta a estreses

Bachmann, Sandra D.

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bachmann, Sandra D.. (2012). Caracterización bioquímica y molecular de nucleósido difosfato quinasa de *Solanum tuberosum* (StNDPKs): análisis de su expresión en la planta de papa en respuesta a estreses. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bachmann, Sandra D.. "Caracterización bioquímica y molecular de nucleósido difosfato quinasa de *Solanum tuberosum* (StNDPKs): análisis de su expresión en la planta de papa en respuesta a estreses". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR

“Caracterización bioquímica y molecular de nucleósido difosfato quinasa de *Solanum tuberosum* (StNDPKs): análisis de su expresión en la planta de papa en respuesta a estreses”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Sandra D. Bachmann

Directora: Dra. Rita M. Ulloa

Consejera de Estudios: Dra. Sara Maldonado

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular
“Dr. Hector N. Torres” (INGEBI, CONICET)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Junio 2012

*Para Juana :
Por todo lo que descubrimos juntas,
y por todo lo que nos queda por descubrir*

*Ya sufriste cosas mejores que éstas
y vas a andar ésta ruta, hoy, cuando anochezca.
tu esqueleto te trajo hasta aquí
con un cuerpo hambriento, veloz.
y aquí, gracias a dios!
uno no cree en lo que oye.*

*Ángel de la soledad
y de la desolación,
preso de tu ilusión vas a bailar,
a bailar... bailar.*

*Es tan simple así (no podés elegir)
claro que no siempre, ¿ves? resulta bien
atado con doble cordel (el de simular)
no querés girar maniatado, querés faulear...
y arremolinar.*

*Medís tu acrobacia y saltás,
tu secreto es: -la suerte del principiante
no puede fallar*

*Alguna vez, quizá, se te va la mano
y las llamas en pena invaden tu cuerpo
y caés en manos del ángel de la soledad
y él, gracias a dios!
tampoco cree en lo que oye.*

*Ángel de la soledad
y de la desolación
preso de tu ilusión vas a bailar,
a bailar... bailar.
Por mis penas bailá
y por tu soledad.*

*Un ángel para tu soledad
Patricio Rey y sus redonditos de ricota*

Agradecimientos

A mi Familia:

A Emiliano, como decía Platón “La mayor declaración de amor es la que no se hace; el hombre que siente mucho, habla poco”. Gracias por acompañarme, por ayudarme a seguir con pie firme este camino que tanto me costó recorrer; tenerte a mi lado a diario es la más linda declaración de amor.

A Juana, por crecer tan linda y llenar los silencios con tu risa contagiosa y tus ocurrencias.

A Bruno, porque llegaste sobre el final de éste recorrido desbordando buen humor, resaltando las cosas que realmente son importantes en la vida.

Al Jardín de mi casa de Rosales, donde jugando descubrí la biología.

A mis papás y a mi hermana... crecer implica cambios y ser diferente está bien. Como siempre digo, una de las primeras cosas que la biología me enseñó es que en la diversidad está la diversión.

A mis amigas:

Pau, Leti, Dani, Marian. Es increíble recordar quienes éramos cuando nos conocimos y quienes somos ahora; para muchas cosas crecimos juntas y las siento parte de mi familia. Gracias por escucharme y acompañarme con tanta alegría en todos los momentos de mi vida.

Lau, Gaby, Belén. Gracias por las reuniones divertidas y los buenos chismes, es lindo seguir contando con ustedes!

A la familia Ayub Soto: Gaby, Nico, Benja y Matute. Por brindarme su amistad, cariño y conocimientos. Gracias por su calidez y generosidad!

A la familia Smurra Eijo: Guada, Dani, Martina y Lautaro. Por tantos buenos momentos de esparcimiento. Es muy lindo poder compartir con ustedes la crianza de nuestros peques!

A la Universidad, sus pasillos y sus docentes que continuaron enseñándome y siempre me recuerdan cual es el camino que elegí seguir.

Al Jardín Materno-infantil "Mi pequeña ciudad" y a todas las Señoras que durante éstos años cuidaron con la mayor dedicación a lo más importante que la vida me ha dado... mis hijos

A Patricia Miranda y a Renata Menedez- Helman, porque continuar en contacto con ustedes me ayudó a recordar que puedo y debo confiar en mi criterio.

A la Dra. Sara Maldonado, a Poli, Agustín, Hernán y a Verónica Lainez. Por enseñarme el mundo de las plantas y brindarme un nuevo espacio para seguir creciendo y seguir formándome como profesional.

Al grupo del Laboratorio de Reproducción y Fisiopatología Materno-Embrionaria de la Facu: gracias por la compañía, los consejos y el refugio.

A la gente del Salad Bar, por compartir sus trabajos, sus proyectos y su buena onda.

Al Dr. Claudio Pereira y a la Dra. Mariana Miranda, por su buena predisposición y generosidad.

A la Dra. Mariana Potenza por su buen criterio y asesoramiento, creo que sos una excelente profesional. Y a mi amiga personal Mariana Potenza, por los ricos almuerzos compartidos y por tu paciencia, asistencia e intervención en los momentos en que la realidad me superó.

Al 219 en general, por los buenos consejos. En especial a Marina Pais y Noelia Muñiz gracias por la generosidad y el espíritu crítico; a Naty Boynak gracias por esa risa contagiosa!

A mis compañeros de Laboratorio ...

Vero, gracias por la energía, la confianza y las enseñanzas.

Caro, recorrimos a la par un camino difícil, gracias por estar siempre atenta y dispuesta a ayudar.

Ceci, gracias por contagiar tu sano equilibrio... excelente observadora, criteriosa y silenciosa. Fuiste una gran contribución a la armonía del laboratorio. Me encantó compartir el espacio con vos.

A Nacho, gracias por tu colaboración y tu buena predisposición.

A Franco, ¡Sos como el Demonio de Tasmania pero más alegre! Gracias por ponerle

vértigo a la vida del Laboratorio y por colaborar conmigo en la última etapa de éste trabajo.

A Maga y a Eli, gracias por los mates laaaargos y la buena onda.

Al INGEBI por brindarme un espacio para hacer la Tesis y porque son una gran familia. Quiero recordar especialmente al Dr. Hector Torres, "El Doc" quien supo hacer realidad este Instituto; y agradecer a la Dra. Mirta Flawiá, por tener siempre abierta la puerta de su oficina. Tanto "El Doc" como Mirta siempre representaron para mí un buen ejemplo sobre como uno debe continuar mirando hacia adelante para avanzar, pero sin olvidar el camino recorrido.

Agradecimientos más que especiales a la Dra. María Teresa Tellez-Iñon por prestar espacio, equipos y reactivos. Y a "La Tere" por las ricas tortas, chocolates y facturas, dulces que reconfortan el alma!

A Gladys, Mari, Norma , Rubén, Irma, Mariano, Daniel y Marta. Por la buena predisposición y calidez, porque siempre que los necesitamos están ahí...

Quiero especialmente agradecer la colaboración de los siguientes investigadores del INGEBI:

A la Dra. Cristina Paveto, al Dr. Guillermo Alonso. Gracias por el aporte de conocimientos, reactivos y charlas divertidas con risas contagiosas. Fueron un gran catalizador en los momentos en donde me fallaba el autoencendido.

Al Dr. Fernando Bravo-Almoacid, Al Dr. Jorge Muschietti, a la Dra. Daniela Capiatti. Gracias por los buenos consejos, las críticas constructivas y los conocimientos transmitidos.

A Rita, por darme la oportunidad de desarrollar ésta tesis y por darme plena libertad de acción.

A todos mis compañeros del Instituto. Gracias, porque seguro en algún momento me prestaron algo... si no fue un buffer, habrá sido una enzima de restricción, ó un protocolo, ó una idea, un cuchillo, un tenedor, sal y aceite para la ensalada, un mate, una galletita ó algún otro etcétera

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y a CONICET por financiar el proyecto y mi formación académica.

INDICE

	PAGINA
Abreviaturas	6
Resumen	13
Abstract	15
INTRODUCCIÓN	17
1. Transducción de señales en plantas	18
1.1 Señales: características y percepción	18
1.2 Amplificación e integración de señales	22
2. Nucleosido di-fosfato quinasas (NDPKs)	24
2.1 Clasificación y características generales	26
2.2 Complejidad estructural	27
2.3 NDPK mitocondriales	28
2.4 NDPK descriptas en plantas	29
3. Mitocondrias en plantas	30
4 Modelo biológico: <i>Solanum tuberosum</i> L.	33
5. Transducción de señales en condiciones de estrés	37
5.1 Estrés abiótico	38
5.1.1 Estrés por bajas temperaturas	39
5.2 Herbivoría	40
RESULTADOS PREVIOS	43
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
MATERIALES Y MÉTODOS	45
MATERIALES	46
1. Material vegetal	46
1.1 - Cultivo de plantas de invernadero	46
1.2 - Plantas crecidas in vitro	46
1.3 - Brotación in vitro	46
2. Tratamientos experimentales	46
2.1 - Tratamientos relacionados con luz/oscuridad	46
2.2 - Tratamientos relacionados con estrés	47
2.2.1 Daño Mecánico	47
2.2.2 Acido jasmónico	47
2.2.3 Frío	47
3. Extractos de mitocondrias y cloroplastos purificados	47
4. Soluciones de uso general	47
4.1 - Soluciones empleadas en técnicas de ADN y ARN	47
4.2 - Soluciones empleadas en técnicas de proteínas	48
5. Oligonucleótidos	48
6. Plásmidos	49

7. Identificación de StNDPKs	49
7.1 - Ensayos de Southern Blot	49
8. Anticuerpos	49
9. Inhibidores	50
METODOS	50
1. Identificación de genes	50
1.1- Preparación y transformación de bacterias competentes Cepas DH5α y BL21 codon plus	50
1.2 - Purificación de plásmidos	50
1.3 - Secuenciación y análisis de las secuencias	51
1.4 - Marcación de sondas radioactivas	51
2. Técnicas generales	51
2.1 - Subclonado en el vector pGEM®-T Easy	51
2.2 - Otras reacciones de ligación	51
2.3 - Corte con enzimas de restricción	51
2.4 - Amplificaciones por PCR	51
2.5 - Electroforesis de ADN	52
2.6 - Purificación de fragmentos de ADN de geles	52
2.7 – Aislamiento y análisis de la región promotora de StNDPK1	52
2.8 – Análisis <i>in silico</i>	52
3. Caracterización molecular de genes identificados	53
3.1 - Cuantificación de ácidos nucleicos	53
3.2 - Extracción de ADN genómico	53
3.3 - Ensayos de Southern Blot	53
3.4 - Extracción de ARN total	54
3.5 - Electroforesis de ARN	54
3.6 –Transcripción reversa	55
3.7 - PCRs semicuantitativas	55
4. Estudios bioquímicos	55
4.1 - Extracción de proteínas	55
4.2 - Extracción de proteínas con TRIzol (Invitrogen)	55
4.3 - Cuantificación de proteínas	56
4.4 - Electroforesis de proteínas	56
4.5 - Ensayos de Western Blot	56
4.6 – Ensayos de actividad de NDPK	56
5. Proteína recombinante StNDPK1	57
5.1 – Clonado de StNDPK1 en un vector de expresión	57
5.2 - Expresión de StNDPK1 recombinante	57
5.3 - Purificación de proteínas recombinantes en condiciones nativas	57
6. Obtención de Anticuerpos	58
RESULTADOS	59
1. StNDPK1 en <i>Solanum tuberosum</i>	60
1.1 - Clonado de la secuencia codificante completa StNDPK1	60
1.2 - Análisis filogenético de StNDPK1	63
1.3 - Análisis del gen	64
1.4 - Clonado parcial de la secuencia codificante de StNDPK2	71

2. Estudios de expresión de StNDPKs	76
2.1 Análisis de expresión en los distintos tejidos de planta de papa	76
2.3. Participación de StNDPK1 en respuesta a la oscuridad	77
2.4. Participación de StNDPK1 en respuesta a diferentes estreses	79
2.4.1 Bajas temperaturas	79
2.4.2 Herviboría	80
2.4.3 Daño mecánico	80
2.4.4 Acido Jasmónico	82
3. Actividad de NDPK en extractos sub-celulares de tubérculos brotados	84
3.1 - Detección de StNDPK1 en extractos de proteínas mitocondriales	84
3.2 -Medición de actividad de NDPK en extractos de proteínas nativas	89
Conclusiones y discusión	92
BIBLIOGRAFIA	100

Abreviaturas

°C	grados centígrados
aa	aminoácidos
ABA	ácido abscísico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ADP	adenosin difosfato
AJ	ácido jasmónico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosina trifosfato
MeOH	metanol
BSA	albúmina sérica bovina
CDPKs	Proteínas quinasas dependientes de calcio
CDS	secuencia codificante
CE	extracto crudo
CL	cloroplastos
cm	centímetros
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
CY	citoplasma
DMSO	di-metil-sulfóxido
dNTP	desoxi-nucleotido trifosfato
DO	densidad óptica
dTDP	desoxi- timidin trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilen diamino tetracético
EGTA	etilenglicol tetracético
EST	marcador de secuencia expresada
EtBr	bromuro de etidio
g	gramos
Gas	giberelinas
Gb	Gen bank
GTP	guanosin trifosfato
h	horas
His	histidinas

IgGs	inmunoglobulinas G
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilo Daltons
L	litros
LDH	lactato deshidrogenasa
M	molar
MAP	proteínas quinasas activadas por mitogenos
MBP	proteína básica de mielina
MeJA	Metiljasmonato
mg	miligramos
MI	mitocondrias
min	minutos
ML	higado de ratón
MI	mililitos
mM	milimolar
MOPS	3 - (N-morfolino) propanosulfónico
MS	Medio de MURASHIGE Y SKOOG
NADH	nicotinamida adenín dinucleótido oxidado
NDPK	Nucleosido di-fosfato quinasa
NDPs	nucleosidos di-fosfato
Ng	nanogramos
Ni-NTA	níquel- ácido nitriloacético
Nm	nanómetros
NTP	nucleosido tri-fosfato
Nts	nucleótidos
O	organelas
ORF	marco abierto de lectura
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
Pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
Pi	fosfato inorgánico
PK	piruvato quinasa
PM	peso molecular
Pmol	picomol
PMSF	cocktail de inhibidores de proteasa
PVP	polivinilpirrolidona
ROS	especies reactivas del oxígeno

Rpm	revoluciones por minuto
RT	transcriptasa reversa
RT-PCR	Reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa reversa
SDS	dodecilsulfato sódico
Seg	segundos
Ser	serina
SSC	solución salina de citrato
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBS	buffer Tris-salino
TF	factores de transcripción
UI	unidades internacionales
UTR	región no traducida
UV	ultra violeta
Var	variedad
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
μ g	microgramo
μ l	microlitros
μ M	micromolar

“Caracterización bioquímica y molecular de nucleósido difosfato quinasa de Solanum tuberosum (StNDPKs): análisis de su expresión en la planta de papa en respuesta a estreses”

La capacidad de respuesta de una planta ante los cambios ambientales circundantes asegura su supervivencia. Los mecanismos de respuesta a estres biótico y abiótico están regulados por vías que dependen de la activación de genes en la cual una red de transducción de señales abarca desde la percepción de las señales hasta la expresión de genes de respuesta permitiendo la adaptación de la planta a su entorno, debiendo para ello integrar las señales externas e internas. Las nucleosido di fosfato quinasa (NDPKs) son enzimas que transfieren el fosfato y de nucleósidos tri fosfatos (NTPs) a nucleósidos di fosfatos (NDPs) a través de un intermediario fosforilado en una histidina conservada, participando de la red de comunicación energética intracelular y pudiendo alterar el pool de NTPs. En plantas se han visto recientemente involucradas en varias cascadas de señalización. El objetivo general del trabajo es caracterizar las isoformas de NDPK en plantas de papa (*S. tuberosum*, var. Spunta) y estudiar su participación en la percepción de señales ambientales, analizando su expresión en respuesta a señales de estrés biótico y abiótico. La hipótesis planteada es que, dado que en toda situación de estrés subyace un compromiso energético y considerando que las NDPKs poseen actividad de fosfo-transferasa, éstas podrían estar involucradas en las respuestas a estímulos ambientales.

A partir de los EST correspondientes a isoformas de NDPKs (STMED71, STMHY37) detectados en los microarreglos TIGR 10K de ARNm de brotes de papa cultivados en luz/oscuridad, se clonó de la secuencia codificante completa de StNDPK1 (GB FJ743686) a partir de brotes de papa y se sub-clonó un fragmento de la secuencia codificante de StNDPK2 (GB JF832386) a partir de una biblioteca de estolones. Se comparó la expresión de ambas en los distintos tejidos vegetativos y reproductivos de la planta y en tres estadios de tuberización por RT-PCR semi cuantitativa. StNDPK1 se expresa con distintos niveles de ARNm tanto en los tejidos como en los estadios de tuberización, mientras que StNDPK2 se expresaría en algún estadio de estolón tuberizante que no se pudo determinar. El análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de StNDPK1 muestra que tiene 238 amino ácidos de longitud, un peso molecular aproximado de 26 kDa y un punto isoeléctrico de 9.24. Codificaría para una proteína mitocondrial, el péptido señal comprendería los primeros 56 aa y el PM de la proteína madura sería de aprox. 20 kDa. La proteína recombinante StNDPK1 marcada con seis histidinas (6xHis) en su N-terminal producida se analizó por Western blot. Un anticuerpo anti-His detectó una banda de 26 kDa, mientras que un anticuerpo anti-NDPK1 dirigido contra el extremo C-terminal de la proteína reveló la banda de 26 kDa y una banda de 18kDa que podría corresponder a la proteína madura. Se detectó actividad de NDPK en extractos crudos y fracciones mitocondriales de brotación tubérculos, pero no en fracciones de cloroplastos. Además, los ensayos de Western blot realizados con el anticuerpo específico antiNDPK1 detectó la enzima en la fracción mitocondrial.

El análisis filogenético de la proteína muestra que StNDPK1 está directamente emparentada con NDPK de *Spinacia oleracea* (que localiza en cloroplastos) y que posee un ancestro común con las otras isoformas de NDPKs de localización mitocondrial (AtNDPK3, BrNDPKIII y PsNDPK3). Además se pudo clonar la secuencia genómica completa de *Stndpk1* (GB GU144806) de 3358 nts, posee 7 exones y 6 intrones. El Southern Blot usando como sonda la secuencia codificante de StNDPK1 sugiere que este gen pertenece a una familia multigénica. Por otro lado, se obtuvo el promotor de éste gen de 2385 pb cuyo análisis *in silico* revela la presencia de elementos regulados por luz, frío, daño mecánico, respuesta a defensa y dos sitios reguladores

de los niveles transcripcionales (CAATbox y 5UTR Py-rich stretch). Dado que se disponía de mayor información respecto de la estructura del gen y de los elementos regulatorios que contiene la isoforma 1 de StNDPK y considerando que ésta tenía un perfil de expresión menos complejo que la isoforma 2, se realizaron los estudios de expresión en condiciones de estrés abiótico y biótico sólo para la isoforma 1. Los resultados de las RT-PCR semi-cuantitativas muestran que el nivel de ARNm de StNDPK1 aumenta en la exposición de plantas a oscuridad por tiempos cortos, mientras que en la exposición a bajas temperaturas se produce una disminución inicial de la expresión para luego recuperar los niveles normales. Se observó que tanto en el tratamiento con daño mecánico como el agregado de AJ (10 μ M) producen un aumento del mensajero de StNDPK1. Por otro lado, se midió actividad de NDPK en extractos de proteínas nativas de fracciones mitocondriales y de cloroplastos; tanto el extracto crudo, como la fracción mitocondrial presentan actividad de NDPK, sin embargo en la fracción de cloroplastos no se detectó actividad alguna.

El análisis bio-informático sugiere que las dos isoformas, son de localización sub-celular. Pero en particular, StNDPK1 fue detectada por Western blot en la fracción mitocondrial donde también se midió la actividad enzimática; por lo que StNDPK1 sería una isoforma que localiza en la mitocondria. Al menos dos isoformas de NDPK en plantas de papa muestran un patrón muy diferente de expresión, StNDPK1 tiene diferentes niveles de expresión en tejidos, pero su expresión es ubicua, mientras StNDPK2 muestra un patrón más restringido y sólo se expresa en ciertas etapas de estolones, lo que sugiere que posiblemente su expresión esté asociada a ciertas etapas del desarrollo del tubérculo. Nuestros resultados sugieren fuertemente que StNDPK1 está dirigida a la mitocondria. El análisis de los datos de Stndpk1 promotor es consistente con los resultados de la expresión, lo que sugiere que StNDPK1 podrían estar involucrados en las respuestas ambientales a la disponibilidad de luz, temperaturas bajas o ataque herbívoro.

Palabras claves: Solanum tuberosum / nucleosido difosfato quinasas / mitocondria / estreses

"Biochemical and molecular characterization of nucleoside diphosphate kinase from Solanum tuberosum (StNDPKs): analysis of its expression in the potato plant in response to stress"

The responsiveness of a plant to environmental changes ensures its survival. Response mechanisms to biotic and abiotic stresses are regulated by signal transduction networks that extend from signal perception to gene activation allowing the plant's adaptation to the environment through a process that integrates external and internal signals. Nucleoside diphosphate kinases (NDPKs) participate in the intracellular energy communication network by altering the nucleoside triphosphates (NTPs) pool; they catalyze the transfer of γ phosphates from NTPs to nucleoside diphosphate (NDPs) through a phosphorylated protein intermediary at a conserved histidine. NDPKs have been involved in several signaling cascades in plants. The overall aim of this study is to characterize NDPK isoforms in potato (*S. tuberosum*, var. Spunta) plants and to study their involvement in the perception of environmental signals by analyzing their expression in response to biotic and abiotic stress signals. Our hypothesis is that, as in all stress situations there is an underlying commitment to energy; NDPKs could be involved in responses to environmental stimuli.

ESTs from NDPKs isoforms (STMED71, STMHY37) were detected in a TIGR 10K microarray probed with total RNA from potato sprouts grown under different conditions (light/dark). *StNDPK1* complete coding sequence (GB FJ743686) was cloned using total RNA from potato sprouts while a fragment of *StNDPK2* coding sequence (GB JF832386) was amplified from a cDNA library from tuberizing stolons. Bioinformatic analysis suggested that both isoforms have a sub-cellular localization because they don't have the characteristic YE motif present in cytosolic NDPKs. Phylogenetic analysis shows that *StNDPK1* protein is directly akin of *Spinacia oleracea* NDPK (which is located in chloroplasts) and shares a common ancestor with other NDPK isoforms with mitochondrial localization (AtNDPK3, BrNDPKIII and PsNDPK3). *In silico* analysis of *StNDPK1* sequence shows that it encodes a protein of 238 aminoacids (aa) with a molecular weight of 26 kDa and an isoelectric point of 9.24. A mitochondrial signal peptide of 56 aa was predicted, thus the mature protein would be of approx. 20 kDa. The recombinant *StNDPK1* protein tagged with six histidines (6xHis) in its N-terminus was produced and analyzed by Western blot. An anti-His antibody detected a 26 kDa band while an anti-NDPK1 antibody directed against the C-terminus of the protein revealed the 26 kDa band and an 18kDa band that could correspond to the mature protein. NDPK activity was detected in crude extracts and mitochondrial fractions from sprouting tubers, but not in chloroplast fractions. In addition, Western blot assays performed with the specific antiNDPK1 antibody detected the enzyme in the mitochondrial fraction.

A Southern blot probed with *StNDPK1* complete coding sequence suggests that this gene belongs to a multigene family. The complete genomic sequence of *Stndpk1* (GB GU144806) and its promoter region (2385 bp) were cloned. *Stndpk1* is 3358 bp long and has seven exons and six introns. *In silico* analysis of the promoter region reveals the presence of elements regulated by light, cold, wounding, defense and two regulatory sites of transcriptional levels (CAATbox and Py-rich 5UTR stretch). We compared the expression of both isoforms in various vegetative and reproductive tissues of the plant and in three stages of tuberization by semi-quantitative RT-PCR. *StNDPK1* is expressed in all tissues and tuberization stages being most abundant in shoot apex, flowers and leaves, while *StNDPK2* expression was undetectable in the tissues analyzed. Expression studies under abiotic and biotic stress conditions were

performed only for StNDPK1. Semiquantitative RT-PCR results show that StNDPK1 transcripts increased in plants exposed to short periods of darkness, while exposure to low temperatures produced an initial decrease in the expression recovering after 6hs. Both, mechanical wounding or the addition of 10 μ M jasmonic acid (JA) produced an increase in StNDPK1's mRNA.

According to our results we propose that at least two NDPK isoforms are present in potato plants that show different expression patterns, StNDPK1 is ubiquitous being most abundant in aerial tissues, while StNDPK2 is restricted to tuberizing stolons. Our results strongly suggest that StNDPK1 is targeted to mitochondria. The data analysis of *Stndpk1* promoter is consistent with the expression results, suggesting that StNDPK1 could be involved in environmental responses to light availability, low temperatures or herbivore attack.

Key words: *Solanum tuberosum* / nucleoside diphosphate kinases / mitochondria / stresses



1. Transducción de señales en plantas

Según la teoría endo-simbionte, la célula vegetal primordial solucionó el problema de la adquisición de energía a través de una asociación simbiótica con un organismo con capacidad fotosintética, el cloroplasto. Dada la abundancia y disponibilidad de la luz, el movimiento no fue un requerimiento imperativo en la evolución de las plantas terrestres pero si la necesidad de incorporar agua, minerales y energía lumínica, surgiendo morfologías aptas para optimizar la ocupación del espacio, el aprovechamiento de los recursos disponibles y la tolerancia al ambiente circundante. Estructuras ramificadas, con crecimiento apical y repeticiones metaméricas cumplen con estos requerimientos y además facilitan la recuperación luego de una lesión. Por esta misma razón, hubo una mínima especialización de los órganos tal que las funciones críticas no se localizan en sólo uno o dos tejidos (Anthony Trewavas 2005b; Anthony Trewavas 2009). Para poder sentir los diferentes estímulos, las plantas terrestres han desarrollado mecanismos para adaptar su crecimiento, desarrollo y fisiología a la calidad de señales, si bien es necesaria cierta distribución de funciones entre diferentes tipos celulares, la mayoría de las células vegetales son capaces de percibir casi todas las señales a las que la planta puede responder, confiriéndole la plasticidad necesaria para ajustarse en cada nueva situación, permitiendo explotar más eficientemente los recursos del entorno (Anthony Trewavas 2005b).

1.1 Señales: características y percepción

El ambiente externo experimentado por las plantas es de una enorme complejidad, dado que el rango de señales abióticas y bióticas que deben sentir es muy diverso. Entre estas señales externas podemos encontrar aquellas relacionadas con la luz, la disponibilidad de nutrientes y agua en el suelo, el dióxido de carbono, la humedad, la temperatura, la gravedad,



el viento, la estructura del suelo, la presencia de plantas vecinas, la herbivoría y el ataque de patógenos. Por otro lado, existe también una gran cantidad de señales internas: moléculas reguladoras del crecimiento y desarrollo, señales mecánicas relacionadas con el crecimiento y la pared celular, metabolitos y señales sistémicas de defensa, entre otras (Gilroy & A Trewavas 2001; Anthony Trewavas 2005b; Anthony Trewavas 2009) (Figura 1).

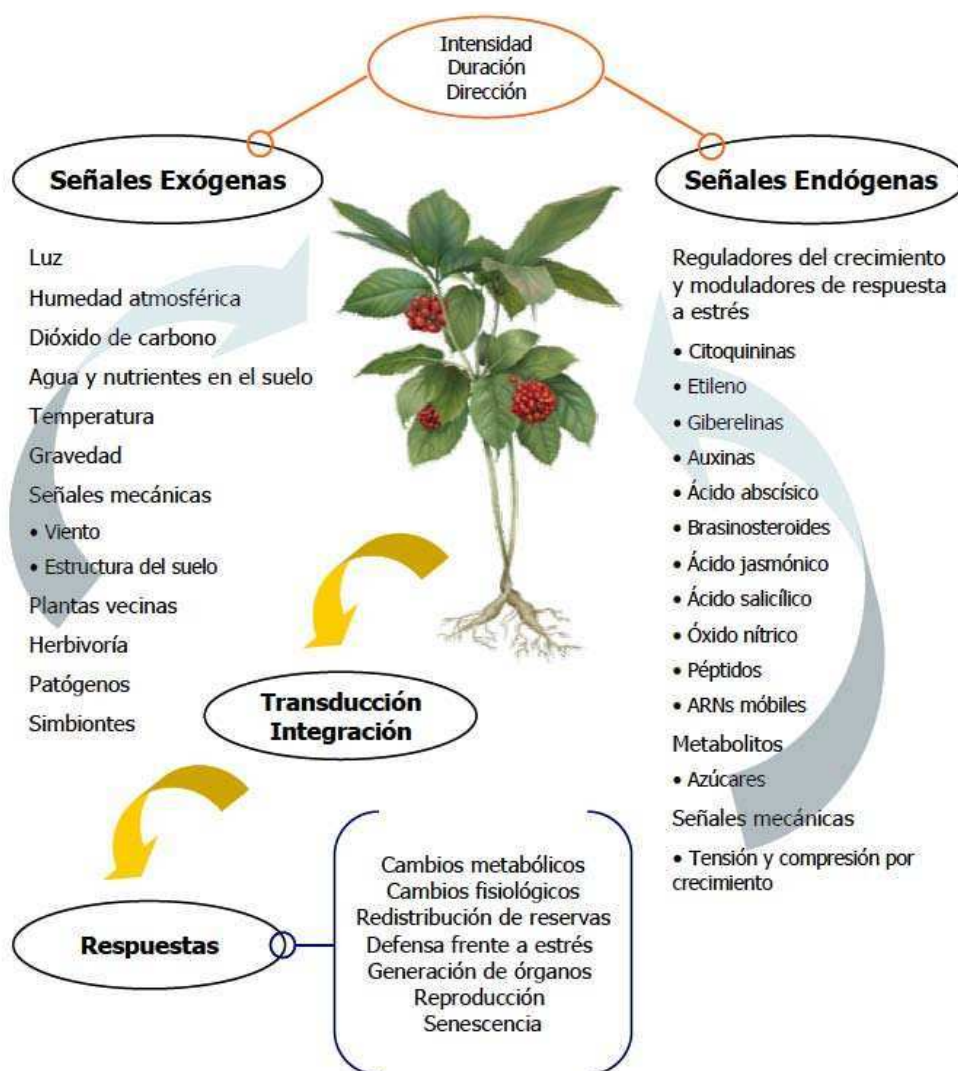


Figura 1 | Estímulos sentidos por las plantas. Un amplio rango de señales externas e internas que las plantas perciben. Estas señales son transducidas e integradas a fin de generar respuestas que permitan optimizar la incorporación de nutrientes y la supervivencia frente a los desafíos del ambiente circundante. (Adaptado de la Tesis



Cada señal tienen una intensidad, dirección (o localización) y duración particular. Por otro lado, los recursos básicos para el desarrollo de la planta se presentan en cantidades variables a lo largo del tiempo y se distribuyen espacialmente en forma de gradientes o mosaicos dentro de la naturaleza (Anthony Trewavas 2005b; Anthony Trewavas 2006). Las plantas entonces deben ser capaces de “decodificar” las señales externas que son captadas por las células vegetales, transformándolas en señales químicas que se integrarán a las señales internas. Estas señales integradas no sólo son transmitidas dentro de la célula sino también a la periferia, con el fin de poder dar una respuesta a los estímulos recibidos.

Un individuo percibe más de un estímulo a la vez, tal que la acción coordinada de diferentes mecanismos de percepción y señalización permitirán una respuesta biológica. Dicha respuesta podría por ejemplo estar mediada por la expresión diferencial de genes ó bien conllevar a modificaciones en los patrones de crecimiento y desarrollo. El éxito de la respuesta biológica, en tanto que asegure la supervivencia del individuo como la adaptación a los cambios ambientales impuestos, requiere un adecuado balance energético en la planta (Plaxton 1996), por lo que el mantenimiento del pool de Nucleósidos Tri-fosfatos (ATP, GTP, CTP y TTP) en las células podría ser una contribución importante.

Proveer una información completa sobre las características de los estímulos percibidos por receptores específicos, requiere de la integración de la información recibida, de una percepción “tridimensional” del estímulo, en tiempo y espacio (Anthony Trewavas 2009). Los receptores involucrados en la captación de señales lumínicas son un buen ejemplo, familias de fitocromos, criptocromos y fototropinas permiten discriminar diferentes longitudes de onda e intensidades, así como también las características del fotoperíodo (Li & H.-Q. Yang n.d.; Christie 2007; Bae & Giltsu Choi 2008).

La mayoría de los receptores conocidos se localizan en la membrana plasmática, aunque también pueden encontrarse en otros lugares de la célula, como el citoplasma o la



pared celular. A su vez, las distintas familias de receptores presentan una gran diversidad estructural y funcional. Existen receptores quinasas de serina/treonina, receptores basados en los sistemas bacterianos de dos componentes, receptores relacionados con canales de membrana, receptores con dominios LRR de interacción proteína-proteína y receptores asociados a procesos de ubiquitinación (Humphrey et al. 2007; Chow & McCourt 2006).

Estos receptores desencadenan la liberación o síntesis de segundos mensajeros, que pueden participar en la transducción de muchas señales. Estas moléculas reguladoras (mensajeros o señales químicas) son utilizadas por las células para armonizar las respuestas biológicas y adaptarse a las condiciones del entorno. La percepción de la señal, representada por un ligando específico para un determinado receptor producirá una cadena de transducción de señales, desatando una cascada reguladora. (Figura 2)

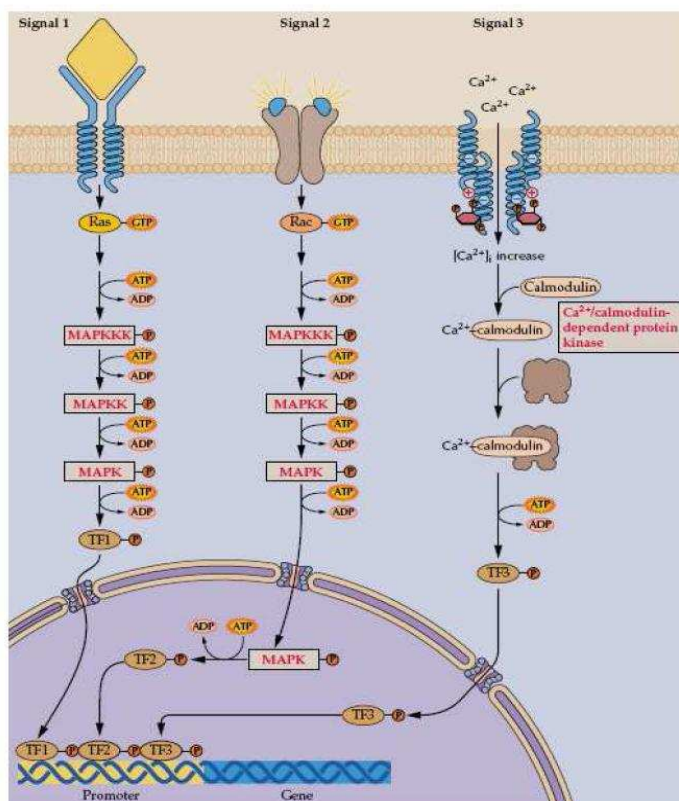


Figura 2] Múltiples vías de transducción de señales. En cada vía de transducción pueden participar múltiples quinasas de proteínas (señal 1 y 2), o se puede modificar la concentración del calcio intracelular (señal 3) afectando la transcripción de un mismo gen blanco a través de la fosforilación de diferentes factores de transcripción (TF1, TF2 o TF3). Los factores de transcripción fosforilados pueden moverse a través de la membrana nuclear (señal 1 y 3), o alternativamente las que pueden moverse son las MAPKs al núcleo, después de haber sido fosforiladas por MAPKK (señal 2). (Adaptada de Gilroy y Trewavas, 2001).



1.2 Amplificación e Integración de señales

Los mecanismos de transducción de señales permiten entonces canalizar, amplificar e integrar los estímulos recibidos por la planta. En las células vegetales la transducción se realiza a través de una red construida por una gran variedad de componentes, entre ellos:

- Segundos mensajeros como calcio (McAinsh & Pittman 2009), nucleótidos cíclicos (H. Richards et al. 2002), especies reactivas del oxígeno (C. Kim et al. 2008) y fosfoinositoles (Xue et al. 2009), junto con las enzimas que los generan y/o regulan sus niveles. Canales de calcio y proteínas que lo unen, como la calmodulina (M. C. Kim et al. 2009)
- Quinasas y fosfatasa de proteínas (S.-H. Cheng et al. 2002; Luan 2003; Mishra et al. 2006)
- Proteínas que permiten el anclaje y/o interacción de los componentes de señalización, como las proteínas 14-3-3 (Oecking & Jaspert 2009)
- Componentes de las vías de degradación de proteínas (Somers & Fujiwara 2009)
- Factores de transcripción de diversas familias (Jain et al. 2012)

El flujo de información a través de la red de transducción puede divergir, ramificarse, converger, sinergizar e integrarse por entrecruzamiento entre diferentes vías (Anthony Trewavas 2005a). A través de ciclos de retroalimentación positiva o negativa una red de transducción aumenta su fortaleza. A su vez, la redundancia dada por múltiples isoformas de las proteínas involucradas y/o por circuitos de control superpuestos asegura el proceso de señalización. Finalmente, se debe tener en cuenta que algunos elementos de la red son específicos de una señal mientras que otros son compartidos por distintas vías (Gilroy & A Trewavas 2001). La especificidad está controlada por interacciones proteína-proteína y por la formación de “microdominios” en los que se agrupan los segundos mensajeros asociados a



una señal y los componentes que funcionan río abajo de dichos mensajeros. Una propiedad de los sistemas de señalización es que éstas señales inducen la síntesis de las proteínas que median su transducción (Gilroy & A Trewavas 2001). Otro tema recurrente es la prevalencia de vías reguladas negativamente (el estado basal es mantenido por el funcionamiento activo de la vía en ausencia de la señal, como ocurre en la regulación por etileno)(McCarty & Chory 2000).

Además se deben considerar los diferentes niveles temporales en los sistemas de transducción, los eventos intracelulares iniciales (en segundos, minutos, horas) consisten en cambios en el flujo iónico y modificación del grado de fosforilación de proteínas mientras que eventos posteriores (en horas, días) se relacionan con modulación de la expresión génica y luego (en horas, días, meses) con modificaciones en la señalización intercelular sistémica (Anthony Trewavas 2009). Por último, es posible la generación de cambios a nivel de cromatina que pueden persistir por mucho tiempo e incluso ser heredados (C. L. Richards et al. 2010).

La integración de dichos estímulos es esencial para la decisión entre señales conflictivas, aquellas donde la respuesta requerirá cierta determinación de prioridades (Trewavas, 2009). A nivel intracelular dicha integración se da por el entrecruzamiento ya mencionado entre diferentes vías de transducción, donde cada variable podría modificar la respuesta a otras variables y la integración estará condicionada por el estado interno de la planta, siendo indispensable no sólo a nivel intracelular sino también a nivel intercelular, dado que los millones de células organizadas en tejidos (dérmico, fundamental y vascular) se influyen unos a otros. Esta señalización intercelular está basada en componentes físicos (por ejemplo, señales mecánicas y eléctricas) y químicos (hormonas vegetales, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, oligosacáridos, azúcares, aminoácidos y minerales), que son transportados a través de las vías simplásticas y apoplásticas sustentando la señalización sistémica y



permitiendo que la planta se comporte como un organismo integrado (Brenner, Ramireddy, Heyl, & Schmülling, 2012; Trewavas, 2005b).

2. Las nucleosido difosfato quinasa

Las nucleosido difosfato quinasa (NDPKs) son enzimas con actividad de fosfo-transferasa (EC.2.7.4.6). Su principal función es mantener el equilibrio entre nucleosidos tri y di-fosfato. Estas enzimas catalizan la transferencia de un fosfato en posición y entre cualquier nucleósido trifosfato (NTP) a un nucleósido difosfato (NDP) a través de un mecanismo que involucra un intermediario fosforilado (Parks *et al.*, 1973) y un residuo histidina conservado (*His117*) en todas las isoformas conocidas (Figura 3).

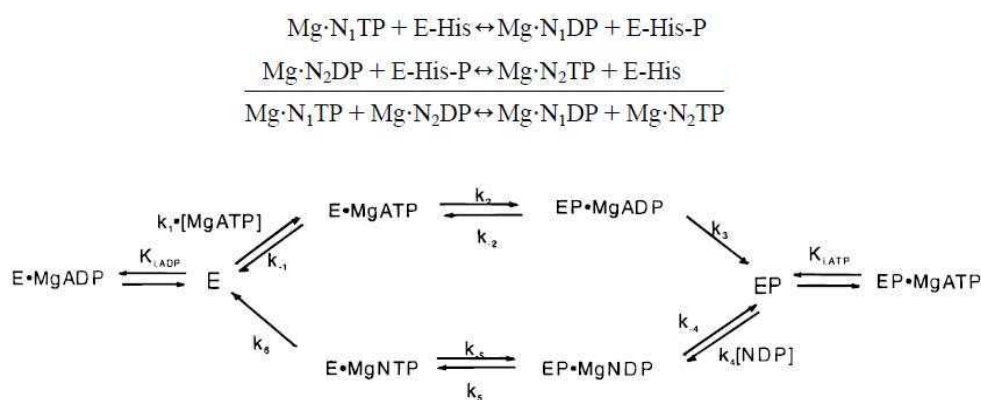


Figura 3 | Reacción de fosfotransferencia mediada por NDPK. Esquema representativo de la formación de intermediario fosforilado en residuo de histidina en una nucleosido difosfato quinasa (Adaptado de Ioan Lascú and Philippe Gonin, 2000)

Si bien la NDPK es activa con una gran variedad de donadores y aceptores de fosfatos, éstas enzimas usualmente transfieren el fosforo en posición y del ATP, dado que éste no sólo es el nucleótido más abundante (varios órdenes de magnitud superior que los otros NTPs, entre 2 y 8 mM) sino que también es la “moneda energética” preferentemente utilizada en la células. Las NDPKs entonces pueden, mediante su actividad de fosfotransferasa, utilizar el ATP



para la síntesis de otros ribonucleótidos y desoxiribonucleótidos a partir de sus respectivos difosfatos. (Mathews, Van Holde & Ahern; 2002)

La bioenergética celular requiere que las moléculas de ATP sean producidas y llevadas a los sitios de consumo de manera efectiva. Tanto desde el punto de vista termodinámico como desde el punto de vista cinético; la transferencia de ATP no puede ocurrir sólo a través de la difusión, ya que es un proceso lento e ineficiente. Las distancias a recorrer entonces dentro de una célula son críticas, por lo que esta comunicación energética intracelular debería establecerse a través de corrientes citoplasmáticas, posicionamiento y movimiento de las mitocondrias, y redes enzimáticas intracelulares. Procesos como el transporte activo de membrana plasmática ó la fosforilación oxidativa en mitocondrias, suponen una separación espacial entre consumo y producción de ATP que es muy bien explicada por la idea de redes enzimáticas intracelulares compuestas por diversas fosfotransferasas (Figura 4). Estas son usadas por la célula para promover la llegada de ATP y remover los productos de hidrólisis generados (H^+ , ADP, Pi). La exportación del ATP desde el espacio inter-membrana mitocondrial es facilitada por las reacciones catalizada por isoformas mitocondriales de fosfo-transferasas entre las cuales están las NDPK. Los grupos de alta energía navegan por el espacio perinuclear restringidos por las isoformas citosólicas y nucleares. Asegurándose así las proporciones adecuadas de nucleótidos y el mantenimiento de la alta energía de hidrólisis de ATP y GTP. (Dzeja 2003).

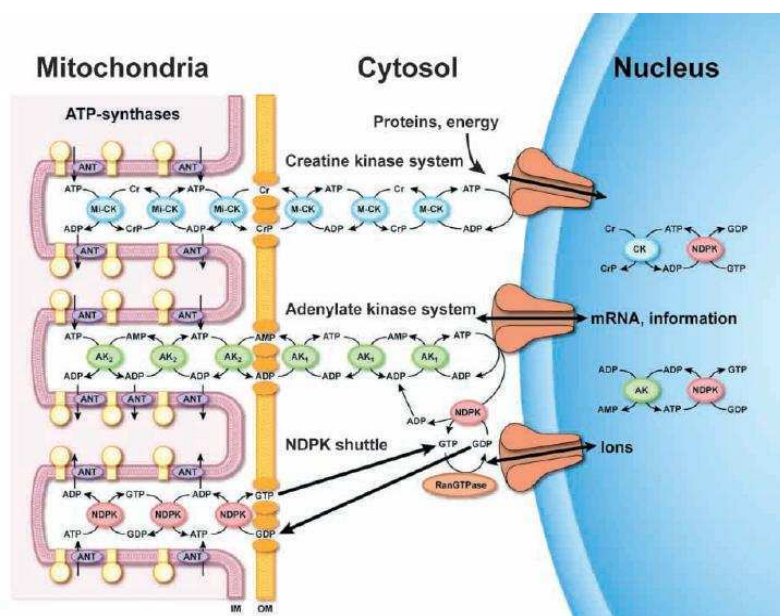


Figura 4| Redes enzimáticas de fosfo-transferasas. Adaptado de Dzeja y Terzic, 2003

2.1 Clasificación y características generales

Las NDPKs fueron inicialmente y simultáneamente descritas por Berg y Jolik (1953) y por Krebs y Hems (1953). Además de su función de mantenimiento metabólico con la cual se las ha caracterizado, existen distintas evidencias de que estas enzimas poseen una función en la transducción de señales en bacterias (M. L. Lacombe et al. 1990), hongos (Fukuchi et al. 1993), plantas (Harris et al. 1994), invertebrados (Rosengard, 1989) y vertebrados (Agarwal et al. 1985).

Dado que es una enzima ubicua, se han observado en una amplia gama de organismos (MacDonald et al. 1993) y se la ha descrito con funciones en diversas vías de transducción de señales. Algunas catalizando la reacción $ATP + GDP \rightarrow ADP + GTP$, de modo que pueden elevar la concentración de GTP en las proximidades de las proteínas G, y así activar las proteínas de unión a GTP (Bominaar et al. 1993). Otras que, aparte de incluir una histidina quinasa como centro activo, se autofosforilan en residuos de Ser (Struglics & Håkansson 1999). Además hay isoformas que localizan cerca del citoesqueleto y podrían funcionar acopladas a



proteínas de unión a GTP rho/rac de mitocondria y de cloroplasto. También se han descrito NDPKs que intervienen en la activación del gen c-myc, sugiriendo un posible rol de éstas como factores de transcripción; y NDPKs cuya actividad quinasa transfiriere fosfato a proteínas como la proteína básica de mielina (MBP), que es sustrato de MAP (proteína activada por mitógenos) quinasa. (Hasunuma et al. 2003)

2.2 Complejidad estructural

Las NDPKs comparten la estructura primaria, secundaria y terciaria pero no la cuaternaria. Las sub-unidades (16-18 Kda) se ensamblan como tetrámeros, en el caso de los procariotas y como hexámeros en el caso de los eucariotas. Se han informado más de 60 secuencias primarias de NDPK y un gran número de estructuras por cristalografía de rayos X de procariotas y eucariotas. Todas tienen una estructura tridimensional muy similar, y sus subunidades mantienen un plegamiento característico con cinco α -hélices embalando cuatro cadenas antiparalelas β -hoja plegada (Milon et al. 2000). Los hexámeros forman un sitio activo con un motivo característico que contiene la Histidina 117 y otros aminoácidos neutros, polares y no polares. Los nueve residuos (NXXH[G/A]SD) son esenciales para que la enzima posea actividad catalítica. (Figura 5)

Además se ha descrito que en su estructura primaria, sólo las isoformas de localización citosólica presentan el motivo YE en el extremo C-terminal. (Postel 2003).

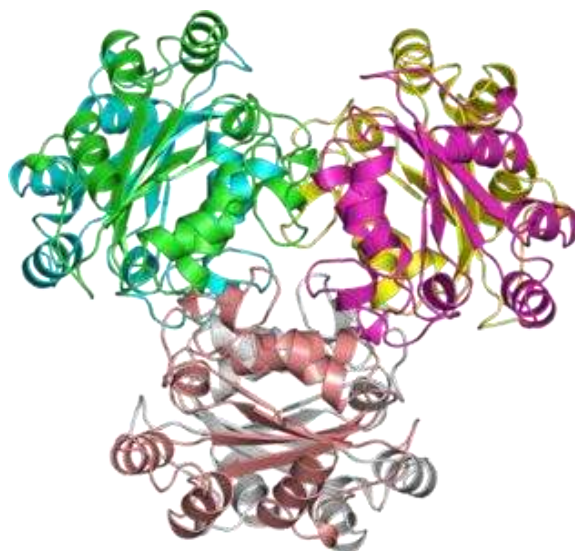


Figura 5|Estructura cuaternaria de NDPK. Estructura homohexamérica, el ensamblado biológico del hexámero se construye formando dímeros entre las cadenas alfa y beta que generan tripletes (Obtenido de Pfam, PDB entry 1ehw)

2.3 Nucleosido di-fosfato quinasas mitocondriales

En mamíferos se conocen diez isoformas que se nombran desde H1 hasta H10 según el tejido en el que se expresan y/o su localización sub-celular; ocho de las cuales pertenecen a la familia de las NM23, una familia de proteínas con funciones descritas en desarrollo y cáncer que poseen actividad de nucleasa, es decir clivan ADN. Estas isoformas se encuentran diferencialmente distribuidas siendo H1 y H2 (de localización nuclear y citoplasmática, respectivamente) las más abundantes y ubicuas, mientras que las H3 y H4 son las menos abundantes, ésta última de localización mitocondrial. Durante muchos años, se la propuso como una enzima regulatoria multifuncional esencial para la expresión de genes y la defensa celular contra la acumulación patológica de daño al ADN (Postel 2003).



Aunque las NDPKs son enzimas ubicuas y su actividad se ha detectado en las mitocondrias aisladas de varios tipos de organismos y tejidos (Hwan Kim et al. 2002; Troll et al. 1993; Sommer & P. S. Song 1994; Izumiya & M. Yamamoto 1995; Hildebrandt et al. 1995; D. S. Park et al. 1995; Annesley et al. 2011; Desvignes et al. 2012) sólo unas pocas isoformas mitocondriales han sido aisladas (Troll et al. 1993; C Knorpp 2003; Tokarska-Schlattner et al. 2008; Glaze & Wadkins 1967). La actividad mitocondrial NDPK varía entre los diferentes tejidos y organismos, y las funciones de estas isoformas están en discusión. En el espacio intermembrana mitocondrial se ha detectado actividad de esta enzima en diversos organismos y se ha propuesto que poseen un importante rol en la generación de los NTP para el citosol mediante la producción de ATP mitocondrial (Gerbitz et al. 1996; Ray & Mathews 1992). Las NDPK en espacio intermembrana podrían por lo tanto, jugar un papel en la comunicación energética intracelular (M.-L. Lacombe et al. 2009).

2.4 Nucleósido di-fosfato quinasa descritas en plantas

En plantas, hay tres isoformas conocidas que se las clasifica según su localización subcelular: **tipo I**, son de localización citosólica, **tipo II** se encuentran en el estroma de los cloroplastos y **tipo III** se encuentran en el lumen de cloroplasto y en el espacio intermembrana de mitocondria (Sweetlove et al. 2001). Como se observa en el esquema de la figura 6, se ha descrito la autofosforilación en *Ser69*, a parte de la *His117* y la *Ser119* características del bolsillo catalítico. Esta *Ser69*, alejada del dominio quinasa, es importante para la funcionalidad de la enzima (Struglics & Håkansson 1999).

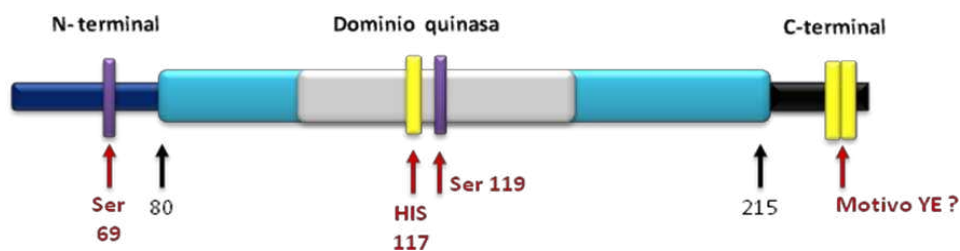


Figura 6| Estructura primaria de una NDPK de planta. En rojo se encuentran señalados los residuos de importancia para su funcionalidad y localización.

Además de la función de mantenimiento metabólico, han sido descritos varios ejemplos del papel de NDPK en la señalización celular (MacDonald et al., 1993; Bovet et al., 1997). Estas enzimas también tienen un papel regulador en los eventos de la transducción de señales en plantas (Dorion et al. 2006), en respuesta a daño mecánico (Harris et al. 1994), calor (Escobar Galvis et al. 2001), la infección por patógenos (S. M. Cho et al. 2004), la tolerancia al estrés ambiental, donde las especies reactivas de oxígeno se acumulan (Moon et al. 2003; Tang et al. 2008) y en la señalización de fitocromo A (G Choi et al. 1999). Además han sido identificados en varios compartimentos sub-celulares, en *Arabidopsis* (Yi et al., 1998), en arveja (Escobar Galvis et al. 1999; Lübeck & Soll 1995), espinaca (Zhang et al., 1995), avena (Hetmann & Kowalczyk 2009) y en papa silvestre (Dorion et al. 2006).

3. Las mitocondrias en plantas

El descubrimiento de la mitocondria fue un hecho colectivo. Las primeras observaciones se deben al botánico suizo Kolliker, en 1880. El alemán W. Flemming, en 1882, también las menciona. En 1884 fueron observados por R. Altmann, quien más tarde en su obra publicada las describe, sin embargo el hallazgo fue rechazado como un artefacto para que años más tarde, en 1916, N.H. Cowdry afirmara que los escritos de R. Altman eran correctos. Sin embargo, el nombre de mitocondria, se debe a C. Benda, quien en 1889 denominó así a unos



gránulos que aparecían con gran brillo en tinciones de cristal violeta y alizarina. En 1904, F. Meves confirma su presencia en una planta, y en 1913 O. H. Warburg descubre la asociación con enzimas de la cadena respiratoria, aunque ya Kingsbury, en 1912 había relacionado estas organelas con la respiración celular. En 1934, fueron aisladas por primera vez a partir de homogeneizados de hígado y en 1948 Hogeboom, Schneider y Palade establecen definitivamente la mitocondria como el lugar donde se produce la respiración celular (Scheffler, 2007; Martin y Müller, 2007). La presencia del ADN mitocondrial fue descubierta por Margit M. K. Nass y Sylvan Nass en 1963

Al igual que los cloroplastos, son organelas semi-autónomas que codifican un cierto número de proteínas; capaces de proliferar mediante división por fisión a partir de mitocondrias pre-existentes. La morfología de las mitocondrias solo pudo ser claramente definida luego de la aparición de la microscopía electrónica. En particular, las mitocondrias aisladas de plantas se observan al microscopio electrónico con una forma esférica ó de bastón, oscilando entre los 0,5 – 1 μm de diámetro y con longitudes superiores a los 3 μm (Douce, 1985). Poseen un complejo de redes reticuladas que han sido observadas tanto en células animales como en algas y plantas (Figura 7).

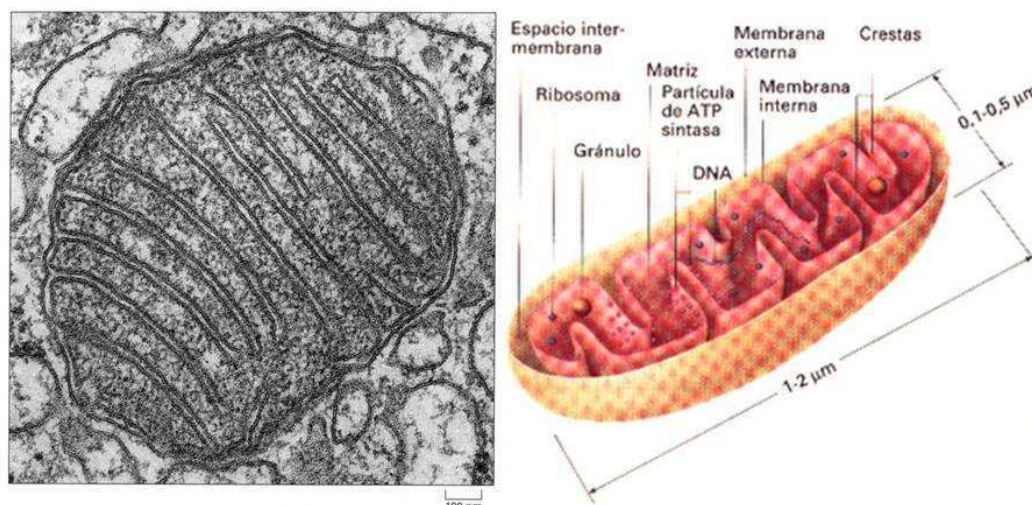


Figura 7] Estructura de una mitocondria. A la izquierda, corte transversal de una mitocondria observada por microscopía electrónica. A la derecha, esquema de las distintas partes de una mitocondria.



En general, el número de mitocondrias observadas en una célula vegetal es bastante menor al número observado en una célula animal. Sin embargo, la cantidad de mitocondrias de una célula vegetal puede variar y suele estar relacionado con la actividad metabólica del tejido (Taiz y Zeiger, 1998). Las características ultra-estructurales de las mitocondrias de plantas son similares a las de animales; están rodeadas de dos membranas claramente diferentes en sus funciones y actividades enzimáticas. La membrana externa y la membrana interna que separan tres espacios: el citosol, el espacio inter-membrana y la matriz mitocondrial. Las mitocondrias son organelas osmóticamente activas, tanto los iones inorgánicos como las moléculas orgánicas cargadas no son capaces de difundir libremente hacia la matriz mitocondrial. La membrana interna es su principal barrera osmótica, ya que la membrana externa es permeable a solutos de bajo PM (menor a 10 kDa) como la mayoría de los metabolitos y los iones.

Si bien las mitocondrias poseen su propio ADN, sus principales funciones dependen de la presencia de un gran número de proteínas que son codificadas en el ADN nuclear y sintetizadas en el citosol, debiendo ser exportadas a esta organela mediante un péptido señal. Estas proteínas son transportadas hasta la organela blanco sin plegarse, una vez que llegan a destino el péptido señal es removido por enzimas específicas que reconocen una señal de clivado, mientras que la proteína se pliega para poder así obtener tanto su estructura terciaria como cuaternaria (Alberts, 2010). Muchas de éstas proteínas, importadas desde el citoplasma celular, son enzimas que intervienen el metabolismo de los azúcares, ya que el piruvato obtenido por la glucólisis pasa a las mitocondrias para oxidarse y obtener energía en forma de ATP (Andresen & H. P. Moore 2001). Sin embargo una parte importante de los carbonos incorporados por la planta a través de la glucólisis y el ciclo de ácido cítrico no son completamente oxidados sino que también pueden ser utilizados para la biosíntesis de



compuestos como metabolitos secundarios, isoprenoides, aminoácidos, ácidos nucleicos y ácidos grasos. La presencia en las plantas de una red de vías metabólicas compartimentalizadas y finamente reguladas, confieren la flexibilidad metabólica necesaria para que las plantas se adapten a las diferentes situaciones de estrés generadas por el ambiente que la rodea (Affourtit et al. 2001; Flügge et al. 2011; Foyer et al. 2011; Bar-Even et al. 2012)

4. Modelo biológico: *Solanum tuberosum* L.

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una dicotiledónea herbácea anual tetraploide ($2n = 4x = 48$), perteneciente a la familia *Solanaceae* (D'Agostino et al. 2007; Clarkson et al. 2004). Esta familia agrupa cerca de 100 géneros y 2500 especies, incluyendo varios cultivos importantes a nivel mundial como el tomate, el tabaco, la berenjena y el pimiento. De las 2500 especies de solanáceas, alrededor de 200 poseen la capacidad de tuberizar. *S. tuberosum* se divide tradicionalmente en dos subespecies: *S. tuberosum* ssp. *andigena*, cultivada principalmente en la región andina, y *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, cultivada en el resto del mundo. Sin embargo, dado que existe una compleja diversidad de especies y variedades tanto silvestres como cultivadas, esta clasificación está siendo reevaluada (Rodriguez et al. 2009; Spooner et al. 2007). La planta de papa es nativa de América; su historia se remonta a 6000 y 10000 años atrás, cuando distintas especies silvestres fueron cultivadas por primera vez en la región andina de Perú y Bolivia. En 1562, tras la colonización española, se registra el primer reporte de este cultivo fuera de América del Sur, en las Islas Canarias, extendiéndose luego por el resto del mundo. El proceso de selección artificial originó un conjunto de cultivares con cualidades agronómicas mejoradas y tubérculos de formas y colores más uniformes (Figura 8).



Figura 8 | Fotografía de tubérculos de papa obtenidos de distintos cultivares.
http://farm1.static.flickr.com/91/241673100_3be23077ff.jpg

Esta planta posee tallos subterráneos denominados estolones a partir de los cuales se desarrollan los tubérculos (Figura 9).

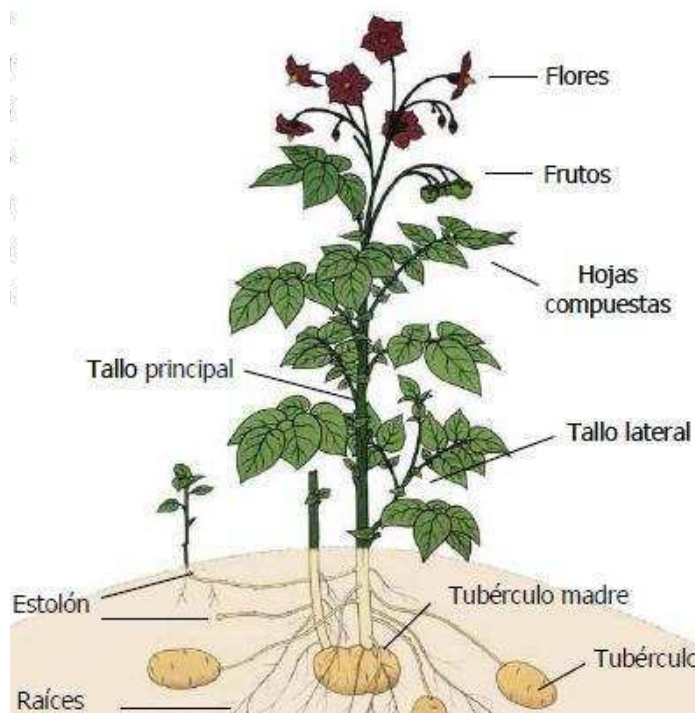


Figura 9 | Dibujo esquemático de una planta de papa (*Solanum tuberosum* L.). Se indican las estructuras anatómicas principales. Los estolones pueden dar origen a tubérculos o a nuevos tallos aéreos. Imagen tomada de CIP-FAO Año Internacional de la Papa (<http://www.potato2008.org>).

Cuando termina el período de crecimiento, las hojas y tallos se marchitan y los tubérculos se desprenden, funcionando como depósito de nutrientes en condiciones



ambientales desfavorables. Cada tubérculo tiene en su superficie varias yemas vegetativas. A partir de estas yemas brotan nuevas plantas cuando las condiciones son propicias. El desarrollo del tubérculo puede dividirse en tres etapas: dormición-brotación-tuberización. Después del inicio de la tuberización, el tubérculo comienza su desarrollo que sólo va a finalizar cuando la planta entre en estado de senescencia. En cualquier momento el tubérculo tiene dos edades diferentes: la edad cronológica y la fisiológica (Jatala et al. 1982). La edad cronológica comienza a partir del inicio de la tuberización o a partir de la cosecha. La edad fisiológica, en cambio, se refiere fundamentalmente a todo el proceso de formación y desarrollo del tubérculo, incluyendo su brotación. En consecuencia, ésta depende tanto de la edad cronológica como de las condiciones ambientales a las cuales están expuestos los tubérculos. Así, los tubérculos pueden tener la misma edad fisiológica y no necesariamente compartir la edad cronológica.

Durante su desarrollo fisiológico el tubérculo atraviesa por varios estados, desde el estado de dormición hasta el estado de senescencia. Este proceso es llamado también envejecimiento fisiológico (Figura 10).

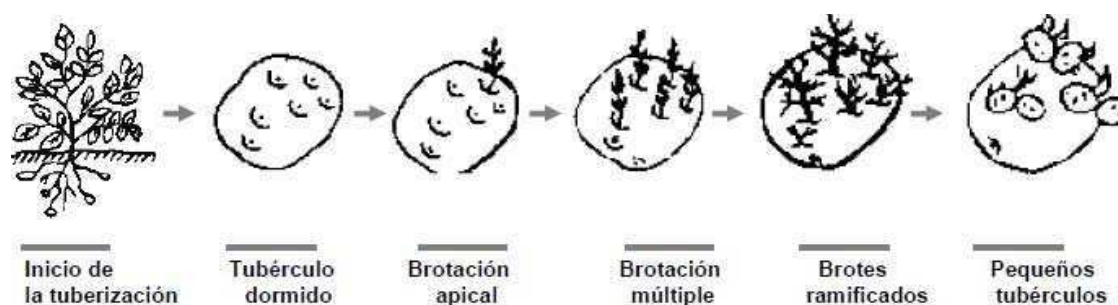


Figura 10|Evolución en la edad fisiológica del tubérculo de papa. Se inicia con el comienzo de la tuberización y finaliza luego de la brotación (www.cipotato.org)



Luego de la dormición sigue el estado de dominancia apical, mientras que el desarrollo de brotes adicionales se inicia una vez finalizada la dominancia apical. En este estado de brotación múltiple los tubérculos dan origen a plantas con varios tallos. Durante la brotación, los tubérculos presentan nudos (comúnmente llamados "ojos"). Estos son yemas axilares que luego de la dormición comenzarán la actividad mitótica con el fin de dar un brote. En cada nudo existen normalmente tres yemas, cada una de las cuales representa un potencial tallo con entrenudos no desarrollados. La disposición de los nudos es helicoidal, a partir del extremo proximal del tubérculo, zona donde va inserto el rizoma, hasta el extremo distal; en este último, los nudos son más abundantes y más profundos (Figura 11).

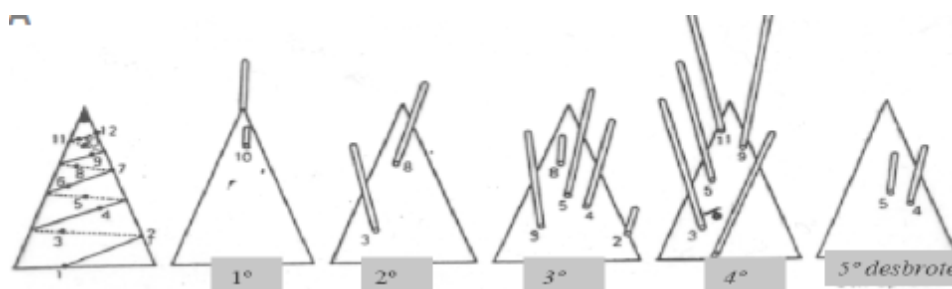


Figura 11 | Desarrollo de brotes en el tubérculo de papa. Ruptura de la dormición y dominancia apical. Adaptado de la Tesis doctoral de Giammaria V.

La yema apical del extremo distal es la que se desarrollará primero, estableciendo una marcada dominancia. Los nudos brotarán, dependiendo del número de yemas que posean, de su ubicación y de las reservas que el tubérculo posea. De estos ojos brotan entonces las nuevas plantas, cuando se recuperan las condiciones. De este modo, la papa puede reproducirse vegetativamente. Tal es así, que las variedades comerciales tienen una limitada capacidad de florecer ya que se propagan a través de "tubérculos semilla".

El tubérculo de la papa tiene una buena calidad como alimento (Camire et al. 2009). Es rico en carbohidratos, tiene poca grasa y un contenido de proteínas alto en relación con otros



tubérculos y raíces tuberosas. A su vez, posee una elevada cantidad de vitamina C y es una buena fuente de vitaminas B1, B2, B3 y B6, además de aportar minerales como potasio, fósforo y magnesio. Según datos de la FAO (<http://faostat.fao.org>), este cultivo ocupa el cuarto lugar mundial en importancia como alimento luego del maíz, el arroz y el trigo. Se estima que la producción mundial de papa en 2007 fue de 323 millones de toneladas, mientras que la Argentina produjo casi 2 millones de toneladas durante el año 2008, siendo así el cuarto productor de América Latina luego de Perú, Brasil y Colombia.

5. Transducción de señales en condiciones de estrés

Por definición, el estrés representa cualquier condición adversa que impida el normal funcionamiento y desarrollo de un sistema biológico (Bray et al., 2000). Este puede ser de origen biótico, es decir impuesto por otros organismos; o producto de un exceso o déficit de algún factor físico o químico en el ambiente, es decir de origen abiótico. Debido a que el ambiente mantiene a las plantas expuestas a numerosas condiciones adversas consideradas como factores de estrés, como temperaturas extremas, alta salinidad en el agua y el suelo, sequía, inundaciones, herbivoría y ataque de patógenos como hongos, bacterias y virus (Mahajan & N. Tuteja 2005); éstas se ven impedidas de expresar todo su potencial genético limitando la productividad de los cultivos. A nivel molecular, las condiciones de estrés activan una red de señalización que controla la percepción tanto de los estímulos bióticos, como abióticos. Esta transducción de las señales y su adecuada regulación se encuentra coordinada por los niveles de distintas hormonas (Shao et al. 2007). Como el ambiente percibido por la planta es resultado de interacción de diversos factores, las redes de señalización asociadas a todos los estímulos percibidos interactúan entre sí permitiendo la generación de respuestas adecuadas que facilitan a la planta ajustarse al contexto (Chinnusamy et al. 2004)



5.1 Estrés abiótico

El estrés abiótico es la causa principal de disminución en el rendimiento de los cultivos en el mundo (W. Wang et al. 2003). Este tipo de estrés puede desencadenar en las plantas numerosos cambios, tanto en niveles morfológicos y fisiológicos como en los bioquímicos y moleculares. En particular, las redes moleculares asociadas a la percepción y transducción del estrés abiótico involucran una gran cantidad de componentes que conforman cascadas de señalización que generarán diversas respuestas biológicas; las cuales tenderán a restablecer la homeostasis mediante numerosos mecanismos. En general, los estreses abióticos producen en las plantas efectos secundarios como el estrés osmótico y estrés oxidativo. A nivel celular, el plegado y funcionamiento de las proteínas, así como también la integridad de las membranas se ven afectados (Vinocur & Altman 2005). Una vez percibido el estrés, se activarán vías de transducción que producirán segundos mensajeros, como el calcio, especies reactivas del oxígeno (ROS) y fosfoinositoles (Mahajan y Tuteja, 2005) que regularán diversas cascadas, de fosforilación y desfosforilación de proteínas, con el fin de modular a factores de transcripción. Tanto, los genes que codifican para proteínas involucradas en la señalización como aquellos que participan en el restablecimiento de la homeostasis celular, podrán entonces modificar su expresión. Las modificaciones post-transcripcional, traduccional y post-traduccional son otra forma de regulación y respuesta a estrés, y suele condicionar tanto la abundancia como la actividad de las proteínas (Hirayama & Shinozaki 2010). En la modificación y ensamble de los complejos de transducción participan numerosos componentes accesorios, entre ellos, las enzimas que metilan, ubiquitinan o agregan grupos lipídicos a otras proteínas y las proteínas de andamiaje (Mahajan y Tuteja, 2005). Este tipo de respuesta posee una regulación fina, que se evidencia en los circuitos de retroalimentación positiva y/o negativa y la modificación de los niveles hormonales, en particular el ABA; los cuales permiten no sólo la amplificación de la señal, sino también el inicio nuevas rondas de transducción.



5.1.1 Estrés por bajas temperaturas

Cada especie vegetal tiene un rango óptimo de temperaturas para su desarrollo, mostrando síntomas de daño cuando son expuestas a temperaturas que se encuentran por debajo de su rango óptimo (Mahajan y Tuteja, 2005). Entre estos síntomas se encuentran una menor expansión foliar, marchitamiento, clorosis, necrosis y alteraciones en el desarrollo reproductivo. Temperaturas menores a los 0°C pueden generar daños aún mayores debido a la formación de cristales de hielo en los tejidos. La formación de estos cristales produce tanto daño mecánico en la estructura de las células como una severa deshidratación. Existen algunas especies que pueden aclimatarse al frío, ya que si son expuestas a bajas temperaturas previamente, son capaces de tolerar el congelamiento (Chinnusamy et al. 2007).

En la transducción de señales asociadas al frío se han descrito aumentos en la concentración de calcio en el citosol, modulación de la actividad de quinasas y factores de transcripción, así como también generación de ROS. Además, se encuentran involucradas hormonas como el ABA y las GAs, las cuales se las propone como moduladoras de algunos de los efectos y respuestas frente a este estrés (Penfield 2008). Dentro de las respuestas al estrés por frío, se encuentra la acumulación de compuestos osmoprotectores como azúcares y prolina, la inducción de genes que codifican para proteínas de tipo LEA (Mahajan y Tuteja, 2005; Chinnusamy et al., 2007) y el incremento de la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados con el fin de favorecer la fluidez de las membranas (Penfield, 2008).



5.2 Herbivoría

La interacción entre las plantas y los insectos fitófagos se ha moldeado durante millones de años, de modo que las distintas especies vegetales han desarrollado sofisticados sistemas de percepción y generación de respuestas frente a la herbivoría (J. Wu & Baldwin 2009). Las plantas son capaces de percibir patrones moleculares asociados a la herbivoría (HAMPs), los cuales pueden ser clasificados como *elicitors químicos*, presentes en las secreciones orales de los herbívoros y en los fluidos asociados a la oviposición; y señales originadas en los patrones específicos de *daño mecánico*. Tanto la glucosidasa presente en las secreciones orales de algunos insectos, y péptidos como las inceptinas, se encuentran entre las proteínas consideradas como *elicitors químicos* (Wu y Baldwin, 2009). Además también se encuentran compuestos conjugados formados por ácidos grasos derivados de las plantas y aminoácidos aportados por los insectos. La conjugación de estas moléculas tiene lugar en el intestino del insecto y el producto final, con propiedades anfifílicas, puede formar canales en las membranas e inducir respuestas de defensa en las plantas. Por otro lado, el *daño mecánico* es una consecuencia inevitable de la herbivoría (Maffei et al. 2007b). Tanto la extensión, como la intensidad del daño; así como también la frecuencia y la forma de alimentación del insecto aportan señales particulares que pueden ser utilizadas por las plantas para generar respuestas específicas hacia distintos herbívoros. Pueden, por ejemplo, modificar su metabolismo para producir compuestos tóxicos, repelentes o que dificulten el proceso de digestión en los herbívoros (Wu y Baldwin, 2009). Entre algunos de éstos compuestos, se encuentran los alcaloides, los compuestos fenólicos y los inhibidores de proteasas. Las plantas atacadas pueden emitir también, compuestos volátiles o producir néctar extra-floral para atraer a los predadores de los insectos fitófagos, generando una vía indirecta de defensa. Por otro lado, existen también barreras físicas que funcionan como defensas directas: la cutícula, los tricomas y las espinas. Con el fin de mantener un equilibrio entre crecimiento y defensa, todas



estas respuestas implican un costo metabólico; debiendo ser fuertemente reguladas tanto a nivel espacial como a nivel temporal. A nivel celular, la percepción de los estímulos asociados a la herbivoría puede generar señales como la despolarización de la membrana plasmática, el aumento de los niveles citoplasmáticos de calcio y la activación de quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPKs) y quinasas de proteínas dependientes de calcio (CDPKs). Además se estimula la producción de ROS y se modifican los niveles de distintas hormonas y mensajeros químicos como el ácido jasmónico (JA), el etileno, el óxido nítrico y la sistemina (Ryan & Pearce 2003; Schilmiller & Howe 2005; Maffei et al. 2007a; J. Wu & Baldwin 2009; Onkokesung et al. 2010). En particular, el JA es la hormona más importante en las interacciones planta-herbívoro y se ha descrito que su forma conjugada con el aminoácido isoleucina (JA-Ile) cumple un rol esencial en la inducción de las respuestas de defensa frente a este estrés. Por otro lado, a partir de la zona dañada se inicia un mecanismo de señalización a distancia que induce respuestas de defensa en tejidos de la planta que no han sido atacados (Schilmiller y Howe, 2005). Diversos estudios realizados en plantas de tomate han aportado evidencias de que los jasmonatos serían la señal sistémica móvil responsable de este proceso. A su vez, la sistemina, un péptido descrito en especies de la familia *Solanaceae*, regula positivamente la defensa sistémica amplificando la producción de JA en los tejidos vasculares. Finalmente, compuestos volátiles como los terpenos y el metiljasmonato (MeJA) son liberados por la planta dañada y pueden estimular respuestas de defensa en plantas adyacentes (Wu y Baldwin, 2009).

Hipótesis y Objetivos



RESULTADOS PREVIOS

Varias isoformas de CDPKs (proteínas quinasas dependientes de calcio), *StCDPK1*, *StCDPK2* y *StCDPK3*, se expresan diferencialmente durante la transición estolón-tubérculo y durante su posterior brotación. Se han caracterizado genómica y funcionalmente *StCDPK1* (Pablo R Gargantini et al. 2006) y *StCDPK2* (Giammaria et al. 2011) y *StCDPK3* (Tesis Doctoral de Grandellis CR, 2011). Se realizaron microarreglos a partir de ARN de brotes de papa cultivados con el fin de analizar los genes que responden diferencialmente a estímulos de luz, oscuridad, giberelinas, sacarosa. Se detectó expresión diferencial en las condiciones de luz/oscuridad de 2 clones en los microarreglos (*STMED71*, *STMHY37*) cuyas secuencias corresponden a isoformas de NDPKs, surgiendo esta nueva línea de investigación en donde nos propusimos caracterizar estas enzimas en plantas de papa mediante el clonado de las secuencias genómicas y codificantes de estos dos genes y el estudio de su expresión en respuesta a los estímulos ambientales.

HIPOTESIS

Dado que las NDPK son enzimas que:

- 1) poseen actividad de fosfo-transferasa,
- 2) participan de la red de comunicación energética intracelular, siendo capaces de alterar el pool de NTPs y afectar cascadas de transducción de señales en la planta.
- 3) Considerando además, que en toda situación de estrés subyace un compromiso energético.

Nuestra hipótesis de trabajo propone que las NDPKs podrían estar involucradas en la transducción de estímulos ambientales participando en la respuesta a algún estrés biótico ó abiótico.



OBJETIVOS

- Caracterizar molecularmente a las isoformas de NDPK de plantas de papa.
- Evaluar los parámetros bioquímicos de StNDPKs.
- Analizar la expresión de las isoformas halladas en diferentes tejidos y en respuesta a estreses bióticos y abióticos.

Materiales y Métodos



MATERIALES

1. Material vegetal

Se utilizaron plantas de papa *Solanum tuberosum* L. cv Spunta libres de virus, cultivadas *in vitro* o en invernadero. Estas plantas fueron obtenidas a partir de tubérculos semilla libres de virus provistos por Diagnósticos Vegetales S. A. (Mar del Plata).

1.1 - Cultivo de plantas de invernadero

Las plantas se cultivaron en macetas (tierra fértil: turba:perlita 1:1:1), a partir de tubérculos, bajo un fotoperíodo de 16h de luz y 8h de oscuridad, y una temperatura de 20-25°C. Las plantas crecidas en un invernadero se procesaron cuando tenían de 2 a 3 meses de edad. Se recolectaron brotes, hojas, pimpollos, flores, tallos, raíces, tubérculos y diferentes estadios de tuberización.

1.2 Plantas crecidas *in vitro*

Se utilizaron plantas micropropagadas *in vitro* a partir de segmentos nodales libres de virus. Estas plantas fueron inicialmente generadas a partir de brotes de tubérculos esterilizados con etanol 70/ (v/v) en agua durante 10 min, lavados con agua estéril y colocados por 10 min en una solución de hipoclorito de sodio 10/ (v/v) en agua. Luego de la esterilización, se realizaron múltiples lavados con abundante agua estéril y se separaron los brotes para ser colocados en tubos con medio de cultivo estéril. Los brotes y segmentos nodales fueron cultivados en medio Murashige – Skoog comercial (MS; Prod N° M519, PhytoTechnology Laboratories) con el agregado de 20 g/L de sacarosa y solidificado con agar 0,7/ (p/v). El pH del medio fue llevado a un valor de 5,7 utilizando KOH 1 M antes del agregado de agar. Las plantas se crecieron durante 2-3 semanas en una cámara de cultivo con fotoperíodo de 16 h de luz (intensidad 4000 lx) a 22- 24°C y luego fueron transferidas a medio MS comercial líquido conteniendo 20 g/L de sacarosa por 1 semana, antes de los tratamientos experimentales.

1.3 Brotación *in vitro*

Los tubérculos fueron previamente esterilizados con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 / , luego fueron lavados con agua estéril dos veces. Los tubérculos fueron transferidos a frascos de vidrios. Se mantuvieron bajo un fotoperíodo de 16h de luz y 8h de oscuridad, y una temperatura de 20-25°C.

2 - Tratamientos experimentales

Para todos los tratamientos se utilizaron plantas *in vitro* cultivadas durante tres semanas en condiciones de multiplicación hasta alcanzar entre 10 a 15 cm de altura.

2.1 Tratamientos relacionados con luz/oscuridad

Plantas *in vitro* fueron colocadas en la oscuridad durante 2 o 6 horas, a continuación, el material vegetal se cosechó. Como control de tiempo (TC) un conjunto de plantas se cosechó al inicio del experimento, antes de poner las plantas en la oscuridad.



2.2 Tratamientos relacionados con estrés

2.2.1 Daño Mecánico

A plantas in vitro se les produjo daño aplicando unas pinzas, perpendicular a la nervadura principal, en la tercera y quinta hojas totalmente expandidas. El material vegetal se cosechó 4hs después. Como control de la manipulación (MC) un conjunto de plantas in vitro se sometió al mismo procedimiento pero sin producir heridas como control de tiempo (TC) otro conjunto de plantas fueron cosechadas al inicio del experimento.

2.2.2 Acido Jasmónico (AJ)

Las plantas se colocaron en medio líquido durante 3 días y después se agregó 10µm de AJ. Se cosechó a las 2 ó 6 hs. Como control de la manipulación (MC), un conjunto de plantas in vitro se sometió al mismo procedimiento pero sin agregar AJ y como control de tiempo (TC) un conjunto de plantas se cosechó al inicio del experimento.

2.2.3 Frío

Plantas in vitro fueron colocadas en frío (4°C) durante 2 o 6 horas, a continuación, el material vegetal se cosechó. Como control de tiempo (TC) se cosechó un conjunto de plantas en el inicio del experimento, antes de poner las plantas en frío.

3 - Extracto de Mitocondrias y Cloroplastos Puros

En el siguiente protocolo se realizan todas las centrifugaciones a 4°C y las muestras deben mantenerse continuamente en hielo. Se homogenizaron 100 g de tejido de hojas ó tubérculos brotados previamente lavados con agua varias veces, en buffer de homogenato (BH): 0,4 M Manitol, 1mM EGTA, 25 mM MOPS-KOH pH 7,8, 10mM Tricina, 8mM Cisteína, 0,1/ (p/v) BSA y 1/ (p/v) PVP. Luego se filtro utilizando 8 capas de gasa superpuestas. Se centrifugó el homogenato por 5 min a 1000 x g, se recuperó el sobrenadante y se realizó un esquema de centrifugación diferencial hasta obtener el pellet enriquecido en organelas. Se realizó un gradiente de Percoll en el que se sembraron 2 ml de organelas/10 ml de colchón (28/ (v/v) Percoll, 10mM MOPS-KOH pH 7.2, 0,1/ (p/v) BSA) y se centrifugó 45 minutos a 40000 x g. Luego se aspiró las bandas correspondientes a las fracciones mitocondriales y de cloroplastos, se lavó diluyendo 4 veces con buffer de lavado (BL): 0,4 M Manitol, 1mM EGTA, 10 mM MOPS-KOH pH7,2, 0,1/ (p/v) BSA y centrifugando a 15000 x g durante 20 minutos para luego resuspender el pellet en buffer de resuspensión (BR): 0,4 M Manitol, 1mM EGTA, 10mM Tricina, pH 7,2. Las muestras se guardaron a -20°C hasta realizar la extracción de proteínas. Alternativamente se conservaron fracciones en 5/ (v/v) DMSO y 7,5/ (v/v) etilenglicol a -70°C para conservar las organelas intactas. (Millar *et al.*, 2007).

4 - Soluciones de uso general

4.1 - Soluciones empleadas en técnicas de ADN y ARN

- TE: 10mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA pH8.
- Tris-EDTA (50/50): 50 mM Tris, 50 mM EDTA.
- Tris-EDTA-NaCl (50/50/100): 50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1 M NaCl.
- TBE 10x: (1 litro) 108 g Tris base, 55 g ácido bórico, 40 ml 0,5 M EDTA pH8.
- TAE 50x: (1 litro) 242g Tris base, 57,1 ml ácido acético glacial, 100 ml 0,5 M EDTA pH8.
- TBF1: 30mM acetato de potasio, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 100 mM KCl y glicerol 15/ v/v, pH 5,8 ajustado con 2 N acético.



- TBF2: 10 mM MOPS pH 7, 5mM CaCl₂, 10 mM KCl y 10/ v/v glicerol. Se ajusta a pH 7 con KOH.
- Solución I: 25 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM glucosa y 10 mM EDTA. - Solución II: 0,2 M NaOH y 1/ SDS.
- Solución III: 3 M acetato de sodio pH 4,8
- H₂O DEPC, agua hexadestilada con el agregado de 0,01/ v/v di-etilpircarbonato. Se agitó durante toda la noche y al día siguiente se autoclavó dos veces.
- Buffer MOPS 10x: 0,2 M MOPS, 0,5 M acetato de sodio pH 7, 0,01 M Na₂EDTA.
- Buffer de siembra para muestras de ADN, 6x: 0,25/ p/v azul de bromofenol, 0,25/ p/v Xyleno Cyanol y 30/ v/v glicerol.
- Buffer de siembra para muestras de ARN: se emplearon 46 µl de la siguiente mezcla cada 30 µl de muestra de ARN. Mezcla: 6 ml MOPS 10x, 30 ml formamida desionizada, 9 ml formaldehído, 1 ml de Bromuro de Etidio (BrEt) 1mg/ml.
- Solución de prehibridación e hibridación de Southern y Northern blot, Church: (a) 134 g de Na₂HPO₄ 7H₂O ó 70 g de Na₂HPO₄ anhidro se disuelven en 500 ml de H₂O ajustándose a pH 7,2 con 2-4 ml de 85/ de H₃PO₄. (b) 10 g de seroalbúmina bovina (BSA) más 0,372 g de EDTA se disuelven en 200 ml de H₂O. Se hidrata primero despacio la BSA y luego se agrega el EDTA. (c) A los 500 ml de (a) se añaden y disuelven 70 g de SDS agitándose con calor. El volumen se lleva con H₂O a 800 ml. Mezclar (b) y (c).
- SSC 20x: 3M NaCl, 0,3M Na₃citrato, pH 7.

4.2 - Soluciones empleadas en técnicas de proteínas

- Buffer de siembra para muestras de proteínas, 5x: 50/ v/v glicerol, 7.7/ p/v DTT, 10/ p/v SDS, 0,4 M Tris-HCl pH 6,8 y 0,002/ p/v azul de bromofenol.
- Buffer Tris-glicina-SDS 10x: (1 litro) 30,3 g Tris base, 144 g glicina y 1/ v/v SDS.
- Azul de Coomasie: 0,025/ p/v Coomasie R250, 30/ metanol, 10/ ácido acético.
- TBS 10x: 0,25 M Tris-HCl pH 8, 9/ p/v NaCl.
- TBS-Tw: TBS 1x + 0,05/ v/v Tween 20.
- PBS: (1 litro) 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄
- PBS-Tw: PBS 1x + Tween 20 0,05/ v/v.
- Reactivo de Bradford: se usó el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* de BioRad.

5 - Oligonucleótidos

Para normalizar		Tm
Ubi1	ATGCAGATCTTTGTGAAGAC	60°C
Ubi2	ACCACCACGGAGACGGAG	58 °C
EF1 fw	ATTGGAAACGGATATGCTCCA	79 °C
EF1 rev	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA	77 °C
18S fw	CTGACGGAAAGATGTCCAAAC	58°C
18S rev	TCCTCCGCTTATTGATATGC	60°C

StNDPK 1 (5-3) EST STMED71		Tm
SAF71	TTTCAGGAGGACGAGCAGCAGC	72°C
SAR71	TCATCCTTTCGGTCTCGGG	71.6°C



SAF71-ATG	GCTTAGAGATGAATTCTCAG	54°C
CDS-SAF71-STOP	CACTTAGTTATCACCATATAGC	56°C
Intrón XL fw(rev)	CTCGAACAAGGAAACAAAGGC	60°C
Intrón XL rev (fw)	GTTGCATGCTCCTCTCTGAAA	60°C
Exón 1 rev	GCTGCTGCTCGTCCTCTGAAA	66°C
3UTR-SAF71	TTAGATAGGCATGAGGGTAGC	60°C
3UTR-SAR71	AAAGTACTTCATTACACATCCCACC	63°C
Fw 5UTR-NDPK1	5' GTGTGATCACGCGCGACTTCAT 3'	64°C
Exon 6 fw	CCCGAGACCGCAAAGGATGA	63°C
fw DELTA-ndpk1	5' GGATCCGGCAGGAGTGAATCTGGAAA 3'	69°C
rev DELTA-ndpk1	5' GTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTC 3'	75°C
StNDPK2 (5-3) EST STMHY37		Tm
SAF37	CTTCACAAAAATGTTGCTTCCC	62°C
SAF37 b	GTAAGGAAACAATTCTCA	49°C
SAX37 (rev)	TGTAATTGGCACGTATATT	52°C
RT37rev	GGAGAAAGGGAATGCCGTAGC	63°C
ATG-SA37 fw:	ACAGATGTTTCAGCAGACTCCT	60°C
STOP-SA37 rev:	CAATGACTTATAATTCATCAT	50°C

6 - Plásmidos

- pGEM-Teasy (Promega): Sistema de clonado de fragmentos de PCR. Posee resistencia a ampicilina, alto número de copias, sistema de β -galactosidasa (Blue/White) para identificación de clones positivos y secuencias promotoras para ARN polimerasas T7 y SP6.
- pRZETA: vector de clonado para expresión de proteínas recombinantes

7 - Identificación de StNDPKs

7.1 - Ensayos de Southern Blot

Se utilizó como sonda la secuencia codificante completa de StNDPK1.

7.2 - Anticuerpos

- Anticuerpos policlonales anti-StNDPK1 dirigidos contra el extremo C-terminal de la proteína. Los mismos fueron obtenidos en conejos utilizando como antígeno una péptido sintético de 20 aminoácidos acoplado a BSA.
- Anticuerpos policlonales contra isoformas humanas de NDPK: anti-H1, anti-H2, anti-H3, anti-H4 (cortesía de la Dra ML Lacombe)
- Anticuerpos policlonales anti-rubisco (cortesía de la Dra. S. Maldonado)
- Anticuerpos anti-citocromo C y anti-VDAC, (Santa Cruz)
- Anticuerpos monoclonales comerciales (SIGMA) que reconocen el dominio de seis histidinas.



-Anticuerpos secundarios: anti-Fc de IgGs de conejo o ratón acopladas a peroxidasa (Amersham e Invitrogen respectivamente)

7.3 - Inhibidores

- Antiproteásicos: 0,5 mM PMSF, 1 mM benzamidina, 2 µg/ml inhibidor de tripsina y 25 unidades/ml aprotinina.

Métodos

1-Identificación de genes

1.1- Preparación y transformación de bacterias competentes, Cepas *E.coli* DH5α y BL21 *codon plus*

La preparación de bacterias competentes de las cepas DH5α y BL21 *codon plus* se realizó como se describe a continuación: - Se plaquean bacterias sobre LB-agar y se crecen a 37°C durante la noche.

- Se transfieren 4 ó 5 colonias aisladas a un tubo de cultivo con 3 ml de LB y se crecen con agitación a 37°C durante la noche.

- Se inocula 1 ml de cultivo a 100 ml de LB en un erlenmeyer de 500 ó 1000 ml, y se crece con agitación a 37°C hasta que la densidad óptica a 600 nm sea 0,5.

- Se deja 10 min en hielo.

- Se centrifuga a 3000 rpm a 4°C durante 5 min y se descarta completamente el sobrenadante.

- Las bacterias se resuspenden cuidadosamente en 40 ml de buffer TFB1 frío y se dejan 5 min en hielo.

- Se centrifugan a 3000 rpm a 4°C durante 5 min y se descarta el sobrenadante.

- Se resuspenden en 4 ml de TFB2 frío y se incuban en hielo 15 min.

- Posteriormente, las bacterias se alicuotan en tubos eppendorf estériles envolumenes de 50 ó 100 µl congelándose inmediatamente en nitrógeno líquido.

- Se almacenan las alícuotas a -70°C.

- Para cada transformación se usaron 50 µl de bacterias competentes. Estas se descongelaron en hielo y se transformaron con 1-10 ng de plásmido. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min y se sometió a un golpe de calor de 42°C durante 90 segundos, enfriándose después durante 1-2 min en hielo. Se agregaron 400 µl de LB estéril y las bacterias se recuperaron a 37°C durante 30 min. Se plaquearon de acuerdo a la eficiencia de las bacterias y a la cantidad de plásmido utilizado.

1.2 - Purificación de plásmidos

Se realizó a partir de cultivos bacterianos de 3 ml (minipreparaciones) ó de 50 ml (midipreparaciones).

- Las midipreparaciones de alta pureza se realizaron con el sistema WIZARD Kit de PROMEGA según las instrucciones del fabricante.

- Para las minipreparaciones, en la mayoría de los casos se utilizó el método de lisis alcalina descrito en el manual "Current protocols in Molecular Biology, Cap.1 (editado por Ausubel y col. 1996):

- Partir de 3-5 ml de un cultivo bacteriano crecido durante toda la noche en medio LB con el antibiótico correspondiente.

- Cosechar las bacterias por centrifugación a 4000 rpm durante 5 min a Tº amb.

- Resuspender el pellet en 300 ml de solución I.



- Agregar 300 ml de solución II, preparada en el momento, mezclar suavemente y dejar 5 min en hielo.
- Agregar 300 ml de solución III, mezclar suavemente y dejar en hielo 5 min.
- Centrifugar a máxima velocidad por 10 min y tomar el sobrenadante.
- Agregar 50 mg/ml de ARNasa A (libre de ADNasa) y se incubó por 30 min a 37°C.
- Hacer 2 extracciones con 400 ml de cloroformo.
- Precipitar con el agregado de 1 volumen de isopropanol 100% y centrifugar a 13.000 rpm por 10 min a T° amb.
- Lavar el pellet con etanol 70%, secar y resuspender en 20 µl de H₂O o TE.

1.3 - Secuenciación y análisis de las secuencias

Todas las construcciones realizadas, como las secuencias genómicas obtenidas por PCR fueron secuenciadas en centros de servicios: Macrogen Inc. World meridian Venture Center, Gaseong-dong, Geumcheon-gu, Seoul, Korea y el Servicio de Secuenciación y Genotipado, USFCEyN.

El análisis y la comparación de las secuencias se realizaron con BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast).

1.4 - Marcación de sondas radioactivas

Las sondas radioactivas se prepararon con el kit Prime a gene (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La marcación se realizó utilizando 25 ng de fragmento de ADN por iniciación al azar de la polimerasa utilizando una batería de hexámeros inespecíficos. Como nucleótido radioactivo se usó [³²P]-dCTP. La sonda se purificó utilizando columnas de Pharmacia Biotech (MicroSpin™ S-300 HR Columns) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2 - Técnicas generales

2.1 - Subclonado en el vector pGEM®-T Easy

La Taq polimerasa deja, en los extremos 5' de sus productos de amplificación, nucleótidos A sobresalientes. Los productos de PCR obtenidos en estas condiciones se subclonaron en el plásmido pGEMT-easy, incluido en el kit pGEM-T Easy vector System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de fragmentos de PCR amplificados con la enzima Pfu, se realizaron reacciones de agregado de los nucleótidos A salientes (tailing) previo al subclonado en el plásmido pGEMT-easy. Para ello se siguieron las instrucciones del kit.

2.2 - Otras reacciones de ligación

En cada reacción de ligación se utilizaron entre 10 y 50 ng de vector. Se hicieron diferentes relaciones molares de inserto: vector (1:1, 3:1 y 5:1) manteniendo constante la masa de vector y variando la cantidad de inserto. Los volúmenes de reacción fueron de 10 o 20 µl utilizando la enzima ADN ligasa del fago T4 (Promega). Para ligar extremos romos se usó 1 UI de enzima y para extremos cohesivos 0,5 UI. Las incubaciones fueron realizadas a 4°C durante toda la noche o a temperatura ambiente por 1 h respectivamente.

2.3 - Corte con enzimas de restricción

Las digestiones de ADN plasmídico, ADN genómico o ADN obtenido por PCR se realizaron en los buffers indicados por el fabricante. Las enzimas utilizadas fueron de New England Biolabs, Promega o GibcoBRL. Se utilizaron de 3 a 5 unidades de enzima por mg de ADN y las incubaciones se hicieron a las temperaturas recomendadas por el fabricante.

2.4 - Amplificaciones por PCR



A partir de secuencias identificadas se diseñaron los oligonucleótidos que se usaron en las diferentes reacciones de amplificación por PCR. La mezcla de amplificación estaba compuesta por el ADN molde correspondiente, 100 ng de cada oligonucleótidos, 1 a 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, buffer Taq, Pfu o Herculasa y 2,5 UI de enzima ADN polimerasa (Taq, Pfu ó Herculase, dependiendo del objetivo final de la PCR).

Todas las reacciones constaron de:

- 5 min a 95°C (desnaturalización inicial del ADN)

30 ciclos de:

- 30 seg a 95°C (desnaturalización)

- 30 seg a T° (anidado)

- t min a 72°C (elongación)

- 10 min a 72°C (elongación final)

Donde T° y t son variables, que dependen de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos usados en cada reacción de PCR y de la longitud del fragmento amplificado en cada caso.

Las reacciones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa entre 0,8 y 1,5/, dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar.

2.5 - Electroforesis de ADN

Se utilizaron geles de agarosa nativos. Estos se prepararon con buffer TBE 1x o TAE 1x al 0,7-1,5/ con 0,5 mg/ml de EtBr. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5 - 10 V/cm. Antes de sembrar, las muestras se resuspendieron en el correspondiente volumen de buffer de siembra. Los geles fueron visualizados y fotografiados con el equipo Image Master VDS, de Pharmacia-Biotech.

2.6 - Purificación de fragmentos de ADN de geles

En la mayoría de los casos, los fragmentos de ADN se purificaron utilizando el Clean PCR (PROMEGA). Los fragmentos de ADN a purificar se separaron por electroforesis en geles de agarosa en buffer TAE 1x y luego se siguieron las instrucciones del fabricante.

2.7 Aislamiento y análisis de la secuencia de la región promotora de StNDPK1.

Se utilizó el kit universal de Genome Walker (Clontech Labs, Inc., Palo Alto, CA) para aislar la secuencia del promotor del gen StNDPK1 acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los oligonucleotidos específicos fueron diseñados río abajo del codón ATG , GSP1-NDPK1 (5 'GCTGCTGCTCGTCCTCTGAAAAGC 3') para la primera ronda de reacción de PCR y GSP2 NDPK1-(5'ACACCAGAAATCCAAGCTCTAGATGC 3 ') para la PCR anidada. El producto final de PCR de 2372 pb fue clonado en pGEM[®]-T Easy (Promega) a través del método de clonación TA y la secuencia de constructo se confirmó mediante secuenciación de ADN en las instalaciones de la Universidad de Iowa. El BLAST contra el genoma secuenciado de *S. phureja*, scaffolds v3, confirmó el aislamiento de la región del promotor por alta identidad de alineamiento local con uno de los scaffolds.

2.8 El análisis de silico:

Stndpk1 secuencia genómica se analizó contra los 181 MB del genoma completo de *S. phureja* DM1-3 516R44 (CIP801092), scaffold v3 (PGSC; <http://www.potatogenome.net>)

El análisis del promotor de Stndpk1 se analizó en PLACE, <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>; PlantCARE <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/> y PlantPAN, <http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/genegroup/index.php>.

Las secuencias genómicas se analizaron con Blastx, contra la base de datos de secuencias de proteínas no redundante (nr) del NCBI, y el alineamiento local entre la secuencia codificante y



la secuencia genómica de StNDPK1 se evaluó con BLASTN (bl2seq) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

El análisis de la secuencia codificante de StNDPK1 se realizó con ExPASy (<http://expasy.org/proteomics>).

Las alineaciones globales se realizaron con Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>).

La secuencia completa traducida de StNDPK1 y la secuencia de aminoácidos de siete NDPK de plantas de la base de datos NCBI detectados mediante BLASTP se utilizaron para el análisis filogenético. Estos datos fueron organizados en un árbol filogenético con el programa ME-Boot del paquete MEGA (5,03 versión) y el programa de vecino más próximo.

3 - Caracterización molecular de genes identificados

3.1 - Cuantificación de ácidos nucleicos

Muestras de ADN, ARN y oligonucleótidos se cuantificaron por medición de la absorbancia a 260 nm. Las concentraciones se calcularon sabiendo que $1DO_{260nm}$ de ADN= 50 mg/ml, $1DO_{260nm}$ de ARN= 40 mg/ml y $1DO_{260nm}$ de oligonucleótidos= 33 mg/ml y teniendo en cuenta el factor de dilución. Muestras de ADN también se cuantificaron por gel, comparando las intensidades observadas al UV con las intensidades dadas por un marcador de masa conocida.

3.2 - Extracción de ADN genómico

- Se pesa hasta 1 g de tejido vegetal fresco.
- Macerar las hojas en un mortero con nitrógeno líquido.
- Transferir a un tubo de polipropileno conteniendo 10 ml de buffer CTAB (2/ CTAB, 1,4M NaCl, 100mM Tris-HCl, pH8, 20mM EDTA, 0.2/ b-MeOH) precalentado a 65°C. Incubar entre 30 min y 1 h agitando cada 10 min.
- Agregar un volumen de cloroformo y agitar por inversión.
- Centrifugar durante 10 min a 5000xg.
- Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo. Repetir la extracción con cloroformo (esta etapa puede repetirse una o dos veces más para lograr una muestra más pura).
- Adicionar RNAsa A a una concentración final de 100 mg/ml e incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Agregar 0.6 volúmenes de isopropanol frío y mezclar suavemente por inversión.
- Si se forma un ovillo de ADN se toma con un anillo y se pasa a un tubo con 500 µl de etanol 70%. De lo contrario centrifugar la muestra durante 1 minuto a 4000 rpm.
- Secar el precipitado.
- Resuspender en 1 ml de TE o agua destilada (libre de nucleasas) toda la noche a 4°C con agitación.
- Concentrar la muestra hasta aproximadamente 200 µl en SpeedVac.

3.3 - Ensayos de Southern Blot

Se digirieron 10 µg de ADN genómico con diferentes enzimas de restricción. La reacción se llevó a cabo en 400 µl finales, empleando 3 UI de enzima por microgramo de ADN genómico. Se incubó el ADN con el buffer apropiado para cada enzima a 4°C durante unas horas. Luego del agregado de la enzima de restricción se incubó unos minutos a 4°C y después se incubó a 37°C durante toda la noche.

Al otro día se agregó 0,1 volúmenes de 3 M acetato de sodio, pH5.2 y 2,5 volúmenes de etanol 100% frío.



Se incubó a -80°C durante una hora y se centrifugó a máxima velocidad durante 20 min. Se secó el pellet y se resuspendió en 30 ml de 10 mM Tris, pH 7,5. El ADN digerido se separó en un gel de agarosa 0,7% que se corrió a 70 V durante 5-6 h. A continuación el gel se trató con HCl 0,25 N durante 30 min, se lavó con H_2O y se transfirió durante la noche a una membrana de nylon Hybond N+ (Amersham) con 0,4 N NaOH. La membrana se lavó con SSC 2x y se prehibridó con Church a 65°C . Posteriormente se hibridó durante toda la noche con una sonda marcada con ^{32}P dCTP. La membrana se lavó 20 min con 2x SSC, 0,1% SDS y 20 min con 1x SSC, 0,1% SDS. Se expuso a una placa fotográfica X-Omat de Agfa con pantalla amplificadora y a -70°C . La placa se reveló entre 7 y 10 días después. Alternativamente se registró la señal empleando un fosforimager Storm 820 (Pharmacia-Biotech).

3.4 - Extracción de ARN total

Este método se utilizó para extraer ARN de diferentes tejidos de las plantas.

Antes de realizar la extracción de ARN todo el material y las soluciones a utilizar fueron esterilizados en un autoclave a 1 atmósfera de presión durante 20 min para evitar la actividad de RNAsas.

Las extracciones se realizaron como se detalla a continuación:

- 0,3 a 1 g de material vegetal fue cosechado y congelado inmediatamente en nitrógeno líquido. En un mortero previamente enfriado se procesó el material hasta obtener un polvo fino. Durante todo el proceso el material siempre se mantuvo congelado.
- Se agregó 1 ml de TRIzol (Invitrogen) por cada 100 mg de material vegetal.
- La mezcla se transfirió a un tubo Corex de vidrio y se centrifugó a 12.000 xg a 4°C durante 10 min en una centrífuga Sorvall con un rotor SS-34.
- El sobrenadante se transfirió a un tubo Falcon estéril de 15 ml y se mantuvo a T ambiente durante 5 min para permitir la completa disociación de los complejos nucleoprotéicos.
- Se agregó 0,2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol inicial. A continuación los tubos se agitaron a mano por inversión durante 15 segundos y se incubaron a T ambiente 2-3 min.
- La mezcla se transfirió a un tubo Corex nuevo y se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C durante 15 min.
- La fase acuosa (superior) se transfirió a un nuevo tubo y se le agregó 0,5 ml de isopropanol más 0,5 ml de citrato de sodio 1.2 M + NaCl 0,8 M por cada ml de Trizol utilizado.
- La mezcla se incubó a T ambiente 10 min y después se precipitó a 10.000 rpm a 4°C durante 10 min en la centrífuga. Se descartó el sobrenadante.
- El sedimento con aspecto gelatinoso se resuspendió en 3 ml de 3 M acetato de sodio pH 5,2, agitándolo en el vórtex durante unos segundos hasta su completa resuspensión. La mezcla se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 min a 4°C . De esta manera se eliminaron los polisacáridos.
- El sedimento se lavó con 2 ml de etanol 70% preparado con H_2O DEPC y se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 15 min.
- El sedimento se secó con el tubo invertido. Cuando estuvo bien seco se resuspendió en 30-200 μl con H_2O DEPC en función de la cantidad de material inicial procesado. El ARN se guardó a -70°C hasta el momento de usarlo.

3.5 - Electroforesis de ARN

Se utilizaron geles de 1,4% agarosa desnaturalizantes con 6% formaldehído en buffer MOPS 1x pH 7. Las muestras a sembrar se diluyeron a 30 μl con agua DEPC y se les agregó 46 μl de buffer de siembra. Las mismas se calentaron a 65°C por 10 min y se colocaron en hielo. La corrida electroforética se realizó con buffer MOPS 1x, formaldehído 6% a 5-10 V/cm. Los geles fueron visualizados y fotografiados con el equipo Image Master VDS, de Pharmacia-Biotech.



3.6 - Transcripción reversa

En todos los casos, 10 µg del ARN obtenido fueron tratados con 10 unidades de ADNasa 1 libre de ARNasas (Promega) durante 30 min a 37°C. Luego de la incubación las muestras se trataron durante 10 min a 75°C y se precipitaron con acetato de sodio y etanol toda la noche a -20°C. A continuación se centrifugaron en frío durante 20 min a 13.000 rpm. El precipitado se resuspendió en agua DEPC y se cuantificó a 260nm en un espectrofotómetro. El rendimiento fue del 50 a 90%. El ARN tratado con ADNasa se almacenó a -70°C y se utilizó como molde en la síntesis de ADNc. La transcripción reversa se llevó a cabo durante 1h a 42°C utilizando la M-MLV-Transcriptasa Reversa (Promega) y 2 µg ARN molde.

3.7 - PCRs semicuantitativas

En primer lugar se realizaron reacciones control de PCR para confirmar el uso de cantidades equivalentes de ADNc molde, empleando oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento de 250 pb de la ubiquitina (20 ciclos de amplificación con temperatura de anidado 55°C) o un fragmento de 100pb usando oligonucleótidos específicos que amplifican el 18s (25 ciclos de amplificación con temperatura de anidado 58°C)

A continuación se realizaron reacciones semicuantitativas de RT-PCR usando oligonucleótidos específicos para amplificar exclusivamente cada ARNm.

Las PCRs se realizaron usando Taq polimerasa (Invitrogen) y constaron de 25 ciclos, la temperatura de anidado correspondiente a cada par de oligonucleótidos está indicada en las figuras. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa.

4 - Estudios bioquímicos

4.1 - Extracción de proteínas en condiciones nativas

Las distintas fracciones obtenidas de la purificación de mitocondrias se utilizaron para realizar la extracción.

Buffer de Extracción (BE): 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM β- mercaptoetanol, 1 mM EDTA y 20% (v/v) glicerol. En el momento usarse se agregaron los inhibidores de proteasas al buffer.

El material se procesó añadiendo BE en una relación 1:1 (v/v) y se incubó a T ambiente por 5 min.

Se lisaron las membranas celulares y subcelulares haciendo 5 ciclos de congelado y descongelado en N₂ líquido y agua a T ambiente.

Luego se centrifugó a 20.000 x g a 4°C durante 20 min

Se descartaron los pellets y se cuantificó el sobrenadante de cada muestra

4.2 - Extracción de proteínas con TRIzol (Invitrogen)

a - Precipitación de DNA

- Remover la fase acuosa remanente en la interfase.
- Agregar 0,3 ml de etanol 100% por ml de TRIzol utilizado. Mezclar por inversión.
- Incubar a T° amb por 3 min.
- Centrifugar 5 min a no más de 2.000 x g a 4°C
- Traspasar el sobrenadante a otro eppendorf.

b - Precipitación de Proteínas

- Agregar al sobrenadante 1,5 ml de isopropanol por ml de TRIzol utilizado.
- Incubar a T° amb por 10 min.
- Centrifugar 10 min a 12.000 x g a 4°C. Descartar el sobrenadante.

**c - Lavados**

- Lavar el pellet 3 veces con 2 ml de hidrocloreto de 0,3 M Guanidina en etanol 95/ por cada ml de TRIzol utilizado. En cada lavado incubar 20 min a T° amb.
- Centrifugar 5 min a 7.500 x g a 4°C
- Luego del tercer lavado mezclar con vortex el pellet en 2 ml de etanol e incubar 20 min a T ambiente
- Centrifugar 5 min a 7.500 x g a 4°C

d - Resuspensión

- Secar por vacío el pellet entre 5 a 10 minutos.
- Disolver en SDS 1/ (ocasionalmente puede incubarse a 50°C para completa disolución).
- Centrifugar el sedimento y el material insoluble 10 mins a 10.000 x g a 4°C.
- Transferir el sobrenadante a otro eppendorf.

4.3 - Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas de los extractos fue determinada por el método de Bradford (1976) utilizando muestras concentradas o diluciones de los mismos. Se usó albúmina de suero bovino para realizar una curva de calibración y las lecturas de absorbancia se hicieron a 620 nm. Se realizaron como mínimo dos duplicados por cada muestra.

4.4 - Electroforesis de proteínas

Se utilizaron geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Se armaron geles desnaturizantes (0,1/ SDS) de 10 a 15/ en celdas BioRad 220. Las muestras a ser analizadas se prepararon agregándoles los volúmenes correspondientes de buffer de siembra 5 x y calentándolas por 3-5 min a 100°C. Como buffer de corrida se usó Tris-glicina-SDS 1x. Se usaron marcadores de peso molecular de Fermentas (11 a 170 kDa).

4.5 - Ensayos de Western Blot

Extractos proteicos fueron resueltos en geles SDS-PAGE al 12-15/ y luego electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa (Amersham-C). La transferencia se hizo en cuba de inmersión (Bio-Rad) utilizando Tris-glicina 1x, 20/ metanol durante 1 - 1,5 h a 70-80volts. Las membranas se incubaron durante 1 h con solución de bloqueo (3/ BSA en buffer TBS-Tw) y luego con los correspondientes anticuerpos primarios durante 1-2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tw, se incubaron durante 1 h con los correspondientes segundos anticuerpos y se volvieron a lavar. Como sustrato para la peroxidasa se usó el kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham). Los anticuerpos secundarios se diluyeron en BSA 0,3/ con buffer TBS-Tw.

4.6 Ensayos de actividad de NDPK

La actividad de NDPK se determinó indirectamente por la piruvato quinasa (PK) - lactato deshidrogenasa (LDH) de acuerdo a Ulloa et al. (1995), utilizando 60 µg de proteína total de extracto crudo (EC) ó extractos de citoplasma (CY), cloroplastos (CL) y mitocondria (MI) en un volumen final de 500 µl. Cada fracción se incubó en una mezcla de reacción que contiene 80 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 3 mM PEP, 25 mM de KCl, 0,3 mM de NADH, 1,25 UI/ml PK y 2,2 UI/ml LDH. Después de 2 min de incubación a 28 °C la reacción se inició con la adición de ATP como donador de fosfato y dTDP como aceptor de fosfato (concentración final 2 mM y 0,4 respectivamente). La disminución en la absorbancia a 340 nm fue registrada para un máximo



de 10 mins cada 15 seg. Dos controles se realizaron para registrar la oxidación del NADH en ausencia de extracto enzimático: la oxidación basal de NADH que da el valor de la pendiente mínima (sin actividad) y en presencia de 2 mM de ADP para detectar la actividad máxima del sistema. La mezcla de reacción sin la adición de NADH se utilizó para establecer en el espectrofotómetro (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech) el cero de actividad. Se midió actividad ATPasa incubando cada muestra con la misma mezcla sin la adición de dTDP, la actividad endógena asociada a la presencia de las ATPasas, NDPs y NTPs se resta a cada muestra, por lo que la actividad NDPK se definió como

$$\text{Actividad NDPK} = \Delta \text{ absorbancia} = (\alpha - \beta).$$

Donde α es la actividad NDPK de la muestra que contiene la actividad medida por la adición exógena de ATP y dTDP más la actividad de la ATPasa y la generada por los NTPs y NDPs endógenos, y β es sólo la actividad de ATPasa y la generada por los NTPs y NDPs endógenos. Se consideró actividad como un cambio de al menos un orden en la pendiente entre la mínima y máxima calculada.

5 - Proteína recombinante StNDPK1

5.1 - Clonado de StNDPK1 en un vector de expresión

Se digirieron 300 ng del plásmido pGEM conteniendo a StNDPK1 con las enzimas de restricción BamHI y SacI, con el buffer BamHI de Fermentas, en un volumen final de 10 μ l. Se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se aisló del gel una banda de 780 pb correspondiente a la NDPK1. Se subclonó en el vector de expresión pRSET-A digerido con las mismas enzimas, de modo de obtener la proteína recombinante StNDPK1::6xHis etiquetada con seis Histidinas en el aminoterminal.

Se transformaron células de *E. coli* DH5 α con 5 μ l de la mezcla de ligación y se plaquearon en medio selectivo (LB- Agar, Ampicilina 100 μ g/ml). Se incubó 18 hs a 37°C. Se seleccionaron 4 clones en medio líquido (LB, Ampicilina 100 μ g/ml). Se realizó una QuickPrep de los mismos para identificar alguno que contuviera el inserto. Luego se extrajo el plásmido y se lo digirió con BamHI y NcoI para confirmar que contenía el inserto.

5.2 - Expresión de StNDPK1 recombinante

Cultivos saturados de *E. coli*, BL21 transformadas se diluyeron 1:20 en LB ampicilina-cloranfenicol y se incubaron con agitación a 37°C, hasta una DO_{600nm}=0,7. Luego se indujeron con 1 mM IPTG (concentración final) por 2 a 3 h. El cultivo bacteriano se centrifugó y el pellet se resuspendió en buffer de lisis, luego se sonicó la muestra, obteniéndose el extracto total inducido. Para ensayos de Western Blot se utilizaron 20 μ l de extracto total por calle, la presencia de la proteína recombinante se detectó tanto con el antisuero de conejo anti-NDPK1 como con un anticuerpo anti-6xHis.

5.3 - Purificación de proteínas recombinantes en condiciones nativas

Para purificar la proteína recombinante en condiciones nativas a partir de un litro de cultivo (LB/Ampicilina/ BL21-StNPK1x6HIS) se siguió el siguiente protocolo (Qiagen):

- Centrifugar el cultivo (LB/Ampicilina/ BL21-StNPK1::6xHis) durante 10 min a 1.000 xg y descartar el sobrenadante
- Resuspender el pellet en 10 ml de buffer de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8).



- Agregar 1mg/ml de lisozima e incubar en hielo por 30 min
- Sonicar 6 veces con ciclos de 10 seg cada uno (4º C).
- Centrifugar el lisado a 10.000 xg durante 20-30 min a 4ºC, descartar el pellet y guardar el sobrenadante.

6 - Obtención de Anticuerpos

Se inyectaron conejos en dos dosis con 10 µg del péptido sintético(KPEELVKYTSNSEKWLYGDN) acoplado a BSA mezclada con adyuvante de Freund completo (en 6 lugares diferentes cada vez) con un intervalo de 15 días. A los 30 días de la segunda inoculación se realizó una sangría exploratoria para chequear el título específico. A la semana se realizó el sangrado de los cinco ratones obteniéndose los sueros antigénicos. La especificidad de los antisueros fue probada en ensayos de Western blot.

Resultados



RESULTADOS

1. StNDPKs en *Solanum tuberosum*

1.1 Clonado de la secuencia codificante completa de StNDPK1

Se amplificó la región codificante completa de StNDPK1 usando como molde ADNc de brotes de papa y oligonucleótidos diseñados sobre la región 5´y 3´del EST STMED71 (gb | BQ118728.2) (gb | 504628.1), uno de los clones del microarreglo de ARN (Tesis doctoral Giammaria V, 2009). Inicialmente, se obtuvo un fragmento de 555 nts. que fue sub-clonado y secuenciado, el cual mostraba un 83% de homología con NDPK4 de *Spinacia oleracea*.

El análisis de ésta secuencia utilizando programas del NCBI nos permitió diseñar oligonucleótidos específicos y así obtener la secuencia codificante completa. La región 3´UTR se obtuvo mediante RACE 3´. Se amplificó un fragmento de 1012 nts que también fue sub-clonado y secuenciado. (Figura 12)

5´ TCTATGTTAGTTTCACTCAATTTCTCACTCTCTTTCTCTCTATCACATTTTCGACTTTCTCTCTCTAAAAAGCTTAGCATGAATTTCTCAGATTTGCAGATCTGCTTCACGAGCAGCAAAGTCACCTCTTCTGCTTCATCTAAGCAGACTTCTCGTGCTTTTT CAGGAGGACGAGCAGCAGCTGCAGCTGCCACAGTTTCTTTGAGAGGAGTGCTGCTTCATAGCCCATATGGCAGGAGTGAATCTGG AAATGCATCTAGAGCTTGGATTTCTGGTGTCTTGTGCCCTTCTGAGCAGCTTACATGCTCCAGGAGCAAGAAGCAGCAGCTGCTGAG ATGGAGCGCACCTTTATCGCCATCAAGCCAGATGGAGTACAGAGGGGCTGATTTAGAAATCGTATCACGCTTTGAGCGCAAGGGCT TCAAGCTGGTTGCAATCAAAGTTGTGATTCCTTCAAAGGAATTTGCAAAGAAGCACTATCATGACTTGAGTGAGAGACCATTCTTTAA TGGTTTGTGCGATTTCTAGCTCTGGCCCTGTCTTAGCAATGGTTTGGGAAGGTGAAGGTGAATCAGATATGGAAGGAAGCTTATA GGAGCCACTGATCCACAGAAATCTGAACCTGGAACCATCAGAGGGGATTTAGCTGTTGTAGTTGGAAGGAACATCATCCATGGCAGCG ATGGCCCCGAGACCGCAAAGGATGAAATCAACCTATGGTTTAAACCAGAGGAGTTGGTAAGTACACCAGCAACTCTGAGAAGTGGCT ATATGGTGATAACTAAAGTGAATGTACTCTTTGCATTAATCTAATTAATTTGCCATTAGATAGGCATGAGGGTAGCAACTCATAAAATCA AATAATACCATTTTTTCTAAAGCGAGTAGCAACTTTACATTTAGTATACTATTTAAAATCACCNCCATAATATTGTATTGAAACAT TGAATTTCAATTTTTTTTGTCCAATGCAATGATTATGCCCAGTATGTTGGTGGGATGTGTAATGAAGTACTTTTTTCGGAGTTAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3´

Figura 12 | Secuencia codificante de StNDPK1 (gb | FJ743686). Se detallan las regiones UTR subrayadas



Esta secuencia fue liberada en GenBank (Acceso FJ743686; *Solanum tuberosum* nucleoside diphosphate kinase (StNDPK1), mRNA, complete cds, isolated from sprouts. AUTHORS Bachmann,S.D. and Ulloa,R.M.) (Figura 13)

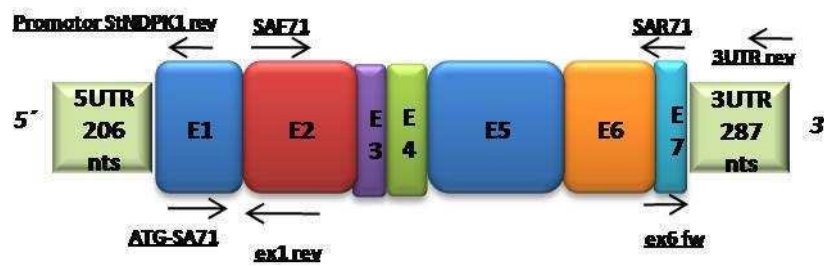


Figura 13| Diagrama de la secuencia codificante de StNDPK1. Se detallan los exones en cajas, la región 3'UTR en naranja.

La traducción de la secuencia nucleotídica generada en ExPASy (<http://www.expasy.ch/>) muestra que StNDPK1 tiene 238 amino ácidos de longitud, un peso molecular aproximado de 26 kDa y un punto isoeléctrico de 9.24 (Figura 14)

```

StNDPK1
atgaattotcagatttgagatctgcttcaagcagcagtaagtcactcccttctgtctca 60
M N S Q I C R S A S R A A K S L L S A S 20
totaaacagacttctcgtgcttttccaggaggacgagcagcagctgcagctgccacagtt 120
S K Q T S R A F S G G R A A A A A T V 40
tgtttgagaggagtgggctcttctatagcctcatatggcaggagtgaatctggaaatgca 180
C L R G V V P S L A S Y G R S E S G N A 60
ctagagcttggtattctggctgcttgccttgcccttcctgcagcagottacatgctccaggag 240
S R A W I S G V L A L P A A A Y M L Q E 80
caagaagocacatgctgctgagatggagcgcacctttatcgccatcaagccagatggagta 300
Q E A H A A E M E R T F I A I K P D G V 100
cagagggggcctgatattcagaaatcgtatcacgctttgagcgcagggctcctcagctgggt 360
Q R G L I S E I V S R F E R K G F K L V 120
gcaatcaaagttggtgattccttcaaaggatttgcaaagaagcactatcactgacttgagt 420
A I K V V I P S K E F A K K H Y H D L S 140
gagagaccattctttaatggtttgctgatttctcttagctctggcctgtcttagcaatg 480
E R P F F N G L C D F L S S G P V L A M 160
gtttgggaagggtgaaggtgtaacatcagatatggaaggaagcttattggagccactgatcca 540
V W E G E G V I R Y G R K L I G A T D P 180
cagaaatcgaacctggaaccatcagagggcatttagctggttgagtcggaaggaacatc 600
Q K S E P G T I R G D L A V V V G R N I 200
atocattgacagcagatggcctcgagaccgcaaaggatgaaatcaacctatggtttaaacca 660
I H G S D G P E T A K D E I N L W F K P 220
gaggagttgggtaagtacaccagcaactctgagaagtggtatattggtgataactaa 717
E E L V K Y T S N S E K W L Y G D N - 238
  
```

Figura 14| Secuencia codificante de StNDPK1. Se detallan los exones impares resaltados en gris, pares sin resaltar.



El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de *St*NDPK1 con algunas isoformas de NDPKs de plantas muestra que la secuencia posee la *Ser 69* conservada entre las isoformas de plantas así como la *His 117* y *Ser119*. Además, el análisis de la región C-terminal revela que no presenta el motivo YE característico de la isoforma citosólica. El análisis BlastX y BlastN mostró que *St*NDPK1 presenta dominios conservados de NDPK y homología con isoformas de localización mitocondrial, el 82/ y 78/ de identidad con NDPK3 de *Pisum sativum* (AAF08537.1, AF191098.1) y el 80/ y 79/ de identidad con NDPK3 de *Arabidopsis thaliana* (NP_192839.1; NM_117171). Además, presenta homología (95/ y 84/) con dos clones (AK322787.1 y AK319442.1) provenientes de una biblioteca de ADNc de longitud completa obtenida a partir de hojas de planta de tomate (*Solanum lycopersicum*) tratadas con agentes patógenos, elicitores, ácido salicílico y ácido metil jasmónico (Aoki et al. 2010). Por otro lado, tiene 81/ de identidad con NDPK4 de *Spinacia oleracea* (Q8RXA8.1) una isoforma localizada en los cloroplastos (Figura 15).



Figura 15 | Análisis de secuencia de aminoácidos *St*NDPK1. Alineamiento global (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) de *St*NDPK1 con isoformas de otras plantas. Péptido señal subrayado, la flecha muestra el posible sitio de clivado, los recuadros muestran aminoácidos conservados (Ser69, His 117, Ser119) y el motivo C-terminal. La caja gris indica el dominio conservado, la caja negra muestra el sitio activo.



Los programas de predicción de modificaciones post traduccionales indican que tiene un 98/ (MitoProt II) de probabilidad de poseer un péptido de traslocación a mitocondria. El gen *Stndpk1* codificaría para una proteína mitocondrial, el peptido señal de la proteína inmadura comprendería los primeros 56 aa y el PM de la proteína madura (sin el peptido señal) sería de aproximadamente 20 kDa.

1.2 Análisis filogenético de StNDPK1

Se comparó la estructura primaria de StNDPK1 con las secuencias de aminoácidos de otras siete NDPKs de angiospermas (mono y dicotiledóneas) utilizando el blastP que permitió seleccionar aquellas especies que presentan una alta identidad de homología (superior al 50/) con la secuencia de StNDPK1 (Figura 16).

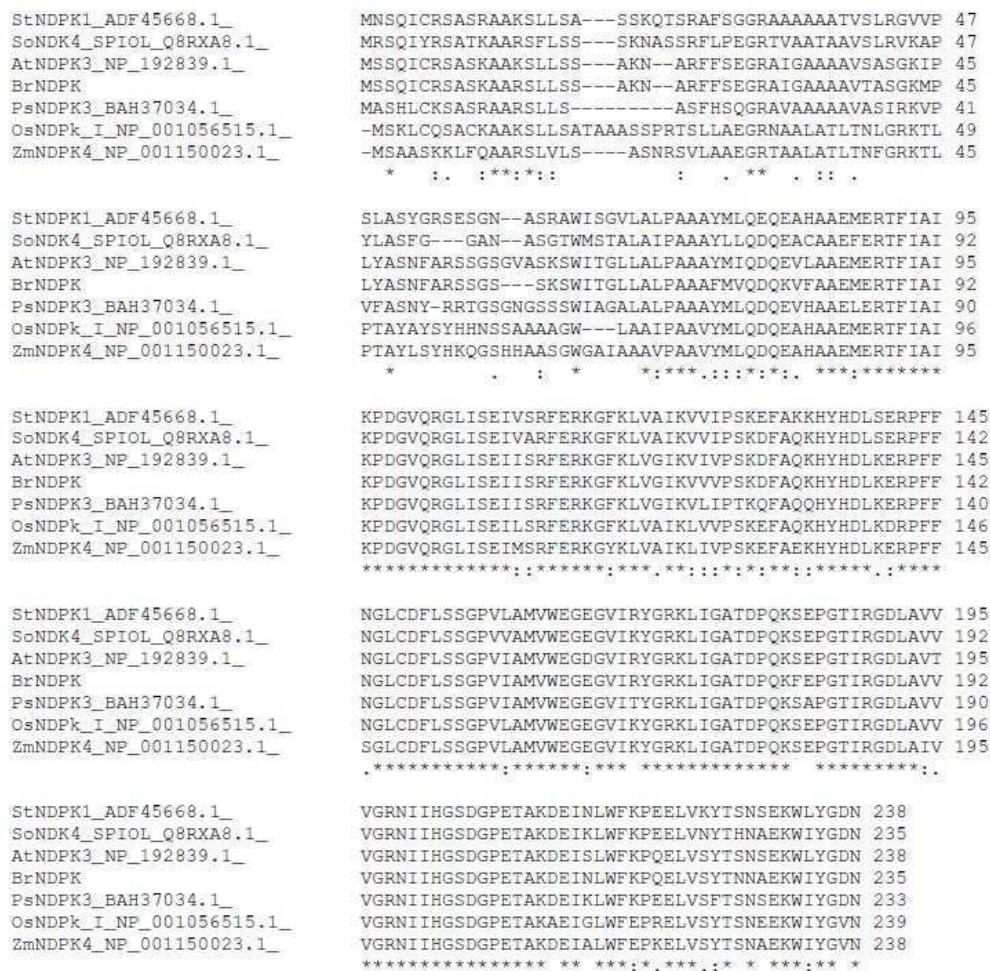


Figura 16 | Alineamiento global utilizado para la construcción del árbol filogenético. Varias isoformas de plantas que presentaron una identidad superior al 50/ en el alineamiento local. (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)



La información obtenida a partir de los alineamientos locales fue organizada en un árbol filogenético con el programa MEGA (5.03) utilizando el método de vecino más próximo (neighbor-joining). La figura 17 muestra que *St*NDPK1 está directamente emparentada con NDPK de *Spinacia oleracea* (que localiza en cloroplastos) y que posee un ancestro común con las otras isoformas de NDPKs de localización mitocondrial (*At*NDPK3, *Br*NDPKIII y *Ps*NDPK3)

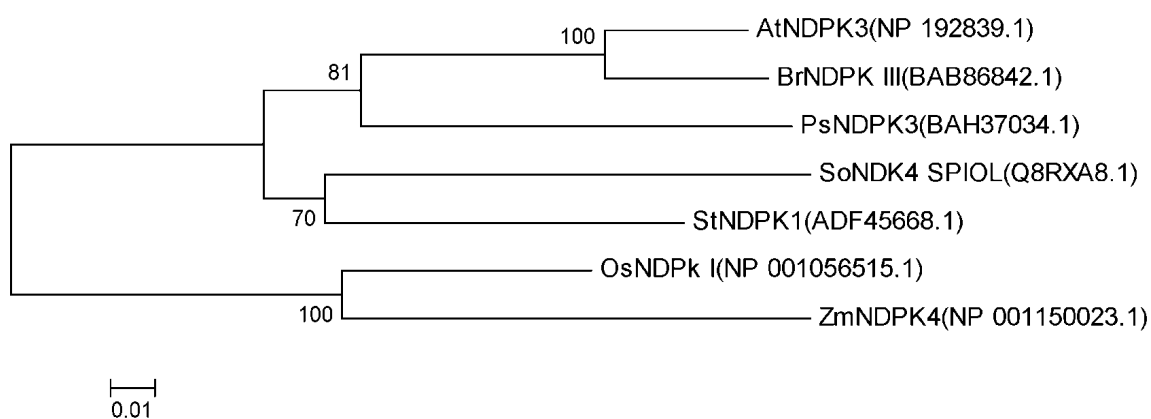


Figura 17 | Árbol filogenético de NDPKs en plantas. Construido por el método de vecino más cercano utilizando los datos de secuencias de aminoácidos de isoformas de NDPK en plantas conocidas y de *St*NDPK1. Los números de las ramas indican los valores de *boot-straping* mostrando el nivel de significancia para la separación de dos ramas (en porcentaje)

1.3 Análisis del gen *Stndpk1*

Con el fin de obtener la secuencia genómica completa de *Stndpk1* se realizaron PCRs sobre ADN genómico de plantas de papa *Solanum tuberosum*, var. Spunta con oligonucleótidos que correspondían a la región 5' y 3' del EST STMED71. Se obtuvo un fragmento de 1693 nt secuenciado que presenta en la región codificante (exones 2 a 7) entre un 76 y un 100 / de homología con *So*NDPK 4, isoforma de *Spinacia oleracea* localizada en cloroplastos. De las seis posibles regiones exónicas las últimas tres son muy conservadas ya que están presentes en NDPK4 de *Spinacia oleracea*, NDPK3 de *Brassica rapa*, NDPK3 de *Arabidopsis thaliana* y NDPK de *Oryza sativa* y alinean con más de un 90 / de homología en todos los casos (Figura 18).

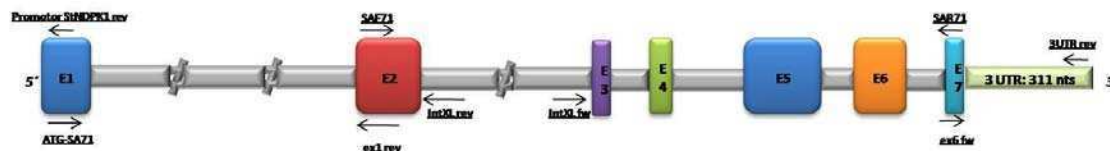


Figura 18 | Diagrama gen Stndpk1 secuenciado. Se detallan las 7 regiones exónicas en cajas y las regiones intrónicas, así como la región 3UTR y el promotor

Sobre la base de la secuencia codificante, se diseñaron oligonucleótidos específicos sobre el extremo 5' del exón 2 y el extremo 3' del exón 7 a fin de poder completar los extremos N y C terminales. En el extremo 5' se pudo amplificar un fragmento de 1384 nts que se subclonó y se secuenció, agregándose una región intrónica de 1271 nts y un nuevo exón de 91 nts (E1) que contiene al codón iniciador. En el extremo 3' se obtuvo un producto de aprox. 450 pb que también fue subclonado y contiene el codón stop y 219 pb río abajo de éste la señal de poliadenilación. Esta secuencia se envió al Gen Bank (Acceso GU144806, *Solanum tuberosum* cultivar Spunta nucleoside diphosphate kinase 1 (NDPK1) gene, complete cds. AUTHORS Bachmann, S.D. and Ulloa, R.M.). El gen Stndpk1 posee 3126 pb de longitud, desde el ATG hasta el codón STOP, se encuentra organizado en siete exones y seis intrones (Tabla 1; representación esquemática en la figura 18) cuyas uniones intrón-exón obedecen la regla GT / AG (Shapiro y Senapathy, 1987). Los exones 1 y 2, separados por el intrón más largo del gen (1271 pb) contienen el péptido señal; mientras que el exón 5 contiene el sitio activo, y los exones 3, 4, 6 y 7 incluyen los dominios conservados. Al comparar la estructura del gen *Stndpk1* con las NDPKs mitocondriales de una planta monocotiledonea como el arroz y una planta dicotiledonea como *Arabidopsis*, se observa que éstos genes se encuentran muy conservados; de hecho la longitud de los exones 3 a 7, que son los que abarcan los dominios conservados y contienen el sitio activo, son idénticos en las tres especies. En todos los casos,



los exones presentan un mayor contenido de GC (39/ a 71/) que los intrones. Sin embargo, el arroz tiene el mayor contenido de GC, siendo los exones 1, 2 y 4 los más relevantes. Luego sigue *Stndpk1* donde los exones 2 a 4 tienen los valores más altos GC, mientras que el menor contenido se observa en los exones de *Arabidopsis*. En *Stndpk1*, las regiones intrónicas representan el 66,5/ de total de la secuencia del gen, mientras que en *Osndpk* representan un 70,5/ y en *Atndpk3* representan un 45,2/ (Tabla 1).

		StNDPK1 (GU144806)		OsNDPK (OS05g0595400)		AtNDPK3 (NM_117171)	
REGION		nts.	%GC	nts.	%GC	nts.	%GC
Secuencia NO codificante							
Promotor		2372	35 %	-	-	-	-
Intron 1		1271	29 %	96	45%	313	28%
Intron 2		671	40 %	101	43%	169	31%
Intron 3		98	24 %	126	40%	80	36%
Intron 4		185	35 %	651	38%	90	27%
Intron 5		89	35 %	501	36%	76	32%
Intron 6		95	34 %	243	32%	78	29%
Secuencia codificante							
Exon 1	Peptido señal(aa 1-29)	88	43 %	94	71%	82	44%
Exon 2	Peptido señal (30 to 56)	135	53 %	132	70%	141	46%
Exon 3	Dominio Conservado	38	53 %	38	53%	38	39%
Exon 4	Dominio Conservado	51	57 %	51	61%	51	43%
Exon 5	Sitio Activo	168	42 %	168	43%	168	39%
Exon 6	Dominio Conservado	113	45 %	113	50%	113	50%
Exon 7	Dominio Conservado	124	46 %	124	52%	124	42%

Tabla 1 | Longitud en pb y / GC los intrones y los exones. Comparación entre el gen *Stndpk1* y los genes de isoformas de localización mitocondrial correspondientes a una monocotiledónea (*Oryza sativa*) y a una dicotiledónea (*Arabidopsis thaliana*)

Mediante Genome Walker se aisló la secuencia del promotor del gen *Stndpk1* usando oligonucleótidos específicos diseñados río abajo del codón ATG (GSP1-NDPK1) para la ronda



inicial de la reacción de PCR y GSP2-NDPK1 para la PCR anidada. El producto final de 2372 pb fue subclonado y su secuencia analizada por secuenciación. El alineamiento local de la secuencia promotora de *Stndpk1* obtenida con los scaffolds v3 del genoma secuenciado de *S.Phureja* DM1-3 516R44 (CIP801092) disponible en Potato Genome Sequencing Consortium Data Release (<http://potatogenomics.plantbiology.msu.edu/index.php?p=blast>) confirmó el aislamiento de la región del promotora debido a la alta identidad (más del 70%) con el scaffold PGSC0003DMS000000511, el cual alinea con una identidad similar con el gen *stndpk1*.

El promotor fue analizado en tres bases de datos diferentes PLANT CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) y PLANT PAN (http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/seq_analysis_total.php). La figura 19 muestra un diagrama del promotor de *Stndpk1* con los elementos regulatorios hallados.

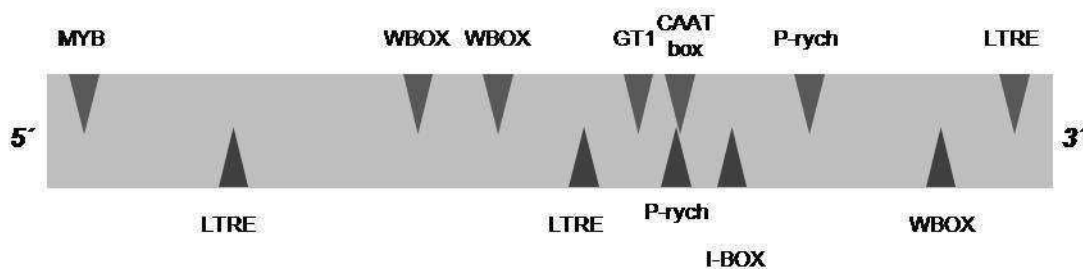


Figura 19 | Diagrama del promotor del gen *Stndpk1*. Se detallan los elementos regulatorios encontrados por análisis bioinformático. Los triángulos indican la posición del elemento regulatorio en el promotor. De acuerdo al sentido de la hebra, arriba corresponde a la hebra (-), abajo corresponde a la hebra (+).

El promotor de *Stndpk1* posee elementos regulados por luz, frío, daño mecánico, respuesta a defensa y dos sitios reguladores de los niveles transcripcionales (CAATbox y 5UTR Py-rich stretch) (Tabla 2).



Secuencia	Base de datos	Posición	Hebra	Elemento	Referencia
TAAGAGAGGAA	Plant CARE	1343	-	3AF1	Elemento de respuesta a LUZ
ATTTCC	PLACE Plant PAN	1013	-	GT1consensus	Elemento de respuesta a LUZ
CAAT	PLACE Plant CARE	915	-	CAATbox	Elemento en cis - enhancer
GATAAG	PLACE Plant PAN Plant CARE	1577	+	I-Box	Elemento de respuesta a LUZ
CCGAAA	Plant CARE	403	+	LTRE	Elemento en cis de respuesta a bajas temperaturas
CCGAC	PLACE Plant PAN	1227 129	+ -	LTRECOREATC OR15	Elemento de respuesta a bajas temperaturas
TGACT	PLACE Plant PAN	2375 1532 2068	+ - -	WBOXNTERF3	Elemento de respuesta a Daño mecánico
GTTAGTT	PLACE Plant PAN	2318	+	MYB1LEPR	Elemento en cis de respuesta a Daño mecánico
TTTCTTCTCT TTTCTCTCTCTC	Plant CARE	611 1444	- +	5UTR Py-rich stretch	Elemento en cis que confiere altos niveles transcripcionales

Tabla 2 | Análisis de la región promotora del gen *Stndpk1*. De izquierda a derecha se muestra el consenso, las bases de datos en donde se las encontró, la posición, el sentido de la hebra, el nombre de la región regulatoria y los estímulos que intervienen en la regulación de dicha región

Además, se tomó un fragmento del scaffold PGSC0003DMS000000511 de 50.000 nts para realizar un análisis bioinformático del entorno del gen *Stndpk1*. Se realizó BlastX con fragmentos de 5Kb (de 0-5, 5-10, 10-15 y desde 15kb) de 21.016 nts río arriba del promotor del gen y de 21.313 nts río abajo del gen. En la figura 20 se muestra los resultados de los alineamientos locales en un esquema. En los fragmentos de 5-10 Kb y de 10-15 Kb del scaffold que se encuentran río arriba de la región promotora, el alineamiento local muestra un 50% de identidad con una proteína de *V. vinífera* (XP_002265840.1) que posee dominios de ATPasa; mientras que en la región del scaffold río abajo del gen se encuentra que, en el fragmento de 5-10 Kb hay un 45% de identidad con una Transcriptasa reversa "like"/Ribonucleasa H; Endonucleasa/Exonucleasa/fosfatasa de *M. trunculata* (ABE87589.2). Por último, en los fragmentos de 10-15 kb y desde 15 Kb en adelante, una UDP-glucose 4-epimerase de *S. tuberosum* (AAP42567) alinea con un 98% de identidad.

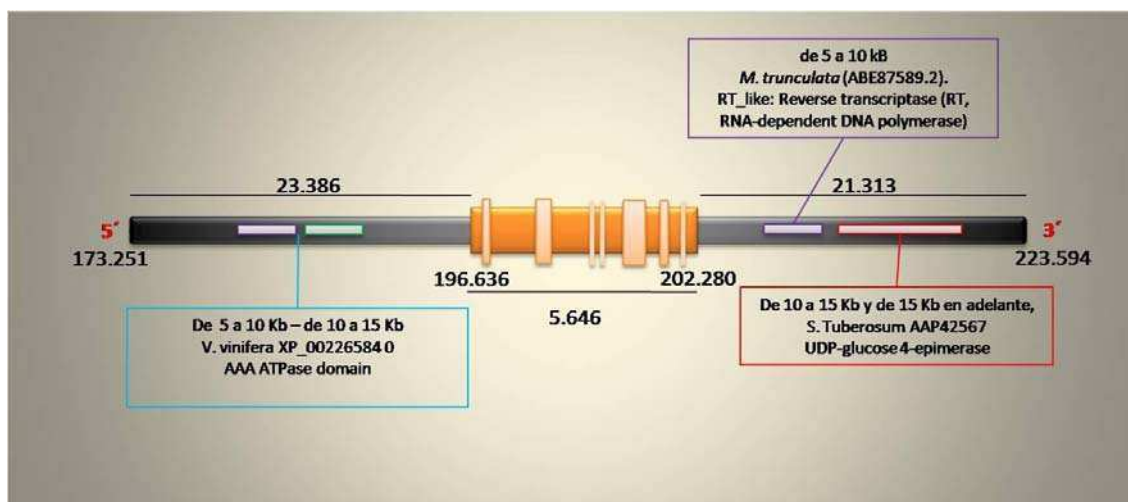


Figura 20 | Diagrama del entorno genómico del gen *Stndpk1*. Se detallan las proteínas que alinearon con una identidad mayor al 40% en el alineamiento local (BlastX).

Por otro lado, se comparó el transcrito del gen *Stndpk1*, con los transcritos de las isoformas mitocondriales de arveja y arábidopsis (Tabla 3). Si bien la longitud de la secuencia codificante es similar en todos los casos, el largo total del transcrito varía entre éstas tres especies; siendo StNDPK1 el transcrito más largo debido a que posee un 5'UTR de mayor longitud. Los UTRs de StNDPK1 son relativamente largos (206 y 287 pb, respectivamente); recientemente se ha informado que las longitudes promedio de 5'-y 3'-UTR en tomate (*Solanum lycopersicum*) son 175 y 257 pb, respectivamente; siendo más largos que los de Arabidopsis, la soja, el álamo, y maíz, y ligeramente más cortos que los de arroz. En dicho trabajo, los autores proponen que aquellos UTRs de tomate que superan ésta longitud promedio podrían contribuir a la regulación de la transcripción del mensajero, la traducción y la estabilidad (Aoki et al., 2010).



	StNDPK1 (FJ743686)		PsNDPK3 (AF191098)		AtNDPK3 (NM_117171)	
	Longitud en nts.	%GC	Longitud en nts.	%GC	Longitud en nts.	%GC
Full-length	1210	40	1044	44	980	42
5'-UTR	206	35	55	37	64	38
CDS	717	47	702	49	716	44
3'-UTR	287	25	287	32	200	34

Tabla 3 | Comparación del transcrito de Stndpk1 con los transcritos de otras dos isoformas mitocondriales de plantas. Se indica longitud en pb y contenido de citosinas y guaninas como / GC de cada una de las regiones de un transcrito primario.

Mediante ensayos de Southern Blot se confirmó la presencia de múltiples genes de NDPK en el genoma de *S. tuberosum*, empleando como sonda la secuencia codificante completa (CDS) de StNDPK1 (717 nts). En la figura 21 se observa que en las calles con el ADN genómico digeridos con dos enzimas de restricción diferentes. En la calle de EcoRI, se observan un total de 7 bandas, todas mayores a 3355 pb. Mientras que en la calle de Hind III solo fue posible detectar dos bandas de alto peso (una de 8Kb y otra de 10Kb). Estos resultados sugieren la existencia de homologos relacionados a StNDPK1 detectables por hibridación. Además, se realizó una búsqueda de homologos en la base de datos del genoma de Solanum phureja (http://www.potatogenome.net/index.php/Main_Page, Solanum phureja scaffold v3) usando la CDS de StNDPK1, revelan la existencia de 5 secuencias de diferentes scaffold (PGSC0003DMS000000511, PGSC0003DMS000000002, PGSC0003DMS000001535, PGSC0003DMS000001826, PGSC0003DMO000064201) que poseen más del 60% de identidad



con la CDS, apoyando los resultados obtenidos en el Southern blot. StNDPK1 pertenecería a una familia multigénica en *S. tuberosum*.

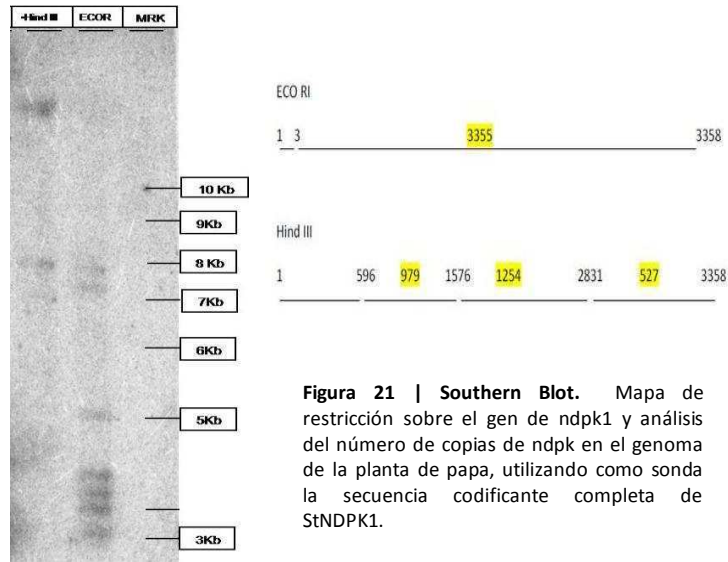


Figura 21 | Southern Blot. Mapa de restricción sobre el gen de *ndpk1* y análisis del número de copias de *ndpk* en el genoma de la planta de papa, utilizando como sonda la secuencia codificante completa de StNDPK1.

1.4 Clonado parcial de la secuencia codificante StNDPK2

Se amplificó parte de la región codificante StNDPK2 usando como molde una biblioteca de expresión de estolones y oligonucleótidos diseñados sobre la región 5' y 3' del EST STMHY37, uno de los clones del microarreglo de ARN en el cual se había detectado expresión diferencial. Se obtuvo un fragmento de 483 nts que fue subclonado y secuenciado (Acceso JF832386, StNDPK2, a nucleoside diphosphate kinase isolated from Stolons, mRNA, partial cds; Bachmann,S.D. and Ulloa,R.M.) (Figura 22).

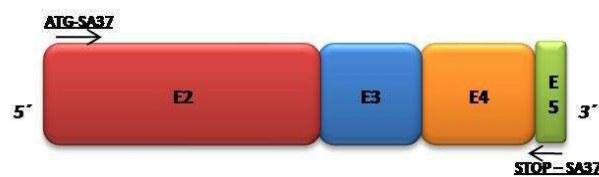


Figura 22 | Diagrama de la secuencia codificante parcial de StNDPK2. Se detallan los exones en cajas



StNDPK2 presenta los dominios característicos de NDPKs, ya que la secuencia posee la *Ser 69* conservada entre las isoformas de plantas así como la *His 117* y *Ser119* dentro del dominio catalítico. Además, el análisis de la región C-terminal revela que no presenta el motivo YE característico de la isoforma citosólica y alta identidad con otras isoformas de plantas ya descritas. Tiene un 97% de similitud con NDPK de *V. vinifera* (XP_002272468) y con NDPK 2 de *A. thaliana* (NP_1731842), involucrada en respuesta estrés oxidativo y a UV, (Moon *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2005). Sin embargo, su secuencia difiere bastante de la isoforma 1, tanto en nucleótidos como en aminoácidos (Figura 23 a y b).

```

a)   StNDPK1   TCTFAGAGCTTGGATTTCCTGGTGTCCCTTGCCTTCCCTGCAGCAGCTTACATGCTCCAGGAG 240
      StNDPK2   -----ACAGATG 7
                                           *** *

      StNDPK1   CA-AGAAGCACATGCTGCTGAGATGGAGCGCACCTTTATCGCCATCAAGCCAGATGGAGT 299
      StNDPK2   TFCAGCAGACTCCTCTACAGAAACAGAAAGGACATTTGGCTATAATAAAGCCAGATGGTGT 67
                                           ** **      ** * * * * ** * * * * * ** ***** **

      StNDPK1   ACAGAGGGGCC---TGATTTTCAGAAATCGTATCACGCTTTGAGCGCAAGGGCTTCAAGCT 356
      StNDPK2   TTTCTGGAAACCATACAAATTCCTGFAAAGGAGACAATTCFCAATC---ATGGATTCAAAAT 124
                                           *  **      * * * * * * * *  *  *  *  * * * * * *

      StNDPK1   GGTTCGAATCAAAGTTGTGATTTCCTTCAAAGGAATTTGCAAAGAAGCACTATCATGA-CT 415
      StNDPK2   CAAAGAGGAATCGTTCAATTCAGCTTGATGAGGATCATGTGAAAAGCTTTTATGCTGAGCA 184
                                           *                * * * *      * * * * * * * * * * * * * *

      StNDPK1   TGAGTGAGAGACCATTCTTTAATGGTTTGTGCGATTTCCCTTAGCTCTGGCCCTGTCTTAG 475
      StNDPK2   TTCTTCAAGGAGCTTCTTCCCAAGCCTTGT-TGAATACATGACCAGTGGTCCAGTGTGA 243
                                           *  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

      StNDPK1   CAATGGTTTGGGAAGGTGAAGGTGTAATCAGATATGGAAGGAAGCTTATAGGAGCCACTG 535
      StNDPK2   TAATGGTTCTGGAGAAAGGGAATGCCATAGCTGATTTGGCGCACATTAATTTGGTCCAACAG 303
                                           ***** ** * * * *      * * * * * * * * * * * * * *

      StNDPK1   ATCCACAGAAATCTGAA-----CCTGGAACCATCAGAGGCGATTTAGCTGTGTGTAG 586
      StNDPK2   ACCCACTCAAGGCGAAGGTTACTCATCCFCACAGTGTFCAGAG-CCATATGTGGGCTGAAT 362
                                           * * * * * * * * * *      * * * * * * * * * * * * * *

      StNDPK1   TTGGAAGG-AACATCATCCATGGCAGCGATGGCCCGAGACCGCAAAGGATGAAATCAAC 645
      StNDPK2   TTACAGAACAATTTGTGTTTCATGGTTCTGACTCACCTCAGTCTGCTAGCCGGGAAATATCT 422
                                           ** * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

      StNDPK1   CTFATGGTTTAAACCAGAGGAGTT-GGTTAAGTACACCAGCAACTCTGAGAAGTGGCTATA 704
      StNDPK2   TTTCTTCTTTAAACGACATCATCAGGACATGCATCTCAGCA----TGATGAATTTATAAGT 478
                                           * * ***** *      * * * * * * * * * * * * * * * *

      StNDPK1   TGGTGATAACTAAGTGAATGTACTCTTTTGCATTAATCTAATTTAATTTGCCATTAGATAGG 764
      StNDPK2   CATTG----- 483
                                           **
    
```



b)

```

stndpk2 -----
Atndpk2 -----MSGI 4
Stndpk1 MNSQICRSASRAAKSLLSASSKQTSRAFSGGRAAAAAATVCLRGVVP SLASYGRSESGNA 60

stndpk2 -----RCSADSSSTETERTLAI IKPDGVSGNHTNSVKETILNHGFKIK 42
Atndpk2 TYQILFLLLLLASVSLSPVRCLGYGASSEERTLAMIKPDGVSGNYTEEIKTIVVEAGFNIV 64
Stndpk1 SRAWISGVLALPAAAYMLQEQEAHAAEMERTFIAIKPDGVQRLISEIVSRFERKGFKLV 120
          *!*; *****; . : * **;

Stndpk2 EESFIQLDEDHVKSFYAEHSSRSFFPSLVEYMTSGPVLIMVLEKGNAIADWRTLIGPTDP 102
Atndpk2 KEMLTQLDKETASAFYEEHSSRSFFPHLVYMTSGPVLVMVLEKRNAVSDWRDLIGPTDA 124
Stndpk1 AIKVVIPSKEFAKKHYHDLSERPFFNGLCDFLSGPVLAMVVEGEGVIRYGRKLIATDP 180
          . : * . . . * ! * . ! . * * * ! ! ! * * * * * ! : . . . ! * * * * * .

stndpk2 LKAKVTHPHSVRAICGLNLQNCVHGSDSPQSASREISFFVKTSS--GHASQHDEL--- 157
Atndpk2 EKAKISHPHSIRALCGKNSQKNCVHGSDSTSSAEREIKFFFKDVVSGDIATQOHDEL--- 181
Stndpk1 QKS---EPGTIRGDLAVVGRNI IHGSDGPETAKDEINLWFRPEELVKYTSNSEKWLYGD 237
          *!; . * ! ! * . . * ! * * * . ! ! * . * ! ! ! *

Stndpk2 -----
Atndpk2 -----
Stndpk1 N----- 238

```

Figura 23 |Análisis de secuencia de StNDPK2. Alineamiento global (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) a) de la secuencia de nucleótidos (StNDPK1 vs. StNDPK2); b) de la secuencia de aminoácidos con la isoforma 2 de *A.thaliana* y la isoforma 1 de *S.tuberosum*. El subrayado muestra aminoácidos conservados (*Ser69*, *His 117*, *Ser119*), la caja gris indica el dominio conservado, la caja negra muestra el sitio activo.

Por análisis *in silico*, comparando tanto el fragmento de StNDPK2 secuenciado, como el EST STMHY37 con el genoma recientemente publicado de *S.Phureja* disponible en Potato Genome Sequencing Consortium Data Release (http://www.potatogenome.net/index.php/Main_Page, Solanum phureja scaffold v3) surge que alinea con el scaffold PGSC0003DMS000000056 con un 97% de identidad, que tiene al menos 5 exones y 4 intrones. Utilizando en un BlastX el fragmento de scaffold con el que la secuencia StNDPK2 alineó con un 60% de identidad con la NDPK de *V. vinífera* (XP_002272468), con NDPK de *Z. mays* (NP_00114850) y con un 55% con NDPK2 de *A. thaliana* (NP_1731842), y combinando los resultados obtenidos de los alineamientos locales realizados; se concluyó que faltarían en la secuencia de StNDPK2 alrededor de 70 nts río arriba para completar el marco abierto de lectura (ORF) (Figura 24).

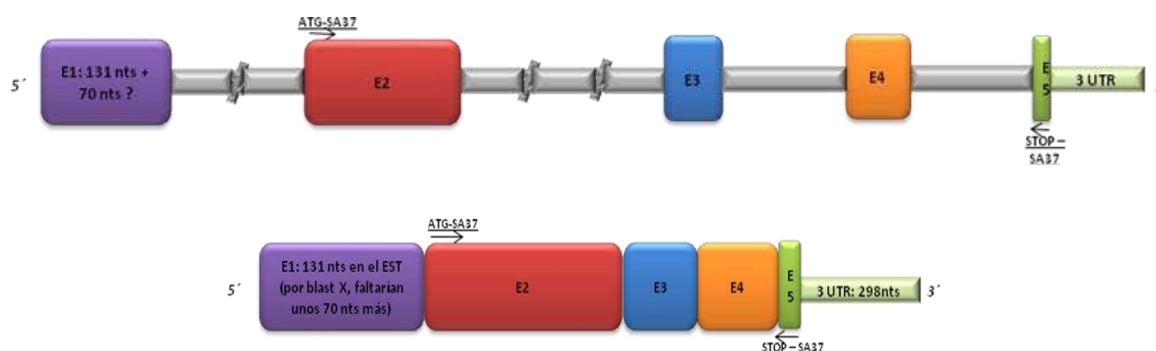


Figura 24 | StNDPK2, diagrama del gen completo y el ORF según análisis *in silico*. Se detallan los exones en cajas, los intrones y la región 3'UTR en líneas.

El gen *Stndpk2* según los datos obtenidos del genoma de *S.phureja*, tendría 4962 pb de longitud, se encontraría organizado en al menos cinco exones y cuatro intrones (Tabla 4; representación esquemática en la figura 24) donde las uniones intrón-exón obedecen la regla GT / AG (Shapiro y Senapathy 1987). Los exones 2 y 3, separados por el intrón más largo del gen (1617 pb), codifican para dominios conservados de la proteína; mientras que el exón 4 contiene el sitio activo, y el exón 5 incluye también dominios conservados. Al comparar la posible estructura del gen *Stndpk2*, tanto con *Stndpk1* como con el gen *ndpk2* de *A. thaliana*, se observa que los exones de éste gen se asemejan más, en estructura y longitud, a los exones de *Atnpk2*. En todos los casos, los exones presentan un mayor contenido de GC (33/ a 51/) que los intrones. Mientras que las regiones intrónicas de *Stndpk2*, representarían el 87,4/ de total de la secuencia del gen, en *Atnpk2* representan un 40,5/ . (Tabla 4)



REGION		StNDPK1 (GU144806)		StNDPK2		AtNDPK2 (NC_003070.9)	
		nts.	%GC		%GC	nts.	%GC
Secuencia NO codificante							
Intron 1		1271	29 %	1084	33%	230	37%
Intron 2		671	40 %	1617	34%	91	37%
Intron 3		98	24 %	831	35%	169	34%
Intron 4		185	35 %	807	37%	102	35%
Intron 5		89	35 %	-	-	-	-
Intron 6		95	34 %			-	-
Secuencia codificante							
Exon2/ Exon 1	Peptido señal	135	53 %	131 + (65 a 72)	34%	285	44%
Exon3/ Exon 2	Dominio Conservado	38	53 %	229	40%	219	44%
Exon4/ Exon 3	Dominio Conservado	51	57 %	112	51%	113	47%
Exon 5 / Exon 4	Sitio Activo	168	42 %	119	42%	114	42%
Exon6 /Exon 5	Dominio Conservado	113	45 %	32	38%	139	33%
Exon 7 / -		124	46 %	-	-	-	-

Tabla4 | Longitud en pb y/ GC los intrones y los exones. Comparación entre el gen Stndpk2 y los genes de la isoforma 1 de Stndpk1 y de la isoforma 2 de *A. thaliana*. En la secuencia codificante se comparan exones de acuerdo con el alineamiento global, izquierda nº de exón de la isoforma 1, derecha nº de exón de las isoformas 2



2. Estudios de expresión de StNDPKs

2.1. Análisis de expresión en los distintos tejidos de plantas de papa

Se determinó la expresión de StNDPK1 y StNDPK2 por RT-PCR semicuantitativa usando distintos tejidos (flor, pimpollo, raíz, hoja, tallo, ápice, brote y estadios 2, 3 y 4 de tuberización), donde las reacciones de PCR se realizaron con oligonucleótidos específicos usando como molde ADNc sintetizado a partir de ARN total y utilizando oligodT como oligonucleótido iniciador; como control de carga se usaron oligonucleótidos específicos para la sub unidad ribosomal 18S. En la figura 25 se observa que StNDPK1 muestra una expresión mayor en tejidos en proliferación tales como el ápice, perotambién se detectó expresión en tejidos fotosintéticos, como las hojas y brotes; y en tejidos reproductivos tales como las flores y las yemas. De modo que esta isoforma se expresa ubicuamente; ya que, aunque los niveles del mensajero de StNDPK1 varian, el transcripto está presente en todos los tejidos que fueron analizados. Por otro lado, StNDPK2, no pudo ser detectada en ninguno de los tejidos analizados, habiendo sido detectada su expresión sólo en la biblioteca de estolones de la cual se la sub clonó. Esto sugiere un perfil de expresión en estadios tempranos de desarrollo del estolón.

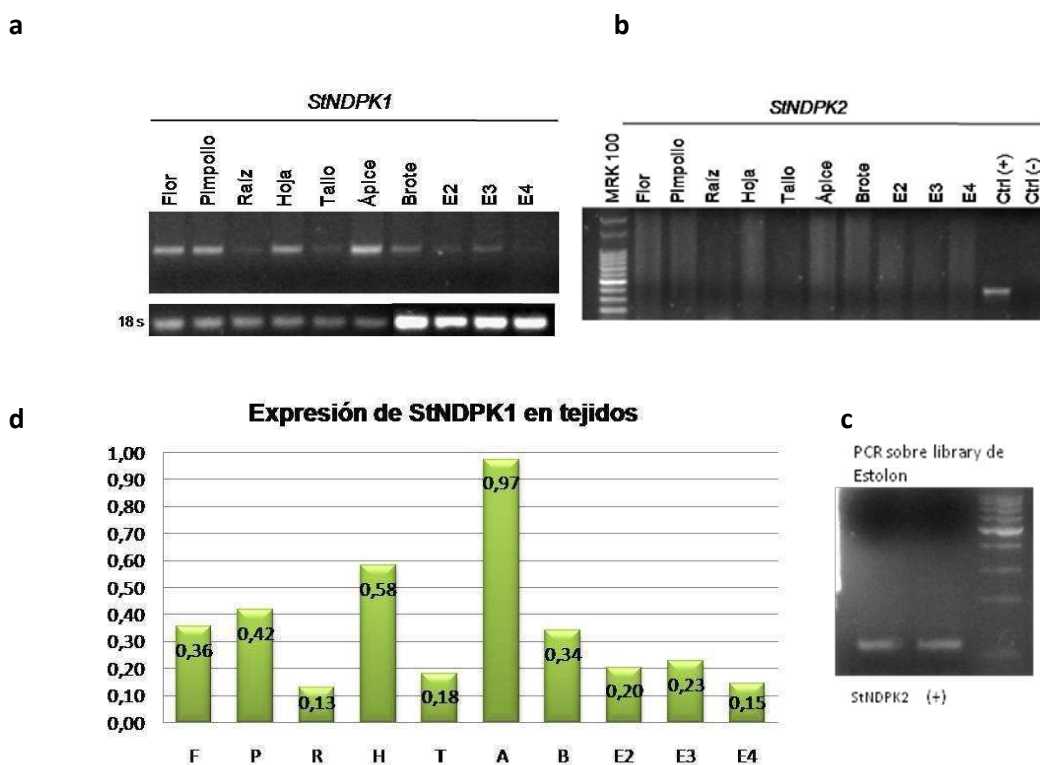


Figura 25 | RT-PCR sobre distintos tejidos de la planta de papa. a) amplificación del fragmento correspondiente a la isoforma 1. b) amplificación del fragmento de la isoforma 2. c) amplificación del fragmento StNDPK2 sub-clonado a partir de una biblioteca de estolones d) Los datos cuantitativos de la RT-PCR de la isoforma 1 se muestra en un gráfico de barras.

Dado que se disponía de mayor información respecto de la estructura del gen y de los elementos regulatorios que contiene éste, en la isoforma 1 de StNDPK, y considerando que ésta isoforma se expresa tanto en tejidos vegetativos como en tejidos reproductivos y en distintos estadios del desarrollo de la planta de papa, mientras que la isoforma 2 tendría un perfil de expresión más acotado, en donde aparentemente su detección con las técnicas utilizadas queda restringida a ciertos estadios específicos de desarrollo del estolón tuberizante; los estudios de expresión en las distintas condiciones de estrés se realizaron sólo para la isoforma 1.



2.2 Participación de StNDPK1 en respuesta a oscuridad

Se cosecharon a distintos tiempos (0, 2, 6 hs) plantas de papa crecidas *in vitro* y puestas en oscuridad. La expresión StNDPK1 se determinó por RT-PCR semicuantitativa. Las reacciones de PCR se realizaron con oligonucleótidos específicos usando como molde ADNc sintetizado a partir de ARN total utilizando oligodT como oligonucleótido iniciador; como control de carga se usaron oligonucleótidos específicos para la ubiquitina. En la figura 26 a, se observa que la oscuridad produce un aumento de los niveles de ARNm de StNDPK1, además a medida que aumenta el tiempo de permanencia en oscuridad de las plantas, aumenta la expresión de ésta isoforma. También se analizó la expresión de esta isoforma utilizando los ADNc sintetizados para el microarreglo de ARN (del cual surgieron los datos de los EST pertenecientes a clones de NDPK con los cuales se inició esta línea de trabajo). Estos ADNc provenían de ARN extraído de brotes provenientes de mitades de tuberculos que habían sido expuestos a condiciones de oscuridad continuas durante un período prolongado (10 ó 35 días). Es importante destacar que la brotación es un proceso de activa división y crecimiento que requiere energía. Sin embargo, en este sistema de brotación, los brotes tienen una importante reserva de almidón que permite soportar la oscuridad prolongada. Los resultados obtenidos en brotes, muestran que se detecta expresión de ésta isoforma a tiempos prolongados como Oscuridad por 10 días y por 35 días (Figura 26 b)

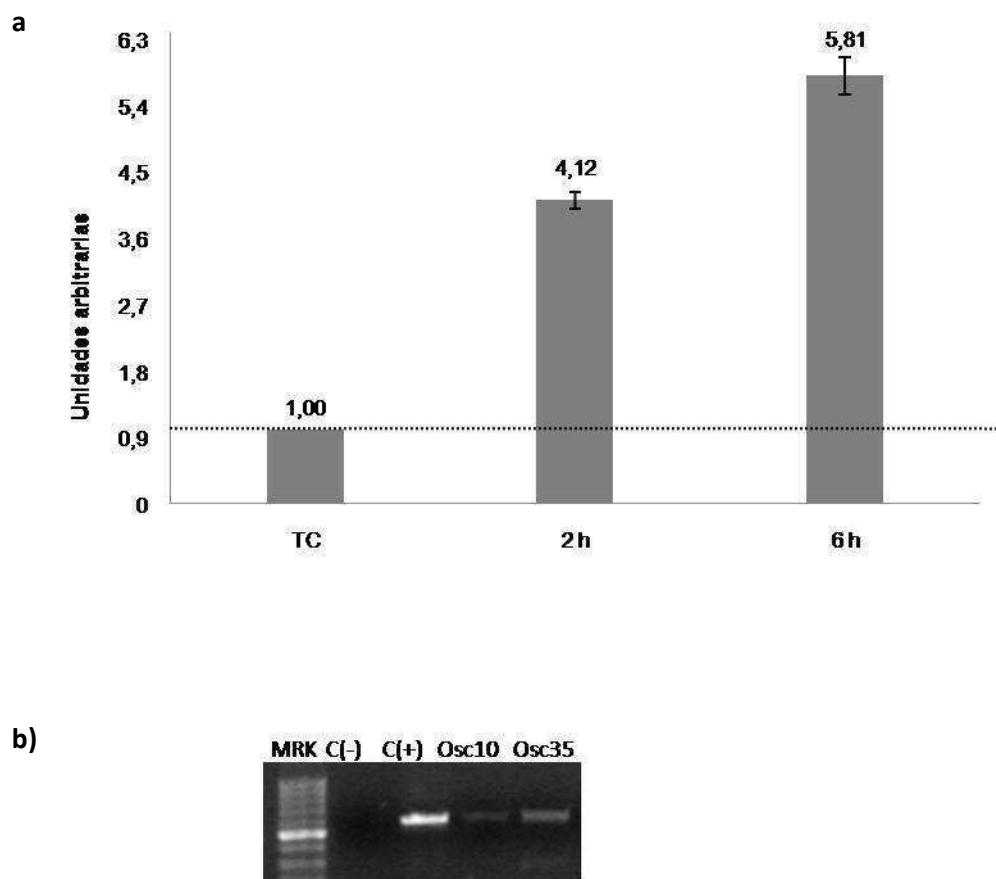


Figura 26 | Perfil de expresión de StNDPK1 en oscuridad. a) Grafico de barras resultante del análisis cuantitativo con Image J de las bandas relativizadas a ubiquitina. Los resultados se muestran como la media de 3 repeticiones biológicas \pm SD. Los tratamientos se encuentran relativizados al control (TC) b) Resultados de la RT-PCR sobre los ADNc utilizados en los microarreglos de expresión (Tesis Doctoral de V. Giammaria)

2.4. Participación de StNDPK1 en respuesta a diferentes estreses

2.4.1 Bajas temperaturas

Para evaluar el efecto de las bajas temperaturas sobre los niveles de expresión de la isoforma 1 de StNDPK se realizaron RT-PCR semicuantitativa usando como molde ADNc sintetizado a partir de ARN total obtenido de plantas de papa crecidas *in vitro*, puestas en frío (4°C) cosechadas a distintos tiempos (0, 2, 6 hs); como control de carga se usaron oligonucleótidos específicos para ubiquitina. El grafico de barras de la figura 27 muestra que la exposición inicial a las bajas temperaturas (2 hs) produce una disminución de los niveles de ARNm de StNDPK1, que luego es recuperado para volver a los niveles iniciales (6 hs)

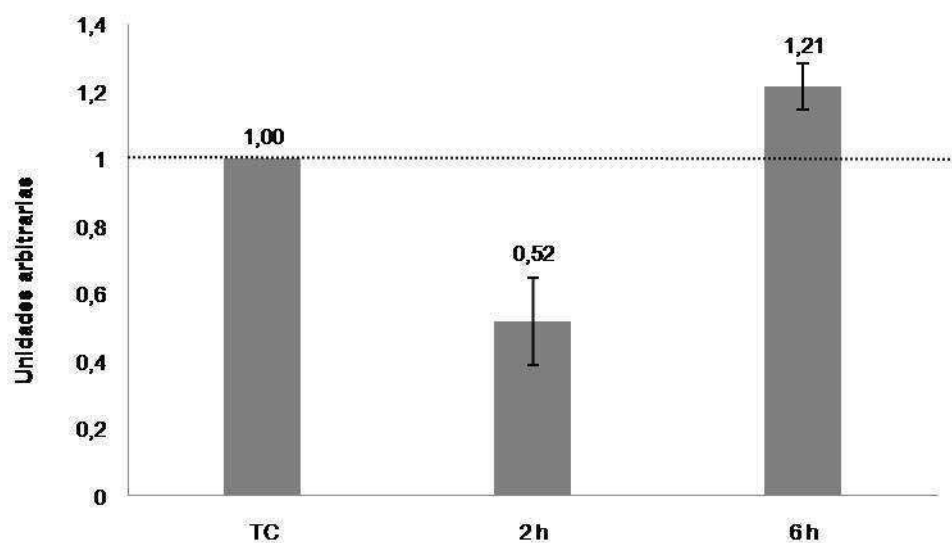


Figura 27 | Perfil de expresión de StNDPK1 en baja temperatura. Grafico de barras resultante del análisis cuantitativo con Image J de las bandas relativizadas a ubiquitina. Los resultados se muestran como la media de 3 repeticiones biológicas \pm SD. Los tratamientos se encuentran relativizados al control (TC)

2.4.2 Herviboría

Para evaluar el posible efecto de la herbivoría sobre el nivel de expresión de StNDPK1, se utilizaron dos tratamientos diferentes. A un pool de plantas crecidas *in vitro* se les produjo daño mecánico con una pinza para simular el estrés generado en la planta por el ataque de insectos herbívoros, mientras que a otro grupo de plantas se los colocó en un medio que contenía 10 μ M de AJ con el fin de estimular la vía de señalización que ésta fitohormona activa en la planta y que se sabe está involucrada directamente en la respuesta al ataque por patógenos (S. Zhao & X. Qi 2008).

2.4.3 Daño mecánico

La expresión de StNDPK1 se midió por RT-PCR semicuantitativa usando como molde el ADNc sintetizado a partir de ARN total obtenido de plantas de papa crecidas *in vitro*, previamente



dañadas con una pinza y cosechadas a distintos tiempos (0, 2 y 6 hs). Como control de tiempo un grupo de plantas se cosechó al inicio del experimento, mientras que como control del tratamiento un grupo de plantas fue expuesto al mismo procedimiento pero sin producir el daño. Para poder relativizar las bandas obtenidas se utilizó como control de carga oligonucleótidos específicos para la subunidad ribosomal 18S. Los resultados de la figura 28 muestran que el nivel de ARNm de StNDPK1 aumenta 1,7 veces a tiempos cortos.

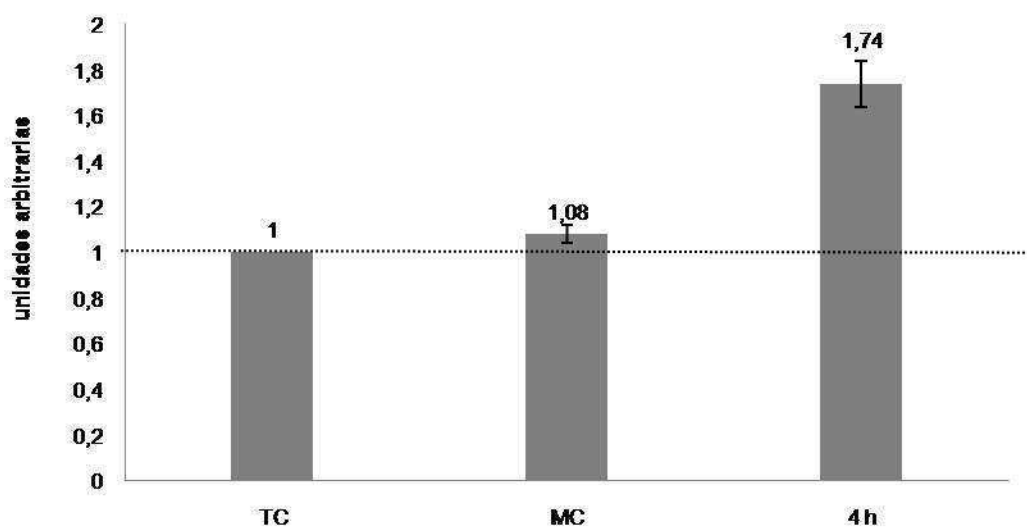


Figura 28 | Perfil de expresión de StNDPK1 en respuesta al daño mecánico. Grafico de barras resultante del análisis cuantitativo con Image J de las bandas relativizadas a 18s. Los resultados se muestran como la media de 3 repeticiones biológicas \pm SD. Los tratamientos se encuentran relativizados al control (TC)

2.4.4 Acido Jasmónico

Para evaluar como varía el nivel de expresión de StNDPK1 en respuesta a la activación de las vías de señalización inducidas por el AJ, el ARN total obtenido de plantas de papa crecidas *in vitro* en presencia de AJ (10 μ M) y cosechadas a distintos tiempos (0, 2 y 6 hs.) se utilizó para sintetizar ADNc, usándolo como molde para la RT-PCR semicuantitativa.; como control de carga se usaron oligonucleótidos específicos la subunidad ribosomal 18S. El grafico



de barras de la figura 29 muestra que la exposición inicial al AJ produce un aumento de los niveles de ARNm de StNDPK1 a tiempos cortos (2hs) y que este aumento se sostiene en el tiempo (6hs)

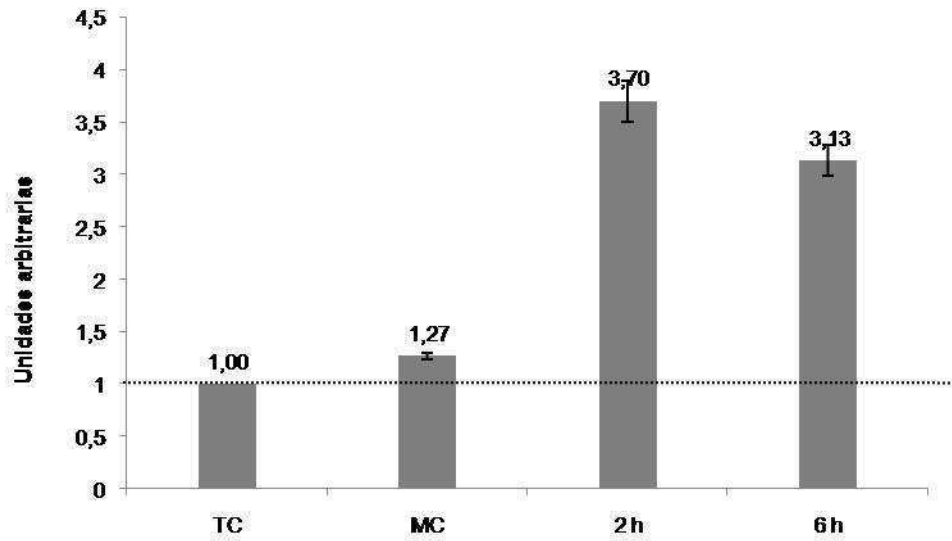


Figura 29 | Perfil de expresión de StNDPK1 en respuesta al tratamiento con ácido jasmónico. Grafico de barras resultante del análisis cuantitativo con Image J de las bandas relativizadas a 18s. Los resultados se muestran como la media de 3 repeticiones biológicas \pm SD. Los tratamientos se encuentran relativizados al control (TC)



3. Actividad de NDPK en extractos subcelulares de tuberculos brotados.

3.1 Detección de StNDPK1 en extractos de proteínas de mitocondrias

En una primera aproximación, se realizaron ensayos de Western blot sobre extractos proteicos (solubles y particulados) de hojas de plantas de papa utilizando antisueros de conejo anti- las isoformas humanas de NDPK-H1, NDPK-H2, NDPK-H4 y NDPK-H5. La figura 30a muestra que el antisuero anti-NDPK-H1 reconoce, en el extracto particulado, dos bandas del peso molecular esperado (26 kDa y 17 kDa). En el mismo ensayo se utilizó como control positivo extracto crudo de hígado de ratón, sobre esta muestra el antisuero reconoció una banda de peso molecular esperado (18 kDa). El antisuero anti la isoforma humana de NDPK-H1 fue purificado en batch con una resina con proteína A y los distintos eluidos y el percolado se corrieron en un gel SDS-PAGE 10% que luego fue teñido con Coomassie (Figura 30 b). Los eluidos 2-7 se juntaron y se probaron tres diluciones diferentes sobre el extracto particulado y el soluble sobre el cual se había probado el suero en un ensayo de western blot. Utilizando la dilución 1:1000, se obtiene una banda de 18 KDa en el extracto particulado, perdiéndose la detección de la banda de 26 KDa (Figura 30 c).

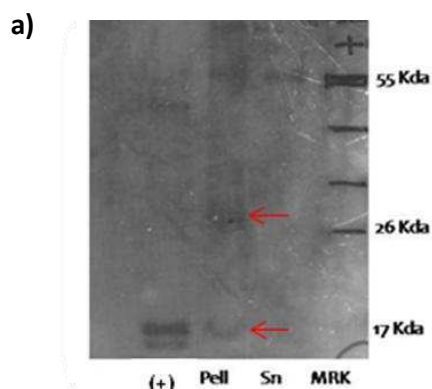
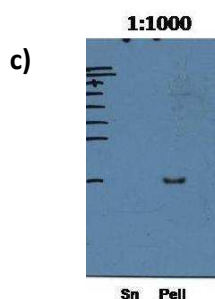
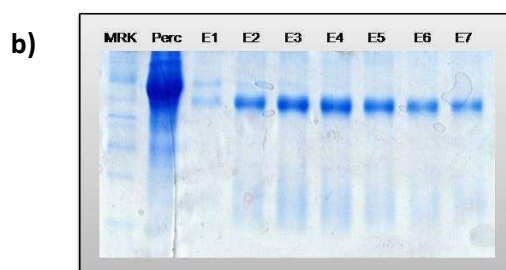


Figura 30 | Western Blot con el antisuero anti-NDPK-H1.

a) Con el suero sobre extractos proteicos solubles y particulados MRK, marcador de peso molecular; Sn, fracción soluble; Pell, fracción particulada, (+) extracto crudo de hígado de ratón. b) SDS-PAGE con los eluidos del antisuero anti-NDPK-H1 purificado. c) con una dilución del antisuero anti-NDPK-H1 1:1000 sobre extractos proteicos solubles (Sn) y particulados (Pell) de hoja



Debido a que los análisis bio-informáticos de StNDPK1 sugerían la presencia de un péptido señal para translocar la proteína a mitocondrias, se procedió a hacer un fraccionamiento celular que permitiera separar no sólo la fracción citoplasmática de las organelas, sino también separar las mitocondrias de los cloroplastos y otros plástidos. Las mitocondrias se purificaron a partir de tubérculos brotados; el extracto crudo (CE) y cuatro fracciones sub-celulares (citoplasma (CY), organelas (O), las mitocondrias (MI), cloroplastos (CL)) fueron aislados. El Western blot de las muestras con un anticuerpo monoclonal anti-VDAC y un anticuerpo policlonal anti-Rubisco confirmó, no solo la purificación de mitocondrias sino que también descartó la contaminación de cloroplastos en fracciones mitocondriales (Figura 31).

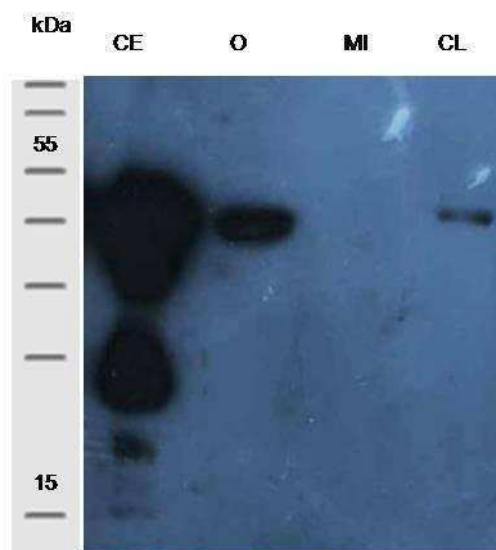


Figura 31 | Purificación de mitocondrias. Western Blot de los extractos proteicos obtenidos de las distintas fracciones subcelulares. Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-rubisco. Extracto crudo (CE) y cuatro subfracciones celulares: citoplasma (CY), organelas (O), mitocondrias (MI), cloroplastos (CL) aislados a partir de tubérculos brotados.

Si bien se logró purificar el anti-suero anti-H1 y se pudo obtener una buena detección en los extractos particulados de la banda de 18 KDa; la detección de ésta banda se perdía al utilizar extractos proteicos provenientes de fraccionamiento subcelular (citoplasma y organelas), tanto con el antisuero purificado como con el sin purificar. Por este motivo se diseñó y obtuvo un anticuerpo policlonal anti-StNDPK1 producido a partir de un péptido diseñado en la región C-terminal de la enzima capaz de reconocer en forma específica la isoforma StNDPK1.

Se analizó la presencia de StNDPK1 en extractos crudos y en las fracciones subcelulares obtenidas a partir de tubérculos brotados. Como se muestra en la figura 32, se detectó una banda de 18KDa en CE, CY, O y MI, pero no en la fracción CL. Debido a que el péptido sintético utilizado en la producción de anticuerpos se acopló a BSA, se realizó un control adicional en el western blot. La banda de 60 kDa, que se observa en la mayoría de las



calles se corresponde con la banda observada para BSA en la calle control, de modo que esta banda se consideró inespecífica en las muestras utilizadas. Por otro lado, se utilizó extracto crudo de hígado de ratón (ML) como control especificidad; en este caso, el anticuerpo anti-StNDPK1 fue incapaz de detectar isoforma alguna; indicando que este anticuerpo estaría dirigido contra una secuencia específica de NDPKs de planta.

a)

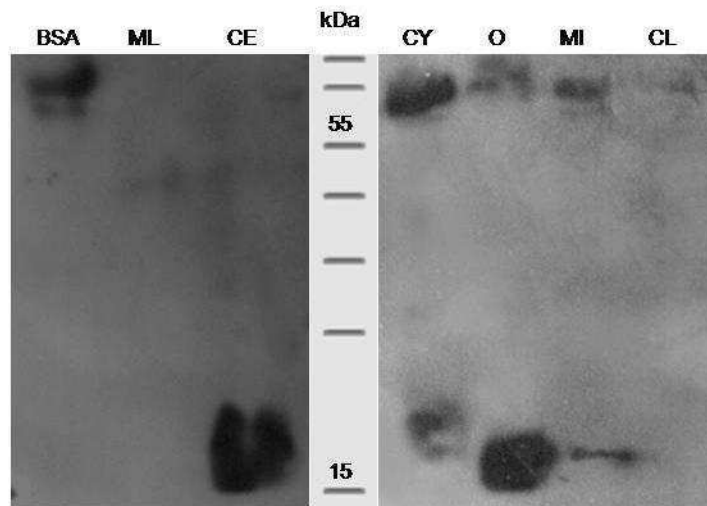
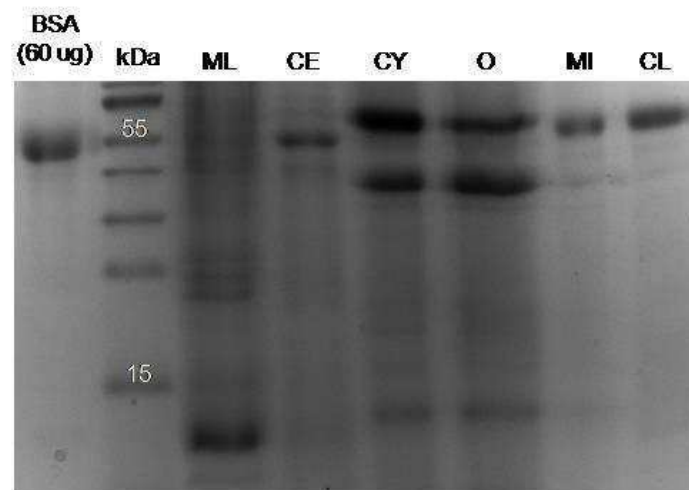


Figura 32 |Detección de StNDPK1 en fracciones sub-celulares. a) Detección de StNDPK1 en el extracto de proteínas mitocondriales. Extracto crudo (CE) y cuatro sub-fracciones celulares: citoplasma (CY), organelas (O), mitocondrias (MI), cloroplastos (CL) aislados a partir de tubérculos brotados. El western blot se realizó con un anticuerpo policlonal anti-StNDPK1 producido a partir de un péptido sintético. b) Coomassie azul de los extractos de proteína obtenidos de las distintas fracciones sub-celulares.

b)





A pesar de que no hay otras isoformas NDPK reportados en *S. tuberosum*, no se puede descartar la posibilidad de que otras isoformas estén siendo detectados por este anticuerpo, por lo tanto, el anticuerpo anti-StNDPK1 fue probado en un western blot contra la proteína recombinante StNDPK1::6xHis. La figura 33 muestra una banda de 26kDa que se corresponde con la proteína recombinante StNDPK1 que contiene el péptido señal (26kDa) y la etiqueta N-terminal 6xHis; y una de 18kDa que se correspondería a una forma procesada de la proteína recombinante de StNDPK1, donde la etiqueta N-terminal 6xHis y el péptido señal son escindidas. Debido a que ocurre este procesamiento, no se pudo lograr purificar la proteína recombinante. Sin embargo, en los ensayos de autofosforilación a partir de los extractos obtenidos del lisado celular, se observó que la marca radioactiva disminuye al aumentar las concentraciones de ADP, siendo posible que la marca del PM esperado observada en el autorradiograma, corresponda al intermediario que se forma en la reacción de transferencia de fosfato de la NDPK.

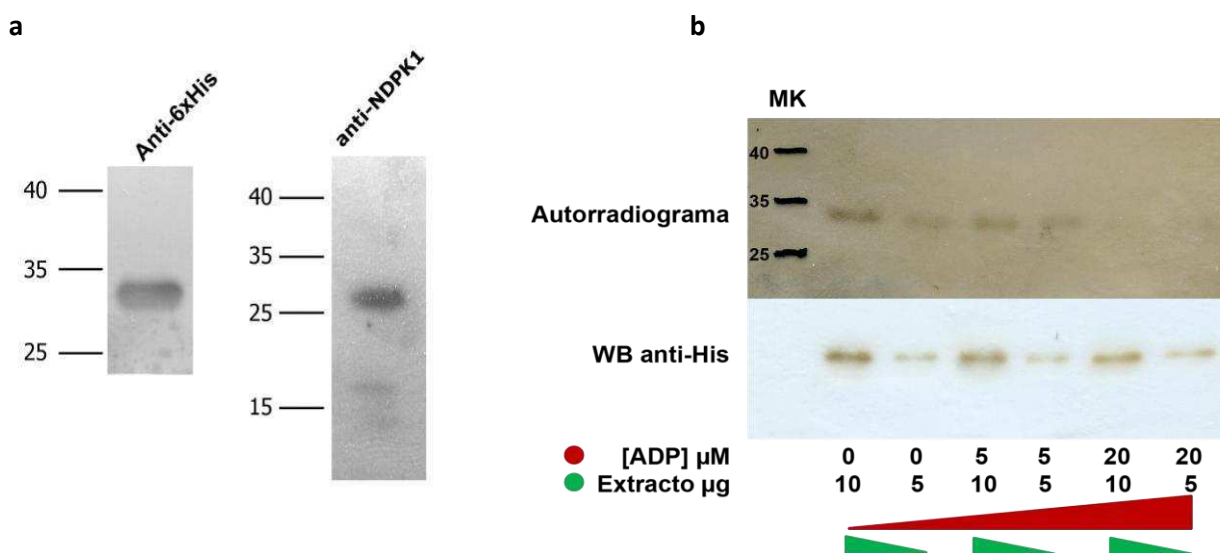


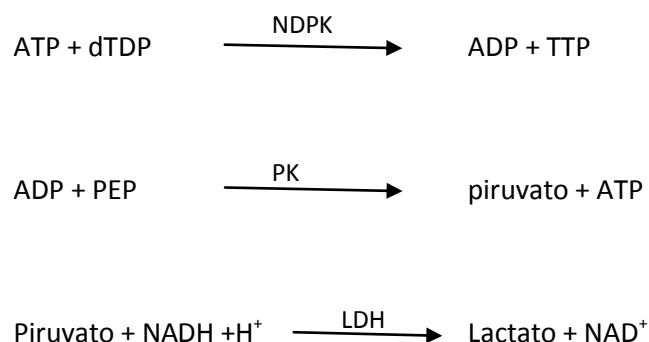
Figura 33 | Western blot de la proteína recombinante StNDPK1. Detección de StNDPK1 en un lisado de *E.coli* (BL21) que expresa la proteína recombinante. a) Western blot con anticuerpo policlonal anti-StNDPK1 producido a partir de un péptido sintético y anticuerpo anti-His. b) ensayo de autofosforilación



Estos resultados muestran que el anticuerpo anti-StNDPK1 puede reconocer la isoforma StNDPK1, tanto en extractos de proteínas de tubérculos brotados como en la proteína recombinante. Aunque el anticuerpo puede detectar en la proteína recombinante tanto, la forma no procesada como la forma procesada; sólo reconoce la proteína madura en los extractos de tubérculos brotados. Tanto en CE y CY, la proteína no procesada de 26 kDa no se detecta, esto puede ser debido a que el procesamiento del péptido señal se produce rápidamente, de modo que la proteína madura (18kDa) es mayoritaria en las células; en consecuencia los niveles de proteína inmadura podrían no ser detectables por este método. Además, StNDPK1 está presente en la fracción mitocondrial, pero no en la fracción del cloroplasto, sugiriendo que la proteína translocaría a esta organela.

3.2 Medición de actividad de NDPK en extractos de proteína nativa

Para medir actividad de NDPK se utilizaron los extractos de proteína nativa obtenidos a partir de las fracciones sub-celulares aisladas en la purificación mitocondrial (CE, CY, MI y CL). 60 µg de proteína total de cada fracción sub celular se incorporaron en una mezcla de reacción que contiene ATP como sustrato donador y dTDP como aceptor. La actividad de NDPK se midió indirectamente por un ensayo acoplado a PK y LDH, registrando la caída de absorbancia a 340 nm (la cual refleja el consumo de NADH) (Rita M Ulloa et al. 1995)





El ADP activa la PK, produciendo piruvato a partir de PEP y la LDH cataliza la conversión de piruvato a lactato oxidando el NADH a NAD⁺. La caída de absorbancia a 340 nm se debe a la conversión de NADH en NAD⁺, la cual se considera directamente proporcional a la cantidad de NDPK activa en la muestra. De modo que la actividad de NDPK se mide por los valores de la pendiente resultante de la curva de caída de absorbancia en función del tiempo. La oxidación basal de (NADH) es el control del valor de pendiente mínima (sin actividad) y la activación del sistema acoplado (ADP) es la condición de rendimiento más alto de control utilizado que el sistema enzimático acoplado (PK y LDH) puede dar. Los valores de las pendientes se muestran en la Tabla 5, se consideró actividad a un cambio de al menos un orden en la pendiente entre el mínimo y máximo calculado, sólo en el CE y dos fracciones sub celulares, CY y MI, se obtuvieron valores de pendiente equivalentes a actividad.

Muestra	Pendiente	Tasa de oxidación
NADH	-3.00E-05	mínima
Cloroplasto	-3.00E-05	
Citoplasma	-8.16E-04	
Extracto crudo	-3.15E-04	
Mitocondria	-1.21E-04	
ADP	-3.48E-03	

Tabla 5 | Actividad NDPK. Valores de la pendiente resultante de la curva de caída de absorbancia en función del tiempo. El valor de la pendiente mínima significa que no hay actividad mientras que el valor de la pendiente máxima representa toda la actividad del sistema. La actividad se considera como un cambio de al menos un orden en la pendiente entre la mínima y máxima calculada.

La figura 34 muestra que tanto el extracto crudo, como la fracción citoplasmática presentan actividad de NDPK. Además se observó actividad en la fracción mitocondrial. Por otro lado, la pendiente obtenida para la fracción CL es similar a la pendiente mínima, por lo que se consideró que la fracción CL no tenía actividad NDPK. Estos resultados se condicen con los resultados obtenidos tanto en el análisis del gen y la secuencia codificante, como en la



detección en los extractos sub-celulares mediante un anticuerpo específico, los cuales sugieren que StNDPK1 es una isoforma de localización mitocondrial.

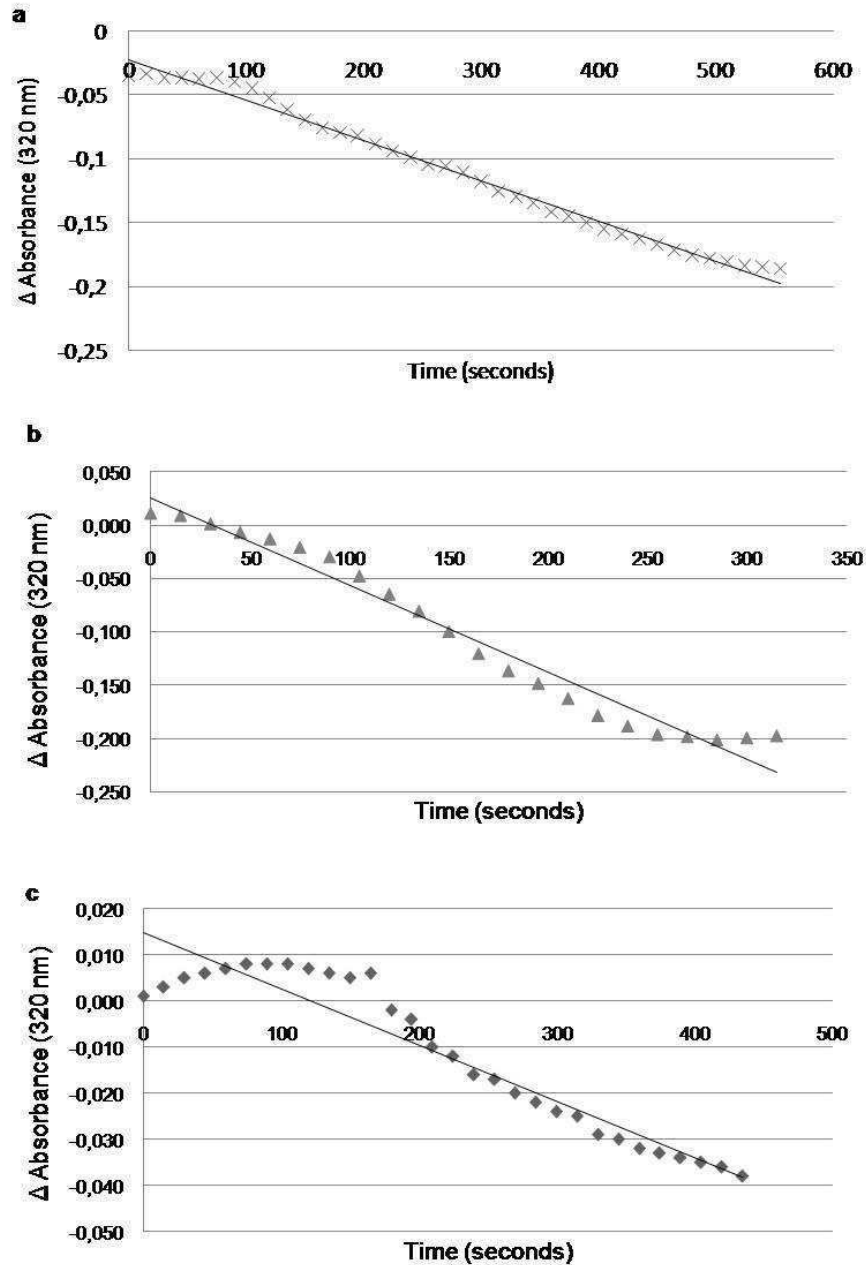


Figura 34 | Actividad NDPK en las distintas fracciones sub-celulares . Actividad NDPK medida como una disminución en la absorbancia de NADH en el tiempo. Absorbancia a 340 nm y el tiempo en segundos. Δ absorbancia se calculó utilizando la fórmula descrita en materiales y métodos. En todos los casos los controles se realizaron a la oxidación basal (NADH) y el funcionamiento del sistema acoplado (ADP). a) extracto crudo, b) citoplasma, c) mitocondria.

Conclusiones y Discusión

CONCLUSIONES Y DISCUSION

En conjunto, estos resultados muestran que existen al menos dos isoformas de NDPK en plantas de papa, de los tres grupos estructurales inicialmente descritos en plantas por Sweetlove et al, 2001. Estudios recientes realizados sobre las tres isoformas de NDPK de arroz sugieren que cada isoforma podría tener una función distintiva según su localización, la cual es posible que se encuentre conservada entre las diferentes especies de plantas (Kihara et al. 2011). Esto se debe a que los análisis filogenéticos revelan que éstos tres grupos divergieron antes de la separación entre monocotiledóneas y dicotiledóneas (Kihara et al, 2011); es más tres isoformas NDPK estaban presentes ya en el último ancestro común de plantas vasculares y musgos (Hammargren et al, 2007). En particular, el análisis filogenético realizado para *StNDPK1* mostró que ésta isoforma posee un ancestro común con las otras isoformas de NDPKs de localización mitocondrial como *AtNDPK3*, *BrNDPKIII* y *PsNDPK3*. El análisis *in silico* realizado sugiere que las dos isoformas halladas son de localización sub-celular; estos resultados coinciden con los análisis bioinformáticos realizados sobre otras especies de plantas que han sido publicados (Sweetlove et al. 2001; D. H. Shin et al. 2004). Estudios realizados en las isoformas de NDPK de arroz, confirmaron mediante expresión transitoria de fusiones NDPK::GFP que la clasificación sugerida por Sweetlove en el 2001 es correcta. Siendo *OsNDPK1* (*Os07g0492000*) una isoforma del tipo 1 que localiza en citoplasma, mientras que *OsNDPK2* (*Os05g0595400*) es una isoforma del tipo 2 que localiza en plástidos y *OsNDPK3* (*Os12g0548300*) es una isoforma del tipo 3 que localiza en mitocondrias (Kihara et al, 2011). *StNDPK1* es homóloga a *OsNDPK3*, mientras que *StNDPK2* presenta homología con *OsNDPK2*, reforzando la idea de que las dos isoformas de papa caracterizadas serían de localización subcelular.

En estudios realizados donde se discute no solo la historia evolutiva, sino también la localización y la expresión de los genes NDPK en arveja, muestran que los genes que codifican



para la isoforma del tipo 3 posee un mayor grado de conservación, que los que codifican para la isoforma del tipo 1 ó 2 (Hammagren et al, 2007). Los análisis realizados tanto para la estructura del gen de StNDPK1, una isoforma del tipo 3; como para la posible estructura del gen de la isoforma del tipo 2, StNDPK2, sugieren que StNDPK1 posee un mayor grado de conservación que StNDPK2. Además, estas dos isoformas muestran un patrón de expresión en tejidos muy diferente. StNDPK1 muestra una expresión significativamente mayor en los tejidos proliferativos, tales como el ápice, sin embargo también se detectó expresión alta en tejidos fotosintéticos, como las hojas y brotes, y en los tejidos reproductivos, tales como las flores y las yemas. Por otro lado, no se detectó expresión de StNDPK2 en ninguno de estos tejidos, encontrándose hasta el momento sólo en estolón. Se ha reportado que las OsNDPK se expresan tanto en tejidos aéreos como las hojas, como en tejidos de reserva como las semillas (Kihara et al., 2011). Además, estudios de expresión realizados en diferentes tejidos de *B. campestris*, revelan que la expresión de los genes de BcNDK dependen del estadio de desarrollo y de las condiciones de germinación. En particular BcNDK3 se expresa más en tejidos proliferativos como el gancho apical y los cotiledones, pero también se detecta expresión en tejidos como pétalos, pistilos y pimpollos. Por otro lado, la expresión de BcNDK2 aumenta en semillas colocadas en luz luego de haberlas hecho germinar en oscuridad (Shin et al, 2004). Además, las mutantes de *A.thaliana* para el gen AtNDPK2 muestran defectos en el desarrollo, disminución de la expresión de los genes de respuesta a auxina y una alta sensibilidad a inhibidores del transporte de auxina (Goh Choi et al. 2005). Es más, en un trabajo realizado sobre una especie relacionada, *S.chacoense*, los autores caracterizaron una isoforma de NDPK que se localizaba predominantemente en el tejido meristemático y el tejido provascular de la región apical, sugiriendo que ésta isoforma podría tener un papel importante durante el crecimiento temprano de la planta (Dorion et al, 2005). Los resultados de expresión, para la isoforma del tipo 2 y la isoforma del tipo 3, realizados en distintos tejidos de



la planta de papa sugieren que: StNDPK1 se expresa de forma ubicua, ya que a pesar de que los niveles de transcripción varían, está presente en todos los tejidos analizados; mientras que StNDPK2 presenta un patrón más restringido, en donde sólo se expresaría en ciertos estadios tempranos de estolón, pudiendo estar involucrada en el desarrollo del estolón tuberizante.

Los datos obtenidos del análisis del promotor de *Stndpk1*, se condicen con los resultados de expresión obtenidos para ésta isoforma; ya que en los tratamientos de oscuridad, frío, daño mecánico y ácido jasmónico se observaron cambios importantes en los niveles de expresión de esta isoforma a tiempos cortos (horas). El promotor posee elementos regulatorios de respuesta a todas éstas señales y además dos regiones de regulación transcripcional, por lo que ésta isoforma podría estar involucrada en respuestas ambientales como la disponibilidad de luz, las bajas temperaturas ó la herbivoría. Si bien NDPK es una enzima que está muy bien caracterizada en su función de mantenimiento metabólico dado su actividad de fosfo-transferasa; en plantas se la ha descrito involucrada en múltiples pasos de señalización tanto en regulación como en diferenciación y desarrollo (Kihara et al., 2011); y también se la postula como una enzima involucrada en diversas respuestas fisiológicas que pueden ser activadas por una variedad de condiciones ambientales así también como en distintos estadios de desarrollo de la planta (Hasunuma et al. 2011; D. H. Shin et al. 2004). Teniendo en cuenta los diferentes niveles temporales en los sistemas de transducción descritos por Trewavas (2009); en donde inicialmente ocurren eventos intracelulares que consisten en cambios rápidos (en segundos, minutos, horas) modificando el flujo iónico y el grado de fosforilación de proteínas; mientras que eventos posteriores (en horas, días) se relacionan con modulación de la expresión génica, los resultados obtenidos en su conjunto estarían sugiriendo que la expresión de StNDPK1 podría modularse en respuesta a ciertas señales ambientales.

Para intentar esclarecer la localización de esta isoforma, se midió la actividad en las



diversas fracciones subcelulares y se la detectó con un anticuerpo específico anti-StNDPK1. La medición de actividad enzimática de NDPK confirmó la presencia de ésta enzima en las mitocondrias y en los extractos de citoplasma. Además en los ensayos de Western blot, StNDPK1 sólo se detecta en la fracción mitocondrial. Ni en la medición de actividad ni en los ensayos de western blot, NDPK puede ser detectada en la fracción del cloroplasto. Por lo tanto, los resultados generales apoyan el análisis *in silico* que predecía la presencia de un péptido señal para translocar la proteína a mitocondria. Además, en los ensayos de Western blot también se detectó señal en el extracto crudo y el citoplasma, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que otras isoformas de papas estén siendo detectadas por el anticuerpo. Sin embargo, el anticuerpo diseñado contra esta isoforma aislada es específico para la planta, ya que no se obtuvo señal en el extracto de hígado de ratón. Además, el anticuerpo anti-StNDPK1 reconoció la proteína recombinante StNDPK1::6xHis confirmando que al menos esta isoforma está siendo detectada en los extractos de proteínas de tubérculos brotados.

Los mecanismos de respuesta a estrés biótico y abiótico están regulados por vías en las que una red de transducción de la señal se extiende desde la percepción de las señales hasta la expresión del gen permitiendo la adaptación de la planta a su entorno, donde subyace un compromiso energético al que la planta se enfrentará. Para ello debe integrar tanto las señales internas y como las externas (Trewavas ,2009). Las NDPKs en las plantas se han visto involucradas en varias cascadas de señalización, son capaces de alterar el conjunto de los NTPs en la célula (Lu et al 1995, Bernard et al 2000, Miller et al 2002), siendo importantes en la comunicación de la red de energía intracelular (Dzeja et al, 2003). Es así que algunas de las NDPKs de plantas podrían entonces actuar como un modulador de ciertos estímulos ambientales, ya sea por cambios del pool de NTPs/NDPs disponibles, o participando en la percepción de algunas señales. Las NDPK son responsables de mantener el equilibrio de



nucleótidos en la célula, pero también están implicadas en algunas funciones reguladoras que podrían estar mediadas a través de interacciones proteína-proteína. Ya en 1973, Pendersen muestra mediante ensayos bioquímicos que la formación de ATP en mitocondrias se encuentra acoplada a la formación de NTPs. En sus conclusiones plantea que "(...) un rol de la NDPK mitocondrial en la transducción de la energía de unión del fosfato desde la mitocondria hacia el citosol, sería consistente con los hallazgos de que también hay actividad de NDPK en el citosol(...)". 30 años después, Dzeja y Terzic, refuerzan éste concepto planteando que en la célula debe existir una red de comunicación de la energía generada en distintos compartimientos celulares; relacionando las funciones de las fosfotransferasas. En los animales, se postula que la NDPK mitocondrial tiene como función metabolizar el GTP producido por la enzima del ciclo de Krebs en la conversión del Succinil-CoA (Sanadi et al, 1954). Sin embargo, en las plantas, la conversión de Succinil- CoA no produce GTP sino ATP (Palmer et al, 1966), de modo que la función metabólica postulada para la NDPK mitocondrial no se requiere en las plantas, planteándose algunas cuestiones interesantes en cuanto a su función. Parecería lógico pensar entonces que las NDPK de mitocondrias en plantas, muchas de las cuales han sido localizadas en el espacio inter-membrana (Sweetlove et al., 2001; Hammargren et al., 2008; Escobar Galvis et al., 1999) cerca de la fuente de ATP celular, podrían desempeñar un papel en la síntesis de GTP, ya sea para la exportación al citosol o para mantener el equilibrio del pool de NTPs (Sweetlove et al, 2001). Además hay evidencias de interacción entre la NDPK mitocondrial de arveja y una Adenilato quinasa (Monika Johansson et al. 2008). Las NDPKs podrían entonces interactuar con proteínas metabólicas, ya sea directamente para regular su función o para formar complejos enzimáticos que intervengan en éstas redes de comunicación de energía. Por otro lado, poco se sabe del papel de la fosforilación de proteínas en la mitocondria (Juszczuk et al, 2007). En conjunto, los resultados obtenidos para StNDPK1 permiten suponer que sería una enzima de localización mitocondrial cuya expresión podría



estar siendo modulada en respuesta a algunos estreses ambientales, a pesar de que ha sido detectada en todos los tejidos de la planta analizados. Es importante destacar, que inicialmente la información de los EST, a partir de los cuales se clonó esta enzima, provenían de los datos de un microarreglo TIGR 10K realizado con ARN total de brotes de papa cultivadas en condiciones diferentes de luz / oscuridad, Giberelinas (GA) y sacarosa (Giammaría et al, 2011 trabajo enviado). Los posteriores análisis del microarreglo revelaron que, si bien no hay diferencias entre luz y oscuridad a tiempos largos; cuando se añadió la GA, ya sea en luz como en oscuridad, se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de ésta isoforma. En este sistema de brotación, los brotes tienen una importante reserva de almidón, siendo la brotación un proceso de activa división y crecimiento que requiere energía. El grupo de Sonnenwald recientemente informó el efecto inductor de las GA en los brotes (Hartmann et al. 2011) En el sistema de brotación que se utilizó para el microarreglo esto se vio reflejado en el hecho de que el desarrollo y la diferenciación es fundamentalmente mayor durante luz y en un aumento en el número de brotes en el caso de oscuridad. En éste caso, el aumento de expresión de StNDPK1 podría vincularse con la demanda energética, ya que estas dos situaciones implicarían un mayor requerimiento de ATP. Cabe destacar, que en la brotación no solo está activo el proceso de división celular sino que también cumple un papel fundamental la elongación celular; procesos como éste requieren por ejemplo, de síntesis de la pared celular. Durante la biosíntesis de la pared celular, diferentes glicosiltransferasas (como por ejemplo, la UDP-4-Glc-epimerasa, cuyo gen se localiza contiguo a StNDPK1 en el cromosoma 8) permiten la interconversión de nucleótidos de azúcar mediante una serie de reacciones enzimáticas por el cual las plantas sintetizan monosacáridos activados que pueden incorporarse en el material de la pared celular (Reiter et al, 2001). Diferentes NDPs asociados a azúcares como la glucosa y la galactosa pueden formar los polisacáridos de la pared celular; de modo que la disponibilidad de los NDP-azúcares es un factor importante (Oomen et al. 2004). Además, se sabe que en



plantas superiores, los azúcares son necesarios no sólo para sostener el crecimiento sino también para regular la expresión de una variedad de genes. Las tensiones ambientales, como la infección por patógenos y el daño mecánico, activan cascadas de respuestas y también pueden afectar el metabolismo de hidratos de carbono (Rainers et al, 1997). Se ha demostrado por ejemplo, que la expresión de enzimas involucradas en respuesta a patógenos y estrés, tales como inhibidor de proteinasa II de la papa (Johnson y Ryan, 1990) y la chalcona sintasa (Tsukaya et al. 1991) son inducidas por el azúcar. Más allá de que en plantas, no se puede establecer un relación directa entre la NDPK mitocondrial y el metabolismo de azúcares, ciertos cambios metabólicos implican cambios en la demanda energética. Si la NDPK mitocondrial interviene en la red de comunicación de energía, los cambios de expresión de enzimas como éstas podrían estar asociados a cambios en las demandas energéticas celulares

Bibliografía



- Affourtit, C., Krab, K. & Moore, A.L., 2001. Control of plant mitochondrial respiration. *Biochimica et biophysica acta*, 1504(1), pp.58–69.
- Agarwal, K.C. et al., 1985. Nonenzymatic glycosylation of erythrocytic proteins in normal and diabetic subjects. Enzymes of nucleoside and nucleotide metabolism. *Diabetes*, 34(3), pp.251–5.
- Andresen, J.M. & Moore, H.P., 2001. Biogenesis of processing-competent secretory organelles in vitro. *Biochemistry*, 40(43), pp.13020–30.
- Annesley, S.J. et al., 2011. Dictyostelium discoideum nucleoside diphosphate kinase C plays a negative regulatory role in phagocytosis, macropinocytosis and exocytosis. *PLoS one*, 6(10), p.e26024.
- Aoki, K. et al., 2010. Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Micro-Tom, a reference system for the Solanaceae genomics. *BMC genomics*, 11, p.210.
- Bae, G. & Choi, Giltsu, 2008. Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annual review of plant biology*, 59, pp.281–311.
- Bar-Even, A. et al., 2012. Rethinking glycolysis: on the biochemical logic of metabolic pathways. *Nature chemical biology*, 8(6), pp.509–17.
- Bominaar, A.A. et al., 1993. Activation of G-proteins by receptor-stimulated nucleoside diphosphate kinase in Dictyostelium. *The EMBO journal*, 12(6), pp.2275–9.
- Brenner, W.G. et al., 2012. Gene regulation by cytokinin in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 3(January), p.8.
- Brenner, W.G. et al., 2005. Immediate-early and delayed cytokinin response genes of Arabidopsis thaliana identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 44(2), pp.314–33.
- Camire, M.E., Kubow, S. & Donnelly, D.J., 2009. Potatoes and human health. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(10), pp.823–40.
- Cheng, S.-H. et al., 2002. Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant physiology*, 129(2), pp.469–85.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K. & Zhu, J.-K., 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of experimental botany*, 55(395), pp.225–36.
- Chinnusamy, V., Zhu, J. & Zhu, J.-K., 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in plant science*, 12(10), pp.444–51.



- Cho, S.M. et al., 2004. Molecules and Enhanced Expression of a Gene Encoding a Nucleoside Diphosphate Kinase 1 (OsNDPK1) in Rice Plants upon Infection with Bacterial Pathogens. *Molecules and Cells*, 18(3), pp.390–395.
- Choi, G et al., 1999. Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature*, 401(6753), pp.610–3.
- Choi, Goh et al., 2005. A possible role for NDPK2 in the regulation of auxin-mediated responses for plant growth and development. *Plant & cell physiology*, 46(8), pp.1246–54.
- Chow, B. & McCourt, P., 2006. Plant hormone receptors: perception is everything. *Genes & development*, 20(15), pp.1998–2008.
- Christie, J.M., 2007. Phototropin blue-light receptors. *Annual review of plant biology*, 58, pp.21–45.
- Clarkson, J.J. et al., 2004. Phylogenetic relationships in Nicotiana (Solanaceae) inferred from multiple plastid DNA regions. *Molecular phylogenetics and evolution*, 33(1), pp.75–90.
- Desvignes, T. et al., 2012. The Nme gene family in fish. *Fish physiology and biochemistry*.
- Dorion, S., Matton, D.P. & Rivoal, J., 2006. Characterization of a cytosolic nucleoside diphosphate kinase associated with cell division and growth in potato. *Planta*, 224(1), pp.108–24.
- Dzeja, P.P., 2003. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *Journal of Experimental Biology*, 206(12), pp.2039–2047.
- D'Agostino, N. et al., 2007. TomatEST database: in silico exploitation of EST data to explore expression patterns in tomato species. *Nucleic acids research*, 35(Database issue), pp.D901–5.
- Escobar Galvis, M.L. et al., 1999. Cloning and characterisation of a pea mitochondrial NDPK. *Biochimie*, 81(12), pp.1089–96.
- Escobar Galvis, M.L. et al., 2001. Heat stress response in pea involves interaction of mitochondrial nucleoside diphosphate kinase with a novel 86-kilodalton protein. *Plant physiology*, 126(1), pp.69–77.
- Flügge, U.-I. et al., 2011. The role of transporters in supplying energy to plant plastids. *Journal of experimental botany*, 62(7), pp.2381–92.
- Foyer, C.H., Noctor, G. & Hodges, M., 2011. Respiration and nitrogen assimilation: targeting mitochondria-associated metabolism as a means to enhance nitrogen use efficiency. *Journal of experimental botany*, 62(4), pp.1467–82.
- Fukuchi, T. et al., 1993. Isolation, overexpression and disruption of a *Saccharomyces cerevisiae* YNK gene encoding nucleoside diphosphate kinase. *Gene*, 129(1), pp.141–6.



- Gargantini, Pablo R et al., 2006. A CDPK isoform participates in the regulation of nodule number in *Medicago truncatula*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 48(6), pp.843–56.
- Gerbitz, K.D., Gempel, K. & Brdiczka, D., 1996. Mitochondria and diabetes. Genetic, biochemical, and clinical implications of the cellular energy circuit. *Diabetes*, 45(2), pp.113–26.
- Giammaria, V. et al., 2011. StCDPK2 expression and activity reveal a highly responsive potato calcium-dependent protein kinase involved in light signalling. *Planta*, 233(3), pp.593–609.
- Gibson, D.G. et al., 2010. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5987), pp.52–6.
- Gilroy, S. & Trewavas, A, 2001. Signal processing and transduction in plant cells: the end of the beginning? *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(4), pp.307–14.
- Glaze, R.P. & Wadkins, C.L., 1967. Properties of a nucleoside diphosphokinase from liver mitochondria and its relationship to the adenosine triphosphate-adenosine diphosphate exchange reaction. *The Journal of biological chemistry*, 242(9), pp.2139–50.
- Harris, N., Taylor, J.E. & Roberts, J. a, 1994. Isolation of a mRNA encoding a nucleoside diphosphate kinase from tomato that is up-regulated by wounding. *Plant molecular biology*, 25(4), pp.739–42.
- Hartmann, A. et al., 2011. Reactivation of meristem activity and sprout growth in potato tubers require both cytokinin and gibberellin. *Plant physiology*, 155(2), pp.776–96.
- Hasunuma, K. et al., 2011. Global warming, plant paraquat resistance, and light signal transduction through nucleoside diphosphate kinase as a paradigm for increasing food supply. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 384(4-5), pp.391–5.
- Hasunuma, K. et al., 2003. Putative functions of nucleoside diphosphate kinase in plants and fungi. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 35(1), pp.57–65.
- Hetmann, A. & Kowalczyk, S., 2009. Nucleoside diphosphate kinase isoforms regulated by phytochrome A isolated from oat coleoptiles. *Acta biochimica Polonica*, 56(1), pp.143–53.
- Hildebrandt, M. et al., 1995. A human NDP-kinase B specifically binds single-stranded polypyrimidine sequences. *Nucleic acids research*, 23(19), pp.3858–64.
- Hirayama, T. & Shinozaki, K., 2010. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 61(6), pp.1041–52.
- Humphrey, T.V., Bonetta, D.T. & Goring, D.R., 2007. Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. *The New phytologist*, 176(1), pp.7–21.



- Hwan Kim, S. et al., 2002. Human brain nucleoside diphosphate kinase activity is decreased in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(4), pp.970–975.
- Izumiya, H. & Yamamoto, M., 1995. Cloning and functional analysis of the ndk1 gene encoding nucleoside-diphosphate kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of biological chemistry*, 270(46), pp.27859–64.
- Jain, A., Nagarajan, V.K. & Raghothama, K.G., 2012. Transcriptional regulation of phosphate acquisition by higher plants. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- Jatala, P., Booth, R.H. & Wiersema, S.G., 1982. Development of *Meloidogyne incognita* in Stored Potato Tubers. *Journal of nematology*, 14(1), pp.142–3.
- Johansson, Monika et al., 2008. The activities of nucleoside diphosphate kinase and adenylate kinase are influenced by their interaction. *Plant Science*, 174(2), pp.192–199.
- Kihara, A. et al., 2011. Physiological and Biochemical Characterization of Three Nucleoside Diphosphate Kinase Isozymes from Rice (*Oryza sativa* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(9), pp.1740–1745.
- Kim, C. et al., 2008. No single way to understand singlet oxygen signalling in plants. *EMBO reports*, 9(5), pp.435–9.
- Kim, M.C. et al., 2009. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. *Molecular plant*, 2(1), pp.13–21.
- Knorpp, C, 2003. Plant mitochondrial nucleoside diphosphate kinase is attached to the membrane through interaction with the adenine nucleotide translocator. *FEBS Letters*, 555(2), pp.363–366.
- Lacombe, M.-L. et al., 2009. Interaction of NDPK-D with cardiolipin-containing membranes: Structural basis and implications for mitochondrial physiology. *Biochimie*, 91(6), pp.779–83.
- Lacombe, M.L. et al., 1990. Functional cloning of a nucleoside diphosphate kinase from *Dictyostelium discoideum*. *The Journal of biological chemistry*, 265(17), pp.10012–8.
- Li, Q.-H. & Yang, H.-Q., Cryptochrome signaling in plants. *Photochemistry and photobiology*, 83(1), pp.94–101.
- Luan, S., 2003. Protein phosphatases in plants. *Annual review of plant biology*, 54, pp.63–92.
- Lübeck, J. & Soll, J., 1995. Nucleoside diphosphate kinase from pea chloroplasts: purification, cDNA cloning and import into chloroplasts. *Planta*, 196(4), pp.668–73.
- MacDonald, N.J. et al., 1993. A serine phosphorylation of Nm23, and not its nucleoside diphosphate kinase activity, correlates with suppression of tumor metastatic potential. *J. Biol. Chem.*, 268(34), pp.25780–25789.



- Maffei, M.E., Mithöfer, A. & Boland, W., 2007a. Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends in plant science*, 12(7), pp.310–6.
- Maffei, M.E., Mithöfer, A. & Boland, W., 2007b. Insects feeding on plants: rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*, 68(22-24), pp.2946–59.
- Mahajan, S. & Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), pp.139–58.
- McAinsh, M.R. & Pittman, J.K., 2009. Shaping the calcium signature. *The New phytologist*, 181(2), pp.275–94.
- McCarty, D.R. & Chory, J., 2000. Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell*, 103(2), pp.201–9.
- Milon, L. et al., 2000. The human nm23-H4 gene product is a mitochondrial nucleoside diphosphate kinase. *The Journal of biological chemistry*, 275(19), pp.14264–72.
- Mishra, N.S., Tuteja, R. & Tuteja, N., 2006. Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of biochemistry and biophysics*, 452(1), pp.55–68.
- Moon, H. et al., 2003. NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1), pp.358–63.
- Oecking, C. & Jaspert, N., 2009. Plant 14-3-3 proteins catch up with their mammalian orthologs. *Current opinion in plant biology*, 12(6), pp.760–5.
- Onkokesung, N. et al., 2010. Jasmonic acid and ethylene modulate local responses to wounding and simulated herbivory in *Nicotiana attenuata* leaves. *Plant physiology*, 153(2), pp.785–98.
- Oomen, R.J.F.J. et al., 2004. Overexpression of two different potato UDP-Glc 4-epimerases can increase the galactose content of potato tuber cell walls. *Plant Science*, 166(4), pp.1097–1104.
- Park, D.S. et al., 1995. Analysis of nm23 expression as a prognostic parameter in renal cell carcinoma. *Journal of Korean medical science*, 10(4), pp.258–62.
- Penfield, S., 2008. Temperature perception and signal transduction in plants. *The New phytologist*, 179(3), pp.615–28.
- Plaxton, W.C., 1996. THE ORGANIZATION AND REGULATION OF PLANT GLYCOLYSIS. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 47, pp.185–214.
- Postel, E.H., 2003. Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 35(1), pp.31–40.



- Ray, N.B. & Mathews, C.K., 1992. Nucleoside diphosphokinase: a functional link between intermediary metabolism and nucleic acid synthesis. *Current topics in cellular regulation*, 33, pp.343–57.
- Richards, C.L., Bossdorf, O. & Verhoeven, K.J.F., 2010. Understanding natural epigenetic variation. *The New phytologist*, 187(3), pp.562–4.
- Richards, H. et al., 2002. Cyclic nucleotide content of tobacco BY-2 cells. *Phytochemistry*, 61(5), pp.531–7.
- Rodriguez, F. et al., 2009. Do potatoes and tomatoes have a single evolutionary history, and what proportion of the genome supports this history? *BMC evolutionary biology*, 9, p.191.
- Ryan, C. a & Pearce, G., 2003. Systemins: a functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 Suppl , pp.14577–80.
- Schillmiller, A.L. & Howe, G. a, 2005. Systemic signaling in the wound response. *Current opinion in plant biology*, 8(4), pp.369–77.
- Shao, H.-B. et al., 2007. Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 54(1), pp.37–45.
- Shin, D.H. et al., 2004. Molecular cloning and characterization of nucleoside diphosphate (NDP) kinases from Chinese cabbage (*Brassica campestris*). *Molecules and cells*, 17(1), pp.86–94.
- Somers, D.E. & Fujiwara, S., 2009. Thinking outside the F-box: novel ligands for novel receptors. *Trends in plant science*, 14(4), pp.206–13.
- Sommer, D. & Song, P.S., 1994. A plant nucleoside diphosphate kinase homologous to the human Nm23 gene product: purification and characterization. *Biochimica et biophysica acta*, 1222(3), pp.464–70.
- Spooner, D.M. et al., 2007. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), pp.19398–403.
- Struglics, a & Håkansson, G., 1999. Purification of a serine and histidine phosphorylated mitochondrial nucleoside diphosphate kinase from *Pisum sativum*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 262(3), pp.765–73.
- Sweetlove, L.J. et al., 2001. Nucleoside diphosphate kinase III is localized to the inter-membrane space in plant mitochondria. *FEBS letters*, 508(2), pp.272–6.
- Tang, L. et al., 2008. Enhanced tolerance of transgenic potato plants overexpressing nucleoside diphosphate kinase 2 against multiple environmental stresses. *Transgenic research*, 17(4), pp.705–15.



- Tokarska-Schlattner, M. et al., 2008. The nucleoside diphosphate kinase D (NM23-H4) binds the inner mitochondrial membrane with high affinity to cardiolipin and couples nucleotide transfer with respiration. *The Journal of biological chemistry*, 283(38), pp.26198–207.
- Trewavas, Anthony, 2006. A brief history of systems biology. “Every object that biology studies is a system of systems.” Francois Jacob (1974). *The Plant cell*, 18(10), pp.2420–30.
- Trewavas, Anthony, 2005a. Green plants as intelligent organisms. *Trends in plant science*, 10(9), pp.413–9.
- Trewavas, Anthony, 2005b. Plant intelligence. *Die Naturwissenschaften*, 92(9), pp.401–13.
- Trewavas, Anthony, 2009. What is plant behaviour? *Plant, cell & environment*, 32(6), pp.606–16.
- Troll, H. et al., 1993. Separate nuclear genes encode cytosolic and mitochondrial nucleoside diphosphate kinase in *Dictyostelium discoideum*. *The Journal of biological chemistry*, 268(34), pp.25469–75.
- Tsukaya, H. et al., 1991. Sugar-Dependent Expression of the CHS-A Gene for Chalcone Synthase from *Petunia* in Transgenic *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 97(4), pp.1414–21.
- Ulloa, Rita M et al., 1995. BIOCHEMICAL Purification and characterization of a soluble nucleoside diphosphate kinase in *Trypanosoma cruzi*. , 6851(95).
- Vinocur, B. & Altman, A., 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current opinion in biotechnology*, 16(2), pp.123–32.
- Wang, W., Vinocur, B. & Altman, A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), pp.1–14.
- Wu, J. & Baldwin, I.T., 2009. Herbivory-induced signalling in plants: perception and action. *Plant, cell & environment*, 32(9), pp.1161–74.
- Xue, H.-W., Chen, X. & Mei, Y., 2009. Function and regulation of phospholipid signalling in plants. *The Biochemical journal*, 421(2), pp.145–56.
- Zhao, S. & Qi, X., 2008. Signaling in plant disease resistance and symbiosis. *Journal of integrative plant biology*, 50(7), pp.799–807.