

UCH-FC
DOC-B
M312
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
Y FARMACEUTICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR
LABORATORIO DE BIOQUIMICA GENERAL

REGULACION, LOCALIZACION Y POSIBLE FUNCION
DE LA APIRASA EN LA TUBERIZACION DE
Solanum tuberosum VAR DESIREE.



MARTA ROSA MANCILLA ASTUDILLO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO
DE DOCTOR EN BIOQUIMICA

PROFESOR PATROCINANTE
DRA. AIDA TRAVERSO P.

SANTIAGO - CHILE

1994

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la tesis de Doctorado presentada por la candidata

MARTA ROSA MANCILLA ASTUDILLO

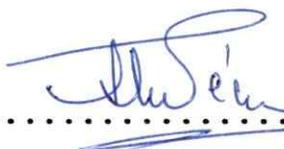
ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de Defensa de Tesis rendido el 18 de Abril de 1994.

Patrocinante de Tesis
Dra. Aída Traverso P.



Comisión Informante de Tesis

Dra. Luz María Pérez R.
(Presidente)


.....


Dra. Liliana Cardemil O.


.....

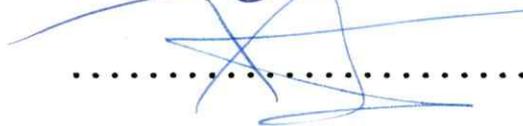
Dr. Jaime Eyzaguirre P.


.....

Dr. Luis Meza B.


.....

Dr. Xavier Jordana De B.


.....

El trabajo experimental realizado en esta tesis fue financiado por los proyectos: FONDECYT 90-1006 (a Dra. M.A. Valenzuela); FONDECYT 90-0031 (a Marta Mancilla); International Foundation for Sciences IFS C/1815-1 (a Marta Mancilla) y Beca de Postgrado y Postítulo de la U. de Chile PG-010-92 (a Marta Mancilla).



A MI AMADA HIJA.



AGRADECIMIENTOS.

A la Sra. Aída Traverso P. por su fe y confianza en mí, estimulándome siempre a seguir en la investigación en el área de la bioquímica vegetal. Gracias por la generosidad de su tiempo en todas las horas que juntas hemos compartido.

A mis compañeras de trabajo:

A María Antonieta Valenzuela por su constante estímulo y su valiosa ayuda en el análisis de resultados y en la edición de esta tesis. Gracias Toña por tu compañerismo y amistad.

A Ana María Kettlun por la amistad que nos ha unido estos años, por soportarme y escucharme en tantas oportunidades. Gracias, amiga.

A Liliana Chayet y Lucía Collados por el cariño que me han brindado el que siempre llevaré en mi corazón.

A mis memoristas, Marcela Del Villar, Verónica Redlich y Patricia Morales les agradezco su trabajo experimental y la amistad que hoy nos une.

Al Dr. Jorge Garrido del Laboratorio de Histología de la Pontificia Universidad Católica por la dirección y análisis de los experimentos de inmunocitocalización de la apirasa por microscopía de luz y electrónica. Gracias por el apoyo que me ha brindado. Deseo expresar mi profundo agradecimiento a sus colaboradores, especialmente, a Lucy Messen, José Morillas y Alejandro Munizaga por su amistad y apoyo experimental y fotográfico.

Al Dr. Arturo Ferreira de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la U. de Chile por la dirección y análisis de los resultados experimentales en la obtención de anticuerpos. Agradezco en forma especial a su colaboradora Patricia Vallejos por su voluntad y trabajo.

Al Dr. Carlos Muñoz del Laboratorio de Biotecnología del INIA "La Platina" por haberme brindado la oportunidad de realizar los cultivos *in vitro* en su laboratorio. Gracias por la generosidad y amistad de Blanquita y muy especialmente de Marisol Muñoz a quienes siempre recordaré con mucho cariño.

Al Dr. Horacio López del INIA "La Platina" mi más sincero agradecimiento por proporcionarme el material biológico para el desarrollo de esta tesis. Gracias a Manuel Gutiérrez y a Don Jorge por acompañarme al campo durante tres años durante las siembras de invierno y verano.

A la Dra. Luz María Pérez como Directora de la Escuela de Graduados de nuestra Facultad mi mayor agradecimiento por las facilidades otorgadas durante la redacción de esta tesis. Como compañera de laboratorio, gracias por todo lo que hemos compartido estos años.

Al Dr. Jaime Eyzaguirre de la Pontificia Universidad Católica por facilitarme un espacio en su congelador a -70°C para guardar material biológico.

A mis amigas y colegas, Inés Contreras, Mercedes Zaldivar, Cecilia Rojas y Jeannette Steiner por su constante apoyo, compañerismo y amistad.

Al personal técnico de nuestro laboratorio, Rodolfo Pulgar y Guillermo Córdova (hoy retirados) y a Patricia Fuentealba y Jessica Pulgar, mi agradecimiento por su respeto y voluntad.

Al equipo femenino del laboratorio: Daniela Selenfreund, Nora Fanta, Patricia Castañeda, Lorena García, Soledad Sandoval, Victoria Espinosa, Patricia Pozo y Beatriz Cantero y al equipo masculino: Aldo Alvarez, Alex Quaas, Tito Pérez, Mario Chiong y Francisco Romero, por todos los momentos que hemos compartido. Gracias a cada uno de ellos en particular.

A la Dra. Ana María Domínguez por su profesionalismo y apoyo durante los últimos años.

A quien me ha enseñado que el Hombre es el diálogo entre la naturaleza y Dios, un punto omega donde convergen todas las fuerzas ascendentes de manera que la Creación entera se presenta en función del Verbo encantado. La fenomenología de lo cósmico.

A mi querida y abnegada hija Carolina por su ternura y cariño incondicional, siempre esperándome con alegría y paciencia. Gracias por ser la gran personita que eres.

Gracias a Dios.

Marta Mancilla A.
1994



INDICE



INDICE.		i
LISTA DE FIGURAS.		vi
LISTA DE TABLAS.		viii
ABREVIATURAS.		ix
RESUMEN.		x
ABSTRACT.		xiv
1.	INTRODUCCION.	1
2.	MATERIALES Y METODOS.	17
2.1.	MATERIALES.	17
2.1.1.	Material biológico.	17
2.1.2.	Reactivos.	17
2.2.	Determinación de la concentración de proteínas.	19
2.3.	Preparación de anticuerpos policlonales monoespecíficos contra la apirasa.	19
2.3.1.	Obtención en conejos.	19
2.3.2.	Obtención en ratones.	20
2.3.3.	Determinación del título de los anticuerpos.	21
2.3.4.	Determinación de la especificidad de los anticuerpos.	22
2.4.	Inmunoelctrotransferencia o "Western-blot".	22
2.5.	Ensayo enzimático de la apirasa.	23
2.6.	Ensayo de las fracciones moduladoras (activadora e inhibidora) de la la actividad apirásica.	24
2.7.	Purificación de las proteínas moduladoras de la apirasa.	24
2.7.1.	Preparación de una fracción moduladora parcialmente purificada: Fr-50.	24
2.7.2.	Metódicas cromatográficas.	25
2.7.2.1.	Cromatografía en Sephadex G-100.	25
2.7.2.2.	Cromatografía en DEAE-Sephadex.	26

2.7.2.3.	Cromatografía en trifluoperazina-Sepharose.	26
2.7.2.4.	Cromatografía de CM-celulosa-apirasa.	28
2.7.2.5.	Cromatografía en octadecil sílica unida a apirasa.	29
2.8.	Determinación del estado de pureza de las proteínas moduladoras de la apirasa.	30
2.8.1.	Electroforesis en geles en placa de poliacrilamida en presencia de SDS.	30
2.8.2.	Electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 4,5.	31
2.9.	Caracterización de las proteínas moduladoras de la apirasa.	31
2.9.1.	Efecto del PMSF sobre la Fr-50.	31
2.9.2.	Efecto de la proteína activadora sobre los parámetros cinéticos de la apirasa.	32
2.9.3.	Determinación de la masa molecular de la proteína activadora por cromatografía de exclusión.	32
2.9.4.	Determinación de la masa molecular de la proteína inhibidora.	33
2.9.5.	Determinación del punto isoeléctrico de la proteína activadora.	33
2.9.5.1.	Electroenfoco en geles cilíndricos de poliacrilamida.	33
2.9.5.2.	Electroenfoco en geles planos de poliacrilamida.	35
2.10.	Preparación de la apirasa de tubérculos de diferentes períodos de desarrollo.	36
2.10.1.	Obtención del homogeneizado y extracción de apirasa.	36
2.10.2.	Cuantificación inmunoquímica de la apirasa en los homogeneizados. ("Inmunodot").	36
2.11.	Localización de la apirasa.	37
2.11.1.	Fraccionamiento subcelular.	37
2.11.1.1.	Centrifugación diferencial.	37
2.11.1.2.	Medición de enzimas marcadoras y actividad apirásica en las distintas fracciones obtenidas por centrifugación diferencial.	38
2.11.1.3.	Solubilización de la enzima microsomal.	38
2.11.2.	Inmunocitlocalización.	39
2.11.2.1.	Inmunocitlocalización de apirasa por impresión de tejido.	39

2.11.2.2.	Inmunocitlocalización por microscopía de luz.	39
2.11.2.3.	Inmunocitlocalización por microscopía electrónica.	41
2.12.	Modelos de estudio <i>in vitro</i> .	43
2.12.1.	Cultivo de tejido <i>in vitro</i> (callos).	43
2.12.1.1.	Determinación de la humedad en callos.	45
2.12.2.	Obtención de homogeneizados e identificación de la apirasa en las diferentes partes de la planta <i>in vitro</i> .	45
2.12.3.	Obtención de una suspensión celular.	46
2.12.3.1.	Inducción de citodiferenciación <i>in vitro</i> en suspensiones celulares homogéneas.	46
3. RESULTADOS.		49
3.1.	Obtención de anticuerpos policlonales monoespecíficos contra la apirasa.	49
3.2.	Regulación de la actividad apirásica durante el desarrollo del tubérculo de <i>S. tuberosum</i> .	50
3.2.1.	Efecto de inhibidores sobre la actividad apirásica en homogeneizados de etapas iniciales de la tuberización.	59
3.2.2.	Proteínas moduladoras de la actividad apirásica durante el desarrollo del tubérculo.	61
3.2.3.	Análisis de las proteínas de la Fr-50 por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS e inmunoelectrotransferencia.	63
3.3.	Purificación de las proteínas moduladoras de la actividad apirásica.	66
3.3.1.	Cromatografía de exclusión en Sephadex G-100.	67
3.3.2.	Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex.	67
3.3.3.	Cromatografía en trifluoperazina-Sepharose.	70
3.3.4.	Cromatografía de afinidad en CM-celulosa unida a apirasa.	72
3.3.5.	Cromatografía de afinidad en octadecil sílica-apirasa.	74
3.4.	Caracterización de las proteínas moduladoras de la actividad apirásica.	77
3.4.1.	Relación entre la concentración de proteínas de la Fr-50 y el porcentaje	

	de estimulación de la actividad apirásica.	78
3.4.2.	Efecto del PMSF sobre la capacidad estimuladora de la Fr-50.	80
3.4.3.	Efecto de la proteína activadora sobre los parámetros cinéticos de la apirasa.	80
3.4.4.	Determinación de la masa molecular de la proteína activadora y la inhibidora.	84
3.4.5.	Determinación del punto isoeléctrico de la proteína activadora.	84
3.5.	Localización tisular y subcelular de la apirasa.	90
3.5.1.	Fraccionamiento subcelular durante el desarrollo del tubérculo.	91
3.5.2.	Localización tisular de la apirasa.	93
3.5.2.1.	Por impresión de tejido en nitrocelulosa.	93
3.5.2.2.	Por microscopía de luz.	95
3.5.3.	Localización intracelular por microscopía electrónica.	98
3.6.	Modelos de estudio con sistemas de cultivo de tejido <i>in vitro</i> .	103
3.6.1.	Obtención de un sistema de estudio <i>in vitro</i> de tejido indiferenciado de papa.	103
3.6.2.	Diferenciación a tallos y/o raíces y formación de microtubérculos.	105
3.6.3.	Identificación de la apirasa en las diferentes partes de la planta obtenida <i>in vitro</i> .	107
3.6.4.	Obtención de un cultivo homogéneo de células en suspensión en activa división celular.	101
3.6.5.	Inducción de citodiferenciación <i>in vitro</i> en suspensiones celulares homogéneas.	111
4.	DISCUSION.	116
4.1.	Regulación de la actividad apirásica durante el desarrollo del tubérculo de <i>S. tuberosum</i> .	116
4.1.1.	Proteínas totales, actividad apirásica y cuantificación de esta enzima durante el desarrollo de la papa.	117
4.1.2.	Purificación de las proteínas moduladoras de la actividad apirásica.	122
4.1.3.	Caracterización de las proteínas moduladoras de la actividad apirásica.	124
4.2.	Localización y distribución de la apirasa en el tejido de papa.	129

4.3.	Modelos de estudio con sistemas de cultivo de tejido <i>in vitro</i> y detección de apirasa.	137
5.	CONCLUSIONES.	149
6.	BIBLIOGRAFIA.	151



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la hipótesis de trabajo sobre la función propuesta para la apirasa.	14
Figura 2. Determinación del título del anticuerpo policlonal contra la apirasa de papa var Desirée.	51
Figura 3. Morfología de la planta de <i>Solanum tuberosum</i> .	53
Figura 4. Determinación de las proteínas totales durante el desarrollo del tubérculo de papa.	55
Figura 5. Determinación de la actividad apirásica y cuantificación de la masa de enzima durante el desarrollo del tubérculo	56
Figura 6. Determinación de las proteínas totales y actividad apirásica en el tubérculo madre.	58
Figura 7. Electroforesis en presencia de SDS de fracciones semipurificadas (Fr-50) de las proteínas moduladoras de la actividad apirásica.	64
Figura 8. Identificación del complejo proteína activadora-apirasa en una Fr-50 por SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia.	65
Figura 9. Columna de Sephadex G-100.	68
Figura 10. Columna de DEAE-Sephadex.	69
Figura 11. Columna de trifluoperazina-Sepharose. Verano.	71
Figura 12. Columna de CM-celulosa-apirasa.	73
Figura 13. Análisis electroforético (SDS-PAGE) de los eluidos de la columna de SiCl ₄ -apirasa.	76
Figura 14. Efecto de la concentración de proteínas de una Fr-50 preparada de una fracción soluble sobre la actividad apirásica.	79
Figura 15a. Efecto de la proteína activadora sobre los parámetros cinéticos de la apirasa cuando el sustrato es ATP.	81
Figura 15b. Efecto de la proteína activadora sobre los parámetros cinéticos de la apirasa cuando el sustrato es ADP.	82
Figura 16a. Columna de Sephacryl S-200 calibrada con proteínas estándares.	85

Figura 18b. Determinación de la masa molecular de las proteínas moduladoras de la apirasa por filtración en Sephacryl S-200.	86
Figura 17. Determinación del punto isoeléctrico de la proteína activadora de la apirasa	88
Figura 18. Identificación del complejo proteína activadora-apirasa en una Fr-50 por electroenfoque e inmunoelectrotransferencia.	89
Figura 19. Distribución subcelular de la apirasa durante el desarrollo del tubérculo de <i>S. tuberosum</i> .	92
Figura 20. Inmunocitocalización de la apirasa por impresión de tejido en nitrocelulosa.	96
Figura 21. Inmunocitocalización de la apirasa por microscopía de luz.	97
Figura 22. Inmunocitocalización de la apirasa por microscopía electrónica.	100
Figura 23. Inmunocitocalización de la apirasa por microscopía electrónica.	101
Figura 24. Cinética de crecimiento de callos de <i>S. tuberosum</i> .	104
Figura 25. Organogénesis de los cultivos <i>in vitro</i> .	106
Figura 26. Identificación de la apirasa en homogeneizados de las distintas partes de la planta cultivada <i>in vitro</i> por SDS-PAGE.	108
Figura 27. Inmunodetección de la apirasa en los homogeneizados de las distintas partes de la planta cultivada <i>in vitro</i>	110
Figura 28. Inducción de citodiferenciación <i>in vitro</i> en suspensiones celulares e identificación de la apirasa en un SDS-PAGE.	112
Figura 29. Inducción de citodiferenciación <i>in vitro</i> suspensiones celulares e inmunodetección de apirasa.	114
Figura 30. Diagrama de los orígenes del tubérculo de papa	132
Figura 31. Diagrama de un corte longitudinal de un tubérculo de papa maduro.	132

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio de cultivo de tejido <i>in vitro</i> .	44
Tabla 2. Efecto de inhibidores sobre la actividad apirásica.	60
Tabla 3. Efecto de la Fr-50 sobre la actividad apirásica a diferentes tiempos de desarrollo del tubérculo de <i>S.tuberosum</i> .	62
Tabla 4. Purificación de las proteínas moduladoras a través de una columna de octadecil sílica-apirasa.	75
Tabla 5. Efecto de la proteína activadora sobre los parámetros cinéticos de la apirasa.	83
Tabla 6. Solubilización de la apirasa unida a la fracción microsomal.	94

ABREVIATURAS

A	: Amperes.
ADPásica	: Actividad adenosindifosfatásica.
a.e.	: Actividad específica.
ATPásica	: Actividad adenosintrifosfatásica.
BA	: Benciladenina.
BSA	: Seroalbúmina de bovino.
CM-celulosa	: Carboximetil celulosa.
2,4D	: 2,4-diclorofenoxiacético.
DEAB	: Dietilaminobencidina.
DCCD	: Diciclohexilcarbodiimida.
DSA	: Anhídrido dodecinilsuccínico.
DEAE Sephadex	: Dietilaminoetil Sephadex.
DES	: Dietilestilbestrol.
DMP	: Tri(dimetilaminoetil)fenol.
g	: Gramo.
h	: Horas.
IgG	: Inmunoglobulina G.
MES	: Acido (2-N-morfolino)etano sulfónico.
min	: Minutos.
NAA	: Acido naftalen acético.
PBS	: Amortiguador de fosfato salino.
Pi	: o-fosfato inorgánico.
PMSF	: Fenilmetil sulfonilfluoruro.
SDS	: Dodecilsulfato de sodio.
SDS-PAGE	: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.
seg	: Segundos.
TBS	: Amortiguador de Tris salino.
TCA	: Acido tricloroacético.
TFP	: Trifluoperazina.
TGA	: Acido tioglicólico.
TEMED	: N,N,N'-Tetrametiletildiamina.
Tris	: Tris(hidroximetil)-aminoetano.
V	: Volt.

RESUMEN

En este trabajo de tesis se ha establecido que la ATP-difosfohidrolasa o apirasa (EC 3.6.1.5) es una enzima soluble cuya actividad está muy regulada durante el desarrollo del tubérculo de *Solanum tuberosum* var Desirée. Su función fisiológica podría estar relacionada con el proceso de diferenciación celular que caracteriza el inicio de la tuberización y por lo tanto podría considerarse como un posible marcador bioquímico para este proceso.

Se encontró un máximo de actividad apirásica (ATPasa-ADPasa) a los 49 días de desarrollo del tubérculo, momento en que se observa el inicio de la tuberización. La cuantificación de la enzima durante todo el desarrollo de la papa, reveló que este máximo de actividad es coincidente con una mayor masa de la enzima.

La actividad apirásica, además, está regulada cinéticamente por dos proteínas moduladoras, una activadora y otra inhibidora. Se intentó purificarlas a través de cromatografías de exclusión, de intercambio iónico y de afinidad. Sólo se logró homogénea la proteína que inhibe la actividad apirásica, debido a que las preparaciones más purificadas de la activadora (menor concentración de proteínas) fueron inestables.

La caracterización parcial de estas proteínas moduladoras evidenció los siguientes hechos:

1) Ambas proteínas se encuentran en la fracción soluble, igual que la apirasa, según un fraccionamiento subcelular.

2) Estas proteínas son termoestables, ya que resisten un calentamiento a 100°C por 5 min, ventaja que ha sido utilizada en su purificación.

3) El porcentaje de activación depende de la concentración de proteínas en el medio de ensayo y es suprimido por la presencia de PMSF, lo cual podría indicar: a) la posible participación de residuos hidroxílicos en la interacción proteína activadora-apirasa o b) que la activación estaría relacionada con una proteólisis parcial de la apirasa.

4) El efecto activador sobre la apirasa es aproximadamente constante durante el desarrollo del tubérculo, y comienza con la aparición de esta enzima.

5) La proteína activadora aumenta la V_{max} y no altera la afinidad de la apirasa por el sustrato (K_m).

6) Estas proteínas moduladoras tienen masas moleculares diferentes: la proteína activadora de 15,0 kDa determinada por filtración en gel; y la proteína inhibidora de 58,0 kDa establecida tanto por filtración en gel como por un SDS-PAGE.

7) El punto isoeléctrico de la proteína activadora es de 9,0 determinado por electroenfoque, lo cual podría favorecer la interacción con la apirasa que es más ácida.

La determinación de la localización de la apirasa a

nivel tisular e intracelular permitió una mayor aproximación a su posible función en las células de la papa. Se estableció que esta enzima se localiza en la región subapical de los estolones y en la peridermis, zona cambial y perimedular de los tubérculos jóvenes. La localización a nivel ultraestructural reveló que la apirasa se distribuye mayoritariamente en la pared celular y en una menor proporción en el citoplasma y no se encontró unida a membranas. Estos hechos indicarían que una posible función de la apirasa podría estar relacionada con la síntesis de glicoproteínas y con el proceso de suberización de la pared secundaria y no con la hidrólisis del dolicol-PP en la síntesis de polisacáridos y glicoproteínas de la pared primaria.

Los sistemas con modelos de cultivos de tejido *in vitro* permitieron estudiar la relación de la apirasa con los procesos de división y diferenciación celular en forma separada. Es necesario señalar que la apirasa presente en microtubérculos tiene una masa molecular más pequeña que la correspondiente a una apirasa aislada de tubérculos maduros cultivados *in vivo*. Esta enzima podría, además, tener una función más general en la célula vegetal, como es la producción y reincorporación de adenosina a la célula de papa. Se descartó una participación de la apirasa en el proceso de división celular porque no se inmunodetectó en callos ni en suspensiones celulares indiferenciadas en presencia de 2,4-D. Sin embargo, con el tratamiento de inductores de la

tuberización se inmunodetectó la aparición de la enzima, lo cual podría indicar que se ha detectado un cambio bioquímico relacionado con la diferenciación celular, porque durante la incubación con inductores no hay división celular. Estos resultados han sugerido que la apirasa podría estar relacionada con uno de los primeros eventos de diferenciación que ocurren al desencadenarse la tuberización, como es la suberización de la pared secundaria y la concomitante síntesis de almidón.

Por lo tanto, podría concluirse que la apirasa no estaría participando en la biosíntesis de la pared primaria durante la división celular, pero sí podría estar cumpliendo una función importante en el proceso de generación de la pared secundaria y en la acumulación de almidón durante la diferenciación celular en el inicio de la tuberización.

ABSTRACT

It has been established in this thesis that ATP-diphosphohydrolase or apyrase (EC 3.6.1.5) is a soluble enzyme. During *Solanum tuberosum* var Desirée tuber development, this enzymatic activity is highly regulated. The physiological role of apyrase might be related to the cellular differentiation process that characterizes the initial stage of tuberization and, for this reason, it could be considered as a possible biochemical marker of this process.

Maximum apyrase activity was found at the 49th day of tuber development, when the observable tuberization begins. This increase in activity is due to a mass increase as shown by enzyme quantification during potato development.

Apyrase activity is also kinetically regulated by two modulator proteins being one an activating protein and the other an inhibitory protein. Several purification steps, through: exclusion, ionic exchange and affinity chromatography, were attempted for these proteins. The only one that could be obtained as an homogeneous protein was the inhibitory protein. The activating protein was very unstable when purified because of its low protein concentration. Partial analysis of these modulator proteins, show the following characteristics:

1) Both proteins, as well as for apyrase, were found in the soluble fraction after subcellular fractionation.

2) These proteins are heat stable because they can be heated at 100°C for 5 min without loss of activity; this high stability has been used in the purification procedure.

3) The activating effect upon apyrase is dependent on the protein concentration in the assay medium. It can be suppressed by PMSF, which would suggest: a) the participation of hydroxylic amino acid residues in the apyrase-activating protein interaction or b) the activation effect could be related to partial proteolysis of apyrase.

4) Apyrase activation is almost constant during tuber development, and is initiated along with the appearance of apyrase activity.

5) The activating protein increases V_{max} but has no effect on the apyrase substrate affinity, because no modification of K_m value is detected.

6) These modulator proteins have different molecular mass: the activating protein has 15,0 kDa (measured by gel filtration) and the inhibitory protein has 58,0 kDa (determined by gel filtration and SDS-PAGE).

7) The activating protein isoelectric point is 9,0, determined by isoelectrofocusing. This basic isoelectric point might favour the interaction with apyrase which is a more acidic protein.

Apyrase localization at the tissular and intracellular

level showed that this enzyme is located in the stolon subapical regions and in the young tuber peridermis and cambial zones. Inside the cell, apyrase is mainly distributed in cell walls with a small proportion localized in the cytoplasm. No apyrase was found bound to membranes. These facts indicate that the role of apyrase may be related to glycoprotein biosynthesis and to the suberization process of the secondary wall, and not to dolychol-PP hydrolysis produced in polysaccharide and glycoprotein biosynthesis in the primary wall.

Model systems of *in vitro* tissue cultures allowed the separate study of the cellular division and differentiation processes. It is important to point out that the molecular mass of apyrase is smaller than that of apyrase isolated from mature tubers, cultured *in vivo*. This last enzyme might also have a more general function in the plant cell such as adenosine production and reincorporation to the potato cell. Apyrase participation in the cellular division process was ruled out because this enzyme was neither immunodetected in callus nor in undifferentiated cellular suspensions produced by addition of 2,4-D. However, apyrase was immunodetected during the treatment with inducers of tuberization, which should indicate a biochemical change related to cellular differentiation, because no cellular division occurs during treatment with these inducers. These results suggest that apyrase could be involved in one of the first events of tissue

differentiation that occur at the beginning of tuberization, such as secondary wall suberization and concomitant starch biosynthesis.

It could thus be concluded that apyrase might not be involved in primary wall biosynthesis during cellular division, but could be playing a predominant role in the secondary wall generating process, and could also participate in starch accumulation during cellular differentiation at the beginning of the tuberization process.

INTRODUCCION

El tubérculo de papa es el producto final del crecimiento y desarrollo de *Solanum tuberosum*, y también el producto inicial de una nueva planta, es decir, es el eslabón que liga vegetativamente a dos generaciones. Morfológicamente, el tubérculo de papa es un tallo subterráneo modificado que se ha diferenciado en un órgano de almacenamiento por una expansión radial y acumulación de almidón y de un determinado grupo de proteínas (Cutter, 1992). A pesar de su importancia económica los mecanismos moleculares que regulan la tuberización en *Solanum tuberosum* son casi desconocidos. Sin embargo, el rendimiento en la producción de tubérculos de buen tamaño y calidad a partir de una planta de *Solanum tuberosum* depende exclusivamente del período inicial de tuberización, es decir, del desarrollo de estolones, número de estolones que tuberizan y del crecimiento inicial de tubérculos jóvenes (Wurr, 1977; Ahmed y Sagar, 1981).

El ciclo de vida de una planta de papa se puede resumir en las siguientes etapas: 1) estado de reposo del tubérculo; 2) estado de dominancia apical; 3) estado de brotación múltiple; 4) formación de estolones; 5) tuberización de los estolones y 6) desarrollo vegetativo, floración y formación de frutos y semillas.

Durante su desarrollo fisiológico, el tubérculo de papa maduro, después de su cosecha, entra en un período de reposo o

dormancia en que no ocurre ningún crecimiento observable de los brotes. La duración de este período de reposo depende de: la variedad de papa, las condiciones previas de crecimiento, la temperatura de almacenamiento, daños en el tubérculo y del grado de madurez del tubérculo al ser cosechado (Rastovski y cols., 1981). Se inicia un nuevo ciclo cuando las yemas del tubérculo empiezan a crecer y a formar brotes. Frecuentemente, la yema apical empieza a brotar primero, marcando el comienzo del estado de dominancia apical; luego se desarrollan brotes adicionales y se inicia el estado de brotamiento múltiple, el que puede durar varios meses, según la variedad. Generalmente, éste es el estado óptimo para sembrar tubérculos-semillas. Una vez que los brotes han emergido sobre la superficie de la tierra, se producen en la base del brote principal, raíces adventicias y las yemas laterales empiezan a crecer formando tallos subterráneos, denominados estolones. Estos estolones se caracterizan por: un crecimiento diageotrópico con internudos alargados, un ápice en forma de gancho y por una disposición de vestigios de hojas distribuídas en espiral. La tuberización se produce en el ápice del estolón ya formado, específicamente en la región subapical (Rastovski y cols., 1981; Cutter, 1992).

Vreugdenhil y Struik (1989) han definido las siguientes etapas necesarias para la formación de tubérculos en una planta de papa:

a) inducción e iniciación del estolón y activación de

una yema axilar en la base del tallo; b) crecimiento del estolón (elongación y ramificación); c) cesación del crecimiento longitudinal del estolón; d) inducción e iniciación de la tuberización (producción y transporte del estímulo inductor de tuberización que resulta en un cambio en el metabolismo del ápice del estolón).

Factores que afectan la tuberización en S.tuberosum.

Cada una de las etapas recién mencionadas están controladas por factores tanto hormonales como ambientales que se describen brevemente a continuación. La formación de estolones es favorecida por la oscuridad y por una humedad relativa alta siendo este proceso independiente del fotoperíodo; por lo tanto, puede ocurrir antes que el tallo haya emergido a la superficie. Se ha descrito que en esta etapa la regulación hormonal está dada principalmente por un balance entre citocininas y giberelinas (Vreugdenhil y Struik, 1989; Cutter, 1992). Inicialmente, los niveles de giberelinas proporcionadas por el tubérculo madre son altos (Abdala de Bottini y Tizio, 1981), en cambio los niveles de citocininas son bajos por el poco desarrollo radicular y continúan disminuídos en la yema axilar debido a la dominancia apical del brote principal. Estas condiciones hormonales favorecen el crecimiento longitudinal del estolón y son inhibitoras de la tuberización. Un fotoperíodo equivalente a días cortos (noches

largas) produce una disminución en los niveles de giberelinas con la consecuente cesación del crecimiento longitudinal del estolón, a lo cual habría contribuido la posible síntesis de etileno en el ápice del estolón (Vreugdenhil y Struik, 1989). La disminución de giberelinas y etileno (Krauss, 1981; Lorenzen y Ewing, 1990; Pelacho y Mingo-Castel, 1991) y el aumento de los niveles de citocininas en el ápice del estolón durante un fotoperíodo corto, determinan el inicio de la tuberización (Palmer y Smith, 1970; Forsline y Langille, 1975; Mauk y Langille, 1978; Obata-Sasamoto y Suzuki, 1979; Hussey y Stacey, 1984; Jameson y cols., 1985). Además, se ha descrito un aumento en las concentraciones de auxinas previo a la iniciación visible de tuberización, manteniéndose una correlación positiva entre el contenido de auxinas y la velocidad de crecimiento del tubérculo (Obata-Sasamoto y Suzuki, 1979; Marschner y cols., 1984).

Otros factores ambientales que estimulan la tuberización son: a) una intensidad lumínica alta que permite un mayor desarrollo folial, lo cual conduce a un aumento en la fotosíntesis y a un mayor suministro de fotosintetatos (Engels y Marschner, 1986; Ewing, 1990); b) la baja temperatura que está muy relacionada al fotoperíodo (Ewing, 1981; Snyder y Ewing, 1989; Reynolds y Ewing, 1989) y c) un elevado cociente carbono/nitrógeno, dado por el uso de fertilizantes con bajos niveles de nitrógeno y una alta concentración de CO₂ en el terreno (Krauss y Marschner, 1982). Las diferentes variedades

de *S. tuberosum* tienen un distinto grado de sensibilidad a cada uno de los factores ambientales mencionados arriba (Ewing, 1990). Otro factor importante en la tuberización independiente del ambiente es la edad fisiológica del tubérculo madre (Ewing, 1990; Cutter, 1992).

Estímulo inductor de la tuberización.

El primer signo visible de tuberización es el hinchamiento de la región subapical del estolón producido por una expansión radial de las células por alargamiento celular seguido de una activa división celular (Duncan y Ewing, 1984). Desde hace más de 30 años se ha sugerido la participación de un estímulo específico de tuberización sintetizado en las hojas durante el período de días cortos. Koda y Okazawa (1988) aislaron, purificaron (Koda y cols., 1988) e identificaron (Koda y cols., 1991) un compuesto que denominaron ácido tuberónico (3-oxo-2-[5'-hidroxi-2'-*cis*-pentenil]-ciclopentano-1-ácido acético) cuya estructura está relacionada con el ácido jasmónico. Hay que destacar que tanto el ácido jasmónico y su éster metílico, también, tienen una potente actividad inductora de tuberización. Este compuesto producido en las hojas es transportado a las partes subterráneas de la planta de papa, siendo la inducción una condición más cuantitativa que cualitativa; es decir, hay una respuesta continuada a la tuberización durante los días cortos (Ewing, 1990).

La forma en que se expresa este estímulo en el estolón es desconocida, pero algunos antecedentes indicarían que depende de calcio y calmodulina (Balami y cols., 1986). Koda y cols. (1991) proponen que estos compuestos inductores de la tuberización podrían afectar la orientación de las microfibrillas de celulosa y consecuentemente inducirían a la expansión radial de las células lo cual desencadena la tuberización. Recientemente, se ha aislado y caracterizado por primera vez un gen que es inducido en las hojas de la planta de papa en el momento en que se induce la tuberización y los autores proponen que este gen estaría relacionado con la formación del estímulo de tuberización, es decir, con el ácido tubérico (Jackson y cols., 1993).

La tuberización a nivel molecular.

Este inicio del proceso de tuberización está estrechamente relacionado con una variedad de cambios bioquímicos, siendo los más relevantes la gran acumulación de almidón y la aparición de nuevas proteínas, los que dan cuenta de la diferenciación morfológica del estolón en tubérculo (órgano de almacenamiento). Por lo tanto, el tubérculo de papa es un sistema muy interesante que puede ser usado como modelo para estudiar los mecanismos moleculares de la diferenciación celular. Sin embargo, para estudiar la tuberización a nivel molecular se requiere reconocer bioquímicamente un tubérculo a

través de marcadores proteicos cuya expresión esté bajo estricto control del desarrollo de éste (Park, 1990).

Se han descrito cambios en el patrón de la expresión génica en las etapas iniciales de tuberización mediante el análisis de proteínas extraídas de los ápices de estolones y de los tubérculos en desarrollo (Park, 1983; Taylor y cols., 1991; Hendriks y cols., 1991; Hannapel, 1991). Además, los experimentos de traducción *in vitro* de RNA aislado de tubérculos en las mismas etapas de desarrollo de éstos apoyan la idea que en el inicio de la tuberización hay algunos cambios en la expresión génica (Hendriks y cols., 1991; Taylor y cols., 1991). Actualmente, se han aislado e identificado varios genes de una genoteca de cDNA construída a partir de poli(A⁺) RNA aislado de ápices de estolones y se ha encontrado que la expresión de estos genes aumenta dramáticamente durante las etapas iniciales de tuberización (Taylor y cols., 1992a,b).

El estudio de la tuberización a nivel molecular se ha concentrado en la expresión de algunas proteínas de almacenamiento como la patatina y las proteínas inhibidoras de proteasas, las cuales han sido consideradas como marcadores bioquímicos de la tuberización, debido a su abundancia y a su regulación durante el desarrollo del tubérculo (Rocha-Sosa y cols., 1989; Sánchez-Serrano y cols., 1986; Park, 1990; Willmitzer y cols., 1990). Otros genes cuya expresión está regulada por señales metabólicas y del desarrollo del

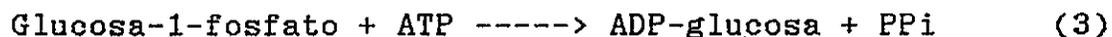
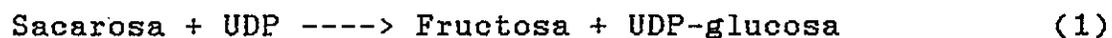
tubérculo al igual que la patatina son los que codifican:

a) para la sacarosa sintetasa (Salanoubat y Belliard, 1989);
b) para una familia de proteínas de 22 kDa (Suh y cols., 1990; Hannapel y cols., 1991); c) para isotipos de α -tubulina, los cuales tienen una función importante en la organización de los microtúbulos al desencadenarse la tuberización (Taylor y cols., 1991); d) para la S-adenosilmetionina descarboxilasa, la cual daría cuenta del aumento en los niveles de poliaminas en el ápice de los estolones (Taylor y cols., 1992a; Taylor y cols., 1993); e) para dos proteínas ribosomales (S19 y L7) (Taylor y cols., 1992b) y finalmente se ha encontrado un gen (*TUB8*) que por su composición podría codificar a una proteína estructural de la pared celular (Taylor y cols., 1992a).

Síntesis de almidón.

La síntesis y acumulación de almidón durante la tuberización es el proceso más significativo de la productividad total de la planta de papa. La regulación de la síntesis de almidón ha sido muy estudiada en tejidos fotosintéticos (Preiss, 1982, 1988) no así en órganos de almacenamiento no fotosintético. Existe una gran diferencia entre ambos tipos de tejido en relación al metabolismo del almidón. En los tejidos verdes es controlado estrictamente por regulación enzimática, en cambio en los tejidos no fotosintéticos la síntesis y degradación de almidón están

separadas temporalmente según las etapas del desarrollo de la planta. Durante la tuberización, el CO₂ asimilado fotosintéticamente y en forma de sacarosa es convertido en almidón en el tubérculo mediante las siguientes reacciones:



(1) sacarosa sintetasa; (2) UDP-glucosa pirofosforilasa; (3) ADP-glucosa pirofosforilasa y (4) almidón sintetasa.

En este proceso la ADP-glucosa pirofosforilasa está activada alostéricamente por ácido 3-fosfoglicérico e inhibida por Pi (Preiss, 1988; Anderson y cols., 1990). Müller-Röber y cols. (1992) han logrado suprimir la actividad de la ADP-glucosa pirofosforilasa en plantas de papas transgénicas en que se ha incorporado el gen para esta enzima en orientación inversa. En este caso, se observó que hubo tuberización pero sin síntesis de almidón, compensado por un aumento en el nivel de sacarosa. Un hecho interesante de destacar es que la inhibición de la síntesis de almidón afecta la expresión de las principales proteínas de almacenamiento del tubérculo. Los resultados obtenidos por Müller-Röber y cols. (1992) plantean una importante relación entre la acumulación de almidón y de proteínas en forma coordinada.

Por lo tanto, el proceso de tuberización puede ser

separado molecularmente en dos procesos que parecen ser regulados de manera diferente:

- 1) la proliferación celular que se caracteriza por una activa síntesis de pared celular y
- 2) una diferenciación celular en que las células de la papa adquieren la capacidad de sintetizar almidón y proteínas.

En este trabajo de tesis se propone que la ATP-difosfohidrolasa o apirasa participaría en estos dos eventos que caracterizan el inicio de la tuberización.

Apirasa o ATP-difosfohidrolasa (EC 3.6.1.5)

La apirasa es una enzima que cataliza específicamente la hidrólisis de enlaces pirofosfóricos de compuestos orgánicos e inorgánicos. Esta enzima posee muy baja especificidad para la parte orgánica del sustrato e hidroliza sólo enlaces pirofosfóricos de una serie de derivados di y trifosfatos, varios de ellos sintetizados en este laboratorio. En este estudio sobre especificidad enzimática, ésta se ha expresado en forma de eficiencia catalítica para las distintas porciones del sustrato (Del Campo y cols., 1977). La apirasa hidroliza en forma secuencial los fosforilos γ y β del ATP, lo cual se demostró usando ATP marcado en el fosforilo β (Traverso-Cori y cols., 1965) como también en el fosforilo γ (Traverso-Cori y Cori, 1962). La actividad apirásica se ha identificado a través del uso de ATP y ADP como sustratos.

Esta enzima tiene un requerimiento absoluto de metales bivalentes para su actividad, siendo el ión Ca^{+2} el que más activa a la enzima (Kettlun y cols., 1982; Valenzuela y cols., 1988). Se ha sugerido que el complejo nucleótido-ión metálico es el verdadero sustrato de la enzima ya que los valores de K_m y $V_{\text{máx}}$ para Ca^{+2} y ADP son iguales (Dixon y Webb, 1979; Valenzuela y cols., 1988).

La apirasa se encuentra ampliamente distribuída en la naturaleza y ha sido identificada en los siguientes tejidos vegetales: tubérculos de *S. tuberosum* (Kalckar, 1944; Krishnan, 1949a,b; Molnar y Lorand, 1961; Traverso-Cori y Cori, 1962; Traverso-Cori y cols., 1965; Traverso-Cori y cols., 1970; Jolliot y cols., 1976; Fakhraí y Hall, 1984); hojas de repollo (Mazelis, 1959); semillas de trébol (Sikka y Das, 1964); plúmulas de arvejas (Nishikawa, 1966); tallos de arvejas (Tognoli y Marré, 1981; Tognoli, 1984); raíces de garbanzos (Vara y Serrano, 1981) y en brotes de *S. tuberosum* (Anich, 1984; Anich y cols., 1990).

Esta enzima, además, ha sido encontrada en diferentes tejidos animales y se caracteriza principalmente por estar sólo unida a membranas como por ejemplo en: páncreas de cerdo (LeBel y cols., 1980); diversos tejidos normales y tumorales (Knowles y cols., 1983); túnica íntima de la aorta (Miura y cols., 1987); eritrocitos (Lüthje y cols., 1988); placenta de rata (Pieber y cols., 1991) y humana (Paparmarcaki y Tsolas, 1990; Kettlun y cols., 1993); útero, glándula salival y

mamaria de rata (Valenzuela y cols., 1989; Valenzuela y cols., 1992; Farrell y cols., 1992). Se ha encontrado una apirasa secretable presente en glándula salival y en saliva de algunos invertebrados como mosquitos (Ribeiro y García, 1980; Sarkis y cols., 1986); sanguijuela (Rigbi y cols., 1987) y en pulga (Ribeiro y cols., 1990).

En relación a microorganismos existe muy poca información de esta enzima, pero se ha descrito su presencia en el medio de cultivo de *Staphylococcus aureus* (Sugiyama y Dack, 1955), *Streptomyces aureofaciens* (Cúrdova y cols., 1982) y en trabajos efectuados en este laboratorio en *E. coli* (Alegria, 1988).

Este laboratorio inició la investigación en apirasas del tubérculo de *S. tuberosum* desde hace más de tres décadas y su propósito ha sido conocer su mecanismo de acción y la función fisiológica en las células vegetales. Este grupo ha sido el pionero en la purificación y caracterización cinética y físico-química de varias isoenzimas de la apirasa en tres variedades de *S. tuberosum*: Desirée, Pimpernel y Ultimus (Valenzuela y cols., 1973; Kettlun y cols., 1982; Mancilla y cols., 1984; Mancilla y cols., 1987; Valenzuela y cols., 1988; Kettlun y cols., 1992a,b). Sin embargo, a pesar de toda la información acumulada su función en las células de papa es desconocida. Solamente, en algunos tejidos animales se ha demostrado que la apirasa participa en el control de la agregación plaquetaria debido a su actividad ADPásica (Rigbi y

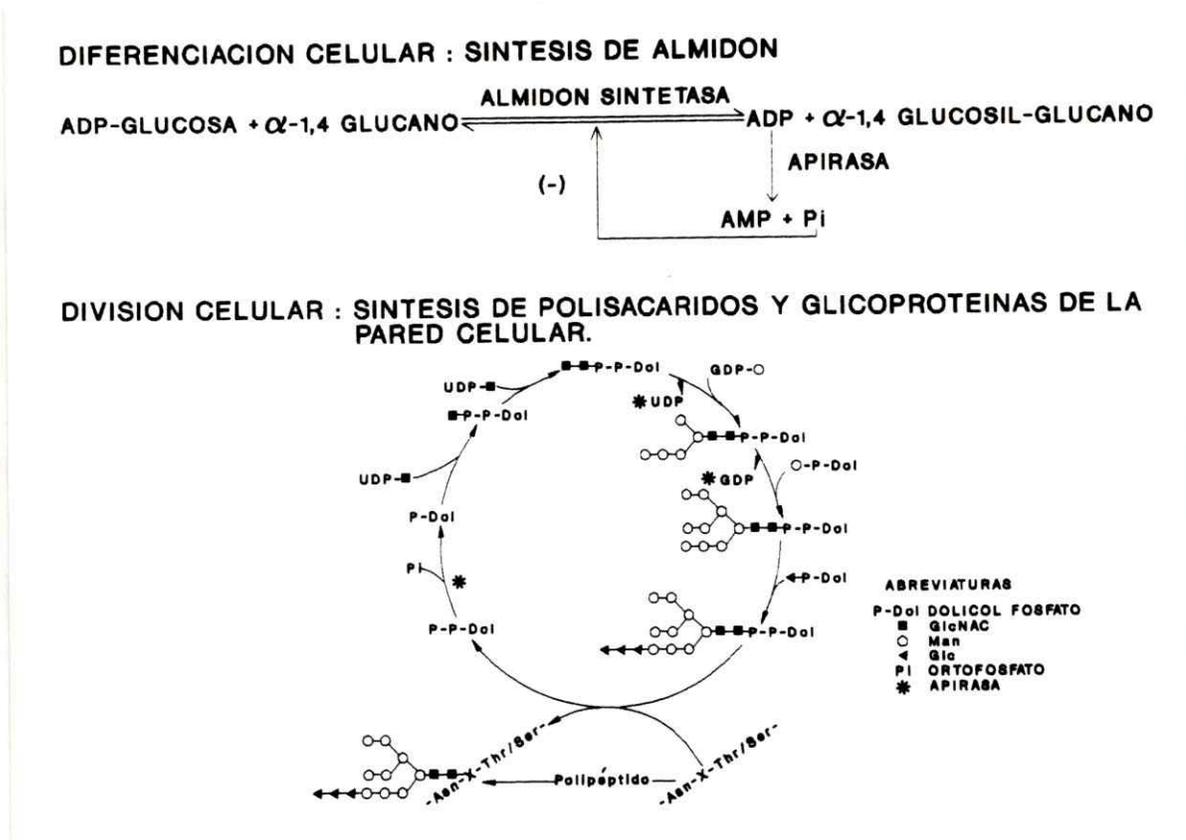
cols., 1987; Miura y cols., 1987; Lüthje y cols., 1988). Otra posible función que se le ha atribuido a la apirasa en tejidos animales es su participación en la vía de degradación de nucleótidos (ATPasa, ADPasa y 5'nucleotidasa) y la reincorporación de adenosina a la célula por su localización de ectoenzima (Yagi y cols., 1991).

El *Objetivo General* de esta tesis ha sido estudiar la posible función de la ATP-difosfohidrolasa o apirasa en la célula vegetal en relación con el fenómeno de inicio de la tuberización en el tubérculo de *S. tuberosum* var Desirée y de este modo evaluarla como un posible marcador bioquímico de este proceso.

Hipótesis de trabajo.

Se propone que la apirasa podría participar en alguno de los dos eventos que caracterizan el inicio de la tuberización: la división y la diferenciación celular a través de la regulación de los niveles de los nucleósidos difosfatos. Esta enzima podría estar relacionada con la hidrólisis de estos nucleósidos difosfatos que son generados en la biosíntesis de almidón y/o en la hidrólisis de intermediarios pirofosforilados en la biosíntesis de los constituyentes de la pared celular. Esta hipótesis se representa en la figura 1:

Figura 1. Representación de la hipótesis de trabajo sobre la función propuesta para la apirasa. Posibles sitios de acción de la apirasa en los procesos moleculares que caracterizan el inicio de la tuberización.



En la proposición I, la función de la apirasa en relación con la síntesis de almidón sería hidrolizar el ADP que se genera como producto de la reacción catalizada por la almidón sintetasa. La importancia de esta hidrólisis estaría en favorecer la síntesis de almidón por drenaje de este producto.

En la proposición II, la apirasa podría catalizar la hidrólisis de un intermediario lipídico pirofosforilado (dolicol-PP) para generar el dolicol-P que es esencial en la

incorporación de azúcares a oligosacáridos de glicoproteínas (Forsee y Elbein, 1975; Brett y Leloir, 1977; Riedell y Miernyk, 1988; Rip y cols., 1988). Además, podría hidrolizar los nucleósidos difosfato generados en este ciclo, haciendo de este modo irreversible la incorporación de los monómeros de los azúcares.

Antecedentes específicos.

El trabajo experimental de esta tesis se basó en los siguientes antecedentes específicos encontrados en esta línea de trabajo:

- Esta enzima cataliza solamente la hidrólisis de enlaces pirofosfóricos (Traverso-Cori y cols., 1965; Del Campo y cols., 1977).

- La actividad apirásica está modulada por dos proteínas reguladoras, una activadora y otra inhibidora (Mancilla y cols., 1987).

- La concentración de la enzima es considerable y representa entre un 2 a un 14% de las proteínas totales del tubérculo, dependiendo de la variedad de *S. tuberosum* (Fanta y cols., 1988; Del Villar, 1991; Kettlun, 1991).

- Se ha encontrado que la actividad específica de la apirasa varía durante el desarrollo del tubérculo (Fanta y cols., 1988; Anich y cols., 1990; Del Villar, 1991; Redlich, 1993).

Objetivos específicos.

Para abordar la estrategia experimental y obtener pruebas que apoyen o refuten la hipótesis de trabajo, se formularon tres preguntas fundamentales:

I. ¿Se encuentra regulada la actividad apirásica, en el proceso de tuberización desde sus inicios?

II. ¿Cuál es la localización y distribución de la apirasa durante el desarrollo del tubérculo y su relación con este proceso fisiológico?

III. ¿Es la participación de la apirasa determinante en el proceso de división y/o diferenciación celular?

Para contestar estas interrogantes se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Cuantificar la apirasa durante las etapas iniciales de la tuberización *in vivo*, para establecer si los cambios en la actividad de la enzima se deben a un aumento de la masa y/o a una estimulación cinética.

2. Purificar, cuantificar y caracterizar las proteínas moduladoras de la actividad apirásica y estudiar su relación con el proceso de tuberización.

3. Estudiar la distribución y localización de la apirasa tanto a nivel tisular como intracelular en el período inicial de tuberización.

4. Establecer un modelo de estudio de la división y diferenciación celular *in vitro* a través de suspensiones celulares.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES.

2.1.1. *Material Biológico.*

Los tubérculos de *Solanum tuberosum* var Desirée fueron cosechados entre los 41 y 160 días después de una siembra de verano y de invierno. Este material biológico fue gentilmente cedido por el Dr. Horacio López T. del Instituto de Investigaciones Agropecuarias "La Platina".

2.1.2. *Reactivos.*

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A) se obtuvieron los siguientes productos: ATP, ADP grado III, NADPH, NADH grado III, BSA, ovoalbúmina, antiIgG de conejo unida a peroxidasa, antiIgG de ratón unida a peroxidasa, proteína A-oro coloidal, estándares de masa molecular para electroforesis en geles con SDS y para filtración en gel, G-6-P-deshidrogenasa (EC 1.1.1.49.) tipo III de levadura de panadería, lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27) tipo IX de músculo de conejo, Trizma base, MES, PMSF, NaBH₄, 4-cloro-1-naftol, rojo de Ponceau, azul de Coomassie R, azul de Coomassie G-250, acrilamida, bis-acrilamida, SDS, papel de nitrocelulosa, anfolitos con rango de pH 3-10, coadyuvante de Freund completo e incompleto, oligomicina, ouabaína, CM-

celulosa, Sepharose 4B-200, Sephadex G-100, DEAE-Sephadex, octadecilsilica, Tween 20, Tritón X-100, CaCl₂, Na₂EDTA, 2,4D, ácido fólico, NAA y cinetina.

De Merck (Darmstadt, Alemania) se obtuvieron los siguientes productos de grado pro-análisis: ácido succínico, ácido tioglicólico, sulfato de amonio, β-alanina, glicina, sacarosa, cisteína, paraformaldehído, glutaraldehído, acetato de uranilo, PbNO₃, molibdato de amonio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, NaOH, NaCl, Na₂HPO₄, CaCl₂ x 2 H₂O, KCl, KH₂PO₄, KNO₃, CoCl₂, MgCl₂, MgSO₄ x 7 H₂O, CuSO₄ x 5 H₂O, ZnSO₄ x 7 H₂O, FeSO₄ x 7 H₂O, NH₄NO₃, H₂SO₄, HCl, ácido bórico, ácido acético glacial, ácido pícrico, TCA, benceno, butanol, etanol, metanol, xilol, peróxido de hidrógeno, mioinositol, ácido nicotínico, tiamina-HCl, piridoxal-HCl y biotina.

De Miles Laboratories (Indiana, U.S.A.) se adquirió: persulfato de amonio, TEMED, riboflavina y azul de bromofenol. De Carlo Erba, alcohol isobutílico y de Difco Laboratories (Detroit Michigan, U.S.A.), Casaminoácidos.

De Ted Pella se obtuvieron los siguientes productos: cacodilato de sodio, Araldita 502, DSA y DMP.

De Polysciences Inc. (Warrington PA) se adquirió el citrato de sodio y el tetróxido de osmio, grado microscopía electrónica.

De la Comisión Chilena de Energía Nuclear el ¹²⁵I.

2.2. Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas se determinaba por los siguientes métodos: a) absorbancia a 280 nm para el análisis de los eluidos de las columnas cromatográficas; b) método de Lowry y cols. (1951) para la determinación de proteínas de las fracciones moduladoras de la actividad apirásica; c) método turbidimétrico de Stadtman y cols. (1951) y d) método de Bradford (1976) para las diversas fracciones obtenidas del fraccionamiento subcelular, ya que con éstos dos últimos se evita la interferencia producida por la cisteína.

En todos los métodos mencionados se utilizaba seroalbúmina de bovino como estándar.

2.3. Preparación de anticuerpos policlonales monoespecíficos contra la apirasa.

2.3.1. Obtención en conejos.

Los tres conejos utilizados fueron hembras de raza neozelandesa. El antígeno correspondió a una apirasa var Desirée purificada según se ha descrito en Kettlun y cols. (1982). Esta apirasa homogénea se sometió a una SDS-PAGE (sección 2.8.1.), la banda correspondiente se cortó y se eluyó en PBS (Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 15 mM, NaCl 140 mM, KCl 3 mM, pH 7,2). En otros casos se realizó una SDS-PAGE y electrotransferencia a papel de nitrocelulosa, se identificó la banda de proteína con una tinción con rojo de Ponceau, se cortó el trozo de nitrocelulosa y se le pulverizó en PBS.

Se colectó el suero preinmune antes de efectuar inyecciones en múltiples sitios subcutáneos (regiones paramediales en la zona dorsal torácica supraescapular y región dorsal en la primera vértebra sacra). El protocolo de inmunización fue el siguiente: la primera inyección se realizó con 200 μg (o bien 100 μg del pulverizado de nitrocelulosa) de antígeno emulsionado con coadyuvante de Freund completo; la segunda y tercera inyección se efectuaron a los 7 y 24 días después de la primera inyección, empleando una emulsión del antígeno con coadyuvante de Freund incompleto; la última inyección de refuerzo se realizó a los 50 días en la región subcutánea intraperitoneal. Las sangrías se efectuaron a través de la vena marginal de la oreja a los 20, 30, 40 y 60 días. La sangre se incubó a 37°C por 4 h para formar un coágulo el cual fue removido y el suero obtenido se centrifugó dos veces a 10.000 x g por 20 min cada vez. Finalmente, los sueros fueron almacenados a -20°C.

2.3.2. Obtención en ratones.

Se utilizaron ocho ratones CF1, hembras. El antígeno correspondió a una apirasa homogénea proveniente de una columna de pseudoafinidad de azul de Cibacrón (Kettlun y cols., 1982). El suero preinmune fue colectado cinco días antes de la primera inyección de antígeno. Se administraron 5 μg de antígeno en cada ratón de acuerdo al siguiente esquema de inmunización: la primera inyección se efectuó en la región subcutánea de los

cojinetes plantares, con el antígeno emulsionado con coadyuvante de Freund completo; la segunda fue a los 7 días en la región subcutánea dorsal torácica con coadyuvante de Freund incompleto; la tercera se realizó, a los 14 días, con el antígeno diluido en suero fisiológico estéril, en la región subcutánea intraperitoneal; por último se dió un refuerzo a los 30 días con una inyección intravenosa del antígeno, diluido en suero fisiológico. A los sueros obtenidos se les determinó su título y su especificidad.

2.3.3. Determinación del título de los anticuerpos.

Para esta determinación se utilizó la metódica descrita por Catt y Tregear (1967). Se emplearon placas blandas Dynatech, las cuales se sensibilizaron con 50 μ L de una solución de 10 μ g/mL de antígeno (apirasa homogénea) diluido en amortiguador carbonato de sodio 100 mM, pH 9,6. Luego de incubar por 3 h a 4°C, la placa se lavó con PBS-Tween 20 al 0,05% y se bloqueó el resto de los sitios con PBS-BSA al 1%. Posteriormente se agregaron diluciones seriadas de suero preinmune e inmune en PBS-BSA al 1%; se incubó por 1,5 h a temperatura ambiente y se lavó con PBS-Tween 20 al 0,05%. El segundo anticuerpo fue un antiIgG de conejo o de ratón marcado con 125 I (obtenido en cabra) diluido en PBS-BSA al 1% de modo de lograr 100.000 cpm para cada pocillo. Después de incubar por 2 h a temperatura ambiente, se lavó exhaustivamente con PBS-Tween 20 al 0,05% (cuatro veces, 10 min) y la emisión gama se

cuantificó en un contador de centelleo Isodata serie 2020.

2.3.4. Determinación de la especificidad de los anticuerpos policlonales

La especificidad de los sueros inmunes se analizó a través de una SDS-PAGE e inmuno-electrotransferencia de las proteínas totales de homogeneizados de estolones hinchados, tubérculos en desarrollo y tubérculos maduros. La obtención de estos homogeneizados se describe en la sección 2.10.1.

2.4. Inmuno-electrotransferencia o "Western-blot".

Las proteínas previamente separadas por SDS-PAGE en geles planos fueron electrotransferidas a nitrocelulosa, de acuerdo al procedimiento descrito por Towbin y cols. (1979). El amortiguador de transferencia fue Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%. El gel se colocó hacia el cátodo y la membrana de nitrocelulosa hacia el ánodo, por 90 min a 80 mA. Posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomassie para verificar la efectividad de la transferencia.

La detección inmunoquímica de antígenos sobre el papel de nitrocelulosa fue realizada por la técnica descrita por Burnette (1981) con algunas modificaciones. El papel de nitrocelulosa se sumergió en TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM) por 10 min, se bloqueó con agitación suave durante 30 min en TBS-Molico (leche en polvo descremada con 35,2% de proteínas) al 5%. Se agregaron anticuerpos antiapirasa diluidos

1:1000 en TBS-Molico al 1% y se incubó por 2 h a temperatura ambiente con agitación suave, luego se lavó cuatro veces por 10 min con TBS-Tween20 al 0,05%. Posteriormente, el papel de nitrocelulosa se sumergió en la solución con el segundo anticuerpo (antiIgG de conejo o de ratón conjugado con peroxidasa) diluido 1:3000 en TBS-Molico al 1% y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación. En seguida se lavó exhaustivamente con TBS-Tween 20 al 0,05% y finalmente se desarrolló el complejo coloreado con una mezcla de metanol al 16,5% (v/v), 4-cloro-1-naftol al 0,05% (p/v) y H₂O₂ al 0,03% (v/v) en TBS. La reacción se detuvo con agua corriente de la llave.

2.5. Ensayo enzimático de la apirasa.

Las actividades ATPásica y ADPásica de la apirasa se ensayaban en un medio que contenía amortiguador succinato de sodio 100 mM, pH 6,0, CaCl₂ 5 mM y ATP o ADP 2 mM. La temperatura de incubación usada era de 30°C y el tiempo de reacción dependía de la actividad de la preparación a ensayar. La reacción se detenía agregando molibdato de amonio en medio ácido y el fosfato liberado (Pi) se determinaba utilizando los métodos de Fiske y SubbaRow (1925) o de Ernster y cols. (1950), según la sensibilidad requerida.

Se define una unidad de actividad apirásica (U) como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de Pi del sustrato (ATP o ADP) por minuto a 30°C. Así, la actividad específica se define

como los μ moles de Pi liberados del sustrato por minuto por milígramo de proteína.

2.6. Ensayo de las fracciones moduladoras (activadora e inhibidora) de la actividad apirásica.

Se preincubaba la apirasa homogénea con la fracción moduladora durante 5 min a 4°C, luego se tomaba una alícuota y se medía la actividad apirásica como se describe en la sección 2.5. Los controles se realizaban utilizando BSA a la misma concentración de proteínas de la fracción moduladora (Mancilla y cols., 1987).

2.7. Métodos de purificación de las proteínas moduladoras de la apirasa.

2.7.1. Preparación de una fracción moduladora parcialmente purificada: Fr-50.

Se preparaba una fracción semipurificada de las proteínas moduladoras a partir de estolones hinchados, de tubérculos en desarrollo, de papas maduras y de una fracción microsomal (P3) cuya descripción se encuentra en la sección 2.11.1.1. Se seguía la metodología descrita por Mancilla y cols. (1987). Cada gramo de tejido se homogeneizaba con 2,0 mL de amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8,0, TGA 5 mM, en un Potter Elvehjem o en una juguera convencional (a máxima velocidad por tres períodos de 30 seg), dependiendo de la cantidad de tejido. Este extracto se filtraba al vacío a través de una tela de

nylon y el filtrado obtenido se centrifugaba a 12.000 x *g* durante 10 min en una centrífuga Sorvall, a 4°C. Las proteínas del sobrenadante se precipitaban con sulfato de amonio hasta una saturación de un 50%, y se centrifugaba a 17.300 x *g* por 30 min a 4°C. Luego, el sedimento se resuspendía en 50 mL de amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8,0 y se calentaba a 100°C por 5 min. Después de un rápido enfriamiento, el material insoluble se separaba por centrifugación a 17.300 x *g* durante 30 min a 4°C. El sobrenadante fue concentrado por liofilización y resuspendido en un volumen mínimo de agua destilada. Para el posterior ensayo, esta fracción denominada Fr-50 era dializada contra NaCl 100 mM.

2.7.2. *Metódicas cromatográficas.*

La purificación de la Fr-50 se continuó con distintas separaciones cromatográficas: de exclusión, de intercambio iónico o de afinidad. El perfil de proteínas se siguió por la absorbancia a 280 nm y las actividades moduradoras por la medición del efecto sobre la actividad apirásica. El Pi liberado fue medido por el método de Ernster y cols. (1950).

2.7.2.1. *Cromatografía en Sephadex G-100.*

Una Fr-50 de 32 mg de proteínas totales y con una estimulación de la actividad ATPásica de un 45% y de la ADPásica de un 30% fue sometida a filtración en una columna de Sephadex G-100 (malla 40/120) de 2,2 cm de diámetro interior y

68 cm de largo. La columna fue equilibrada con 1,3 L de amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 8,0, NaCl 300 mM a 4°C. Se eluyó con un flujo de 6 mL/h y los eluidos seleccionados fueron concentrados por liofilización, resuspendidos en agua destilada, dializados contra NaCl 100 mM y finalmente congelados a -20°C.

2.7.2.2. Cromatografía en DEAE-Sephadex.

Una columna de DEAE-Sephadex de 1,4 cm de diámetro interior y 49 cm de largo se equilibró con amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 8,0. Una alícuota de una Fr-50 que contenía 23,8 mg de proteínas totales y que estimulaba en un 50% la actividad ATPásica y en un 30% la ADPásica se diluyó 1:5 en agua destilada antes de colocarla en la columna. El lavado de ésta se realizó con el mismo amortiguador de equilibrio hasta que la absorbancia a 280 nm bajara a cero. La elución se efectuó con una gradiente lineal de 0 a 1,0 M de NaCl en amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y un flujo de 6 mL/h. Las fracciones moduladoras de la apirasa se concentraron por liofilización, se dializaron contra NaCl 100 mM, y se congelaron a -20°C.

2.7.2.3. Cromatografía en trifluoperazina-Sepharose.

Preparación de trifluoperazina-Sepharose.

La trifluoperazina se acopló a la Sepharose por el método del bisoxirano (Sundberg y Porath, 1974), según la secuencia descrita por Charbonneau y Cormier (1979). La

Sepharose 4B-200 se lavó con agua destilada y se secó al vacío. Se tomaron 45 g de la Sepharose seca y se procedió a activarla con una mezcla de 45 mL de NaOH 0,6 N y 135 mg de NaBH₄ a la que se le adicionaron 45 mL de bisoxirano (éter 1,4-butanodiol diglicídico). Este proceso de activación se realizó agitando lentamente durante 8 h a temperatura ambiente. La etapa del acoplamiento consistió en mezclar la Sepharose activada, previamente lavada con 3 L de agua destilada, con 72 mL de amortiguador Na₂CO₃ 100mM pH 11,0 y 181,1 mg de trifluoperazina. Este acoplamiento se realizó calentando por 48 h a 70°C, con agitación lenta. Durante el proceso de acoplamiento, la Sepharose se mantuvo cubierta con un papel de aluminio por la fotosensibilidad de la trifluoperazina. Finalmente, se lavó con 500 mL de acetona, 500 mL de etanol y 500 mL de agua destilada. Se guardó a 4°C resuspendida en agua destilada.

Columna cromatográfica de trifluoperazina-Sepharose.

Una alícuota de Fr-50 se dializó contra el amortiguador de equilibrio de la columna de afinidad (Tris-HCl 10 mM pH 7,0, CaCl₂ 0,5 mM). La Fr-50 dializada tenía 112,8 mg de proteínas y una estimulación de la actividad apirásica de un 50% para la ATPasa y un 75% para la ADPasa. La columna de TFP-Sepharose de 1,5 x 27,0 cm fue equilibrada con el amortiguador mencionado y se lavó hasta obtener una absorbancia menor que 0,005 a 280 nm. Luego, se eluyó con la adición de NaCl 500 mM al amortiguador

de equilibrio hasta que la absorbancia a 280 nm fuera nula. Las fracciones con actividad moduladora se pusieron dentro de un tubo de diálisis que se colocó dentro de Sephadex G-25 seco a 4°C. Las fracciones moduladoras concentradas se guardaron a -20°C.

2.7.2.4. Cromatografía en CM-celulosa-apirasa.

Preparación de CM-celulosa-apirasa.

La unión de la apirasa a CM-celulosa se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Weliky y cols. (1969), modificada en esta tesis, como se describe a continuación: 3 g de CM-celulosa en agua destilada se activó con 0,6 g de DCCD en 1,5 mL de tetrahidrofurano y 3 mL de agua destilada formando una emulsión que se agitó lentamente durante 24 h a 4°C. Luego, se lavó exhaustivamente para eliminar el exceso de DCCD repitiendo dos veces el lavado con 200 mL de agua destilada y 300 mL etanol al 10% alternativamente para finalizar con 200 mL de agua destilada. La etapa de acoplamiento de la proteína consistió en mezclar la CM-celulosa activada con 3,8 mg/mL de apirasa homogénea. Se incubó con agitación lenta a 4°C durante 3 días y finalmente, se lavó exhaustivamente con agua destilada. La resina CM-celulosa-apirasa fue capaz de hidrolizar ATP y ADP.

Columna cromatográfica de CM-celulosa-apirasa.

Se empleó una columna de propileno de 1,6 x 5,5 cm

equilibrada con 150 mL de amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Se colocó una alícuota de Fr-50 cuya cantidad de proteínas y porcentaje de estimulación de la actividad apirásica se indica en Resultados. La columna se lavó con el amortiguador de equilibrio hasta que la absorbancia a 280 nm llegó a cero, y se eluyó con la adición de NaCl 500 mM a este amortiguador. Las fracciones con actividad moduladora se concentraron por liofilización y se dializaron contra NaCl 100 mM.

2.7.2.5. Cromatografía en octadecil sílica-apirasa.

Preparación de octadecil sílica-apirasa.

Para el acoplamiento de apirasa homogénea a octadecil sílica se utilizó la metodología descrita por Chiong y cols. (1991). Esta adsorción consistió en resuspender la octadecil sílica en metanol y luego el agregado de apirasa se efectuó en forma rápida agitando esta mezcla con un vortex. Se incubó toda la noche a 4°C con agitación lenta y rotatoria. La SiCl₈-apirasa se separó por centrifugación, se lavó varias veces con TBS hasta que no se detectó actividad apirásica en el sobrenadante. La SiCl₈-apirasa hidrolizó tanto el ATP como el ADP.

Columna cromatográfica de octadecil sílica-apirasa.

Se preparó una columna pequeña de 200 µL y se equilibró con amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7,0. Se colocó 250 µL de una Fr-50, equivalentes a 0,625 mg de proteínas totales y se lavó

con el amortiguador de equilibrio hasta que no se detectó proteína en los eluidos. Finalmente, la elución se efectuó con el mismo amortiguador en presencia de NaCl 500 mM.

2.8. Determinación del estado de pureza de las proteínas moduladoras de la apirasa.

El control del estado de pureza de las distintas fracciones proteicas se siguió por electroforesis en presencia de SDS y electroforesis a pH ácido. La cantidad de proteínas que se colocó en cada caso se indica en Resultados.

2.8.1. Electroforesis en geles en placa de poliacrilamida en presencia de SDS.

La electroforesis en condiciones desnaturantes se realizó usando los amortiguadores descritos por Laemmli (1970) y fue modificada para minigeles de poliacrilamida al 11% para ser utilizada en placas de 6 x 10 cm y 0,4 mm de espesor. La electroforesis se realizó a 20 mA inicialmente hasta que el colorante atravesó el gel concentrador y luego a 40 mA hasta que llegó al límite inferior del gel separador. Se usó una fuente de poder BioRad 160/116. Las bandas de proteínas ya separadas se tiñeron a 60-70°C durante 15 min con una mezcla de TCA al 10%, isopropanol al 25% y azul de Coomassie al 0,1%. El desteñido se realizó también a 60-70°C por 60 min en ácido acético al 10%.

2.8.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 4,5.

La electroforesis en condiciones no desnaturalantes se realizó de acuerdo con la técnica de Reisfield y cols. (1962). Los geles de poliacrilamida se prepararon en tubos de vidrio de 0,6 cm de diámetro interno y 10 cm de largo. La electroforesis se realizó a 8°C aplicando una corriente de 2 mA por tubo, hasta que la pironina B llegó al fondo del tubo del gel. Los geles se tiñeron y destiñeron de acuerdo a Weber y Osborn (1969).

Para la detección de la proteínas moduladora en los geles, éstos se cortaron transversalmente en segmentos de 2 mm de espesor y se extrajeron con 0,5 mL de NaCl 200 mM por 18 h. El ensayo se efectuó como se describe en la sección 2.6. y se determinó el Pi liberado por el método de Ernster y cols. (1950).

2.9. Caracterización de las proteínas moduladoras de la apirasa.

2.9.1. Efecto del PMSF sobre la Fr-50.

Se preparó una Fr-50 de papas var Desirée y var Ultimus en ausencia de PMSF. En el medio de ensayo para la activación se agregó PMSF 0,1 mM y se preincubó por 5 min en hielo, posteriormente se ensayó la actividad apirásica como se describe en la sección 2.6.

2.9.2. Efecto de la proteína activadora sobre los parámetros cinéticos de la apirasa.

Los ensayos enzimáticos se realizaron según se describió en la sección 2.5. Cuando el sustrato variable fue ATP la concentración de éste varió entre 0,018 y 0,130 mM y cuando fue ADP varió entre 0,029 y 0,230 mM. El Pi liberado se midió por el método de Ernster y cols. (1950).

Para determinar los valores de K_m y V_m en presencia de la proteína activadora se utilizó una Fr-50 que tenía 1,0 mg/mL de proteínas con una estimulación de un 40% de la actividad ATPásica y de un 39% la ADPásica. Los valores de K_m y V_m en ausencia de la proteína activadora se establecieron en presencia de BSA 1,0 mg/mL.

2.9.3. Determinación de la masa molecular de la proteína activadora por cromatografía de exclusión.

Una columna de Sephacryl S-200 de 1,0 x 30 cm se equilibró con 250 mL de amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7,0, $CaCl_2$ 5 mM, NaCl 200 mM a temperatura ambiente. La columna se calibró con 1,0 mg (100 μ L) de las siguientes proteínas estándares: γ -globulina (150,0 kDa), seroalbúmina (67,0 kDa), ovoalbúmina (45,0 kDa), mioglobina (17,0 kDa) y citocromo c (12,5 kDa). Se aplicó una alícuota de 100 μ L de la Fr-50 (previamente concentrada por Sephadex G-25) equivalentes a 1,5 mg de proteínas totales. La proteína activadora se detectó en el eluido de la columna por su capacidad de estimular la

actividad apirásica (sección 2.6) y las proteínas estándares por sus respectivas absorbancias a 280 nm. La masa molecular se calculó por el método de Andrews (1964).

2.9.4. Determinación de masa molecular de la proteína inhibidora.

La masa molecular de la proteína inhibidora se estableció a través de una electroforesis en geles en placa de poliacrilamida en presencia de SDS según se describe en la sección 2.8.1. Se aplicó una alícuota de 10 μ L correspondiente a 2,6 μ g de proteína inhibidora proveniente de una columna de SiCl₄-apirasa en un alto grado de pureza.

2.9.5. Determinación del punto isoelectrico de la proteína activadora.

2.9.5.1. Electroenfoque en geles cilindricos de poliacrilamida.

Los geles para electroenfoque fueron preparados de acuerdo a la técnica descrita por Pearce y cols. (1972). Los anfolitos usados fueron de rangos de pH entre 3,0 y 10,0 y los geles se prepararon en tubos de vidrio de 0,6 cm de diámetro interno y de 10 cm de largo. Antes de la polimerización del gel de poliacrilamida se colocaron entre 64 μ g y 325 μ g de proteínas de una Fr-50 (concentrada por Sephadex G-25 y posteriormente dializada contra NaCl 100 mM) de manera que quedó homogéneamente distribuída a lo largo de todo el gel. En el reservorio superior de la cámara se puso una solución de

NaOH 20 mM (cátodo) y en el inferior H_2SO_4 al 0,2% (v/v) (ánodo) para obtener mayor linealidad en los perfiles de pH en la zona entre pH 7,0 y 10,0. El electroenfoque se realizó aproximadamente a 10°C , obtenida por flujo de agua corriente. Después se aplicó un voltaje constante de 300 V demorándose alrededor de 100 min en alcanzarse una corriente baja y constante (entre 1-2 mA).

Terminado el proceso de electroenfoque se midió el pH de los geles cada 0,5 cm por medio de un electrodo de superficie Broadley-James Corp. (U.S.A.). La tinción de proteínas se realizó según Winter y Anderson (1977). Primero los geles se fijaron en ácido sulfosalicílico al 3,46% y TCA al 11,5% (v/v) por 18 h. Luego se deshidrataron en etanol al 25% (v/v) y ácido acético al 8% (v/v) por 30 min y finalmente fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie R al 0,115% en etanol al 25% (v/v) y ácido acético al 8% (v/v) por 15 min a 60°C . El desteñido se efectuó también a 60°C en esta misma solución pero sin azul de Coomassie.

Para determinar el pI de la proteína activadora, los geles se cortaron transversalmente en segmentos de 2 mm de espesor, se dejaron eluyendo toda la noche en NaCl 200 mM y se midió el efecto de estimulación sobre la actividad apirásica. El Pi liberado se cuantificó por el método de Ernster y cols. (1950).

2.9.5.2. *Electroenfoque en geles planos de poliacrilamida.*

La composición del gel fue la misma que para los geles cilíndricos (Pearce y cols., 1972), excepto que se usó una mezcla de anfolitos de rango de pH entre 3,0 a 10,0 y de 7,0 a 9,0. En este caso se utilizaron dos portaobjetos de 2,5 x 7,5 cm y la mezcla se repartió en una delgada película. Se colocó una alícuota de la Fr-50 correspondiente a 100 y 160 µg de proteínas. Las soluciones del ánodo y cátodo fueron las mismas, es decir, H₂SO₄ al 0,2% y NaOH 20 mM, respectivamente. La conexión se realizó mediante tiras de papel filtro embebidas en las soluciones del cátodo y ánodo. Se utilizó 2 µL de una mezcla de citocromo c y mioglobina (de 10 mg/mL cada una) para saber cuando detener el electroenfoque.

Con el fin de detectar las proteínas moduladoras de la actividad apirásica se realizó una inmunoelectrotransferencia como se describió en la sección 2.4, pero con la siguiente modificación. Se incluyó una preincubación del papel de nitrocelulosa con apirasa homogénea (2,5 mg/ml) diluída 1:1000 en TBS, antes de incubar con el primer anticuerpo. Luego de esta incubación por cuatro horas a temperatura ambiente con agitación, la membrana se lavó tres veces con TBS-Tween 20 al 0,05% por 10 min cada vez. Posteriormente, se continuó con la metódica antes descrita (sección 2.4.).

2.10. Preparación de la apirasa de tubérculos de diferentes períodos de desarrollo.

2.10.1. Obtención del homogeneizado y extracción de apirasa.

Se rallaron los tubérculos de *S. tuberosum* de diferentes períodos de desarrollo y cada gramo se recibió en 2 mL de amortiguador de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, KCl 250 mM, MgCl₂ 5 mM, sacarosa 250 mM, PMSF 0,1 mM y cisteína 4 mM). La homogeneización se hizo en un Potter Elvehjem con émbolo de vidrio a 4°C y luego, cada homogeneizado se filtró a través de una tela de nylon. El filtrado es lo que se denominó homogeneizado (H).

2.10.2. Cuantificación inmunoquímica de apirasa en los homogeneizados. ("Inmunodot").

Se tomaron alícuotas de cada homogeneizado, obtenido como se describe en 2.10.1, correspondiente a los diferentes tiempos de crecimiento del tubérculo. Estos homogeneizados se centrifugaron a 1.000 x g por 10 min a 4°C en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B con el objeto de eliminar el almidón, y se les determinó proteínas por el método turbidimétrico (Statdman y cols., 1951) y por el método de Bradford (1976). Las muestras, centrifugadas a 1.000 x g en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B y sin centrifugar, se diluyeron a una concentración de proteínas de 50 µg/mL en PBS-BSA 10 µg/mL. Se aplicaron 50 µL de las soluciones (en triplicado) en cada pocillo de una cámara Bio-Dot (Bio-Rad Laboratories, Richmond,

California), y se incubó por 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente se siguió la metódica descrita por Hawkes y cols. (1982) como sigue: se bloqueó el resto de los sitios con PBS-BSA al 5% y se lavó con PBS-Tritón X-100 al 0,05%. Se incubó con anticuerpos antiapirasa diluïdos 1:3000 en PBS-BSA al 1% durante 2 h a 4°C. Después de lavar exhaustivamente (siete veces, 10 min) con PBS-Tritón X-100 al 0,05% y PBS-BSA al 1% se incubó con anticuerpos antiIgG de conejo obtenido de cabra marcado con ^{125}I y diluïdos en PBS-BSA al 1% de modo de tener 100.000 cpm en cada pocillo. La incubación se realizó durante 2 h a 4°C con agitación continua. Finalmente, la membrana de nitrocelulosa se lavó exhaustivamente y se cuantificó la marca en cada punto con un contador de centelleo gama Isodata 2020.

2.11. Localización de la apirasa.

2.11.1. Fraccionamiento subcelular.

2.11.1.1. Centrifugación diferencial.

El homogeneizado (H) se centrifugó a 1.000 x *g* durante 10 min en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B a 4°C. La pella (P1) resultante se sometió a un lavado con amortiguador MES 50 mM pH 6,0, cisteína 4 mM, NaCl 100 mM y se volvió a centrifugar a 1.000 x *g* durante 10 min. Posteriormente, el sobrenadante obtenido de estas centrifugaciones se centrifugó a 12.000 x *g* por 20 min. La pella (P2) resultante se resuspendió en el amortiguador descrito, se lavó y se volvió a centrifugar

a 12.000 x *g* por 20 min. Estos dos sobrenadantes obtenidos se juntaron y se centrifugaron a 100.000 x *g* durante 1 h en una centrífuga Beckman-Spinco de ángulo fijo. La pella (P3) siguió el mismo procedimiento de lavado que las pellas anteriores y al sobrenadante final se lo consideró como fracción soluble. En resumen, P1 corresponde a núcleos, almidón y restos celulares, P2 corresponde principalmente a mitocondrias, P3 a los microsomas y S corresponde a la fracción soluble.

2.11.1.2. Medición de enzimas marcadoras y actividad apirásica en las distintas fracciones obtenidas por centrifugación diferencial.

En cada fracción se midió la actividad apirásica (ATPásica y ADPásica) como se describe en la sección 2.5. El Pi liberado se midió por el método de Fiske y SubbaRow (1925). La actividad 5'-nucleotidásica y la de glucosa-6-fosfatasa se midieron según lo descrito por Beaufay y cols. (1974). Además se midió la actividad de succínico deshidrogenasa por la metódica de Bonner (1955) y la de láctico deshidrogenasa según el método descrito por Bergmeyer y cols. (1974). Las proteínas se midieron por el método de Bradford (1976).

2.11.1.3. Solubilización de la enzima microsomal.

A la pella de 100.000 x *g* (P3) se le agregó NaCl sólido hasta una concentración de 0,5, 1,0 y 2,0 M. Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se agitó esporádicamente con un

vórtex. La enzima solubilizada se separó por centrifugación en una ultracentrífuga Beckman-Spinco con rotor de ángulo fijo, a 100.000 x *g* durante una hora a 4°C. La pella remanente se resuspendió en amortiguador de extracción y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. Finalmente, se midió en la fracción solubilizada y en la pella remanente la actividad apirásica por el método de Ernster y cols. (1950).

2.11.2. *Inmunocitocalización.*

2.11.2.1. *Inmunocitocalización de apirasa por impresión de tejido.*

La inmunocitocalización de la apirasa por impresión de tejido en nitrocelulosa se realizó mediante la técnica descrita por Cassab y Varner (1987). Se sumergió el papel de nitrocelulosa en TBS durante 15 seg y se secó con aire caliente. Se presionó el trozo de tejido (cortes transversales y longitudinales de estolones y tubérculos en desarrollo) sobre el papel de nitrocelulosa durante 30 seg. A continuación, se procedió de la misma forma descrita anteriormente para la detección inmunoquímica de antígeno (sección 2.4.).

2.11.2.2. *Inmunocitocalización por microscopía de luz.*

Los estolones completos y trozos de tubérculos en desarrollo fueron fijados, deshidratados e incluidos para la microscopía de luz con inmunodetección de la apirasa. Los tejidos se fijaron por 24 h en una solución de Bouin: solución

acuosa saturada de ácido pícrico al 71% (v/v), formaldehído al 24% (v/v), ácido acético glacial al 4,8% (v/v). Luego, se lavaron con agua corriente durante 1 h y se sometieron a deshidratación de la siguiente manera: en etanol al 60% y 80% (15 min) ; en etanol al 96% (dos veces por 15 y 30 min) y finalmente, en etanol (dos veces, 60 min). Luego del proceso de deshidratación de los tejidos, se incubaron en una mezcla etanol/butanol (1:1 v/v) por 1 h y posteriormente en butanol durante 2 h. La inclusión en "paraplast" se realizó primero a 60°C en butanol/"paraplast" (1:1) por 1 h y luego en "paraplast" puro. Los tejidos incluidos en "paraplast" se cortaron en secciones de 7 a 10 μm con un micrótopo Leitz Wetzlar y se recibieron en agua caliente. Los cortes se montaron en portaobjetos tratados con albúmina y se incubaron a 60°C por 24 h.

Para realizar la inmunocitoquímica fue necesario eliminar la parafina de los cortes mediante incubaciones seriadas en xilol (2 veces, 5 min), etanol (2 veces, 5 min), metanol/H₂O₂ al 30% (45:5 v/v) (20 min a 4°C), etanol al 96%, 80% y 60% (5 min) y por último un lavado con agua destilada por 5 min. La innumodetección se realizó según se describe en la sección 2.4 con las siguientes modificaciones: los cortes se incubaron tres veces en TBS por 10 min antes de bloquear con TBS-Molico al 5% durante 3 h. El primer anticuerpo (suero preinmune como control y suero inmune) fue diluído 1:50 y 1:100 en TBS-Molico 1% y se incubó por 18 h. Los lavados se

efectuaron con TBS-Tween 20 al 0,01% (cuatro veces, 10 min) y con TBS-Molico al 1% (dos veces, 10 min). Posteriormente, se incubó con anticuerpos antiIgG de conejo-peroxidasa diluidos 1:20 por 45 min y se lavó 3 veces por 10 min con amortiguador Tris 41 mM, KH_2PO_4 3,5 mM, Na_2HPO_4 10,6 mM, NaCl 120 mM, pH 7,5. Finalmente, se incubó en oscuridad con este amortiguador en presencia de DEAB 1 mg/mL y H_2O_2 al 0,1% durante 10 min y se lavó con agua destilada.

Para el análisis microscópico se realizó una deshidratación rápida mediante incubaciones seriadas en etanol al 60%, 80%, 96%, 100% y en xilol al 100%. Se utilizó un microscopio óptico Nikon (Optiphot). En algunos casos se efectuó una tinción de fondo con hematoxilina de Harris (Mallory, 1938).

2.11.2.3. Inmunocitlocalización por microscopía electrónica.

Se utilizó el siguiente material biológico: estolones de 47 y 53 días y tubérculos jóvenes de 60 y 74 días. En estos últimos se separó la peridermis, la zona cambial y la región perimedular. Los diferentes tejidos se cortaron en secciones de 0,5 a 1 mm y fueron fijados con una mezcla de glutaraldehído al 2,5% (v/v) y paraformaldehído al 2,0% (v/v) en amortiguador cacodilato de sodio 200 mM, pH 7,2 durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron tres veces por 5 min con este mismo amortiguador y fueron postfijados con tetróxido de osmio al 0,25% durante 1 h con agitación rotatoria. Luego, se

lavaron tres veces por 15 min con agua destilada y se sometieron a deshidratación en una serie gradual de etanol y acetona como sigue: en etanol al 50%, 70% y 95% (15 min); en etanol al 100% (4 veces 20 min) y en acetona anhidra (2 veces 20 min). La inclusión de los tejidos se inició con una incubación en una mezcla de Araldita (Araldita 502 al 52,3% v/v, DDSA al 46,5% v/v y DMP al 1,2% v/v)/acetona anhidra (1:1 v/v) durante toda la noche a temperatura ambiente y con agitación rotatoria y finalmente en Araldita a 60°C por 18 h.

Para identificar las zonas del tejido incluido se efectuaron cortes semifinos con un ultramicrotomo Ultrame LKB y se tiñeron con azul de Toluidina al 1% en borato de sodio al 1%. Una vez realizado este análisis, se efectuaron cortes ultrafinos de 1-2 μ m los cuales fueron recibidos en grillas de níquel de 200 mesh para la inmunocitoquímica. Los cortes de tejido se trataron con TBS-ovoalbúmina al 5% por 1 h y se incubaron con el suero preinmune como control y con los anticuerpos antiapirasa diluïdos 1:1000, 1:500, 1:100 y 1:50 en TBS-ovoalbúmina al 1% durante 18 h a temperatura ambiente. Para la inmunodetección, las grillas previamente lavadas con TBS-Tween 20 al 0,01% se incubaron con proteína A-oro coloidal diluída 1:50 en TBS-ovoalbúmina al 1%. Después de incubar por 2 h, las grillas fueron lavadas cuatro veces con TBS y con agua bidestilada, desionizada y estéril, y se tiñeron posteriormente con acetato de uranilo al 4% (p/v) en metanol y citrato de plomo (Reynolds, 1963). Las microfotografías fueron obtenidas

en un microscopio electrónico Phillips EM 300 usando 20 μ de abertura.

2.12. Modelos de estudio "in vitro".

2.12.1. Cultivo de tejido "in vitro" (callos).

Se cultivaron explantes del ápice caulinar aéreo etiolado de tubérculos de *S. tuberosum* var Desirée brotados en la oscuridad (Anich, 1984). Estos ápices caulinares fueron previamente esterilizados en una solución fungicida de Thiram 50% durante 30 min; luego de colocarlos por 1,5 min en hipoclorito de sodio 0,5 M, se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Se colocaron 2 a 3 ápices en frascos que contenían 10 mL de medio de cultivo y un papel filtro para sustentar el tejido vegetal previamente esterilizado. El medio nutritivo basal consistió en la mezcla de macro y microelementos descrito por Murashige y Skoog (1962) al cual se agregó una serie de suplementos, como se muestra en la tabla 1. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,7 y se autoclavó por 15 min a 115°C bajo una presión de 1,5 atmósferas. Los cultivos crecieron en condiciones controladas: fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad; intensidad lumínica de 3000 Lux; humedad relativa entre un 20 a 40% y 25°C de temperatura.

El uso de un fotoperíodo dependió del tipo de tejido a cultivar, para favorecer la formación de un tejido indiferenciado (callo) los cultivos se mantuvieron en la oscuridad. En cambio, para estimular la formación de

Tabla 1. Composición del medio de cultivo de tejidos *in vitro*.

Compuesto	mg/L
NH ₄ NO ₃	1.650,00
KH ₂ PO ₄	170,00
MgSO ₄ 7H ₂ O	370,00
KNO ₃	1.900,00
MnSO ₄ 4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,60
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025
H ₃ BO ₃	6,20
KI	0,0075
CaCl ₂ 2H ₂ O	440,00
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,85
Na ₂ EDTA	37,30
m-Inositol	100,00
Acido nicotínico	0,50
Tiamina-HCl	0,50
Piridoxal-HCl	0,50
Glicina	2,00
Acido fólico	0,50
Biotina	0,05
Cinetina	0,20
2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)	3,00
Caseína hirolizado	1000,00
Sacarosa	25000,00
pH: 5,7	

microtubérculos se utilizó el fotoperíodo antes mencionado y además, se agregó sacarosa al 5% en ausencia de 2,4-D.

Los callos fueron repicados seis veces como máximo, cada 30 días, en el mismo medio de cultivo fresco. Las plantas de papa obtenidas *in vitro* se propagaron, cada 60 días, por trozos de tallo también en medio de cultivo fresco.

2.12.1.1. Determinación de la humedad en callos.

Con el objetivo de expresar los resultados del crecimiento de los callos a través del tiempo en forma independiente de los posibles cambios en el contenido de agua, se determinó el peso seco. Para realizar esta determinación, los callos se pesaron en una balanza analítica y se colocaron en una estufa a 105°C durante 72 h hasta alcanzar un peso constante.

2.12.2. Obtención de homogeneizados e identificación de la apirasa en las diferentes partes de la planta "in vitro"

Los diferentes tejidos vegetales (callo, raíces, tallo, hojas y microtubérculos) se homogeneizaron en un Potter-Elvehjem con el mismo amortiguador usado para el fraccionamiento subcelular descrito en la sección 2.10.1. Se tomó una alícuota de cada extracto equivalente a la misma concentración de proteínas en todos los casos, se efectuó un SDS-PAGE (sección 2.8.1.) para separar las proteínas y se identificó la apirasa mediante una inmunoelectrotransferencia.

2.12.3. Obtención de una suspensión celular.

Las suspensiones celulares para realizar los estudios de citodiferenciación se obtuvieron por disrupción mecánica de los callos. Los callos fueron disgregados en un mortero estéril, traspasados a matraces que contenían el medio de cultivo de la tabla 1, y mantenidos con agitación mecánica (60 rev/min) para favorecer la disgregación celular. Se utilizó un agitador orbital (Bio-Shaker BR-30L) de temperatura controlada para mantener el cultivo a 25°C. Los matraces se envolvieron en papel de aluminio para evitar el efecto de la luz en la diferenciación celular. Los cultivos fueron repicados dos veces a la semana durante dos meses.

Para obtener la sincronidad del cultivo se repicó tres o cuatro veces en total generando un cultivo relativamente homogéneo (comunicación personal del Dr. Armand Mouras, Laboratorio de Biología Vegetal, Universidad de Burdeos, Francia).

La viabilidad de la suspensión celular se midió por su capacidad de regenerar callos en una semana. Se tomó una alícuota de la suspensión y se colocó sobre un papel filtro en un frasco que contenía el medio descrito en la tabla 1.

2.12.3.1. Inducción de citodiferenciación in vitro en suspensiones celulares homogéneas.

Se emplearon tres condiciones descritas en la literatura como inductoras de tuberización en plantas de *S. tuberosum*:

1) cinetina 3,5 mg/L; 2) NAA 10 mg/L y 3) NAA 10 mg/L más BA 1,0 mg/L (Palmer y Smith, 1970; Ahmed y Sagar, 1981). Se usó el mismo medio descrito en la tabla 1 pero se reemplazó el 2,4-D por cada una de las condiciones recién mencionadas y además se aumentó la sacarosa a un 10%. El control correspondió a un cultivo que mantenía las condiciones de indiferenciación celular, es decir: 2,4-D 3,0 mg/L y 2,5% de sacarosa. Para los tres tratamientos de diferenciación se tomaron alícuotas de la suspensión celular de modo de tener aproximadamente 1×10^6 células/mL. Se centrifugaron a $12.000 \times g$ por 20 min en una centrífuga Sorvall RC-5B y se lavaron tres veces con medio de cultivo estéril sin hormonas. Luego, se traspasaron a matraces con los distintos medios de diferenciación y se cultivaron por 24 o 48 h en oscuridad a 25°C con una agitación de 60 rev/min. Una vez completado el tiempo de cultivo, las células fueron sedimentadas por centrifugación a $12.000 \times g$ por 20 min y lavadas tres veces con agua destilada estéril, para detener la reacción de diferenciación. Las pellas obtenidas se homogeneizaron en un Potter-Elvehjem con amortiguador Tris-HCl 125 mM pH 6,8, β -mercaptoetanol al 10%, glicerol al 20%, SDS al 5% y azul de bromofenol al 0,01% en una proporción de 1:4. Luego, se incubaron por 5 min a 100°C y las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE (sección 2.8.1.). La apirasa presente en estos extractos se inmunodetectó luego de realizar una electrotransferencia del gel SDS-PAGE (sección 2.4.). Este mismo procedimiento se efectuó con el cultivo control. Las

proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (1976) en
homogeneizados de células preparados según se describe en la
sección 2.10.1.

3. RESULTADOS.

3.1. *Obtención de anticuerpos policlonales monoespecíficos contra la apirasa.*

La preparación de anticuerpos con una alta especificidad hacia la apirasa y un buen título implicó desarrollar diferentes estrategias de inmunización en conejos y ratones. En primer lugar, el factor más importante en la producción de anticuerpos específicos es la pureza del antígeno; por lo tanto se utilizó una apirasa homogénea. El segundo factor es el estado de la proteína, es decir, si se encuentra en condiciones nativas o desnaturaladas. Los anticuerpos generados contra el antígeno desnaturalado son, generalmente, más efectivos cuando se utilizan en "immunoblots" o inmunoprecipitación después de una traducción *invitro* (Coligan y cols., 1991). En consecuencia, se utilizó una apirasa homogénea que después de la última etapa de purificación fue sometida a un SDS-PAGE y la banda correspondiente se inyectó a conejos. Estos anticuerpos fueron también capaces de reconocer a la apirasa en condiciones nativas, como es el caso de los experimentos de titulación de apirasa y de inmunolocalización.

Sin embargo, debido a que estos anticuerpos antiapirasa obtenidos en conejos perdieron su especificidad con el tiempo debido a desnaturalación por el proceso de congelamiento y descongelamiento, se procedió a inmunizar ratones. En este caso

se empleó una apirasa homogénea pero en condiciones nativas, es decir, correspondiente al eluido de la última etapa de purificación de la enzima. La figura 2 muestra la determinación del título del suero inmune obtenido en la sangría final de conejos y ratones. Se encontró que el título de los anticuerpos obtenidos en los ratones es superior al logrado en los conejos, 1:20.000 y 1:7.000, respectivamente.

Por otra parte, la especificidad de los anticuerpos que se obtiene de diferentes animales puede variar en el reconocimiento de los epítopes antigénicos dominantes en una proteína. Sin embargo, ambos sueros inmunes resultaron muy específicos respecto a la apirasa. Al realizar una inmunoelectrotransferencia de un gel SDS-PAGE en que se colocó una cantidad equivalente de proteínas correspondiente a homogeneizados preparados a partir de tejido de papa en diferentes estados de desarrollo, se pudo observar que los anticuerpos reaccionan sólo contra la apirasa presente en estos homogeneizados (resultados no mostrados).

La obtención de anticuerpos policlonales mono-específicos contra la apirasa fue de fundamental importancia para identificar, cuantificar y localizar esta enzima.

3.2. Regulación de la actividad apirásica durante el desarrollo del tubérculo de *S. tuberosum*.

El estado de desarrollo del tubérculo se consideró en función del número de días que transcurrieron desde la siembra

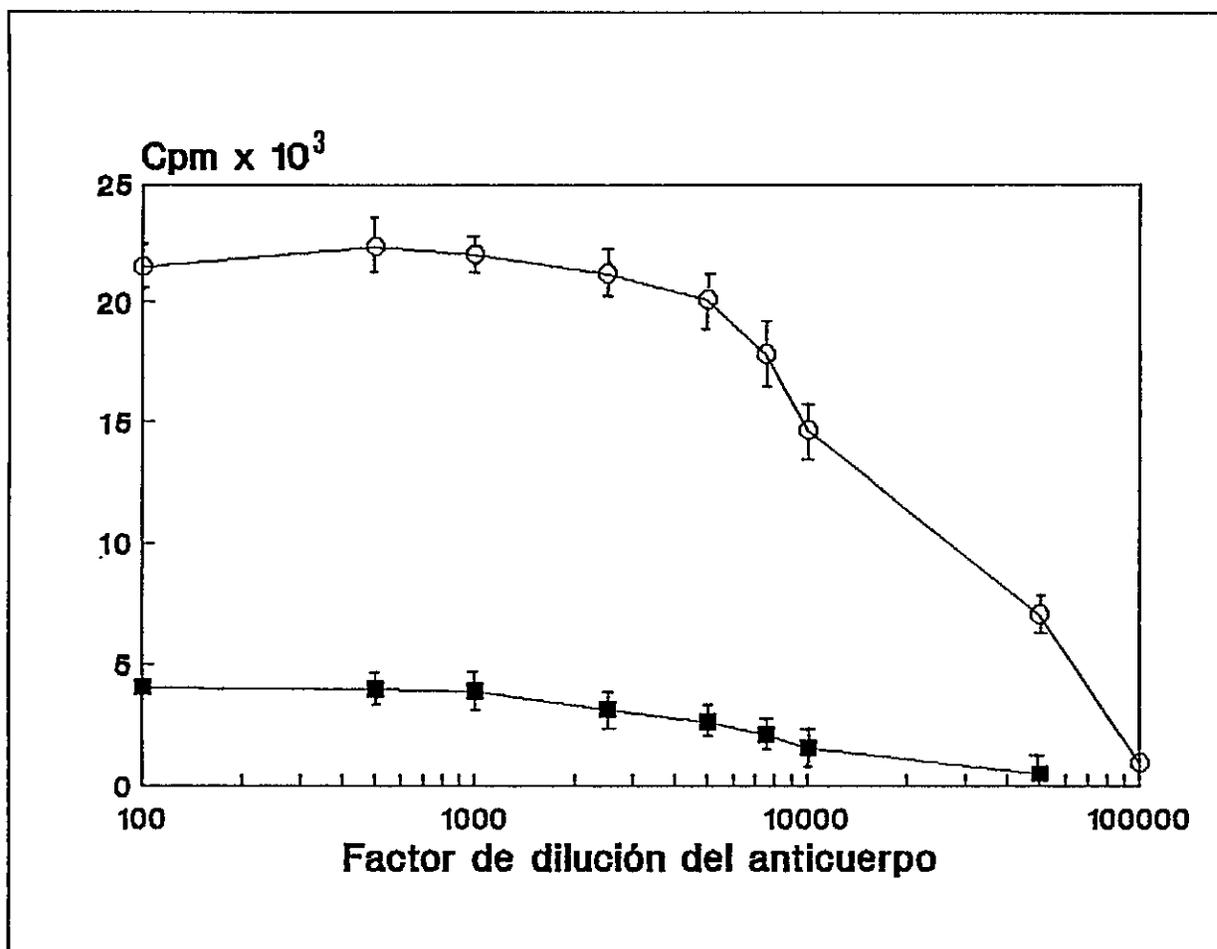


Figura 2. Determinación del título del anticuerpo policlonal contra la apirasa de papa var Désirée.

Alícuotas de 50 μ L de diluciones de suero inmune de ratón (○—○) o de conejo (■—■) inyectados con apirasa homogénea, se agregaron a una placa de PVC previamente sensibilizada con 50 μ L de apirasa (10 μ g/mL). Posteriormente se incubó con 100.000 cpm del anticuerpo policlonal de cabra antiIgG de conejo o de ratón radiomarcado con 125 I y se determinó la radioactividad en cada pocillo. Las determinaciones se realizaron en triplicado, obteniéndose una desviación estándar < 5%.

hasta la recolección de las matas. Se estudió un período comprendido entre los 41 y los 140 días de desarrollo tanto en siembras de verano como de invierno. Se determinó la concentración de proteínas totales, se cuantificó la actividad apirásica (ATPásica-ADPásica) y se midió el efecto de las proteínas moduladoras sobre la actividad apirásica durante las etapas iniciales de la tuberización. Además, se siguió la actividad apirásica y el contenido de proteínas totales en el tubérculo madre.

Dado que la población de papas de un determinado estado de desarrollo es heterogénea en tamaño (Wurr, 1977) (figura 3), se estandarizó la toma de muestras de la siguiente manera: estolones no hinchados e hinchados entre 1,0 - 1,5 mm de diámetro con 41 días de desarrollo; estolones hinchados de 2,0 - 4,0 mm de diámetro con 49 días; una mezcla de estolones hinchados y tubérculos jóvenes de 5,0 - 9,0 mm con 53 y 60 días de desarrollo; tubérculos jóvenes entre 1,0 - 2,5 cm de diámetro con 67 a 90 días y desde los 100 a 140 días de desarrollo se cosecharon tubérculos cuyo diámetro varió entre 3,0 y 6,0 cm. Los resultados se expresaron en peso húmedo, ya que se había demostrado que el contenido de agua es constante y por lo tanto, no afecta los parámetros determinados (Anich, 1984).

En la figura 4 se observa el contenido de proteínas totales durante el desarrollo del tubérculo en una siembra de verano. Se puede apreciar que hay una mayor concentración de

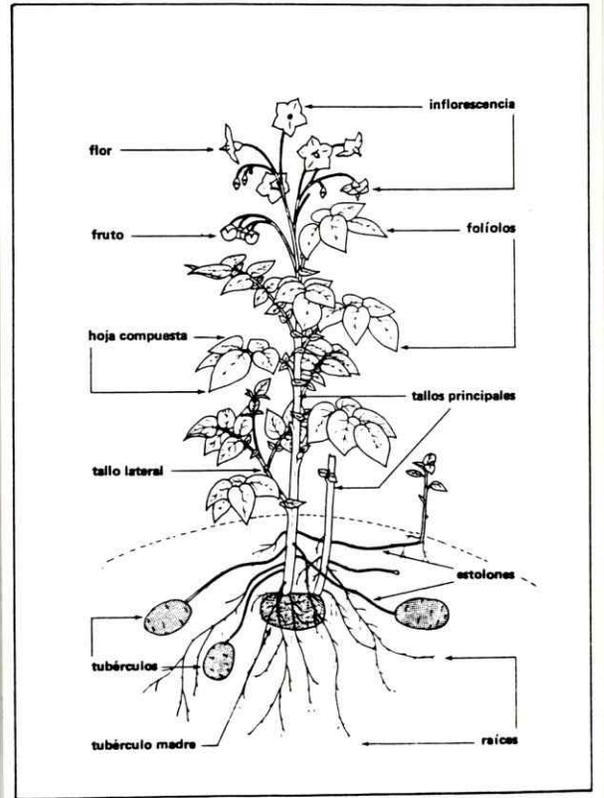


Figura 3. Morfología de la planta del *Solanum tuberosum*

proteínas (12,6 mg/g de tejido fresco) a los 41 días de desarrollo, luego disminuye y se mantiene relativamente constante en alrededor de 1,7 mg/g de tejido fresco hasta los 140 días (estado de madurez). En una siembra de invierno se observó esta misma tendencia la cual se repitió durante dos años consecutivos, observándose leves variaciones en los valores absolutos de las proteínas totales.

En la figura 5 se muestra la determinación de la actividad apirásica en U totales/g de tejido fresco y su cuantificación mediante titulación con anticuerpos antiapirasa durante el desarrollo del tubérculo. Se puede ver que existe un máximo de actividad enzimática a los 49 días de desarrollo, el cual es coincidente con una mayor cantidad de la enzima. La cuantificación de apirasa mediante "inmunodot" se efectuó en homogeneizados centrifugados a 1.000 x g por 10 min y, también, en homogeneizados sin centrifugar. De esta manera se evitó que la presencia de almidón en las muestras disminuyera la capacidad de unión de las proteínas a la placa de microtitulación. Ahora bien, en relación a las cpm asociadas a una solución de apirasa homogénea de 50 µg/mL se pudo calcular que la apirasa corresponde a un 8% de las proteínas totales en el período de mayor actividad enzimática (49 días después de la siembra). Es importante hacer notar que este máximo de actividad apirásica y la mayor masa de enzima se detectó en un período que corresponde visualmente a estolones hinchados, es decir, en el momento de inicio de la tuberización. Sin embargo,

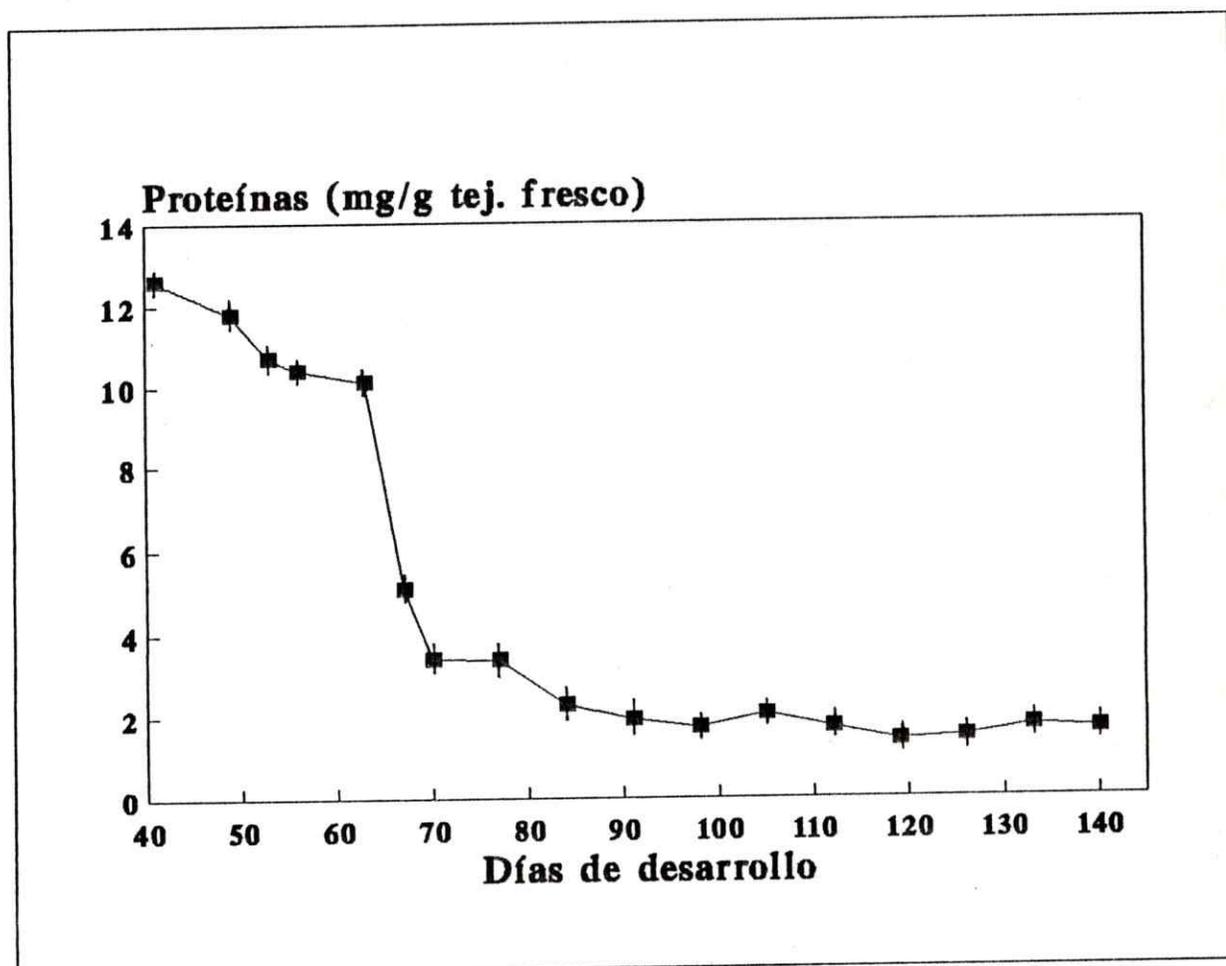


Figura 4. Determinación de las proteínas totales durante el desarrollo del tubérculo de papa.

La concentración de proteínas totales presentes en los homogeneizados obtenidos a partir de tubérculos en desarrollo desde los 41 hasta los 140 días después de una siembra de verano, se midió por el método de Bradford (1976). Se utilizó BSA como estándar. Los valores son el promedio de tres muestras procesadas independientemente en dos años consecutivos. La determinación de cada muestra fue realizada en triplicado.

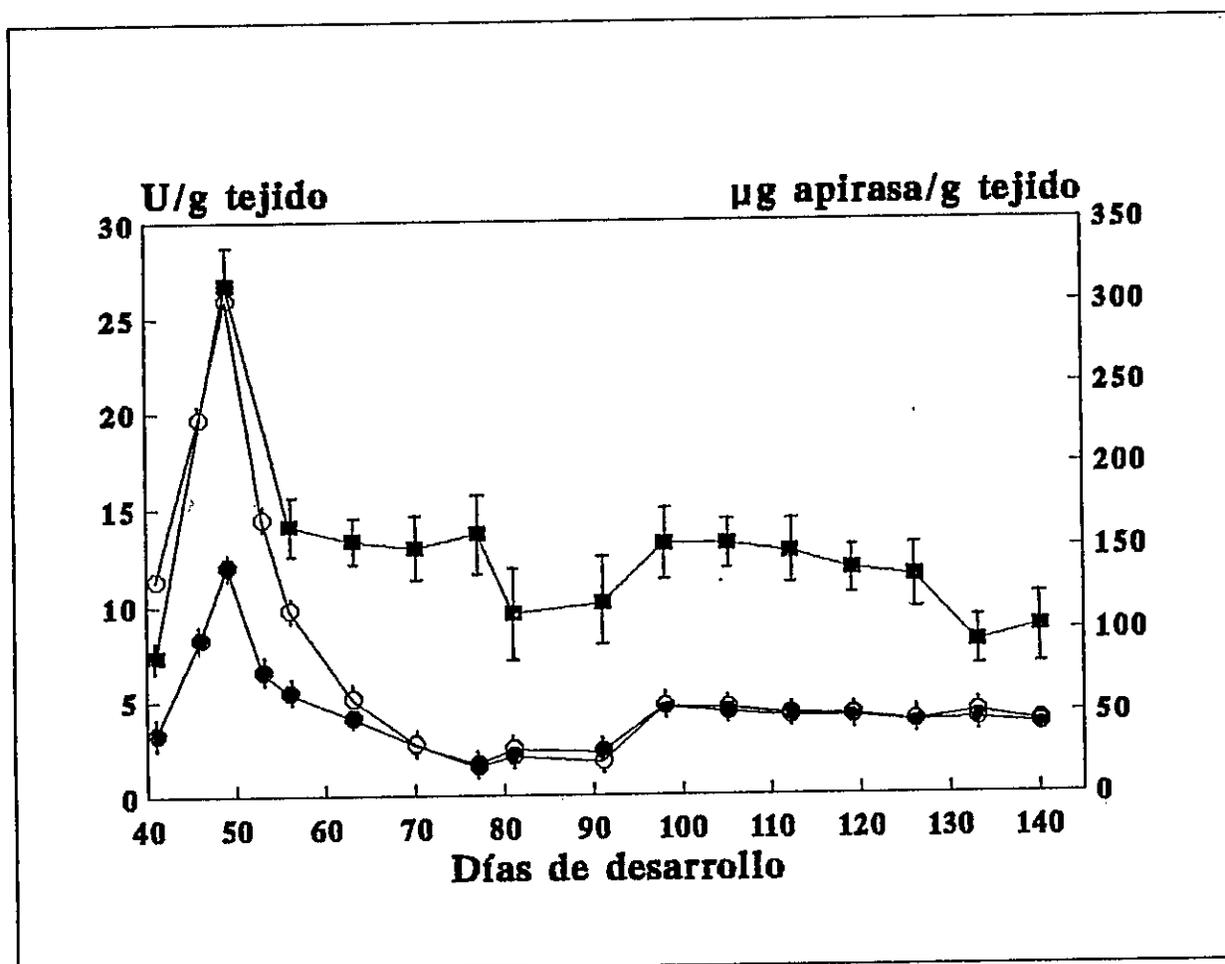


Figura 5. Determinación de la actividad apirásica y cuantificación de la masa de enzima durante el desarrollo del tubérculo de papa.

La actividad apirásica: ATPásica (○—○) y ADPásica (●—●) se midió en los mismos homogeneizados descritos en la figura 4. Los valores se expresan como U/g de tejido fresco y corresponden al promedio de tres muestras procesadas independientemente en dos años consecutivos. Se aplicó a una cámara de Bio-Dot alícuotas de 50 µL de los homogeneizados en una concentración de 50 µg/mL de proteínas. Se incubó con anticuerpos antiapirasa diluïdos 1:3.000, luego con anticuerpos antiIgG de conejo radiomarcado con ^{125}I y se cuantificó la radiactividad asociada a cada punto (■—■).

en estolones sin hinchar, con 41 días de desarrollo, tanto la actividad apirásica, como la cantidad de enzima es baja. A los 56 días, cuando el proceso de tuberización está totalmente desencadenado, la actividad apirásica disminuye cerca de un 60%. Esto estaría indicando que la acción de la apirasa es importante en el momento en que se comienza la tuberización. Se observa un leve aumento de la actividad apirásica alrededor de los 100 días, el que no está correlacionado con una mayor masa de enzima, ya que la titulación de apirasa alcanza un valor aproximadamente constante a partir de los 60 días. Este segundo aumento en la actividad apirásica corresponde a aproximadamente a un 30% del primero; después, la actividad se mantiene relativamente constante hasta la madurez.

En el tubérculo madre se encontró que la actividad apirásica expresada en U/g de tejido fresco es al menos 100 veces menor que en los tubérculos jóvenes a los 49 días después de la siembra y 25 veces menor con respecto a tubérculos maduros de 140 días. La actividad apirásica en el tubérculo madre disminuye rápidamente en el tiempo hasta un valor cercano a cero alrededor de los 100 días después de la siembra. Esta disminución en la actividad enzimática es consistente con la disminución que se produce de la totalidad de las proteínas (figura 6).

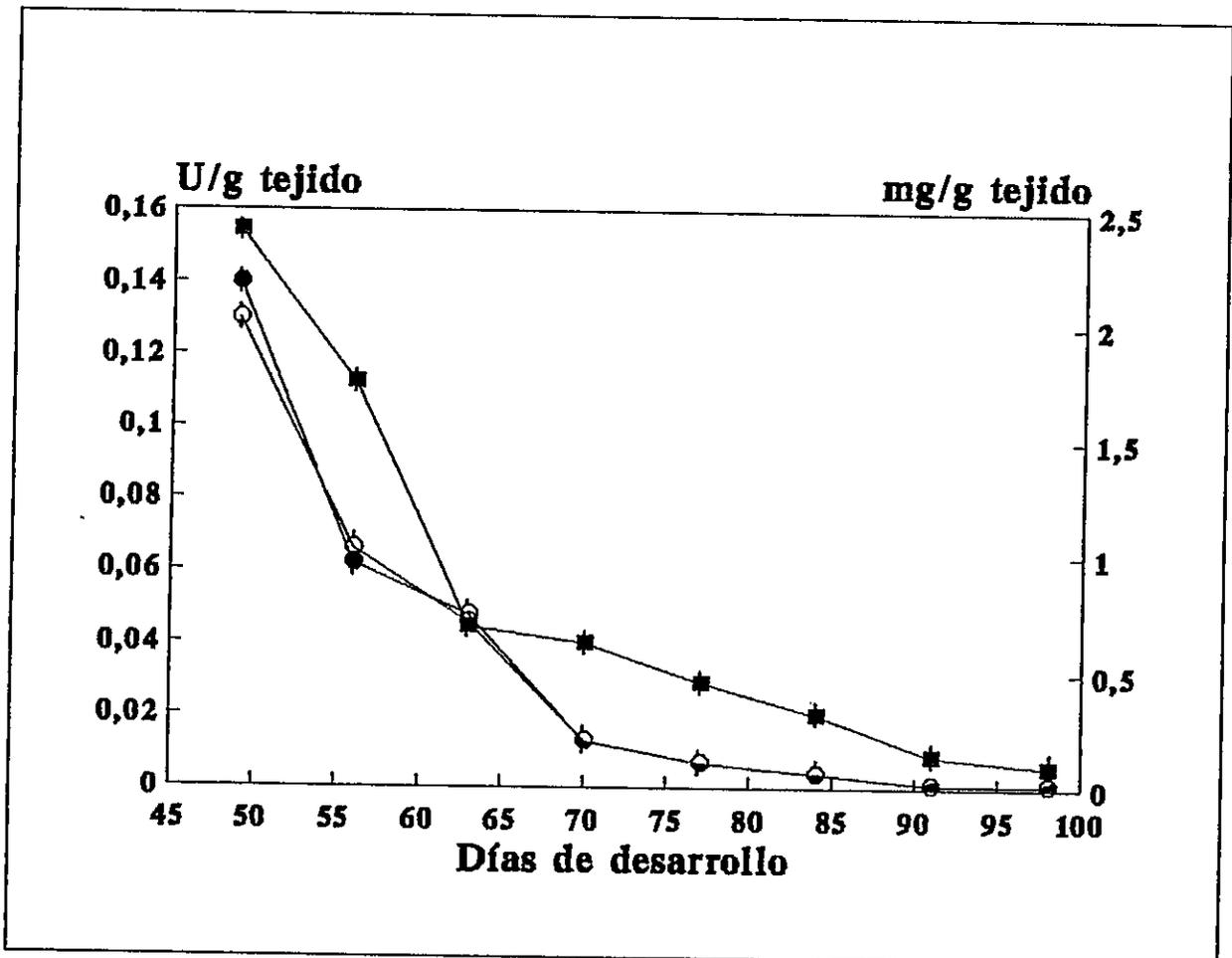


Figura 6. Determinación de las proteínas totales y actividad apirásica en el tubérculo madre.

La concentración de proteínas totales se midió por el método de Bradford (■—■) en los homogeneizados preparados con los tubérculos madre con 49 a 98 días después de sembrados en un período de verano. La actividad apirásica ATPásica (○—○), ADPásica (●—●) se expresa en U/g de tejido fresco. Los valores corresponden a un promedio de dos muestras procesadas independientemente. La determinación de cada muestra fue en triplicado.

3.2.1. Efecto de inhibidores sobre la actividad apirásica en los homogeneizados de las etapas iniciales de la tuberización.

Cabe hacer notar que la apirasa proveniente de tubérculos maduros var Desirée se caracteriza por un cuociente hidrolítico ATPásico/A DPásico de 1,0 (Traverso-Cori y cols., 1970). Pero en las etapas iniciales del desarrollo, es decir, el período comprendido entre los 41 y 56 días, este cuociente fue cercano a 3,5 (figura 5). Con el objeto de ver si esta mayor actividad ATPásica encontrada en los homogeneizados correspondería a la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPasa o a la ATPasa mitocondrial, se estudió el efecto que tenían dos inhibidores específicos de dichas ATPasas. En la tabla 2 se puede observar que ni la ouabaína (inhibidor de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPasa) ni la oligomicina (inhibidor de la ATPasa mitocondrial) presentaron efecto sobre la actividad ATPásica de estos homogeneizados. Estos resultados podrían indicar que durante este período hay estimulación, no sólo de la actividad apirásica, sino que, además, de otras ATPasas presentes en el tejido, como por ejemplo las de transporte, ya que hay un ligero aumento del cuociente ATPásico/ADPásico. No se estudió el efecto de DES, DCCD y o-vanadato (inhibidores inespecíficos de ATPasas) porque también afectan a la actividad apirásica (Valenzuela y cols., 1989).

Tabla 2. Efecto de inhibidores sobre la actividad apirásica.

	48 días		53 días		60 días	
	ATPasa	ADPasa	ATPasa	ADPasa	ATPasa	ADPasa
	U/mL		U/mL		U/mL	
Control (EtOH)	10,2	3,5	7,3	3,0	2,8	1,3
+ Oligomicina (0,9 mg/mL)	10,2	3,5	7,2	3,0	2,7	1,3
Control (H ₂ O)	10,2	3,4	7,3	3,0	2,7	1,3
+ Ouabaína 5 mM	10,1	3,4	7,3	3,0	2,7	1,3

Los valores corresponden a un promedio de tres ensayos.

Además de los cambios en la masa de apirasa durante el desarrollo del tubérculo, su regulación cinética por proteínas moduladoras descritas previamente en este laboratorio (Mancilla y cols., 1987) es otro aspecto importante a ser considerado.

3.2.2. Proteínas moduladoras de la actividad apirásica durante el desarrollo del tubérculo.

Se preparó una fracción parcialmente purificada de estas proteínas, que se ha denominado Fr-50, (Sección 2.7.1.) con el material biológico colectado a distintos tiempos de desarrollo del tubérculo. Los resultados se muestran en la tabla 3. Para poder efectuar un análisis comparativo, se estandarizó la concentración de proteínas de la Fr-50 a 1,0 mg/mL (concentración a la que se determinó el máximo efecto de activación) y en consecuencia la actividad apirásica control se midió en presencia de BSA 1,0 mg/mL. Se puede inferir de la tabla que a la concentración de proteínas antes mencionada se observa un efecto estimulador de la actividad apirásica que se mantiene relativamente constante durante todo el período estudiado. Sin embargo, a mayores concentraciones de proteína de la Fr-50 empieza a hacerse evidente la presencia de la proteína inhibidora que, también está presente en la Fr-50 (ver figura 14). Por otra parte es importante indicar que una Fr-50 preparada a partir de papas maduras brotadas (de más de 160 días) no tiene ningún efecto modulador sobre la actividad apirásica.

Tabla 3. Efecto de la Fr-50 sobre la actividad apirásica a diferentes tiempos de desarrollo del tubérculo de *S. tuberosum*.

Días	Actividad*/actividad control	
	ATPasa	ADPasa
49	1,73	1,54
56	1,70	1,50
63	1,59	1,61
70	1,46	1,44
77	1,46	1,43
84	1,56	1,58
91	1,78	1,68
98	1,82	1,65
105	1,69	1,45
112	1,67	1,45
119	1,66	1,46
126	1,64	1,44
133	1,54	1,44
140	1,65	1,43

Actividad*: Actividad apirásica en presencia de 1 mg/mL de Fr-50 (la concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry y col., 1951). Actividad control: Actividad apirásica en presencia de 1,0 mg/mL de BSA. Las preparaciones de las Fr-50 fueron realizadas con tubérculos correspondientes a una siembra de verano. La concentración óptima para obtener la máxima activación en cada caso fue 1,0 mg/mL. Los resultados de la tabla representan el promedio de dos experimentos realizados por separado y el efecto modulador se midió en triplicado.

Se realizó un estudio de la estabilidad de la Fr-50 y se encontró que a mayor concentración de proteínas (aproximadamente, 5 mg/mL) y a -20°C se lograba una fracción estable por 25 días. Además, la estabilidad de esta fracción depende, también, de varios otros factores como: período de siembra (invierno, verano), desarrollo del tubérculo y factores ambientales (lluvias y heladas)

3.2.3. Análisis de las proteínas de la Fr-50 por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS e inmunoelectrotransferencia.

En la figura 7 se muestra un SDS-PAGE de una Fr-50 preparada con tubérculos jóvenes de 67 días y otra de 74 días de desarrollo. Se puede apreciar que las dos preparaciones semipurificadas de las proteínas moduladoras presentan un patrón similar de proteínas. Para lograr identificar la proteína activadora presente en la Fr-50 se realizó una electrotransferencia a nitrocelulosa del gel sometido a SDS-PAGE cuyos resultados se presentan en la figura 8. Como se indicó en la sección 2.9.5.2, el papel de nitrocelulosa fue incubado inicialmente con apirasa homogénea y después con los anticuerpos antiapirasa para inmunodetectar los posibles complejos de la apirasa con las proteínas moduladoras. En la figura 8, A) corresponde al control sin preincubación con apirasa y B) al tratado con apirasa. En el control es posible detectar que en la Fr-50 de 74 días hay varias bandas de

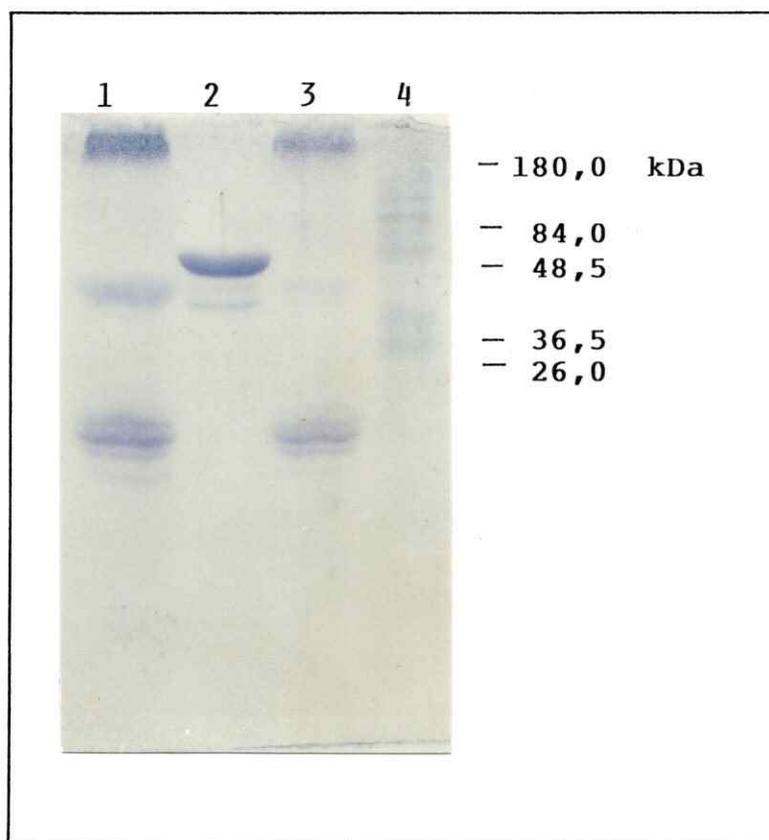


Figura 7. Electroforesis en presencia de SDS de fracciones semipurificadas (Fr-50) de las proteínas moduladoras de la actividad apirásica.

1. Alícuota de 90 μg de proteínas de una Fr-50 preparada a partir de tubérculos jóvenes de 67 días de desarrollo, según se describe en la sección 2.7.1.
2. Alícuota de 8,0 μg de apirasa purificada de papas var Desirée.
3. Alícuota de 90 μg de una Fr-50 preparada a partir de tubérculos jóvenes de 74 días.
4. Estándares de masa molecular.

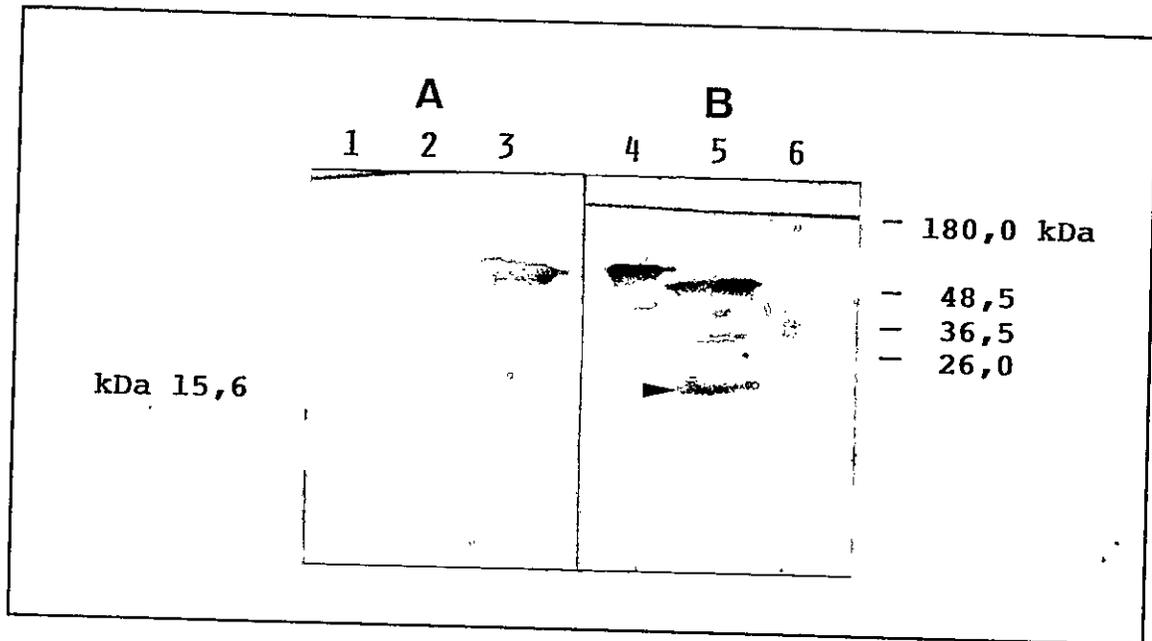


Figura 8. Identificación del complejo proteína activadora-apirasa en una Fr-50 por SDS-PAGE-immunoelectrotransferencia.

A. Control de una inmunoelectrotransferencia de las proteínas de una Fr-50 separadas por una SDS-PAGE en que no se preincubó previamente con la apirasa. La dilución de los anticuerpos antiapirasa fue 1:1000 y la de los anticuerpos antiIgG de conejo fue 1:3000.

1. Estándares de masa molecular.
2. Alícuota de 90 µg de una Fr-50 de tubérculos de 74 días.
3. Alícuota de 8,0 µg de apirasa var Desirée.

B. Inmunoelectrotransferencia del gel SDS-PAGE de la Fr-50 en que se incluyó una preincubación con una solución de apirasa (2,5 mg/mL) diluída 1:1000 en TBS antes de incubar con los anticuerpos antiapirasa.

4. Alícuota de 8,0 µg de apirasa Desirée.
 5. Alícuota de 90 µg de una Fr-50 de tubérculos de 74 días.
 6. Estándares de masa molecular.
- (➤) indica el probable complejo entre la proteína activadora (15,6 kDa) y la apirasa.

proteínas que reaccionan con los anticuerpos antiapirasa. Lo más probable es que estas bandas correspondan a productos de degradación de la apirasa, debido a que los anticuerpos antiapirasa utilizados en este experimento eran policlonales monoespecíficos. En la Fr-50, también, está presente la apirasa, pero inactivada por calentamiento a 100°C, lo cual la hace más accesible a proteasas. Sin embargo, los anticuerpos son capaces de reconocer a esta mezcla de apirasas degradadas e inactivas. Pero en B) hay una banda de 15,6 kDa que podría representar el posible complejo entre la proteína activadora y la apirasa.

Con el objetivo de cuantificar y localizar estas proteínas moduladoras por medio de anticuerpos monoespecíficos dirigidos contra ellas, se intentó purificarlas por diferentes métodos.

3.3. Purificación de las proteínas moduladoras de la actividad apirásica.

A partir de la fracción semipurificada (Fr-50) se abordaron diferentes estrategias de purificación para lograr obtener la proteína activadora homogénea y separada de la inhibidora, ya que ambas se encuentran presentes en la Fr-50. Esta fracción fue posteriormente purificada a través de cromatografías de exclusión, intercambio iónico y de afinidad.

3.3.1. *Cromatografía de exclusión en Sephadex G-100.*

La Fr-50 se sometió a una cromatografía en Sephadex G-100. El perfil de elución de la columna se muestra en la figura 9. Se puede observar que la fracción activadora eluye en el volumen de vacío de la columna (82,0 mL). En este tipo de cromatografía debería ser posible separar la proteína inhibidora de la activadora dada la diferencia de masa molecular entre ellas (la proteína activadora tiene una masa molecular de 16,0 kDa y la inhibidora de 58,0 kDa. Ver figura 16, sección 3.4.4.). Sin embargo, en esta preparación de invierno no fue posible detectar fracciones con efecto inhibitorio sobre la actividad apirásica a lo largo de la elución de la columna. Se observaron los mismos resultados al utilizar una columna de Sephadex G-75. Esto indicaría una fuerte interacción de la proteína activadora con otras proteínas de la Fr-50 entre las cuales está presente la apirasa inactivada por acción del calentamiento. Probablemente este patrón de elución sería distinto con mayor fuerza iónica y con otra preparación de Fr-50 de diferente período estacional (ver discusión, sección 4.1.2.).

3.3.2. *Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex.*

Los resultados obtenidos con este tipo de cromatografía se presentan en la figura 10. La elución de las proteínas se realizó con un gradiente de NaCl que iba de 0 a 1,0 M. Se obtuvo un máximo de proteínas que eluye entre 0,27 y 0,33 M de

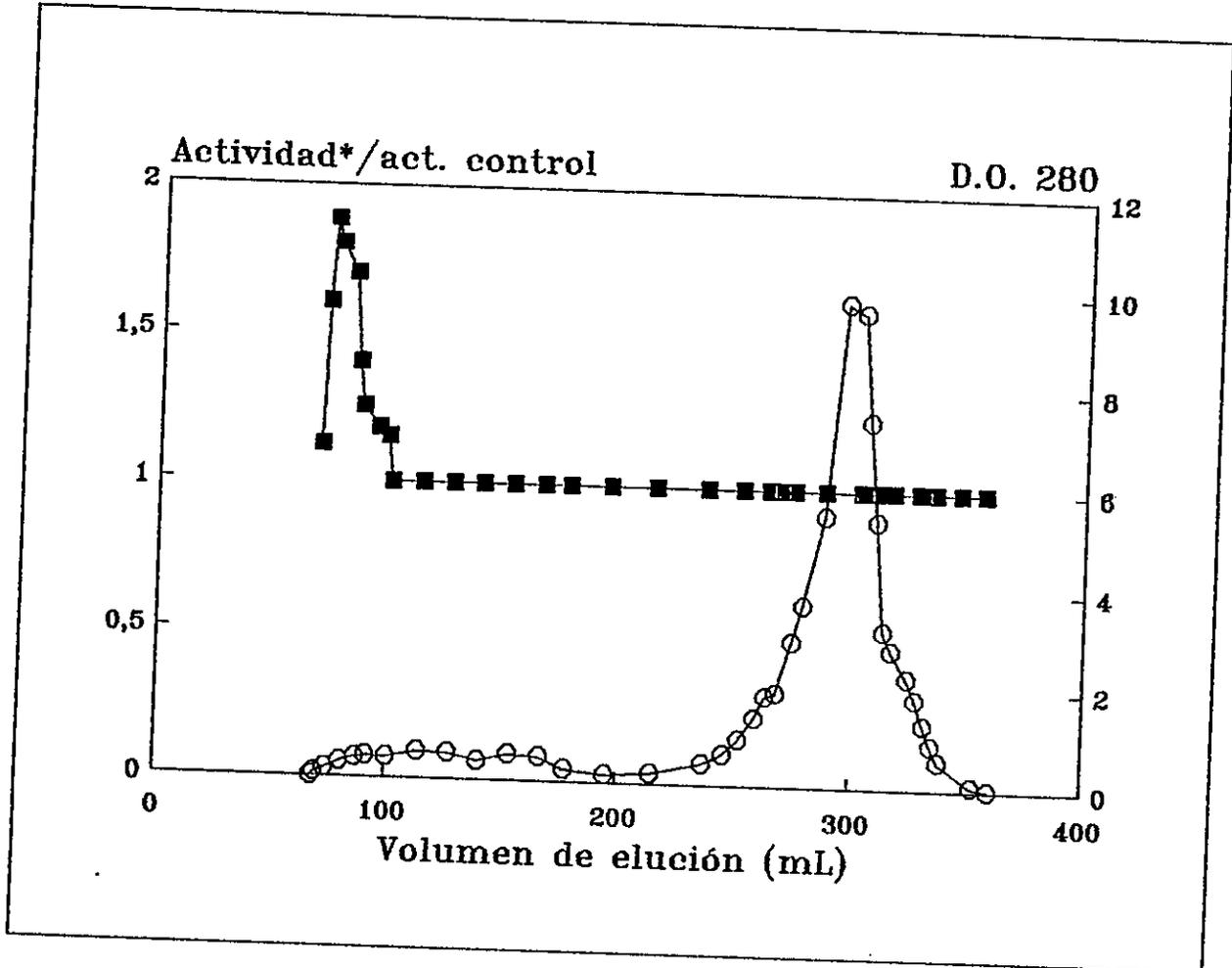


Figura 9. Columna de Sephadex G-100.

Perfil de elución de la proteína activadora en una columna de Sephadex G-100, equilibrada con 1,3 L de Tris-HCl 100 mM pH 8,0, NaCl 300 mM. Se colocaron 32,0 mg de proteínas de una Fr-50 cuyo cociente actividad ATPásica*/actividad control es de 1,26 y el de la actividad ADPásica*/actividad ADPásica control de 1,24. En la figura se representa la estimulación sobre la actividad ADPásica (■—■) y la absorbancia a 280 nm (○—○). Actividad* es la medición de la estimulación de la actividad apirásica en presencia de 100 μ L de eluido de la columna. Actividad control es la medición de la actividad apirásica en presencia de BSA a la misma concentración que el eluido.

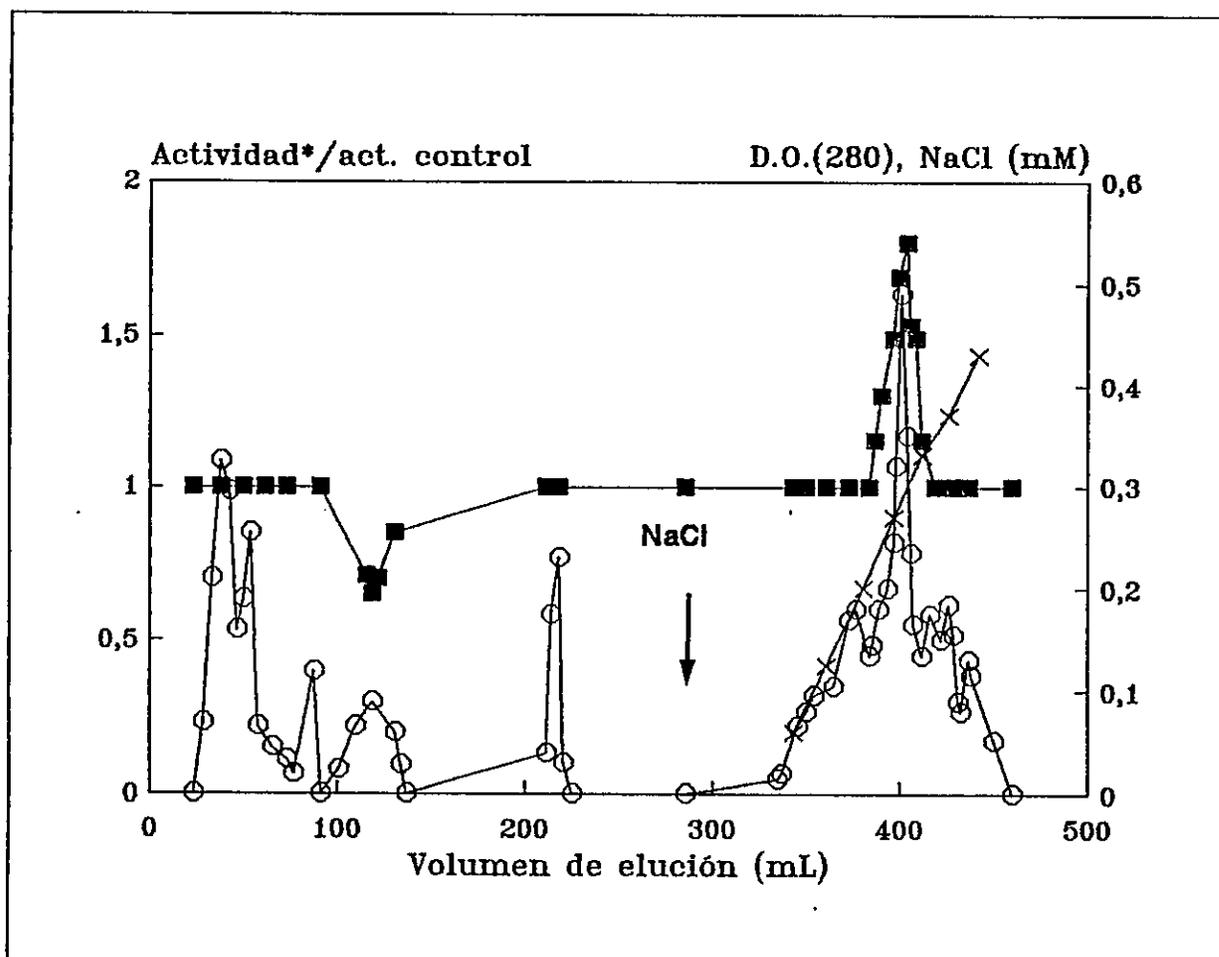


Figura 10. Columna de DEAE-Sephadex.

Perfil de elución de las proteínas moduladoras de la actividad apirásica en una columna de DEAE-Sephadex, equilibrada con amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 8,0. Se colocaron 23,8 mg de proteínas de una Fr-50 cuyo cociente actividad ATPásica*/actividad control es 1,50 y el de la actividad ADPásica*/actividad control de 1,30. La elución se efectuó con una gradiente de 0 a 1,0 M de NaCl. En la figura (■—■) corresponde a la actividad ADPásica*/actividad control; (○—○) la absorbancia a 280 nm y (x—x) a la gradiente de NaCl.

NaCl y que tiene un efecto estimulador de la actividad apirásica. Sin embargo, en el lavado inicial de la columna con el amortiguador en ausencia de NaCl, se pudo apreciar un pequeño máximo de proteínas que inhibe la actividad apirásica. Esta fracción con efecto inhibitorio no fue siempre detectable. Los eluidos con efecto modulador se concentraron por liofilización y por Sephadex G-25, pero perdieron su efecto modulador. Los eluidos concentrados con efecto activador tenían 1,03 mg/mL de proteínas y los con efecto inhibidor 0,59 mg/mL. Sin embargo, ambos presentaban al menos 7 bandas de proteínas al realizar una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas y en SDS-PAGE.

3.3.3. *Cromatografía en trifluoperazina-Sepharose.*

La posterior purificación de la Fr-50 a través de una columna de TFP-Sepharose ha resultado bastante exitosa en cuanto a la separación de la proteína activadora de la inhibidora. La figura 11 muestra el resultado obtenido con una Fr-50 preparada con tubérculos maduros de una siembra de verano. En la figura es posible observar que eluyen dos fracciones totalmente separadas que tienen efecto modulador sobre la actividad apirásica una activadora y la otra inhibidora. Los eluidos presentaron varias bandas de proteínas en un SDS-PAGE y resultaron inestables tanto sin concentrar como después del proceso de concentración. Por otra parte, también, se realizó una purificación a través de esta misma

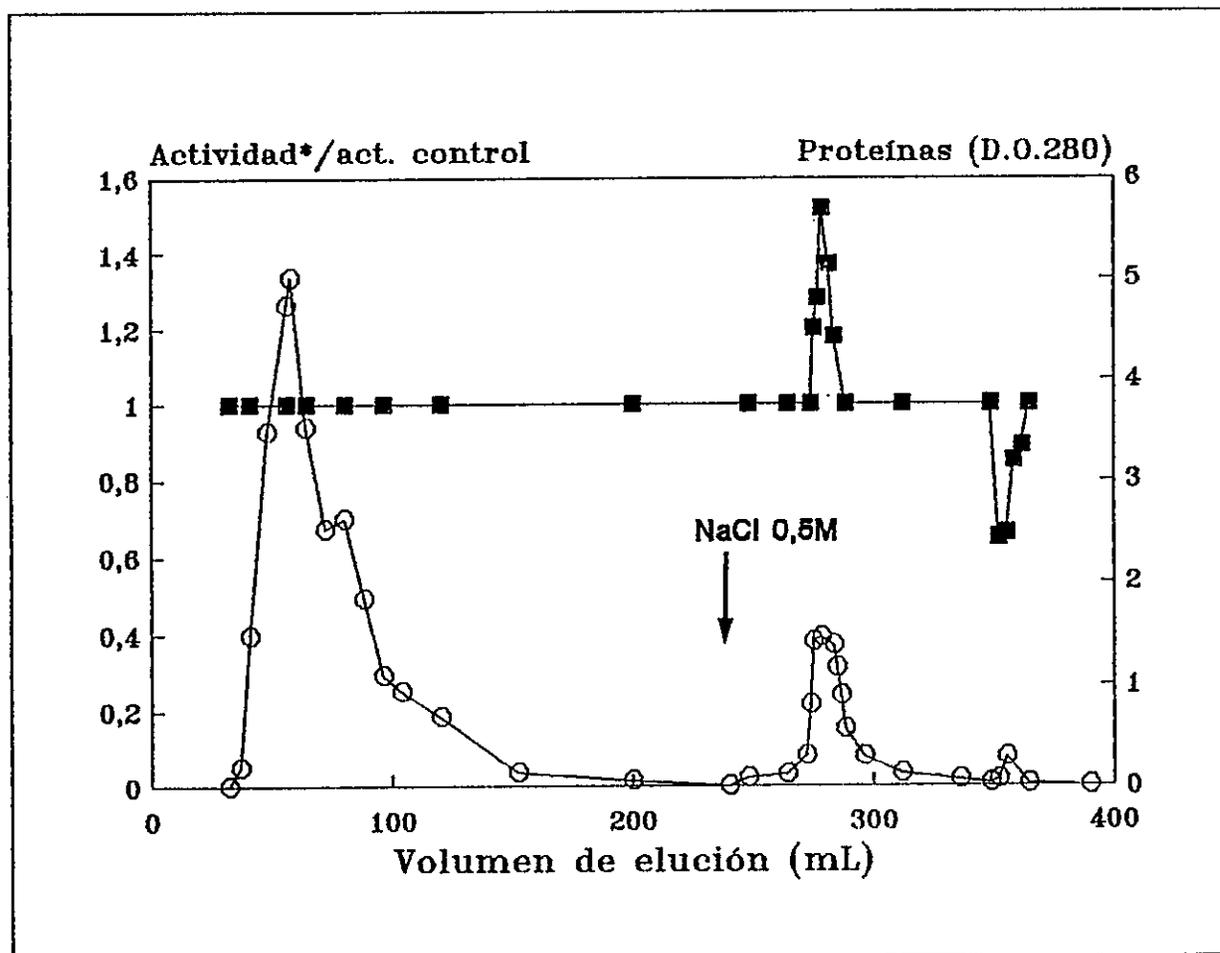


Figura 11. Columna de trifluoperazina-Sepharose. Verano.

Perfil de elución de las proteínas modificadoras de la actividad apirásica en una columna de trifluoperazina-Sepharose equilibrada con Tris-HCl 10 mM pH 7,0, CaCl₂ 0,5 mM. Se colocaron 113,0 mg de proteínas de una Fr-50 preparada con papas maduras de una siembra de verano cuyo cociente actividad ATPásica*/actividad control es de 1,50 y el de la actividad ADPásica*/actividad control de 1,75. La elución se efectuó con el amortiguador de equilibrio en presencia de 500 mM de NaCl. En la figura (■—■) corresponde a la actividad ADPásica*/actividad control; (○—○) a la absorbancia a 280 nm y (—→) indica la adición de NaCl al amortiguador de elución.

columna con una Fr-50 preparada a partir de tubérculos de una siembra de invierno, obteniéndose resultados muy similares.

Dado los resultados logrados con estos tipos de columnas, se intentó purificar a las proteínas moduladoras a través de cromatografías de afinidad basándose en su interacción con la apirasa. Se utilizaron dos matrices diferentes a las cuales se unió apirasa homogénea. Los resultados se presentan a continuación.

3.3.4. Cromatografía de afinidad en CM-celulosa-apirasa.

La unión de la apirasa a CM-celulosa resultó muy estable y por lo tanto fue posible disponer de una columna que es fácilmente reutilizable después de exhaustivos lavados. En la figura 12 se puede apreciar uno de los resultados obtenidos con este tipo de cromatografía. En este caso la elución se efectuó con un gradiente de NaCl de 0 a 800 mM, en otros casos se empleó un cambio brusco de fuerza iónica de NaCl 500 mM. Como se aprecia en la figura, en algunos casos es posible separar las dos proteínas moduladoras a través de este tipo de columna. La fracción proteica inhibidora de la apirasa eluye aproximadamente a una fuerza iónica equivalente a 20 mM de NaCl, en cambio la activadora lo hace a 100 mM. Este hecho es bastante repetitivo siempre que se use como material de partida la misma Fr-50. Sin embargo, la proteína inhibidora no se detectó en todas las purificaciones de la Fr-50.

Esta fracción activadora eluida de la columna de

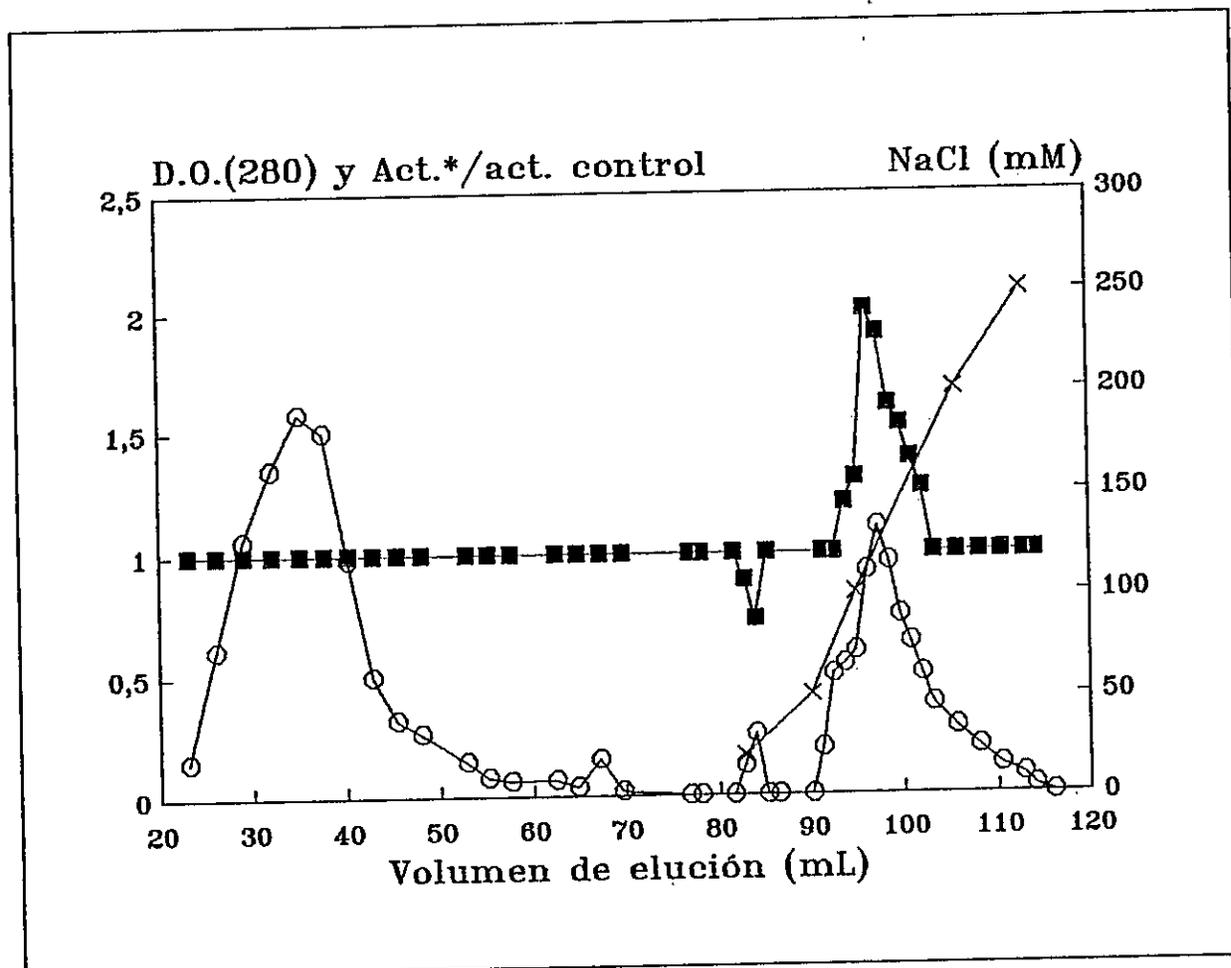


Figura 12. Columna de CM-celulosa-apirasa.

Perfil de elución de las proteínas moduladoras de la actividad apirásica en una columna de CM-celulosa-apirasa equilibrada con Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Se colocaron 50 mg de proteínas de una Fr-50 cuyo cuociente actividad ADPásica*/actividad control es 1,30 y el de la actividad ADPásica*/actividad control es 1,25. La elución se efectuó con una gradiente lineal de 0 a 800 mM de NaCl. En la figura (■—■) corresponde a la actividad ADPásica*/actividad control; (○—○) a la absorbancia a 280 nm y (x—x) a la gradiente de NaCl.

CM-celulosa-apirasa presenta al menos cinco bandas de proteínas al realizar un SDS-PAGE. La fracción eluída y concentrada se recromatografió nuevamente a través de la columna de CM-celulosa-apirasa, pero no se logró una mayor purificación. Por otra parte, a diferencia de la fracción inhibidora, la fracción activadora eluída de esta columna resultó ser bastante estable. Este hecho no se observó con las otras columnas cromatográficas (Sephadex G-100, DEAE-Sephadex y TFP-Sepharose).

3.3.5. Cromatografía de afinidad en octadecil sílica-apirasa.

El octadecil sílica (SiCl₈) son cadenas lipídicas de 18 átomos de carbono químicamente unidas a los grupos silanol de las partículas de sílica. Este material tiene una capacidad de unión muy fuerte con moléculas con dominios hidrofóbicos, tales como proteínas que interactúan con grupos apolares unidos a la matriz sólida. Debido a esta propiedad se utilizó la SiCl₈ como fase sólida a la cual se unió apirasa homogénea, siendo este complejo SiCl₈-apirasa bastante estable.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos de tres columnas en las cuales se intentó purificar una Fr-50. Los resultados son bastante repetitivos y el hecho más sobresaliente en esta purificación de la Fr-50, es que permite separar la proteína activadora de la inhibidora y obtener a ésta última en forma homogénea. La fracción activadora eluye en el lavado de la columna con amortiguador, en cambio, la

Tabla 4. Purificación de las proteínas modificadoras a través de una columna de octadecil sílica-apirasa.

	Fr-50	Lavado 1	Lavado 2	Eluido
Columna 1				
ATPasa*/ATPasa control	1,33	1,73	1,58	0,88
ADPasa*/ADPasa control	1,26	1,53	1,44	0,76
Proteínas (mg/mL)	0,713	0,024	0,008	0,262
Columna 2				
ATPasa*/ATPasa control	1,31	1,41	1,13	0,70
ADPasa*/ADPasa control	1,50	1,39	1,10	0,77
Proteínas (mg/mL)	1,0	0,025	0,044	0,234
Columna 3				
ATPasa*/ATPasa control	1,31	1,0	1,0	0,70
ADPasa*/ADPasa control	1,50	1,0	1,0	0,75
Proteínas (mg/mL)	1,0	**	**	0,052

* En las tres columnas se colocó aproximadamente la misma cantidad de proteínas.

** Indetectable por el método utilizado.

Se utilizó en cada caso una columna de 200 μ L equilibrada y lavada con amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7,0. La elución se efectuó con el mismo amortiguador que contenía además NaCl 500 mM.

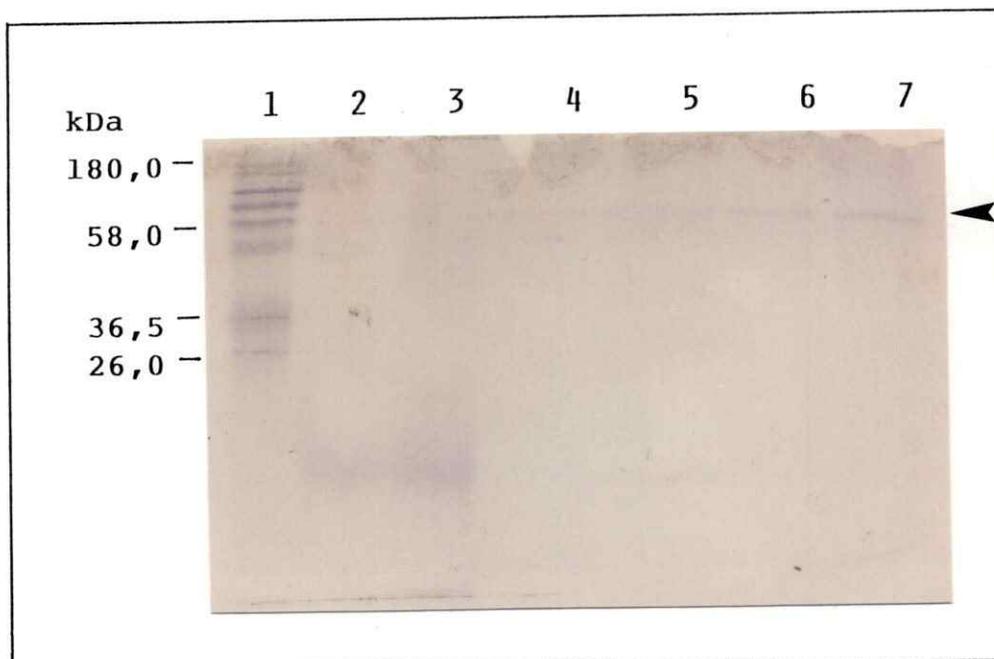


Figura 13. Análisis electroforético (SDS-PAGE) de los eluidos de la columna de SiCl_8 -apirasa.

1. Estándares de masa molecular.
 2. y 3. Alícuotas de 15 μg de proteínas de las fracciones eluidas en el lavado de la columna con amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7,0.
 4. y 5. Alícuotas de 2,5 μg del eluido final de la columna con el mismo amortiguador en presencia de NaCl 500 mM; 6 y 7 corresponden a alícuotas de 5,0 μg del eluido final. La masa molecular se determinó por la migración electroforética de las proteínas estándares.
- (\blacktriangleright) indica la banda correspondiente a la proteína inhibidora cuya masa molecular es de 58,0 kDa.

fracción inhibidora requiere de mayor fuerza iónica para ser eluída. El grado de pureza de las fracciones moduladoras eluidas de esta columna se determinó mediante un SDS-PAGE cuyo resultado se presenta en la figura 13. Como puede observarse en la figura, en el eluido final de esta columna se obtiene una sola banda de proteínas de 58,0 kDa que tiene un efecto inhibidor sobre la actividad apirásica. De la fracción activadora sólo puede decirse que no está homogénea, ya que es bastante difícil detectar esta proteína con azul de Coomassie.

Aparentemente, esta columna de SiCl₄-apirasa podría ser una buena alternativa para separar y purificar a homogeneidad la proteína inhibidora. Pero hay que considerar que es una columna de alto costo ya que se usa apirasa homogénea y pierde su capacidad de unión cuando se reutiliza varias veces. Además, el rendimiento de la columna es muy bajo lo que sumado a la baja concentración de estas proteínas moduladoras en el tejido, conduce a la inestabilidad de las fracciones moduladoras obtenidas. Por lo anterior el uso de esta columna debiera descartarse para fines preparativos.

3.4. Caracterización de las proteínas moduladoras de la actividad apirásica.

Para comprender la regulación de la actividad apirásica durante el inicio de la tuberización fue importante conocer algunas características de las proteínas moduladoras.

3.4.1. *Relación entre la concentración de proteínas de la Fr-50 y el porcentaje de estimulación de la actividad apirásica.*

Con el objeto de conocer el efecto de la concentración de proteínas de la Fr-50 sobre la actividad apirásica, se midió el porcentaje de activación en función de diferentes concentraciones de proteínas de esta fracción (0,2 a 2,0 mg/mL). En la figura 14 se observa que el máximo de activación (65%) es a una concentración de 0,25 mg/mL de proteínas de una Fr-50 preparada de un sobrenadante de 100.000 x g. A concentraciones superiores no se observa variaciones en el porcentaje de activación. Por otra parte, se realizó el mismo experimento a partir de una Fr-50 preparada de una fracción microsomal, observándose un efecto similar. Esta tendencia observada en la figura 14 en que el efecto estimulador disminuye a concentraciones mayores de proteínas podría deberse a la presencia de la proteína inhibidora en la Fr-50. Cabe hacer notar que la concentración óptima de proteínas para lograr la máxima activación de la apirasa depende del período del año en que se sembraron los tubérculos. Los resultados presentados en la figura 14 corresponden a una Fr-50 preparada a partir de tubérculos maduros de una siembra de invierno, en cambio en la tabla 3 (sección 3.2.2.) el material biológico correspondió a una siembra de verano. En este último caso la concentración óptima de proteínas para activar la apirasa fue de 1,0 mg/mL.

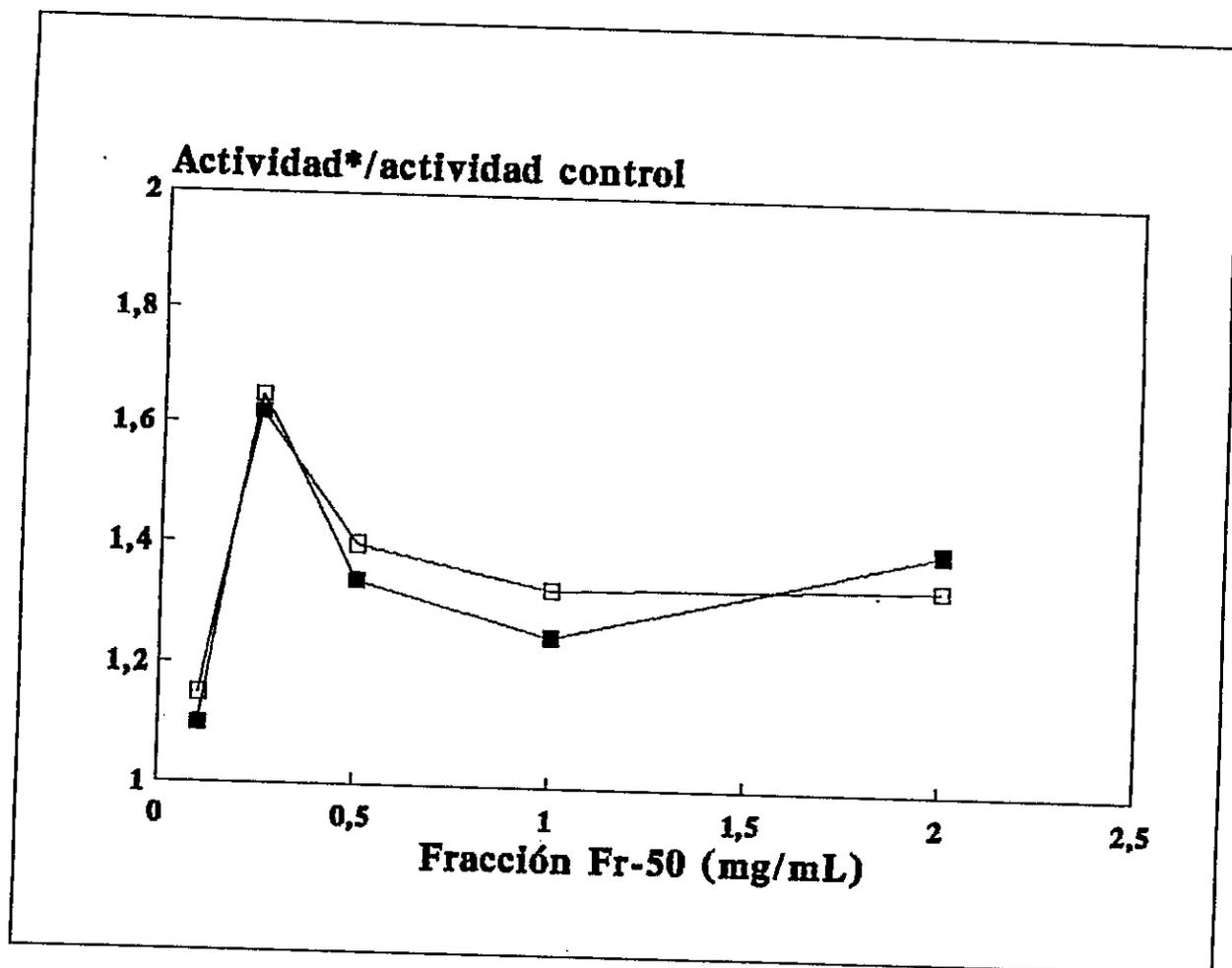


Figura 14. Efecto de la concentración de proteínas de una Fr-50 preparada de una fracción soluble sobre la actividad apirásica.

La Fr-50 se preparó a partir de un sobrenadante de 100.000 x g según se describió en la sección 2.7.1. En este caso se utilizaron tubérculos maduros de una siembra de invierno. La concentración de proteínas se midió por el método de Lowry y cols. (1951). (□—□) representa la actividad ATPásica*/actividad control y (■—■) la actividad ADPásica*/actividad control. La actividad apirásica control se midió en presencia de BSA a la misma concentración de la Fr-50.

3.4.2. Efecto del PMSF sobre la capacidad estimuladora de la Fr-50.

Se midió el efecto del PMSF (inhibidor de seril proteasas) sobre una Fr-50 obtenida tanto de papas var *Ultimus* como *Desirée*. Se encontró que una concentración de 0,1 mM de PMSF inhibe completamente el efecto estimulador de ambas Fr-50 sobre la actividad apirásica.

3.4.3. Efecto de la proteína activadora sobre los parámetros cinéticos de la apirasa.

El análisis de los resultados para estimar los valores de los parámetros cinéticos se hizo a través de métodos gráficos, empleando las transformaciones lineales de Hanes-Woolf (Hanes, 1932). Las curvas se ajustaron a los valores experimentales por medio del método de regresión lineal. En las figuras 15a y 15b se representan los gráficos de la cinética de Hanes-Woolf al variar el ATP y el ADP en presencia y en ausencia de la Fr-50. Se puede apreciar que para ambos sustratos la proteína activadora afecta sólo la V_{max} de la apirasa. Los valores aparentes de los parámetros cinéticos se resumen en la tabla 5. Estos resultados explican la mayor eficiencia catalítica de la enzima en presencia de la proteína activadora.

Experimentos similares no han podido realizarse con la proteína inhibidora debido a que no se ha obtenido en cantidad suficiente y es bastante más inestable que la activadora.

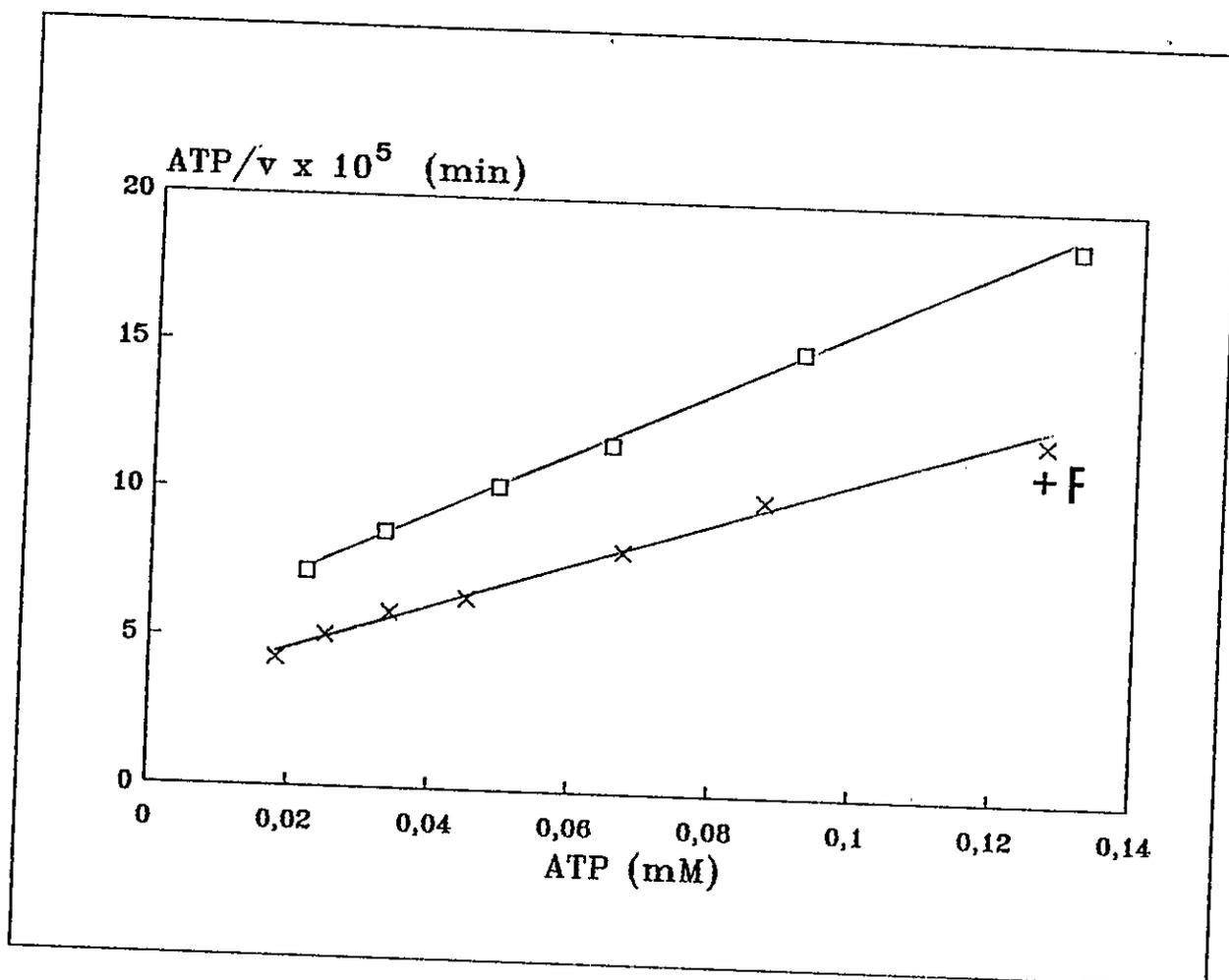


Figura 15a. Efecto de la proteína activadora sobre los parámetros cinéticos de la apirasa cuando el sustrato es ATP.

Gráfico de Hanes-Woolf. El medio de ensayo contenía amortiguador succinato de sodio 100 mM pH 6,0; CaCl_2 5 mM y la concentración de ATP varió entre 0,018 y 0,130 mM. Se preincubó 5 min con BSA 1,0 mg/mL y se midió la actividad apirásica por el método de Ernster y cols. (1950) ($\square-\square$). Para la determinación de los parámetros cinéticos de la apirasa en presencia de la proteína activadora, se preincubó con 1,0 mg/mL (máxima activación) de una ADPásica ($x-x$). La gráfica corresponde al promedio de tres experimentos realizados en duplicado. F= Fr-50

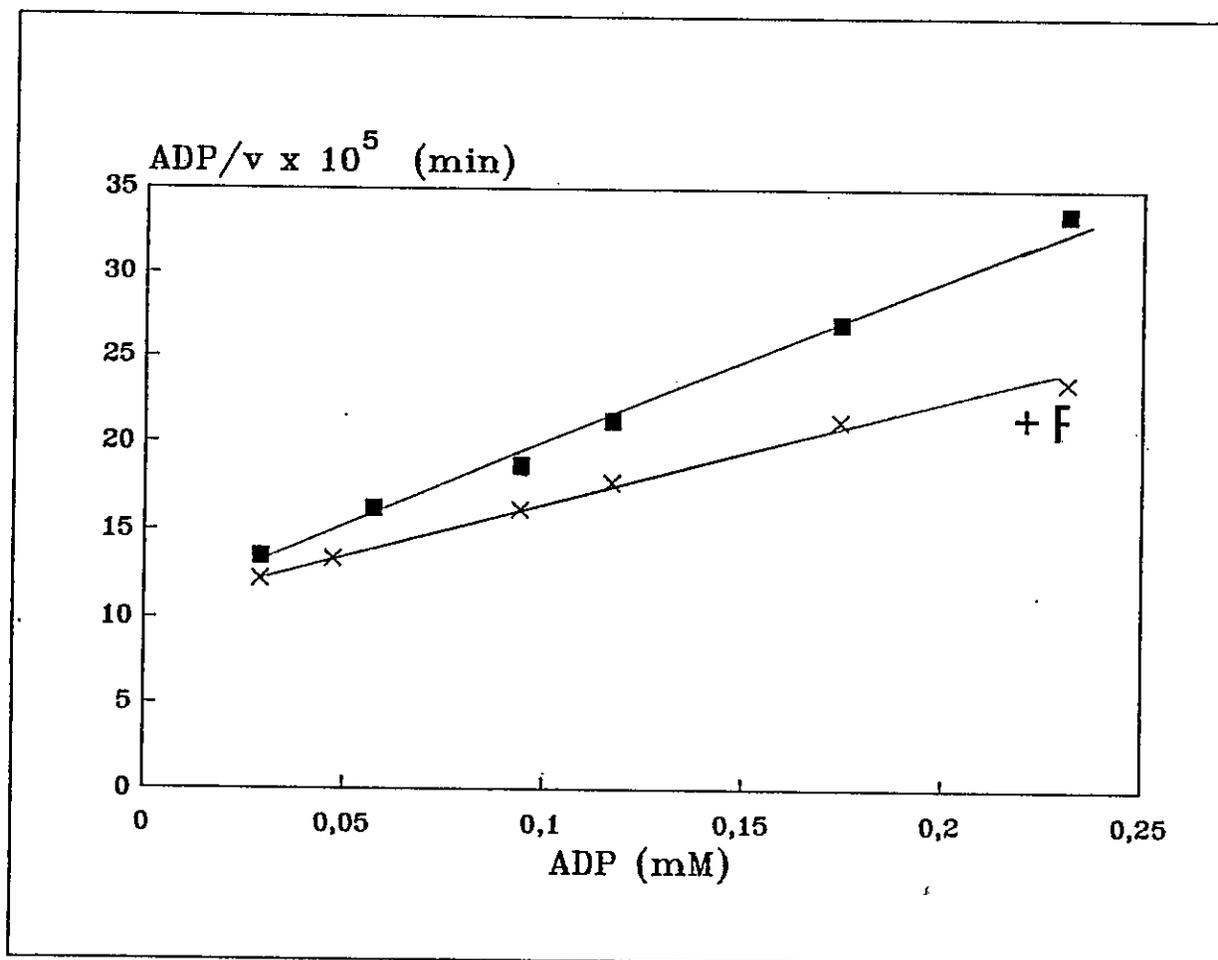


Figura 15b. Efecto de la proteína activadora sobre los parámetros cinéticos de la apirasa cuando el sustrato es ADP.

Gráfico de Hanes-Woolf. Las condiciones se describen en la figura 15a, pero el sustrato variable fue ADP entre 0,029 y 0,230 mM en ausencia (■—■) y en presencia (x—x) de la Fr-50. La gráfica corresponde al promedio de tres experimentos realizados en duplicado. F= Fr-50

Tabla 5. Efecto de la proteína activadora sobre los parámetros cinéticos de la apirasa.

Sustrato mM	Km mM		Vmáx U		Vmáx/Km min ⁻¹	
	-Fr-50	+Fr-50	-Fr-50	+Fr-50	-Fr-50	+Fr-50
ATP (0,018-0,13)	0,047	0,046	950	1398	20.210	30.392
ADP (0,029-0,23)	0,17	0,176	1041	1744	6.125	9.378

U = μ moles de Pi/min x mL.

La Fr-50 fue preparada con tubérculos maduros de una siembra de verano cuya máxima activación es con 1,0 mg/mL de proteínas.

3.4.4. Determinación de la masa molecular de la proteína activadora y la inhibidora.

Para determinar la masa molecular de la proteína activadora se utilizó una filtración por una columna calibrada de Sephacryl S-200. En la figura 16a se muestran los volúmenes de elución de las distintas proteínas estándares en función del logaritmo de la respectiva masa molecular. Por el volumen de elución de la proteína activadora detectado por su capacidad de estimular la actividad apirásica, se pudo estimar una masa molecular de aproximadamente 15,0 kDa. Además, en esta cromatografía de exclusión fue posible detectar una fracción que tenía la capacidad de inhibir la actividad apirásica cuya masa molecular correspondió a 58,9 kDa (figura 16b). Estos valores son totalmente coincidentes tanto en determinaciones realizadas con preparaciones de Fr-50 de var Desirée como de var Ultimus.

Por otra parte, se confirmó la masa molecular de la proteína inhibidora en estado homogéneo por un SDS-PAGE (sección 3.3.5.). En la figura 13 se muestra que la masa molecular corresponde a 58,0 kDa.

3.4.5. Determinación del punto isoeléctrico de la proteína activadora.

El punto isoeléctrico de la proteína activadora se determinó mediante isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida, como se describió en la sección 2.9.5.1. Para

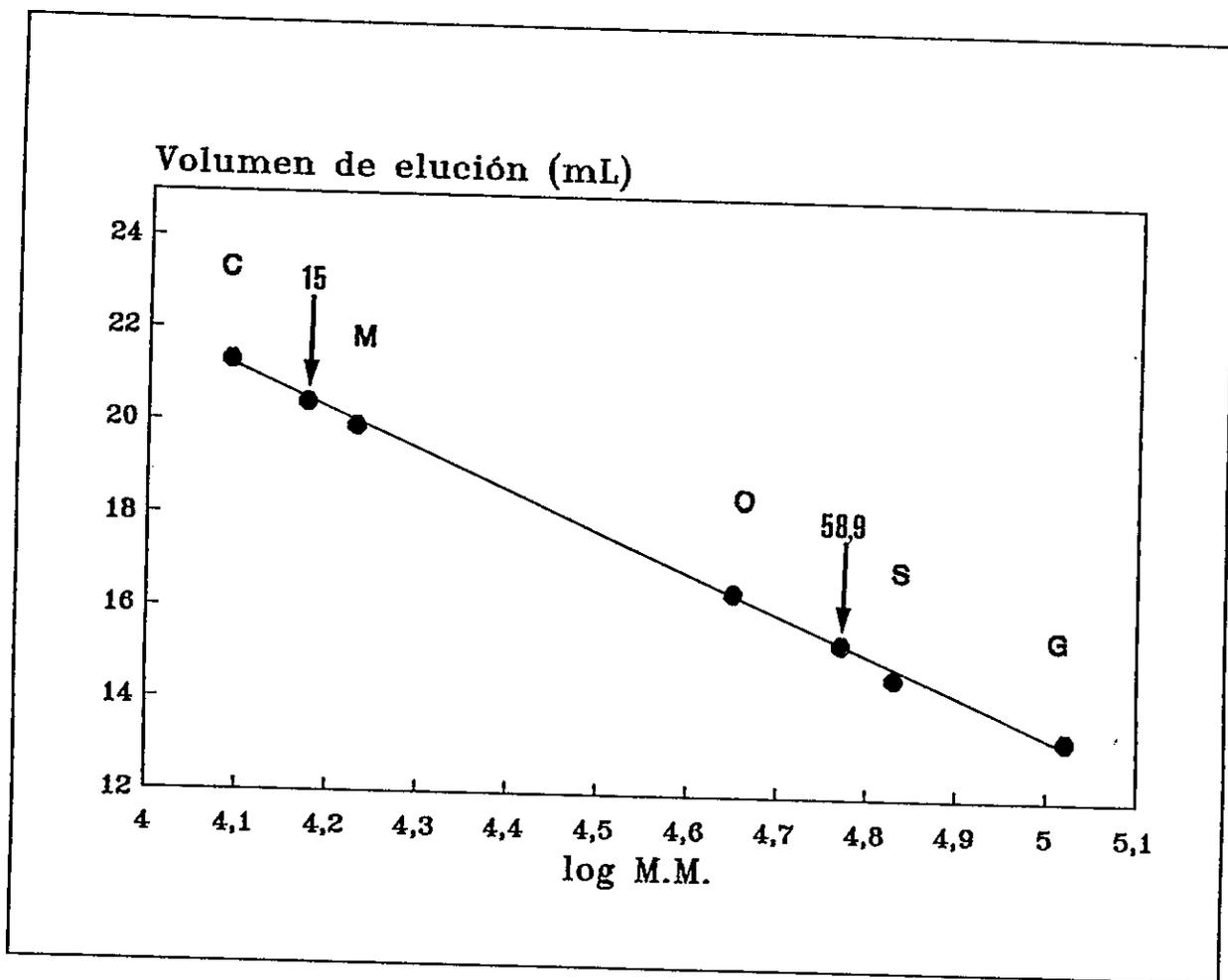


Figura 16a. Columna de Sephacryl S-200 calibrada con proteínas estándares.

Perfil de elución de proteínas estándares de masa molecular en una columna de Sephacryl S-200 equilibrada con amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7,0; CaCl₂ 5 mM; NaCl 200 mM a temperatura ambiente. La columna se calibró con 1,0 mg de: γ globulina (G: 150,0 kDa); seroalbúmina (S: 67,0 kDa); ovoalbúmina (O: 45,0 kDa); mioglobina (M: 17,0 kDa) y citocromo c (C: 12,5 kDa). Las proteínas se detectaron por su absorbancia a 280 nm. (→) indica a la proteína activadora de 15,0 kDa; (→) a la proteína inhibidora de 58,9 kDa.

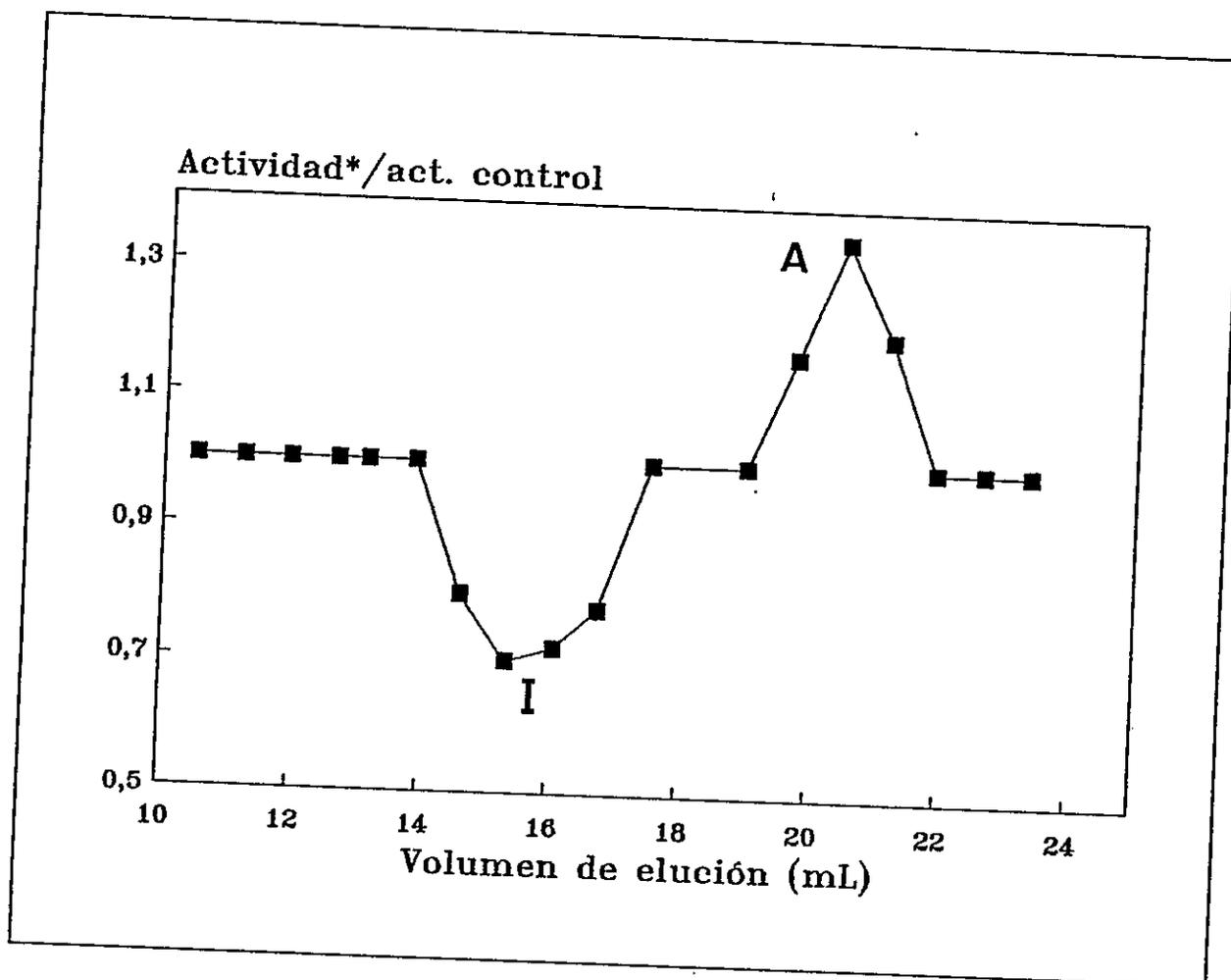


Figura 16b. Determinación de la masa molecular de las proteínas moduladoras de la apirasa por filtración en Sephacryl S-200.

Perfil de elución de la proteína inhibidora (I) y activadora (A) de la apirasa en una columna calibrada de Sephacryl S-200 en las condiciones descritas en la figura 16a. Se aplicó una alícuota de 1,5 mg de proteínas totales de una Fr-50 preparada a partir de tubérculos de papa var Ultimus que estimulaba un 52% la actividad ATPásica y un 44% la ADPásica. Las proteínas moduladoras se detectaron por su capacidad de inhibir o estimular la actividad ADPásica, (■—■) de la apirasa.

esta determinación se utilizó una Fr-50 preparada tanto de var Desirée como de var Ultimus, el eluido final de las columnas de CM-celulosa-apirasa y de la columna SiCle-apirasa. La figura 17 muestra el perfil de pH y la estimulación de la actividad apirásica a lo largo del gel. En esta figura se representa el isoelectroenfoque correspondiente a una Fr-50 preparada de papas var Desirée. En todos los casos estudiados se encontró un pI de 8,95.

Una vez conocido este parámetro, se utilizó el electroenfoque en geles planos de poliacrilamida con el propósito de purificar la proteína activadora con lo que se obtuvo un resultado positivo. Se sometieron a electroenfoque tres geles planos, dos de ellos contenían 100 µg de Fr-50 (A y B) y el tercer gel correspondió a un control con citocromo c y mioglobina como indicadores del tiempo final del electroenfoque. Se intentó identificar la proteína activadora a través de la formación del complejo proteína activadora-apirasa. Para esto se realizó una electrotransferencia de los geles (A y B) a papeles de nitrocelulosa; luego sólo el filtro A se preincubó con apirasa homogénea y finalmente el posible complejo proteína activadora-apirasa se inmunodetectó con anticuerpos antiapirasa. El gel B que no incluía la preincubación con apirasa correspondió al control (sección 2.9.5.2). La figura 18 muestra que en el filtro del gel A hay dos bandas de proteínas de pI alcalino: una cerca de 9,0 y otra un poco más alcalina. En el filtro del gel B (control), se

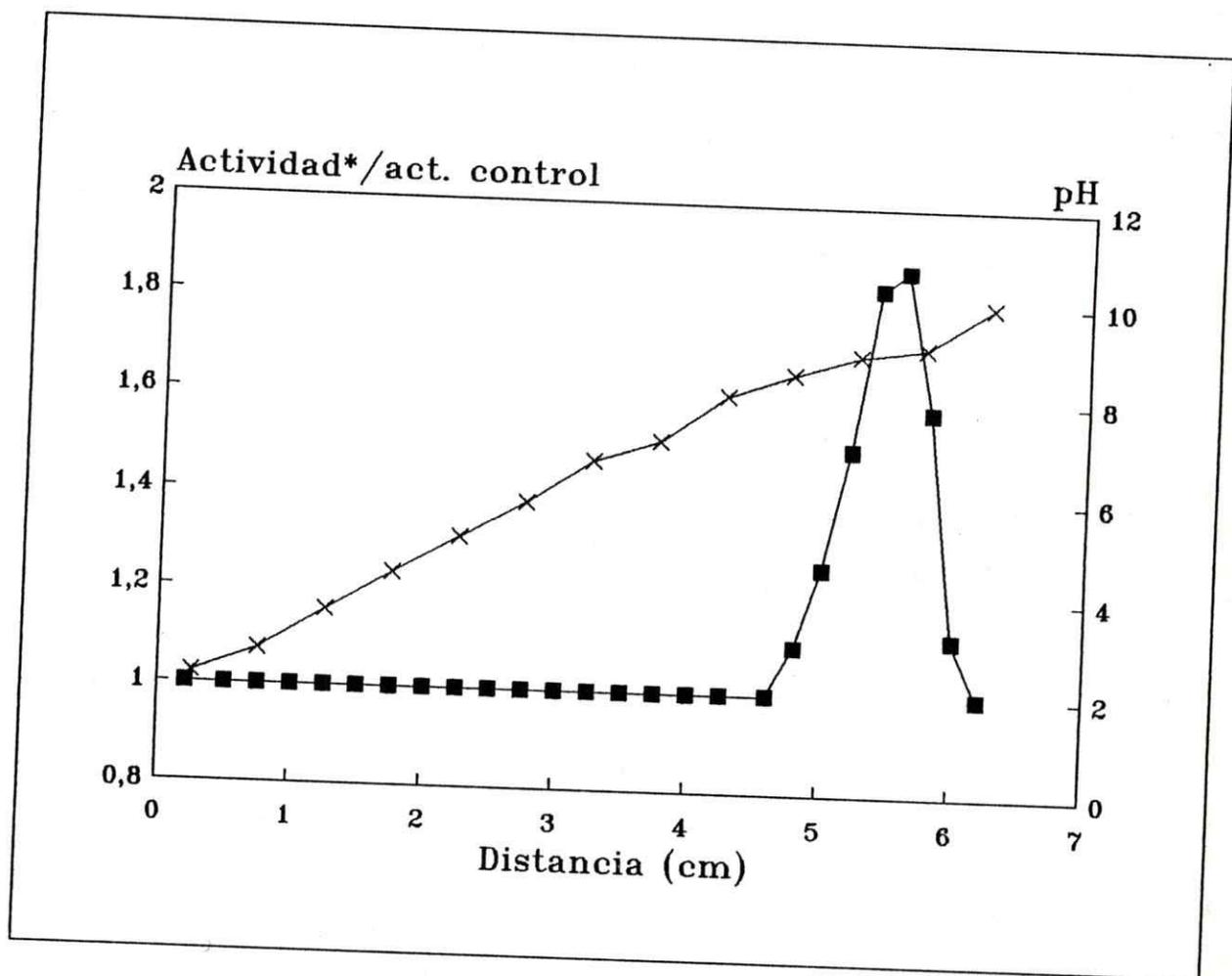


Figura 17. Determinación del punto isoeléctrico de la proteína activadora de la apirasa.

Los anfolitos usados fueron de rango de pH entre 3,0 y 10,0. Perfil de pH (X—X). Se colocaron 325 μ g de proteínas de una Fr-50 preparada a partir de papas var Desirée que estimulaba en un 79% la actividad ATPásica y un 71% la ADPásica. La muestra se agregó previa polimerización del gel, y la proteína activadora se detectó por su estimulación sobre la actividad apirásica. El Pi liberado se determinó por el método de Ernster y cols. (1950). (■—■) corresponde a la actividad ADPásica*/actividad control.

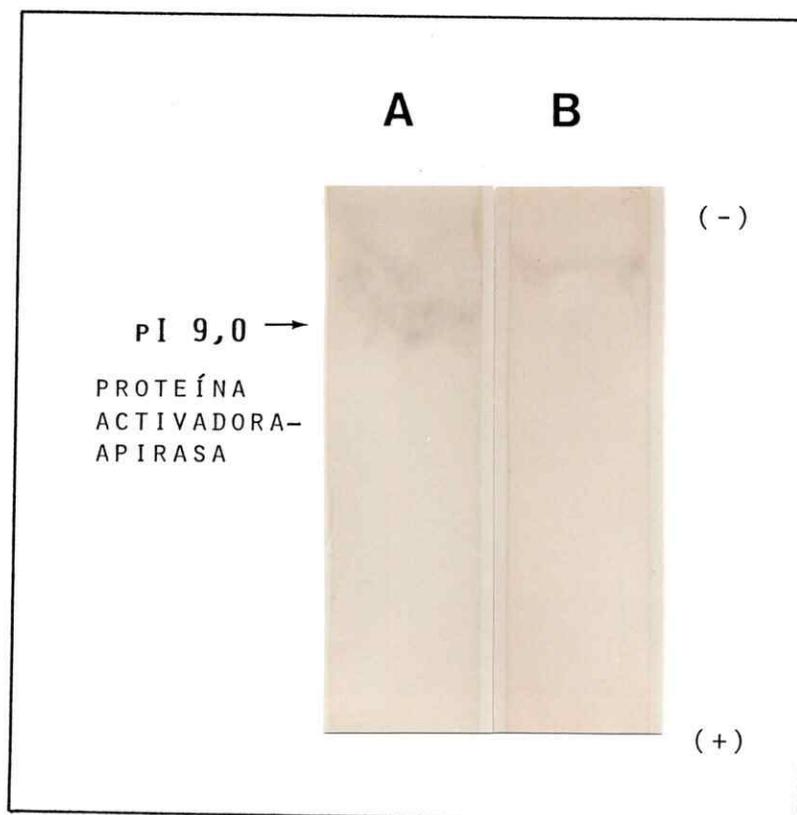


Figura 18. Identificación del complejo proteína activadora-apirasa en una Fr-50 por electroenfoque e inmunoelectrotransferencia.

Electroenfoque en geles planos de poliacrilamida de una alícuota de una Fr-50 de papas var Desirée equivalente a 160 µg. Se usó una mezcla de anfólitos de rango de pH de 3,0 a 10,0 y de 7,0 a 9,0. Luego del electroenfoque, las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa y la identificación del complejo proteína activadora-apirasa se efectuó mediante una preincubación con apirasa antes de incubar con los anticuerpos antiapirasa (A). El segundo anticuerpo correspondió a un antiIgG de conejo-peroxidasa. El control (B) no incluyó la preincubación con apirasa.

observa una sola banda que es de pI levemente mayor a 9,0 y que corresponde a la misma banda en el filtro del gel A. Esta banda de proteínas podría corresponder a un complejo formado por la apirasa desnaturada presente en la Fr-50 porque reaccionó con los anticuerpos monoespecíficos antiapirasa. La otra banda de pI cercano a 9,0 que se vió en el filtro del gel A correspondería al complejo proteína activadora-apirasa. Por lo tanto, se continuará la purificación de la proteína activadora mediante esta metódica.

En cuanto a la proteína inhibidora, no ha sido posible determinar su pI debido a que se obtienen muestras de baja concentración proteica y de suma labilidad a baja fuerza iónica.

3.5. Localización tisular y subcelular de la apirasa.

Con el objetivo de comprender la posible función fisiológica de la apirasa y su probable relación con el proceso de tuberización es imprescindible conocer su localización y distribución celular. La determinación de la ubicación y distribución de la apirasa se realizó a tres niveles:

- 1) fraccionamiento subcelular,
- 2) localización tisular, y
- 3) localización intracelular.

3.5.1. *Fraccionamiento subcelular durante el desarrollo del tubérculo.*

Con el propósito de ver si existían cambios de distribución de esta enzima durante el desarrollo, en relación a la distribución encontrada en papas maduras, se realizó un fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial. La identificación y la pureza de las fracciones (homogeneizado, P3 y fracción soluble) se determinó midiendo la actividad de las enzimas marcadoras. Además se estableció la distribución de la apirasa en todas las fracciones obtenidas que fueron homogeneizado H, P1, P2, P3 y S (sobrenadante).

La medición de las enzimas marcadoras se realizó solamente en el H, P3 y S ya que se ha demostrado que con el esquema de centrifugación diferencial descrito, casi no hay contaminación por mitocondrias en el citosol (Valenzuela y cols., 1989). En la figura 19 se muestra la distribución subcelular de la apirasa a través del desarrollo del tubérculo. Se visualiza que aproximadamente un 65% de la actividad apirásica se encuentra asociada a la fracción soluble y alrededor de un 15% a la fracción microsomal (P3). Esta distribución se mantiene durante todos los períodos estudiados y es también muy semejante a la encontrada en tubérculos maduros (140 días). Por otra parte, en la figura 19 puede observarse que el cociente ATPásico/ADPásico se mantiene cercano a la unidad en las cuatro fracciones durante los diferentes períodos, lo cual es característico de la apirasa

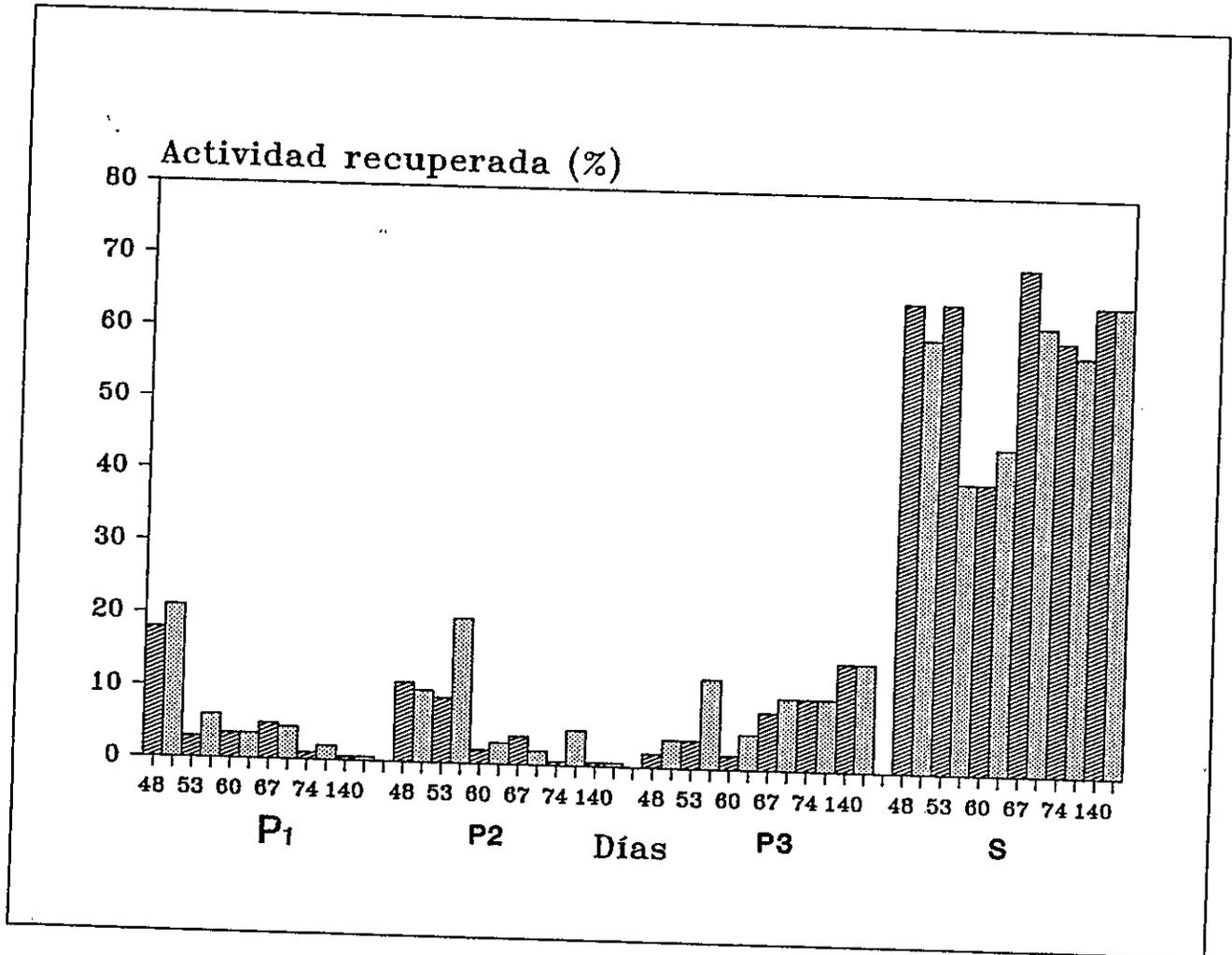


Figura 19. Distribución subcelular de la apirasa durante el desarrollo del tubérculo de *S. tuberosum*.

Fraccionamiento subcelular mediante centrifugación diferencial de los homogeneizados obtenidos a partir de tubérculos en desarrollo (48 a 89 días después de una siembra de verano) y de tubérculos maduros (140 días). La identificación y la pureza de las fracciones se determinó midiendo la actividad de las respectivas enzimas marcadoras. La distribución de la actividad apirásica ATPásica (▨) -ADPásica (▤) se estableció en todas las fracciones y el Pi liberado se midió por el método de Fiske y SubbaRow (1925). P₁ = pella de 1.000 x g (núcleos, almidón y debris); P₂ = pella de 12.000 x g (mitocondrias); P₃ = pella de 100.000 x g (microsomos) y S= sobrenadante de 100.000 x g.

proveniente de la variedad Desirée. Sin embargo, este valor de 1,0 no se observa en los homogeneizados en donde se encontró un cociente ATPásico/ADPásico mayor que 1,0 en los períodos iniciales del desarrollo (ver sección 3.2, figura 5).

Liberación de la apirasa asociada al P3.

La fracción microsomal o P3 obtenida en la centrifugación diferencial fue tratada con NaCl 0,5, 1,0 y 2,0 M con el fin de solubilizar la apirasa del P3. Los resultados se muestran en la tabla 6 en donde se puede apreciar que esta apirasa se libera fácilmente con fuerza iónica, incluso con NaCl 0,5 M.

3.5.2. Localización tisular de la apirasa.

Para conocer la distribución de la apirasa a nivel de los diferentes tejidos que constituyen los estolones y tubérculos jóvenes, se emplearon dos metódicas: 1) por impresión de tejido en nitrocelulosa e inmunodetección de la apirasa y 2) por inclusión del material biológico en "paraplast" e inmunodetección por microscopía de luz.

3.5.2.1. Por impresión de tejido en nitrocelulosa.

Se estableció la localización de la apirasa a nivel de órgano total mediante impresión de tejido en nitrocelulosa e inmunodetección, según se describió en la sección 2.11.2.1. Se utilizaron estolones desde 41 días hasta tubérculos jóvenes de

Tabla 6. Solubilización de la apirasa unida a la fracción microsomal.

NaCl M	Solubilizado (%)		Insoluble (%)		Recuperación Total (%)
	ATPasa	ADPasa	ATPasa	ADPasa	
0,5	92,6	89,9	7,4	10,1	75,7
1,0	95,8	97,0	4,2	3,0	81,8
2,0	97,8	98,8	2,2	1,2	92,6

Se consideró 100% a la suma de la actividad apirásica encontrada en el solubilizado más la actividad remanente en la fracción insoluble.

74 días tanto de siembras de verano (A) como de invierno (B). En la figura 20 se puede apreciar que la enzima se concentra en la zona subapical de los estolones hinchados; en cambio, en los tubérculos jóvenes la apirasa se distribuye mayoritariamente en la peridermis (piel) y en la zona cambial. Además, en los tubérculos en desarrollo y en los de mayor grado de madurez, la enzima se inmunodetecta en una menor proporción en el parénquima perimedular y en la zona medular del almacenamiento de almidón. La distribución de la apirasa y la intensidad de la reacción con los anticuerpos antiapirasa es muy reproducible y no se obtuvieron impresiones cuando se empleó como control suero preinmune o bien el complejo antiIgG-peroxidasa.

La resolución por este método no es suficiente para distinguir más detalles tisulares, por lo que se procedió a una inmunocitocalización mediante microscopía de luz.

3.5.2.2. *Por microscopía de luz.*

En este caso, se utilizaron estolones completos y trozos de tubérculos en desarrollo los cuales fueron incluidos en "paraplast" y cortados en secciones de tejido de 7 a 10 μm . La apirasa se identificó por inmunodetección. En la figura 21 a) corresponde a la zona un estolón hinchado de 53 días con una dilución de los anticuerpos antiapirasa de 1:50; b) al mismo tejido pero con una dilución de anticuerpos 1:100; c) a la zona medular de un tubérculo en desarrollo de 84 días y d) a la zona perimedular del mismo tejido del tubérculo de 84 días. Como se

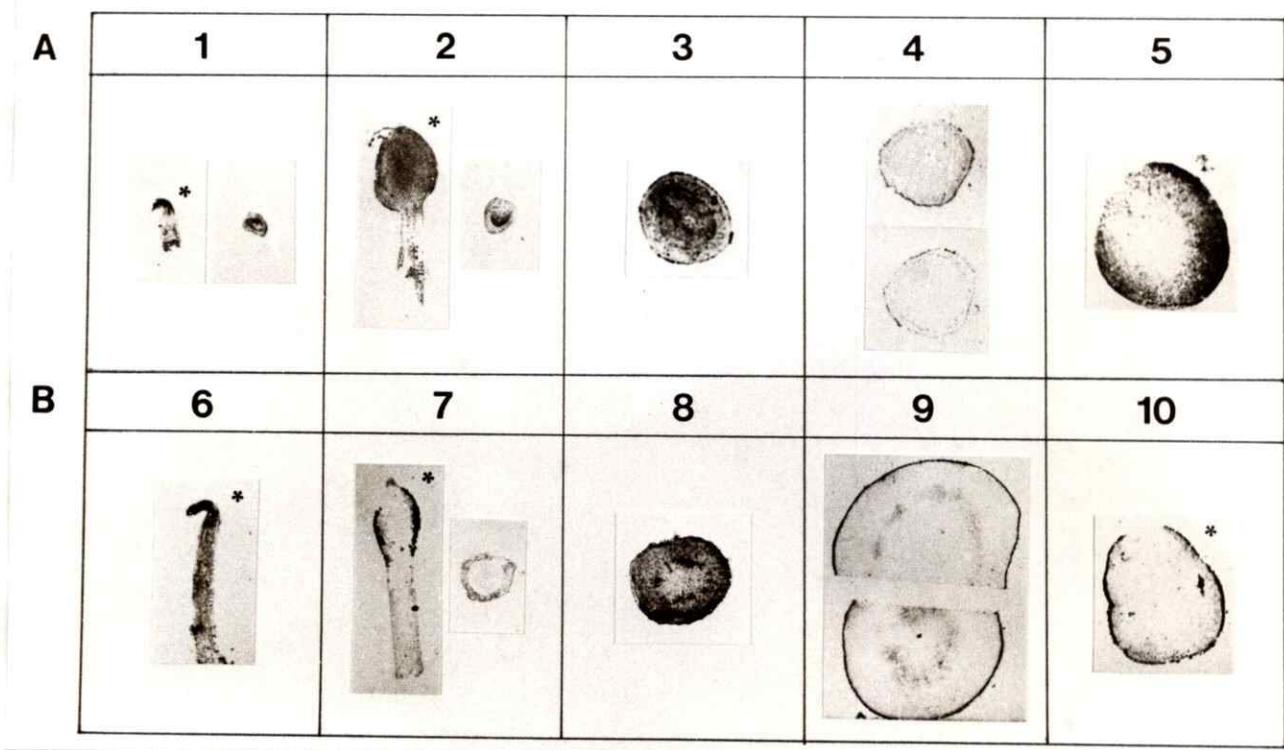


Figura 20. Inmunocitlocalización de la apirasa por impresión de tejido en nitrocelulosa.

Cortes transversales y longitudinales (*) de tejido en diferentes estados de desarrollo se imprimieron en nitrocelulosa y la apirasa se detectó incubando primero con anticuerpos policlonales mono-específicos contra la apirasa diluidos 1:1000 y luego con anticuerpos antiIgG de conejo-peroxidasa diluidos 1:3000 en TBS-Molico 1%. (A) siembra de verano y (B) siembra de invierno. 1) estolón de 41 días de desarrollo ; 2) estolón de 48 días; 3) tubérculo joven de 60 días de desarrollo; 4) de 67 días; 5) de 74 días; 6) estolón de 41 días de desarrollo; 7) estolón de 49 días; 8) tubérculo joven de 56 días de desarrollo; 9) de 70 días; y 10) tubérculo joven de 77 días de desarrollo.

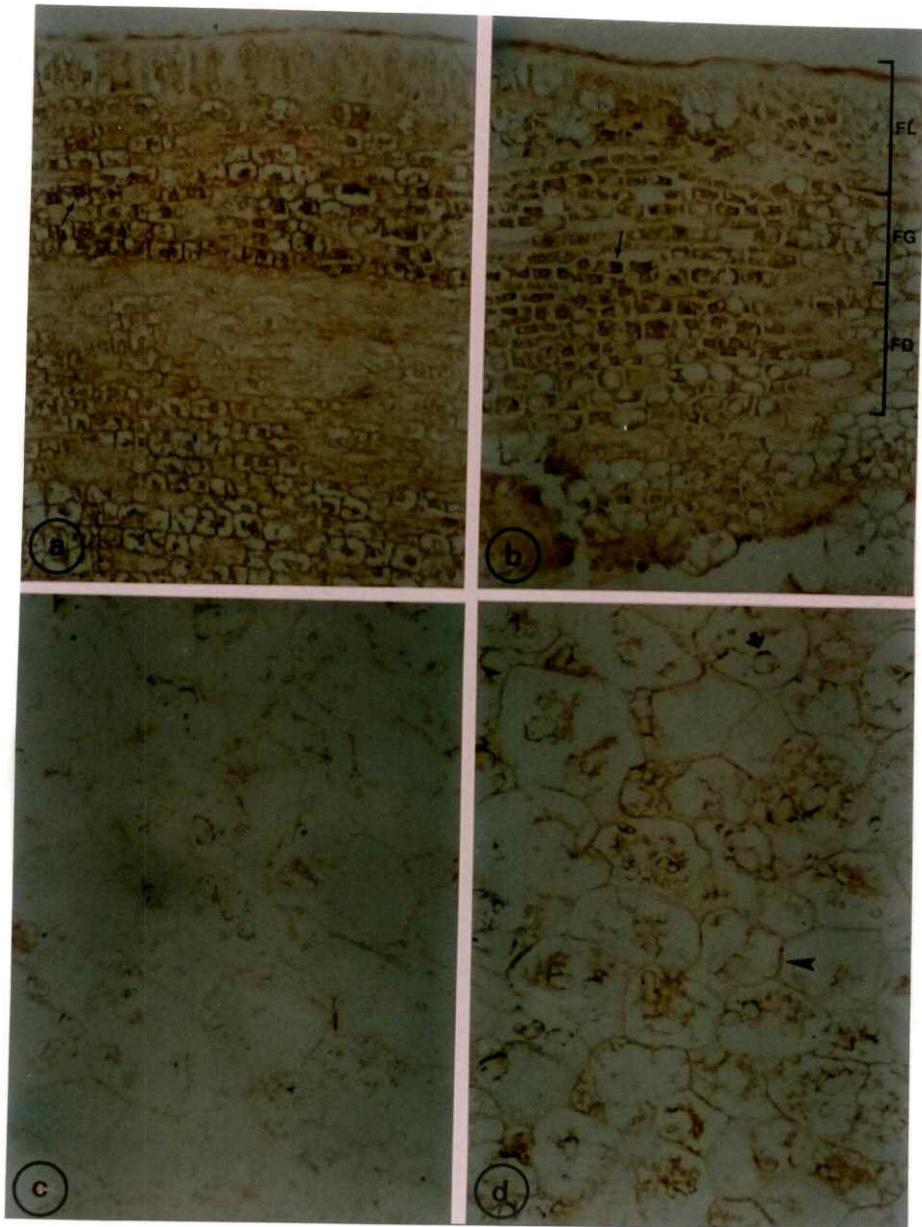


Figura 21. Inmunocitocalización de la apirasa por microscopía de luz.

puede apreciar en las figuras tanto en estolones como en los tubérculos jóvenes, la apirasa se distribuye mayoritariamente en la peridermis, más específicamente en la zona del felógeno. En los tubérculos jóvenes, se observa una distribución importante en la zona perimedular. Hay que destacar que la enzima se localiza en forma bastante específica en las paredes celulares y en los amiloplastos de las células de la zona perimedular. Los controles realizados en esta metódica con suero preinmune tampoco dieron reacción positiva.

3.5.3. Localización intracelular por microscopía electrónica.

La determinación de la localización de la apirasa a nivel ultraestructural se realizó mediante inmunodetección con proteína A-oro coloidal y microscopía electrónica. El tejido utilizado en estos experimentos correspondió a: estolones de 47 y 53 días de desarrollo; peridermis, zona cambial y perimedular de tubérculos jóvenes de 60, 74 y 84 días de desarrollo.

En la figura 22a se muestra un control realizado mediante una incubación con suero preinmune de un corte de tejido de la región subapical de un estolón de 47 días de desarrollo. Es posible observar sólo una partícula de oro en todo el corte (señalado por la flecha). El otro control de esta técnica consistió en incubar solamente con el complejo proteína A-oro coloidal, es decir, en ausencia de los anticuerpos antiapirasa y tampoco se detectó marca. La figura 22a muestra un aspecto celular bastante característico

de un estolón de 47 días: una pared celular gruesa y un citoplasma rico en retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y ribosomas. En esta etapa de desarrollo los amiloplastos están en formación y son muy pequeños y escasos.

En la figura 22b se presenta un corte de la región subapical de un estolón de 47 días que fue incubado con anticuerpos antiapirasa. Se puede apreciar una pared celular gruesa y la apirasa localizada preferentemente en este compartimento celular, además se detecta algunas partículas de oro en el citoplasma. Esta distribución se encontró en todos los tejidos estudiados. En los estolones de 47 días se observó una mayor proporción de partículas de oro que en los otros tejidos lo que estaría dando cuenta de una mayor cantidad de apirasa. Las figuras 22c y 22d muestran cortes de la región subapical de un estolón de 53 días y de la zona cambial de un tubérculo joven de 60 días, respectivamente. En estas fotografías se puede apreciar la distribución preferencial de la apirasa en la pared celular. Además, se encontró que esta enzima, también se distribuye en menor proporción y en forma aparentemente inespecífica en el citoplasma, núcleo y vacuola (figuras 22b,c,d). Esta distribución inespecífica se ilustra en la figura 23a que representa el citoplasma de una célula correspondiente a la peridermis de un tubérculo joven de 60 días. No se encontró apirasa ligada a ninguna membrana; sin embargo, se detectó una interacción con cuerpos proteicos muy abundantes, principalmente en la peridermis (figuras 23a). En

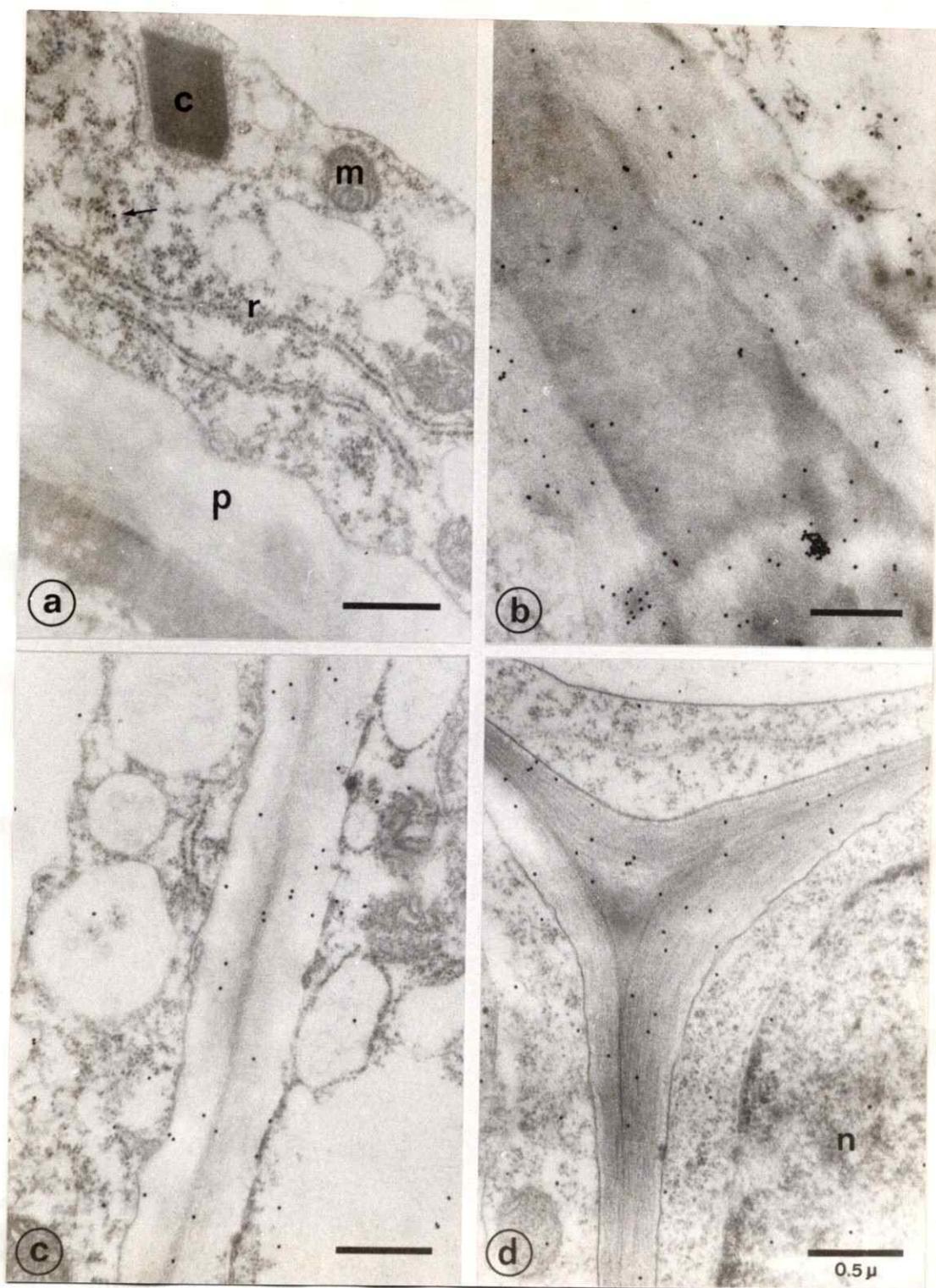


Figura 22. Inmunocitocalización de la apirasa por microscopía electrónica.

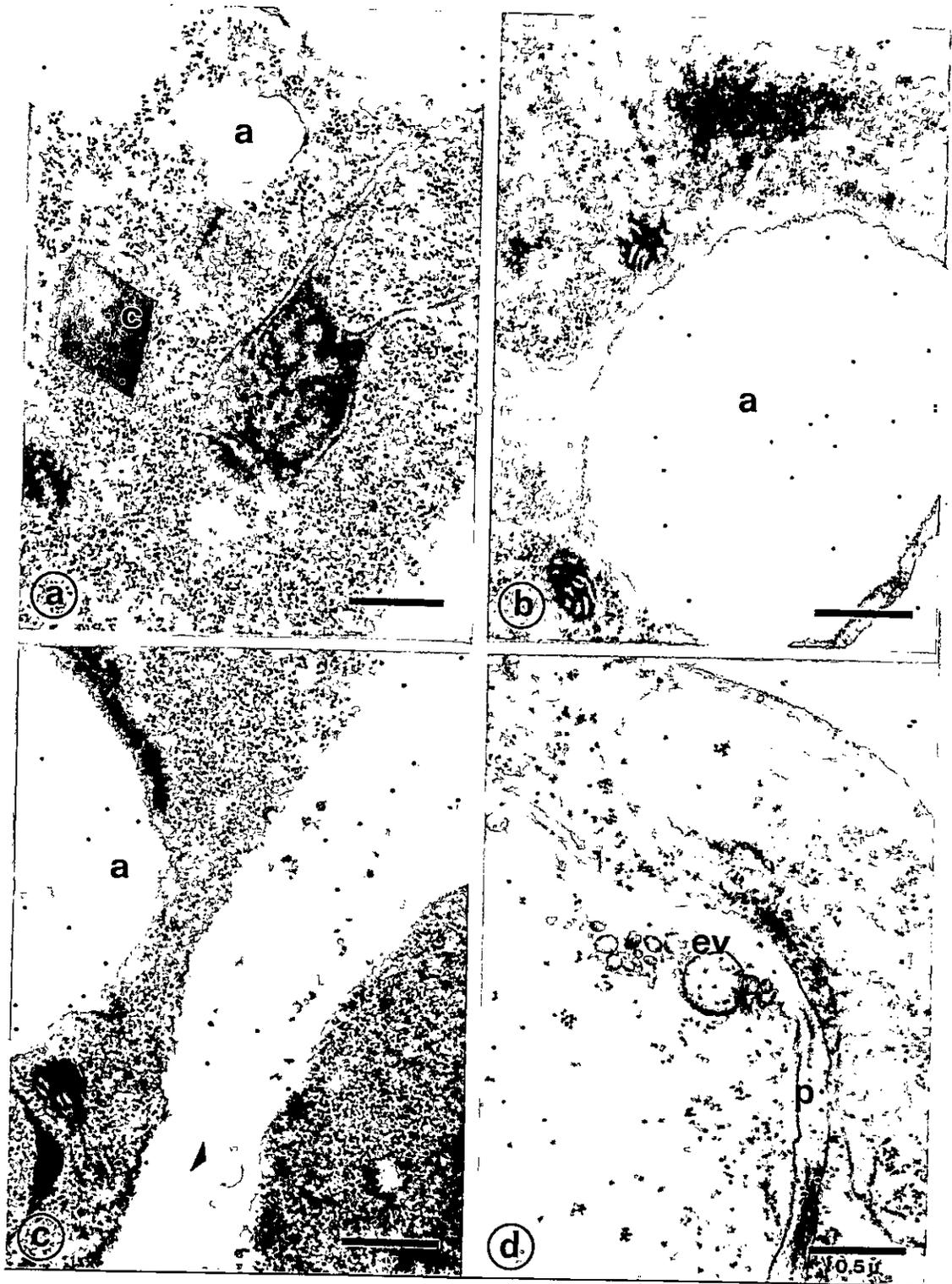


Figura 23. Inmunocitlocalización de la apirasa por microscopía electrónica.

los tubérculos jóvenes más desarrollados se detecta, además, una localización específica dentro de los amiloplastos. Las figuras 23b y 23c muestran esta distribución de la apirasa en cortes correspondientes a células de la zona cambial de un tubérculo de 74 días y de la región perimedular de un tubérculo de 84 días, respectivamente.

En los cortes de tejido correspondientes a la peridermis y a la zona cambial de tubérculos jóvenes se observó la presencia de estructuras vesiculares en las vecindades de la pared celular. En las figuras 23c y 23d se puede apreciar estas estructuras y también es posible detectar partículas de oro que indican la presencia de apirasa dentro y en los alrededores de estas vesículas. A pesar que en la localización tisular de la apirasa por impresión de tejido en nitrocelulosa se encontró una mayor proporción de la enzima en la peridermis, esto no se detectó en el análisis del recuento de las partículas de oro. Sin embargo, es necesario destacar que de acuerdo a un análisis estadístico de la distribución de las partículas de oro en todos los cortes de tejido estudiados, éstas se encuentran en aproximadamente un 70% en la pared celular de las células de la papa.

3.6. Modelos de estudio con sistemas de cultivo de tejido "in vitro".

3.6.1. Obtención de un sistema de estudio "in vitro" de tejido indiferenciado de papa.

Se propuso establecer un sistema de estudio *in vitro* con el fin de disponer de un modelo más controlado que permita comparar el comportamiento de la apirasa *in vivo* e *in vitro*. Esta comparación podría dar algunos indicios sobre la probable relación entre la apirasa y la división y diferenciación celular.

Se cultivaron ápices caulinares de papas maduras brotadas en la oscuridad en el medio basal de Murashigue y Skoog (1962) enriquecido con una serie de otros compuestos descritos en la tabla 1 de la sección 2.12.1. Después de aproximadamente tres meses de incubación, los callos que proliferaron fueron repicados en el mismo medio de cultivo fresco. Se efectuó un máximo de cinco subcultivos cada tres semanas, ya que los callos degeneraron al ser repicados por más tiempo. Es necesario destacar que la concentración de 2,4-D utilizada en el medio fue bastante alta (3,0 mg/L) en comparación con lo descrito en la literatura. Sin embargo, a concentraciones inferiores de 2,4-D (0,1; 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 mg/L) no se obtuvo la desdiferenciación deseada, es decir, la formación de un callo homogéneo bien indiferenciado.

En la figura 24 se muestra la cinética de crecimiento de los callos (de tercer repique) expresada como peso fresco en

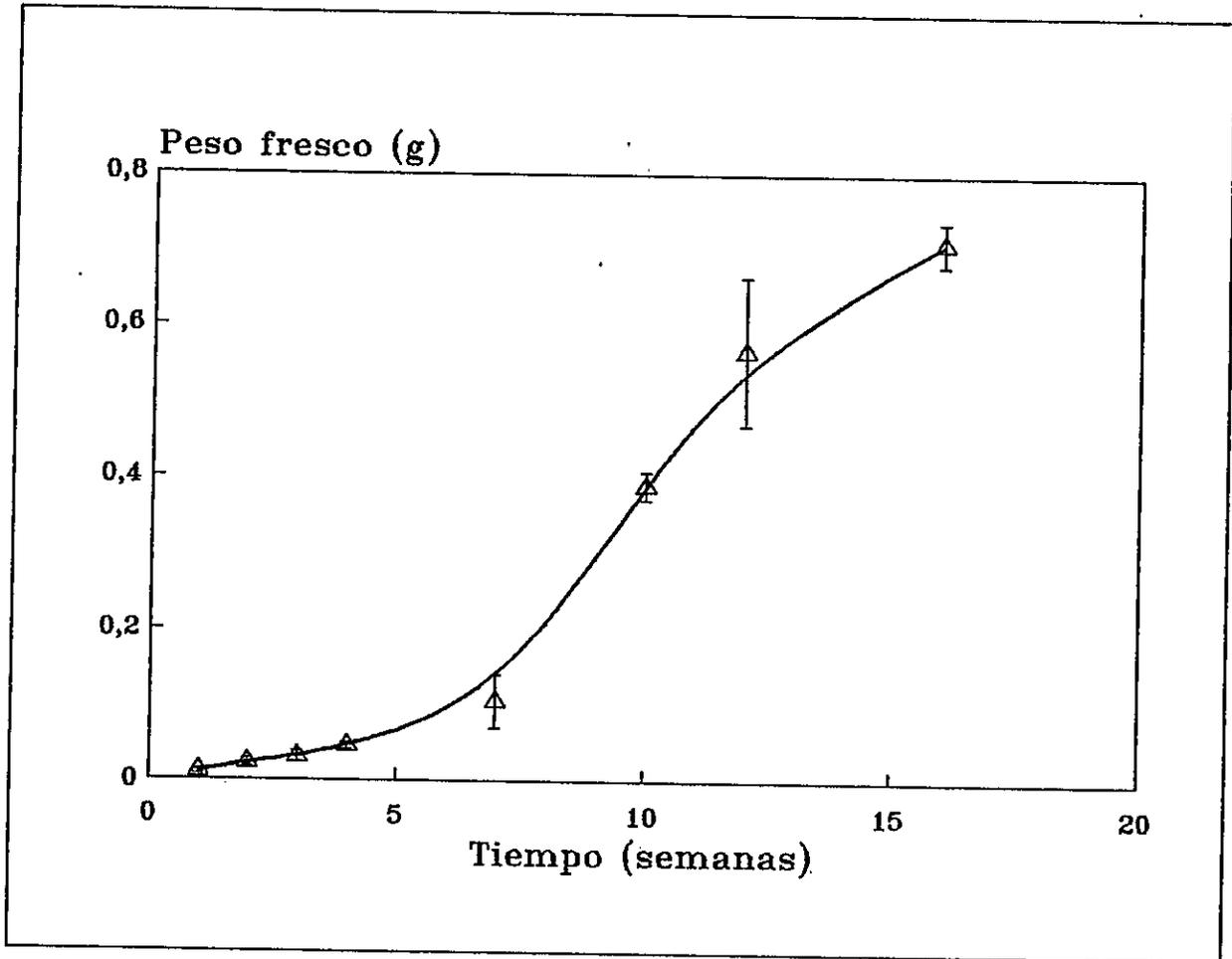


Figura 24. Cinética de crecimiento de callos de *S. tuberosum*.

Callos obtenidos a partir del cultivo de ápices caulinares de papas brotadas en oscuridad en las condiciones descritas en la sección 2.12.1. Los resultados se expresan como peso fresco en función del tiempo de cultivo. El contenido de agua es constante y de un $90,3\% \pm 3,3\%$.

función del tiempo. Al determinar el peso seco de estos tejidos se pudo establecer que el contenido de agua es de $90,3\% \pm 3,3\%$ y resultó ser constante durante todo el tiempo estudiado. Se puede concluir que el crecimiento de los callos de papa es bastante lento. Sin embargo, luego del segundo subcultivo este crecimiento es más rápido.

3.6.2. Diferenciación a tallos y/o raíces y formación de microtubérculos.

Los primeros callos obtenidos a partir de los ápices caulinares cultivados por más de cuatro meses comenzaron a diferenciarse a brotes y/o raíces formando incluso microtubérculos en forma espontánea en presencia de 2,4-D (figuras 25a, b y c). El 2,4-D es un herbicida y constituye una auxina sintética muy estable que induce indiferenciación. Cabe hacer notar que esta respuesta morfogénica, es decir, la diferenciación espontánea en diferentes órganos en presencia de 2,4-D se observó solamente en los primeros callos obtenidos. Posteriormente se obtuvo un material de trabajo que consistió en un tejido que fue incapaz de diferenciarse espontáneamente en presencia de 2,4-D y que permaneció en el estado de callo. Este material es el que se utilizó (figura 24) en todos los experimentos posteriores.

Por otra parte, se establecieron las condiciones de cultivo a partir de trozos de tallo, logrados en la diferenciación espontánea, para favorecer la formación de

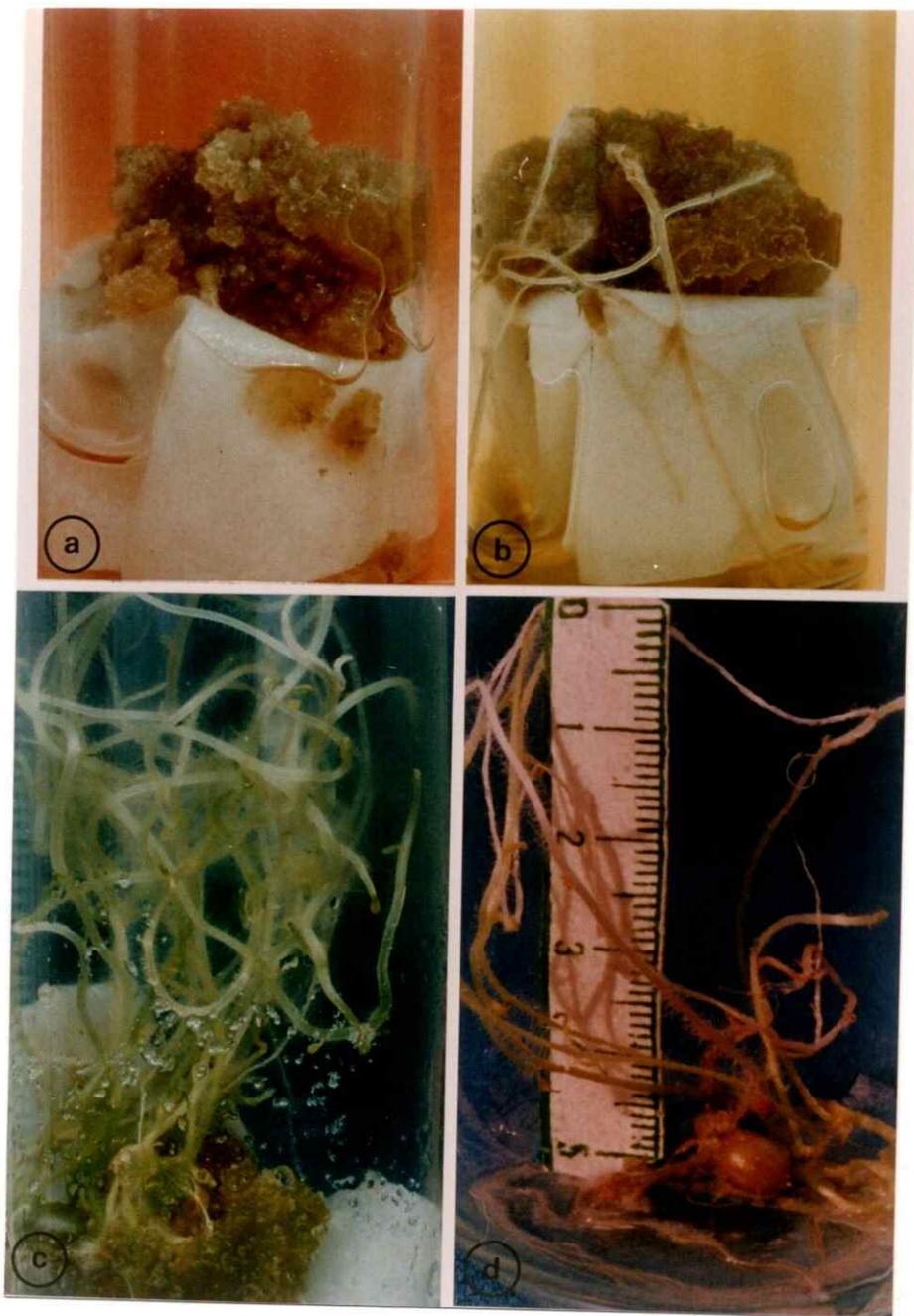


Figura 25. Organogénesis de los cultivos *in vitro*.

Las condiciones de cultivo fueron: fotoperíodo de 16 h de luz y 8 de oscuridad; intensidad lumínica de 3.000 Lux; humedad relativa entre un 20 a 40% y 25°C de temperatura.

a) callo, tejido indiferenciado de 15 semanas; b) diferenciación espontánea a raíces; c) a brotes y tallos, en presencia de 2,4-D; d) formación de microtubérculos en ausencia de 2,4-D y en 5% de sacarosa.

microtubérculos *in vitro*. Se utilizó el mismo medio descrito en la tabla 1 pero en ausencia de 2,4-D y con un 5% de sacarosa, ya que ésta induce el proceso de tuberización (Hussey y Stacey, 1984). En este medio se logró la producción de microtubérculos en un mes de cultivo en las condiciones descritas en la sección 2.12.1. Los resultados logrados se muestran en la figura 25d. De este modo se logró disponer de una planta completa de papa crecida *in vitro*.

3.6.3. Identificación de la apirasa en las diferentes partes de planta obtenida "in vitro".

Con el objetivo de establecer si la apirasa se encontraba en otras partes de la planta cultivada *in vitro* y así aclarar si esta enzima presenta o no una especificidad a un determinado órgano, se prepararon homogeneizados de tallos, hojas, raíces y microtubérculos y se realizó una SDS-PAGE. En cada caso se agregó al gel igual concentración de proteínas totales. En la figura 26 se muestra las diferencias en el patrón proteico de cada uno de estos homogeneizados. Se observa una proteína de aproximadamente 57,0 kDa que aparece en todos los homogeneizados, siendo más abundante en el de hoja y mucho menor en el de raíces, donde casi no se aprecia. Esta proteína no corresponde a apirasa, ya que ésta última tiene una migración levemente mayor según lo indica el estándar de apirasa homogénea (figura 26).

Para una mejor identificación de la apirasa se realizó

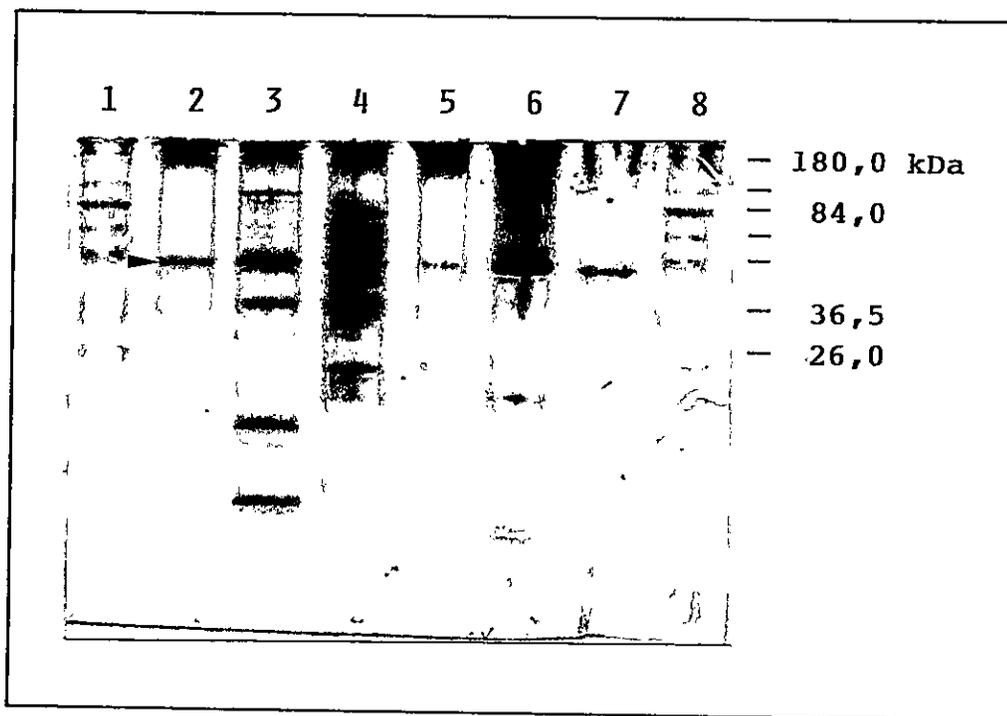


Figura 26. Identificación de la apirasa en homogeneizados de las distintas partes de la planta cultivada *in vitro* por SDS-PAGE.

Los homogeneizados se prepararon según se describe en la sección 2.12.1 y las proteínas se midieron por el método de Bradford (1976). Se colocaron alícuotas equivalentes a 20 μ g de proteínas totales de cada uno de los homogeneizados.

1) estándares de masa molecular; 2) homogeneizado de tallo (1,02 mg de proteínas/g de tejido fresco); 3) de microtubérculos (0,54 mg de proteínas/g de tejido fresco); 4) de hojas (4,76 mg de proteínas/g de tejido fresco); 5) de raíces (1,94 mg de proteínas/g de tejido fresco); 6) de callo (1,24 mg de proteínas/g de tejido fresco); 7) estándar de apirasa Desirée y 8) estándares de masa molecular. (\blacktriangleright) señala la proteína de 57 kDa. Las proteínas se tiñieron con azul de Coomassie.

una electrotransferencia de este SDS-PAGE e inmunodetección de la apirasa. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 27 en donde se puede apreciar que en el homogeneizado de microtubérculos hay una banda que reacciona intensamente con los anticuerpos antiapirasa cuya masa molecular es de 34,0 kDa. Las otras bandas más débiles corresponden a reacciones inespecíficas de los anticuerpos obtenidos en conejo. La proteína de 34,0 kDa podría corresponder a otra forma de apirasa o bien a un producto de degradación de ésta, a pesar que el amortiguador con que se obtuvo el homogeneizado contenía PMSF. Para descartar una de estas dos posibilidades se preparó un homogeneizado directamente en el amortiguador en que se prepara la muestra para el SDS-PAGE (sección 2.12.2.). La inmunodetección de apirasa luego de la transferencia se hizo utilizando anticuerpos policlonales monoespecíficos antiapirasa preparados recientemente en conejos. Se comprobó que efectivamente los microtubérculos tienen otra forma de apirasa de menor masa molecular que la apirasa de tubérculos crecidos *in vivo* (50,0 kDa). Las condiciones de extracción y detección de apirasa fueron repetidas para las otras partes de la planta *in vitro* encontrándose que no hay apirasa inmunodetectable.

Un aspecto interesante de destacar es que la apirasa en los microtubérculos se detecta sólo cuando están recién formados, en aquellos que están más maduros o brotados, la enzima no se inmunodetectó.

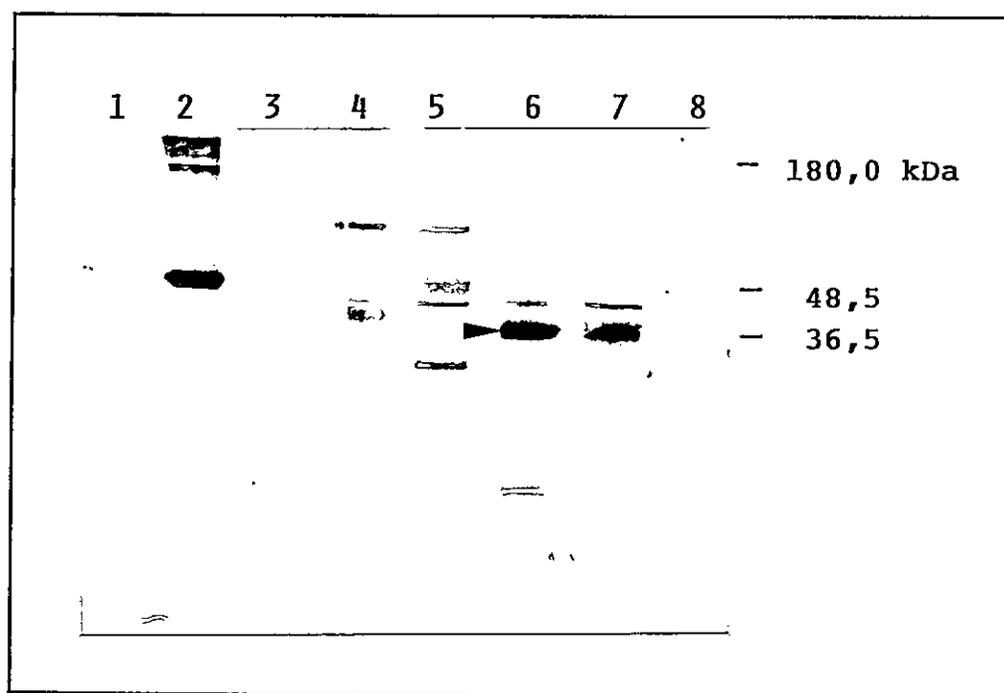


Figura 27. Inmunodetección de la apirasa en los homogeneizados de las distintas partes de la planta cultivada *in vitro*.

Las proteínas separadas por el gel SDS-PAGE de la figura 26 se transfirieron a nitrocelulosa y la apirasa se detectó con anticuerpos antiapirasa diluïdos 1:1000 y anticuerpos antiIgG de conejo-peroxidasa diluïdos 1:3.000.

1) estándares de masa molecular; 2) estándar de apirasa homogénea; 3) homogeneizado de callo; 4) de raíces; 5) de hojas; 6) de microtubérculos; 7) de tallos y 8) estándares de masa molecular.

(➤) señala la apirasa de 34,0 kDa en el homogeneizados de microtubérculos.

3.6.4. Obtención de un cultivo homogéneo de células en suspensión en activa división celular.

El objetivo de obtener una suspensión celular fue disponer de un sistema más específico y controlado para el estudio de la división y diferenciación celular en forma separada. La suspensión celular se obtuvo por disrupción mecánica de los callos de papa cultivados en el medio descrito en la tabla 1. El cultivo sincrónico se logró repicando dos veces a la semana en 30 mL de medio de cultivo y agitación continua y así se disminuyó la formación de agregados. Es importante hacer notar que la temperatura y la agitación a la cual se realiza el cultivo son factores críticos en lograr la suspensión de células indiferenciadas de papa. A partir de este cultivo homogéneo y sincrónico se realizaron los experimentos de citodiferenciación *in vitro*.

3.6.5. Inducción de citodiferenciación "in vitro" en suspensiones celulares homogéneas.

El objetivo de estos experimentos fue construir un modelo para poder apreciar la diferenciación celular a un nivel bioquímico, y verificar los posibles cambios en la expresión de la apirasa. En la figura 28 se muestra una SDS-PAGE de suspensiones celulares de callo sometidas a diferentes tratamientos inductores de tuberización y por lo tanto, de la diferenciación celular. Es necesario indicar que se efectuó un recuento celular antes y después de cada tratamiento con los

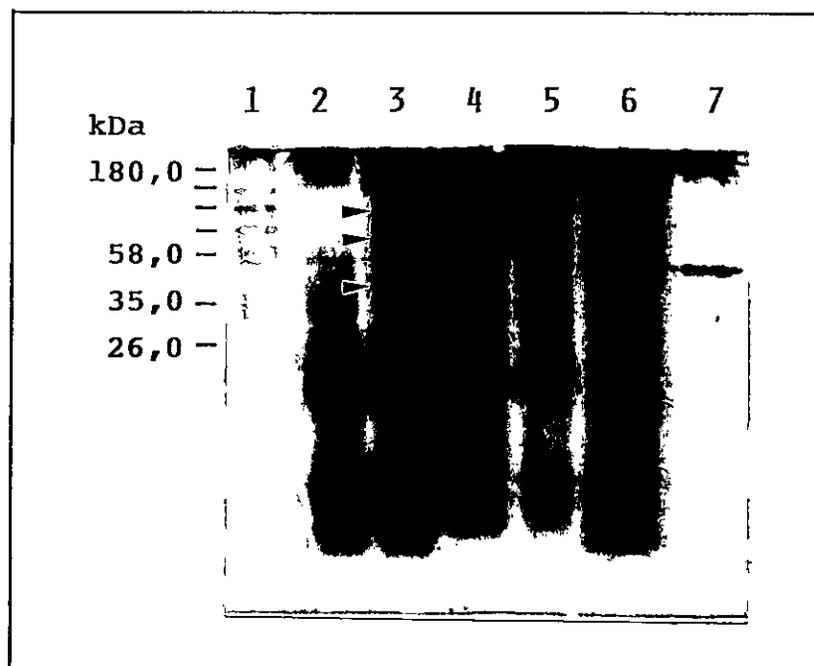


Figura 28. Inducción de citodiferenciación *in vitro* en suspensiones celulares e identificación de la apirasa en un SDS-PAGE.

Las suspensiones celulares se obtuvieron por disrupción mecánica de callos como se describe en la sección 2.12.3., se trataron con diferentes condiciones inductoras de tuberización y se prepararon homogeneizados según la sección 2.12.3.1. En todos los homogeneizados la cantidad de proteínas fue aproximadamente constante de $0,89 \text{ mg/l} \times 10^8$ células, medidas por el método de Bradford (1976). Se colocaron alícuotas equivalentes a $20 \mu\text{g}$ de proteínas totales de cada homogeneizado.

1) estándares de masa molecular; 2) homogeneizado control de células en presencia de $3,0 \text{ mg/mL}$ de 2,4-D; 3) tratamiento con cinetina $3,5 \text{ mg/mL}$ por 24 h; 4) tratamiento con cinetina $3,5 \text{ mg/mL}$ por 48 h; 5) tratamiento con NAA 10 mg/mL por 24 h; 6) tratamiento con NAA 10 mg/mL más BA $1,0 \text{ mg/mL}$ por 24 h; 7) $6 \mu\text{g}$ de apirasa homogénea.

(\blacktriangleright) indica nuevas bandas de proteínas con respecto al control.

diferentes agentes inductores, encontrándose que no hay variación en el número de células. Estos tratamientos inductores de tuberización en *S. tuberosum* fueron seleccionados de acuerdo a la literatura según Palmer y Smith (1970) y Ahmed y Sagar (1981) y consistieron en: cinetina 3,5 mg/L, NAA 10 mg/L más BA 1,0 mg/L y NAA 10 mg/L. En esta figura se puede apreciar que en el homogeneizado de células indiferenciadas (control), al igual que en el extracto de callo (figura 26), hay una menor cantidad de bandas de proteínas, a pesar de que se agregó la misma cantidad de proteínas en todos los casos. En el caso de las células tratadas con hormonas se observa la aparición de algunas bandas de proteínas que no se detectan en el homogeneizado control (figura 28). Una observación importante de destacar es que en los homogeneizados de células inducidas hormonalmente se aprecia una banda de proteínas que migra a la misma masa molecular que el estándar de apirasa homogénea. Esta banda no se observa en el extracto de células indiferenciadas.

Para corroborar esta apreciación se realizó una electrotransferencia de este SDS-PAGE (figura 28) con posterior inmunodetección de la apirasa. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 29, en donde se puede visualizar que en el homogeneizado control (sin tratamiento hormonal) no hay apirasa inmunodetectable. Aunque los anticuerpos utilizados en el experimento no eran monoespecíficos contra la apirasa, en los homogeneizados de las células inducidas hormonalmente se ve

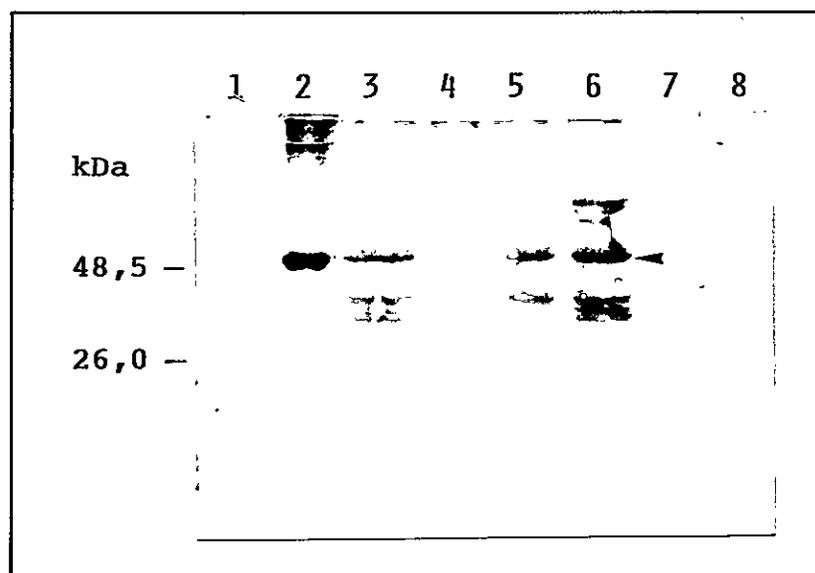


Figura 29. Inducción de citodiferenciación *in vitro* en suspensiones celulares e inmunodetección de la apirasa.

Las proteínas separadas por el gel SDS-PAGE de la figura 28 fueron transferidas a nitrocelulosa y la apirasa se inmunodetectó con anticuerpos antiapirasa diluïdos 1:1000 y luego con anticuerpos antiIgG de conejo diluïdos 1:3000.

1) estándares de masa molecular; 2) estándar de apirasa homogénea; 3) tratamiento con NAA 10 mg/mL más BA 1,0 mg/mL por 24 h; 4) tratamiento con NAA 10 mg/mL por 24 h; 5) tratamiento con cinetina 3,5 mg/mL por 24 h; 6) tratamiento con cinetina 3,5 mg/mL por 48 h; 7) homogeneizado control de células en presencia de 3,0 mg/mL de 2,4-D; 8) estándares de masa molecular. (➤) indica la banda correspondiente a la apirasa.

una fuerte reacción con una banda que migra conjuntamente con el estándar de apirasa. Sin embargo, en el caso de las células tratadas sólo con NAA 10 mg/L prácticamente no se detecta reacción con los anticuerpos antiapirasa. Por otra parte, hay que destacar que el patrón proteico en las células inducidas con cinetina 3,5 mg/L no varió entre las 24 y 48 h de tratamiento. Esto implica que con 24 h de tratamiento es suficiente para detectar la presencia de apirasa en estas células.

Con el objetivo de descartar una estimulación inespecífica de la expresión génica por las fitohormonas (Willmitzer y cols., 1990) se efectuó un experimento de inducción de células de papa sólo en presencia de sacarosa 10%. Se encontró que a las 24 h de tratamiento hay aparición de una banda que migra conjuntamente con la apirasa usada como estándar. Este hecho no se observó en el control que correspondió al mismo descrito anteriormente (resultados no mostrados).

4. DISCUSION

La tuberización es un proceso fisiológico en el cual el estolón, que es un tallo especializado, se diferencia en un órgano de almacenamiento dando origen al tubérculo (Vreugdenhil y Struick, 1989; Ewing, 1990). Para el estudio de la tuberización a nivel molecular, se requiere del conocimiento de la secuencia cronológica de los eventos bioquímicos que están sucediendo durante este período. En este trabajo se ha propuesto que la apirasa, por su actividad ADPásica, podría estar participando en el proceso de desencadenamiento de la tuberización y por lo tanto constituir un buen marcador molecular de este proceso. De acuerdo a esta hipótesis, la primera interrogante que se planteó fue: *¿Se encuentra regulada la actividad apirásica en el proceso de tuberización desde sus inicios?*

4.1. Regulación de la actividad apirásica durante el desarrollo del tubérculo de S. tuberosum.

El estudio de la regulación de la actividad apirásica se abordó durante todo el desarrollo del tubérculo hasta su madurez mediante la determinación de las proteínas totales, medición de la actividad enzimática y cuantificación de la masa de apirasa. Además, se estudió el efecto de las proteínas moduladoras de la actividad apirásica, las se purificaron parcialmente y se caracterizaron a fin de relacionarlas con una posible función fisiológica de la apirasa.

4.1.1. Proteínas totales, actividad apirásica y cuantificación de esta enzima durante el desarrollo de la papa.

Estudios efectuados con anterioridad en este laboratorio con siembras de papas de invierno y de verano (Fanta y cols., 1988; Anich y cols., 1990, respectivamente) parecieron indicar que existían cambios en la actividad apirásica (ATPasa-ADPasa) durante el desarrollo del tubérculo hasta su madurez. Estos cambios ocurrían alrededor de los 100 días y la mantención o disminución de la actividad apirásica dependía del período del año en que se había efectuado la siembra (invierno o verano). En estos estudios se trabajó con tubérculos jóvenes desde los 75 días de desarrollo hasta su madurez (140 días). El período inicial de la tuberización es difícil de definir, pero se considera que empieza cuando el tubérculo madre se pone bajo tierra. Sin embargo, el inicio de la tuberización depende, además, de variados factores como: temperatura, fotoperíodo, fertilizantes, etc, ((Quick y cols., 1979; Ewing, 1981; Krauss y Marschner, 1982; Reynolds y Ewing, 1989; Lorenzen y Ewing, 1990, Cutter, 1992). Por otra parte, la tuberización es un proceso complejo en que se evidencian cambios en la morfología y desarrollo de toda la planta, como también se han descrito alteraciones drásticas en el metabolismo y distribución de los fotosintetatos (Engels y Marschner, 1986; Vreugdenhil y Struik, 1989; Lorenzen y Ewing, 1990; Ewing 1990).

En el estudio de esta tesis se han definido cuatro estados en el desarrollo del tubérculo: 1) estolones sin hinchar, son aquellos que pueden ser inducidos fisiológicamente a tuberizar; 2) estolones en los cuales se ha iniciado el proceso de tuberización; 3) tubérculos jóvenes, en desarrollo y 4) tubérculos con más de 100 días después de la siembra.

En la figura 4, se destacó que la mayor concentración de proteínas se obtiene en el período inicial de la tuberización. En cambio, la mayor actividad apirásica, expresada tanto como actividad específica o en U/g de tejido fresco, se detectó en los estolones totalmente inducidos (49 días de desarrollo), es decir, al desencadenarse la tuberización (figura 5). Esta mayor actividad apirásica es coincidente con una mayor masa de la enzima, lo cual podría indicar que la apirasa sufriría una estimulación en su expresión génica durante este período. Se ha descrito que el período inicial de la tuberización se caracteriza por cambios de expresión génica en que se observa una estimulación en la síntesis de algunas proteínas características (Duncan y Ewing, 1984; Vreugdenhil y Struik, 1989; Willmitzer y cols., 1990; Park, 1990; Hannapel, 1991; Taylor y cols., 1991; Taylor y cols., 1992a,b). Sin embargo, aún en la papa no se ha logrado identificar un gen que sólo se exprese durante el inicio de la tuberización. Uno de los principales obstáculos en estos estudios es el desconocimiento sobre en qué momento es el

inicio de la tuberización en cada uno de los estolones de una misma planta, es decir, sólo se ha apreciado que la conducta de los estolones individuales de una planta es variable y el comienzo de la tuberización en los estolones no ocurre simultáneamente, ni ordenadamente sino que, según la literatura, probablemente dependería de una competencia por el suministro de fotosintetatos (Engels y Marschner, 1986). Una de las proteínas que aumenta su concentración al desencadenarse la tuberización es la apirasa, ya que su actividad aumenta en el momento de producirse el hinchamiento o inducción de los estolones. Este hecho podría estar condicionado a un control a nivel de la transcripción del gen, como ocurre con otras proteínas ya identificadas en el tubérculo. Estas proteínas son las proteínas I y II, inhibidoras de proteasas (Keil y cols., 1989); la patatina (Park, 1990); la α -tubulina (Taylor y cols., 1991); una familia de proteínas de 22,0 kDa (Hannapel, 1991)), la aglutinina (Pont-Lezica y cols., 1991) y la S-adenosilmetionina descarboxilasa (Taylor y cols., 1992a). Además, es posible que aumenten algunas actividades ATPásicas como la H^+ -ATPasa, la Ca^{+2}, Mg^{+2} -ATPasa que podrían dar cuenta del cociente de hidrólisis ATPásico/ADPásico de 3,5 encontrado en los homogeneizados de las etapas iniciales de tuberización, ya que la apirasa var Desirée, se caracteriza por un cociente ATPásico/ADPásico de 1,0.

Alrededor de los 100 días después de la siembra se

observó un segundo aumento en la actividad apirásica que no es coincidente con un aumento en la masa de la enzima (figura 5). Este período se caracteriza porque la concentración de proteínas y de almidón ha alcanzado un nivel constante. Un tubérculo de 90 a 100 días pesa aproximadamente 50 g y es a partir de este momento cuando se produce el aumento de volumen más dramático en el desarrollo del tubérculo, el que alcanza un peso cercano a 250 g a los 140 días (papa madura). Este crecimiento da cuenta de la forma del tubérculo, la que puede ser redonda, ovalada u oblonga, dependiendo del balance entre el crecimiento en longitud y grosor, lo cual es característico de la variedad. Se ha encontrado que este crecimiento está, principalmente, dado por alargamiento celular, ya que se ha detectado un aumento en el número de células sólo en la región perimedular del tubérculo (Cutter, 1992).

Por otra parte, se siguió la actividad apirásica en papas maduras que empiezan a brotar (tubérculos madres) y debido a que dicha actividad disminuye hasta hacerse insignificante, se descartó la participación de la apirasa en esta etapa (figura 6). Estos resultados concuerdan con el hecho que el tubérculo madre está degradando su material de reserva y movilizándolo en metabolitos y hormonas para favorecer el desarrollo y crecimiento del follaje de la nueva planta (Bailey y cols., 1978; Abdala de Bottini y Tizio, 1981; Cutter, 1992).

Por lo tanto, estos resultados indicarían que la actividad apirásica estaría regulada desde los inicios de la tuberización para continuar durante el desarrollo del tubérculo. Su función principal estaría relacionada con algunos eventos característicos del comienzo de la tuberización, como también con el aumento del volumen del tubérculo. Este hecho experimental (figura 5) apoyaría la hipótesis de trabajo planteada en esta tesis.

Esta regulación de la actividad apirásica está dada no sólo por cambios en la masa de la enzima durante el desarrollo del tubérculo, sino además por la regulación cinética efectuada por dos proteínas moduladoras (Mancilla y cols., 1987). En este trabajo de tesis se encontró que estas proteínas moduladoras (activadora e inhibidora) estaban presente en el tejido de papa desde sus etapas iniciales hasta la madurez (tabla 3). Aparentemente, la proporción entre estas dos proteínas no varía durante el desarrollo, ya que el porcentaje de estimulación de la actividad apirásica es muy parejo durante el período estudiado. Por lo tanto, se intentó purificar estas proteínas moduladoras con el fin de cuantificarlas, localizarlas y caracterizarlas para relacionarlas con la posible función propuesta para la apirasa.

4.1.2. Purificación de las proteínas moduladoras de la actividad apirásica.

La presencia de las dos proteínas moduladoras de la actividad apirásica fue descrita en este laboratorio (Mancilla y cols., 1987). Una de ellas es activadora y la otra inhibidora. Cabe señalar que este hallazgo se hizo en papas maduras de 140 días. Ambas proteínas son estables al calor y su efecto modulador es independiente de calcio. La proteína activadora es diferente de la calmodulina debido a que no es capaz de activar a la fosfodiesterasa y eluye con alta fuerza iónica en una columna de TFP-Sepharosa (Mancilla y cols., 1987).

Las diferentes estrategias de purificación para estas proteínas moduladoras abordadas en esta tesis, no llevaron este proceso a la purificación final con material suficiente para un estudio más acabado, debido a que se obtuvieron preparaciones de baja concentración proteica y esta situación provocó una inestabilidad de las proteínas moduladoras. Sin embargo, se lograron algunos resultados de purificación con las cromatografías de afinidad en que se aprovechó la interacción de las proteínas moduladoras con la apirasa unida a matrices sólidas. Estas cromatografías fueron las más resolutivas y las fracciones moduladoras obtenidas las más estables. Con estas metódicas empleadas no se logró purificar a homogeneidad la proteína activadora, pero ésto sí fue logrado con la proteína inhibidora. Los resultados presentados

en la tabla 5, parecen indicar que la proteína activadora tiene una menor afinidad por la columna de SiCl₈-apirasa que la inhibidora. Esto podría indicar que el grado de interacción de estas dos proteínas con la apirasa es diferente. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de una interacción directa e inespecífica de la proteína activadora con los grupos silanol libres, lo que facilitaría su elución (Chiong y cols., 1991). Se ha descrito que las condiciones de pH extremo, fuerza iónica alta y alteraciones en la constante dieléctrica no afectan la unión de una proteína a la matriz sólida (Chiong y cols., 1991). Pero, el uso repetido de esta columna de SiCl₈-apirasa afectó la capacidad de interacción de la apirasa con las proteínas moduladoras, las que no fueron retenidas por la columna. Por lo tanto, se descartó el uso de una columna de SiCl₈-apirasa con fines preparativos debido al alto costo que implicaba su síntesis, ya que era necesario utilizar apirasa homogénea.

Debido a la baja estabilidad de las fracciones moduladoras más puras (menor concentración proteica), fue necesario usar fracciones menos purificadas para su caracterización (Fr-50) lo que dio mejores resultados ya que la concentración proteica fue superior a 3,0 mg/mL. Además, algunos parámetros pudieron ser corroborados con fracciones más purificadas provenientes de los eluidos de las columnas de CM-celulosa-apirasa y SiCl₈-apirasa. También, se caracterizaron las proteínas moduladoras de preparaciones de la Fr-50 provenientes de papas var Ultimus.

4.1.3. Caracterización de las proteínas moduladoras de la actividad apirásica.

Se encontró en este laboratorio que las proteínas moduladoras estaban presentes en una misma preparación de tubérculos de papa llamada Fr-50. Si se medía la estimulación de la actividad apirásica en relación con la concentración de proteínas de la Fr-50 se encontraba que la estimulación aumentaba proporcionalmente con la concentración proteica, pero hasta cierto límite sobre el cual se empieza a evidenciar una inhibición de la actividad (figura 14). Ambas actividades moduladoras de la apirasa fueron separadas posteriormente por cromatografía de una Fr-50 en TFP-Sepharose (figura 11).

También, se ha observado que el contenido de las proteínas moduladoras de la Fr-50 varía mucho en concordancia con el período del año en que procedan las papas, es decir, si la siembra es de verano o de invierno. Así se ha visto que si la preparación de la Fr-50 es originaria de una siembra de verano el contenido de la proteína activadora es el doble del de una siembra de invierno. En algunos casos esta variación es tan marcada que una de ellas no se detecta, aunque lo frecuente es que ambas estén presente. Estas variaciones estacionales que se observan en la concentración de las proteínas moduladoras han sugerido que sea una sola entidad proteica que pueda sufrir de algún modo variaciones estacionales pero que originalmente tenga la capacidad para aumentar o disminuir la actividad apirásica.

Los primeros pasos para aclarar esta interrogante fueron dados en el sentido de aislar estas actividades moduladoras para conocer algunas características que las diferencian entre sí. Ambas actividades moduladoras comparten el ser termoestables (resisten 5 min de calentamiento a 100°C) lo cual es aprovechado en la preparación de la Fr-50.

Con el propósito de obtener fracciones más estables y un mayor rendimiento se efectuó una preparación de la Fr-50 en presencia de PMSF (inactivador de seril proteasas). Sin embargo, esta preparación de la Fr-50 con PMSF resultó totalmente inactiva en cuanto a inhibir o estimular la actividad apirásica. Se corroboró este resultado preparando una Fr-50 en ausencia de PMSF que activaba normalmente la apirasa pero al agregar al medio de ensayo el PMSF la modulación desaparecía completamente. Una posible explicación a este efecto del PMSF sería la probable participación de residuos hidroxílicos involucrados en la interacción apirasa-proteína activadora. No se puede descartar la posibilidad que la proteína activadora sea una seril proteasa que es inhibida por el PMSF, sin embargo será necesario realizar otro tipo de experimentos para demostrarlo.

La primera prueba que las proteínas moduladoras son diferentes es que tienen distinta masa molecular: la activadora le corresponde una de 15,0 kDa y la inhibidora de 58,0 kDa (figura 13 y figuras 16a,b). La masa molecular de la proteína inhibidora se determinó por dos métodos: filtración

en gel y SDS-PAGE. Además, las proteínas moduladoras provenientes de la var *Ultimus* presentan las mismas masas moleculares que las de la var *Desirée*, determinadas por filtración en gel.

El punto isoeléctrico de la proteína activadora es bastante alcalino (9,0) y podría favorecer la interacción con la apirasa, ya que esta última tiene un pI de 6,7. Un aspecto interesante que cabe hacer notar es que ha sido posible detectar el complejo apirasa-proteína activadora. Esto se pudo visualizar a través de la electrotransferencia de un gel SDS-PAGE o bien de un gel de electroenfoque a papel de nitrocelulosa, luego preincubación de éste con apirasa e inmunodetección del complejo proteína activadora-apirasa con anticuerpos antiapirasa (figura 8 y figura 18). Los anticuerpos antiapirasa no reconocen directamente a la proteína activadora. Estos resultados respaldan la interacción entre la apirasa y su proteína activadora. También como se aprecia en la figura 18, ocurre interacción de la apirasa desnaturalada (presente en la Fr-50) con los anticuerpos antiapirasa.

Las proteínas moduladoras están en la fracción soluble celular según los resultados obtenidos con preparaciones de la Fr-50 tanto de fracciones microsomales como de sobrenadantes de 100.000 x g (figuras 14). El efecto estimulador de la actividad apirásica encontrado en la fracción microsomal es fácilmente solubilizado con fuerza iónica (NaCl 1,0 M), lo que

estaría indicando que se trata de una interacción inespecífica. Esta distribución subcelular (sobrenadante de 100.000 x g) de las proteínas moduladoras es la misma que se ha encontrado para la apirasa (sección 4.2; figura 19), donde se aprecia que la apirasa es una enzima esencialmente soluble.

Al estudiar el efecto de la proteína activadora sobre los parámetros cinéticos de la apirasa se encontró que esta proteína no altera la K_m para los sustratos ATP y ADP pero sí aumenta la $V_{máx}$ (tabla 5). Estos resultados indicarían que el cambio conformacional producido por la interacción de la proteína activadora con la apirasa no altera la afinidad de la enzima por su sustrato. Esta característica la define como una proteína reguladora ya que modifica específicamente una propiedad cinética de la apirasa en virtud de su unión a ella (Niemeyer, 1988).

De estos últimos resultados surge otra interrogante: ¿cómo es la regulación de la interacción entre la apirasa y sus dos proteínas moduladoras (activadora e inhibidora) si coexisten en el mismo compartimento y si su acción está dada por un supuesto cambio conformacional producto de la interacción entre ellas? Niemeyer (1988) ha planteado que la interacción de la proteína reguladora con la enzima cuya actividad modula, podría depender básicamente de tres situaciones: 1) de la concentración relativa de ambas proteínas; 2) de una modificación covalente, fisiológicamente reversible, de la proteína reguladora y 3) de la concentración

de algunos metabolitos o iones. Estas situaciones permiten que la interacción de la enzima regulada por la proteína moduladora sea transitoria, transitoriedad que es una propiedad muy característica y necesaria de los fenómenos vivos. Cualquiera de estas tres situaciones de regulación (Niemeyer, 1988) podrían dar cuenta de la modulación de la apirasa durante la tuberización. Además, hay que hacer presente también que en el inicio de la tuberización hay un considerable aumento de la masa de la apirasa. Estudios a futuro en este interesante aspecto de la regulación cinética de la apirasa permitirán aclarar la función de estas proteínas moduladoras y estudiar su capacidad de modular otras proteínas.

En conclusión, es evidente que la actividad apirásica está muy regulada durante el desarrollo del tubérculo *in vivo* lo que apoyaría la hipótesis de su posible función en relación con los eventos del inicio de la tuberización.

La segunda interrogante que era necesario responder para acercarse a la posible función fisiológica de la apirasa ha sido: *¿cuál es la localización y distribución de la apirasa durante el desarrollo del tubérculo y su relación con este proceso fisiológico?*

4.2. Localización y distribución de la apirasa en el tejido de papa.

La distribución subcelular de la apirasa en plantas superiores no ha sido fácil de establecer mediante centrifugación diferencial. Se han descrito tanto formas solubles como insolubles de la apirasa (Krishnan, 1949; Molnar y Lorand, 1961; Traverso-Cori y cols., 1970; Jolliot y cols., 1976; Vara y Serrano, 1981; Tognoli y Marré, 1981; Tognoli, 1984; Valenzuela y cols., 1989, Kettlun y cols., 1992a). En el caso de las apirasas insolubles estas fueron fácilmente liberadas de las membranas con fuerza iónica (NaCl o KCl 500 mM). Pero, en general, la apirasa llamada "insoluble" de tejidos de plantas es proporcionalmente baja.

Estudios previos realizados en el laboratorio han indicado que en tubérculos maduros, la apirasa se distribuye mayoritariamente en el sobrenadante de 100.000 x g, es decir, en la fracción soluble (Valenzuela y cols., 1989). En este trabajo se estableció que no hay cambios en el patrón de distribución de la apirasa al realizar un fraccionamiento subcelular mediante centrifugación diferencial durante todo el desarrollo del tubérculo (figura 19). Es necesario hacer notar que siempre se ha detectado aproximadamente un 15% de apirasa asociada a la fracción microsomal tanto en tubérculos de papa (Jolliot y cols., 1976; Valenzuela y cols., 1989; Kettlun y cols., 1992a) como en raíces de garbanzos (Vara y Serrano, 1981) e hipocótilos de arvejas (Tognoli, 1984). Sin embargo,

se ha podido concluir que la apirasa asociada a membranas corresponde a un artefacto del fraccionamiento subcelular, ya que es fácilmente liberada con fuerza iónica (tabla 7). Incluso se ha podido establecer que esta interacción inespecífica se produce preferentemente con membranas provenientes del retículo endoplásmico rugoso (resultados no mostrados). Tognoli (1984) ha descrito que el porcentaje de apirasa insoluble en hipocótilos de arvejas depende de la presencia de Mg^{+2} en el medio de homogeneización y, además, de la presencia de una proteína de 34,0 kDa en la fracción microsomal. El autor sugiere que esta proteína podría estar involucrada en la sedimentación de la apirasa y que la interacción de la enzima con esta proteína podría representar un paso en un proceso de reconstitución con algún significado fisiológico.

El hecho de encontrar que la apirasa de diferentes orígenes vegetales es esencialmente soluble es una de las grandes diferencias con las apirasas de orígenes animales, ya que esta última es una verdadera enzima unida a membranas (Valenzuela y cols., 1989; Pieber y cols., 1991, en la bibliografía citada; Valenzuela y cols., 1992).

Por lo tanto, para acercarse a la función fisiológica de la apirasa en tejidos vegetales ha sido fundamental abordar el estudio de la localización de esta enzima a diferentes niveles de organización celular mediante técnicas inmunoquímicas.

La determinación de la distribución de la apirasa a nivel tisular mediante impresión de tejido en nitrocelulosa e inmunodetección reveló que la apirasa se concentra en la región subapical de los estolones hinchados. Este órgano, en forma de gancho, se caracteriza por tener dos regiones de naturaleza meristemática, el ápice y la región subapical las que en conjunto dan origen a toda la histogénesis del tubérculo. La médula y las regiones corticales del tubérculo se desarrollan por diferenciación del meristema basal que se deriva del meristema apical del ápice del estolón. El procambio da origen al floema externo, al xilema primario, al floema interno y al parénquima fascicular. Las células parenquimáticas formadas hacia el interior en relación al anillo del xilema contribuyen al crecimiento de la zona perimedular. La figura 30 muestra un diagrama que resume la sucesión de los eventos en los tejidos del tubérculo de papa (Reeve y cols., 1969; Cutter, 1992). Por lo tanto, la localización de la apirasa en la región subapical de los estolones nos estaría indicando que su posible función podría estar relacionada con la división y diferenciación celular que está ocurriendo en esa región del tejido (figura 20).

Además, en los tubérculos jóvenes, la apirasa se inmunodetectó en las siguientes zonas: la peridermis o piel; en la zona cambial y en la perimedular (figura 20). Estos tejidos se caracterizan durante todo el desarrollo del

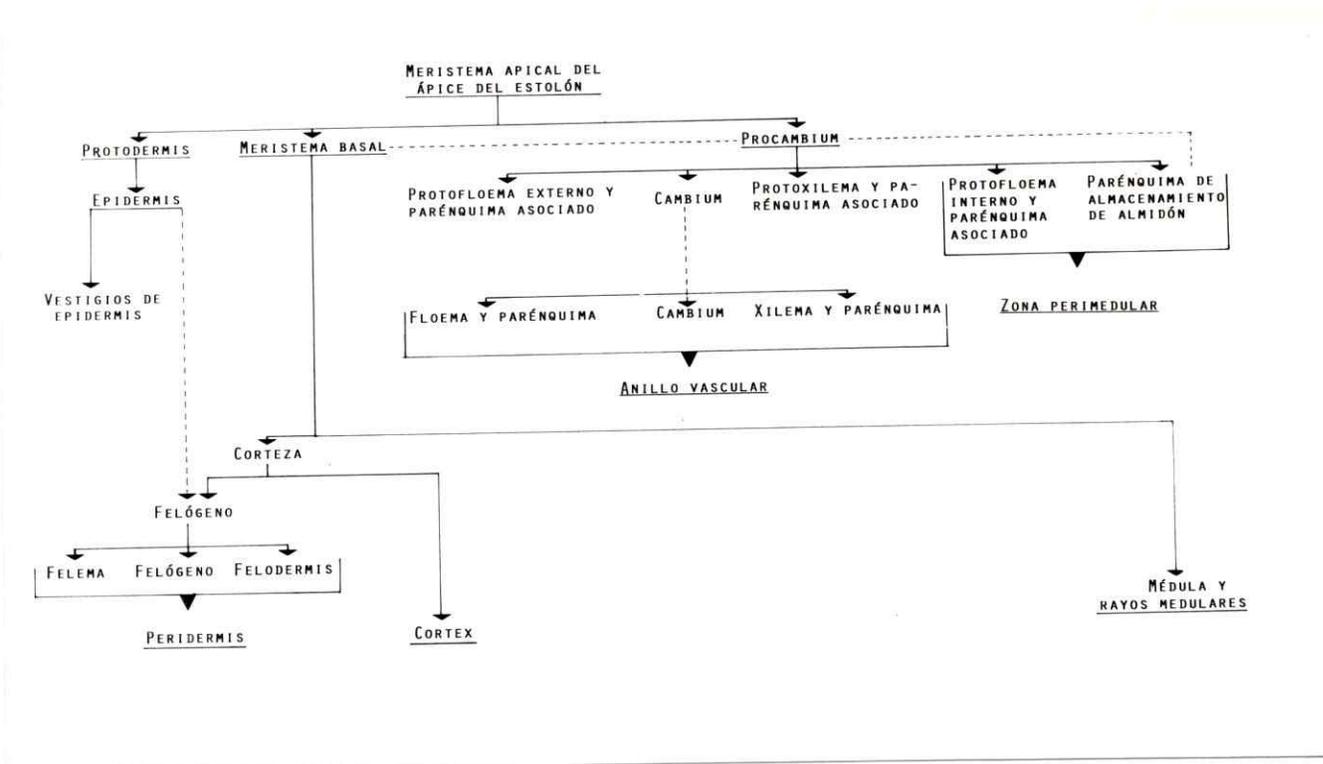


Figura 30. Diagrama de los orígenes del tubérculo de papa.

Las líneas punteadas representan vías de diferenciación celular. Reeve y cols. (1969).

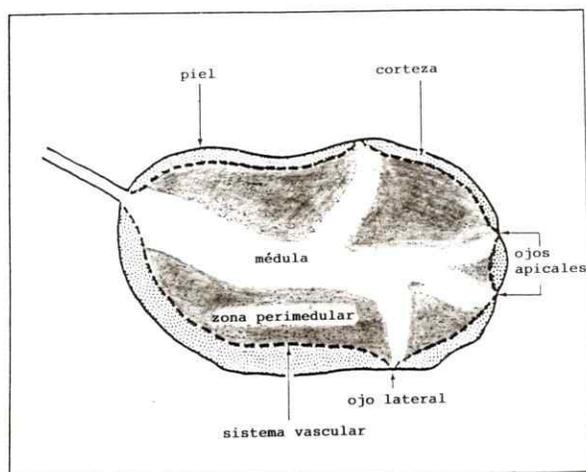


Figura.31. Diagrama de un corte longitudinal de un tubérculo de papa maduro.

tubérculo en la mantención constante de su índice mitótico. En el momento en que el estolón comienza a hincharse, la formación de la peridermis se produce por divisiones periclinales de la epidermis y de la hipodermis. La peridermis está constituida por una capa de células que se divide activamente durante todo el desarrollo del tubérculo, la cual se denomina felógeno (meristema de tipo secundario). La capa de nuevas células formadas son muy suberizadas y constituyen el felema (capas de corcho). Las células de la hipodermis pueden generar células parenquimáticas hacia el interior del tubérculo constituyendo la denominada felodermis. La figura 31 muestra un diagrama longitudinal de un tubérculo de papa maduro. Por otra parte, se ha descrito que la división celular de la zona perimedular es la que da cuenta del aumento en volúmen del tubérculo, simultáneamente con el alargamiento celular (van Es y Hartmans, 1981; Cutter, 1992).

De estos antecedentes se puede concluir que la apirasa se localiza en tejidos que están dividiéndose y diferenciándose simultáneamente dando origen a la peridermis caracterizada por su alto grado de suberización y al tejido medular caracterizado por su acumulación de almidón. Estos resultados fueron corroborados mediante los experimentos de inmunocitoquímica y microscopía de luz (figura 21), en donde se detectó la apirasa en las paredes celulares de las células del felógeno y también en los amiloplastos de las células de la zona perimedular. Finalmente, la inmunocitlocalización de

la apirasa por microscopía electrónica de transmisión acusó una vez más la presencia de la apirasa en las paredes celulares de todos los tejidos estudiados (figuras 22 y 23).

Se han descrito diferentes enzimas que están presentes en las paredes celulares de plantas superiores las que participarían en el metabolismo de la pared vegetal (McNeil y cols., 1984; Cassab y Varner, 1988; Varner y Lin, 1989; Showalter, 1993). Si se aísla la pared celular, se ha encontrado una actividad ATPásica correspondiente a una ATPasa de transporte (Fakhrai y Hall, 1984). Sin embargo, Hall y Nelson (1990) consideraron que estas preparaciones de pared celular podrían haber estado contaminadas con membrana plasmática, ya que la ATPasa de transporte es característica de la membrana plasmática. Pero Coupé y D'Auzac (1980) han encontrado en preparaciones de pared celular de raíces y de hipocótilos de *Vicia faba* una actividad ATPásica que también hidroliza nucleosidos difosfatos y no es estimulada por cationes monovalentes. Las propiedades descritas para esta enzima son muy similares a las de la apirasa y no corresponden a una IDPasa, como sugieren los autores, ya que ésta última no hidroliza los nucleosidos trifosfatos (Novikoff y Heus, 1963; Morré y cols., 1977; Brandan y Fleischer, 1992). Por lo tanto, la actividad detectada por Coupé y D'Auzac corresponde a una posible actividad apirásica en la pared celular, y en esta tesis se aportan pruebas citológicas de la presencia de apirasa en este mismo compartimento celular.

Esta localización ultraestructural indicaría que la apirasa podría estar relacionada con algún evento que se está desarrollando en la pared vegetal. Como se propone en la hipótesis de trabajo, uno de estos eventos en que podría participar la apirasa, por su actividad ADPásica, es en la síntesis de polisacáridos de la pared durante la división y alargamiento celular. Coupé y D'Auzac (1980) también sugieren que esta enzima tendría una función en el crecimiento de la pared celular más que en fenómenos de transporte. Sin embargo, el hecho de no encontrar apirasa ligada a ninguna membrana descarta su participación en la catálisis del dolicol-PP a dolicol-P, ya que esta etapa ocurriría en el retículo endoplásmico.

En la hipótesis planteada en la Introducción, también se propuso una posible participación de la apirasa en la síntesis de almidón. Esto estaría apoyado por la detección de la apirasa en los amiloplastos (figura 23 b,c). Se inmunodetectó la presencia de apirasa en una menor proporción en el citoplasma, vacuola y núcleo de la célula (figura 22b,c,d y figura 23). La función de la apirasa en el citoplasma podría estar relacionada con la hidrólisis de los nucleosidos difosfatos (ADP) generados en la síntesis de glicoproteínas (figura 1, proposición II en Introducción). En la vacuola, la apirasa podría encontrarse en forma inactiva como ocurre con otras proteínas de tipo hidrolítico (Marty y cols., 1980). Hirasawa y cols. (1979) han descrito una

nucleosido trifosfato-difosfatasa (NTDPasa) presente en la cromatina de cotiledones de arvejas cuyas características son muy similares a la apirasa en cuanto a los productos de la reacción, especificidad de sustrato, dependencia de metales bivalentes y masa molecular. Los autores sugieren que esta enzima podría estar involucrada en la regulación de la síntesis de RNA, ya que habían encontrado que esta actividad NTDPasa era un inhibidor de la síntesis de RNA *in vitro* con la RNA polimerasa de *E.coli*. Dado que esta proposición ha sido dejada de lado debido a los avances en la regulación de la transcripción, se propone que la apirasa podría estar relacionada con la probable síntesis de glicoproteínas en el núcleo. Aunque la glicosilación en este organelo no ha sido totalmente demostrada, Hart y cols. (1989) han descrito que este proceso podría ocurrir en el citoplasma y núcleo, además del que ocurre en los dictiosomas.

En conclusión, la determinación de la localización de la apirasa en las células de papa ha permitido acercarse a una probable función fisiológica y además, constituye una evidencia que apoya la hipótesis propuesta en este trabajo. Sin embargo, era necesario responder una tercera pregunta para aclarar la función de la apirasa en el proceso de tuberización: *¿es la participación de la apirasa importante en el proceso de división y/o diferenciación celular?* Para responder esta incógnita era necesario buscar un modelo de estudio *in vitro* que permitiera separar estos dos procesos. Se

ha descrito que la división y alargamiento celular y el depósito de almidón son los primeros cambios que se han observado durante el inicio de la tuberización, pero el orden en que estos fenómenos ocurren no ha sido bien establecido y las pruebas son conflictivas (Duncan y Ewing, 1984; Cutter, 1992). La dificultad radica en identificar estos fenómenos en el ápice de estolones de plantas intactas que están en la etapa de inicio de la tuberización. Es imposible predecir exactamente cuándo y en cuál estolón ocurrirá la tuberización. Por lo tanto, se abordó el estudio de la relación entre la apirasa y la división y diferenciación celular mediante modelos de cultivo de *S.tuberosum in vitro*.

4.3. Modelos de estudio con sistemas de cultivo de tejido "in vitro" y detección de apirasa.

Se cultivaron ápices caulinares de papas brotadas en la oscuridad. Dado que se trata de un meristema primario que, aunque presenta una cierta gradiente de diferenciación relativa, puede fácilmente, después de varias etapas, desdiferenciarse y formar un callo. El callo es un tejido cicatricial, eventualmente neoplásico y corresponde a la continuación de las divisiones celulares (mitosis) y a la producción de un tejido homogéneo y poco organizado (Box y Terron, 1988).

La primera etapa de crecimiento de estos callos es bastante lenta, según se puede apreciar en la figura 24, a

pesar de haber utilizado un medio de cultivo enriquecido y una alta dosis de 2,4-D (tabla 1). Aunque el 2,4-D es una auxina potente que se hace tóxica a concentraciones elevadas, hubo que usar dosis de 3,0 mg/mL para obtener callos de tejido de *S. tuberosum*. Se ha observado en cultivos de segmentos de tallos de papa que el 2,4-D favorece la formación de estolones más que la tuberización, lo que muestra su efecto sobre la diferenciación durante este proceso (Mangat y cols., 1984). Sin embargo, es necesario destacar que aunque el 2,4-D es muy poco eficaz en la organogénesis, durante la inducción de callos después de tres meses del primer subcultivo o repique de éste, se observó una diferenciación espontánea produciendo la regeneración de raíces, tallos y microtubérculos (figura 25). Además, hay que considerar que el tejido calloso que se origina de material juvenil y/o herbáceo (en este caso meristemo de ápices caulinares), se regenera mucho más fácilmente que el que procede de material adulto y/o leñoso (Ayerbe, 1990).

Por lo tanto, mediante la propagación de trozos de tallos fue posible obtener una planta de papa completa cultivada *in vitro*. Pero, para favorecer la formación de microtubérculos en menor tiempo, no se agregó el 2,4-D al medio de cultivo y se aumentó el porcentaje de sacarosa a un 5%, ya que está descrito que la sacarosa es un inductor de la tuberización (Forsline y Langille, 1976; Hussey y Stacey, 1984; Willmitzer y cols., 1990; Park, 1990).

La identificación de la apirasa en las diferentes partes de la planta crecida *in vitro* reveló que esta enzima presenta una cierta especificidad de órgano, ya que se inmunodetectó sólo en el microtubérculo. Sin embargo, esta apirasa del microtubérculo tiene una masa molecular (34,0 kDa) menor que la apirasa de tubérculos maduros cultivados *in vivo* (49,0 kDa). Esta proteína correspondería a otra forma de apirasa ya que aparentemente no es un producto de degradación (sección 3.6.3.). Estos resultados sugieren una serie de interrogantes cuyas respuestas podrían explicar la diferencia de masa molecular entre la apirasa de papa crecida *in vivo* con la desarrollada en los cultivos *in vitro*:

- ¿hay alguna alteración en la transcripción del gen para la apirasa en la condición *in vitro*?,
- ¿hay alteraciones en el procesamiento de mRNA para la apirasa?,
- ¿hay alteraciones en las modificaciones post-transcripcionales como glicosilaciones y/o amidaciones, ya que la apirasa es una proteína glicosilada y con un alto grado de amidación?,
- ¿sufre esta apirasa del microtubérculo regulación cinética por las proteínas moduladoras ya descritas?.

Por otra parte, los microtubérculos aéreos, obtenidos por cultivos de planta *in vitro* o por cortes de hojas y desarrollo de yemas axilares, han sido ampliamente utilizados como un efectivo medio de propagación de cultivares libres de

enfermedades y también como almacenamiento y transporte de germoplasma (Ewing, 1978; Duncan y Ewing, 1984; Hussey y Stacey, 1984, Cutter, 1992). Este sistema de propagación se ha basado en que estos microtubérculos contienen el mismo grupo de proteínas características de los estolones y tubérculos subterráneos. Estos estudios se han realizado por comparaciones de las proteínas más abundantes de la papa mediante electroforesis o electroenfoque de proteínas totales o bien por identificación inmunológica de la patatina (Paiva y cols., 1982; Park, 1983; Wheeler y cols., 1988). Como estos enfoques no han individualizado todas las proteínas del tubérculo, en este trabajo de tesis se ha observado que la apirasa presente en el microtubérculo cultivado *in vitro* tiene menor tamaño molecular (34,0 kDa) que la apirasa de tubérculo cultivado *in vivo*. Esto indica que hay una alteración en una proteína que podría cumplir una importante función en el proceso de tuberización y tal vez esta alteración podría, también, ocurrir con otras proteínas aún no estudiadas. Se ha descrito en la literatura que algunas plantas derivadas de cultivos de callo no son idénticas genéticamente a la planta cultivada *in vivo*. Este fenómeno ha sido denominado variación somaclonal y la papa parece ser muy susceptible a estos cambios (Cutter, 1992). Sin embargo, se debe tener en cuenta que esta variación somaclonal también podría producirse durante la propagación *in vivo*, en el tejido de *S.tuberosum*. Además de la variación somaclonal, se puede presentar una

variación epigenética como resultado de un cambio en la expresión génica. Esta última es reversible y no hereditaria. Entre los factores que determinan la probabilidad y frecuencia de este fenómeno de variación epigenética está el tipo de regulador del crecimiento utilizado en el medio de cultivo. En particular, las elevadas concentraciones de 2,4-D pueden dar origen a anomalías durante la división celular (Box y Terron, 1988; Ayerbe, 1990).

En resumen, los resultados obtenidos indicarían que en la planta de papa crecida *in vitro*, la apirasa es más pequeña en masa molecular y presentaría especificidad de órgano, ya que se detectó sólo en el microtubérculo. Sin embargo, esta especificidad no se encuentra en plantas cultivadas *in vivo*, ya que en este laboratorio se ha detectado también la apirasa en brotes etiolados de tubérculos de papa (Anich y cols., 1990). Además, otros autores han encontrado apirasa en diferentes órganos como: hojas de repollo (Mazelis, 1959), tallos de arvejas (Tognoli y Marré, 1981; Tognoli, 1984) y raíces de garbanzos (Vara y Serrano, 1981). Pero, hay que destacar que la mayor cantidad de apirasa se encuentra en el tubérculo, donde se ha estimado que puede llegar a constituir hasta un 14% (8% en esta tesis) de las proteínas totales (Fanta y cols., 1988; Kettlun, 1991). No se ha estudiado si la apirasa de estos otros órganos es tan regulada como la apirasa del tubérculo y si ésta sufre cambios en su expresión génica.

La hipótesis de trabajo planteada en esta tesis propone

que la función de la apirasa estaría relacionada con la síntesis de pared celular, con la síntesis de glicoproteínas y de almidón (figura 1 en Introducción); éstos procesos también ocurren en las células de otros órganos por lo que no es extraño encontrar la presencia de la apirasa en ellos. Sin embargo, se puede proponer otra posible función relacionada con su actividad ADPásica como es la producción y reincorporación a la célula de adenosina, en conjunto con la acción de una 5'-nucleotidasa. La principal fuente de adenosina es el AMP derivado del ADP y ATP (Olsson y Pearson, 1990) y la apirasa proveniente de la variedad Desirée hidroliza eficientemente estos dos últimos sustratos. En tejidos animales se ha descrito que la adenosina puede modular una amplia variedad de procesos funcionando en forma similar a un segundo mensajero (Newby, 1984). Recientemente, Ries (1991) ha encontrado que el triacontanol, un alcohol primario que es constituyente natural de la ceras vegetales y un potente promotor del crecimiento, promueve la formación de 9- β -L(+)-adenosina, y de esta manera, regula una serie de procesos fisiológicos. Se propone que esta adenosina, también es derivada de AMP y por ende del ADP y ATP. El mecanismo de acción de estos compuestos reguladores y la fuente de L(+)-adenosina son desconocidos (Reis, 1991), pero no se puede descartar la posible participación de la apirasa en este complejo proceso de formación y control de la síntesis de adenosina.

Por otra parte, los estudios realizados con suspensiones celulares y tratamientos con inductores de tuberización han revelado la posible participación de la apirasa en la diferenciación celular durante el proceso de tuberización, donde podría estar involucrada en la suberización de la pared secundaria. El apoyo experimental a esta proposición es la ausencia de apirasa por inmunodetección en callos (figura 27), y en suspensiones celulares indiferenciadas (en presencia de 2,4-D, figura 29) en activa división celular. Este hecho indicaría que esta enzima no participaría en el proceso de síntesis de pared primaria como se propuso en la hipótesis de trabajo. A las 48 horas de incubación con los distintos tratamientos de inducción de tuberización se encontró el mismo número de células, en cambio se inmunodetecta apirasa, lo que indicaría un proceso bioquímico relacionado con la diferenciación celular. Como el primer evento de la diferenciación es la suberización de la pared secundaria (Kolattukudy, 1980, 1984), podría ser que la apirasa estuviera relacionada con el proceso bioquímico que es la síntesis y depósito de suberina.

Se conoce muy poco acerca de la estructura y composición de la suberina, pero está formada por una parte alifática (20-50%) y otra parte fenólica (50-75%) y esta última estaría interactuando con carbohidratos de la pared celular (Kolattukudy, 1980, 1984). La peridermis de órganos subterráneos, como el tubérculo de papa, se caracteriza por

estar formada por células con una pared secundaria muy suberizada cuya función principal es aumentar la resistencia a la difusión del agua y constituir una barrera al ataque de patógenos (Schmidt y Schönherr, 1982; Vogt y cols., 1983; Kolattukudy, 1984). Cabe hacer notar que, como se describió anteriormente, la apirasa se concentra principalmente en la peridermis (figura 20) lo que apoyaría la proposición acerca de su participación en la suberización. Se ha descrito que la síntesis de suberina es fundamental durante la formación y desarrollo del tubérculo de papa, pero que disminuye durante el almacenamiento de éste y cesa durante su brotación (Kolattukudy, 1984). Estos antecedentes coinciden con el patrón de actividad apirásica encontrado durante el desarrollo del tubérculo, donde la mayor actividad se encuentra en la etapa inicial (49 días) y desaparece durante la brotación (figura 5). También es coincidente con el hecho de no encontrar proteínas moduladoras en papas brotadas y con la ausencia de inmunodetección de apirasa en microtubérculos brotados.

Se ha descrito que en el momento de dividirse las células del felógeno se forma la pared secundaria y se deposita suberina, y que este fenómeno continúa en las células del felema. Estas células se caracterizan por: a) tener un gran número de ribosomas; b) tener un retículo endoplásmico rugoso paralelo a la pared celular; c) no tener plastidios y d) la presencia de cristales cúbicos de proteínas de un gran

tamaño que es característico en estas células de la papa. Como la principal actividad metabólica de las células que estructuran la peridermis es la síntesis de suberina, la que es secretada en la pared, también aquí se ha observado vesículas de secreción que podrían corresponder a monómeros de suberina (Wattendorff, 1974; Cutter, 1992). En el análisis ultraestructural realizado, en esta tesis, en estolones y peridermis, también se observó estas características recién descritas dando cuenta del activo proceso de suberización que se está efectuando en ellas (figura 22 y 23). El hecho de detectar la presencia de la apirasa en estos tejidos es una prueba que relaciona su función con este proceso metabólico.

Por lo tanto, el hecho más sobresaliente de estos resultados experimentales es la relación de la apirasa con la diferenciación celular al desencadenarse la tuberización.

Como se mencionó anteriormente en esta misma sección, se encontró que en suspensiones celulares tratadas con factores inductores de tuberización se estimuló la expresión de la apirasa. Es necesario señalar que las hormonas vegetales pueden estimular la expresión génica pero esta estimulación puede ser inespecífica (Willmitzer y cols., 1990). Sin embargo, se descartó esta posibilidad al estimular la expresión génica de la apirasa por medio de sacarosa al 10%. Se ha descrito que el nivel de sacarosa en los medios de cultivo *in vitro* es el factor más decisivo en inducir tuberización y se ha propuesto que juega un papel importante

en la regulación de los genes involucrados en este proceso (Forsline y Langille, 1976; Hussey y Stacey, 1981; Hussey y Stacey, 1984). Diferentes laboratorios han demostrado que el promotor de un gen clase I que codifica para la patatina es activado por sacarosa o glucosa (Mignery y cols., 1988; Rocha-Sosa y cols., 1989; Wentzler y cols., 1989a,b; Jefferson y cols., 1990). Esta acumulación de la patatina es paralela al depósito de almidón (Rocha-Sosa y cols., 1989; Wentzler y cols., 1989a; Perl y cols., 1991). Otro ejemplo de estimulación génica por sacarosa lo han proporcionado Keil y cols. (1989) los cuales han encontrado un miembro de la familia de genes para el inhibidor II de proteínasa cuyo promotor responde a señales del desarrollo del tubérculo y también del medio ambiente al igual que en el caso de la patatina. Johnson y Ryan (1990) han sugerido que el gen para el inhibidor II y otros genes regulados por sacarosa tienen una región específica en el DNA que responde a ese estímulo aumentando la transcripción. Se ha encontrado que la región estimulada por sacarosa se encuentra en la porción río arriba del extremo 5' la cual es bastante conservada. Esta región definida en inglés como "enhancer" para sacarosa podría interactuar con elementos (sacarosa u otros) que estimulan el promotor del gen correspondiente (Johnson y Ryan, 1990). Otro gen regulado de manera similar es el de la sacarosa sintetasa que se encuentra principalmente expresado en los tubérculos en desarrollo, pero también en menor proporción en otras partes

de la planta (Salanoubat y Belliard, 1989).

Un órgano subterráneo que tiene propiedades funcionales y bioquímicas semejantes a las del tubérculo de papa es el de la raíz tuberosa del camote (*Ipomoea batatas*). Este órgano, también, acumula grandes cantidades de proteínas y almidón; algunas de ellas son características del camote y al parecer forman parte de las proteínas de almacenamiento. Se ha encontrado en el camote que la sacarosa estimula la expresión del gen para la esporamina de una manera similar como la descrita para las proteínas de almacenamiento del tubérculo de papa (Hattori y cols., 1990; Hattori y cols., 1991).

Según estos antecedentes se ha propuesto que la activación de genes que codifican para proteínas específicas es desencadenada por señales metabólicas del desarrollo de las funciones de almacenamiento en los tejidos. Además, estas señales metabólicas para el almacenamiento de proteínas y almidón podrían coordinar entre sí ambos procesos como se dió a entender en la introducción de esta tesis (Rocha-Sosa y cols., 1989; Wenzler y cols., 1989; Hattori y cols., 1990).

El hecho de haber encontrado que la apirasa sólo se expresa en condiciones de alta concentración de sacarosa podría indicar que su expresión estaría modulada en forma similar a las recién descritas.

La mayor masa de la apirasa encontrada en los estudios *in vivo* y la inducción de la enzima *in vitro* genera a futuro

la pregunta: ¿existirá regulación de la expresión génica de la apirasa durante el proceso de diferenciación celular en la tuberización? La comprensión de estos fenómenos fisiológicos a nivel molecular mediante el conocimiento y comprensión de los mecanismos que regulan la expresión del gen para la apirasa contribuirá a aclarar la función y regulación de ella en las células de la papa.

5. CONCLUSIONES

1. La actividad apirásica (ATPasa-ADPasa) se encuentra muy regulada desde el inicio de la tuberización tanto a nivel de masa de la enzima como a nivel cinético por dos proteínas moduladoras. Esto indicaría que la apirasa cumpliría una función determinante en el momento que se desencadena la tuberización.

2. Las proteínas activadora e inhibidora son dos proteínas solubles y termoestables que están presentes durante todo el desarrollo del tubérculo y su efecto modulador sobre la apirasa depende de la concentración de proteínas.

3. La interacción de la proteína activadora con la apirasa produce un cambio conformacional de modo que aumenta la V_{max} de la enzima, pero no afecta su afinidad por el sustrato.

4. La principal característica que diferencia a las dos proteínas moduladoras es su masa molecular (la activadora de 15,0 kDa y la inhibidora de 58,0 kDa). Otra característica de la proteína activadora es su punto isoeléctrico alcalino (9,0) lo cual favorecería su interacción con la apirasa.

5. La apirasa es una enzima soluble y no cambia su distribución durante el desarrollo del tubérculo. Se localiza mayoritariamente en la pared celular y en el citoplasma de la zona subapical de los estolones y en la peridermis, zona cambial y perimedular de tubérculos jóvenes. Además, se le

inmunodetectó en los amiloplastos de los tubérculos en desarrollo. Esta localización ha sugerido una posible función de la apirasa en la suberización de la pared secundaria y en la producción y reincorporación de adenosina a la célula.

6. Se estableció un modelo de estudio a través del cultivo de tejido *in vitro*, y se encontró que la apirasa presente en los microtubérculos tiene una masa molecular de 34,0 kDa. Se determinó que la apirasa no es inmunodetectable en callos ni en suspensiones celulares indiferenciadas en activa división celular, lo cual descartaría su participación en este proceso. Sin embargo, la apirasa se expresa en condiciones inductoras de tuberización, lo que ha sugerido que esta enzima participaría en el proceso de diferenciación celular durante el inicio de la tuberización.

6. BIBLIOGRAFIA.

- ABDALA DE BOTTINI G & TIZIO R (1981) Hormonal contribution of the mother tuber to growth, stolonization and tuberization of the potato plant (*Solanum tuberosum* L. cv Spunta). *Phyton* 41, 27-32.
- AHMED ChM & SAGAR GR (1981) Effects of a mixture of NAA + BA on numbers and growth rates of tubers of *Solanum tuberosum* L. *Potato Res.* 24, 267-278.
- ALEGRIA P (1988) Identificación de apirasa en microorganismos. Tesis para optar al título de Químico-Farmacéutico. Universidad de Chile.
- ANDERSON JM, OKITA TW & PREISS J (1990) Carbohydrate Metabolism. En: VAYDA ME y PARK W (eds) *The Molecular and Cellular Biology of the Potato*. CAB International. Wallingford. pp 159-180.
- ANDREWS P (1964) Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem. J.* 91, 222-232.
- ANICH M (1984) Apirasa y metabolitos durante la germinación y desarrollo de *Solanum tuberosum*. Aislamiento de calmodulina del tubérculo maduro. Tesis para optar a los títulos de Bioquímico y Químico Farmacéutico. Universidad de Chile.
- ANICH M, FANTA N, MANCILLA M, KETTLUN AM, VALENZUELA MA & TRAVERSO-CORI A (1990) Apyrase activity and changes in metabolites during germination and tuberization of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 29, 1411-1415.
- AYERBE L (1990) Inducción de callos, cultivos de callos y regeneración de órganos y embriones. En: *Cultivo In Vitro de las Plantas Superiores*. Ediciones Mundi-Prensa Madrid, pp 209-223.
- BAILEY KM, PHILLIPS IDJ & PITT D (1978) The role of buds and gibberellin in dormancy and the mobilization of reserve materials in potato tubers. *Ann. Bot.* 42, 649-657.
- BALAMI V, VELUTHAMBI K & POOVAIAH BW (1986) Effect of calcium on tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiol.* 80, 856-858.
- BEAUFAY H, AMAR-COSTESECC A, FEYTMANS E, THINES-SEMPOUX D, WIBO M, ROBBI M & BERTHET J (1974) Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. *J. Cell Biol.* 61, 188-200.

- BERGMAYER HV, GAWEHN K & GRASSED M (1974) Method in Enzymatic Analysis, Vol 1, Academic Press, London, pp 425-522.
- BONNER WD (1955) Methods in Enzymology; Vol 1, Academic Press Inc, New York, pp 722-724.
- BOX JMM & TERRON PU (1988) Neoformación de meristemos y embriogénesis somática. En: Multiplicación Vegetativa y Cultivo In Vitro. Mundi-Prensa Ediciones. Madrid. pp 71-89.
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- BRANDAN E & FLEISCHER B (1982) Orientation and role of nucleosidediphosphatase and 5'-nucleotidase in golgi vesicles from rat liver. Biochemistry 21, 4640-4645.
- BRETT C & LELOIR LF (1977) Dolichyl monophosphate and its sugar derivatives in plants. Biochem. J. 161, 93-101.
- BURNETTE WN (1981) "Western Blotting": Electrophoretic transfer of protein from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinate protein A. Anal. Biochem. 112, 195-203.
- CASSAB GI & VARNER JE (1987) Immunocytolocalization of extensin in developing soybean seed coats by immunogold-silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. J. Cell Biol. 105, 2581-2588.
- CASSAB GI & VARNER JE (1988) Cell wall proteins. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39, 321-353.
- CATT K & TREGEAR GW (1967) Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes. Science 158, 1570-1572.
- COLIGAN J, KRUISBEEK A, MARGULIES D, SHEVACH E & STROBER W (1991) Currents Protocols in Immunology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- COUPE M & D'AUZAC J (1980) "ATPase" des parois squelettiques de racine et d'épicotyle chez *Vicia faba*. Physiol. Vég. 18, 223-240.
- CURDOVA E, JECHOVA V & HOSTALIK Z (1982) Properties of apyrase and inorganic pyrophosphatase in *Streptomyces aureofaciens*. Inst. Microbiol. 27, 159-166.
- CUTTER EG (1992) Structure and Development of the Potato Plant. En: HARRIS PM (ed) The Potato Crop. 2^a ed. Chapman & Hall.

London. pp 65-161.

- CHARBONNEAU H & CORMIER MJ (1979) Purification of plant calmodulin by fluphenazine-Sepharose affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 1039-1047.
- CHIONG M, LAVANDERO S, RAMOS R, AGUILLON JC & FERREIRA A (1991) Octadecyl silica: a solid phase for protein purification by immunoadsorption. *Anal. Biochem.* **197**, 47-51.
- DEL CAMPO G, PUENTE J, VALENZUELA MA, TRAVERSO-CORI A & CORI O (1977) Hydrolysis of synthetic pyrophosphoric esters by an isoenzyme of apyrase from *Solanum tuberosum*. *Biochem. J.* **167**, 525-529.
- DEL VILLAR M (1991) Cambios metabólicos durante la tuberización y desarrollo de la papa en relación a la actividad apirásica. Tesis para optar al título de Bioquímico. Universidad de Chile.
- DIXON M & WEBB EC (1979) *Enzymes*. 3a ed. Longmans. Academic Press. New York.
- DUNCAN DA & EWING EE (1984) Initial anatomical changes associated with tuber formation on single-node potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings. *Ann. Bot.* **53**, 607-610.
- ENGELS CH & MARSCHNER H (1986) Allocation of photosynthate to individual tubers of *Solanum tuberosum* L. *J. Exp. Bot.* **37**, 1795-1803.
- ERNSTER L, ZETTERTRON R & LINDBERG O (1950) Method for the determination of tracer phosphate in biological material. *Acta Chem. Scand.* **4**, 942-947.
- EWING EE (1978) Shoot, stolon, and tuber formation on potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings in response to photoperiod. *Plant Physiol.* **61**, 348-353.
- EWING EE (1981) Heat stress and the tuberization stimulus. *Am. Potato J.* **58**, 31-49.
- EWING EE (1990) Induction of Tuberization in Potato. En: VAYDA ME y PARK WD (eds) *The Molecular and Cellular Biology of the Potato*. CAB International. Wallingford. pp 25-42.
- FAKHRAI H & HALL JL (1984) Changes in calcium-ATPase activity associated with the washing (ageing) of potato tuber discs. *J. Plant Physiol.* **117**, 69-79.
- FANTA N, ANICH M, MANCILLA M, KETTLUN AM, VALENZUELA MA & TRAVERSO-CORI A (1988) Starch, adenine nucleotides and apyrase changes during potato tuber development. *Ach. Biol. Med. Exp.*

21, 129-133.

- FARRELL HM, LEUNG CT & WICKHAM ED (1992) Distribution of ADPase activity in the lactating rat mammary gland and its possible role in an ATP cycle in the Golgi apparatus. Arch. Biochem. Biophys. 292, 368-375.
- FISKE CH & SUBBAROW Y (1925) The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66, 375-400.
- FORSEE WT & ELBEIN AD (1975) Glycoprotein biosynthesis in plants. J. Biol. Chem. 250, 9283-9293.
- FORSLINE PL & LANGILLE AR (1975) Endogenous cytokinins in *Solanum tuberosum* as influenced by photoperiod and temperature. Physiol. Plant. 34, 75-77.
- FORSLINE PL & LANGILLE AR (1976) An assessment of the modifying effect of kinetin on in vitro tuberization of induced and non-induced tissues of *Solanum tuberosum*. Can. J. Botany 54, 2513-2516.
- HALL JL & NELSON SJ (1990) Properties of ATPase activity associated with cell wall fractions from higher plants. J. Plant Physiol. 137, 241-243.
- HANES CS (1932) Studies on plant amylases. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by amylase of germinated barley. Biochem. J. 26, 1406-1421.
- HANNAPEL DJ (1991) Characterization of the early events of potato tuber development. Physiol. Plant. 83, 568-573.
- HART GW, HALTIWANGER RS, HOLT GD & KELLY WG (1989) Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. Annu. Rev. Biochem. 58, 841-874.
- HATTORI T, NAKAGAWA S & NAKAMURA K (1990) High-level expression of tuberous root storage protein genes of sweet potato in stems of plantlets grown *in vitro* on sucrose medium. Plant Mol. Biol. 14, 595-604.
- HATTORI T, FUKUMOTO H, NAKAGAWA S & NAKAMURA K (1990) Sucrose-induced expression of genes coding for the tuberous root storage protein, sporamin, of sweet potato in leaves and petioles. Plant Cell Physiol. 32, 79-86.
- HAWKES R, NIDAY E & GORDON J (1982) A dot immuno-binding assay for monoclonal and other antibodies. Anal. Biochem. 119, 142-147.
- HENDRIKS T, VREUGDENHIL D & STIEKEMA J (1991) Patatin and four

serine protease inhibitor genes are differentially expressed during potato tuber development. *Plant Mol. Biol.* 17, 385-394.

- HIRASAWA E, MATSUMOTO H & TAKAHASHI E (1979) Nucleoside triphosphate diphosphatase from germinated pea cotyledon chromatin. *Plant Cell Physiol.* 20, 1041-1046.
- HUSSEY G & STACEY NJ (1981) *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) *Ann. Bot.* 48, 787-796.
- HUSSEY G & STACEY NJ (1984) Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann Bot.* 53, 565-578.
- JACKSON SD, SONNEWALD U & WILLMITZER L (1993) Characterisation of a gene that is expressed in leaves at higher levels upon tuberisation in potato and upon flowering in tobacco. *Planta* 189, 593-596.
- JAMESON PE, McWHA JA & HASLEMORE RM (1985) Changes in cytokinins during initiation and development of potato tubers. *Physiol. Plant.* 63, 53-57.
- JEFFERSON R, GOLSBROUGH A & BEVAN M (1990) Transcriptional regulation of a patatin-1 gene in potato. *Plant Mol. Biol.* 14, 995-1006.
- JOHNSON R & RYAN CA (1990) Wound-inducible inhibitor II genes: enhancement of expression by sucrose. *Plant Mol. Biol.* 14, 527-536.
- JOLLIOT A, DEMANDRE CH & MAZLIAK P (1976) Adenosine triphosphatases bound to plasmalemma, mitochondria, and microsomes or present in the cytoplasmic phase from potato tubers. *Physiol. Plant.* 38, 287-292.
- KALCKAR H (1944) Adenylpyrophosphatase and myokinase. *J. Biol. Chem.* 153, 355-367.
- KEIL M, SANCHEZ-SERRANO J & WILLMITZER L (1989) Both wound-inducible and tuber-specific expression are mediated by the promoter of a single member of the potato proteinase inhibitor II gene family. *EMBO J.* 8, 1323-1330.
- KETTLUN AM, URIBE L, CALVO V, SILVA S, RIVERA J, MANCILLA M, VALENZUELA MA & TRAVERSO-CORI A (1982) Properties of two apyrases from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 21, 551-558.
- KETTLUN AM (1991) Identificación, aislamiento y caracterización de dos formas de apirasa en tubérculo de *S. tuberosum* var *Ultimus*. Tesis para optar al título de Doctor en Bioquímica. Universidad de Chile.

- KETTLUN AM, LEYTON M, VALENZUELA MA, MANCILLA M & TRAVERSO-CORI A (1992a) Identification and subcellular localization of two isoenzymes of apyrase from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* **31**, 1889-1894.
- KETTLUN AM, URRA R, LEYTON M, VALENZUELA MA, MANCILLA M & TRAVERSO-CORI A (1992b) Purification and characterization of two isoapyrases from *Solanum tuberosum* var *Ultimus*. *Phytochemistry* **31**, 3691-3696.
- KETTLUN AM, ALVAREZ A, QUINTAR R, VALENZUELA MA, COLLADOS L, ARANDA E, BANDA A, CHAYET L, MANCILLA M, PIEBER M & TRAVERSO-CORI A (1993) Human placental ATP-diphosphohydrolase: biochemical characterization, regulation and function. *Int. J. Biochem.* (en prensa).
- KNOWLES AF, ISLER RE & REECE JF (1983) The common occurrence of ATP-diphosphohydrolase in mammalian plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **731**, 88-96.
- KODA Y & OKASAWA Y (1988) Detection of potato tuber-inducing activity in potato leaves and old tubers. *Plant Cell Physiol.* **29**, 969-974.
- KODA Y, OMER EA, YOSHIHARA T, SHIBATA H, SAKAMURA S & OKAZAWA Y (1988) Isolation of a specific potato tuber-inducing substance from potato leaves. *Plant Cell Physiol.* **29**, 1047-1051.
- KODA Y, KIKUTA Y, TAZAKI H, TSUJINO Y, SAKAMURA S & YOSHIHARA T (1991) Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds. *Phytochemistry* **30**, 1435-1438.
- KOLATTUKUDY PE (1980) Cutin, suberin, and waxes. En: STUMPF PK Y CONN (eds) *The Biochemistry of Plants*. Academic Press New York. Vol 4, pp 571-645.
- KOLLATTUKUDY PE (1984) Biochemistry and function of cutin and suberin. *Can. J. Bot.* **62**, 2918-2933.
- KRAUSS A (1981) Abscisic and gibberellic acid in growing potato tubers. *Potato Res.* **24**, 435-439.
- KRAUSS A & MARSCHNER H (1982) Influence of nitrogen nutrition, daylength and temperature on contents of gibberellic and abscisic acid and on tuberization in potato plants. *Potato Res.* **25**, 13-21.
- KRISHNAN PS (1949a) Studies on apyrases. I. Purification of potato apyrase by fractional precipitation with ammonium sulfate. *Arch. Biochem.* **20**, 261-271.
- KRISHNAN PS (1949b) Studies on apyrases. II. Some properties of

potato apyrase. Arch. Biochem. 20, 272-283.

- LAEMMLI, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- LEBEL D, POIRIER GG, PHANEUF S, ST-JEAN P, LALIBERTE JF & BEAUDOIN AR (1980) Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP-diphosphohydrolase from pig pancreas. J. Biol. Chem. 255, 1227-1233.
- LORENZEN JH & EWING EE (1990) Changes in tuberization and assimilate partitioning in potato (*Solanum tuberosum*) during the first 18 days of photoperiod treatment. Ann. Bot. 66, 457-464.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL & RANDALL RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- LUTHJE J, SCHOMBURG A & OGILVIE A (1988) Demonstration of a novel ecto-enzyme on human erythrocyte capable of degrading ADP and of inhibiting ADP-induced platelet aggregation. Eur. J. Biochem. 175, 285-289.
- MALLORY FB (1938) Pathological Technique. W.B. Saunders Philadelphia. Reprints 1961, Hafuer, New York.
- MANCILLA M, KETTLUN AM, VALENZUELA MA & TRAVERSO-CORI A (1984) Structural studies of two apyrases from *Solanum tuberosum*. Phytochemistry 23, 1397-1400.
- MANCILLA M, VALENZUELA MA, ANICH M, KETTLUN AM, JARA O & TRAVERSO-CORI A (1987) Identification of an apyrase activating protein and of calmodulin in *Solanum tuberosum*. Phytochemistry 26, 2471-2474.
- MANGAT BS, KERSON G & WALLACE D (1984) The effect of 2,4D on tuberization and starch content of potato tubers produced on stem segments cultured in vitro. Am. Potato J. 61, 355-361.
- MARSCHNER H, SATTELMACHER B & BANGERTH F (1984) Growth rate of potato tubers and endogenous contents of indolylacetic acid and abscisic acid. Physiol. Plant. 60, 16-20.
- MARTY F, BRANTON D & LEIGH R (1980) Plant Vacuoles. En: STURM PK y CONN EE (eds) The Biochemistry of Plants. Vol 1. Academic Press. Inc., pp 625-655.
- MAUK CS & LANGILLE AR (1978) Physiology of tuberization in *Solanum tuberosum* L. Plant Physiol. 62, 438-442.
- MAZELIS M (1959) Enzymatic degradation of adenosine

- triphosphate to adenine by cabbage leaf preparations. *Plant Physiol.* **34**, 153-158.
- McNEIL M, DARWILL AG, FRY SC & ALBERSHEIM P (1984) Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann. Rev. Biochem.* **53**, 625-663.
 - MIGNERY GA, PIKAAD CS & PARK WD (1988) Molecular characterization of the patatin multigene family of potato. *Gene* **62**, 27-44.
 - MIURA Y, HIROTA K, ARAI Y & YAGI K (1987) Purification and partial characterization of adenosine diphosphatase activity in bovine aorta microsomes. *Thromb. Res.* **46**, 685-695.
 - HOLNAR J & LORAND L (1961) Studies on apyrases. *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 353-363.
 - MORRE DJ, LEMBI CA & VAN DER WOUDE WJ (1977) A latent inosine-5'-diphosphatase associated with Golgi apparatus-rich fractions from onion stem. *Cytobiologie* **16**, 72-81.
 - MÜLLER-RÖBER B, SONNEWALD U & WILLMITZER L (1992) Inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* **11**, 1229-1238.
 - MURASHIGE T & SKOOG F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* **15**, 473-497.
 - NEWBY AC (1984) Adenosine and the concept of "retaliatory metabolites". *TIBS* **9**, 42-44.
 - NIEMEYER H (1988) Proteínas reguladoras de la actividad enzimática. *Anal. Acad. Nac. Cs. Fís. Nat.* **40**, 53-67.
 - NISHIKAWA AH (1966) Purification and characterization of cytoplasmic apyrase from plumules of *Pisum sativum*. Ph.D. Thesis. Oregon State University of Corvallis. Oregon. Microfilms (Ann. Arbor, Mich.) Order N066-3932.
 - NOVIKOFF AB & HEUS M (1963) A microsomal nucleoside diphosphatase. *J. Biol. Chem.* **238**, 710-716.
 - OBATA-SASAMOTO H & SUZUKI H (1979) Activities of enzymes relating to starch synthesis and endogenous levels of growth regulators in potato stolon tips during tuberization. *Physiol. Plant.* **45**, 320-324.
 - OLSSON RA & PEARSON JD (1990) Cardiovascular purinoceptors.

Physiol. Rev. 70, 761-845.

- PAIVA E, LISTER RM & PARK WD (1982) Comparison of the protein in axillary bud tubers and underground stolon tubers in potato. *Am. Potato J.* 59, 425-433.
- PALMER CE & SMITH OE (1970) Effect of kinetin on tuber formation on isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. *Plant Cell Physiol.* 11, 303-314.
- PAPAMARCAKI T & TSOLAS O (1990) Identification of ATP diphosphohydrolase activity in human term placenta using a novel assay for AMP. *Mol. Cell. Biochem.* 97, 1-8.
- PARK W (1983) Tuber proteins of potato. A new and surprising molecular system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1, 61-66.
- PARK W (1990) Molecular approaches to tuberization in potato. En: VAYDA ME y PARK WD (eds) *The Molecular and Cellular Biology of the Potato*. CAB International. Wallingford. pp 43-56.
- PEARCE FL, BANKS BEC, BANTHORPE DV, BERRY AR, DAVIS HS & VERNON C (1972) The isolation and characterization of nerve-growth factor from the venom of *Vipera russelli*. *Eur. J. Biochem.* 29, 417-425.
- PELACHO AM & MINGO-CASTEL AM (1991) Effects of photoperiod on kinetin-induced tuberization of isolated potato stolons cultured *in vitro*. *Am. Potato J.* 68, 533-541.
- PERL A, AVIV D, WILLMITZER L & GALUN E (1991) *In vitro* tuberization in transgenic potatoes harboring β -glucuronidase linked to a patatin promoter: effects of sucrose levels and photoperiods. *Plant Sci.* 73, 87-95.
- PIEBER M, VALENZUELA MA, KETTLUN AM, MANCILLA M, ARANDA E, COLLADOS L & TRAVERSO-CORI A (1991) ATPase-ADPase activities of rat placental tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B, 281-285.
- PONT-LEZICA RF, TAYLOR R & VARNER JE (1991) *Solanum tuberosum* agglutinin accumulation during tuber development. *J. Plant Physiol.* 137, 453-458.
- PREISS J (1982) Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 419-458.
- PREISS J (1988) Biosynthesis of starch and its regulation. En: PREISS J (ed.) *The Biochemistry of Plants*. Vol 14, Academic Press, Inc., pp 182-249.
- QUICK WA, SNYDER JC & DESBOROUGH SL (1979) The effect of maturation, protein content, and ploidy on phosphorus

metabolism of potato cultivars and Phureja-Tuberosum hybrids. Potato Res. 22, 1-17.

- RASTOVSKI A, VAN ES A, BUITELAAR N, DE HAAN PH, HARTMANS KJ, MEIJERS CP, VAN DER SCHILD, SIJBRING PH, SPARENBERG H & VAN ZWOL BH (1981) En: Storage of Potatoes. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen. pp 15-72.
- REDLICH V (1993) Localización y regulación de la ATP-difosfohidrolasa durante el desarrollo de *Solanum tuberosum*. Tesis para optar al título de Licenciada en Bioquímica de la Universidad de Santiago de Chile.
- REEVE RM, HUATALA E & WEAVER ML (1969) Anatomy and compositional variation within potatoes. I Developmental histology of the tuber. Am. Potato J. 46, 361-373.
- REISFIELD RA, LEWIS UJ & WILLIAMS DE (1962) Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature 195, 281-283.
- REYNOLDS ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208-212.
- REYNOLDS MP & EWING EE (1989) Effects of high air and soil temperature stress on growth and tuberization in *Solanum tuberosum*. Ann Bot. 64, 241-247.
- RIBEIRO JMC & GARCIA ES (1980) The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. J. Insect Physiol. 26, 303-307.
- RIBEIRO JMC, VAUGHAN JA & AZAD AF (1990) Characterization of the salivary apyrase activity of three rodent flea species. Comp. Biochem. Physiol. 95, 215-219.
- RIEDELL WE & MIERNYK JA (1988) Glycoprotein synthesis in maize endosperm cells. The nucleoside diphosphate-sugar:dolichol-phosphate glycosyltransferases. Plant Physiol. 87, 420-426.
- RIES S (1991) Triacontanol and its second messenger 9- β -L(+)-adenosine as plant growth substances. Plant Physiol. 95, 986-989.
- RIGBI M, LEVY H, ELDOR A, IRAQI F, TEITELBAUM M, OREVI M, ALAJOUTSIJARVI A, HOROVITZ A & GALUN R (1987) The saliva of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. I Biochemical characterization of the high molecular weight fraction. Comp. Biochem. Physiol. 87B, 567-573.
- RIP JW, WILLIAMS JA, CRICK DC, RYMERSON RT & CARROLL KK (1989) Biosynthesis of glycosylated dolichol intermediates and

- asparagine-linked glycoproteins during the germination of soybean seed embryos. *Biochem. Cell. Biol.* 67, 377-383.
- ROCHA-SOSA M, SONNEWALD U, FROMMER W, STRATMANN M, SCHELL J & WILLMITZER L (1989) Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J.* 8, 23-29.
 - SALANOUBAT M & BELLIARD G (1989) The steady-state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration. *Gene* 84, 181-185.
 - SANCHEZ-SERRANO J, SCHMIDT R, SCHELL J & WILLMITZER L (1986) Nucleotide sequence of proteinase inhibitor II encoding cDNA of potato (*Solanum tuberosum*) and its mode of expression. *Mol. Gen. Genet.* 203, 15-20.
 - SARKIS JJF, GUIMARAES & RIBEIRO JMC (1986) Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. *Biochem J.* 233, 885-891.
 - SCHMIDT HW & SCHÖNHERR J (1982) Fine structure of isolated and non-isolated tuber periderm. *Planta* 154, 76-80.
 - SHOWALTER AM (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5, 9-23.
 - SIKKA KC & DAS NB (1964) Berseem (*Trifolium alexandrinum* Linn) apyrase Indian. *J. Exp. Biol.* 2, 41-43.
 - SNYDER RG & EWING EE (1989) Interactive effects of temperature, photoperiod, and cultivar on tuberization of potato cuttings. *HortScience* 24, 336-338.
 - STADMAN E, NOVELLI GD & LIPMAN F (1951) Turbidimetric determination of protein. *J. Biol. Chem.* 191, 365-376.
 - SUGIYAMA H & DAS GM (1955) Apyrase in partially purified Staphylococcal enterotoxin. *J. Infection Diseases* 96, 286-294.
 - SUH SG, PETERSON JE, STIEKEMA WJ & HANNAPEL DJ (1990) Purification and characterization of the 22-kilodalton potato tubers proteins. *Plant Physiol.* 94, 40-45.
 - SUNDBERG L & PORATH J (1974) Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography. I. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes. *J. Chromatogr.* 90, 87-98.
 - TAYLOR MA, DAVIES HV & SCOBIE LA (1991) Molecular changes associated with tuberisation in *Solanum tuberosum*. Differential expression of α -tubulin isotypes. *Physiol. Plant.* 81, 244-250.

- TAYLOR MA, MAD ARIF SA, KUMAR A, DAVIES HV, SCOBIE LA, PEARCE SR & FLAVELL AJ (1992a) Expression and sequence analysis of cDNAs induced during the early stages of tuberisation in different organs of the potato plant (*Solanum tuberosum* L.) Plant Mol. Biol. 20, 641-651.
- TAYLOR MA, MAD ARIF SA, PEARCE SR, DAVIES HV, KUMAR A & GEORGE LA (1992b) Differential expression and sequence analysis of ribosomal protein genes induced in stolon tips of potato (*Solanum tuberosum* L.) during the early stages of tuberization. Plant Physiol. 100, 1171-1176.
- TAYLOR MA, BURCH LR & DAVIES HV (1993) Changes in polyamine biosynthesis during the initial stages of tuberisation in potato (*Solanum tuberosum* L.) J. Plant Physiol. 141, 370-372.
- TOGNOLI L & MARRE E (1981) Purification and characterization of a divalent cation-activated ATPase-ADPase from pea stem microsomes. Biochim. Biophys. Acta 642, 1-14.
- TOGNOLI L (1984) Interaction of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase from pea with a membrane protein factor. Phytochemistry 23, 515-518.
- TOWBIN H, STAHELIN T & GORDON J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some application. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4350-4354.
- TRAVERSO-CORI A & CORI O (1962) Splitting of terminal phosphate group of adenosine triphosphate by potato apyrase. Biochim. Biophys. Acta 57, 158-160.
- TRAVERSO-CORI A, CHAIMOVICH H & CORI O (1965) Kinetic studies and properties of potato apyrase. Arch. Biochem. Biophys. 109, 173-184.
- TRAVERSO-CORI A, TRAVERSO S & REYES H (1970) Different molecular forms of potato apyrase. Arch. Biochem. Biophys. 137, 133-142.
- VALENZUELA MA, DEL CAMPO G, MARIN E & TRAVERSO-CORI A (1973) Effects of protein-modifying reagents on an isoenzyme of potato apyrase. Biochem. J. 133, 755-763.
- VALENZUELA MA, KETTLUN AM, MANCILLA M, CALVO V, FANTA N & TRAVERSO-CORI A (1988) The effect of bivalent metal ions on ATPase-ADPase activities of apyrase from *Solanum tuberosum*. Phytochemistry 27, 1981-1985.
- VALENZUELA MA, LOPEZ J, DEPIX H, MANCILLA M, KETTLUN AM, CATALAN L, CHIONG M, GARRIDO J & TRAVERSO-CORI A (1989)

Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant sources. Characterization of microsomal apyrase. *Comp. Biochem. Physiol.* 93B, 911-919.

- VALENZUELA MA, COLLADOS L, KETTLUN AM, MANCILLA M, LARA H, PUENTE J, ARANDA E, CHAYET L, ALVAREZ A & TRAVERSO-CORI A (1992) Changes in apyrase activity in uterus and mammary gland during lactogenic cycle. *Comp. Biochem. Biophys.* 103B, 113-118.
- VAN ES A & HARTMANS KJ (1981) Structure and Chemical Composition of the Potato. En: BUITELAAR N, VAN ES A, DE HAAN PH, HARTMANS KJ, MEIJERS CP, RASTOVSKI A, VAN DER SCHILD JHW, SIJBRING PH, SPARENBERG H y VAN ZWOL BH (eds) Storage of Potatoes. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen. pp 17-81.
- VARA F & SERRANO R (1981) Purification and characterization of a membrane-bound ATP-diphosphohydrolase from *Cicer arietum* (chick-pea) roots. *Biochem.J.* 197, 637-643.
- VARNER JE & LIN LS (1989) Plant cell wall architecture. *Cell* 56, 231-239.
- VOGT E, SCHÖNHERR J & SCHMIDT HW (1983) Water permeability of periderm membranes isolated enzymatically from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) *Planta* 158, 294-301.
- VREUGDENHIL D & STRUIK PC (1989). An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* 75, 525-531.
- WATTENDORFF J (1974) The formation of cork cells in the periderm of *Acacia senegal* Willd. and their ultrastructure during suberin deposition. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 72, 119-134.
- WEBER K & OSBORN M (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- WELIKY N, BROWN FS & DALE EC (1969) Carrier-bound proteins: properties of peroxidase bound to insoluble carboxymethylcellulose particles. *Arch. Biochem. Biophys* 131, 1-8.
- WENZLER HC, MIGNERY GA, FISHER LM & PARK WD (1989a) Analysis of achimeric class-I patatin-GUS gene in transgenic potato plants: high-level expression in tubers and sucrose-inducible expression in cultured leaf and stem explants. *Plant Mol. Biol.* 12, 41-50.
- WENZLER HC, MIGNERY GA, FISHER LM & PARK WD (1989b) Sucrose-regulated expression of a chimeric potato tuber gene in leaves

- of transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* **13**, 347-354.
- WHEELER RM, HANNAPPEL DJ & TIBBITTS TW (1988) Comparison of axillary bud growth and patatin accumulation in potato leaf cutting as assays for tuber induction. *Ann. Bot.* **62**, 25-30.
 - WILLMITZER L, BASNER A, FROMMER W, HÖFGEN R, LIU XJ, KÖSTER M, PRAT S, ROCHA-SOSA M, SONNEWALD U & VANCANNEYT G (1990) Tuber-specific gene expression in transgenic potato plants. In: LYCETT GW y GRIERSON D (eds) *Genetic Engineering of Crop Plants*. Butterworths. London. pp 105-114.
 - WINTER A, EK K & ANDERSON V (1977) Analytical electrofocusing in thin layers of polyacrylamide gels. *LKB application Note* 250, December.
 - WURR DCE (1977) Some observations of patterns of tuber formation and growth in the potato. *Potato Res.* **20**, 63-75.
 - YAGI K, SHINBO M, HASHIZUME M, SHIMBA LS, KURIMURA S & MIURA Y (1991) ATP diphosphohydrolase is responsible for ecto-ATPase and ecto-ADPase activities in bovine aorta endothelial and smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **180**, 1200-1206.