

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

00567
N-6
2Ej.

CARACTERIZACION DE LA APARICION DE LA ATP_{asa} DE H^+ DE LA
A.1

MEMBRANA PLASMATICA EN LA GERMINACION DE EMBRIONES

DE MAIZ

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)
PRESENTA LA:

Q. F. B. SOBEIDA SANCHEZ NIETO

MÉXICO, D.F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE:	Dra. Marietta Tuena de Gómez Puyou
PRIMER VOCAL:	Dra. Irma Bernal Lugo
SECRETARIO:	Dr. Edmundo Chávez Cossio
PRIMER SUPLENTE:	Dr. Diego González Halphen
SEGUNDO SUPLENTE:	Dr. Blas Lotina Henssen

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 104 en el Departamento de Bioquímica, Conjunto E, DEPg, Facultad de Química UNAM.

Dra Marina Gavilanes Ruíz
ASESOR

Q.F.B. Sobeida Sánchez Nieto

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marina Gavilanes Ruiz por su acertada dirección y dedicación durante el desarrollo de este trabajo, así como por el apoyo y confianza que siempre me ofreció.

A las Dras. Marietta Tuena de Gómez Puyou e Irma Bernal Lugo por su interés y sus valiosas sugerencias para la realización de este trabajo, además de la revisión crítica del presente manuscrito.

Al Dr. Diego González Halphen por sus atinadas observaciones durante el desarrollo de este trabajo y además por su gran ayuda en el diseño y elaboración del anticuerpo contra la ATPasa de membrana plasmática.

Al Biól. Oscar R. García Rubio le agradezco su invaluable ayuda para montar la técnica de obtención de vesículas de membrana plasmática, sin la cual no hubiera sido posible llevar a término este trabajo.

A la M. en C. Erika Rendón por su amable disposición en la inmunización del conejo y la obtención del anticuerpo.

Al M. en C. Jorge Sepúlveda, por su desinteresada ayuda y paciencia en la realización de las fotografías al microscopio electrónico de las vesículas de membrana plasmática.

A la Biól. Emma Bertha Gutierrez-Cirlos por el tiempo que me brindó para el análisis densitométrico de mis blots.

Este trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) con el número de proyecto IN206691.

Agradezco también al CONACyT por la beca crédito otorgada para la realización de mis estudios. No. de Registro 58554.

DEDICATORIAS

Con amor para mis padres:

Sobeida Nieto Cacho
Julio Sánchez Cabrera

Con mucho cariño a mis hermanos:

María del Carmen
Julio Alberto

Para mi amor:

Leobardo

Y para mis compañeros y amigos del laboratorio 104, Oscar, Alicia, Socorro, Fernando, Patricia y Carmen.

RESUMEN

Muchos procesos metabólicos y fisiológicos están implicados en el proceso de germinación de una semilla, el cual se inicia con la entrada de agua a ésta y se expresa en la salida de la radícula. Durante esta etapa es muy importante la movilización de las reservas de nutrimentos del endospermo hacia el embrión para sostener su crecimiento, de manera que los sistemas de transporte de solutos en las membranas de las células embrionarias deben ser muy activos, por lo cual la actividad de una bomba primaria como la ATPasa de membrana plasmática resultaría fundamental. La enzima acopla la hidrólisis de ATP al transporte vectorial de protones desde el citoplasma hasta el exterior de la célula. El gradiente electroquímico formado puede servir para el transporte de solutos, mientras que la acidificación que se produce ayudaría al mantenimiento del pH citoplásmico y al aflojamiento de la pared celular, necesario para el crecimiento de la célula. Ambos factores resultan importantes en la germinación de la semilla.

Para el estudio de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática (MP) en la germinación de embriones de maíz se procedió a obtener una preparación enriquecida en vesículas de membrana plasmática de los embriones de maíz embebidos por diferentes tiempos, mediante la técnica de partición de fases. Se hicieron modificaciones a la técnica para obtener un enriquecimiento en vesículas de la membrana plasmática por arriba del 70%. La concentración de Peg y Dex que se usó para obtener las vesículas de MP de los embriones secos fue diferente a la de los embriones embebidos, pero en ambos casos se logró obtener un enriquecimiento cercano al 80% y en algunas preparaciones hasta del 90%. Cuando se midió la actividad de la ATPasa de la MP en las vesículas enriquecidas se encontró que en los embriones secos hay actividad de ATPasa de la MP, ésta se incrementa al máximo a 1h de imbibición del embrión, a las 2h decrece la actividad y se mantiene hasta las 7h de imbibición.

Se hicieron geles de poliacrilamida-SDS de las vesículas de membrana plasmática y se transfirieron las proteínas al papel de nitrocelulosa, o bien, se adsorbieron directamente las proteínas al papel de nitrocelulosa, siguiéndose después en ambos casos la técnica de Western, revelándose con fosfatasa alcalina. En las mismas vesículas se detectó a la ATPasa mediante un anticuerpo que reacciona contra un péptido de 14 aminoácidos que se encuentra en el NH_2 terminal de la enzima. Los patrones densitométricos de las inmunorréplicas de las fracciones de vesículas de MP a los diferentes tiempos de imbibición del embrión presentaron un perfil similar al encontrado cuando se midió la actividad, si bien el pico máximo de ATPasa se encontró una hora después del de la actividad de la enzima.

La diferencia entre los perfiles de actividad y de proteína durante la imbibición del embrión, puede deberse a una o varias de las siguientes causas: a) recambio de la enzima preformada con la sintetizada *de novo*, b) expresión diferencial de isoformas de la enzima, c) regulación de la actividad de la enzima por factores celulares.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Ontogenia y estructura de la semilla de maíz.....	1
1.2. Germinación.....	4
1.3. ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática de plantas.....	10
1.3.1 Preparaciones usadas en el estudio de la ATPasa-H ⁺ de la MP.....	11
1.3.1.1. Vesículas de membrana plasmática.....	11
1.3.1.2. Enzima pura y reconstituida en liposomas.....	14
1.3.2 Características de la enzima.....	15
1.3.3 Estructura de la ATPasa-H ⁺ de la MP de plantas.....	17
1.3.4 Mecanismo catalítico.....	20
1.3.5 Función fisiológica.....	21
1.3.6 Regulación.....	24
2. HIPOTESIS.....	29
3. OBJETIVOS.....	30
4. MATERIALES Y METODOS.....	31
4.1. Material biológico.....	31
4.2. Siembra de embriones.....	31
4.3. Medición del porcentaje de germinación.....	31
4.4. Acumulación de peso húmedo en embriones.....	32
4.5. Medición del consumo de oxígeno en embriones.....	33
4.6. Procedimientos de homogenización.....	34
4.7. Obtención de las fracciones de homogenado sin Núcleos, Microsomal + Mitocondrial y Microsomal.....	35

4.8.	Obtención de vesículas enriquecidas en membrana plasmática por el método de partición en un sistema de polímeros en dos fases.....	36
4.9.	Precipitación de las diferentes fracciones membranales con acetona al 70 %.....	39
4.10.	Determinación de la concentración de proteína.....	39
4.11.	Fotografías al microscopio electrónico de las fracciones microsomal y U ₂ de embriones embebidos 0 y 1 hora.....	40
4.12.	Medición de la actividad de hidrólisis de ATP.....	41
4.13.	Cuantificación del fosfato liberado.....	42
4.14.	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.....	42
4.15.	Electrotransferencia de proteínas de geles de poliacrilamida-SDS a papel de nitrocelulosa.....	44
4.16.	Adsorción de proteínas a papel de nitrocelulosa.....	45
4.17.	Inmunodetección de la ATPasa de H ⁺ de membrana plasmática (técnica de Western).....	46
4.18.	Obtención del anticuerpo contra la porción amino terminal de la ATPasa de membrana plasmática.....	48
4.19.	Obtención de los perfiles densitométricos de las inmunorélicas y Western en hendidura.....	51
5.	RESULTADOS.....	52
5.1.	Parámetros fisiológicos de la germinación del embrión.....	52
1.1.	Porcentaje de Germinación.....	52
1.2.	Cinética de la toma de agua.....	54
1.3.	Cinética de consumo de oxígeno.....	54
5.2.	Identificación de los componentes proteicos que hidrolizan ATP en la fracción microsomal de embriones de maíz.....	57
5.3.	Determinación de la composición óptima de la mezcla de fases para obtener el mayor enriquecimiento en VMP por el método de partición en dos fases.....	59

5.4. Elección de la fracción membranal para obtener VMP por el método de partición en dos fases.....	61
5.5. Efecto de la cantidad de proteína en la purificación de VMP obtenidas por una segunda partición de fases.....	63
5.6. Rendimiento en VMP obtenidas de una segunda partición de fases.....	66
5.7. Comparación de los componentes proteicos que hidrolizan ATP en las fracciones microsomal y U ₂	67
5.8. Influencia de la concentración de polímeros en el enriquecimiento de VMP de embriones secos de maíz....	69
5.9. Comparación de la purificación de VMP de embriones secos y embebidos por la actividad de hidrólisis de ATP sensible a Na ₃ VO ₄	71
5.10. Comparación de la purificación de VMP de embriones secos y embebidos por microscopía electrónica.....	72
5.11. Patrón de actividad de la ATP _{asa} de MP en VMP purificadas de embriones embebidos por diferentes tiempos.....	75
5.11.1. Purificación de VMP de embriones embebidos por diferentes tiempos.....	75
5.11.2. Patrón de la actividad de la ATP _{asa} de MP....	76
5.12. Inmunodetección de la ATP _{asa} de MP con el anticuerpo contra la porción central de la ATP _{asa} de MP de <i>Arabidopsis thaliana</i>	78
5.13. Obtención del anticuerpo específico para la ATP _{asa} de MP de plantas.....	80
5.14. Caracterización del anticuerpo obtenido contra la región amino terminal de la ATP _{asa}	81
5.15. Inmunodetección en réplica en Western de la ATP _{asa} de MP en las VMP de embriones embebidos por diferentes tiempos.....	83
5.16. Detección y cuantificación de la ATP _{asa} de MP en las VMP de embriones embebidos por diferentes tiempos....	85
5.17. Perfil de la ATP _{asa} de MP a los diferentes tiempos de imbibición del embrión.....	87

5.18. Cinética de aparición de la ATPasa de MP en vesículas purificadas de embriones de maíz en germinación.....	89
6. DISCUSION.....	91
7. CONCLUSIONES.....	105
8. BIBLIOGRAFIA.....	106

ABREVIATURAS

BSA	Albúmina de suero bovino
CCCP	Carbonil cianuro 3- cloro fenilhidrazona
CTC	Solución de cobre tartrato carbonato
ApH	Gradiente de pH
$\Delta\psi$	Gradiente electroquímico
DES	Dietilestilbestrol
Dex	Dextran T-500
DCCD	Diciclohexil carbodiimida
DOC	Desoxicolato de sodio
DTE o DTT	Ditioeritol o ditiotreitól
E ₁ o E ₂	Conformación 1 o 2 de la enzima
EDTA	Etilendiamino tetraacético
K _m	Constante de Michaelis
K _i	Constante de inhibición
L ₁	Fracción inferior de un sistema de fases que resulta de una primera partición de fases
L ₂	Fracción inferior de un sistema de fases, producto de una segunda partición de fases
MBS	m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimido éster
MP	Membrana plasmática
NTP	Nucleósido trifosfato
NDP	Nucleósido difosfato
Peg	Polietilenglicol 3350
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBS	Solución amortiguada con Tris
TTBS	Solución salina amortiguada con Tris
TLCK	1-1Cloro-3-4-tosilamido-7-amino-2-heptanona-HCl
TPCK	1-1Cloro-3-4-tosilamido-4-2-heptanona
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamino
U ₁	Fracción superior de un sistema de fases que resulta de una partición de fases y que está enriquecida en VMP

U₂

Fracción superior obtenida al realizar dos particiones de fases consecutivas. Se encuentra enriquecida en VMP

VMP

Vesículas de membrana plasmática

1. INTRODUCCION

1.1. Ontogenia y estructura de la semilla de maíz.

La semilla es un óvulo fertilizado maduro de plantas. Es el medio natural de dispersión, propagación y perpetuación de muchas especies vegetales, ya que contiene sustancias nutritivas, la maquinaria metabólica y las estructuras celulares necesarias para formar una nueva planta (Niembro, 1988).

La semilla de maíz se origina por el proceso de doble fertilización que ocurre en el gametofito femenino y llega a su madurez 40 a 50 días después de la fertilización (Lindsey y Topping, 1993). En la semilla madura se logran distinguir las siguientes partes (Fig. 1):

a) La cubierta seminal o pericarpio, que se encuentra recubriendo a la semilla madura, protegiéndola de daños físicos y bióticos procedentes del exterior. Es un tejido que se formó de los tegumentos que rodean al óvulo (Niembro, 1988).

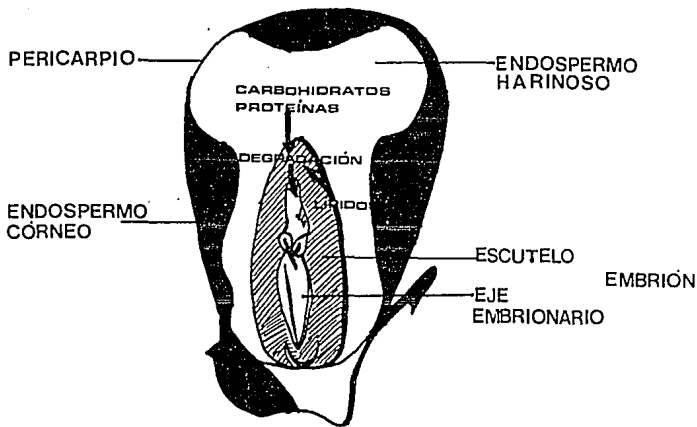


Fig. 1. Corte longitudinal de una semilla de maíz, indicándose las estructuras que la conforman (adaptado de Bewley y Black, 1986).

b) El endospermo, es un tejido que se originó por la fusión de uno de los dos núcleos espermáticos con dos núcleos polares del gametofito. La mayoría de sus células se dividieron asincrónicamente, sintetizando y almacenando compuestos químicos como carbohidratos (principalmente almidón), proteínas y lípidos, que serán posteriormente utilizados cuando la germinación comience y hasta que la plántula recién formada se establezca como organismo autótrofo. Además, en el endospermo se encuentra una capa especializada de células llamada aleurona que contiene enzimas hidrolíticas, las cuales serán usadas en el proceso de movilización de reservas, principalmente del almidón (Ching, 1978; Lindsey y Topping, 1993).

La consistencia del endospermo depende principalmente de los compuestos químicos almacenados. El endospermo córneo, de consistencia dura, se compone principalmente de hemicelulosa mientras que el endospermo harinoso contiene principalmente almidón, lo cual le da una consistencia de harina (Niembro, 1988).

c) El embrión se originó por la fertilización de uno de los dos núcleos espermáticos con la célula huevo, que después de subsecuentes divisiones celulares asimétricas se fue organizando espacialmente para generar la diversidad celular que existe en el embrión. En el embrión maduro se logran distinguir el eje embrionario que contiene las estructuras que darán lugar al tallo y a la raíz en la planta y el escutelo que lo rodea (el cual representa el cotiledón característico del maíz). En el proceso de la germinación, el escutelo se encargará de la absorción de las sustancias de reserva del endospermo, así como de su degradación y transporte hacia el eje embrionario, para lo cual contiene grandes cantidades de enzimas hidrolíticas. Además, puede almacenar gránulos de carbohidratos, proteínas y lípidos, aunque en mucho menor proporción que el endospermo (Esau, 1977; Lindsey y Topping, 1993).

Los cambios que ocurren desde la fertilización hasta la formación de la semilla madura son: la diferenciación morfológica y fisiológica de los órganos, la adquisición de la maquinaria metabólica necesaria para su crecimiento, el almacenamiento de sustancias nutritivas y por último, la disminución del contenido de agua (deseccación). Una vez llegado al estado de madurez, la semilla puede pasar a un estado de letargo o dormancia (semillas ortodoxas) en el cual el crecimiento activo se suspende, o bien seguir su crecimiento hacia plántula, dependiendo esto de las condiciones ambientales que la rodean, como son la luz, temperatura y humedad, así como la permeabilidad de la testa al agua y de la presencia de inhibidores de la germinación en la semilla (Esau, 1977; Villiers, 1978).

1.2. Germinación.

El proceso de germinación comienza con la entrada de agua a la semilla y culmina con la salida de la radícula (Ching, 1978; Bewley y Black, 1986). La absorción de agua o imbibición es un paso esencial en el proceso de la germinación y es un fenómeno que está bien descrito en la literatura. Generalmente se acepta que ocurren en ella tres grandes eventos o fases, los cuales delinearán claros cambios del metabolismo de la semilla (Fig. 2).

FASE I.

En la primera fase hay una toma rápida de agua, debida a la hidratación de los constituyentes de la semilla, tales como proteínas, lípidos, carbohidratos y organelos, entre otros. Con ello ocurre la reactivación de las moléculas y organelos preexistentes, los cuales fueron formados durante la maduración de la semilla y subsecuentemente almacenados (Ching, 1978; Bewley y Black, 1986). Tanto semillas viables como no viables presentan esta fase.

Hay una lista enorme de enzimas que se han encontrado en la semilla entera, el cotiledón o el embrión, ya sea en estado seco o con pocas horas de hidratación y en diferentes especies. Entre las enzimas que se han encontrado se incluyen las siguientes: aldolasa, β -amilasa, α -galactosidasa, isoamilasa, invertasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, UDPG transferasas, glutámico descarboxilasa, peptidasas, proteasas, ureasa, isocitrato liasa, malato sintetasa, lipooxigenasa, fosfolipasa D, aconitasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, catalasa, esterasa, peroxidasa fitasa, adenosin cinasa y ribonucleasa entre otras; todas estas enzimas forman parte de vías importantes en el metabolismo celular (Ching, 1978).

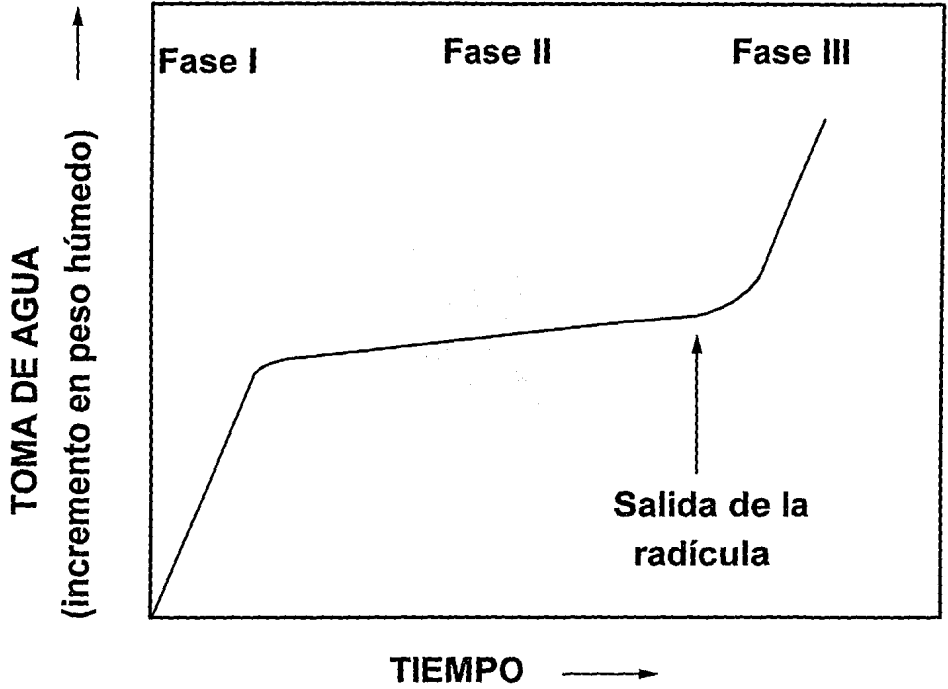


Fig. 2. Perfil trifásico de la toma de agua de semillas en germinación (adaptado de Bewley y Black, 1986).

FASE II.

En la fase II ocurre la síntesis activa de ATP, sustratos, coenzimas, proteínas (enzimas y estructurales), DNA, RNA, organelos, membranas y los materiales de la pared celular, necesarios para el alargamiento y división de las células del eje embrionario. Todo ello se realiza a expensas de las reservas de nutrimentos que fueron almacenados en el endospermo (Ching, 1978; Bewley y Black, 1986). En esta fase el único cambio morfológico observable es el alargamiento de las células, principalmente las de la radícula, dado sólo por el aumento de volumen de las células y no por su división.

La movilización de las reservas del endospermo ha sido motivo de estudio debido a la importancia que tiene en la supervivencia y el crecimiento del embrión. Se han logrado caracterizar con mayor precisión los cambios morfológicos que la fisiología y la bioquímica de los procesos que ocurren. De hecho, hay mucho desconocimiento en estos dos últimos aspectos, ya que están implicados muchos compuestos que se están activando o sintetizando, algunos en secuencia y otros en concierto, dependiendo de su localización sitio-temporal. Además, ciertos componentes como las enzimas se ven influenciados por factores exógenos a ese tejido (como son los fitoreguladores), de los cuales no se sabe con certeza el mecanismo por el cual ejercen su acción.

El seguimiento de una enzima o de un conjunto de enzimas, se ha realizado ya sea por la aparición o desaparición de productos o sustratos en alguno o varios de los tejidos de la semilla, o por su influencia en el metabolismo general de la célula o por el cambio en las propiedades físicas de los tejidos (viscosidad, refractancia, etc.).

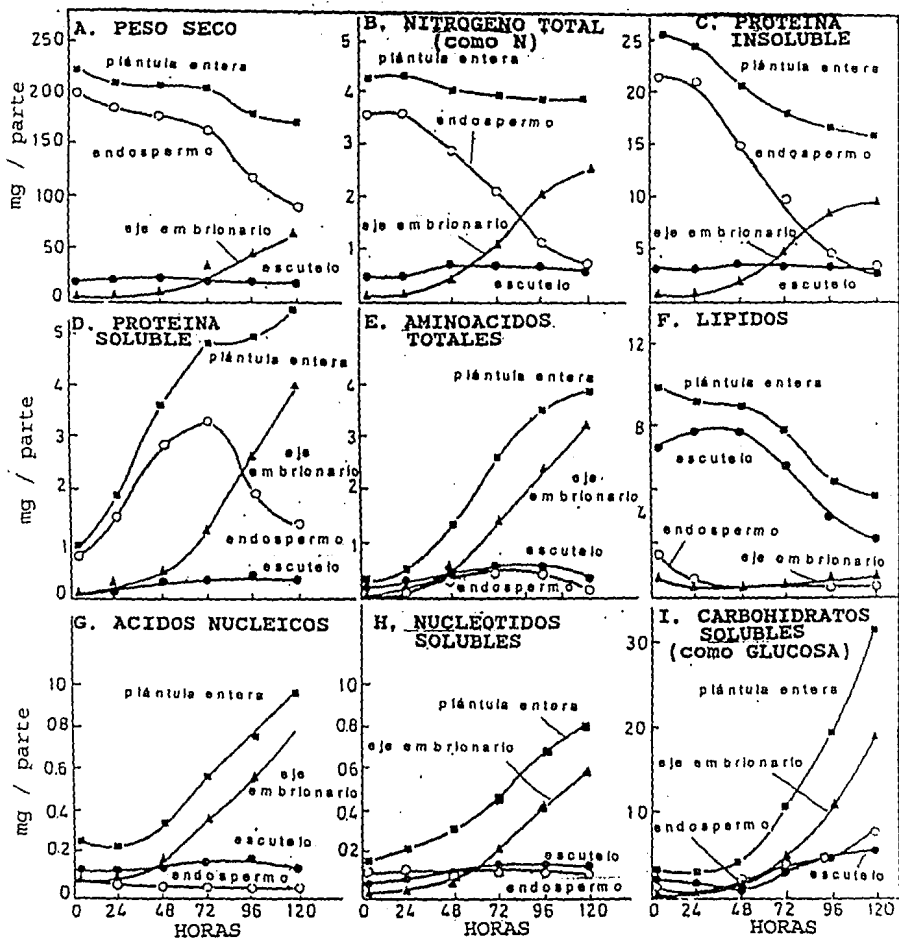


Fig. 3. Cambios en el contenido de varios componentes en diferentes partes de *Zea mays*, durante la germinación (Adaptado de Ingle et al, 1964).

En la figura 3 se presentan los cambios de algunos compuestos químicos y macromoléculas en el transcurso de la germinación de semillas de maíz. Los datos indican que conforme la germinación avanza, las sustancias nitrogenadas (proteínas y nucleótidos) y los carbohidratos, ambos localizados en el endospermo, y los lípidos en el escutelo, son transportados hacia el eje embrionario (Fig. 3B, 3C, 3D, 3F y 3G); pero para ser asimilados por éste, los polímeros deben ser hidrolizados a aminoácidos, azúcares (Fig. 3E y 3G), ácidos grasos y glicerol respectivamente.

Se conoce por ejemplo, que en la semilla de maíz el almidón representa del 70 al 80% de los carbohidratos almacenados en el endospermo y su degradación ocurre por la actividad de las enzimas de la capa de aleurona, las cuales aumentan su actividad o elevan su síntesis por un estímulo exógeno, como es el ácido giberélico (Ching, 1978). La glucosa producida a partir del almidón es absorbida por el escutelo y transformada a sacarosa, de aquí es transportada hacia el eje embrionario vía un simporte con protón en la membrana plasmática (Humprey, 1987 y 1988). Para que se lleve a cabo la síntesis y almacenamiento de sacarosa en el escutelo se necesita de energía, la cual es provista por la mitocondria, que se multiplica rápidamente en este durante la germinación (Ching, 1978).

La actividad respiratoria en el inicio de la germinación es alta, lo cual indica que en la semilla seca se encuentran las subunidades peptídicas y los cofactores correspondientes a las enzimas capaces de llevar a cabo la actividad respiratoria (Ching, 1978; Ehrenshaft y Brambl, 1990). En ejes embrionarios de maíz, opera la vía sensible a NaCN mientras que en embriones están presentes esta vía y la insensible a NaCN o de oxidasa alterna (Ehrenshaft y Brambl, 1990), si bien en ejes embrionarios de frijol, Puntarulo y colaboradores (1987) encontraron que el total del consumo de oxígeno detectado, se debe a una citocromo oxidasa, a la oxidasa alternativa, a la lipooxigenasa, a la

autooxidación de los componentes respiratorios y a otras oxidasas citosólicas. El consumo de oxígeno involucra una gran cantidad de compuestos orgánicos y su degradación oxidativa, que en el inicio de la germinación van a llevar hacia la formación de compuestos de alta energía, utilizados en la síntesis de ribosomas, mitocondrias, glioxisomas, plastidios, núcleos y membranas (Ching, 1978).

Aunado al marcado incremento en la velocidad de síntesis de proteínas se observa una síntesis activa de nucleótidos y ácidos nucléicos en el eje embrionario de maíz (Fig. 3G y 3H).

FASE III.

En esta fase ocurren los mayores cambios morfológicos del embrión. Se inicia con la salida de la radícula, la cual crece hasta convertirse en la raíz primaria, mientras que en el extremo superior del eje embrionario empieza el crecimiento del tallo o epicotilo y la aparición de las primeras hojas. Entre la radícula y el epicotilo se encuentra una estructura denominada hipocotilo. El hipocotilo se alarga por arriba de la raíz primaria y se diferencia dando lugar a las raíces adventicias de la nueva plántula (Ching, 1978; Bewley y Black, 1978).

La aparición de la radícula marca el inicio de la primera división mitótica de las células embrionarias y el crecimiento de ésta ocurre a expensas de los nutrimentos remanentes del endospermo; al desaparecer éste y el escutelo, comienza el crecimiento autótrofo de la nueva plántula (Esau, 1977).

Una de las enzimas que podría estar involucrada de manera importante en el proceso de germinación de la semilla sería la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, puesto que crea una diferencia de potencial eléctrico y de pH en la membrana, que puede ser usado para el transporte de nutrimentos hacia las células embrionarias y además la acidificación que se produce en el apoplasto, ocasionaría que los componentes de la pared celular se aflojaran, éstos dos procesos ayudarían al crecimiento de la célula.

3. ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de plantas.

La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de plantas lleva a cabo simultáneamente la hidrólisis de ATP y el transporte de H^+ desde el citosol hacia el exterior de la célula, creando de esta manera una diferencia de potencial eléctrico y de pH, el cual puede ser usado en múltiples procesos fisiológicos que se detallarán más adelante.

Antecedentes:

El primer reporte sobre la caracterización molecular de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática (MP) de plantas lo realizaron Hodges y colaboradores en 1972, y a partir de entonces ha surgido una extensa información sobre las características bioquímicas y estructurales de la enzima, así como sobre su importancia fisiológica.

3.1 Preparaciones usadas en el estudio de la ATPasa-H⁺ de la MP.

El estudio de la enzima se ha realizado en diferentes tipos de preparaciones: a) en vesículas tanto de extractos crudos (fracción microsomal) como en fracciones enriquecidas en vesículas de membrana plasmática (VMP) y b) en la enzima pura solubilizada y reconstituida en liposomas (Sze, 1985 y Serrano, 1990). Además, gracias al conocimiento de la secuencia de nucleótidos del gene de la ATPasa de la MP de *Arabidopsis thaliana* y con ayuda de las técnicas de biología molecular, se ha logrado sobreexpresar a la enzima en *Saccharomyces cerevisiae* (Villalba et al, 1992) para ser utilizada posteriormente en estudios cinéticos (Palmgren y Christensen, en prensa).

3.1.1. Vesículas de membrana plasmática

Las fracciones microsomales crudas se obtienen por homogenización del tejido y a centrifugación diferencial (Serrano, 1989). Estas preparaciones contienen a las vesículas de membrana plasmática (VMP) y además las vesículas membranales de otros organelos como son el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, la mitocondria y la vacuola.

Tabla I. Enzimas que hidrolizan ATP y que se encuentran en fracciones crudas de plantas.

ENZIMA	pH OPTIMO	SUSTRATOS	INHIBIDORES
ATP _{asa} mitocondrial (EC 3.6.1.34)	8 - 9	ATP > GTP Mg ²⁺ > Ca ²⁺	Oligomicina (1μM) Azida (1mM) DCCD (1μM)
ATP _{asa} vacuolar	7 - 8	ATP > GTP Mg ²⁺ > Ca ²⁺	Nitrato (20mM) DES (0.1mM) DCCD (10μM) Eritrocina B (50μM) N-etilmaleimida (10μM)
ATP _{asa} - Ca ²⁺ de la membrana plasmática	7 - 7.2	ATP > ITP Ca ²⁺ > Mg ²⁺	Na ₃ VO ₄ (100μM) Eritrocina B (50μM)
ATP _{asa} -H ⁺ de la membrana plasmática (EC 3.6.1.35)	6 - 7	ATP >> NTP Mg ²⁺	Na ₃ VO ₄ (50 a 100μM) Eritrocina B (50μM) DCCD (0.1mM) DES (0.1mM)
Fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2)	8 - 9	Esteres de fosfato	Molibdato (0.1mM) Na ₃ VO ₄ (0.1mM)
Apirasa (EC 3.6.1.5)	6 - 7	NTP y NDP ⁺ Ca ²⁺ o Mg ²⁺	No conocido

* NTP y NDP son nucleótidos trifosfato o difosfato respectivamente.

La identificación de la ATP_{asa} de la MP en esta la fracción microsomal es difícil, ya que se encuentran enzimas que también hidrolizan ATP y que están presentes en otras membranas (Tabla I). Las actividades enzimáticas de éstas se pueden evaluar por el uso de inhibidores específicos, por modificación de las condiciones de reacción o una mezcla de inhibidores para mantener solo una de las actividades enzimáticas presentes (Faraday y Spanwick, 1992 Serrano, 1990; Liß et al., 1991).

Debido a los problemas que implica la identificación de la actividad de la enzima en la fracción microsomal cruda, esta fracción se ha sometido a purificaciones posteriores. Hay diversos métodos reportados para obtener una fracción enriquecida en VMP, y la elección de cualquiera de ellos depende del uso que se hará de las membranas purificadas.

Utilizando para la separación de las vesículas de diferentes organelos los gradientes de dextran, de sacarosa o de glicerol, que aprovechan los diferentes tamaños, así como sus diferencias en densidad; las VMP se equilibran entre una densidad de 1.13 a 1.17 g/cc. Y se obtienen con el 60 al 80 % de pureza, con las desventajas de que éstas existen como una mezcla de vesículas de polaridad normal ("right-side-out", con el sitio catalítico de la enzima expuesto hacia el interior de la vesícula) y de polaridad invertida ("inside-out", con el sitio catalítico de la enzima expuesto hacia el exterior de la vesícula) y que además son permeables a los iones y al ATP (Sze, 1985; Hodges y Mills, 1986 y Larsson et al, 1987).

Otro método que ha sido empleado para obtener VMP es el de separación o partición en dos fases, utilizando dos polímeros como el dextran T-500 y el polietilenglicol 3350. La separación de las VMP de las otras vesículas se basa en la carga de superficie que las caracteriza, por lo que, se obtiene además una población homogénea en la orientación de las vesículas, lo que las hace un material útil en estudios de transporte. La pureza que se alcanza utilizando este método es de aproximadamente del 80 al 90%. (Hodges y Mills, 1986 y Larsson et al, 1984 ,1987).

Para evaluar la pureza de las VMP y la contribución de los posibles contaminantes membranales, se utilizan diferentes marcadores bioquímicos (Tabla II). De manera ideal, un marcador debe representar una actividad enzimática única o una propiedad intrínseca asociada a la membrana que la contiene. Ya que es difícil encontrar una enzima o marcador que sea exclusivo de una

membrana, se ha recomendado el uso de varios marcadores.

Tabla II. Marcadores bioquímicos de diferentes membranas celulares (tomado de Hodges y Mills, 1986 y Briskin et al, 1987).

MEMBRANA	MARCADOR BIOQUIMICO
Plasmática	ATPasa estimulada por K^+ , inhibida por vanadato Glucana Sintetasa II UDPG-esterol glucosil transferasa Celulasa Unión de ácido naftiltalámico Tinción con ácido crómico-ácido fosfotungstico
Tonoplasto	ATPasa inhibida por KNO_3 Pirofosfatasa
Mitocondria	Citocromo-c oxidasa ATPasa inhibida por azida
Golgi	IDPasa latente UDPasa estimulada por Tritón Glucana Sintetasa I
Reticulo endoplásmico	NADH o NADPH citocromo c reductasa insensible a azida

3.1.2. Enzima pura y reconstituida en liposomas.

La enzima ha sido purificada a partir de la fracción microsomal usando soluciones que incluyen una combinación de sales (KCl o KBr) y detergentes (Tritón X-100, sales biliares, octilglucósido), para eliminar las proteínas periféricas.

Posteriormente se estabilizó la ATP_{asa} con glicerol (20 a 45%), DTT y EDTA. Se solubilizó con detergentes como la lisolecitina y el zwittergente 3-14 (N-tetradecil-N,N-amonio-1-propanosulfonato), solos o en combinación con sales biliares. Para separarla de otras proteínas solubilizadas por una centrifugación zonal sobre un gradiente de glicerol. El establecimiento de la pureza de la ATP_{asa} se verificó por electroforesis en gel o por técnicas inmunológicas (Sze, 1985 y Serrano, 1990).

3.2 Características de la enzima.

La enzima pura y reconstituída en liposomas tiene un peso molecular aproximado de 100 KDa y es capaz de llevar a cabo la hidrólisis de ATP asociado al bombeo de protones. En experimentos realizados para determinar el peso molecular de la proteína nativa se han obtenido pesos moleculares de 225 a 228 KDa, sugiriendo que la enzima puede existir como un dímero. Sin embargo, es posible que los detergentes y el proceso de calentamiento que se realiza en la preparación de las muestras a correr en un gel pueden ocasionar que la enzima se agregue (Briskin et al, 1985 y De Michelis et al, 1990).

La ATP_{asa} de H⁺ de la MP utiliza preferentemente al ATP como sustrato, disminuyendo su actividad hasta aproximadamente el 6% cuando se usan otros ésteres fosfóricos como GTP, UDP, GDP, ADP, CDP Y CTP (Serrano, 1990 y Linnemeyer et al, 1990). Además se necesita de la presencia de Mg²⁺ para que se lleve a cabo la actividad óptima, otros cationes divalentes como Co²⁺, Mn²⁺ y Zn²⁺ dan del 60 al 40 % de la actividad comparada con Mg²⁺; el Ca²⁺ y el Cu²⁺ llegando incluso a inhibir completamente la actividad (Sze, 1985; Serrano, 1990 y Linnemeyer et al, 1990).

La Km para ATP varía de 0.2 a 2.7 mM, dependiendo del tejido, forma de homogeneización, tipo de preparación utilizada y las condiciones en las cuales se haya ensayado su actividad. Los productos de la reacción de hidrólisis del ATP; el ADP y el fosfato inhiben a la enzima de manera competitiva y no competitiva respectivamente (Serrano, 1990).

Existen reportados varios inhibidores de la actividad catalítica (Tabla I), aunque ninguno de ellos es específico, ya que además de inhibir a la ATP_{asa} de la MP inhiben a otro tipo de fosfohidrolasas, el Na₃VO₄ es el más usado de ellos y tiene una Ki de 10 µM.

La actividad basal de la ATP_{asa} es estimulada por cationes en la siguiente secuencia K⁺ > Na⁺ > Cs⁺ > Li⁺ (Sze, 1985). Los aniones no tienen efecto.

La enzima pura requiere de fosfolípidos para una actividad óptima, aunque este requerimiento varía dependiendo del tejido y el método elegido para la solubilización. Así, preparaciones solubilizadas con lisolectina son menos estimuladas por lípidos que las que se prepararon con zwittergente 3-14 y sales biliares; es probable que el requerimiento de fosfolípidos haya sido satisfecho durante la solubilización, por lo cual la aplicación exógena de los mismos ya no se necesite (Serrano et al, 1988).

La enzima ha sido clasificada dentro del grupo de las ATP_{asas} tipo P; ya que se demostró que la enzima se fosforila covalentemente en un residuo de aspártico durante el ciclo catalítico. Se determinó su peso molecular (100 KDa), la sensibilidad a Na₃VO₄ y su dependencia a Mg²⁺ (Vara y Serrano, 1983).

3.3 Estructura de la ATP_{asa}-H⁺ de la MP de plantas.

Gracias a los avances logrados con la clonación y secuenciación de los genes de la ATP_{asa} de MP en *Arabidopsis thaliana*, (Harper et al, 1989 y Pardo y Serrano, 1989), *Nicotiana plumbaginifolia* (Boutry et al, 1989 y Pérez et al, 1992) y en *Lycopersicon esculentum* (Ewing et al, 1990) se ha determinado la estructura primaria y se han realizado predicciones sobre el arreglo de la enzima en la membrana. Asimismo, se han comparado estas estructuras de la ATP_{asa}-H⁺ de la MP de plantas con las de otros miembros del grupo de las ATP_{asas} tipo P.

El porcentaje de aminoácidos idénticos entre las ATP_{asas} de MP de plantas varía entre el 79 y el 96%, encontrándose la más alta similitud entre las ATP_{asas} de tabaco y tomate. Al compararlas con la ATP_{asa} de H⁺ de *Neurospora crassa*, el grado de similitud disminuye hasta el 35%. Si se excluyen los primeros 31 a 127 de la región NH₂-terminal (de acuerdo a la especie) y los últimos 43 a 104 residuos del COOH-terminal, es más fácil alinear a las ATP_{asas} de hongos y plantas (Ewing et al, 1990; Wach et al, 1992).

El peso molecular estimado a partir de los 953 aminoácidos que forman a la enzima es de 105 KDa (Ewing et al, 1990).

Usando diferentes métodos de predicción de la estructura secundaria de la enzima, la unión de compuestos químicos a residuos implicados en la catálisis, la unión de anticuerpos monoclonales y el análisis de mutaciones inducidas, se ha logrado construir un modelo de su topología en la membrana (Fig. 4).

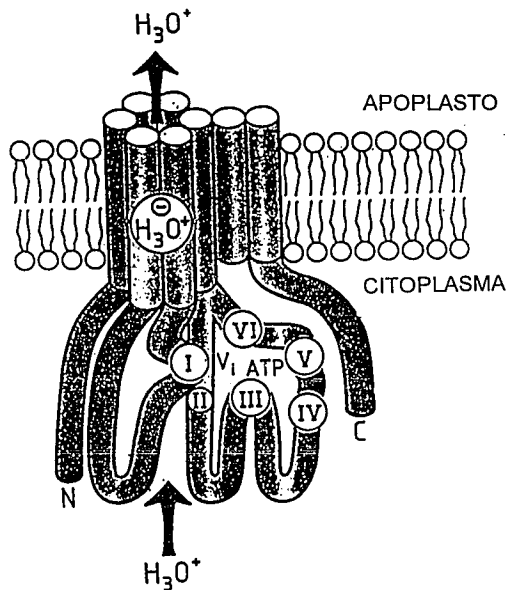


Fig. 4. Arreglo de la ATPasa de H⁺ en la membrana plasmática de plantas (tomado de Serrano et al, 1992).

Con el modelo anterior se pueden señalar las características estructurales de la enzima:

1. Las regiones amino y carboxilo terminales están expuestas hacia el citoplasma. Identificadas por anticuerpos específicos contra esas porciones.
2. Se proponen entre 8, 10 ó 12 cruces transmembranales. Las primeras 4 hélices transmembranales están conservadas en todas las ATPasas tipo P de diferentes especies y especificidades de catión o cationes a transportar, mientras que hacia el carboxilo terminal no se ha podido establecer cuantas hélices cruzan la membrana (Serrano y Portillo, 1990; Wach, 1992 y Serrano et al, 1992).

3. El 70% de la enzima está expuesta hacia la superficie citoplasmática y contiene los sitios funcionales para la hidrólisis del ATP y el transporte del H⁺. A continuación se describen las regiones recurrentes o bloques de secuencias de aminoácidos más conservados y de los cuales se conoce su función en todas las ATPasas tipo P:
 - a. La región I (TGES) participa en la hidrólisis de ATP y une al Na₃VO₄. Una mutación en el glutámico (233), bloquea el cambio conformacional de la enzima de E₁P a E₂P, y también el transporte del protón. (Serrano, 1989 y Green y Stokes, 1992).
 - b. La región II (CSDKTGT) es el sitio de formación del intermediario fosforilado, específicamente en el residuo de aspártico (D, 378). Una mutación en este residuo afecta el transporte del protón (Serrano, 1989 y Serrano y Portillo, 1990).
 - c. Las regiones II, IV, V y VI participan en la unión de ATP. Un cambio de un aspartato por asparagina en el motivo VI, provoca una baja actividad enzimática y una disminución en la especificidad por el nucleótido (Serrano, 1989 y Serrano y Portillo, 1990).
4. Se ha sugerido que el carboxilo terminal interactúa con los motivos IV y V para regular la actividad de la enzima. La eliminación con tripsina de una porción de esta región, aumenta su actividad de hidrólisis de ATP (Serrano, 1989 y Palmgren et al., 1991).
5. Sólo el 5% de la estructura de la enzima se encuentra en el exterior de la célula (Sussman y Harper, 1989).

3.4 Mecanismo catalítico.

Debido a la vasta información que hay con respecto a las ATPasas tipo P en animales, se ha podido avanzar rápidamente en el conocimiento de esta enzima en plantas. Las ATPasas tipo P se caracterizan por tener un polipéptido de 100 kDa y por tener un mecanismo de hidrólisis de ATP que involucra la formación de un intermediario fosforilado covalente en un residuo de ácido aspártico. El mecanismo por el cual se lleva a cabo la catálisis es cíclico e involucra dos estados conformacionales diferentes de la enzima: E₁ y E₂.

La conformación E₁ es fosforilada covalentemente por ATP y une con alta afinidad al H⁺ a transportar, mientras que la enzima en la conformación E₂ puede ser fosforilada, además es en esta conformación cuando se libera al protón al exterior de la célula.

Los cambios conformacionales de la enzima no muestran un significativo cambio en la estructura secundaria, medido por dicroísmo circular; sin embargo el cambio conformacional es suficiente para cambiar la accesibilidad a sitios proteolíticos, la fluorescencia intrínseca del triptofano, la reactividad de grupos sulfhidrilos, el pKa de los grupos ácidos, el marcaje con reactivos hidrofóbicos y la formación de cristales bidimensionales de la enzima (Serrano, 1989 y Stokes, 1991).

Se ha medido la estequiometría de protones transportados por ATP hidrolizado, con varios métodos y todos ellos coinciden con una estequiometría de 1 (Briskin y Reynolds-Niesman, 1991). Sin embargo no se sabe como es que los protones son transportados a través de la enzima. Se han sugerido dos alternativas para que esto ocurra y son vía un "cable" de protones o mediante un sitio alternante de acceso. En el primero estarían involucrados varios aminoácidos (serina, treonina, aspártico, asparagina, lisina,

glutámico, glutamina, tirosina e histidina) de las α -hélices que conformarían al canal. Mientras que en el sitio alternante de acceso se propone que sólo un aminoácido se protonaría y con el cambio conformacional de la enzima este residuo se internalizaría, para que el protón fuera liberado en el otro lado de la membrana (Briskin y Hanson, 1992).

También se desconoce el mecanismo involucrado en el acoplamiento de la hidrólisis de ATP y el bombeo de H^+ por la enzima, pero se han propuesto dos alternativas para que ocurra: el modelo directo o de conducción por ligando, o el indirecto o conformacional. En ambos modelos se toma en cuenta a) la fosforilación de la enzima, b) el cambio conformacional de la enzima, c) la liberación del fosfato en el citoplasma y d) la unión del protón en el citoplasma y su posterior liberación en el apoplasto. Sin embargo, los dos modelos difieren en la distancia que separa a los sitios de fosforilación y unión o transporte del protón, siendo cercana en el modelo directo y en sitios alejados en el modelo indirecto (Briskin y Hanson, 1992).

3.5 Función fisiológica.

La $ATP_{asa}-H^+$ de la MP se ha postulado como una enzima clave en el metabolismo celular ya que puede participar en (ver Fig. 5):

a) **Regulación del pH.** El transporte de protones hacia el exterior de la célula por la ATP_{asa} de la MP, ayuda al mantenimiento del pH citoplasmático, si bien no es la única que puede participar en este proceso, ya que también en la membrana plasmática se encuentra una NADH oxidasa que puede bombear protones al apoplasto, mientras que en el citosol el malato ayuda a regular el pH (Barr, 1991; Serrano, 1992b y Trofimova, 1992).

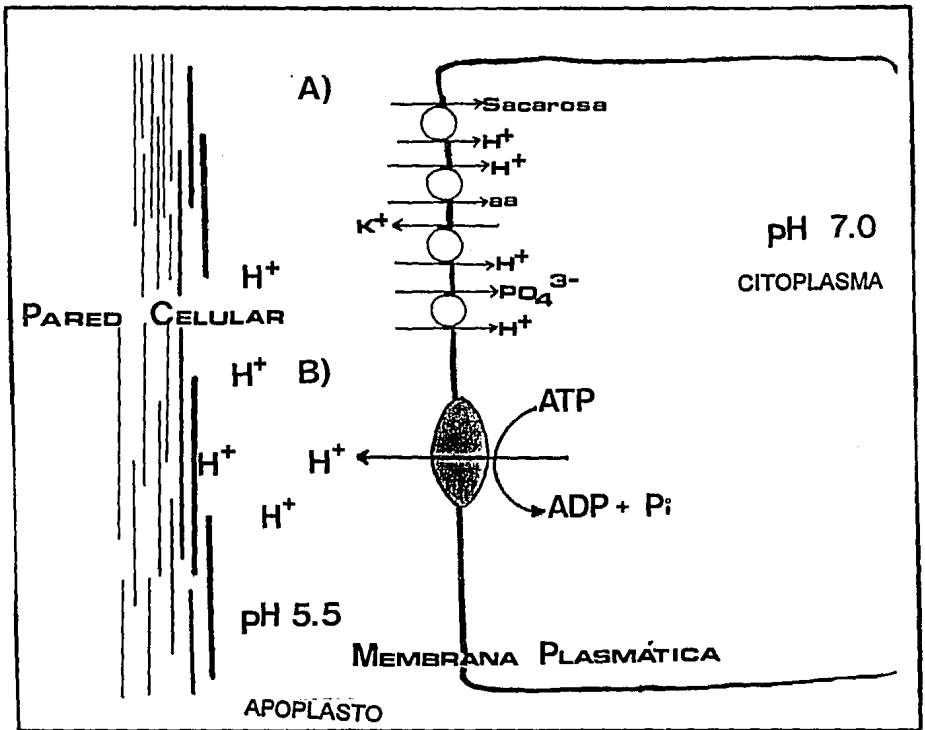


Fig. 5. Papel de la ATPasa-H⁺ de la membrana plasmática en en la fisiología de la célula. La enzima hidroliza ATP y bombea protones al exterior de la célula, de está manera crea un gradiente electroquímico en la membrana el cual puede ser utilizado para: A) el transporte secundario y B) para la acidificación de la pared celular.

b) **Nutrición celular y cambios de turgor.** La diferencia de potencial eléctrico y de pH que produce la ATP_{asa} al transportar protones del citosol al apoplasto, provee la energía necesaria para promover el transporte de moléculas como aminoácidos, azúcares y iones al interior de la célula, mediante los sistemas secundarios de transporte como son los uniportadores, simportadores, antiportadores y los canales (Serrano, 1989). Se han aportado evidencias de que esto ocurre en vesículas de membrana plasmática purificadas por el sistema de partición en dos fases, en donde se encontró que el transporte de sacarosa dependía en su mayor parte de la formación de un ΔpH y un $\Delta \Psi$ que es formado por la $ATP_{asa}-H^+$ de la MP, realizándose el transporte de la sacarosa simultáneamente con un protón (Lemoine y Deltrot, 1989; Buckout, 1989). Por otra parte, en la hoja completa de *Riccia fluitans* se midió un transporte por simporte de aminoácidos con protón, dependiente del gradiente electroquímico de protones, que posiblemente es establecido por la ATP_{asa} de la MP (Felle y Johannes, 1990).

La diferencia de potencial eléctrico es usada para el transporte de K^+ al interior de la célula a través de canales sensibles a voltaje, lo cual provoca un cambio de turgor que se refleja por ejemplo en la apertura estomatal (Linnemeyer, 1990). Se ha detectado con anticuerpos monoclonales la presencia de la ATP_{asa} de la MP en las células guardia, lo cual pone de manifiesto la relevancia de la enzima en la apertura de los estomas (Villalba et al, 1991).

La distribución preferencial de la enzima en las raíces y las cercanías del floema, que son zonas en las que se lleva un transporte alto de nutrientes, indica también la importancia de la enzima en la nutrición de la células (Parets-Soler et al, 1990; Lew, 1991).

c) **Elongación celular.** La teoría del "crecimiento ácido", postula que la acidificación de los componentes de la pared celular (por ejemplo las hidrolasas y las pectinas) provoca un aumento en la extensibilidad de la pared, lo cual ayudaría a la elongación de la célula. La actividad de bombeo de protones por la ATPasa de la MP ayuda en este fenómeno (Hager et al, 1991).

3.6 Regulación.

Por otra parte, la función de la enzima puede ser modulada por diferentes factores como son reguladores del crecimiento, fitotoxinas, luz, fosforilación, los lípidos y la presencia de isoformas.

LIPIDOS:

En un estudio comparativo del efecto de los detergentes en la actividad de ATPasa de H⁺ de MP obtenida de raíces de avena y tomate y en el hongo *Neurospora crassa*, se encontró una clara activación de las ATPasas de plantas de 150 a 350 %, dependiendo de la concentración de detergentes usados, sin embargo en el hongo la enzima se inactivó desde concentraciones muy bajas de los detergentes (lisolectina 0.03 mg/ml, desoxicolato 0.1 mg/ml y Tritón X-100 0.04 mg/ml). Lo anterior indica que aunque existen similitudes entre las ATPasas de plantas con las de hongos, existen marcadas diferencias en la dependencia de la interacción de la proteína con su inmediato entorno anfifílico (Surowy y Sussman; 1985).

En raíces de arroz crecidas en presencia de Ni y Cd se presentaron cambios en la composición de los lípidos de la MP (aumento en el sitosterol y disminución en campesterol y el A5

avenasterol) y además un aumento entre el 37 al 66% en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la MP. Con estos resultados los autores proponen que los lípidos de la membrana, regulan la actividad de la enzima (Ros et al, 1992).

Sandstrom y Cleland (1989) encontraron que hay esteroides fuertemente unidos a la ATPasa de MP, los que posiblemente podrían 1) preservar la configuración de la enzima y 2) ayudar a la interacción entre la enzima y los fosfolípidos o detergentes.

FITOREGULADORES:

Se ha reportado que la actividad de la enzima está controlada por prácticamente todos los reguladores del crecimiento de plantas como son: auxinas, brassilanolido (hormona del polen), citocininas y ácido abscísico (Serrano, 1989). Aunque el efecto más estudiado ha sido el de las auxinas.

Las auxinas son sustancias sintetizadas en tejidos jóvenes o en continuo crecimiento que estimulan el crecimiento celular. Se ha propuesto, de acuerdo con la teoría del "crecimiento ácido", que su efecto es el de inducir una salida de protones del citosol (Cleland, 1976).

Se estudiaron los eventos celulares que ocurren por la acción de la hormona en coleótilos de maíz, y se observó que la auxina causa a) un aumento en el flujo de vesículas de membrana, del retículo endoplásmico hacia la membrana plasmática, b) un incremento en la ATPasa-H⁺ en la MP, detectada con anticuerpos específicos y c) un aumento en la síntesis de la enzima, evaluado por la disminución del crecimiento de los coleótilos y la presencia de la enzima al adicionar cordicepina y cicloheximida (Hager et al, 1991).

Por lo anterior, la ATPasa de H⁺ sería regulada por la auxina al aumentar su síntesis y su transporte posterior (exocitosis) hacia la MP. Aunque el modo de acción de la auxina se desconoce (Hager et al, 1991), es posible que sea a través de un complejo de receptores, ya que se ha encontrado un receptor que une a la auxina y que se encuentra principalmente en la epidermis de las hojas y raíces (Serrano, 1989).

FITOTOXINAS:

La fusicosina es una fitotoxina producida por *Fusicoccum amygdali*, que activa la hidrólisis de ATP por la ATPasa, aunque parece no hacerlo de manera directa. Se necesita la presencia de un receptor para unirse y ejercer su efecto sobre la ATPasa (Coccuci y Marrè, 1991 y De Michelis et al, 1991).

Se ha reportado también el efecto de sustancias supresoras del crecimiento de plantas sobre la actividad de la ATPasa de la MP, observándose una inhibición que varía desde el 15 al 49% dependiendo de: la naturaleza química de la sustancia empleada, entre las que se encuentran glucopéptidos de bajo peso molecular y compuestos terpénicos con o sin glicosilar como la triclorina A y el diacetilpiperol; el tipo de preparación (extractos crudos del hongo productor del supresor o preparaciones semipuras o puras de uno de los compuestos de interés) y la especie utilizada para observar el efecto del supresor (Cruz, et al, 1990; Shirishi et al, 1991 y Calera, 1992).

FOSFORILACION:

Se sabe que la ATPasa de la MP de *N. crassa* es regulada por fosforilación, ya que tiene cuando menos 8 sitios susceptibles de ser fosforilados. La fosforilación disminuye la actividad enzimática de la enzima (Slayman, 1992).

En la región del COOH-terminal se encuentran serinas que pueden ser fosforiladas por una cinasa dependiente de Ca^{2+} . En la ATPasa de H^+ de la MP también se encuentran residuos de serina y treonina que pueden ser fosforilados, aunque no se ha demostrado que estos sitios se fosforilen. Los datos que se tienen son la fosforilación de la fracción microsomal total asociada con una disminución en la actividad de la enzima, aunque estos datos no son concluyentes de que la disminución en la actividad de la enzima se deba a su fosforilación (Zocchi, 1985 y Serrano, 1989).

ISOFORMAS:

Se han obtenido recientemente los cDNAs de los genes que codifican para las ATPasas de tomate, tabaco y *Arabidopsis*, encontrándose familias y subfamilias con 3 a 6, 4 y 3 genes respectivamente, que codifican para la enzima. La similitud entre las isoformas intra e interespecie es muy alta, sin embargo las isoformas de tabaco y tomate se han encontrado distribuidas en diferentes tejidos de la planta, tallos y flores. Además, en tabaco las isoformas fueron específicas de diferentes estadios de desarrollo del tejido. Este puede ser también un mecanismo de regulación de la enzima, ya que estas isoformas pueden presentar diferentes constantes cinéticas y diferencias en la modulación de su actividad (Palmgren y Christensen, en prensa).

LUZ:

Está bien documentado que la luz induce un alargamiento de las células en las dicotiledóneas por un incremento en la extensibilidad de su pared celular. El mismo efecto se ha observado cuando se incuban las hojas, iluminadas con luz blanca en una solución ácida. Asimismo se ha observado que en las hojas del frijol hay una salida de protones en los primeros 5 a 10

minutos después de la iluminación (Marrè et al, 1989b y Linnemeyer et al, 1990). Además, se ha observado que la apertura de los estomas es estimulada en presencia de luz, posiblemente debido a un incremento en la actividad de la ATPasa de la MP (Amodeo et al, 1992).

Las evidencias que apoyan que la ATPasa de la MP se encarga de acidificar el exterior celular cuando se ilumina al sistema, son las siguientes: a) la luz aumenta hasta 6 veces la actividad específica de la enzima, b) la acidificación externa activada por luz es inhibida por Na_3VO_4 , c) la despolarización de la membrana, el incremento de la toma de K^+ por la célula y la alcalinización del interior celular es inhibida por Na_3VO_4 y d) la fusicosina activa la salida de protones en la misma proporción que la luz (Marrè et al, 1989a y Linnemeyer et al, 1990). Es probable que al menos parte del efecto de la luz esté también relacionado con la acción de las auxinas.

HIPOTESIS

Habiendo hecho en la introducción anterior una revisión de los conceptos e información que enmarcan la realización de este trabajo, a continuación se enuncian las consideraciones fundamentales que llevaron a plantear la hipótesis de trabajo.

Ya que durante la germinación de una semilla es muy importante la movilización de las reservas de nutrimentos (aminoácidos, azúcares y iones) del endospermo hacia el embrión para sostener su crecimiento, los sistemas de transporte de solutos en las membranas de las células embrionarias deben ser muy activos.

La actividad de una enzima como la ATPasa de H^+ localizada en la membrana plasmática, que establece un gradiente electroquímico de H^+ a través de ésta para facilitar el paso de iones o moléculas que por simple difusión no podrían entrar a la célula, podría jugar un papel muy importante en el inicio de la germinación. Además, esta enzima al transportar protones del citoplasma provoca una acidificación del apoplasto y de los componentes de la pared celular, lo cual ayudaría al aflojamiento de ésta para el alargamiento de las células, fenómeno que es fundamental en el período de la germinación.

Con estos antecedentes se pone de manifiesto el papel que la enzima puede tener en el proceso de germinación de embriones, por lo cual se propuso estudiar la presencia de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en el proceso de germinación de embriones.

O B J E T I V O .

Caracterizar la cinética de aparición de la ATP_{asa} de la membrana plasmática en la germinación del maíz.

O B J E T I V O S P A R T I C U L A R E S :

1. Establecer los tiempos en los cuales se estudiaría la aparición de la ATP_{asa} de la membrana plasmática (MP), en la germinación del maíz, caracterizando tres parámetros fisiológicos diferentes: porcentaje de germinación, acumulación de peso húmedo y consumo de oxígeno.
2. Obtener una fracción de vesículas enriquecidas en membrana plasmática (VMP), de embriones a diferentes tiempos de imbibición, mediante la técnica de separación en dos fases (Larsson et al, 1987).
3. Detectar la actividad de hidrólisis de ATP de la ATP_{asa} de H⁺ de membrana plasmática evaluada por su inhibición específica al Na₃VO₄, en las preparaciones de VMP de los embriones embebidos por diferentes tiempos.
4. Detectar la presencia de la ATP_{asa} de H⁺ de MP por medio de un anticuerpo específico, en las fracciones enriquecidas en VMP de los embriones embebidos por diferentes tiempos.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Material biológico.

Se disectaron manualmente embriones de maíz del híbrido A662 (cosecha de 1989) que se almacenaron hasta su uso en frascos ámbar con silica gel, a 4° C. Las semillas utilizadas fueron proporcionadas por el Dr. Aquiles Carballo, del Centro de Genética en el Colegio de Posgraduados, municipio de Texcoco, México.

4.2. Siembra de embriones.

Los embriones se desinfectaron usando una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 2 minutos, enjuagándose después 2 veces con agua destilada esterilizada durante 2 minutos cada vez. Posteriormente, el proceso de imbibición consistió en colocar los embriones en una caja de Petri de 10 cm de diámetro que contenía papel filtro humedecido con 7 ml de agua bidestilada en condiciones de esterilidad. Todo el material utilizado fue previamente esterilizado en autoclave. Se sembraron de 30 a 100 embriones por caja, dependiendo del experimento; las cajas de Petri se colocaron en una incubadora a 29° C (en la oscuridad) por los tiempos que se indican más adelante.

4.3. Medición del porcentaje de germinación.

A. En semillas.

Se pusieron a germinar 90 semillas de maíz, distribuidas en 3 cajas de Petri, bajo las condiciones descritas en la sección anterior. El conteo de las semillas germinadas se realizó a diferentes tiempos,

desde 1 hora hasta las 72 horas de imbibición. Se consideró como semilla germinada a aquella que tenía por lo menos 2 mm de radícula emergida de la testa.

B. En embriones.

Los embriones se sembraron en la forma descrita anteriormente y se incubaron durante 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 35, 48, 60, 66 y 72 horas; para cada tiempo se sembraron 30 embriones. La visualización de la salida de la radícula a tiempos cortos fue difícil ya que sólo es claro que ésta se ha alargado cuando tiene aproximadamente 1 mm de grosor.

4.4. Acumulación de peso húmedo en embriones.

Después de la incubación y conteo de los embriones germinados (sección anterior), se tomaron al azar 27 embriones (embebidos por cada uno de los tiempos) y se pesaron para obtener el peso húmedo por embrión en imbibición. Además se pesaron 27 embriones sin embeber, tomados al azar, para documentar el tiempo cero.

4.5. Medición del consumo de oxígeno en embriones.

Se usó un oxímetro con un electrodo de Clark. Para la determinación se usaron 3 embriones embebidos en cada uno de los tiempos ya señalados; asimismo, se utilizaron 3 embriones secos, para cada experimento. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

El procedimiento utilizado fue el siguiente:

- a) El aparato se calibró a 100 % de O_2 con 5 ml de una solución de KH_2PO_4 50 mM a pH 7.0 (Puntarulo y Boveris, 1990).
- b) Se añadió ditionita a esta solución para calibrar el aparato a 0% de O_2 .
- c) Se lavó perfectamente el electrodo con agua destilada, etanol y nuevamente con agua destilada. Se secó cuidadosamente y se puso nuevamente en la solución amortiguada de fosfatos.
- d) Se repitieron los pasos a, b y c para verificar que la calibración era la adecuada.
- e) Una vez calibrado el aparato, se añadieron los embriones a los 5ml de la solución de fosfatos y se midió la velocidad de consumo de oxígeno. Para la ciudad de México, el 100 % de oxígeno en una solución corresponde a 980 η átomos de O_2 .
- f) Los valores de η átomos de O_2 obtenidos se expresaron como $\eta atO_2/embrión/min$.

Se compararon las gráficas obtenidas de peso húmedo y consumo de oxígeno de los embriones a los diferentes tiempos de imbibición, con las ya reportadas en la literatura, esto con el fin de escoger los tiempos en los cuales embeber los embriones para medir tanto la proteína como la actividad de la ATP_{asa} de H^+ de la membrana plasmática.

4.6. Procedimientos de homogeneización.

A. Homogeneización simple.

Al concluir el tiempo de imbibición de los embriones, 200 de éstos se congelaron con nitrógeno líquido y se homogeneizaron con mortero y pistilo preenfriados (15 minutos) hasta obtener un polvo fino. A este polvo se le añadió el medio I (sacarosa 250 mM, EDTA 2 mM, ATP 1 mM, Tris/HCl 70 mM pH 8.0, DTE o DTT 4 mM, β -mercaptoetanol 15 mM, TPCK 100 μ g/ml, TLCK 50 μ g/ml y quimostatina 7 μ g/ml) en una relación 1 g de embrión : 1 ml de medio I. El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa y el residuo se rehomogenizó con la misma relación de tejido : medio. Ambos filtrados se combinaron para usarse después en la obtención de diferentes fracciones de membranas. Toda esta marcha se hizo para cada tiempo de imbibición.

B. Homogenización doble.

El procedimiento fue similar al anterior hasta la obtención del polvo fino. Después se transfirió el polvo del mortero a un recipiente pequeño y se le añadió el medio I en una relación 1 g de embrión : 1 ml de medio. En seguida se realizó una segunda homogeneización con un triturador de tejidos por 4 minutos a 12 000 rpm. El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa y el residuo se rehomogeneizó con la misma relación de tejido:medio. Por último, se combinaron ambos filtrados para posteriormente obtener las diferentes fracciones membranales.

Más adelante se señalará en que casos se usó una u otra homogeneización.

*Éstos se añadieron justo antes de usarse la solución.

4.7. Obtención de las fracciones de Homogenado sin Núcleos, Microsomal + Mitocondrial y Microsomal.

El homogenado obtenido por cualquiera de los dos métodos ya descritos, se sometió a una centrifugación diferencial, realizándose tres centrifugaciones a diferentes velocidades (Fig. 6). Todo el procedimiento se hizo a 4°C.

El sobrenadante de la primera centrifugación fue denominado *fracción de homogenado sin núcleos (H-N)*. Después se sometió la fracción H-N a una centrifugación a 13,000 xg para eliminar el sedimento que contiene a las mitocondrias, mientras que el sobrenadante se centrifugo a 80,000 xg (50,000 rpm, rotor Beckman TLA 100.1) para obtener el sedimento que se denomino *fracción microsomal (M)*. La *fracción microsomal más mitocondrial (M+Mit)* se obtuvo centrifugando la fracción H-N a 80,000 g por 30 minutos.

Los sedimentos de las fracciones microsomal y microsomal + mitocondrial se resuspendieron en 100 a 300 µl de medio II (sacarosa 250 mM, Tris/HCl 5 mM pH 7.0, glicerol 10 % , DTT 1 mM, TPCK 100 µg/ml, TLCK 50 µg/ml y quimostatina 7 µg/ml) para almacenarse en alícuotas a -70° C. De cada una de estas fracciones más del homogenado total se tomó una alícuota de 50 a 200 µl y se precipitó con acetona fría al 70 % como más adelante se describirá.

*Éstos se añadieron justo antes de usarse la solución.

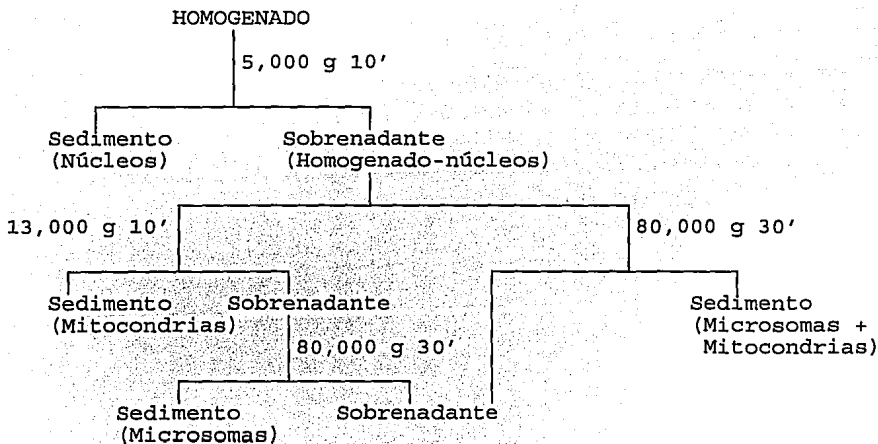


Fig. 6. Esquema de obtención de las diferentes fracciones membranales.

4.8. Obtención de Vesículas enriquecidas en Membrana Plasmática por el método de reparto en un sistema de polímeros en dos fases.

Se usó el procedimiento descrito por Larsson et al (1987), buscándose las mejores condiciones para obtener el mayor enriquecimiento en vesículas de membrana plasmática (VMP) de embriones de maíz.

La fracción membranal (homogenado-núcleos, mitocondrial + microsomal o microsomal) se ajustó a una concentración de KH_2PO_4

5 mM pH 7.8, KCl 0, 3 ó 5 mM y a un peso de 0.9 g (fracciones mitocondrial + microsomal y microsomal) ó 9 g (fracción homogenado-núcleos). Después se adicionó a una mezcla de fases (que se hizo poco tiempo antes de usarse), utilizando los siguientes componentes:

Concentración de Solución Madre	Cantidad	Concentración Final
Dextran T-500 20 % (p/p)	1.116 g	6.2 %
PEG 40 % (p/p)	0.558 g	6.2 %
Sacarosa (sólida)	0.305 g	330 mM
KH_2PO_4 0.2 M pH 7.8	67.5 μl	5 mM
KCl 2 M	4.1 μl	3 mM
Agua	2.7 g	

Cuando se usó la fracción de homogenado-núcleos, todas estas cantidades se multiplicaron por 10. Por otra parte, se variaron las concentraciones de KCl, Dextran y PEG, manteniendo siempre una relación de 1:1 entre estos 2 últimos.

La fracción de membranas más la mezcla de fases se agitó invirtiendo 25 veces el tubo para centrifugarse después a 1,500 rpm por 5 minutos a 4° C. De esta centrifugación se lograron separar 2 fases: a la fase superior (PEG) se le denominó U₁ (constituída preferencialmente por las vesículas de membrana plasmática) y a la fase inferior (Dextran), L₁ (constituída por otras vesículas celulares) (Fig. 7).

Con el objeto de obtener un mayor enriquecimiento en vesículas de membrana plasmática, se hizo un sistema de fases como se describió en el párrafo anterior, con la diferencia de que el aforo con agua fue de 3.6 g o 36 g. Se centrifugó a 1,500 rpm por 5 min. a 4° C y se desechó la fase superior de PEG. Mientras que a la fase de Dextran se le adicionó la fracción U₁

que se había obtenido en la primera separación de fases. Esta mezcla se agitó 25 veces por inversión del tubo y se centrifugó a 1,500 rpm (rotor Beckman 6H 3.7) por 5 minutos a 4° C, para obtener la fase U₂. Por último, esta fracción de vesículas de membrana plasmática se diluyó 1:1 en sacarosa 250 mM y Tris/HCl pH 7.5 y se centrifugó a 100,000 xg por 4 h a 4° C. Se resuspendió el sedimento obtenido en 100-200 µl de medio II, almacenándose en alícuotas a -70° C (Larsson et al, 1987); una alícuota de 50-100 µl se precipitó con acetona fría al 70 %, como más adelante se describirá.

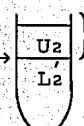
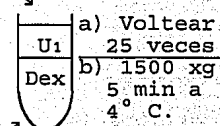
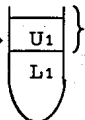
PRIMER REPARTO DE FASES

Mezcla
de fases

(2.7 g
ó 27 g)

+
Fracción
membranal
de embriones
(0.9 g ó 9 g)

a) Voltrear
25 veces
b) 1500 x g
5 min a
4° C.



a) Voltrear
25 veces
b) 1500 xg
5 min a
4° C.

Diluir 1:1
la fracción
U₂ con la
solución
amortiguada

100,000
x g 4 h
a 4° C

↓
VMP

SEGUNDO REPARTO DE FASES

Sistema
de fases

(3.6 g
ó 36 g)

a) Voltrear
25 veces
b) 1500 x g
5 min a
4° C.

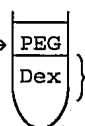


Fig. 7. Esquema de obtención de vesículas de membrana plasmática (VMP) por el sistema de reparto de fases en dos polímeros (adaptado de Hodges y Mills, 1986).

4.9. Precipitación de las diferentes fracciones membranales con acetona al 70 %

La precipitación de las fracciones membranales se realizó inmediatamente después de ser resuspendidas en medio II, para evitar en lo posible la actividad de proteasas presentes en la preparación. Para esto se tomaron de 50 a 100 μl de fracción membranal y se les ajustó el volumen a 300 μl con agua, después se añadieron 700 μl de acetona fría y se agitó en un vórtex. La proteína precipitada se mantuvo por 12-24 horas a -70°C en un ultracongelador, después se descongeló y se centrifugó por 5 minutos en una microfuga; el botón se llevó al volumen original con SDS al 5 % (99.9 % de pureza) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Estas fracciones membranales fueron utilizadas para su corrimiento en geles de poliacrilamida-SDS y para inmunoréplicas tipo Western.

4.10. Determinación de la concentración de proteína.

Se utilizó el método de Lowry et al (1951). El procedimiento fue el siguiente: a 0.9 ml de agua bidestilada se añadieron 3 μl de homogenado; 3 μl de homogenado-núcleos; 5 μl de microsomas; 7 μl de U_2 ; 3, 5 ó 7 μl de medio II (testigo 1); 3, 5 ó 7 μl de SDS al 5 % (testigo de las muestras precipitadas) o la solución estándar de albúmina de suero bovino (BSA). Se añadieron después 0.1 ml de DOC al 0.15 %, seguido por la adición de 1 ml del reactivo A, que consiste en partes iguales de agua bidestilada, NaOH 0.8 N, SDS al 10 % y CTC (Na_2CO_3 10 %, CuSO_4 0.1 % y $\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 0.2 %). Posteriormente, se añadieron 0.5 ml de reactivo B (1 volumen de Folin Ciocalteu + 5 volúmenes de agua bidestilada). Se esperaron 30 minutos y se leyó la densidad óptica en un espectrofotómetro (Schimadzu) a 750 nm. Para la curva estándar de proteína se usaron de 10 a 60 μg de BSA.

4.11. Fotografías al microscopio electrónico de las fracciones microsomal y U₂ de embriones embebidos 0 y 1 hora.

Las micrografías electrónicas fueron tomadas en el Instituto de Fisiología Celular por el M. C. Jorge Sepúlveda. A continuación se describe el procedimiento:

a) Para fijar las muestras se tomaron 50 μ l de la fracción microsomal o de la fracción U₂ de embriones secos o embebidos 1h y se le añadieron 200 μ l de glutaraldehído 3 %, se centrifugó esta mezcla por 5 minutos en una microfuga Beckman (E), manteniéndose en esta solución por 2h a 4°C

b) Se centrifugó nuevamente en la microfuga por 5 minutos y se desechó el glutaraldehído. Después se lavó el sedimento con una solución de fosfatos 100 mM a pH 7.2.

c) Para posfijar la muestra se eliminó la solución de fosfatos y se añadió una solución de osmio al 2% incubándose por 2h. Después se eliminó la solución de osmio centrifugando en microfuga por 5 minutos y se lavó nuevamente con el amortiguador de fosfatos según el punto b.

d) Se desechó la solución de fosfatos, procediéndose después a deshidratar la muestra tomando como solución inicial para el procedimiento de deshidratación el etanol al 30% llegándose al final a una solución de etanol absoluto.

e) A la muestra deshidratada se le añadió óxido de propileno y se incubó por 48 horas, después se realizó la infiltración con óxido de propileno y Epon 812 en relación 1:1 por 48 horas y al final se llevó a cabo la inclusión del material en Epon 812 por 48 horas a 60°C.

f) Se realizaron los cortes del material incluido con un ultramicrotomo Rayher.

g) Los cortes se contrastaron con acetato de uranilo al 2%, citrato de plomo según Reynolds (1963).

h) Se observaron las muestras en el microscopio electrónico JEOL 12EXII.

4.12. Medición de la actividad de hidrólisis de ATP.

La determinación se llevó a cabo en 150 μ l de medio de reacción que contenía sacarosa 250 mM, Tris/HCl 20 mM (pH 7.0), CCCP 7 μ M, ATP/Tris 10 mM (pH 7.0), $MgCl_2$ 10 mM y 100 μ M de lisofosfatidilcolina; este último solo en los casos en que se indica. Además, para inhibir específicamente alguna de las enzimas presentes en la fracción microsomal y la fracción U_2 , se usaron los inhibidores específicos para cada una de ellas a las concentraciones que se indican en la Tabla III.

Tabla III. Concentraciones de inhibidores específicos de enzimas con actividad de hidrólisis de ATP en las fracciones microsomal y U_2 (tomado de Sánchez et al 1992).

Inhibidor	Concentración	Enzima inhibida
KNO_3	100 mM	ATP _{asa} de tonoplasto
Na_3VO_4	150 μ M	ATP _{asa} de membrana plasmática
Na_2MoO_4	1 mM	Fosfatasa ácida
NaN_3	1 mM	ATP _{asa} mitocondrial

La reacción se inició con la adición de 3.3 μ g de proteína, dejándose proceder por 3 h a 30° C; la reacción se detuvo con la adición de 150 μ l de SDS 24 % (99.9 % de pureza). La hidrólisis de ATP se midió como la liberación de fosfatos y los resultados se expresaron en η molPi/mg/h. Se incluyeron testigos para la reacción de hidrólisis de ATP en presencia de los inhibidores, ya que éstos por sí solos disminuían la coloración producida por el fosfato liberado espontáneamente en ausencia de proteína.

4.13. Cuantificación del fosfato liberado.

El procedimiento utilizado fue el de González et al (1992), en el cual a 150 μ l de la muestra con fosfatos o agua con fosfatos, se le añadieron 150 μ l de SDS 24 % y 300 μ l de mezcla B:C (molibdato de amonio 2 % y ácido ascórbico 12 %, disueltos por separado en HCl 1 N y mezclados en relación 1:1). La mezcla se incubó de 3 a 10 minutos a temperatura ambiente y se agregaron después 450 μ l de reactivo E (citrato de sodio 2 %, metaarsenito de sodio 2 % y ácido acético 2 %). Después de 20 minutos a temperatura ambiente se midió la absorbencia de las muestras a 850 nm. La curva estándar empleada fue realizada con 10 a 60 η moles de fosfato.

4.14. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

Se siguió la técnica descrita por Laemmli (1970). Se prepararon geles con un grosor de 0.75 mm, el gel separador estuvo compuesto por acrilamida 10 %, bisacrilamida 0.27 %, SDS 0.1 % y Tris/HCl 3 M (pH 8.6). La polimerización fue catalizada por la adición de persulfato de amonio 0.02 % y N,N,N',N'-tetrametil etilendiamino (TEMED) 0.2 % . Mientras que el gel concentrador estuvo compuesto de acrilamida 4 %, bisacrilamida 0.1 % SDS 0.14 % y Tris/HCl 0.1 M pH 6.6, agregándose los agentes polimerizantes persulfato de amonio 0.04 % y TEMED 0.24 % . La solución de corrida fue glicina 0.192 M, Trizma base 0.025 M y SDS 0.1 %.

Para la preparación de las muestras a correr por electroforesis, se tomó el volumen necesario de las fracciones membranales precipitadas para tener de 25 a 30 μ g de proteína; este volumen fue mezclado con la solución de muestra (SDS 10 %, β -mercaptoetanol 5 %, urea 8 M, azul de bromofenol 0.01 % y Tris/HCl 0.5 M pH 6.6) en una relación 1:1. Se mezcló

perfectamente y se aplicó con microjeringa en los pozos del gel concentrador.

Como referencia, en un pozo se aplicaron 10 μ l de una mezcla de proteínas con peso molecular conocido (Tabla IV), con el fin de tener un patrón de comparación con el cual obtener los pesos moleculares aproximados de las bandas de proteína en las fracciones membranales.

Tabla IV. Estándares de peso molecular preteñidos (Prestained SDS Molecular Weight Marker Kit No. MW-SDS-BLUE, Sigma) usados para electroforesis en geles de SDS, 10 μ l contienen 3 μ g de cada proteína.

Enzima	Peso Molecular (Daltones)
DESHIDROGENASA LACTICA de músculo de conejo	36,500
FUMARASA de corazón de puerco	55,300
PIRUVATO CINASA de músculo de gallina	75,200
FRUCTOSA 6P-CINASA de músculo de conejo	85,300
β -GALACTOSIDASA de <i>Escherichia coli</i>	107,000

Todas las muestras se aplicaron a los geles por duplicado para tener de esta manera un gel o parte de él para transferir a papel de nitrocelulosa y el duplicado para teñir con azul de Coomasie.

El corrimiento electroforético de los geles de poliacrilamida-SDS se llevó a cabo a 140 mV por 1.5 horas. Al concluir éste, se removió el gel del soporte. La tinción del gel se hizo añadiéndole la solución de ácido acético 10 % y azul brillante de Coomasie R-250, hasta que las bandas tuvieran la coloración deseada. En los casos en que fue necesario destañar se usó la solución de metanol 40 %, ácido acético 10 % y por último se fijó el gel en ácido acético al 11 %. El gel teñido se guardó en bolsas de polietileno selladas que contenían agua y NaN_3 o se secaron entre dos hojas de papel celofán. La electrotransferencia de las proteínas del gel a papel de nitrocelulosa se detallará a continuación.

4.15. Electrotransferencia de proteínas de geles de poliacrilamida SDS a papel de nitrocelulosa.

Se usó la técnica de réplica en Western (Towbin et al, 1979). El gel a transferir se agitó suavemente por 15 minutos en la solución amortiguada de transferencia (Trizma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 % y SDS 0.1 %). Después se ensambló el emparedado en el cual quedan en contacto el gel y el papel de nitrocelulosa (poro de 45 μm), según se muestra en la figura 8.

La electrotransferencia se llevó a cabo a 240 mA por 2 h con sistema de enfriamiento, usando la solución de transferencia (Trizma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 % y SDS 0.1 %). Al terminar la transferencia se colocó el papel de nitrocelulosa en un recipiente transparente que contenía TBS (NaCl 0.5 M, Tris/HCl 20 mM pH 7.5), la cara del papel que estuvo en contacto con el gel se colocó hacia arriba. La detección de la ATPase de H^+ de

membrana plasmática en el papel de nitrocelulosa se describirá después.

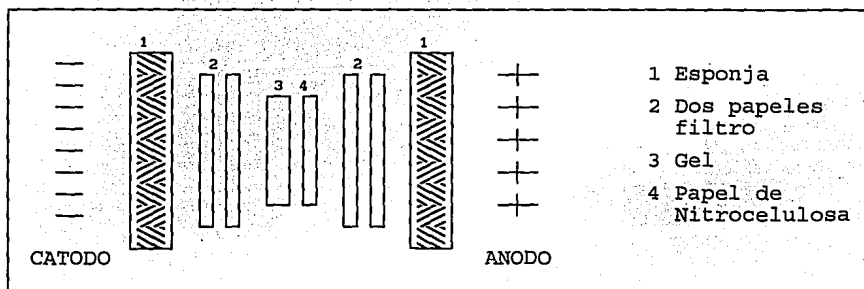


Fig. 8. Componentes de un emparedado de electrotransferencia (adaptado de Towbin et al, 1979).

4.16. Adsorción de proteínas a papel de nitrocelulosa.

Se utilizó la técnica de Western en ranura ("slot blot"). Se cortó un rectángulo de papel de nitrocelulosa de 12 cm x 3.5 cm y se sumergió en TBS agitándose por 15 minutos, después se colocó en el aparato Miniprotean II screen (Bio-Rad). Se ensambló el dispositivo y se conectó el vacío. En las ranuras de la placa superior del aparato se inyectaron de 25 a 30 μg de proteína membranal preparada de manera similar a las muestras corridas por electroforesis. Además se incluyó cuando menos un blanco que contenía la solución de muestra. Se adicionaron 500 μl de TBS para lavar la proteína que pudiera haber quedado en las paredes que forman la ranura. Se dejó secar por 2 h con vacío, después se cerró el vacío y se desarmó el aparato. El papel de nitrocelulosa se colocó en 10 ml de solución bloqueadora (Tabla V) y se siguió el procedimiento de detección de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática usando anticuerpos específicos según se detalla más adelante.

4.17. Inmunodetección de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática (Técnica de Western).

Se detectó a la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática tanto en muestras del gel electrotransferido a nitrocelulosa como en una mezcla de proteínas adsorbidas a papel de nitrocelulosa. En la primera se puede detectar y determinar el peso molecular aproximado y la existencia, si la hay, de más de una banda de proteína que reaccione con el anticuerpo; en la segunda se obtiene una distribución homogénea de la proteína en la ranura, lo cual no se logra en la inmunoréplica. En ambas el papel se trata según la técnica de Western (Tobwin et al 1979).

Se establecieron las condiciones óptimas de bloqueo de los sitios inespecíficos y para la detección de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática con anticuerpos específicos y que se resumen en la Tabla V. Se describirá más adelante la obtención del anticuerpo contra la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática de plantas.

Se usó como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, obtenido de suero de cabra y conjugado con fosfatasa alcalina. Antes del revelado de la inmunoréplica se cortó el carril que contenía a los estándares de peso molecular preteñidos para evitar la tinción inespecífica e intensa que ocurre entre la mezcla para desarrollar color y los estándares preteñidos, después de esto se añadió la solución reveladora (100 ml de una solución de MgCl₂ 1 mM, NaHCO₃/NaOH 0.1 M pH 9.8 adicionada con 30 mg de cloruro de p-nitro azul de tetrazolio, disueltos en 1 ml de dimetilformamida al 70 % y 15 mg de fosfato de 5-bromo-4-cloro, 3 indolil sal de toluidina disueltos en 1 ml de dimetilformamida) a la inmunoréplica.

Tabla V. Condiciones finales para la detección de la ATPasa de MP de plantas, en papel de nitrocelulosa.*

	Tiempo	Temperatura	Solución
Lavado del papel de nitrocelulosa	10 min	Ambiente	TBS
Bloqueo	2 h	37° C	6 % de leche Sveltes en TBS
Lavados	Dos de 5 min c/u	Ambiente	TTBS **
Primer anticuerpo	4 h	Ambiente	Dilución 1:1000 del anticuerpo en TBS
Lavados	Uno de 1 h	Ambiente	TTBS **
Segundo anticuerpo	4-6 h ó toda la noche	Ambiente ó 4° C	Dilución 1:1000 del anticuerpo en TBS
Lavados	Tres de 5 min c/u	Ambiente	TTBS y el 3 ₀ con TBS
Revelado de las proteínas con Ab. esp. en el papel	5-30 min	Ambiente	Reveladora

* Todo el procedimiento se llevó a cabo con agitación lateral, suave y constante, del papel de nitrocelulosa.

** La solución de TTBS contenía lo mismo que la solución de TBS más Tween-20 0.05 %.

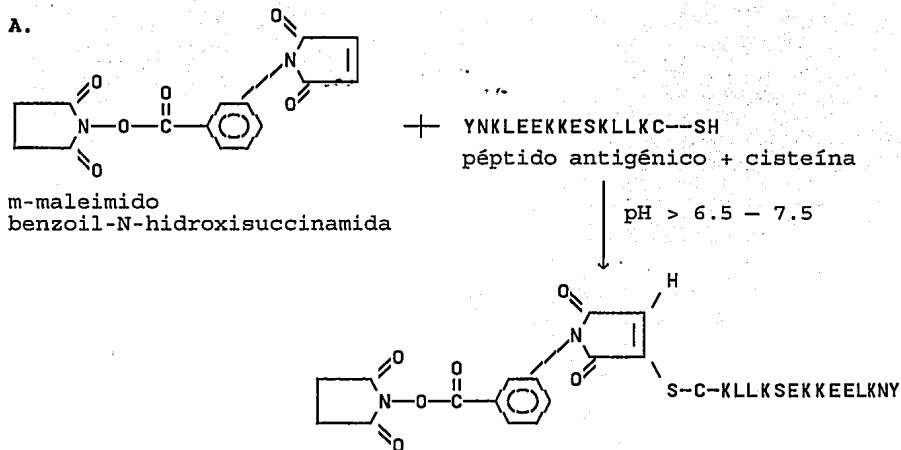
Se colocó en agitación suave hasta que las bandas se hicieron visibles, la reacción se detuvo al cambiar la solución de revelado por agua bidestilada, en la cual se lavó 2 veces la nitrocelulosa. La réplica se conservó en agua con NaN_3 en oscuridad y a 4° C en bolsas de polietileno.

4.18. Obtención del anticuerpo contra la porción amino terminal de la ATPasa de membrana plasmática.

A partir de las tres secuencias conocidas de aminoácidos de las ATPasas de membrana plasmática de plantas, se buscó una secuencia conservada y antigénica para hacer un anticuerpo que reaccionara específicamente contra la ATPasa. El péptido que se escogió consta de 14 aminoácidos (YNKLEEKESKLLK) y se encuentra en la región amino terminal de la ATPasa de membrana plasmática de las 3 especies de plantas cuya estructura primaria se conoce. La búsqueda y el diseño del péptido antigénico la realizó el Dr. Diego González Halphen del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las regiones hidrofílicas de la secuencia se seleccionaron de acuerdo a los valores de Hopp en el cálculo de índice de hidropatía (Hopp, 1985).

La síntesis del péptido y la haptización (Fig. 9) se mandó hacer a la compañía Multiple Peptide Systems, de San Diego, California, EU. El procedimiento incluyó: a) la síntesis del péptido, b) la adición de una cisteína en el extremo carboxilo terminal del péptido, c) unión al tiol de la cisteína con MBS (m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimido éster) y d) la conjugación con la hemocianina (Keyhole limpet hemocyanin, KLH).

A.



B.

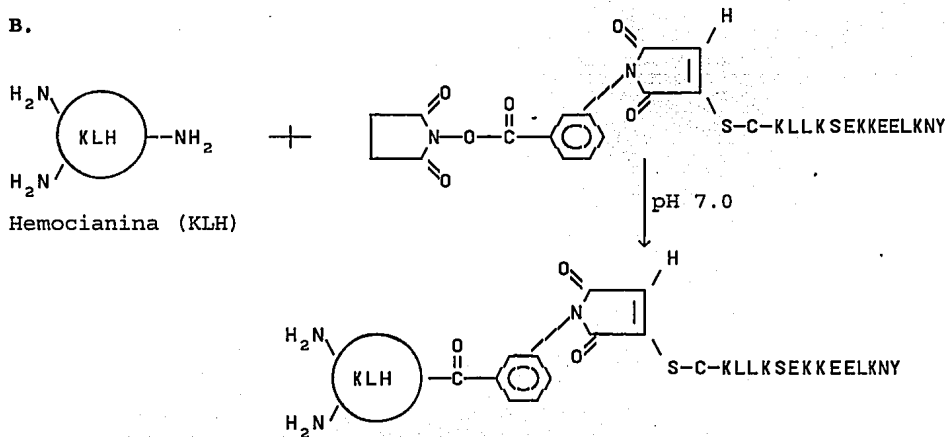


Fig. 9. Haptenización del péptido antigénico a hemocianina.
A. Reacción de la Cisteína del péptido con MBS.
B. Reacción entre la región hidroxisuccinamida con los grupos aminos de la hemocianina.

La obtención del suero inmune y la titulación de los anticuerpos fue realizada por la M. en C. Erika Rendón, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. El procedimiento que siguió fue el siguiente:

- a) *Inmunización del conejo.* Se inyectaron al conejo 100 μg de antígeno mezclados con 1 ml de adyuvante de Freund, después se aplicaron, a intervalos de 3 semanas, 3 inyecciones que contenían 50 μg de antígeno mezclado con 1 ml de adyuvante incompleto de Freund.
- b) *Sangría de prueba.* Se realizó una sangría al conejo al terminar la serie de inmunizaciones, investigándose el contenido de anticuerpos en el suero por la técnica de inmunoréplica, corriendo en geles de poliacrilamida-SDS a la fracción microsomal de coleoptilos de maíz de 3 días de imbibición. Al detectarse las bandas de proteína con la dilución del anticuerpo 1:2500 se procedió a sangrar a blanco al conejo.
- c) *Obtención del suero inmune.* Se sangró al conejo, se dejó coagular la sangre, se separó el coágulo de las paredes del tubo y por último se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min en el rotor SS-34 de la centrifuga Sorvall. Se precipitó el suero con sulfato de amonio al 40 %, centrifugándose después a 10,000 rpm por 10 min en el mismo rotor y centrifuga. El sedimento se resuspendió en 1 ml de TBS y se volvió a titular el anticuerpo según el inciso anterior.

4.19. Obtención de los perfiles densitométricos de las inmunorélicas y Western en hendidura.

Se hicieron las densitometrías de las proteínas en el papel de nitrocelulosa utilizando para ello un GelScan XL (2.1), del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, y con la ayuda de la Bióloga Emma Bertha Gutiérrez-Cirlos.

El papel de nitrocelulosa se colocó en el aparato de lectura, y se le indicó la siguiente información: 1) las distancias en las cuales se encontraban los carriles a leer, 2) el inicio y final de la migración de las proteínas (para el caso de la inmunoréplica), 3) el número del carril correspondiente al blanco (para eliminar la absorción debida a la tinción inespecífica del papel) y 4) el número del carril que correspondía a los estándares de peso molecular, el nombre de cada uno de ellos y los pesos moleculares correspondientes.

El densitómetro registra las bandas de proteína como un pico de absorbencia. Con los picos detectados en el papel de nitrocelulosa se obtuvo la siguiente información: a) el número de bandas de proteína en cada carril, b) su localización en el papel de nitrocelulosa (peso molecular), c) su intensidad, d) su grosor, e) el área de cada banda, que resulta de multiplicar los valores obtenidos en los incisos c y d (concentración) y f) la determinación del área relativa de cada banda de proteína, con respecto a las otras bandas, para lo cual se usó la siguiente fórmula:

$$\text{área relativa del pico 1 (\%)} = \frac{\text{área del pico 1}}{\text{suma de las áreas de todos los picos a comparar}} \times 100$$

RESULTADOS.

1. Parámetros fisiológicos de la germinación del embrión.

Con el propósito de establecer los tiempos en los cuales se caracterizaría la aparición de la ATP_{asa} de H^+ de la membrana plasmática en la germinación de embriones de maíz, se midieron los siguientes parámetros fisiológicos: porcentaje de germinación, toma de agua y consumo de oxígeno de embriones embebidos desde 0 hasta 72 horas.

1.1. Porcentaje de Germinación.

Se midió simultáneamente el porcentaje de germinación de embriones y semillas de maíz a diferentes tiempos de imbibición bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad. Se encontró que tanto para semillas como para embriones el máximo porcentaje de germinación fue del 90 % (Fig. 10). Esta similitud de valores indica que no se alteró la viabilidad del embrión al haber sido removido de la semilla. Sin embargo, el máximo de germinación para los embriones se presentó a las 35 horas, mientras que en la semilla ocurrió a las 60 horas de imbibición; es decir, la velocidad de germinación de los embriones es más rápida que la de las semillas. Esto puede deberse a que el agua penetra en la semilla más lentamente que en el embrión, ya que la testa y el endospermo actúan como barreras físicas para la entrada del agua; por lo tanto, los cambios metabólicos y fisiológicos iniciales necesarios para la germinación se llevan a cabo más lentamente en las semillas que en los embriones. Lo anterior implica que en los embriones se verá más rápidamente la reactivación del metabolismo celular; cabe señalar que se tomó como el final del período de germinación en los embriones, las 35 horas de imbibición.

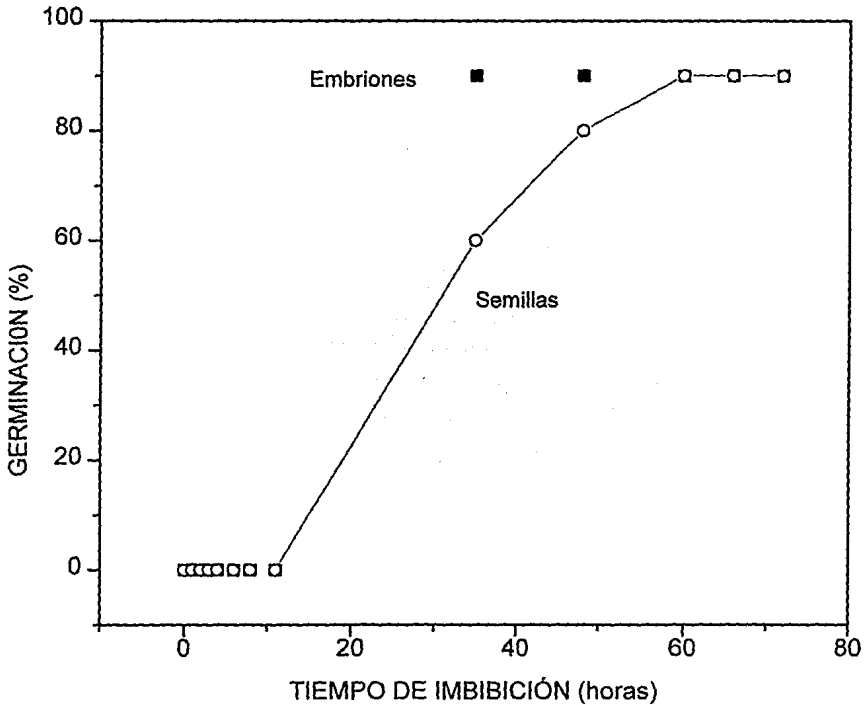


Fig. 10. Viabilidad de semillas y embriones. 30 semillas y 30 embriones fueron embebidos en cajas Petri según lo descrito en Materiales y Métodos. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes.

1.2. *Cinética de la toma de agua.*

El patrón cinético de la toma de agua de los embriones de maíz (Fig. 11) fue similar al reportado para semillas completas (Fig. 2). Hubo una rápida acumulación de peso húmedo en las primeras 2 horas de imbibición de los embriones (fase I), después disminuyó la velocidad de toma de agua (fase II), lo cual precedió a una segunda toma rápida de agua (fase III). La fase II del período de imbibición es la más interesante del proceso, ya que durante ella se prepara al embrión para su crecimiento. Esta fase se inició a partir de las 2 h y terminó cuando germinó el embrión, lo cual ocurre alrededor de las 35 h de imbibición (Fig. 10). La germinación del embrión no puede detectarse de manera muy precisa, ya que la radícula está siempre expuesta y es difícil apreciar cuando se inicia su elongación.

1.3. *Cinética de consumo de oxígeno.*

Se midió la actividad de consumo de oxígeno a los diferentes tiempos de imbibición del embrión. En los embriones no previamente embebidos no se detectó consumo de oxígeno (Fig. 12). Sin embargo, los embriones presentaron un gran aumento de dicha actividad, (hasta 6.9 μ átomos de O_2 /embrión/min) en la primera hora de imbibición; después de este tiempo y hasta las 10 h se siguió incrementando la actividad de consumo de oxígeno, aunque en menor grado. En el tiempo en que ocurrió la emergencia de la radícula (35 h), se logró detectar un incremento pronunciado en la actividad de consumo de oxígeno. El consumo de oxígeno ha sido usado como una medida de la actividad metabólica de embriones y semillas durante la germinación (Ching, 1978), razón por la cual se usó en este estudio, encontrándose que la mayor actividad metabólica ocurre dentro de las primeras 10 horas de imbibición del embrión.

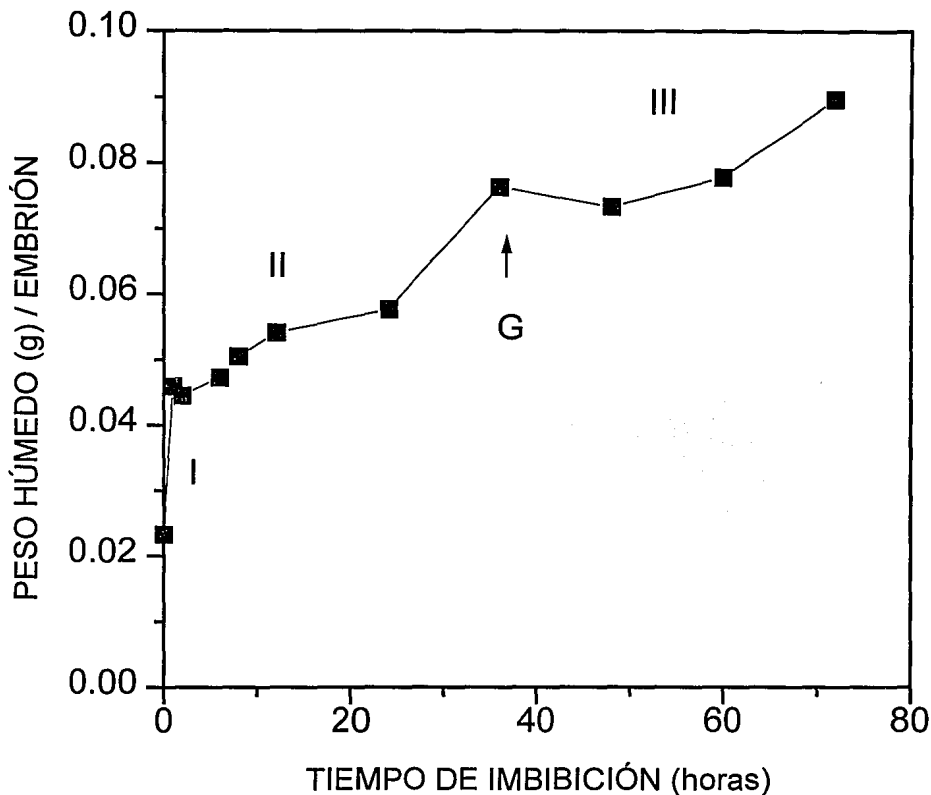


Fig. 11. Cinética de incremento del peso húmedo de embriones de maíz A₆₆₂. 27 embriones se pusieron a embeber en cajas de Petri según se indicó en Materiales y Métodos. Se indican las tres fases de toma de agua y el punto donde la germinación a concluído (G). Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes.

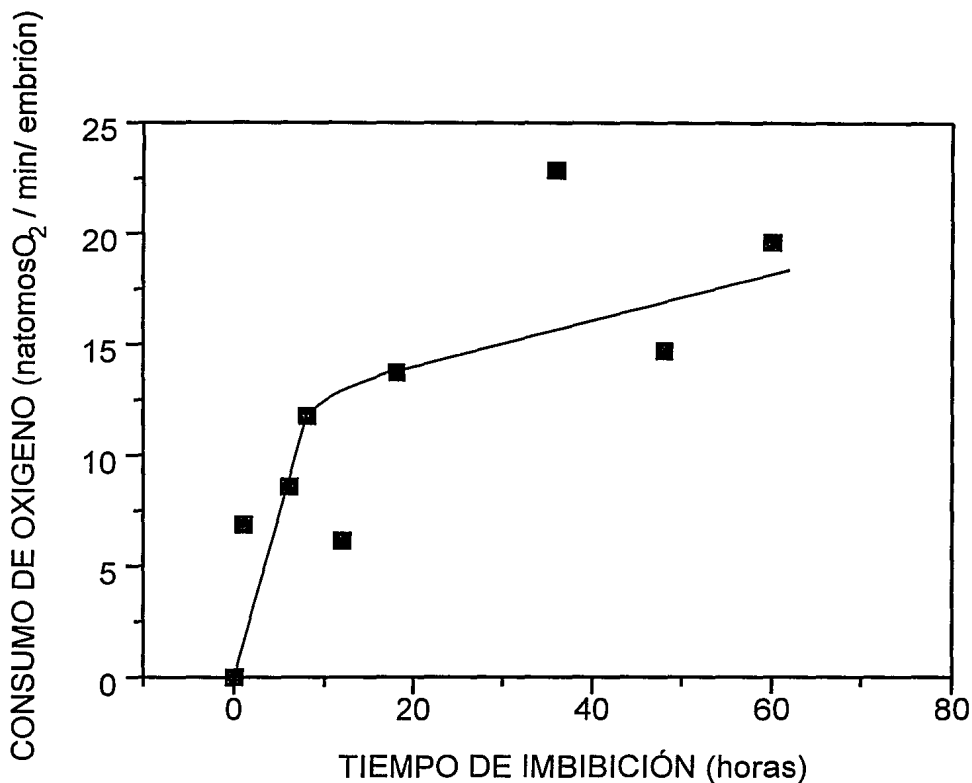


Fig. 12. Cinética de consumo de oxígeno de embriones en germinación. 30 embriones se pusieron a embeber en cajas Petri los tiempos indicados. Al cabo de ellos 3 embriones se colocaron en la cubeta del oxímetro en donde se midió su consumo de O₂ según lo descrito en Materiales y Métodos.

Con base en los resultados presentados en las figuras 10, 11 y 12 se determinaron los tiempos en los cuales se estudiaría a la ATPasa de H⁺ membrana plasmática en la germinación. Los tiempos que se escogieron fueron 0, 1, 2, 4, 5.5 y 7 h. En éstos se podría observar si la ATPasa de H⁺ la MP existía en semillas no embebidas, la magnitud de su presencia y su desarrollo durante la imbibición del embrión.

2. Identificación de los componentes que hidrolizan ATP en la fracción microsomal de embriones de maíz.

En un trabajo previo (García, 1993) se caracterizó la aparición de la ATPasa de H⁺ membrana plasmática en la germinación, utilizando para ello las fracciones microsomales de embriones de maíz. En dicha fracción se midió la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de inhibidores específicos para cada enzima, con el fin de evaluar la contribución de las diferentes enzimas a la actividad total. Según pudo confirmarse en este trabajo, en la fracción microsomal se encuentran además de la ATPasa de la MP, otras enzimas que hidrolizan ATP (Tabla VI). Se encontró que sólo el 33.4 % de la actividad total correspondía a la ATPasa de la membrana plasmática, mientras que la ATPasa de tonoplasto, así como la ATPasa mitocondrial, estaban presentes con una contribución similar o mayor que ésta (33 y 44 % respectivamente). También se encontró una escasa actividad sensible a Na₂MoO₄ (correspondiente a fosfatasa ácida) que corresponde al 5.6 % de la actividad total de hidrólisis de ATP.

El total de los porcentajes de inhibición fue superior al 100 %. Esto podría deberse a que con las concentraciones de inhibidores utilizadas haya ocurrido una inhibición cruzada, ocasionando que la actividad de las enzimas haya sido subestimada

o sobreestimada.

Tabla VI. Componentes enzimáticos de la fracción microsomal de embriones * que hidrolizan ATP.

ACTIVIDAD **	HIDROLISIS DE ATP	
	$\mu\text{mol Pi mg}^{-1} \text{h}^{-1}$	Inhibición (%)
TOTAL	2514.6 \pm 110.5	0
Sensible a Na_3VO_4 (ATPasa de MP)	839.4 \pm 125.0	33.4
Sensible a KNO_3 (ATPasa de Tonoplasto)	833.4 \pm 75.2	33.1
Sensible a NaN_3 (ATPasa Mitocondrial)	1114.0 \pm 103.1	44.3
Sensible a Na_2MoO_4 (Fosfatasa ácida)	140.8 \pm 48.4	5.6

* Los embriones fueron embebidos 1 h en H_2O a 29° C.

** La actividad sensible al inhibidor se obtuvo como la diferencia entre la actividad total de hidrólisis de ATP y la actividad residual o insensible al inhibidor.

Ya que los resultados obtenidos con las fracciones microsomales de embriones no eran inequívocos, se procedió en este trabajo a caracterizar la aparición de la ATPasa de MP en la germinación de los embriones en preparaciones enriquecidas en vesículas de membrana plasmática (VMP). Los dos métodos más ampliamente reportados en la literatura para este fin son los gradientes de sacarosa o bien un sistema de partición en dos fases

usando Dextran T-500 (DEX) y Polietilenglicol 3350 (PEG). Sabemos los antecedentes en el laboratorio y en la literatura, que los gradientes de sacarosa son menos efectivos en la separación de VMP de las otras membranas celulares, comparados con del sistema de partición en dos fases, con el cual es posible obtener hasta un 90 % de pureza en VMP y con la ventaja adicional de que la orientación de las vesículas es uniforme, (Hodges et al, 1986; Larsson et al, 1987; De Michelis et al, 1991 y Calera, 1992).

3. Determinación de la composición óptima de la mezcla de fases para obtener el mayor enriquecimiento en VMP por el método de reparto en dos fases.

En este método siempre hay que determinar cuidadosamente las concentraciones de polímeros y sales que se usen dependiendo del tejido del cual se parte, ya que la técnica se basa en la separación de las membranas dependiendo de su carga de superficie y ésta varía dependiendo del tejido y de la especie en estudio (Hodges et al, 1986; Larsson et al, 1987).

Los resultados de la variación en la concentración de los polímeros en la mezcla de fases se muestran en la Fig. 13. El incremento en las concentraciones de PEG y DEX desde 6.2 hasta 6.8 % produjo un aumento en la purificación de VMP, evaluada por la inhibición de la hidrólisis de ATP por Na_3VO_4 . Sin embargo, a PEG 7.0 % y DEX 7.0 % hubo una disminución notable en la purificación (7.5 %). El mayor enriquecimiento en VMP se encontró en PEG 6.8 %, DEX 6.8 %.

La separación de VMP de las otras vesículas fue afectada no sólo por las concentraciones de los polímeros en la mezcla de fases sino también por la concentración de KCl (Fig. 13) (Hodges, et al, 1986; Larsson et al, 1987).

En ausencia de KCl, la purificación fue apenas del 25 %, pero usando las concentraciones de PEG y DEX de 6.7 % y a 3 mM de KCl, aumentó al 47 %, mientras que a 5mM de KCl se obtuvieron VMP con una mejor pureza, cerca del 80 % (Fig. 13). Este valor resulta ser mayor al que se obtuvo con una concentración de polímeros de 6.8 % en la mezcla de fases y 5 mM de KCl. Por lo tanto, en los siguientes experimentos, se usaron KCl 5 mM, PEG 6.7 % y DEX 6.7 % en la mezcla de fases.

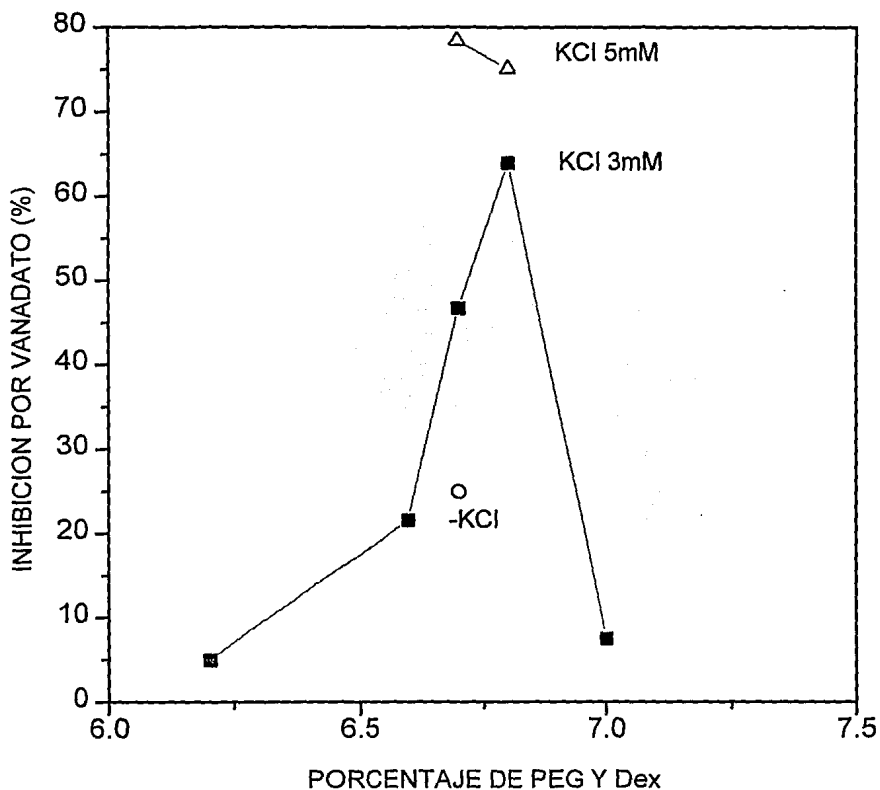


Fig. 13. Efecto de la variación de las concentraciones de PEG, Dextran y KCl sobre el enriquecimiento de vesículas de membrana plasmática obtenidas por el método de reparto de fases. La fracción de mitocondrias más microsomas (M+Mit) de embriones embebidos 1h en agua a 29° C se aplicó al sistema de partición de fases con las modificaciones ilustradas en la Figura y se obtuvo la fracción U_1 , a la cual se le midió la hidrólisis de ATP sensible a vanadato.

4. Elección de la fracción membranal para obtener VMP por reparto en dos fases.

Con el propósito de recuperar mayor cantidad de proteína membranal en la fracción U₁ (obtenida de la partición en dos fases), para su uso en los experimentos de actividad e inmunodetección de la ATP_{asa} de MP, se realizaron las siguientes modificaciones: a) una homogenización doble del tejido (Ver Materiales y Métodos), para obtener una mezcla mas homogénea en el tamaño de vesículas y b) someter la fracción de H-N (homogenado menos núcleos) en lugar de la M+Mit (microsomal más mitocondrial) a la partición de fases, para evitar la pérdida de VMP de gran tamaño (y por tanto de proteína membranal) y realizar menos centrifugaciones (Tabla VII).

Tabla VII. Recuperación de proteína membranal en la fase U₁ a partir de fracciones crudas de membranas.

Fracción Membranal	PROTEINA TOTAL (mg)	
	A partir de 150 embriones *	Fracción U ₁
• M + Mit (s)	15.6 ± 3.5	0.12 ± 0.07
• M + Mit (d)	24.0 ± 6.7	0.22 ± 0.12
• H-N (d)	162.6 ± 50	0.75 ± 0.12

* Los embriones fueron embebidos 1 hora en agua y fueron homogenizados según se describió en Materiales y Métodos.

(s) Homogenización simple

(d) Homogenización doble

• H-N es homogenado sin núcleos; M + Mit es la fracción de microsomas más mitocondrias que se obtuvo como se describió en Materiales y Métodos.

Los valores representan la media de 5 diferentes fracciones membranales.

Cuando se realizó la doble homogenización de los embriones, hubo un incremento de 15.6 a 24.03 mg en la proteína recuperada en la fracción M+Mit, es decir, se recuperó 1.5 veces más proteína y como consecuencia se obtuvo mayor cantidad de proteína en la fracción U₁ de VMP. Por otra parte, al someter a la fracción H-N (d) al reparto en dos fases, se lograron recuperar 0.75 mg de proteína en la fracción U₁, que son 6.25 veces más que la obtenida de una fracción M+Mit (s) y 3.4 veces más que la resultante de una fracción M+Mit (d). De manera que para los siguientes experimentos se usó la fracción de homogenados sin núcleos (H-N) obtenida de la doble homogenización de los embriones.

5. Efecto de la cantidad de proteína en la purificación de VMP obtenidas por un segundo reparto de fases.

Los resultados en la purificación de VMP por la técnica de reparto en dos fases fueron poco reproducibles a pesar de estar usando las condiciones más favorables para su obtención. Con el objeto de eliminar esta variación se introdujeron las siguientes modificaciones:

- a) Una segunda separación de fases de la fracción inicial (U₁), para obtener una preparación de mayor pureza y homogeneidad (fracción U₂).
- b) La adición de un detergente en el medio de reacción de hidrólisis de ATP para excluir la posible heterogeneidad de la orientación de las membranas, es decir, que una población de vesículas tuviera el sitio activo de la ATP_{asa} hacia adentro (orientación correcta o "al derecho") y otra población hacia afuera de las vesículas (orientación "al revés"). Ya que sin detergente sólo es posible medir la ATP_{asa} en vesículas con esta última orientación (Hodges, et al, 1986; Larsson et al, 1987), se usó lisofosfatidilcolina 100 µM para solubilizar a la membrana y exponer así a los sitios activos sin afectar la inhibición por vanadato

de la ATP_{asa} de MP (Grouzis et al, 1987).

- c) Determinar la posibilidad de un requerimiento óptimo de proteína membranal añadida a la mezcla de fases para obtener una fracción enriquecida en VMP.

En la Fig. 14 se muestran los resultados de examinar las 3 alternativas descritas. Se encontró un óptimo en la cantidad de proteína de la fracción H-N que se sometió a la purificación por reparto en dos fases y que estuvo entre 105 y 110 mg. Con dicha cantidad se obtuvo una preparación de VMP con alta pureza (90 a 95%); fuera de este intervalo de proteína la purificación disminuyó y llegó en algunos casos a valores que son muy similares al contenido de vesículas de membrana plasmática de una fracción microsomal (Tabla VI y Fig. 14). Por otra parte, cuando se realizaba un solo reparto de fases, la purificación en esta fracción no era mayor del 80 % (Fig. 13), mientras que empleando la fracción U₂, la pureza de las VMP fue del 80 al 90 % usando la concentración óptima de proteína membranal (Fig. 14). En cuanto al efecto del detergente en la actividad que es inhibida por vanadato, se obtuvo un patrón irregular, si bien había una estimulación en la región de mayor enriquecimiento de las vesículas de membrana plasmática, de manera que se siguió usando en experimentos posteriores.

Con la información precedente, quedaron establecidas las condiciones óptimas para la purificación de VMP de embriones de maíz y que se resumen a continuación: a) doble homogenización de los embriones; b) uso de la fracción de homogenados sin núcleos; c) adición de 110 mg de proteína membranal a la mezcla de fases d) mezcla de fases con PEG 6.7 %, DEX 6.7 % y KCl 5 mM; e) la realización de dos particiones de fases sucesivas para obtener la fracción U₂ y f) medición de la actividad de ATP_{asa} de MP en presencia y ausencia de lisofosfatidilcolina.

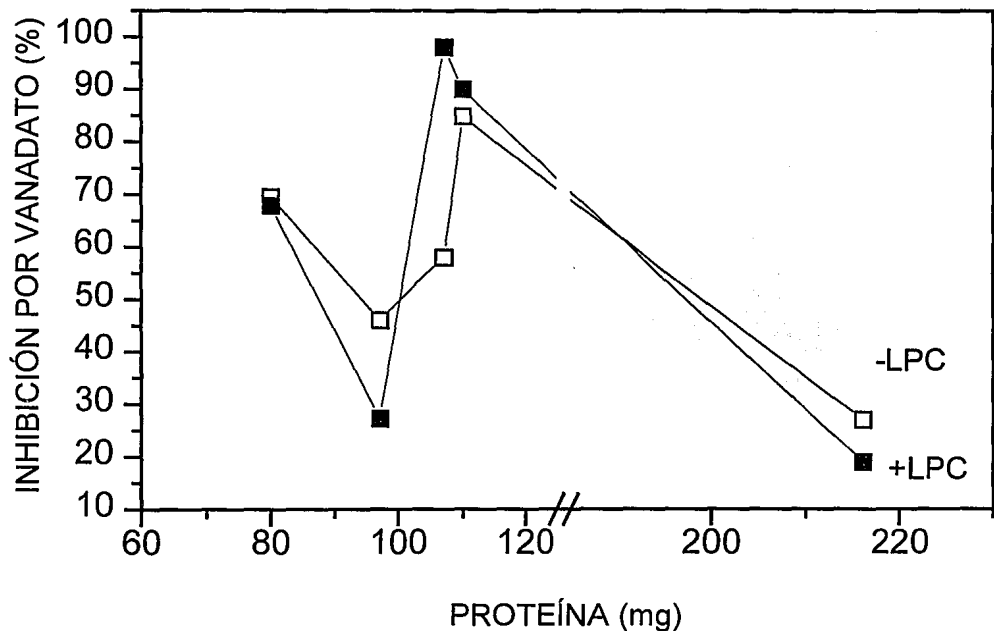


Fig. 14 .Efecto de la cantidad de proteína aplicada al sistema de reparto de fases en el enriquecimiento de vesículas de membrana plasmática . La fracción de homogenado sin núcleos de embriones embebidos 1h, fue aplicada al sistema de reparto y se llevaron a cabo dos repartos consecutivos. La medición de la inhibición de hidrólisis de ATP por vanadato se hizo en la fracción U₂ en presencia (—■—) o ausencia (—□—) de lisofosfatidilcolina (LPC).

6. Rendimiento en VMP obtenidas de un segundo reparto de fases.

Se evaluó la cantidad de proteína total recuperada en la fracción purificada de VMP obtenida de un segundo reparto en dos fases. En la Tabla VIII se muestran los datos de un experimento típico realizado para obtener la suficiente proteína membranal en la fracción U₂ para poder medir la actividad enzimática y detectar con anticuerpos específicos a la ATP_{asa} de MP.

Tabla VIII. Recuperación de proteína membranal en la fase U₂.

Fuente de Proteína	Cantidad (mg)	Recuperación
Embriones [•]	5200 ± 1400 [*]	
Fracción H-N	270 ± 14 [*]	
Fracción H-N para partición	220 ± 0.0	
Fracción U ₂	0.314 ± 0.1 [*]	0.14 % ± 0.04 ^{**}

* Valores obtenidos de 5 diferentes extractos membranales.

** Rendimiento de la fracción U₂ obtenido al considerar 220 mg de proteína de la fracción H-N como 100 %.

• Peso húmedo de 200 embriones embebidos 1 hora.

A partir de 200 embriones embebidos una hora fue posible obtener la proteína necesaria de homogenado sin núcleos para cargar dos mezclas de fases con 110 mg de proteína cada uno (220 mg totales), las dos fracciones U_2 que se obtuvieron al seguir el procedimiento de reparto en dos fases ya descrito fueron mezcladas. La proteína total recuperada en esta fracción fue de 0.31 mg, que corresponde al 0.14 % de la proteína total (H-N), con la que se inició la purificación de VMP.

7. Comparación de los componentes que hidrolizan ATP en las fracciones microsomal y U_2 .

Para evaluar la pureza de las VMP obtenidas en U_2 por la técnica de partición en dos fases se utilizó como criterio de pureza la inhibición de la hidrólisis de ATP por vanadato, el cual es un inhibidor específico de la ATP_{asa} de H^+ de MP (Tabla IX). Aún cuando se encontró un porcentaje alto de la inhibición de la hidrólisis de ATP por vanadato, todavía existe actividad insensible a este inhibidor. Para conocer cual o cuales enzimas eran responsables de la liberación de este fosfato en el medio de reacción y además examinar las diferencias entre la hidrólisis de ATP en la fracción microsomal y en la fracción U_2 se incluyeron en el medio de reacción los inhibidores específicos de varias enzimas que hidrolizan ATP (ver Tabla III en Materiales y Métodos); los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IX.

Tabla IX. Componentes de la actividad de hidrólisis de ATP de las fracciones microsomal y U₂ de embriones embebidos 1 hora.

ACTIVIDAD	HIDROLISIS DE ATP			
	$\mu\text{mol Pi mg}^{-1} \text{h}^{-1}$		(Inhibición en %)	
	Microsomal		U ₂	
TOTAL	2620	(0)	1220	(0)
* Sensible a Na_3VO_4 (ATPasa de MP)	747 ± 158.0	(28.2)	785 ± 60.5	(79.4)
Sensible a KNO_3 (ATPasa de Tonoplasto)	580 ± 62.3	(22.1)	0 ± 13.2	(0)
Sensible a NaN_3 (ATPasa Mitocondrial)	1440 ± 173.0	(54.9)	219.6 ± 52.4	(18)

* La actividad sensible al inhibidor se obtuvo como la diferencia entre la actividad total de hidrólisis de ATP y la actividad residual o insensible al inhibidor.

La actividad total de hidrólisis de ATP de la fracción microsomal fue 2.1 veces mayor a la encontrada en la fracción U₂. Sin embargo, sólo el 28.2 % correspondió a la ATPasa de MP en la fracción microsomal, mientras que el 79.4 % de la actividad total de la fracción U₂ fue de ATPasa de MP. Hay que hacer notar que los valores absolutos de actividad específica sensible a vanadato en estas dos fracciones membranales no son significativamente distintos (747 y $785 \mu\text{mol Pi mg}^{-1} \text{h}^{-1}$), lo cual sugiere que hay la misma cantidad de enzima en ambas fracciones. Además, en la fracción microsomal se detectó actividad de las ATPasas de

mitocondria y tonoplasto, contribuyendo con 54.9 y 22.1 %, respectivamente. Con el procedimiento de purificación de VMP se logró disminuir la contribución de la ATPasa mitocondrial al 18 % y perder por completo la actividad de la ATPasa de tonoplasto. Estos resultados confirmaron que siguiendo el procedimiento optimizado de partición en dos fases, se lograba obtener una preparación de pureza aceptable de las VMP, en donde la actividad predominante es la de la ATPasa de MP.

8. Influencia de la concentración de polímeros en el enriquecimiento de VMP de embriones secos de Maíz.

Después de haber establecido las condiciones para purificar VMP por el método de separación de fases, utilizando para ello embriones embebidos una hora, se procedió a purificar las VMP de los embriones embebidos por diferentes tiempos (con las concentraciones de polímeros de 6.7 %); el porcentaje de inhibición de la hidrólisis de ATP por vanadato en dichas vesículas sólo fue bueno para los embriones embebidos, no así para los del tiempo cero, en los cuales la inhibición no fue mayor del 39 %, medido en presencia o ausencia de lisofosfatidilcolina (Tabla IX). De tal manera que se procedió a determinar la concentración óptima de polímeros en la mezcla de fases, para purificar las VMP de los embriones sin embeber (Tabla X).

Tabla IX . Efecto de la concentración de polímeros en la purificación de VMP de embriones de maíz no embebidos. Se partió de 110 mg de proteína de la fracción de H-N (d) y se obtuvo la fracción U₂ de un sistema de fases que tenía KCl 5 mM.

Concentración de PEG y DEX (%)	Inhibición de la hidrólisis de ATP por Na ₃ VO ₄ (%)	
	Sin LPC*	Con LPC*
6.5	66.1 ± 3.2	58.5 ± 4.5
6.7	31.0 ± 5.2	39.1 ± 3.8
6.8	77.7 ± 2.7	88.0 ± 4.2

*Lisofosfatidilcolina 100 μM en el medio de reacción de hidrólisis de ATP.

Los datos corresponden a la media de 2 diferentes fracciones membranales y determinadas por triplicado cada una.

Se encontró que a 6.5 % de concentración de los polímeros, había una purificación de membranas plasmáticas de alrededor del 60 %, mayor a la que se obtenía a 6.7 % de los polímeros. Pero fue a PEG 6.8 % y DEX 6.8 % cuando se logró obtener la mayor purificación: 77.7 %, en ausencia de lisofosfatidilcolina, y de 88 % en presencia del detergente. Así que para purificar VMP de embriones secos se utilizó 6.8 % de cada uno de los polímeros en la mezcla de fases.

9. Comparación de la purificación de VMP de embriones no embebidos y embebidos por la actividad de hidrólisis de ATP sensible a Na_3VO_4 .

Las diferencias en la purificación de VMP de embriones no embebidos y embebidos fue notoria cuando se usó 6.7 % de PEG y 6.7 % de DEX (Tabla XI), ya que hubo un escaso enriquecimiento en VMP de los embriones secos a esta concentración de polímeros (Tablas IX y XI), contrastando con el alto enriquecimiento en VMP de embriones embebidos una hora, el cual correspondió a 70.6 % medido sin LPC y de aproximadamente 87 % con LPC en el medio de reacción (Tabla XI). Sin embargo, a una concentración de 6.8 % de los polímeros, la diferencia en la purificación entre los embriones secos y embebidos fue menor, ya que se obtuvo una pureza de 78 a 88 % de las membranas plasmáticas de los embriones secos medida sin y con LPC respectivamente, mientras que para los embriones embebidos fue de aproximadamente 68 %. A pesar de que a 6.8 % de los polímeros fue menor la diferencia en la purificación de las VMP entre los embriones secos y embebidos, se utilizó sólo esta concentración para los embriones secos y 6.7 % de PEG y 6.7 % de DEX para obtener las VMP de los embriones embebidos para utilizar las fracciones membranales más enriquecidas en VMP.

Tabla XI. Comparación de la purificación de VMP de embriones secos (tiempo cero) y de embriones embebidos (1 hora). Se partió de 110 mg de la fracción H-N (d) y se obtuvo la fracción U₂ con una mezcla de fases que contuvo 5 mM de KCl.

Concentración de PEG y DEX (%)	Inhibición de la hidrólisis de ATP por Na ₃ VO ₄ (%)			
	Tiempo cero -LPC	Tiempo cero +LPC	Tiempo 1 h -LPC	Tiempo 1 h +LPC
6.7	31.0 ± 5.2	39.1 ± 3.8	70.6 ± 5.1	86.8 ± 4.3
6.8	77.7 ± 2.7	88.0 ± 4.2	67.5 ± 3.2	67.9 ± 4.0

10. Comparación de la purificación de VMP de embriones secos y embebidos por microscopía electrónica.

Las micrografías electrónicas de las muestras de fracciones crudas y purificadas de MP de embriones embebidos 0 y 1 horas y obtenidas en paralelo, revelaron la siguiente información:

- a) Las fracciones de microsomas tanto de los tiempos de 0 y 1 hora de imbibición mostraron una gran heterogeneidad en cuanto al tipo y tamaño de las vesículas.
- b) Esas mismas muestras después de ser purificadas (fracciones U₂) fueron muy homogéneas, presentando vesículas pequeñas con la morfología típica de las VMP.
- c) Lo anterior concuerda con el hecho de que las fracciones U₂ de 0 y 1 hora de imbibición hayan presentado actividades de hidrólisis de ATP muy semejantes.

- d) La presencia de fragmentos de membrana plasmática que no formaban vesículas fue muy evidente tanto en las muestras de 0 como en la de 1 hora de imbibición. Es probable que estos fragmentos sean de MP pues en las fracciones membranales crudas (microsomas) no se encuentran y sí en las membranas purificadas (U₂).
- e) En resumen, no se observaron grandes diferencias entre los tiempos 0 y 1 hora de imbibición, pero sí entre las fracciones crudas y las purificadas.

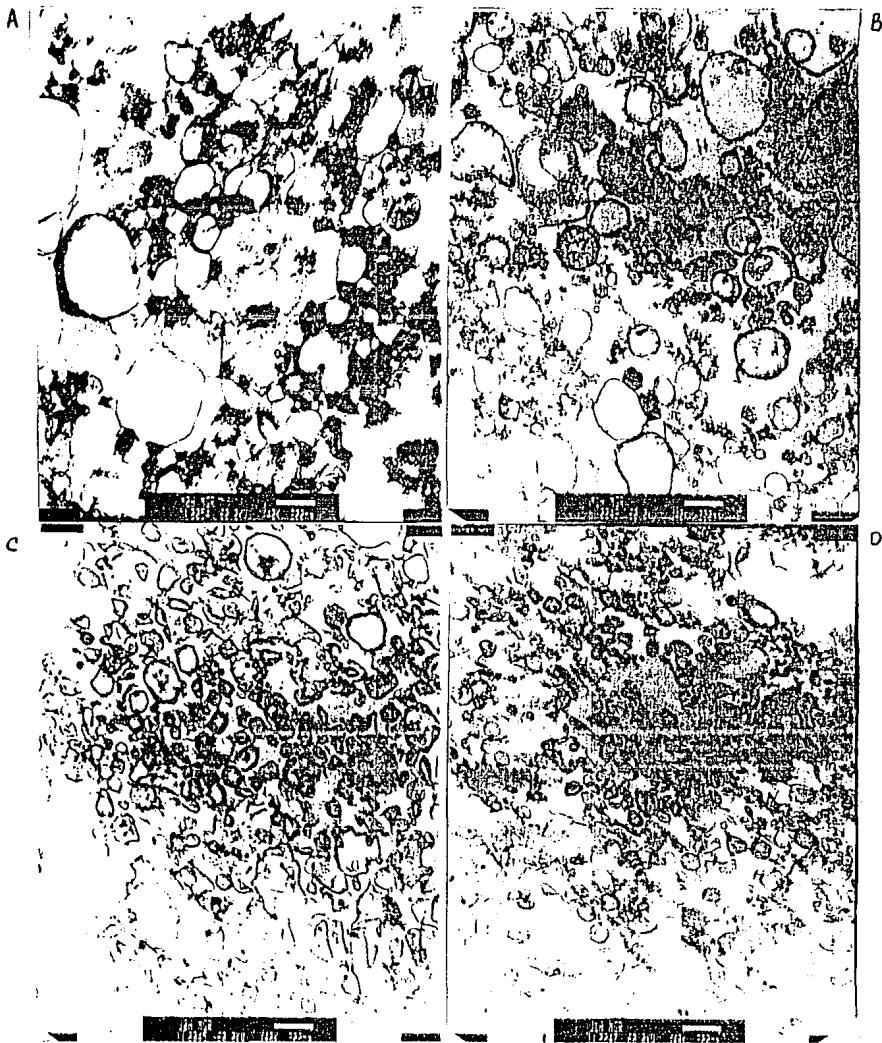


Fig. 15 Fotografías al microscopio electrónico de diferentes fracciones membranales de embriones de maíz. A Fracción microsomal de embriones secos, B Fracción microsomal de embriones embebidos 1h, C Fracción U2 de embriones secos y D Fracción U2 de embriones embebidos 1h. Las flechas indican los fragmentos de membrana abiertos.

11. Patrón de actividad de la ATPasa de MP en VMP purificadas de embriones embebidos por diferentes tiempos.

11.1. Purificación de VMP de embriones embebidos por diferentes tiempos.

Con el propósito de obtener el perfil de actividad de la ATPasa de MP de embriones de maíz en germinación, se procedió a purificar las vesículas de membrana plasmática de 0, 1, 2, 4, 5.5 y 7 horas de imbibición de los embriones. La obtención de estas vesículas se realizó en un solo día, para homogeneizar la edad de las vesículas y además reducir las posibles variaciones en el perfil de actividad o proteína causadas por almacenamiento y no a la variación natural que pueda existir entre uno y otro tiempo de imbibición de los embriones. En la tabla XII se muestran los resultados de la purificación de las membranas.

Tabla XII. Actividad de hidrólisis de ATP* de las VMP purificadas por separación en dos fases de embriones embebidos diferentes tiempos.

Concentración de PEG y DEX (%)	Tiempo de Imbibición (horas)	Actividad Total ($\mu\text{mol Pi mg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Inhibición por Na_3VO_4 (%)
6.8	0	943.5	76.7
6.7	1	1242.3	78.1
6.7	2	715.7	80.8
6.7	4	708.8	50
6.7	5.5	459.3	67.5
6.7	7	484.5	75.8

Los valores representan la media de las actividades de 2 fracciones membranales distintas para cada tiempo y determinadas por triplicado en cada una.

*La reacción de hidrólisis de ATP se llevó a cabo en presencia de lisofosfatidilcolina 100 μM

Se obtuvo una pureza de 67.5 a 81 % en VMP de los embriones con excepción de las VMP obtenidas de embriones embebidos 4 horas, posiblemente debido a un error técnico. Por otra parte, la actividad total de hidrólisis de ATP fluctuó entre 480 y 1240 $\mu\text{mol Pi mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, dependiendo del tiempo de imbibición de los embriones. A partir de estos valores y con los datos de la inhibición por vanadato, fue posible calcular la actividad de la ATPase de MP a los diferentes tiempos de imbibición de los embriones.

11.2. Patrón de la actividad de la ATPase de MP.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 16. En el tiempo cero, cuando los embriones aún no habían sido embebidos, se encontró actividad de ATPase de H^+ ; es decir, la enzima está presente y es capaz, en las condiciones de ensayo, de hidrolizar ATP. Después de una hora, se presentó el máximo de actividad de ATPase y después de este tiempo decreció, llegando a valores aún menores que la actividad encontrada al tiempo cero. El que se encuentre a la enzima en los embriones secos y con la capacidad de llevar a cabo una actividad más alta que la encontrada a 4, 5.5 y 7 horas, podría indicar que esta enzima juega un papel importante al inicio de la reactivación del metabolismo de las células embrionarias.

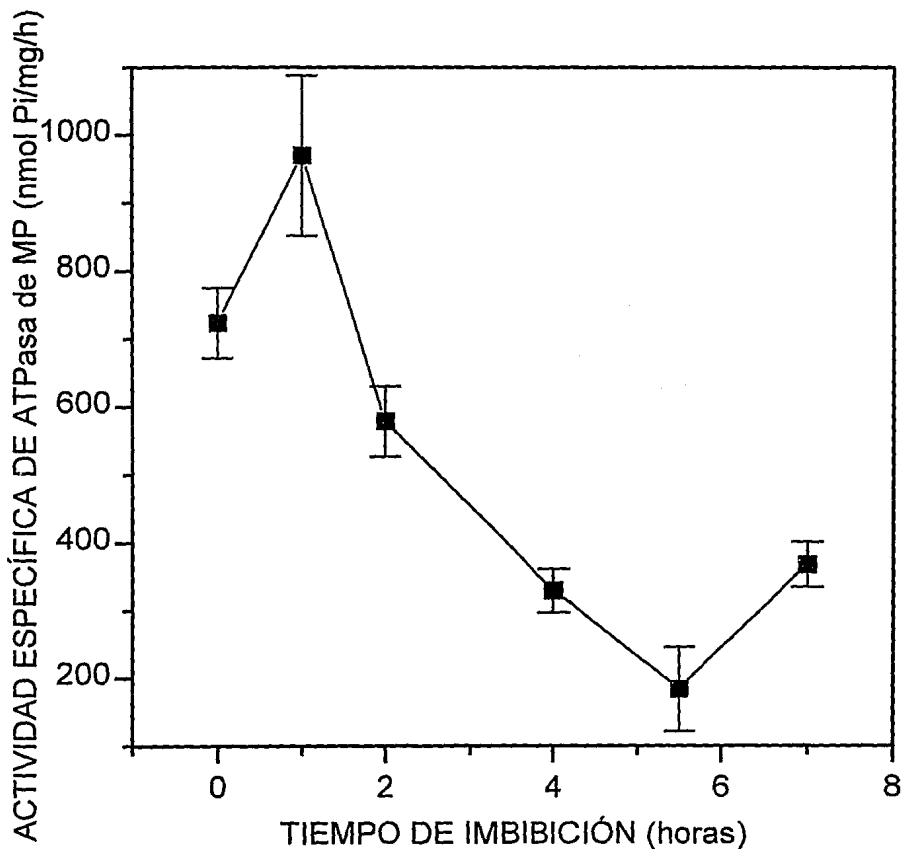


Fig.16. Perfil de actividad específica de la ATPasa de membrana plasmática de embriones de maíz. 200 embriones de maíz se pusieron a embeber por los tiempos indicados al cabo de los cuales se homogenizaron en N_2 líquido. Las VMP se purificaron por la técnica de partición de fases y en las fracciones U_2 respectivas se midió la hidrólisis de ATP.

12. Inmunodetección de la ATP_{asa} de MP con el anticuerpo contra la porción central de la ATP_{asa} de MP de *Arabidopsis thaliana*.

Con el propósito de comparar el patrón de la actividad enzimática con el de la proteína específica, se procedió a detectar a la enzima usando anticuerpos. En trabajos anteriores (Sánchez, 1993 y García, 1993) se había utilizado un anticuerpo que reconoce la porción central de la ATP_{asa} de MP de *A. thaliana*, el cual fue generosamente proporcionado por el Dr. Ramón Serrano (Valencia, España); este anticuerpo se utilizó también en los primeros experimentos. Después de varias modificaciones a la técnica para detectar a la enzima en las réplicas en Western, se logró obtener una inmunoréplica como la que se muestra en la Fig. 17. Fue necesario exponer el papel de nitrocelulosa un tiempo largo con la solución de revelado (aproximadamente 2 h), para poder visualizar las bandas de proteína que reaccionaron con el anticuerpo, obteniéndose un fondo muy alto. Por otra parte, se sabe que la ATP_{asa} de MP es un polipéptido de 100 kDa de peso molecular y lo que se obtuvo a todos los tiempos de imbibición de los embriones fueron de 4 a 6 bandas de reacción con el anticuerpo que oscilaban entre los 40 y 85 kDa de peso molecular. Por ello se tuvieron que utilizar concentraciones altas de inhibidores de proteasas en las muestras de electroforesis que además se precipitaron con acetona inmediatamente después de haber sido obtenidas (ver Materiales y Métodos), para evitar la actividad proteolítica que durante la germinación es muy alta, preparándose luego para el corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida SDS. Aún así, las bandas de proteína reveladas usando este anticuerpo no disminuyeron. Posiblemente lo que sucedió fue la reacción inespecífica del anticuerpo con otras proteínas, por la exposición prolongada a éstos y la poca eficiencia ya que la dilución empleada de éste fue baja (1:300), ya que a concentraciones menores del anticuerpo, fue difícil detectar alguna banda en la inmunoréplica. De manera que se procedió a obtener un anticuerpo con mayor especificidad para la

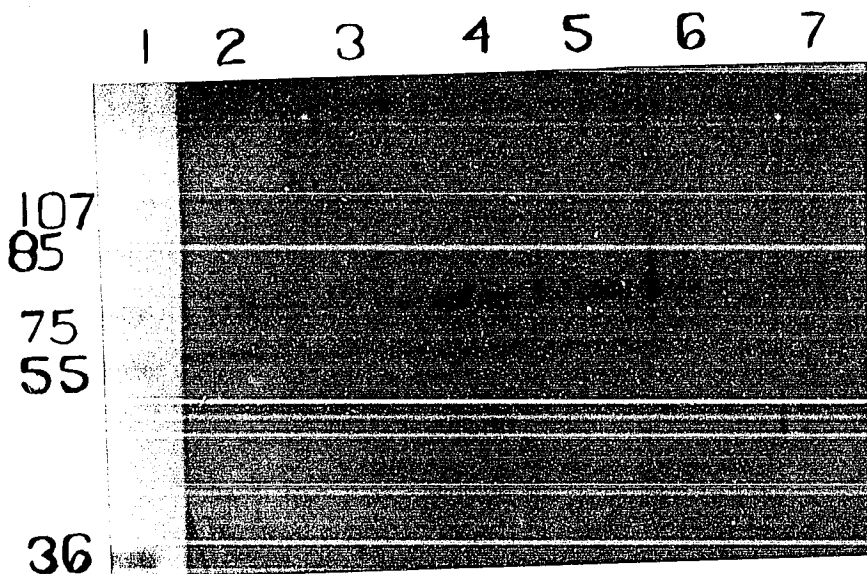


Fig. 17. Inmunoréplica usando un anticuerpo anti-ATPasa de MP de *A. thaliana* diluído 1:300 en TBS y fracciones microsomales de embriones embebidos diferentes tiempos. Se añadieron 30 μ g de proteína por pozo. 1) estándares de peso molecular, 2) 0 horas, 3) 1 hora, 4) 2 horas, 5) 4 horas, 6) 5.5 horas y 7) 7 horas de imbibición de los embriones.

13. Obtención del anticuerpo específico para la ATP_{asa} de MP de plantas.

En la literatura se encuentran reportadas las secuencias de aminoácidos de las ATP_{asas} de *Licopersicon esculentum* (Ewing et al, 1990), *Arabidopsis thaliana* (Harper et al, 1989; Pardo y Serrano, 1989) y *Nicotiana plumbaginifolia* (Boutry et al, 1989; Pérez et al, 1992) deducidas de sus genes respectivos. A partir de estas secuencias se buscó una secuencia común, que estuviera conservada y fuera antigénica, para hacer un anticuerpo que reaccionara específicamente contra la ATP_{asa}. En la Fig. 18B se indican las tres regiones que resultaron ser las más antigénicas de la ATP_{asa}, de ellas se escogió una secuencia en la región I por estar altamente conservada en éstas y por no encontrarse en otras ATP_{asas} tipo P de MP de otras especies (como levaduras y hongos) y que transportan otro catión (Wach, 1992). Se sintetizó el péptido correspondiente (Fig. 18A) y se inyectó en conejos para obtener los anticuerpos policlonales específicos (Materiales y Métodos).

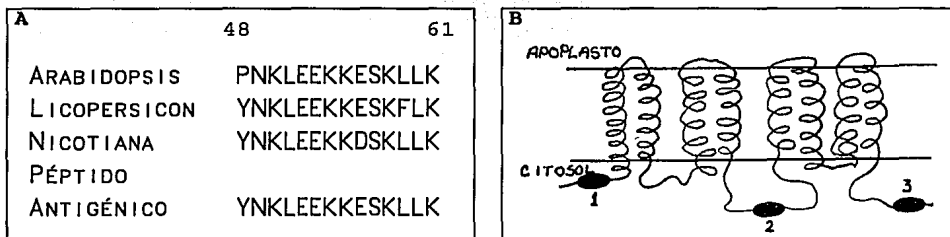


Fig. 18. Secuencias conservadas y antigénicas de las ATP_{asas} de membrana plasmática de plantas. A. Secuencias conservadas en la región 1 de la ATP_{asa} de MP de 3 especies de plantas y el péptido antigénico diseñado a partir de éstas. B. Modelo transmembranal de la ATP_{asa} de MP mostrando las tres regiones más antigénicas.

14. Caracterización del anticuerpo obtenido contra la región amino terminal de la ATP_{asa}.

Una vez obtenido el anticuerpo contra la región amino terminal de la ATP_{asa} de MP se procedió a caracterizar su reacción en inmunorélicas tipo Western de diferentes fracciones membranales de embriones. En la Fig. 19 se observa que hay una sola banda de reacción con el anticuerpo tanto en fracciones crudas (homogenado y microsomas) como en la fracción U₂, donde además hubo una mayor reacción, tal y como se esperaba, ya que esta fracción membranal está enriquecida en vesículas de MP y por lo tanto de su ATP_{asa}. Algunas bandas menores que aparecen en la réplica solo aparecen a tiempos largos de exposición a la fosfatasa alcalina. Además, el anticuerpo reaccionó con una sola banda en una preparación de vesículas de membrana plasmática de betabel (control positivo) y no hubo reacción usando una fracción semipurificada de la ATP_{asa} de H⁺ de *Kluveromyces lactis* (control negativo) proporcionado amablemente por el Dr. Juan Pablo Pardo (Fac.de Medicina, UNAM). Ya que el anticuerpo mostró ser específico para la ATP_{asa} de MP de plantas, fue utilizado para detectar a la enzima en las fracciones purificadas en VMP de los embriones embebidos por diferentes tiempos.

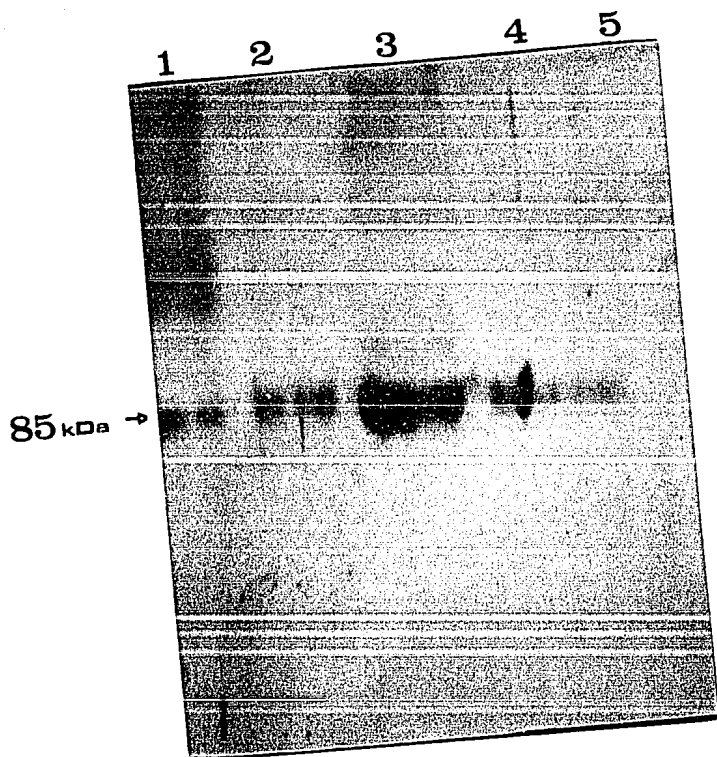


Fig. 19. Inmune-réplica tipo Western de diferentes fracciones membranales utilizando el anticuerpo anti-región NH_2 terminal de la ATPase de MP de plantas. Se emplearon 30 μg de proteína por carril. 1) Homogenado 2) Microsomas 3) U_2 4) Vesículas de betabel 5) Vesículas de levadura.

15. Inmuno-detección en réplica en Western de la ATPasa de MP en las VMP de embriones embebidos por diferentes tiempos.

Se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS de las VMP de los embriones embebidos por diferentes tiempos y la inmunoréplica tipo Western del gel de estas mismas muestras (Fig. 20 B), detectándose a la ATPasa en estas preparaciones con el anticuerpo contra la región NH₂ terminal de la enzima. En el gel teñido por Coomassie (Fig. 20 A) se puede apreciar un gran número de bandas en la región de los 100 kDa. Sin embargo, en la inmunoréplica (Fig. 20 B) se observó que había una sola banda de reacción de aproximadamente 85 kDa de peso molecular en todos los tiempos de imbibición del embrión; desgraciadamente esta banda tenía una forma irregular en la distribución, a pesar de que en el gel (Fig. 20 A) se observó una distribución homogénea de las proteínas (bandas bien definidas). Es posible que dada su escasez en la membrana, la ATPasa no se transfiera uniformemente dando bandas de forma irregular.

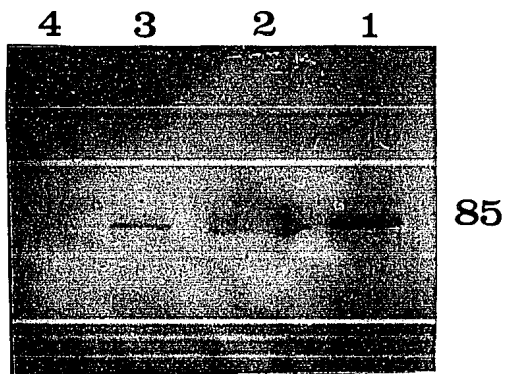
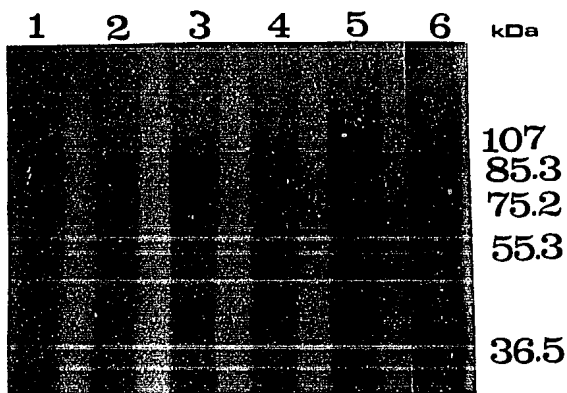


Fig. 20. A. Gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomasie, en el cual se corrieron VMP de embriones embebidos por diferentes tiempos, se cargaron 25 μ g de proteína por carril. 1) cero horas, 2) 1 hora, 3) 2 horas, 4) 5.5 horas 5) 7 horas de imbibición de los embriones y 6) estandares de peso molecular. B. Inmunoréplica del gel A usando el anticuerpo que reconoce la región amino terminal de la ATPasa de MP. 1) 1 hora, 2) 2 horas, 3) 5.5 horas y 4) 7 horas de imbibición de los embriones

16. Detección y cuantificación de la ATP_{asa} de MP en las VMP de embriones embebidos por diferentes tiempos.

Para la detección y cuantificación de la ATP_{asa} de MP en las VMP de los embriones que fueron embebidos por diferentes tiempos, se adsorbieron las vesículas directamente en el papel de nitrocelulosa, según se detalló en Materiales y Métodos. Lo anterior se justificó por dos razones: la primera, porque la distribución de la proteína membranal en una ranura ("slot blot") es mejor a la que se tiene de una réplica del gel (De Lisle, 1991), y lo anterior facilita hacer la densitometría de esta banda; la segunda razón fue porque al haber obtenido una sola banda de reacción con el anticuerpo contra la ATP_{asa} en la inmunoréplica de las VMP de los embriones embebidos por diferentes tiempos (Fig. 21B), el color que se obtendría en la ranura sería debido solamente a esta banda.

Los resultados de la inmunoréplica en ranuras ("slot blot") de las VMP de los embriones embebidos por diferentes tiempos se muestran en la Fig. 21 A, en donde se observa que sí se logró una distribución pareja de la proteína en la ranura. Se cuantificó la intensidad y grosor de cada banda por densitometría y los resultados de este análisis se encuentran en el panel B de la misma figura. Los picos obtenidos de cada banda se utilizaron para determinar la concentración relativa de ATP_{asa} a cada uno de los tiempos de imbibición de los embriones (ver Materiales y Métodos).

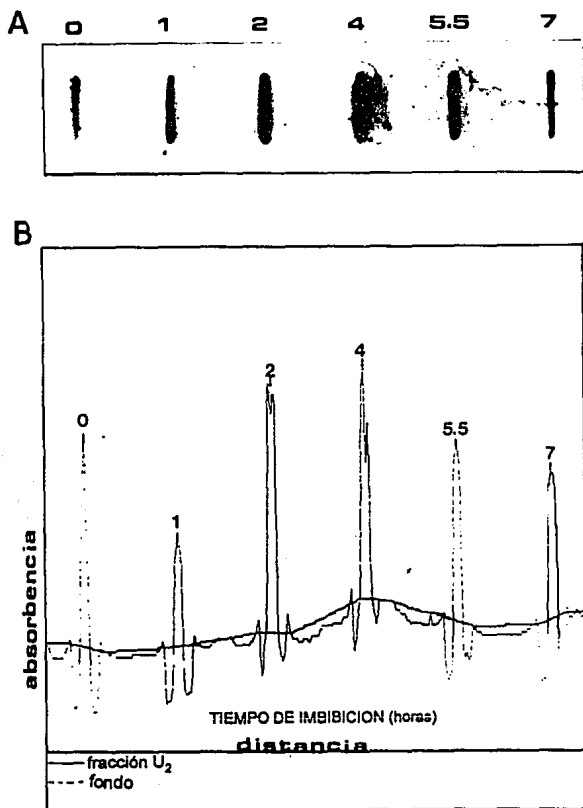


Fig. 21. Inmunodetección de la ATP_{asa} de MP a diferentes tiempos de imbibición de los embriones. A. Western en ranura ("slot blot") de las fracciones de embriones con 0, 1, 2, 4, 5.5 y 7 horas de imbibición. Se aplicaron 25 μ g de proteína en cada ranura. B. Perfil densitométrico de las proteínas detectadas con el anticuerpo específico de la inmunoréplica en ranura mostrada en A.

17. Perfil de la ATPasa de MP a los diferentes tiempos de imbibición del embrión.

La reactividad al anticuerpo o la concentración relativa de ATPasa a cada uno de los tiempos de imbibición de los embriones se encuentra graficada en la Fig. 22. Se detectó a la ATPasa en los embriones secos o sin embeber. A la primera hora de haber sido embebidos no se observó un aumento significativo de la enzima, pero a las 2 horas de imbibición se observó un máximo de proteína, siendo ésta 3 veces mayor a la detectada en el tiempo cero. Lo anterior sugiere una síntesis *de novo* de la enzima; la población de enzimas que se detectó a las 2 horas representaría entonces la mezcla de la proteína existente y la sintetizada *de novo*. A las 4 horas de imbibición de los embriones, la proteína disminuyó a valores similares a los del tiempo cero y se mantuvo esta cantidad de proteína hasta las 7 horas de imbibición del embrión. Es claro que a las 4 horas ya pudo haber una degradación de las diferentes poblaciones de la enzima, en donde posiblemente ya haya poca o nada de la que existía en el embrión sin embeber. Esto asumiendo que lo que hay de ATPasa puede ser reconocido por el anticuerpo y que este solo reconoce a la ATPasa.

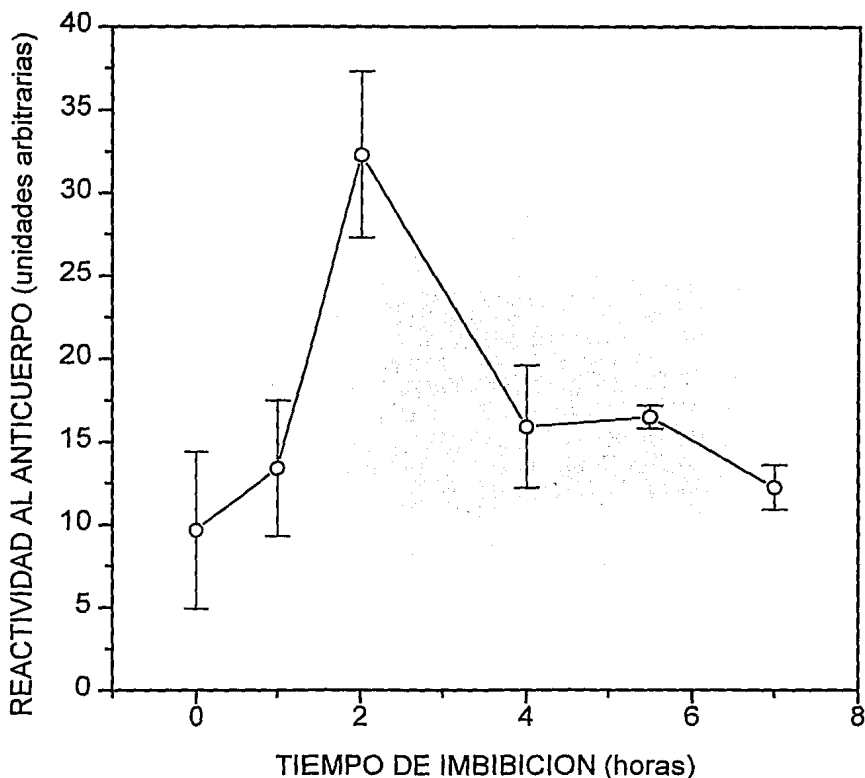


Fig. 22. Perfil de detección de la ATPasa de la membrana plasmática con anticuerpos en embriones embebidos a diferentes tiempos. Las fracciones membranales (U_2) utilizadas fueron las mismas de los experimentos de la Fig. 15, solo que para este experimento las membranas fueron precipitadas con acetona inmediatamente después de ser obtenidas.

18. Cinética de aparición de la ATP_{asa} de MP en vesículas purificadas de embriones de Maíz en germinación.

Para tener una imagen más completa de la cinética de aparición de la enzima en la germinación de embriones de maíz, se combinaron las gráficas de la ATP_{asa} de MP detectada con anticuerpos (Fig. 22) y por actividad (Fig. 16) en una misma gráfica (Fig. 23). Se observó que aunque ambos perfiles eran de forma similar presentaban algunas diferencias, como son: a) el pico máximo de actividad se presentó una hora antes que el de proteína y b) la magnitud de la actividad no corresponde a la magnitud de los niveles de proteína en las primeras horas de imbibición de los embriones. Esta discordancia se mostró consistente en 6 preparaciones diferentes.

En el recuadro de la Fig. 23 se encuentra la relación de la actividad específica de la ATP_{asa} de H⁺ de la membrana plasmática y la reactividad al anticuerpo a diferentes tiempos de imbibición de los embriones. Esta gráfica muestra claramente como la actividad específica de la enzima es muy alta en la primera hora y que la población de la enzima que se encuentra a las dos horas de imbibición presenta una actividad de ATP_{asa} menor, pero que se sostiene aproximadamente en la misma relación Actividad / Reactividad al anticuerpo hasta las 7 horas de imbibición.

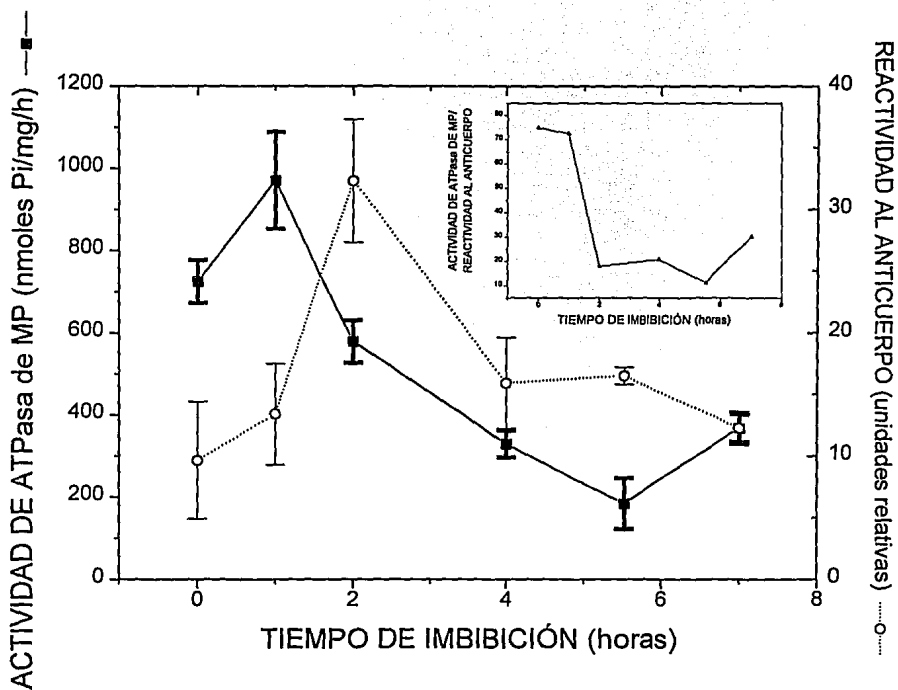


Fig. 23. Perfil de aparición de la ATPasa de la membrana plasmática de embriones de maíz, detectada con anticuerpos específicos y por actividad.

6. DISCUSION

Selección del período de la germinación relevante para estudiar la cinética de aparición de la ATP_{asa} de H^+ de la membrana plasmática.

En este trabajo se utilizaron los embriones aislados de maíz, como un sistema más simple que la semilla entera, lo cual permite disectar los fenómenos circunscritos a los tejidos que conforman al escutelo y al eje embrionario, que son las estructuras alrededor de las cuales va a realizarse el cambio en el metabolismo de la semilla durmiente. El costo de esta simplificación radica en que en los estudios en los embriones aislados no se pueden considerar las interacciones del resto de la semilla con el embrión, las cuales constituyen también una parte importante en el inicio de la germinación.

Las tres fases distintivas del proceso de germinación se logran delimitar gracias a los cambios de peso húmedo o también llamado de toma de agua de la semilla (Ching, 1978; Bewley y Black, 1978). En los embriones de maíz se lograron observar estas tres fases, lo cual confirma lo que se ha reportado en embriones de maíz, girasol y soya (Puntarulo et al, 1987; Ehrenshaft y Brambl, 1990; Attuci et al, 1991).

La hidratación que ocurre en la fase I es un fenómeno físico que puede ocurrir aún en semillas no viables (Ching, 1978; Bewley y Black, 1978). Así que para evaluar la actividad metabólica de los embriones fue necesario usar otro criterio fisiológico. El consumo de oxígeno es una medida ampliamente utilizada como criterio de la reactivación metabólica de la semilla y sus componentes (Ching, 1978; Bewley y Black, 1978; Puntarulo y Boveris, 1990), debido a la población enorme de enzimas que se ven involucradas: todas las enzimas de la glucólisis, del ciclo

de Krebs, de la cadena de transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa (Ching, 1978; Puntarulo et al, 1987; Puntarulo y Boveris, 1990; Ehrenshaft y Brambl, 1990; Attucci et al, 1991). El consumo de oxígeno de los embriones nos indicó que el comienzo de la actividad metabólica de los embriones es muy alto en las primeras diez horas de imbibición.

La fase II de la toma de agua de la semilla comienza cuando ésta ha alcanzado la mayor hidratación y las enzimas se encuentran trabajando activamente para la formación de membranas, pared celular, síntesis de proteínas, organelos, DNA y RNA. Es en esta fase donde ocurren los mayores cambios metabólicos que preparan al embrión para su crecimiento (Ching, 1978).

Cuando tanto las fases de la toma de agua como el consumo de oxígeno de los embriones se ubicaron en la temporalidad de la curva de germinación, se hizo evidente que en las primeras 10 horas de la imbibición ocurre la reactivación del metabolismo quiescente como condición preparatoria para la elongación de la radícula.

De estos resultados, se escogieron 0, 1, 2, 4, 5.5 y 7 horas de imbibición de los embriones, que es un período temprano en la germinación, ya que en él se podría observar la presencia de la $ATP_{asa}-H^+$ de la MP, si existían niveles iniciales de la enzima, y si éstos cambiaban en el transcurso de la imbibición. En el estudio de la actividad mitocondrial en la germinación se han elegido también tiempos de imbibición entre 0 y 10 horas en embriones y ejes embrionarios de maíz, pepino, girasol y frijol. Las actividades mitocondriales que se han medido son el consumo total de oxígeno, la movilización de lípidos y la hidrólisis de ATP sensible a oligomicina. Además, han sido identificados algunos componentes enzimáticos que contribuyen a alguna de estas actividades respiratorias como son la citocromo c oxidasa, la ATP_{asa} mitocondrial y la lipoxigenasa (Puntarulo et al, 1987; Ehrenshaft y Brambl, 1990; Attucci et al, 1991; Hill et al, 1992).

En el presente trabajo la actividad enzimática evaluada fue la de la hidrólisis de ATP sensible a Na_3VO_4 , por lo cual la especificidad de esta determinación era crítica.

Purificación de la fracción de vesículas de membrana plasmática.

En un trabajo previo se había caracterizado a la ATPase de la MP en la germinación de ejes y embriones de maíz, utilizándose fracciones microsomales (García, 1993). La identificación de los componentes que hidrolizaban ATP se realizó por medio de inhibidores específicos, encontrándose cuatro enzimas presentes en esta fracción: la fosfatasa ácida y las ATPases mitocondrial, del tonoplasto y de la membrana plasmática. En este trabajo se corroboró la heterogeneidad de la preparación y ya que la hidrólisis de ATP sensible a Na_3VO_4 se estaba usando como indicadora de la actividad de la ATPase de H^+ de la MP, se hizo patente que ésta era una suposición que podría llevar a consideraciones falsas, pues por ejemplo el Na_3VO_4 puede inhibir a la fosfatasa ácida, también presente en la preparación (Gallagher y Leonard, 1982; Sze, 1985; Serrano, 1990).

Por lo anterior, en este trabajo se procedió a obtener una preparación homogénea y específica de vesículas de membrana plasmática. Además, una preparación de mayor pureza permite tener la posibilidad de medir procesos de transporte acoplados a la actividad de la enzima en la membrana plasmática.

El método que se escogió para obtener a las vesículas de la membrana plasmática fue el de separación en dos fases utilizando el polietilenglicol 3350 y el dextran T-500, que ha sido empleado para obtener VMP de semillas, hojas y raíces de especies como remolacha, espinaca, avena, frijol, maíz y rábano, con resultados entre el 90 y el 95% de pureza de las VMP (Larsson et al, 1984,

1987; Hodges y Mills, 1986; Buckhout, 1989; Linnemeyer et al, 1990; Palmgren et al, 1990; De Michelis et al, 1991; Faraday y Spanwick, 1992).

La técnica de separación de las VMP de las otras vesículas se basa en su carga de superficie y aparentemente ésta varía dependiendo del tejido y de la especie en estudio, recomendándose determinar las condiciones óptimas para el reparto como: concentración de los polímeros, del KCl y el número de las subsecuentes particiones que hay que realizar para obtener la mayor purificación de las vesículas de membrana plasmática (Hodges et al, 1986; Larsson et al, 1987).

La mayoría de las preparaciones de vesículas de membrana plasmática reportadas se han obtenido dentro del intervalo de 5.5 a 7.0 % de concentración de los polímeros y además en un trabajo previo en el laboratorio, la concentración óptima de polímeros empleada para obtener VMP de raíces de *Echinocloa crusgalli* fue del 7.0 % (Calera, 1992). Con estos antecedentes se eligió el intervalo de concentraciones de los polímeros cercano a 7.0 (6.2 % a 7.0 %) para obtener las VMP de los embriones de maíz. Además se han reportado concentraciones de KCl desde 0.3 mM a 40 mM para obtener VMP, pero las concentraciones más empleadas son 3, 5 y 6 mM por lo cual se decidió probar el efecto de 3 y 5 mM de KCl en estas preparaciones (Larsson et al, 1984 y 1987; Hodges y Mills, 1986; Buckhout, 1989; Linnemeyer et al, 1990; Palmgren et al, 1990; De Michelis et al, 1991; Faraday y Spanwick, 1992; Calera, 1992). La concentración óptima de polímeros con la que se obtuvo la mayor pureza de las VMP (80%) fue de 6.7 % y una concentración de KCl de 5 mM.

Otras modificaciones que fueron exitosas fueron la doble homogenización del tejido y la de adicionar a la mezcla de fases prácticamente todo el homogenado excepto la fracción nuclear. Esto sugiere que las vesículas de la membrana plasmática que se generan en un homogenizado simple pueden ser de tamaños muy

distintos y que las vesículas grandes se pierden en las centrifugaciones a baja velocidad. Con la doble homogenización se logró una recuperación mayor de la proteína membranal como vesículas muy pequeñas de tamaño uniforme, como lo revelaron las fotografías al microscopio electrónico.

La estandarización de la cantidad de proteína aplicada al sistema de fases y la realización de un segundo reparto, llevaron a alcanzar purezas superiores al 80% (fracciones U₂) de acuerdo a lo reportado por otros autores (Larsson *et al*, 1984 y 1987; Hodges y Mills, 1986; Buckhout, 1989; Linnemeyer *et al*, 1990; Palmgren *et al*, 1990; De Michelis *et al*, 1991; Faraday y Spanwick, 1992).

Se ha reportado que las vesículas de membrana plasmática obtenidas por este método se obtienen selladas y con el sitio catalítico de la enzima hacia dentro de la vesícula (orientación de polaridad normal), por lo cual se recomienda el uso de detergentes como Tritón X-100, lisolecitina o lisofosfatidilcolina para que el ATP sea accesible a la enzima. El uso del detergente permite detectar la actividad de la enzima con 3 a 6 veces más actividad que la medida sin el detergente en el medio de reacción. (Larsson *et al*, 1984 y 1987; Hodges y Mills, 1986; Grouzis *et al*, 1987; Palmgren *et al*, 1990).

Se probó el efecto de la lisofosfatidilcolina sobre la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPase de la MP, obteniéndose un bajo incremento en la actividad, indicando que la mayoría de las VMP de los embriones tenía la orientación del sitio catalítico de la enzima hacia afuera de la vesícula, es decir las vesículas estaban con la polaridad invertida. Se ha reportado que dependiendo del tejido se pueden obtener vesículas en una u otra polaridad, o como una mezcla de las dos polaridades (Sze, 1985), y que al ser sometidas a la separación en dos fases, la mayoría de las vesículas de la membrana plasmática se obtienen al derecho (Larsson, 1984 y 1987; Hodges y Mills, 1986), si bien

con ciertas concentraciones de sales (KCl) y sometiendo a las vesículas (obtenidas de un primer reparto) a repetidos ciclos de congelamiento y descongelamiento, es posible obtener una preparación de vesículas al revés (Palmgren et al, 1990). Tal vez con las modificaciones hechas a la técnica y las propiedades intrínsecas del tejido se haya favorecido la obtención de las VMP con la orientación invertida.

La fracción U₂ obtenida por el sistema de partición de fases detallado anteriormente tuvo un 80 % de pureza, medida como la inhibición de la hidrólisis de ATP sensible al Na₃VO₄, el restante 20% de la actividad de hidrólisis de ATP insensible al inhibidor lo proporcionó la ATP_{asa} mitocondrial. Esta preparación resultó mucho mejor material para realizar el estudio propuesto que la fracción microsomal original, ya que en esta última se encontraban: la ATP_{asa} mitocondrial con 3 veces más actividad que en la fracción U₂, la ATP_{asa} de tonoplasto que en la fracción U₂ no estaba presente y la ATP_{asa} de la MP que solo representaba el 28 % de la actividad total de hidrólisis de ATP.

Un resultado interesante de este trabajo fue el que las VMP de los embriones no embebidos requirieron diferentes condiciones de separación que las de los embriones embebidos para alcanzar las mismas condiciones de pureza. Es difícil decir sólo con estos datos, cual o cuales son las causas que producen un requerimiento diferente en la concentración de los polímeros para obtener vesículas purificadas de MP de embriones secos y de los embriones que han sido embebidos. En esta dirección, se ha encontrado que al colocar a una semilla en una solución, hay una salida de solutos como K⁺, aminoácidos y azúcares entre otros, que poco después disminuye o se detiene. Este fenómeno se presenta en cualquier semilla, embrión o eje que haya sufrido el fenómeno natural de desecación o bien haya sido almacenado en condiciones favorables o adversas de almacenamiento. Se ha postulado que uno de los factores que producen esta salida inicial de solutos en la semilla es la desorganización del sistema membranal de la célula

debida al bajo contenido de agua que alcanza la semilla durante la desecación (5 a 10 %) y el cual al incrementarse durante la germinación organizaría y sellaría las bicapas lipídicas formadoras de los organelos y la envoltura celular pre-existentes que fueron originadas en la formación de la semilla en la planta madre (Bewley, 1986).

En semillas de girasol sin hidratar se observó que las mitocondrias presentaban una estructura trilaminar y que al ser embebidas por 3 horas ya presentaban la estructura normal de bicapa lipídica (Attuci et al, 1991). En el presente trabajo, las fotografías al microscopio electrónico de las preparaciones de VMP tanto de embriones secos como embebidos 1 hora mostraron un gran número de fragmentos de membrana. Desgraciadamente no hicimos las fotografías de VMP de embriones embebidos por tiempos más largos, quizá en ellos se observe una disminución de los fragmentos de membrana. Sin embargo, es probable que la membranas remanentes de los embriones de semillas secas tengan características diferentes en los fosfolípidos y las proteínas, tales que propicien cambios en la carga de superficie por ejemplo) y lo cual redunde en requerimientos diferentes en su purificación, como se observó en este trabajo.

Detección de la ATP_{asa} de la MP usando anticuerpos.

El anticuerpo obtenido a través de la haptización de un péptido antigénico usado en este trabajo, constituyó una herramienta confiable en la detección de la ATP_{asa} por las siguientes razones: a) responde a una secuencia conservada en tres especies de plantas no relacionadas cercanamente en su filogenia y es muy probable que esta secuencia se halle en la ATP_{asa} respectiva en maíz; b) reacciona con una sola banda en una preparación de vesículas de membrana plasmática de betabel, que contiene una ATP_{asa} de H⁺ P clásica, aunque no está secuenciada; c) no reacciona con la ATP_{asa} de *K. lactis*, la cual carece de

esta secuencia en la región NH₂-terminal; d) es improbable que reaccionará con otro tipo de ATPasas pues en la región NH₃-terminal considerada para diseñar al péptido antigénico hay solo un 25 % de secuencias conservadas en todas las ATPasas tipo P que transportan algún ión (Green y Stokes, 1992).

Sin embargo, este anticuerpo no serviría para detectar la ATPasa de la MP en los siguientes casos: a) en los que la enzima estuviera proteolizada en el amino terminal, y b) que hubiera formas de la enzima (isoenzimas) que tengan incompleta o carezcan de la secuencia antigénica. Aunque esto último es improbable ya que todas las secuencias deducidas de los diferentes genes que codifican para cada una de las isoformas de las ATPasas de tabaco, tomate y *Arabidopsis* presentan la secuencia que fue elegida en este trabajo para la obtención del anticuerpo.

Algo que no podemos explicar es el peso molecular de aparentemente 85 KDa de la banda que reacciona con el anticuerpo. Quizá esta proteína sea resultado de un corte proteolítico que deja a la enzima activa. Sin embargo, este comportamiento lo presentan tanto la enzima de betabel como la de maíz. El ver la reacción del anticuerpo contra una fracción pura de la ATPasa de 100 KDa, ayudaría a distinguir entre un corte proteolítico de la enzima o su migración anómala en el gel.

El análisis del perfil de detección de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática reveló varios puntos importantes:

- a) Que hay enzima en los embriones de la semilla seca. Sin embargo éstos por sí mismos no indican cuanta de esta enzima está en condiciones de ser activa.
- b) El que después de una hora de imbibición no se detecte el mismo nivel de enzima ,pero que éste aumente a la dos horas de imbibición sugiere una síntesis activa de la

enzima en el que el anticuerpo estaría detectando tanto la pre-existente como la sintetizada *de novo*. Hager et al (1992), encontraron que la vida media de la ATP_{asa} de MP de coleoptilos de maíz era de alrededor de 12 minutos. Asumiendo una vida media similar para la ATP_{asa} de los embriones, a las 2 horas habría aproximadamente el doble de la enzima que a la hora, lo cual es similar a lo que se detectó con los anticuerpos a las dos horas.

- c) La posterior caída de reactividad a los anticuerpos podría indicar una disminución en la síntesis *de novo* de la enzima combinada con un aumento en la degradación.

Todos estos datos se correlacionaron con los datos de la actividad enzimática como se ve a continuación.

Caracterización del patrón de la actividad hidrolítica de la ATP_{asa} de H⁺ de la membrana plasmática.

El análisis del perfil de la actividad de la ATP_{asa} de H⁺ de la MP combinado con los datos de inmunodetección de la enzima mostró discordancias en varios tiempos, por lo cual se proponen las siguientes interpretaciones:

a) Los embriones de la semilla seca contienen ATP_{asa} que puede ser activa. Este hecho es indicativo de la importancia que esta enzima tiene en el metabolismo celular, de manera que se preserva en estado funcional durante el período de desecación para asumir sus funciones fisiológicas apenas se inicia la germinación. Con ello se le puede considerar como una enzima "housekeeping", como ya han planteado Pérez et al (1992).

b) El drástico aumento en la actividad específica al cabo de una hora de imbibición sugeriría que se trata de un aumento en la síntesis de la enzima, sin embargo, los anticuerpos indican

que no hay aparición de sitios antigénicos. Esto puede interpretarse de varias formas: que haya un rearrreglo transitorio de la enzima en la membrana, favorecido por una reorganización de la estructura membranal por la mayor entrada de agua al tejido o que haya aparecido alguna molécula activadora de la enzima o que se esté sintetizando una nueva forma muy activa de la enzima en una proporción semejante a la de la enzima que se está degradando.

La primer explicación no es muy probable, pues se trataría de un cambio conformacional "accidental" que dependería de una modificación membranal transitoria; los datos indican que no hay una correlación directa entre la toma de agua de los embriones y la actividad de la enzima, ya que el embrión sigue captando agua después de este tiempo, mientras que la actividad de la enzima decrece.

La segunda explicación podría referirse a la aparición de algún tipo de compuestos, por ejemplo una auxina que se sabe que tienen un efecto activador sobre la enzima. Sin embargo, no hay antecedentes en la literatura para documentar esta posibilidad.

La tercer posibilidad se basa en el hecho de que se ha reportado la presencia de isoformas de la enzima en *Arabidopsis thaliana*, *Licopersicon esculentum* y *Nicotiana plumbaginifolia* que se presentan de manera mayoritaria y selectiva en ciertos tejidos o estadios de desarrollo de la planta (Ewing et al, 1990; Boutry et al, 1989; Dewitt et al, 1991; Pérez et al, 1992). Para el caso de las isoformas PMA1, PMA2 y PMA3 de *A. thaliana* que fueron sobreexpresadas en *S. cereviseae* se encontró que difieren en la Km por ATP, la activación por fosfatidilcolina, la cantidad de la enzima presente en la membrana y la concentración de Na_2VO_4 para lograr su inhibición total (Palmgren y Christensen, en prensa), por lo cual es posible que se encontrara alguna o varias isoformas de la enzima en el transcurso de la germinación.

Es muy interesante que un pico semejante de actividad en la primera hora de imbibición se ha reportado en la ATPasa mitocondrial, también durante la imbibición de embriones de maíz (Ehrenshaft y Brambl, 1990). La coincidencia sugiere que éste puede ser un período crítico para el metabolismo energético dentro de las fases tempranas de la imbibición, independientemente de los mecanismos moleculares implicados.

c) A las dos horas hubo una disminución de la actividad de la enzima, si bien se había detectado mayor cantidad de proteína con el anticuerpo. Es probable que esto se debiera a uno o varios de los siguientes factores: a que la enzima que se está sintetizando no esté bien integrada en la membrana o no toda logra integrarse, a que la enzima es menos activa por la presencia de algún factor que esté suprimiendo su actividad o a que haya síntesis predominante de una o varias isoformas con actividades más bajas que las de las que se encontraban anteriormente.

d) A las 4 horas se inicia una disminución de la actividad y esto posiblemente se debe a que hubo una degradación de la enzima, ya que hubo menos proteína detectada por el anticuerpo, si bien también queda la posibilidad de que el tipo de enzima que va degradándose es una isoforma muy activa y la que está sintetizándose y formando gradualmente la población total es una menos activa.

e) En los tiempos finales estudiados, los patrones de actividad y de presencia de la enzima se hacen paralelos, como si el tiempo transcurrido fuera de intenso ajuste y se llegara paulatinamente a una situación en donde los factores implicados en la regulación de la actividad se hacen menos o más.

Como se puede apreciar, la dinámica del sistema es muy complejo por la multitud de factores que pueden combinarse e ir cambiando sus contribuciones en el transcurso de la germinación.

Algunos experimentos que proporcionarían información que descartaría o reforzaría algunas posibilidades serían:

A) **Biosíntesis de novo.**- La medición de la síntesis de la enzima en los embriones con diferentes tiempos de imbibición usando marcaje con metionina-³⁵S y con la inmunoprecipitación específica podría dar la información de a qué tiempo comienza la síntesis de la enzima y cuál es la contribución de la síntesis de novo a cada tiempo. La adición de cicloheximida después de la síntesis de la enzima nos diría cual es la vida media de la enzima sintetizada.

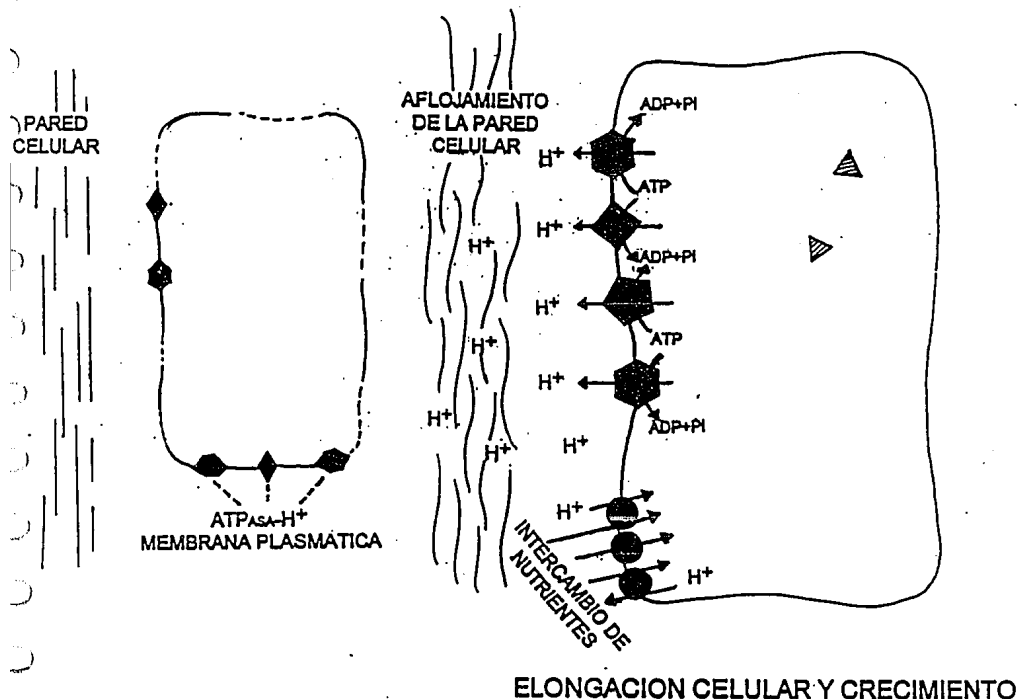
B) **Detección de isoformas.**- Con ayuda de las sondas que se tienen para las isoformas detectadas en tabaco, tomate o *Arabidopsis* sería posible encontrar alguna o varias de las isoformas, si es que las hay en los embriones de maíz y determinar si estas isoformas se encuentran presentes cuantitativa o diferencialmente en uno u otro estado de imbibición de los embriones. Además sería factible, identificar las isoformas de los embriones por clonación de las familias de genes, sobreexpresar las enzimas en levadura como lo realizó Palmgren para las isoformas de *A. thaliana*, y entonces realizar un estudio cinético en las isoformas de los embriones de maíz para evaluar sus diferencias con respecto a su papel fisiológico en la germinación de los embriones de maíz.

Con los datos disponibles se propone el siguiente modelo del papel de la enzima en la germinación de embriones de maíz. Al encontrarse la semilla en estado seco, los sistemas membranales de las células del embrión estarían desorganizados y sus componentes se encontrarían embebidos en ellas tal vez con una estructura inadecuada para su actividad, dentro de estos componentes estaría incluida la ATPasa-H⁺ de la MP como una o varias isoformas. Cuando el agua entra a la célula, la membrana

empezaría a organizarse, se activarían las enzimas celulares y membranales y aparecería entre otros compuestos reguladores del crecimiento. La ATP_{asa-H^+} de la MP se "acomodaría" en la membrana y comenzaría sus actividades de hidrólisis de ATP y de bombeo de protones hacia el apoplasto, con lo cual acidifica los componentes de la pared celular, promoviendo su aflojamiento por una parte y por otra produciendo el gradiente electroquímico de H^+ a través de la membrana, el cual es usado para el transporte de aminoácidos, azúcares y iones para la nutrición celular. Con ello se facilitarían dos requerimientos esenciales para el crecimiento de las células de la radícula, con cuya salida la semilla queda calificada como germinada.

CELULA EMBRIONARIA
(de semilla seca)

CELULA EMBRIONARIA
(de semilla embebida)



ELONGACION CELULAR Y CRECIMIENTO

Fig. 24 Modelo del papel de la H^+ -ATPase de la membrana plasmática en la germinación de embriones de maíz.

CONCLUSIONES

1. La $ATP_{asa}-H^+$ de la membrana plasmática se encuentra presente en los embriones secos, detectada tanto por actividad como por proteína.

2. El perfil de la $ATP_{asa}-H^+$ de la membrana plasmática detectada por anticuerpos a los diferentes tiempos de imbibición de los embriones es similar a la de la actividad de hidrólisis de ATP de la enzima, si bien el pico máximo de actividad precede al de la enzima.

Las diferencias entre los patrones de actividad y proteínas de la ATP_{asa} durante la imbibición del embrión podrían explicarse por:

- a) Balance total entre las diferentes velocidades de biosíntesis y degradación de la enzima.
- b) Síntesis diferencial de isoformas.
- c) Efecto de elementos reguladores que aparecen en ciertos tiempos de la germinación.
- d) Combinaciones de los factores anteriores.

3. El hecho de haber encontrado a la ATP_{asa} de H^+ de la membrana plasmática desde el inicio de la germinación, inclusive en el embrión de la semilla seca, indica que esta enzima es muy importante en el proceso debido muy probablemente a las funciones que desempeña en la nutrición y el crecimiento celular.

BIBLIOGRAFIA

Amodeo G., Srivastava A. y Zeiger E. 1992. Vanadate inhibits blue light-stimulated swelling of *Vicia* guard cell protoplasts. *Plant Physiol.* 100: 1567-1570.

Attucci S., Carde J. P., Raymond P., Saint-Gès V., Spiteri A. y Pradet A. 1991. Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. *Plant Physiol.* 95: 390-398.

Barr R. 1991. The possible role of redox-associated protons in growth of plant cells. *J. Bioerg. Biomem.* 23(3): 443-467.

Bewley J. D. 1986. Membrane changes in seeds as related to germination and the perturbations resulting from deterioration in storage. *Physiology of seed deterioration in Crop Science Society of America. CSSA Spec. Pub. (11). Madison, USA.*

Bewley J. D. y Black M. 1978. *Physiology and biochemistry of seeds. VI. Development, germination and growth.* Springer-Verlag.

Bewley J. D. y Black M. 1986. *Physiology and biochemistry of seeds. VI. Development, germination and growth.* Springer-Verlag.

Briskin D. P. y Hanson J. B. 1992. How does the plant plasma membrane H^+ -ATPase pump protons?. *J. Exp. Bot.* 43 (248): 269-289.

Briskin D. P., Leonard R. T. y Hodges T. K. 1987. Isolation of the plasma membrane: Membrane markers and general principles. *Methods Enzymol.* 148: 542-558.

Briskin, D. P. y Reynolds-Niesman I. 1991. Determination of H^+ /ATPase stoichiometry for the plasma membrane H^+ -ATPase from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiol.* 95: 242-250.

Briskin D. P., Thornley W. R. y Roti-Roti J.L. 1985. Target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase. *Plant Physiol.* 78: 642-644.

Boutry M., Michelet, B. y Goffeau A. 1989. Molecular cloning of a family of genes encoding a protein homologous to plasma membrane H⁺-translocating ATPases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 567-574.

Buckout T. J. 1989. Sucrose transport in isolated plasma-membrane vesicles from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Evidence for an electrogenic sucrose-proton symport. *Planta* 178: 393-399.

Calera Medina M. R. 1992. Efecto de la resina glicosídica de *Ipomoea tricolor* sobre la actividad de la ATPase de H⁺ de la membrana plasmática de radícula de *Echinocloa crusgalli*. Tesis de Maestría, Fac. de Química, UNAM. México.

Cleland, R. E. 1976. Kinetics of hormone-induced H⁺ excretion. *Plant Physiol.* 58: 210-213.

Cocucci M. C. y Marré E. 1991. Co-sedimentation of one form of plasma membrane H⁺/ATPase and of the fusicoccin receptor from radish microsomes. *Plant Sci.* 73: 45-54.

Cruz Ortega R., Anaya A. L., Gavilanes-Ruiz M., Sánchez-Nieto S. y Jiménez Estrada M. 1990. Effect of diacetyl piquerol on H⁺-ATPase activity of microsomes from *Ipomoea purpurea* J. Chem. Eco. 16 (7): 2253-2261.

Ching, T. M. 1978. Metabolism of germinating seed. En: *Seed Biology*. T. T. Kozlowski (Ed.). Vol. II. Academic Press, Inc. New York.

De Lisle, R. C. 1991. A quantitative dot-blot immunoassay for integral membrane proteins: Preparation of pancreatic plasma membranes containing apical and basolateral domains. *Anal. Biochem.* 192: 1-5.

De Michelis M. I., Pugliarello M. Ch., Olivari C. y Rasi-Caldogno F. 1990. On the mechanism of FC-induced activation of the plasma membrane H^+ -ATPase. En: *Plant membrane transport: the current position.* Pág. 373-378.

De Michelis M. I., Rasi-Caldogno F., Pugliarello M. Ch. y Olivari C. 1991. Fusicoccin binding to its plasma membrane receptor and the activation of the plasma membrane H^+ -ATPase. II. Stimulation of the H^+ -ATPase in a plasma membrane fraction purified by phase-partitioning. *Bot Acta* 4: 257-344.

DeWitt N. D., Harper J. F. y Sussman M. R. 1991. *Plant J.* 1: 121-128.

Ehrenshaft M. y Brambl R.. 1990. Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of Maize. *Plant Physiol.* 93: 295-304.

Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plants.* John Willey & Sons N. Y.

Ewing N. N., Wimmers L. E., Meyer D. J., Chetelat R. T. y Bennett A. 1990. Molecular cloning of Tomato plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant Physiol.* 94: 1874-1881.

Faraday Ch. D. y Spanswick R. M. 1992. Maize root plasma membranes isolated by aqueous polymer two-phase partitioning: Assessment of residual tonoplast ATPase and pyrophosphatase activities. *J. Exp. Bot.* 43 (257): 1583-1590.

Felle H. y Johannes E. 1990. The regulation of proton/amino acid symport in *Riccia fluitans* L. by cytosolic pH and proton

pump activity J. Exp. Bot. 41(226): 587-592.

Gallager S. R. y Leonard R. T. 1982. Effect of vanadate, molybdate and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots. Plant Physiol. 70: 1335-1340.

García-Rubio O. R. 1993. Aparición de dos ATPasas de H^+ en ejes embrionarios y embriones en germinación. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala, UNAM, México (En prensa).

González-Romo P., Sánchez-Nieto S. y Gavilanes Ruíz M. 1992. A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentration. Anal. Biochem. 200: 235-238.

Green N. M. and Stokes D. L. 1992. Structural modelling of P-type ion pumps. Acta Physiol. Scand. 146: 59-68.

Grouzis J. P., Gibrat R., Rigaud J. Grignon C. 1987. Study of sidedness and tightness to H^+ of corn root plasmalemma vesicles: preparation of a fraction enriched in inside-out vesicles. Biochim. Biophys. Acta 903: 449-464.

Hager A., Debus G., Edel H-G., Stransky H. y Serrano R. 1991. Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma membrane H^+ -ATPase. Planta 185: 527-537.

Harper J. F., Surowy T. K. y Sussman M. R. 1989. Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the plasma membrane proton pump (H^+ -ATPase) of *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1234-1238.

Hill S. A., Grof Ch. P.L., Bryce J. H. y Leaver Ch. J. 1992. Regulation of mitochondrial function and biogenesis in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledons during early seedling growth.

Plant Sci. 99: 60-66.

Hodges T.K., Leonard R.T., Bracker C. E., Keenan, T.W. 1972. Purification of an ion-stimulated ATPase from plant roots: Association with plasma membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 3307-3311.

Hodges T. K. and Mills D. 1986. Isolation of plasma membrane. Methods Enzymol. 118: 41-54.

Hopp T. 1985. En: Synthetic peptides in Biology and Medicine. Alitalo K., Partanen P. y Vaeri A. (Eds.). Elsevier Science Publ. Amsterdam. Pág. 3-12.

Humphreys T. E. 1987. Sucrose efflux and export from maize scutellum. Plant Cell Environ. 10: 259-266.

Humphreys T. E. 1988. Anomalous kinetics of sucrose uptake in maize scutellum slices. Plant Cell Environ. 11: 525-534.

Larsson C., Kjellbom P., Widell S. T Lundborg T. 1984. Sidedness of plant plasma membrane vesicles purified by partitioning in aqueous two-phase systems. FEBS 171(2): 271-276.

Larsson C., Widell S. y Kejjellbom P. 1987. Preparation of high-purity plasma membranes. Methods Enzymol. 148: 558-568.

Laemli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lemoine R. y Deltrot 1989. Proton-motive force driven sucrose uptake in sugar beet plasma membrane vesicles. FEBS 249 (1): 129-133.

Lew R. R. 1991. Electrogenic transport properties of growing *Arabidopsis* root hairs. The plasma membrane proton pump and potassium channels. Plant Physiol. 97: 1527-1534.

Liß H., Siebers B., Weiler E. W. 1991. Characterization, functional reconstitution and activation by fusicoccin of a Ca^{2+} -ATPase from *Corydalis sempervirens* Pers. cell suspension cultures. *Plant Cell Physiol.* 32 (7): 1049-1056.

Lindsey K. Topping J. F. 1993. Embryogenesis: A question of Pattern. *J. Exp. Bot.* 44(259): 359-374.

Linnemeyer P. A., Volkenburg E. U. y Cleland R. E. 1990. Characterization and effect of light on the plasma membrane H^{+} -ATPase of Bean Leaves. *Plant Physiol.* 94: 1671-1676.

Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. y Randal R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Marrè M. T., Albergoni F. G. Moroni A. y Marrè E. 1989a. Light-induced activation of electrogenic H^{+} extrusion and K^{+} uptake in *Elodea densa* depends on photosynthesis and is mediated by the plasma membrane H^{+} -ATPase. *J. Exp. Bot.* 40 (212) 343-352.

Marrè M. T., Albergoni F. G. Moroni A. y Plugariello M. Ch. 1989b. Evidence that H^{+} -extrusion in *Elodea densa* leaves is mediated by ATP-driven H^{+} pump. *Plant Sci.* 62: 21-28.

Niembro A. 1988. Semillas de árboles y arbustos. Ontogenia y estructura. Edit Limusa S. A. de C. V. México.

Palmgren M. G., Askerlund P., Fredrikson K., Widell S., Sommarin M. y Larsson Ch. 1990. Sealed inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.* 92: 871-880.

Palmgren M. G. y Chistensen G. 1993 (En prensa). Functional comparisons between plant plasma membrane H^{+} -ATPase isoforms expressed in yeast. *J. Biol. Chem.*

Palmgren M. G., Somarin M. Serrano R. y Larsson Ch. 1991. Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plasma membrane H^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 266 (30): 20470-20475.

Pardo J. M. y Serrano R. 1989. Structure of plasma membrane H^+ -ATPase gene from the plant *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 254 (15): 8557-8562.

Parets-Soler A., Pardo J. M. y Serrano R. 1990. Immunocytolocalization of plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant Physiol.* 93: 1654-1658.

Pérez Ch., Michelet B., Ferrant V., Bogarts P. y Boutry M. 1992. Differential expression within a three gene subfamily encoding a plasma membrane H^+ -ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *J. Biol. Chem.* 267 (2): 1204-1211.

Puntarulo S., Beconi M. T., Sánchez R. A. y Boveris A. 1987. Oxidative activities in soybean embryonic axes during germination. *Plant Sci.* 52: 33-39.

Puntarulo S. y Boveris A. 1990. Effect of natural and accelerated aging on the hydroperoxide metabolism of soybean embryonic axes. *Plant Sci.* 68: 27-32.

Reynolds E.S. 1963. *J. Cell Biol.* 17:209-215.

Ros R., Cook D. T., Martínez-Cortina C. y Picazo I. 1992. Nickel and cadmium related changes in growth, plasma membrane lipid composition, ATPase hydrolytic activity and proton pumping of rice (*Oryza sativa* L. CV Bahia) shoots. *J. Exp. Bpt.* 43 (256): 1475-1481.

Sánchez Luna V. N. 1993. Aislamiento de ATPasa-H⁺ de membrana plasmática de raíz de trigo y su detección por anticuerpos específicos. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias, UNAM, México.

Sánchez-Nieto S., Rodríguez-Sotres R., González-Romo P, Bernal-Lugo I. y Gavilanes-Ruiz M. 1992. Tonoplast and plasma membrane ATPases from maize lines of high or low vigour. Seed Sci. Res. 2: 105-111.

Sandstrom R. P. y Cleland R. E 1989. Selective delipidation of the plasma membrane by surfactants. Plant Physiol. 90: 1524-1531.

Sze H. 1985. H⁺-translocating ATPases: Advances using membrane vesicles. Ann. Rev. Plant Physiol. 36: 175-208.

Serrano R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 61-94.

Serrano R. 1990. Recent molecular approaches to the physiology of the plasma membrane proton pump. Bot. Acta 103 (3): 230-234.

Serrano R., Montesinos C. y Sánchez J, 1988. Lipid requirements of the plasma membrane ATPases from oat roots and yeast. Plant Sci. 56: 117-122.

Serrano R. y Portillo F. 1990. Catalytic and regulatory sites of yeast plasma membrane H⁺-ATPase studied by directed mutagenesis. Biochim. Biophys. Acta 1018: 195-199.

Serrano R., Portillo F., Monk B. C. y Palmgren M. G. 1992. The regulatory domain of fungal and plant plasma membrane H⁺-ATPase. Acta Physiol Scand. 146: 131-136.

Shiraishi T., Araki M., Yoshioka H., Kobayashi I., Ymada T., Ichinose Y., Kunch H, y Oku H. 1991. Inhibition of ATPase activity in pea plasma membranes *in situ* by a suppressor from pea pathogen, *Mychosphaerella pinodes*. Plant Cell Physiol. 32 (7): 1067-1075.

Slayman C.L. 1992. Molecular correlates of physiological regulation in a P-type H⁺ ATPase. Acta Physiol. Scand. 146: 137-140.

Stokes D. L. 1991. P-type ion pumps: structure determination may soon catch up with structure prediction. Curr. Opin. Struct. Biol. 1: 555-561.

Sussman M. R. y Harper J. F. 1989. Molecular biology of the plasma membrane of higher plants. Plant cell 1: 953-960.

Surowy T. K. y Sussman M. R. 1985. Immunological cross-reactivity and inhibitor sensitivities of the plasma membrane H⁺-ATPase from plants and fungi. Biochim. Biophys. Acta 848: 24-34.

Tobwin H., Stachelin T. y Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (9): 4350-4354.

Trofimova M. S. 1992. Proton-ATPase in plasmalemma as a component of cytosolic pH-stat in isolated protoplasts. Fiz. Ras. 39 (1): 5-14.

Vara F. y Serrano R. 1983. Phosphorylated intermediate of the ATPase of plant plasma membranes. J. Biol. Chem. 257: 5334-5336.

Villalba J. M., Lützelshwab M. y Serrano R. 1991. Immunocytolocalization of plasma membrane H⁺ ATPase in maize

coleoptiles and enclosed leaves. 185: 458-461.

Villalba J. M., Palmgren M. G., Berberían G. E., Ferguson Ch. y Serrano 1992. Functional expression of plant plasma membrane H^+ ATPase in yeast endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 267 (17): 12341-12349.

Villiers T. A. 1978. Seed dormancy. En: Seed Biology. T. T. Kozlowski (Ed.). Vol. II. Academic Press, Inc. New York.

Wach A., Schlessner A. y Goffeau A. 1992. An alignment of 17 deduced protein sequences from plant, fungi y ciliate H^+ -ATPase genes. J. Bioenerg. Biomem. 24 (3) 309-317.

Zocchi G. 1985. Phosphorylation-dephosphorylation of membrane protein controls de microsomal H^+ -ATPase activity of corn roots. Plant Sci. 40: 153-159.