

27
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE MEMBRANA
PLASMATICA DE CAPA DE ALEURONA DE CEBADA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C A

P R E S E N T A :

VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA



MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Presidente: Prof. Raúl Aguilar Caballero
Vocal: Prof. Homero Hernández Montes
Secretario: Prof. Irma Ofelia Bernal Lugo
1er. Suplente: Prof. Luz del Carmen Castellanos Román
2do. Suplente: Prof. José Juan Zúñiga Aguilar

Síto donde se desarrolló el tema: Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

Asesor del Tema:

Irma Ofelia Bernal Lugo
Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo

Sustentante:

Vanessa Rebeca Maya Ampudia
Vanessa Rebeca Maya Ampudia

Dedicatoria

A mi mamá, Irma
A mi papá, Pepe

Agradecimientos

A mi papá, Ade, Claudia y Mau, por siempre estar conmigo.

A Pame, por su alegría.

A la Dra. Irma Bernal, por todo lo que he aprendido de ella, por su confianza, apoyo y entusiasmo en todo momento.

Al jurado M. en C. Raúl Aguilar Caballero, Dr. Homero Hernández Montes, M. en C. Luz del Carmen Castellanos Román y M. en C. José Juan Zúñiga Aguilar, por el tiempo dedicado y los valiosos comentarios realizados durante la revisión de este trabajo.

A la Dra. Marina Gavilanes por todo su apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Jorge Vázquez por su apoyo a este trabajo.

A Sobeida, por toda su paciencia y disposición a ayudarme siempre.

A Adriana, por demostrarme que a los veintitrés todavía se encuentran excelentes amigos.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio 104: Oscar, Alicia, Coco, Edi, Paty, Rebeca, Enrique, Chelo, Nora y Luis.

A mis amigos, "los Químicos": Fernando, Dara, Juan Pablo, Luis Miguel, Kira, Yuri, Vanesaa, César, Gerardo.

Agradecimientos

A Carolina, por muchos años de amistad.

A Tula, por su apoyo, cariño y confianza de siempre, por su sonrisa mañanera y por compartir conmigo el gusto de hacer este trabajo.

A Chepe, por su apoyo y ayuda incondicional, por estar conmigo de principio a fin, por la Bioquímica que tuvo que aprender; pero sobre todo, por todo lo que somos, tenemos y compartimos.

A la Universidad por darme la oportunidad de formar parte de ella.

Índice General

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	6
2.1. Objetivo general	6
2.2. Objetivos particulares	6
3. ANTECEDENTES	8
3.1. Auxinas	10
3.2. Citoquininas	12
3.3. Etileno	13
3.4. Ácido abscísico	13
3.5. Ácido jasmónico	15
3.6. Giberelinas	18
3.7. La Capa de Aleurona	22
3.7.1. Regulación de la síntesis de α -amilasa por AG_3	24
3.7.2. Percepción y transducción celular del AG_3	29
3.7.3. Percepción del estímulo	29
3.7.4. Transducción de la señal hormonal	31
3.7.5. El calcio en la capa de aleurona	34
4. MATERIALES Y MÉTODOS	38
4.1. Material biológico	38
4.2. Preparación de las semillas	38
4.3. Obtención de las capas de aleurona	39
4.4. Aislamiento de membranas	39
4.4.1. Preparación del tejido	39
4.4.2. Obtención del Homogenado sin fracción nuclear	40
4.4.3. Obtención de vesículas de membrana plasmática por el método de reparto en un sistema de polímeros en dos fases	40
4.5. Determinación de proteína	42
4.6. Ensayos enzimáticos	43
4.6.1. ATPasas	43

Índice General

4.6.2. Citocromo C reductasa como marcador de membrana de retículo endoplásmico	44
4.6.3. Citocromo C oxidasa como marcador de membrana mitocondrial	47
4.6.4. Glucán sintetasa II (GSII) como marcador de membrana plasmática	50
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
5.1. Selección de la concentración óptima de los polímeros en el sistema de reparto de fases	54
5.2. Determinación de la cantidad óptima de proteína a cargar en el sistema de fases	56
5.3. Rendimiento del aislamiento de las vesículas membranales	58
5.4. Actividad de ATPasas como marcadoras de membrana	59
5.5. Distribución de las enzimas marcadoras de membrana mitocondrial, retículo endoplásmico y plasmática en las diferentes fracciones del reparto de fases	69
6. CONCLUSIONES	74
7. BIBLIOGRAFÍA	77

Índice de Tablas

Tabla 3.1.	Efectos principales causados por los diferentes tipos de fitorreguladores.....	19
Tabla 3.2.	Principales efectos causados por las giberelinas a nivel planta y celular.....	20
Tabla 4.1.	Componentes para la elaboración del sistema de fases.....	40
Tabla 4.2.	Cantidades requeridas de los diferentes componentes para la elaboración de los sistemas de fases de diferente concentración de polímeros.....	41
Tabla 4.3.	Concentraciones de inhibidores específicos de enzimas con actividad de hidrólisis de ATP.....	44
Tabla 4.4.	Concentraciones finales de los componentes del medio de reacción para determinar la actividad de la citocromo C reductasa.....	47
Tabla 4.5.	Concentraciones finales de los componentes del medio de reacción para determinar la actividad de la citocromo C oxidasa.....	49
Tabla 4.6.	Concentraciones finales de los componentes del medio de reacción para determinar la actividad de la glucán sintetasa.....	51
Tabla 5.1.	Efecto de la variación de la concentración de los polímeros en la recuperación de proteína en FS.....	56
Tabla 5.2.	Efecto de la concentración final de K^+ y Cl^- en la eficiencia de reparto y recuperación de proteína membranar.....	58
Tabla 5.3.	Recuperación y distribución de la proteína después del reparto de fases.....	59
Tabla 5.4.	Determinación de la actividad de ATPasas de las diferentes membranas en FS.....	60
Tabla 5.5.	Efecto de la variación en las concentraciones de los inhibidores en la actividad de las diferentes ATPasas en la fracción H-N.....	61
Tabla 5.6.	Distribución y recuperación de proteína y actividad de ATPasa durante el proceso de purificación.....	62
Tabla 5.7.	Determinación del tipo de membranas y su abundancia en cada fracción del sistema de fases.....	64
Tabla 5.8.	Abundancia de ATPasas en FS.....	65
Tabla 5.9.	Determinación de la actividad de ATPasas de las diferentes membranas en la fracción FS ₂	66

Índice de Tablas

Tabla 5.10. Distribución de las enzimas marcadoras de membrana mitocondrial en las diferentes fracciones del reparto de fases	70
Tabla 5.11. Distribución de las enzimas marcadoras de membrana de retículo endoplásmico en las diferentes fracciones del reparto de fases.....	71
Tabla 5.12. Distribución de las enzimas marcadoras de membrana plasmática en las diferentes fracciones del reparto de fases.....	72
Tabla 5.13. Distribución de la actividad de los diferentes marcadores de membrana con respecto a la fracción H-N.....	72

Índice de Figuras

Figura 3.1. Vías de biosíntesis de auxinas a partir de triptofano.....	11
Figura 3.2. Cinetina y tres de sus análogos.....	12
Figura 3.3. Biosíntesis del etileno.....	14
Figura 3.4. Ácido abscísico.....	15
Figura 3.5. Biosíntesis y estructura del ácido jasmónico.....	17
Figura 3.6. Estructura de algunas giberelinas.....	20
Figura 3.7. Biosíntesis de giberelinas a partir de acetato.....	22
Figura 3.8. La capa de aleurona.....	25
Figura 4.1. Efecto de la variación de la concentración de citocromo C oxidado en la actividad de la citocromo C reductasa.....	45
Figura 4.2. Variación de la cantidad de proteína de la fracción H-N para la actividad de la citocromo C reductasa.....	46
Figura 4.3. Efecto de la variación de la concentración de citocromo C reducido en la actividad de la citocromo C oxidasa.....	48
Figura 4.4. Variación de la cantidad de proteína de la fracción H-N para la actividad de la citocromo C oxidasa.....	49
Figura 4.5. Variación de la cantidad de proteína de la fracción FS en la actividad de la glucán sintetasa II.....	53
Figura 5.1. Efecto de la proteína cargada en el sistema de fases en la eficiencia de la recuperación membranal. El sistema de fases fue de 2.7 g y se ajustó a un peso de 3.6 g con proteína de la fracción cruda (H-N).....	57

RESUMEN

La capa de aleurona de la semilla de cebada secreta una variedad de enzimas hidrolíticas, principalmente α -amilasa, que degradan el endospermo almidonoso durante la germinación. La síntesis y secreción de la α -amilasa son inducidas por el ácido giberélico e inhibidas por el ácido abscísico. Los efectos de estos fitorreguladores se manifiestan como cambios en la velocidad de transcripción de los genes que codifican para esta enzima, así como en la velocidad de síntesis y secreción de proteínas. Sin embargo, el mecanismo de percepción hormonal, recepción del estímulo y transducción de la señal no se conocen todavía. Existe evidencia de que la percepción del ácido giberélico en protoplastos de capa de aleurona de cebada se lleva a cabo a través de la membrana plasmática, por lo que es necesario contar con una metodología de aislamiento y purificación de esta membrana para poder realizar los estudios

moleculares que conduzcan al esclarecimiento del mecanismo de la percepción del AG₃ y la transducción de la señal en este tejido.

El objetivo de este trabajo fue optimizar las técnicas de aislamiento y purificación de la membrana plasmática de la capa de aleurona de cebada. La metodología utilizada fue el reparto en dos fases de polímeros. En este sistema, constituido de polietilenglicol (PEG) y dextrán, la membrana plasmática contenida en un homogenado celular se distribuye de manera preferencial en la fase superior del sistema. Las concentraciones de polímeros, así como la cantidad de proteína cargada al sistema fueron variadas para determinar las concentraciones óptimas que permitieran obtener el mejor rendimiento en cuanto a recuperación y pureza de membranas. Se detectó que la mayor recuperación de membrana plasmática en la fase superior del sistema, FS, (medida como cantidad de proteína por el método de Lowry-Peterson) se obtuvo con una relación de 6.5%/6.5% de PEG/Dextrán. La identificación de los tipos de membrana presentes en las diferentes fases del sistema, así como en el homogenado sin núcleos, se realizó inicialmente midiendo la actividad de hidrólisis de fosfatos de distintas ATPasas y fosfatasa. Los resultados obtenidos con esta metodología no resultaron reproducibles, y por tanto se utilizaron otras enzimas marcadoras de membrana previa optimización de sus ensayos. Las enzimas marcadoras utilizadas fueron la citocromo C oxidasa (membrana mitocondrial), la citocromo C reductasa (retículo endoplásmico) y la glucán sintetasa II (membrana plasmática). Los resultados de tales experimentos indican que la fase superior del sistema contiene principalmente a la membrana plasmática.

1. INTRODUCCIÓN

Las giberelinas son una clase de hormonas vegetales que producen cambios profundos y diversos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La química y metabolismo de estos compuestos han sido estudiados por varias décadas, lo que ha llevado a comprender las vías involucradas en su biosíntesis y catabolismo. Para entender los mecanismos de percepción y acción de las giberelinas, muchos estudios han tomado como sistema modelo la capa de aleurona de cereales. Durante los últimos años, se ha acumulado evidencia sobre el sitio de percepción del ácido giberélico, así como también se han desarrollado nuevas técnicas para identificar posibles receptores para este fitorregulador. El conocimiento de los eventos regulados por el ácido giberélico en las células de aleurona han avanzado a través de diferentes enfoques como lo son la genética molecular, la biología celular, la electrofisiología y la

bioquímica (Gilroy, 1994). Esto ha permitido encontrar una gran diversidad de procesos regulados por esta fitohormona en diferentes tejidos vegetales. Estos procesos varían desde la modulación de la actividad de canales iónicos, hasta la regulación de la expresión génica. A pesar de la existencia de trabajos prometedores para dilucidar los mecanismos moleculares por los que las giberelinas desatan esta gran variedad de eventos celulares en las plantas, la comprensión de las vías de percepción-transducción-respuesta aún permanece en sus primeras etapas (Hooley, 1994).

Las células de la capa de aleurona de los cereales conforman un tejido altamente especializado que se diferencia de las células del endospermo periférico durante el desarrollo y forman una capa de una a tres células de grosor que envuelve al endospermo almidonoso. Justo después de la germinación de la semilla, las células de la aleurona empiezan a sintetizar y secretar diversas enzimas hidrolíticas responsables de la degradación del almidón y proteínas de reserva del endospermo para proveer a la plántula de nutrientes. Esta movilización de las reservas está regulada por el ácido giberélico.

Las células de aleurona aisladas responden a la adición de AG_3 sintetizando y secretando al medio las enzimas hidrolíticas que participan en la movilización de reservas. En este sistema, la α -amilasa constituye el 60% del total de enzimas sintetizadas *de novo*. Por lo que la regulación por ácido giberélico de la expresión génica en las células de aleurona es, probablemente, la respuesta más extensamente estudiada en relación al mecanismo de acción del AG_3 .

Existe evidencia indicando que la percepción de este fitoregulador en las células de la capa de aleurona se lleva a cabo a través de la membrana plasmática. Dado que las células de este tejido son altamente sensibles al ácido

giberélico, es factible pensar que este tejido podría ser una fuente importante de un posible receptor de membrana (Hooley, 1994). Asimismo, el contar con preparaciones de membrana plasmática pura de estas células abre muchos posibles caminos de investigación que nos permitirían dilucidar diferentes aspectos en la vía de percepción, transducción y/o respuesta.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Adaptar y optimizar la metodología de reparto en dos fases de polímeros, al aislamiento y purificación de membrana plasmática de células de capa de aleurona de cebada.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la concentración de polímeros en el sistema de fases para que la membrana plasmática de la aleurona se distribuya de manera preferencial hacia una de las fases.

- Determinar la pureza de la fracción de membrana plasmática, utilizando enzimas marcadoras para cada tipo membranar.
- Estandarizar las metodologías de las enzimas marcadoras de diversos tipos de membranas (citocromo C oxidasa, citocromo C reductasa, ATPasa, glucán sintetasa II).

3. ANTECEDENTES

Dentro de los aspectos más interesantes sobre los seres vivos está su capacidad para crecer y desarrollarse. La síntesis continua de moléculas complejas a partir de otras más sencillas, lleva al organismo a tener no sólo células más grandes sino más elaboradas. Las células de una planta no crecen ni se desarrollan de la misma manera, por lo que una planta adulta tiene en su estructura diferentes tipos de células. El proceso mediante el cual las células de una planta se especializan se denomina diferenciación, así como el proceso por el cual las células crecen y se caracterizan como parte de un tejido u órgano se llama desarrollo.

En la actualidad sabemos que la síntesis de enzimas es regida por los genes. Éstos de alguna manera controlan el funcionamiento de las células y por

tanto contribuyen a su crecimiento y desarrollo. Sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos que controlan y regulan el cuándo y cómo se deben transcribir estos genes, según los requerimientos de los diferentes tipos de células y de la planta en general.

Poco después del inicio de este siglo, hemos podido aprender mucho sobre lo que sucede durante el crecimiento y desarrollo de las plantas. A lo largo de este tiempo se ha podido establecer que el desarrollo de las plantas puede ser modificado importantemente por diversos factores ambientales, como lo son la luz y la temperatura. Asimismo, se ha incursionado en el estudio de la mecánica por la cual la planta logra una comunicación integral entre sus células, tejidos y órganos. A la fecha, sabemos que esta red de comunicación se establece a través de diversos mensajeros químicos, que a través de muchos estudios han podido ser relacionados con varios procesos involucrados con el crecimiento.

Con base en lo que se conocía sobre las características y el funcionamiento de las hormonas animales, los mensajeros químicos vegetales fueron llamados fitohormonas u hormonas vegetales y definidos como sustancias orgánicas producidas en una región específica de la planta, y transportadas a otra donde en muy pequeña concentración son capaces de generar y regular una o varias respuestas fisiológicas. Sin embargo, se ha encontrado que esta definición no es del todo adecuada; ya que se ha observado que los mensajeros químicos en las plantas no se sintetizan exclusivamente en tejidos específicos sino en casi todas sus estructuras en diferentes proporciones, dependiendo de los requerimientos del tejido donde se producen y de la planta en general. Por ello, actualmente, estas sustancias que cumplen con la función de transmitir señales específicas a lo largo de la planta se han denominado fitorreguladores.

Hasta el momento se han caracterizado seis tipos de fitorreguladores que intervienen en diferentes procesos de crecimiento y desarrollo:

1. Las auxinas.
2. Las citoquininas.
3. El etileno.
4. El ácido abscísico.
5. El ácido jasmónico.
6. Las giberelinas.

A continuación se describen las características generales de cada grupo (Devlin & Witham, 1983).

3.1. AUXINAS

Las auxinas fueron descubiertas en 1926, como compuestos no identificados que provocaban la orientación de coleoptilos de avena hacia la luz. Ahora esta sustancia se conoce como ácido indolacético (IAA) y se ha encontrado en muchas plantas superiores.

Existen algunos compuestos que producen los mismos efectos que el IAA como el ácido fenilacético. Otras sustancias tienen considerable actividad como auxinas, tal como el indoletanol, el indolacetaldehído y el indolacetonitrilo, más esto se debe al hecho de que pueden ser transformadas a IAA en la planta.

Se conocen dos mecanismos de síntesis del IAA que parten del triptofano e involucran la eliminación de los grupos amino y carboxilo de la cadena lateral de este aminoácido (Figura 3.1).

Existen también en la célula dos formas de eliminar las auxinas en el

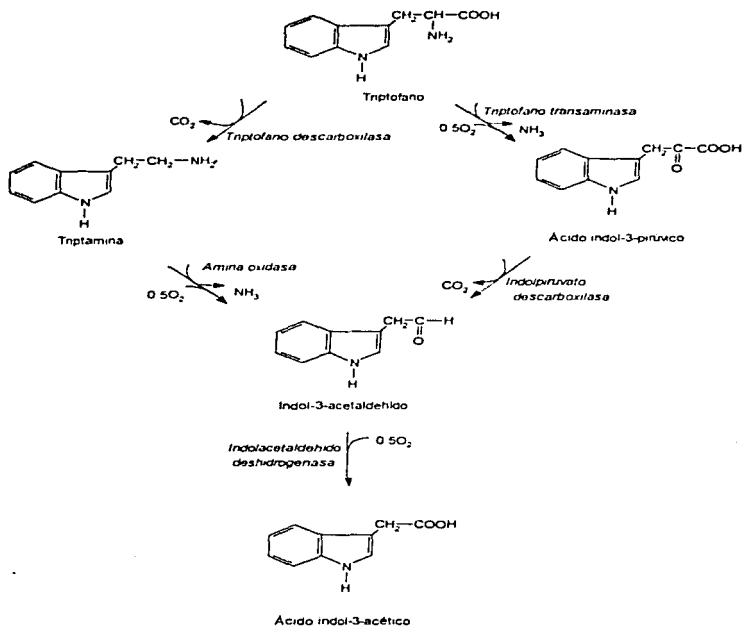


Figura 3.1. Vías de biosíntesis de auxinas a partir de triptofano (Devlin & Witham).

momento que no se les requiere. Una de ellas es la síntesis de auxinas enlazadas a otros compuestos (aminoácidos o azúcares) que las vuelven

inactivas. Por otra parte, se puede llevar a cabo la degradación oxidativa del IAA por medio de la IAA oxidasa.

El transporte de las auxinas se lleva a cabo a través del parénquima del floema y la corteza. El transporte es polar, es decir, del tallo hacia la base de la planta y de las raíces hacia los ápices.

3.2. CITOQUININAS

En un principio las citoquininas fueron identificadas como un producto de la degradación de la desoxiadenosina de ADN envejecido. Se piensa que pueden generarse naturalmente como producto de degradación o recambio del ADN. Algunos de estos compuestos se muestran en la figura 3.2.

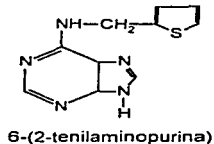
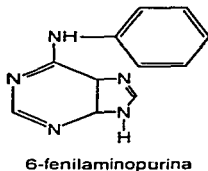
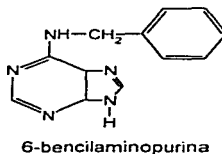
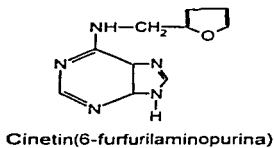


Figura 3.2. Cinetina y tres de sus análogos (Devlin & Witham).

Un aspecto interesante de estos compuestos es que se pueden encontrar en forma de base rara ($^{\beta}$ Ade) de algunos ARN de transferencia. Se cree que probablemente su presencia en posiciones específicas cercanas al anticodón del ARNt, mantiene su estructura y puede contribuir al enlazamiento correcto del ARNt y el aminoácido durante el proceso de la traducción. Por ello se piensa que las citoquininas pueden estar involucradas en la regulación de la síntesis de proteínas a este nivel.

Las citoquininas son producidas en regiones meristemáticas y en zonas de continuo crecimiento potencial. Probablemente, se transportan a través del xilema y son abundantes en raíces, hojas jóvenes y frutos en desarrollo.

3.3. ETILENO

Desde hace mucho tiempo, se sabe que el etileno afecta diversos procesos en las plantas desde la germinación hasta la maduración del fruto.

Estructuralmente, el etileno es muy diferente a otros fitoreguladores. A temperaturas fisiológicas normales, este hidrocarburo es un gas, y por tanto se difunde rápidamente a través de los tejidos de la planta. Su producción puede ser inducida *in vivo* por daño mecánico, frotamiento, radiación y por la presencia de otras sustancias como las auxinas. Existe evidencia considerable sobre el hecho de que la metionina es el precursor primario del etileno en plantas superiores (Figura 3.3).

3.4. ÁCIDO ABSCLISICO

Inicialmente esta sustancia fue aislada en forma cristalina del fruto maduro del algodón, se encontró que estimulaba su abscisión, por lo que se le denominó

ABSCISINA I. La estructura de este producto no pudo ser determinada. Después se aisló otra sustancia similar del fruto inmaduro del algodón, al que se le llamó **ABSCISINA II**. Posteriormente, se encontró otra sustancia a la que se denominó **dormina**. Para eliminar confusiones entre los diferentes nombres de este compuesto se llamó **ácido abscísico** (Figura 3.4).

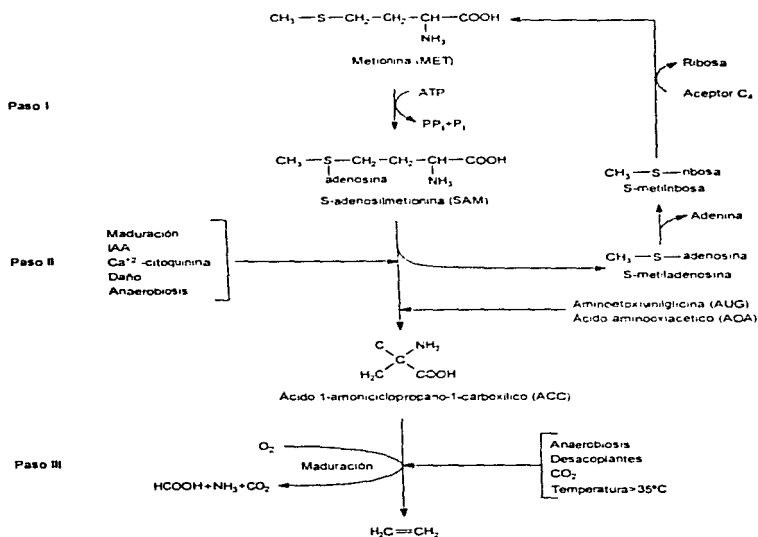


Figura 3.3. Biosíntesis del etileno (Devlin & Witham).

La síntesis del ácido abscísico (ABA) parece llevarse a cabo predominantemente en hojas maduras de donde se transporta a varias regiones a través de los tejidos del peciolo y del tallo. El transporte de este compuesto se realiza por medio del floema y del xilema. Los niveles de ABA en la planta parecen estar controlados por el estrés.

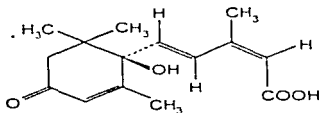


Figura 3.4. Ácido abscísico (Devlin & Witham).

El ácido abscísico (ABA) es un sesquiterpeno que se deriva del ácido mevalónico. Sin embargo, todavía se desconoce si el ABA proviene directamente de un precursor de 15 carbonos como el farnesil pirofosfato, o bien es un producto del rompimiento de un compuesto de 40 carbonos como el carotenoide violaxantina. EL ABA se presenta en las plantas en muy bajas concentraciones (de 4×10^{-8} a 2×10^{-7} M), únicamente se han detectado concentraciones del orden de 10^{-6} M en hojas sometidas a estrés de agua, semillas en desarrollo y en semillas y brotes latentes.

3.5. ÁCIDO JASMÓNICO

De todos los grupos de fitoreguladores caracterizados en la actualidad, los jasmonatos son los de más reciente descubrimiento. El ácido jasmónico fue por primera vez aislado de un cultivo de hongos y se identificó como un inhibidor del crecimiento en varias plantas superiores. Hoy en día, el ácido jasmónico

[(**-**)-JA] junto con su estereoisómero [(**+**)-7-iso-JA]) y su metil éster [(**-**)-JA-Me] son los principales representantes de este grupo de biorreguladores naturales.

La estructura básica de los jasmonatos se forma de un anillo de ciclopentanona sustituido de forma variable en C-3, C-6, y C-7. Estos compuestos son sintetizados a partir del ácido linoleico y el producto final es el (**+**)-7-iso-JA (Figura 3.5). Éste último es fácilmente transformado al (**-**)-JA por isomerización. También, se han identificado jasmonatos conjugados con aminoácidos (como valina, isoleucina y leucina), así como con glucósidos.

En plantas superiores, esta vía biosintética se localizó en frutos inmaduros, cotiledones de semillas germinadas y hojas. Hasta el momento no se conoce mucho sobre los niveles naturales de jasmonatos endógenos y su distribución en la planta. Sin embargo, con respecto a la localización intracelular de la vía parece que algunos de sus pasos son catalizados por enzimas asociadas a membrana de cloroplasto.

El transporte de estos compuestos en la planta aparentemente se lleva a cabo a través del floema. La mayor actividad de los jasmonatos se da en tejidos en crecimiento como los ápices de tallo y raíz, hojas jóvenes y frutos inmaduros.

También se ha demostrado que los niveles de JA endógeno se incrementan en respuesta a estímulos externos como daño mecánico, ataque de patógenos y estrés osmótico.

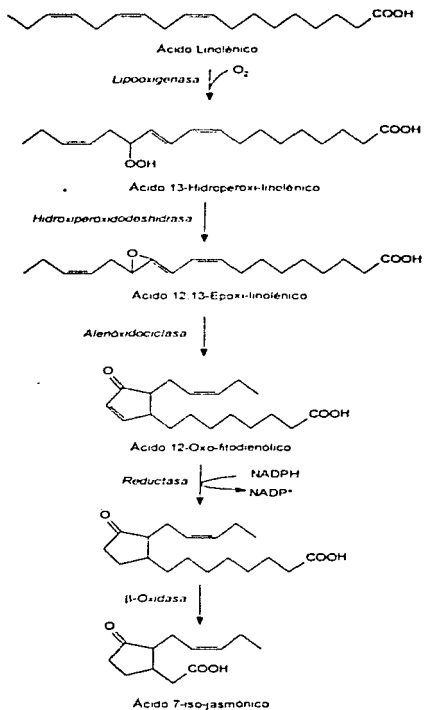


Figura 3.5. Biosíntesis y estructura del ácido jasmónico (Sembdner, *et al.* 1993).

Los jasmonatos producen diversos efectos inhibidores o promotores, en forma de cambios fisiológicos o morfológicos. Algunos de ellos son similares a los provocados por el ABA. Los jasmonatos más activos son el (+)-7-iso-JA y su metil éster, aunque son rápidamente isomerizados. Se ha comprobado que algunos jasmonatos conjugados, especialmente el (-)-JA-(S)-Ile y su metil éster, son tan activos como los no conjugados.

Los múltiples efectos fisiológicos causados por estos compuestos sugieren una acción pleiotrópica o una relación directa con procesos metabólicos y genéticos (Sembdner, *et al.* 1993).

Algunos de los efectos principales que producen en plantas estos primeros cinco grupos de fitoreguladores se enlistan en la Tabla 3.1.

3.6. GIBERELINAS

Las giberelinas (AG) fueron inicialmente aisladas de un ascomiceto conocido como *Gibberella fujikuroi*. Tiempo después, estas sustancias pudieron ser aisladas de plantas superiores. Actualmente se sabe que las giberelinas están presentes en angiospermas, gimnospermas, helechos, algas y hongos.

A la fecha se ha logrado aislar 52 giberelinas. Todas ellas poseen un esqueleto carbonado general y son similares estructuralmente. Estos compuestos tienen como precursor un diterpeno, el kaureno. Pueden tener 19 ó 20 carbonos en su estructura, así como distinguirse entre sí por la presencia o ausencia de un grupo funcional lactona y por sus sustituyentes, principalmente grupos hidroxilo (Figura 3.6).

Tabla 3.1. Efectos principales causados por los diferentes tipos de fitorreguladores.

FITORREGULADOR	EFECTOS QUE PRODUCEN
AUXINAS	<ul style="list-style-type: none"> • Favorecen la elongación del tallo y la raíz • Incrementan la velocidad de la división cambial en tallo • Desarrollan el procambium vascular en la raíz • Desarrollan brotes laterales
CITOQUININAS	<ul style="list-style-type: none"> • Actúan con el IAA para generar la división celular • Inducen el alargamiento celular (junto con IAA y giberelinas) • Inducen o inhiben el desarrollo de la raíz (dependiendo de su concentración) • Influyen en la dominancia apical • Demoran la senescencia en hojas • Favorecen la retención de clorofila
ETILENO	<ul style="list-style-type: none"> • Induce el climaterio (incremento abrupto de la respiración en fruto que desata los procesos de maduración del mismo) • Inicia, forma y mantiene el hipocotilo en dicotiledóneas • Acelera la senescencia y abscisión de hojas • Induce la formación de raíces adventicias en tallo • Inhibe la elongación de raíz, tallo y hojas • Inhibe la floración • Favorece la epinastia
ACIDO ABSCISICO	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve la dormancia • Inhibe el crecimiento de yemas y la formación del tallo • Inhiben el desarrollo de la semilla y su germinación • Inhiben el geotropismo y el cierre de estomas
JASMONATOS	<ul style="list-style-type: none"> • Inhiben el crecimiento longitudinal de la planta y la raíz • Inhiben la embriogénesis y la germinación • Promueven el rompimiento de la dormancia en semillas • Promueven la senescencia y abscisión de hojas • Promueven el cierre de estomas • Promueven la degradación de la clorofila • Promueven la respiración

El acetato es el precursor primario en la biosíntesis de estos compuestos. La condensación de tres moléculas de acetato y subsecuentes transformaciones enzimáticas (fosforilación, descarboxilación, isomerización) llevan a la eventual síntesis del kaureno. Este diterpeno puede entonces ser transformado en diferentes tipos de giberelinas en la planta (Figura 3.7).

En la planta, las giberelinas pueden encontrarse enlazadas a glucósidos, probablemente como una forma de ser inactivadas y/o almacenadas. Se ha

encontrado que las hojas jóvenes, el embrión y el fruto son los sitios de mayor síntesis de giberelinas activas, así como son almacenadas en abundancia en la semilla.

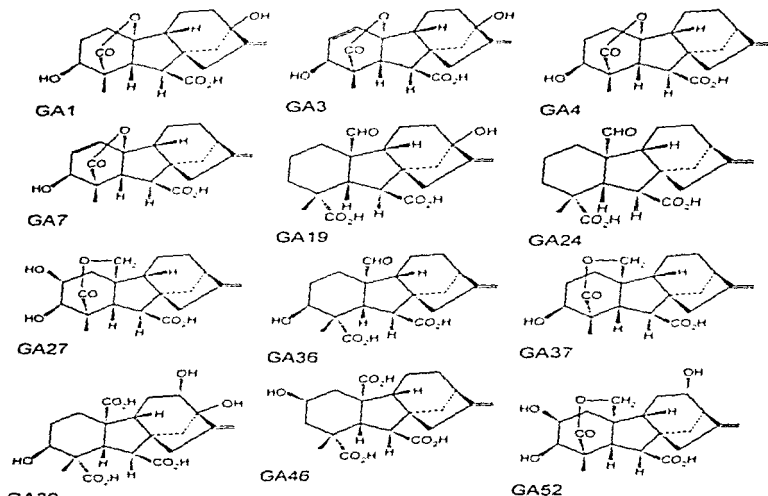


Figura 3.6. Estructura de algunas giberelinas (Devlin & Witham).

Generalmente, el transporte de las giberelinas es no polar y ocurre en el floema de forma similar a los carbohidratos. Sin embargo, no se conoce el mecanismo de distribución de donde se producen al lugar donde provocan su efecto.

Tabla 3.2. Principales efectos causados por las giberelinas a nivel planta y celular.

Efectos a nivel planta	Posible efecto a nivel celular
<p>Formación de capullo y floración: Regulan la permanencia de la planta en estado de roseta o la formación del capullo para posteriormente florecer, dependiendo de la concentración de las AG endógenas.</p>	<p>Estimulan la división celular y la elongación (en meristemas subapicales)</p>
<p>Crecimiento del tallo Revertien el efecto inhibitorio de la luz (probablemente causado por la disminución del nivel de AG disponible) en el crecimiento del tallo. Se piensa que quizás son un factor limitante para este proceso.</p>	<p>El incremento de AG disponible en el tejido aumenta la plasticidad de la pared celular de las células jóvenes. -La luz podría retardar la conversión de un precursor de ácido giberélico. -La luz podría estimular la síntesis de inhibidores del AG.</p>
<p>Partenocarpia Además de las auxinas o en conjunto con ellas favorecen este fenómeno.</p>	<p>Las giberelinas producidas durante el desarrollo de la semilla se transporta a los tejidos del fruto y tiene control sobre su desarrollo.</p>
<p>Enanismo Logran modificar la expresión fenotípica de mutantes enanas (por deficiencia en AG por bloqueo de la vía biosintética entre copalil pirofosfato y kaureno, por receptores ineficientes, bloqueo metabólico o exceso de inhibidores naturales).</p>	
<p>Movilización de reservas durante la germinación. Inducen la hidrólisis de proteínas de reserva en capa de aleurona. Inducen la síntesis <i>de novo</i> de enzimas hidrolíticas en capa de aleurona que son secretadas al endospermo almidonoso para su degradación.</p>	<p>Producen la alteración de la ultraestructura de las células de la aleurona en cuanto a gránulos celulares y membranas. Las enzimas sintetizadas <i>de novo</i> son la α-amilasa, ribonucleasa, β-1,3-glucanasa. La β-amilasa preformada es secretada junto con las anteriormente citadas. Existe regulación a nivel de genes que involucra síntesis de ARN, resultado de la activación o represión de genes. Esto ha podido ser corroborado por el uso de inhibidores de síntesis de ARN como la 8-azaguanina y actinomicina D así como de inhibidores de síntesis proteica como la cicloheximida y la puromicina.</p>

Se profundizará más sobre los efectos fisiológicos y moleculares producidos por las giberelinas en la capa de aleurona de la semilla de los cereales; ya que para los fines de este trabajo, resultan de particular

importancia. Los efectos que producen estos compuestos se encuentran resumidos en la tabla 3.2.

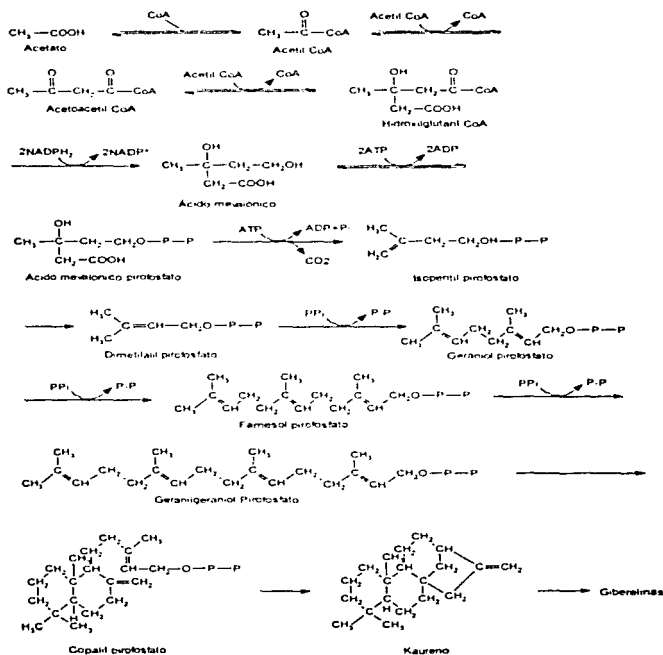


FIGURA 3.7. BIOSÍNTESIS DE GIBERELINAS A PARTIR DE ACETATO (DEVLIN & WITHAM).

3.7. LA CAPA DE ALEURONA

El endospermo se encuentra formado por dos partes: la capa de aleurona y el endospermo almidonoso. La capa de aleurona consiste de una a tres capas de células cuya pared celular es muy rígida. La composición de la pared celular varía de una especie a otra. Por ejemplo, la pared celular de la capa de aleurona del trigo consta principalmente de xilanos y heteroxilanos, mientras que la de la cebada se constituye de arabinoxilanos y $(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-glucanos}$ (Jacobsen, 1988).

La especial rigidez de la pared celular se debe probablemente a que éste es un tejido cuyas células no se reproducen, por lo que deben estar bien protegidas de posibles daños a su estructura (Figura 3.8)

La capa de aleurona es la responsable de la movilización de reservas del endospermo almidonoso durante la germinación. Durante este proceso, el embrión inicia la síntesis de ácido giberélico, el cual se difunde a través del escutelo hasta llegar a la capa de aleurona. Este fitorregulador desata una serie de respuestas fisiológicas que permiten la hidrólisis de las proteínas de reserva de estas células. Posteriormente, se inicia la síntesis *de novo* de enzimas hidrolíticas, que se secretan al endospermo almidonoso e inician la digestión del mismo. Los productos de hidrólisis eventualmente viajan hacia el embrión donde son aprovechados para su desarrollo (Jacobsen, 1988).

Diversos trabajos han tenido como objetivo describir los diferentes efectos causados por las giberelinas a nivel celular y genético en este tejido. Es decir, se han estudiado varios eventos moleculares que se inducen y/o modifican por la presencia de este fitorregulador. A continuación, se describirá la regulación de los genes de α -amilasa por el AG_3 , ya que este es el evento más estudiado debido a que la α -amilasa constituye la principal enzima sintetizada *de novo*

como respuesta a este fitorregulador; y luego el posible mecanismo que permite percatarse de la presencia del AG₃.

3.7.1. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE α -AMILASA POR AG₃

Como ya se mencionó anteriormente, durante la germinación de la semilla, las reservas almacenadas (carbohidratos, proteínas y lípidos) en el endospermo almidonoso y en la aleurona son degradados y enviados a través del escutelo hacia la plántula en desarrollo. Las enzimas responsables de este proceso provienen principalmente de la capa de aleurona, así como también muchas de ellas están bajo el control de las giberelinas.

La α -amilasa, una endohidrolasa, es importante en la degradación inicial de la amilosa y amilopectina de los gránulos de almidón del endospermo. Existe evidencia de que los diferentes grupos de isoenzimas de la α -amilasa tienen distintas actividades *in vitro*. La β -amilasa y la α -glucosidasa son exohidrolasas que liberan maltosa y glucosa respectivamente. Estas enzimas no son capaces de romper enlaces de ramificación, éstos son hidrolizados por la dextrinasa límite.

A diferencia de la α -amilasa y la α -glucosidasa, que son sintetizadas en la aleurona durante la germinación, la β -amilasa existe en el endospermo de la semilla seca de forma inactiva, enlazada a cuerpos protéicos por puentes disulfuro. El incremento de la actividad de esta enzima puede deberse a la activación de una proteasa inducida por AG₃ al iniciar la germinación, que logra romper el complejo β -amilasa-cuerpo protéico (Jacobsen, *et al.* 1988).

Las enzimas cuya actividad es una respuesta inducida por el AG₃ se han clasificado en cuatro grupos principales (Jacobsen, *et al.* 1988):

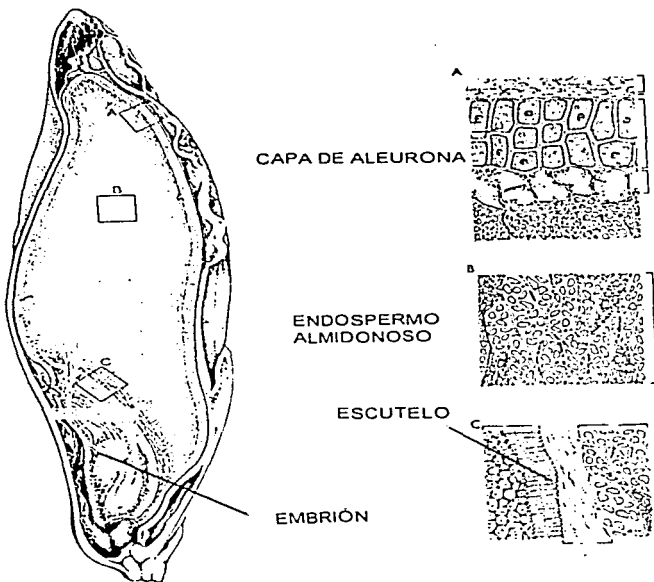


Figura 3.8. La capa de aleurona.

- Grupo I:** Son aquellas enzimas que presentan un incremento rápido en actividad sin que haya un cambio apreciable en su concentración.
- Grupo II:** Son aquellas enzimas cuya síntesis y secreción son inducidas por AG_3 .
- Grupo III:** Son aquellas enzimas que incrementan su actividad por síntesis *de novo* en ausencia de AG_3 , pero muestran mayor actividad en su presencia.
- Grupo IV:** Son enzimas cuyo nivel es constante, pero se incrementa en la presencia de AG_3 .

Muchos aspectos sobre el control hormonal de la expresión génica en la capa de aleurona han sido estudiados, en particular con respecto a la α -amilasa. En primera instancia, se ha podido establecer que hay dos grupos de isoenzimas que se separan con base a sus distintos puntos isoeléctricos (pI) y que existen diferencias claras entre estos grupos, mientras que las isoenzimas pertenecientes al mismo son similares (Jacobsen, *et al.* 1982).

Por traducción de ARNm en un sistema libre de células, se pudo determinar que la síntesis de los dos grupos de isoenzimas es dirigida por dos poblaciones separadas de ARNm. También se ha demostrado que los genes para las isoenzimas de bajo y alto punto isoeléctrico se encuentran en diferentes cromosomas (Lazarus, *et al.* 1985). Recientemente, el uso de técnicas de ADN recombinante ha provisto evidencia adicional de la existencia de familias de genes de α -amilasa en cebada (Jacobsen, 1988).

A través de diversos estudios, se ha podido observar que los fitorreguladores pueden controlar la transcripción de los genes, y por ende también los niveles de ARNm; éstos a su vez regulan la velocidad de síntesis de proteínas específicas. Para el caso particular de la capa de aleurona, se ha

demostrado que los inhibidores de la transcripción impiden la inducción de la síntesis de la α -amilasa, así como también provocan una alteración en la síntesis de ácidos nucleicos, ARNm en especial (Jacobsen, 1983).

Algunos estudios de transcripción con núcleos (aislados de protoplastos de aleurona de cebada y avena tratados con AG_3) mostraron que éstos producían niveles menores de ARN total, la mayor parte correspondiente a ARNm, que los producidos por núcleos de células control. La incubación simultánea de los protoplastos con AG_3 y ABA resultó en la anulación de todos los efectos del AG_3 en la transcripción. Con esto se pudo concluir que tanto AG_3 como ABA regulan la síntesis de α -amilasa, controlando en parte eventos dentro del núcleo, probablemente la transcripción de los genes de la α -amilasa (Jacobsen, 1988).

De aquí, era de esperarse que el ARNm de la α -amilasa se acumulara en presencia de AG_3 . Esto se demostró traduciendo el ARNm total aislado en sistemas libres de células, utilizando la cantidad de péptidos de α -amilasa sintetizados como medida del ARNm de α -amilasa presente. En efecto, se encontró que el AG_3 produce la acumulación del ARNm de α -amilasa traducible (Jacobsen, 1988).

Más recientemente, la disponibilidad de clones de cADN de α -amilasa permitió realizar el análisis directo del ARNm y la distinción entre los transcritos de los genes de α -amilasa de los transcritos traducibles. Con base en los resultados de muchos estudios, se ha determinado que el ARNm de la α -amilasa se acumula en presencia de AG_3 y que el ABA inhibe esta acumulación (Jacobsen, 1988). También se ha observado que el ARNm de la α -amilasa de bajo pI se encuentra presente en la aleurona hidratada, se incrementa de 10 a 20 veces como respuesta al AG_3 durante las primeras 24

horas y responde a niveles bajos del fitorregulador ($\geq 10^{-8}$ M). Por otra parte, el ARNm de la α -amilasa de alto punto isoeléctrico está en muy baja concentración en el tejido hidratado, se incrementa de 50 a 100 veces de las 12 a 16 horas como respuesta al AG_3 decreciendo más tarde y responde al AG_3 en altas concentraciones ($\geq 10^{-6}$ M). Todo esto refuerza la idea de que los genes de los diferentes grupos de α -amilasa son regulados diferencialmente (Rogers, 1985).

La transcripción de los genes de α -amilasa podría involucrar la interacción de factores *trans* con elementos *cis* en los promotores de dichos genes. Se ha demostrado que hay elementos en el promotor de los genes de α -amilasa que confieren altos niveles de expresión génica regulada por fitorreguladores (Huttly, *et al.* 1989 y Jacobsen, *et al.* 1991). Estos elementos se encuentran entre 174 y 41 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Skriver, *et al.* (1991) determinaron la existencia de un elemento de respuesta al AG_3 , al que denominaron GARE. Lanahan, *et al.* (1992), demostraron que en el gen Amy32b (para α -amilasa de bajo pI en cebada), el GARE regula el control hormonal de la transcripción.

Se han encontrado, por lo menos, otros tres factores necesarios para los altos niveles de expresión génica regulada por fitorreguladores a nivel de transcripción. Este grupo de elementos fue designado como el complejo de respuesta al AG_3 (GARC) y se compone de una secuencia de enlazamiento a proteínas, Opaque-2 (O2S); una secuencia enriquecida con nucleótidos de pirimidina, la caja de pirimidina, el GARE, y la caja I (TATCCAT) (Sutliff, *et al.* 1993).

Con el fin de determinar la influencia de los fitorreguladores a nivel de la traducción del ARNm de la α -amilasa, se ha determinado por marcaje de proteínas *in vivo* que esta enzima constituye aproximadamente 50-60% de la

síntesis total de proteínas (Jacobsen, 1988). Por lo que al parecer, en efecto, la síntesis de proteínas se encuentra regulada por otros factores involucrados en la transcripción. Estos factores podrían incluir una alta eficiencia en el inicio de la traducción en función de las secuencias de nucleótidos, o bien la presencia de factores de iniciación dependientes del fitorregulador. Otra explicación para el predominio de la α -amilasa sería una supresión importante de la síntesis de otros polipéptidos. Sin embargo, todavía no existe evidencia suficiente para afirmar que el control hormonal se lleva a cabo también a nivel de traducción.

3.7.2. PERCEPCIÓN Y TRANSDUCCIÓN CELULAR DEL AG₃

En los sistemas hormonales, las células de los diferentes tejidos y órganos son capaces de detectar, transmitir y responder a señales hormonales de manera muy específica. A partir de estudios realizados en otros organismos se ha visto que esto es debido a que las células blanco están equipadas con una serie de receptores que pueden detectar un conjunto de señales químicas; así como con un mecanismo intracelular que amplifica, transmite y traduce la señal en una respuesta fisiológica.

En las plantas, el mecanismo por el cual se lleva a cabo la percepción-transducción de las señales emitidas por los fitorreguladores no se conoce todavía. Sin embargo, existen modelos de percepción-transducción de señales para hormonas animales, los cuales han influido de manera importante en el estudio de estos sistemas en plantas.

3.7.3. PERCEPCIÓN DEL ESTÍMULO

Algunos fitorreguladores como el ácido giberélico, el ácido abscísico y las auxinas son ácidos orgánicos pequeños, que en su forma no cargada, en teoría,

pueden atravesar membranas biológicas. Como resultado de esto, podrían interactuar con receptores citoplasmáticos, como en el caso de algunas hormonas esteroides en animales. Por otra parte, también es posible que interactúen con receptores que se encuentren enclavados en la parte externa de la membrana plasmática.

Un receptor se define como una proteína (generalmente enlazada a un glicósido) capaz de enlazarse específica y reversiblemente a un compuesto químico que lleva un mensaje a la célula, sin transformarlo químicamente. Después de que se da la unión mensajero químico-receptor, este último sufre un cambio conformacional que provoca el desencadenamiento de una serie de reacciones que producen eventualmente una respuesta fisiológica en la célula.

Existe cierta evidencia sobre el hecho de que la percepción del ácido giberélico en células de capa de aleurona se da a nivel de membrana plasmática. De los estudios que presentan resultados contundentes a este respecto, existe el trabajo de Hooley (1992) donde estudia la respuesta de protoplastos de aleurona de avena (*Avena fatua*) hacia el ácido giberélico. Los protoplastos incubados con el fitorregulador en concentraciones de 10^{-14} a 10^{-9} M, presentan una producción de α -amilasa aproximadamente 2.7 a 3.8 veces mayor que la de los controles incubados durante el mismo tiempo pero sin ácido giberélico.

En otro trabajo, la incubación de protoplastos con un derivado del AG_4 impermeable a la membrana (el compuesto es la unión de AG_4 con perlas de sefarsa) resultó en la inducción de la síntesis y secreción de α -amilasa, que es una respuesta característica del estímulo de las giberelinas en las células de capa de aleurona (Gilroy, *et al.* 1994).

Por otra parte, se ha observado que algunos anticuerpos anti-idiotípicos

contra AG_3 , pueden producir la misma respuesta emitida por la aleurona inducida por AG_4 , medida como síntesis de α -amilasa (Gilroy, *et al.* 1994).

En este mismo trabajo se muestra que la incubación de protoplastos de capa de aleurona de cebada con ácido giberélico exógeno produce respuestas típicas a este fitorregulador como lo son, vacuolación del protoplasto y secreción de α -amilasa. También se encontró positiva la expresión transiente del promotor de α -amilasa ligado al gen reportero GUS. Cuando se microinyectó ácido giberélico a los protoplastos, éstos no produjeron respuesta alguna al fitorregulador. Sin embargo, al tratar estos mismos protoplastos con AG_3 exógeno, mostraron las respuestas antes mencionadas (Gilroy, *et al.* 1994).

Como conclusión de los experimentos antes mencionados, se puede decir que en efecto la percepción del ácido giberélico en capa de aleurona se lleva a cabo a nivel de membrana plasmática. Por estudios de marcaje de fotoafinidad se han identificado proteínas que se enlazan a ácido giberélico (Walker, *et al.* 1994) mismas que podrían ser sus receptores. Sin embargo, existe la posibilidad de que solo sean enzimas relacionadas a su metabolismo. Por ello, existen grupos trabajando en la síntesis de reactivos de fotoafinidad con mayor especificidad.

Se debe mencionar que existe evidencia sobre la recepción a nivel de membrana plasmática de otros fitorreguladores, como las auxinas (Napier, *et al.* 1990). Esto refuerza la idea de que la percepción de las giberelinas sea a través de receptores de membrana.

3.7.4. TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL HORMONAL

Los fitorreguladores, al igual que otros mensajeros químicos, pueden regular la

actividad enzimática de las células en las que ejercen su efecto, así como alterar las velocidades de síntesis de proteínas preexistentes o inclusive inducir la síntesis de otras nuevas. De aquí que es lógico pensar que el proceso de percepción-transducción de señales no es sencillo en absoluto.

En la actualidad, se han identificado, tanto en plantas como en animales, dos vías principales para la transducción de señales.

1. La vía de transducción para algunas hormonas, como las esteroides, propone que éstas son asimiladas por las células blanco por difusión simple a través de la membrana plasmática. Una vez dentro de la célula, las hormonas interactúan con receptores citoplasmáticos capaces de detectar los diferentes niveles hormonales dentro de la célula. Estos receptores intracelulares son proteínas reguladoras que pueden interactuar con otras proteínas específicas, así como también con secuencias específicas de ADN de la cromatina. Estas interacciones dan como resultado la modificación de la velocidad o de los patrones de transcripción de los genes. Se han encontrado también receptores de esteroides en membrana plasmática que perciben los niveles externos de hormona y pueden influir en la alteración de los flujos de Na^+ / H^+ a través de la membrana plasmática y en los niveles de AMPc y Ca^{2+} (Libbenga, *et al.* 1984).
2. La segunda vía es la descrita para los mensajeros químicos cuyos receptores se encuentran localizados en la membrana plasmática, como sería el caso del AG_3 o las auxinas. Estos receptores membranales funcionan como sensores de los niveles de hormona externa y transducen la presencia hormonal en señales intracelulares por medio de la activación de la adenilato ciclasa (que convierte ATP en AMP cíclico) y/o por la activación de la fosfolipasa C (que convierte el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato de la membrana en inositol trifosfato y diacilglicerol). Estas señales activan a su vez a la proteína cinasa

dependiente de AMPc, liberan Ca^{2+} de fuentes internas (incrementando así la concentración extracelular de este catión) y activan a la proteína cinasa C. Estas respuestas, de alguna manera disparan una respuesta fisiológica en la célula, que puede hasta incluir alteraciones en la expresión génica (Libbenga, *et al.* 1984).

En plantas, por ejemplo, se ha demostrado que la auxina induce la hiperpolarización de la membrana a través de la actividad de la ATPasa de protones de la membrana plasmática. La incubación de protoplastos de aleurona con antisuero contra la denominada ABP (proteína enlazadora de auxinas), bloquea la respuesta inducida por este fitoregulador. Esto indica que la ABP presente en la superficie externa de la membrana plasmática es esencial para el flujo de información de la auxina hacia la H^+ -ATPasa. Por otra parte, se ha encontrado evidencia sobre la abundancia de ABP en membrana plasmática con sensibilidad a auxinas, por lo que se piensa que la ABP es un receptor para auxinas (Napier, *et al.* 1990).

Es evidente que estos modelos distan mucho de poder explicar todos los eventos celulares provocados por el estímulo de una hormona, además de que resultaría muy aventurado afirmar que los mecanismos de transducción en plantas son iguales a los de animales. Sin embargo, se sabe que algunos sistemas de regulación son altamente conservados, por lo que las principales cadenas de transducción en plantas podrían tener algunos aspectos en común con las de animales.

El complejo estímulo-receptor genera cambios en factores citoplasmáticos, identificados como segundos mensajeros, que amplifican, integran y propagan la señal inicial. En plantas, existen varias especies que han sido propuestas como segundos mensajeros como los protones, las poliaminas, las proteínas cinasas, y las fosfatasa.

Se ha encontrado que los niveles de Ca^{2+} cambian importantemente en respuesta a una amplia variedad de estímulos, por lo que se piensa que este catión podría mediar varias respuestas fisiológicas. Existen diversos trabajos que apoyan el hecho de que el Ca^{2+} puede fungir como segundo mensajero.

En varios estudios se han hecho mediciones que indican que la concentración intracelular de Ca^{2+} en diferentes tipos de células es menor de 200 nM, y sólo en casos especiales este nivel se ve incrementado por algún estímulo. Por otro lado, se han identificado canales de Ca^{2+} en plantas superiores e inferiores. Además, existe evidencia de que el inositol trifosfato y la fosforilación modifican la actividad de estos canales (Bethke, *et al.* 1994). También se han caracterizado ATPasas de Ca^{2+} en membranas de células vegetales. Por otra parte, se ha reportado la presencia de proteínas con gran afinidad y especificidad por el GTP en membranas de varias células vegetales. Se sabe que esta especie provoca la liberación de Ca^{2+} de vesículas membranales.

3.7.5. EL CALCIO EN LA CAPA DE ALEURONA

Muchos estudios han demostrado que varios procesos fisiológicos en plantas son regulados por las concentraciones de Ca^{2+} en la célula. En el caso particular de la capa de aleurona de cebada existen estudios con protoplastos tratados con AG_3 , donde se ha encontrado que la variación en las condiciones de incubación de los mismos (diferentes concentraciones de Ca^{2+} extracelular, distintos tiempos, cambios del pH externo) producen diferentes patrones de distribución de este catión dentro y fuera la célula (Bush, *et al.* 1988). Concomitantemente, se observaron cambios en la síntesis y secreción de la α -amilasa (producción diferencial de isoenzimas en cuanto a tiempo y concentración) y alteración del pH extracelular. Por ejemplo, la incubación de los

protoplastos con AG_3 y 20 mM de Ca^{2+} produce un incremento del calcio citoplasmático de 200 nM a 350 nM, induce la síntesis de α -amilasas de alto y bajo punto isoeléctrico, y propicia la acidificación del medio externo. Mientras que el tratamiento de los protoplastos con AG_3 y 10 mM de Ca^{2+} no altera el nivel basal de este catión en el interior de la célula y sólo se induce la síntesis de α -amilasa de bajo punto isoeléctrico en baja concentración (Carbonell, *et al.* 1984). Ésto sugiere que el calcio podría de alguna manera regular algunos procesos involucrados con las respuestas de este tejido al AG_3 (Bush, *et al.* 1989).

Por otra parte, se sabe que el paso del calcio al citoplasma, ya sea de comportamientos extracelulares o intracelulares de altas concentraciones, involucra la activación de una proteína que se enlaza al calcio, la calmodulina. Se ha demostrado que la activación de esta proteína es un prerrequisito para diversas respuestas regulatorias. En protoplastos de aleurona de cebada, se ha encontrado que el tratamiento con AG_3 incrementa los niveles de calmodulina, que a su vez promueve el transporte de calcio hacia el interior del retículo endoplásmico. Por ello, se ha propuesto que la toma elevada de Ca^{2+} del retículo endoplásmico por inducción con AG_3 puede ser coordinada y regulada por niveles elevados de calmodulina asociada a membranas (Gilroy, *et al.* 1993). Ésto refuerza la idea de que el calcio desempeña un papel importante en la transducción de las señales provocadas por la interacción del AG_3 con las membrana plasmática de las células de la capa de aleurona.

Es bien sabido que la membrana plasmática no funge sólo como delimitadora de los diferentes dominios intra y extracelulares, sino que también regula la entrada y salida de distintos materiales a través de diferentes mecanismos de transporte asociados a la membrana plasmática. Por otra parte también, controla las interacciones célula-célula a través de diferentes receptores de membrana, y percibe los niveles externos de

mensajeros químicos.

Los receptores de la membrana plasmática son proteínas transmembranales, con sitios de enlace en la porción de la proteína expuesta al exterior de la célula. En general, la ocupación de estos sitios por un agonista (moléculas que pueden inducir una respuesta del receptor) causará un cambio conformacional en la proteína receptora que será propagado a la región expuesta al interior de la célula. En la parte de la membrana plasmática en contacto con el citoplasma, puede haber diferentes interacciones entre el receptor y otras proteínas que eventualmente llevan a distintos estadios del proceso de transducción.

En la actualidad, la capa de aleurona es uno de los pocos sistemas con familias de genes bien identificados que son regulados positiva y negativamente por diferentes fitorreguladores (AG_3 y ABA) y cuyos productos están bioquímicamente identificados (α -amilasa, β -glucanasa). Por ello, ha servido como un modelo importante para el estudio de la regulación hormonal de la expresión génica en plantas.

Dada la evidencia de que la percepción de la señal del ácido giberélico en las células de capa de aleurona de cereales se lleva a cabo a nivel de membrana plasmática, es factible pensar que este estímulo podría conllevar algunos cambios en las proteínas de membrana que fungieran como receptores específicos y permitieran transmitir la señal del fitorregulador hacia el interior de la célula desencadenando la respuesta correspondiente.

Con el fin de poder realizar estudios a nivel proteínas de membrana plasmática en este sentido, resulta importante y necesario tener una metodología confiable y eficiente para el aislamiento y purificación de este tipo de membrana. Asimismo, el contar con membrana plasmática pura nos

permitiría estudiar los cambios que se presenten en sus diferentes proteínas asociadas, o inclusive sería factible determinar si existen cambios también a nivel fosfolípidos en cuanto a su composición y/o estructura en la membrana. De esta manera, el aislamiento y purificación de membrana plasmática de este tejido nos presenta muchas posibles estrategias que nos podrían acercar a elucidar algunos de los aspectos importantes del mecanismo de percepción hormonal y/o transducción.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es el de optimizar la metodología que permita el aislamiento y purificación de membrana plasmática de células de capa de aleurona de cebada.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron semillas de cebada *Hordeum vulgare*, variedad Himalaya, cosecha 1994, obtenidas del Departamento de Agronomía de la Universidad de Washington, Pullman, WA.

4.2. PREPARACIÓN DE LAS SEMILLAS

Las semillas de cebada se cortaron transversalmente eliminando el embrión. Las medias semillas sin embrión se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial

al 20% (v/v), agitándolas en esta disolución durante 20 minutos. Se enjuagaron seis veces con agua destilada estéril hasta eliminar el olor a hipoclorito. Después se les añadió ácido clorhídrico 0.01 N, donde se agitaron durante 10 minutos (para eliminar algún excedente de hipoclorito de sodio). Se enjuagaron nuevamente seis veces con agua destilada estéril hasta eliminar el pH ácido (medido con papel indicador de pH Whatman).

4.3. OBTENCIÓN DE LAS CAPAS DE ALEURONA

Las medias semillas desinfectadas se pusieron a embeber durante 72 hs a 28°C sobre dos círculos de papel filtro Whatman No. 1 y con 7 ml de agua destilada estéril en cajas de Petri. Al término de este tiempo, se eliminó el endospermo almidonoso con la ayuda de dos espátulas. Todas las manipulaciones con las semillas desinfectadas se realizaron en condiciones estériles.

4.4. AISLAMIENTO DE MEMBRANAS

4.4.1. PREPARACION DEL TEJIDO

Las capas de aleurona obtenidas se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron en un mortero con pistilo preenfriados hasta formar un polvo fino. Este se transfirió a un vaso de precipitados donde se le añadió medio de homogeneización (sacarosa 250 mM, etiléndiamina tetracético (EDTA) 2 mM, ATP 1 mM, Tris/HCl 70 mM pH 8.0, ditiotreitól (DTT)* 4 mM, β-mercaptoetanol* 15 mM, N-tosil-L-fenilalanin clorometil cetona (TPCK)* 100 µg/ml, N-α-p-tosil-L-lisin clorometil cetona (TLCK)* 50 µg/ml y quimostatina* 7 µg/ml) en relación 1 g de tejido : 1 ml de medio. Se homogeneizó con un Polytron a aproximadamente

15000 RPM en lapsos de 1 min durante 3 min. Finalmente, el homogenado se hizo pasar a través de cuatro capas de gasa, eliminando así la mayor parte de los residuos celulares. En todo momento la preparación se mantuvo a 4°C.

4.4.2. OBTENCIÓN DEL HOMOGENADO SIN FRACCIÓN NUCLEAR

El homogenado total se centrifugó a 5000 X g durante 15 min a 4°C. La pastilla se descartó y el sobrenadante se denominó Homogenado sin Núcleos (H-N).

4.4.3. OBTENCIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA POR EL MÉTODO DE REPARTO EN UN SISTEMA DE POLÍMEROS EN DOS FASES

El enriquecimiento de vesículas de membrana plasmática de capa de aleurona se realizó según el procedimiento descrito por Larsson, *et al* (1987).

La mezcla de fases consistió de lo siguiente:

Tabla 4.1. Componentes para la elaboración del sistema de fases.

Componente	Cantidad	Concentración final
Dextran T-500 20%	11.66 g	6.5% p/p*
Polietilénglicol 3350 40%	5.86 g	6.5% p/p
Sacarosa	3.05 g	330 mM
KH ₂ PO ₄ 0.2 M pH 7.8	0.675 ml	5 mM
KCl 2M	0.041 ml	3 mM
H ₂ O cbp	27.00 g	---

* Esta concentración de polímeros se utilizó en todos los sistemas de fases después de la selección de la concentración óptima de los mismos.

El sistema de fases se preparó pesando 11.66 g de Dextrán T-500 al 20% p/p en agua en un tubo Corex de 50 ml. A ese mismo tubo se añadieron 5.86 g

de polietilenglicol 3350 al 40% p/p en agua sin volver a tarar la balanza (es decir que se lleva al peso acumulado de Dextrán y polietilenglicol). De la misma manera, se agregaron 3.05 g de sacarosa en polvo. Después se añadió la cantidad indicada de KH_2PO_4 0.2 M pH 7.8 y KCl 2M. Del peso final obtenido, se llevó a un peso de 27 g con agua para obtener las concentraciones finales especificadas en la tabla 4.1. La mezcla de fases (27 g) se llevó a un peso de 36 g añadiendo la fracción H-N. Dependiendo de la cantidad de proteína obtenida en el H-N, la mezcla de fases se escaló para obtener al final las mismas concentraciones finales antes especificadas.

Con el objeto de determinar las condiciones óptimas para el enriquecimiento en vesículas de membrana plasmática se estudió el efecto de las diferentes concentraciones de polímeros en la mezcla de fases. Los resultados se muestran en el siguiente capítulo. Los sistemas se elaboraron de la misma forma antes descrita, utilizando las siguientes cantidades de reactivos:

Tabla 4.2. Cantidades requeridas de los diferentes componentes para la elaboración de los sistemas de fases de diferente concentración de polímeros.

Componente	Concentración de polímeros			
	5.5/5.5	6.2/6.2	6.5/6.5	7.0/7.0
20% p/p Dextran	9.96 g	11.16	11.66 g	12.60 g
40% PEG	4.98 g	5.58 g	5.86 g	6.30 g
Sacarosa	3.05 g	3.05 g	3.05 g	3.05 g
0.2 M Buffer fosfatos pH 7.8	0.675 ml	0.675 ml	0.675 ml	0.675 ml
2 M KCl	0.041 ml	0.041 ml	0.041 ml	0.041 ml
Agua cbp	27.00 g	27.00 g	27.00 g	27.00 g

La mezcla de fases junto con el homogenado sin núcleos se agitó

invirtiendo enérgicamente el tubo 25 veces. Después se centrifugó a 1500 RPM por 10 min a 4°C para volver a separar las fases.

La fase superior (FS) enriquecida en membrana plasmática se separó de la mezcla. Para eliminar el polímero, se diluyó tres veces su volumen con un buffer que contenía sacarosa 250 mM, Tris/HCl 10mM pH 7.5, se agitó y centrifugó a 100,000Xg por 2 h a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en 100-150 µl de medio de resuspensión (sacarosa 250 mM, Tris/HCl 5mM pH 7.0, Glicerol 10%, DTT* 1 mM, TPCK* 100 µg/ml, TLCK* 50 µg/ml, quimostatina* 7µg/ml). Esta muestra se alícuotó en fracciones de 50 µl y se guardaron a -70°C. (*Estos reactivos se añadieron justo antes de usar la solución).

Para realizar otro paso de enriquecimiento de la membrana plasmática, se preparó otro sistema de fases como se describió anteriormente y se llevó al peso de 36 g con agua. El sistema se centrifugó a 1500 RPM durante 5 min y la fase superior de PEG fue eliminada. Entonces se cargó FS (obtenida en el reparto anterior) sobre la fase inferior (FI) de Dextran del sistema de fases. Se agitó el sistema invirtiendo el tubo 25 veces y se centrifugó a 1500 RPM durante 5 min a 4°C. La fase superior del sistema, denominada FS₂, se lavó del polímero, se centrifugó y se resuspendió la pastilla obtenida en las mismas condiciones descritas anteriormente.

4.5. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

La determinación de proteína se llevó a cabo por medio del método de Lowry (1951).

En 0.9 ml de agua destilada se agregaron de 5 a 10 µl de muestra (H-N,

FS, FS₂ o FI), 0.1 ml de desoxicolato de sodio al 0.15% (p/v) y 0.1 ml de ácido tricloroacético al 72% (v/v). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1.0 ml de agua destilada, 0.1 ml de desoxicolato de sodio 0.15% (p/v), 1.0 ml de reactivo A, que contiene en partes iguales: agua destilada, hidróxido de sodio 0.8 M, dodecilsulfato de sodio al 10% (p/v) y CTC (Na₂CO₃ al 10% (p/v), CuSO₄ al 0.1% (p/v) y K₂C₄H₄O₆ al 0.2% (p/v)), y 0.5 ml de reactivo B (Reactivo Folin Ciocalteu y agua destilada 1:5) Se dejó desarrollar color durante 30 min. al término de los cuales se leyó la absorbencia en un espectrofotómetro LKB Ultrospec II a 750 nm.

La curva patrón se realizó con una disolución estándar de seroalbúmina de bovino (1 mg/ml) con 10 a 60 µg de proteína.

4.6. ENSAYOS ENZIMATICOS

4.6.1. ATPASAS

La hidrólisis enzimática de ATP fue medida por un método colorimétrico modificado para la determinación de Pi en muestras con alto contenido protéico y baja actividad de ATPasa. Este método se basa en la formación de un complejo de fosfomolibdato en medio ácido seguido por la reducción o complejación con tintes básicos que resultan en un producto colorido (González, *et al.* 1992).

En este método, se añadieron 10 µg de proteína de la fracción membranal a un medio que contiene sacarosa 250 mM, Tris/HCl 10 mM pH 7.0, carbonilcianuro 3-cloro-fenilhidrazona (CCCP) 7 µM, ATP/Tris pH 7.0 10 mM, cloruro de magnesio 10 mM y lisofosfatidilcolina 100 µM en un volumen total de

150 μ l. Se incubó a 30°C durante 1 h, al término de la cual se detuvo la reacción por la adición de 150 μ l de reactivo A (dodecil sulfato de sodio al 24%). Después se agregaron los reactivos para desarrollar color: 300 μ l de reactivo D que consiste de la mezcla 1:1 del reactivo B (ácido ascórbico 12% en HCl 1N) y reactivo C (molibdato de amonio 2% en HCl 1N) y 450 μ l de reactivo E (citrato de sodio 2% y metarsenito de sodio 2% en ácido acético al 2% en agua), el cual se adicionó a los 3-7 min de haber añadido el reactivo D. Las muestras se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente y se hicieron las lecturas de absorbencia a 850 nm. Habiendo realizado la curva patrón con 10 a 60 η moles de fosfato, la actividad de las ATPasas se midió como la liberación de fosfato inorgánico expresado como η moles de Pi / mg proteína / h.

Con el fin de identificar las membranas presentes en la muestra como función de la actividad de sus ATPasas específicas, se añadieron al medio de hidrólisis diferentes inhibidores de actividad de ATPasa, que se enlistan a continuación:

Tabla 4.3. Concentraciones de inhibidores específicos de enzimas con actividad de hidrólisis de ATP.

Inhibidor	Enzima inhibida	Concentración final
Tris-NO ₃	ATPasa de tonoplasto	200 mM
Na ₃ VO ₄	ATPasa de membrana plasmática	200 μ M
NaN ₃	ATPasa mitocondrial	2 mM
Na ₃ MoO ₄	Fosfatasa ácida	0.5 mM

Dado que las concentraciones finales de inhibidor estaban reportadas para embrión de maíz, se realizó una selección de concentraciones óptimas de los inhibidores para capa de aleurona, lo que se muestra en los resultados.

4.6.2. CITOCROMO C REDUCTASA COMO MARCADOR DE MEMBRANA DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO.

La reducción del citocromo C por la acción de la citocromo C reductasa se midió por el incremento en la densidad óptica a 550 nm. La reducción es lineal durante un minuto, pero disminuye más rápido cuando más del 40% del citocromo C ha sido reducido. (Mahler R., 1955).

Medimos la actividad de la enzima pura (Citocromo C Reductasa porcina, SIGMA Chemical Co.) a diferentes concentraciones de citocromo C oxidado, para establecer la concentración saturante de este sustrato para la enzima, (Figura 4.1).

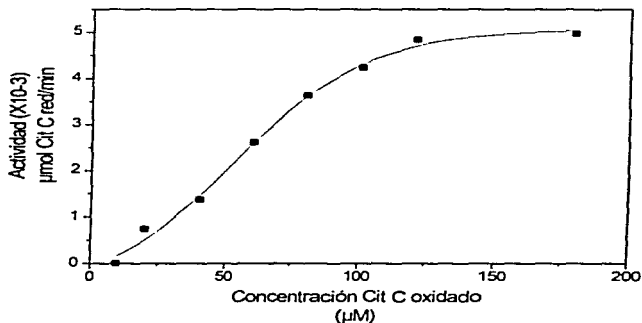


Figura 4.1. Efecto de la variación de la concentración de citocromo C oxidado en la actividad de la citocromo C reductasa.

De la Figura 4.1, podemos ver que la concentración óptima de citocromo C para el ensayo resultó de 180 μM .

También medimos la actividad de la enzima con diferentes cantidades de proteína del homogenado sin núcleos, para determinar la mínima cantidad de proteína necesaria para detectar la actividad de la enzima, (Figura 4.2).

Dentro de la zona lineal de la curva, seleccionamos la cantidad de 20 μg de proteína, pues con ésta se registró una actividad considerable para llevar a cabo nuestros ensayos. Se conservaron los 20 μg de proteína para todas las fracciones.

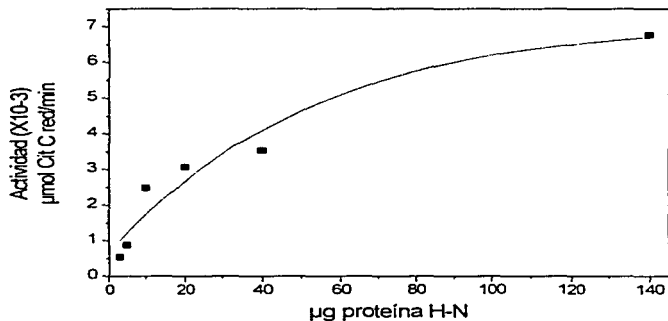


Figura 4.2. Variación de la cantidad de proteína de la fracción H-N para la actividad de la citocromo C reductasa.

Finalmente, el medio de reacción en un volumen total de 1 ml contuvo:

Tabla 4.4. Concentraciones finales de los componentes del medio de reacción para determinar la actividad de la citocromo C reductasa.

Reactivo	Concentración final
Citocromo c (oxidado)	180 μ M
NADPH	3 mM
Cianuro de potasio	5 mM
Antimicina	1.4 μ M
Amortiguador Fosfatos pH 7.2	50 mM

La reacción se inició añadiendo 20 μ g de proteína de H-N, FS o FI. Se leyó el incremento de la absorbencia a 550 nm cada 10 s durante 1.5 min en un espectrofotómetro SHIMAZDU UV160U. De la pendiente de la curva obtenida se calculó la actividad específica expresada como η moles de citocromo C reducido por minuto por mg de proteína. El coeficiente de extinción del citocromo C a 550 nm es 18.5 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$.

4.6.3. CITOCROMO C OXIDASA COMO MARCADOR DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

La oxidación del citocromo C catalizada por la citocromo C oxidasa se midió espectrofotométricamente por la disminución de la absorbencia a 340 nm a 25°C (Green, et al. 1963).

Para determinar las condiciones óptimas para el ensayo, se midió la actividad de la citocromo C oxidasa pura (SIGMA Chemical Co.) variando la concentración de citocromo C reducido, (Figura 4.3).

Pudimos observar que la concentración de citocromo C reducido a la que la enzima se encuentra saturada es de aproximadamente 10 μM .

Por otra parte, medimos la cantidad de proteína necesaria de homogenado sin núcleos para poder detectar la actividad de la enzima, (Figura 4.4).

La cantidad óptima de proteína de H-N para medir la actividad de la enzima resultó de 10 μg . Por ello, empleamos esta misma para todas las fracciones, con fines de estandarización.

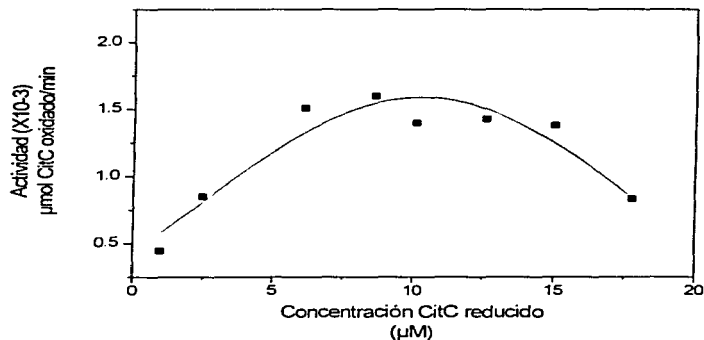


Figura 4.3. Efecto de la variación de la concentración de citocromo C reducido en la actividad de la citocromo C oxidasa.

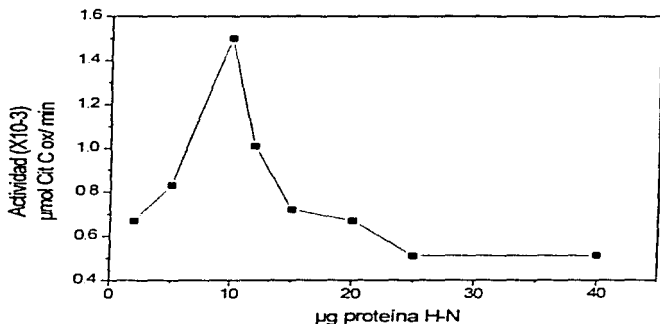


Figura 4.4. Variación de la cantidad de proteína de la fracción H-N para la actividad de la citocromo C oxidasa.

Finalmente, el medio de reacción en un volumen total de 1 ml contuvo:

Tabla 4.5. Concentraciones finales de los componentes del medio de reacción para determinar la actividad de la citocromo C oxidasa.

Reactivo	Concentración final
Citocromo c (reducido)*	12.6 μM
NAD*	361 μM
Buffer Fosfatos pH 7.2	50 mM

* Este reactivo se preparó añadiendo 1 ml de una disolución 1 M de ácido ascórbico a 10 mg de citocromo c oxidado. El citocromo c reducido obtenido se dializó durante 20 hs en 4 l de agua desionizada a 4°C.

La reacción se inició añadiendo 10 μg de proteína de H-N, FS o FI. Se leyó el decremento de la absorbencia a 340 nm cada 10 s durante 1.5 min en un espectrofotómetro SHIMAZDU UV160U. De la pendiente de la curva obtenida se calculó la actividad específica expresada como nmol de Citocromo C oxidado por minuto por mg de proteína. El coeficiente de extinción del NAD^+ a 340 nm es $6.22 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$.

4.6.4. GLUCÁN SINTETASA II (GSII) COMO MARCADOR DE MEMBRANA PLASMÁTICA

La actividad de la glucán sintetasa II fue medida como la incorporación de UDP- $[\text{H}^3]$ -glucosa a un poliglucano, en este caso la celobiosa. De acuerdo a la metodología consultada (Walker, *et al.* 1993), la cantidad de proteína necesaria para determinar la actividad de esta enzima era de 1 μg , así como también la muestra se colocaba sobre un papel filtro Whatman 3MM, donde se lavaba varias veces con una mezcla de metanol/cloroformo.

En los primeros ensayos utilizamos esta técnica, sólo que usamos 10 μg de proteína. Sin embargo, las actividades obtenidas para las muestras resultaron iguales o más bajas que aquellas obtenidas para los blancos. En principio pensamos que teníamos problemas con los lavados de la muestra y que no estábamos eliminando la radiactividad inespecífica de la reacción. Por ello, decidimos modificar la forma de lavar los filtros con la muestra. Esta vez, lavamos los filtros con una mezcla de 150 ml de etanol y 350 ml de acetato de amonio 0.5 M pH 3.6, (Kauss, *et al.* 1983); así como también, agregamos 0.5 mg de celulosa sólida para arrastrar el oligosacárido sintetizado. No obstante, volvimos a tener los mismos resultados. Probablemente, con estos lavados, los carbohidratos en la mezcla de reacción pasaban a través del filtro y sólo conservábamos la radiactividad inespecífica.

Según reporta Ray (1979), dado que la cantidad de material particulado presente en la muestra es muy pequeña, para detener la reacción se añade etanol al 70% para precipitar los carbohidratos. Añadimos también UDP-glucosa 2 mM para eliminar la radiactividad inespecífica; además de que se deben agregar 100 µg de proteína de membranas enzimáticamente inactivas, que funcionan arrastrando los oligosacáridos. Optamos por no emplear papel filtro para poner la muestra, sino que la pastilla formada después del último lavado con etanol al 70% se resuspendió en 300 µl de la misma disolución y se añadió directamente al vial con el líquido de centelleo.

Con esta metodología, se realizó un experimento en el que se emplearon diferentes cantidades de proteína de FS (donde esperábamos la mayor actividad de GSI) para establecer la mínima cantidad de proteína requerida para el ensayo. Ya que otra posible causa por la que el ensayo no estaba resultando bien era la cantidad de proteína que estábamos empleando (Figura 4.5).

Con este experimento, comprobamos que 10 µg de proteína no era suficiente para obtener actividades detectables de la glucán sintetasa II. Así, en los ensayos posteriores utilizamos 200 µg de proteína de todas las fracciones (FS, FI y H-N).

Finalmente, el medio de ensayo contenía en un volumen total de 200 µl:

Tabla 4.6. Concentraciones finales de los componentes del medio de reacción para determinar la actividad de la glucán sintetasa.

Reactivo	Concentración final
HEPES-KOH (pH 7.25)	50 mM
Sacarosa	330 mM ^a
Digitonina	0.006%
Glicerol	16.0% ^a

Tabla 4.6. Concentraciones finales de los componentes del medio de reacción para determinar la actividad de la glucán sintetasa (Continuación).

Reactivo	Concentración final
Ditiotreitol (DTT)	2 mM
Espermina	2 mM
Celobiosa	20 mM
Cloruro de calcio	0.2 mM
UDPG	2 mM
UDP-[³ H] glucosa	20 GBq/mol

*Se considero que las vesículas de membranas se encontraban resuspendidas en un buffer que contiene glicerol y sacarosa, de manera tal que sólo se agregó el glicerol y la sacarosa necesaria para alcanzar las concentraciones finales indicadas

La reacción se inició con la adición de 200 µg de proteína de las fracciones H-N, FS o FI. Se incubó durante 30 min a 25°C. La reacción se detuvo por la adición de etanol al 95% hasta llegar a una concentración final del 70%. Esto se realiza con el fin de precipitar los oligosacáridos sintetizados por acción de la enzima.

Se añadieron 100 µg de proteína de membranas enzimáticamente inactivas (fracción microsomal hervida durante 10 min) y se centrifugó por 1 min a 13000 RPM. Se eliminó el sobrenadante. La pastilla formada se resuspendió y lavó en 300 µl de etanol al 70% y 2 mM UDPG, repitiendo el procedimiento anterior tres veces. La pastilla finalmente se resuspende en 300 µl de la misma disolución y se transfiere a un vial con 5 ml de líquido de centelleo. Se contó la radiactividad incorporada a la muestra en un Liquid Scintillation Counter Beckman LS6000 IC. La actividad específica se expresó en ηmol de glucosa incorporada por minuto por mg de proteína que se calculó a partir de la radiactividad específica contenida en la mezcla de reacción.

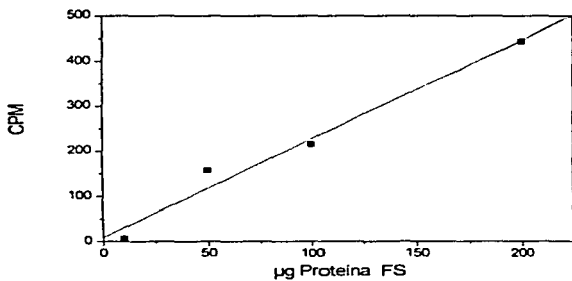


Figura 4.5. Variación de la cantidad de proteína de la fracción FS en la actividad de la glucán sintetasa II.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE LOS POLÍMEROS EN EL SISTEMA DE REPARTO DE FASES

La purificación de membrana plasmática por medio de un sistema de reparto en dos fases de Dextrán/polietilenglicol (PEG) ha mostrado ser un método cuya eficiencia es por mucho mayor a la de los métodos tradicionales, como lo es la centrifugación en gradientes de sacarosa. La superioridad del reparto de fases reside en el hecho de que la separación de las vesículas membranales se realiza en función de sus propiedades superficiales. La centrifugación en gradientes de sacarosa separa las vesículas membranales de acuerdo a su tamaño o densidad. La densidad de la membrana plasmática (1.14-1.17 g/ml) es muy similar a la de las membranas mitocondriales (1.15-1.17 g/ml), membranas

de aparato de Golgi (1.12-1.15 g/ml), así como la del retículo endoplásmico rugoso (1.15-1.17g/ml), por lo que la separación en este tipo de gradientes no es muy eficiente. Por otra parte, las propiedades superficiales de la membrana plasmática son muy diferentes de las de las membranas intracelulares. Por lo que con una concentración óptima del sistema de dos fases, se pueden obtener preparaciones de vesículas de membrana plasmática de alta pureza localizadas en la fase superior del sistema, que corresponde a la de PEG (Larsson, *et al.* 1987).

Con el fin de determinar las condiciones óptimas para la separación, se varió la concentración de los polímeros del sistema de fases. De la literatura, escogimos una concentración de 6.2% Dextran/PEG (Sánchez-Nieto, 1994), que nos sirvió como base para preparar varios sistemas de reparto en concentraciones menores y mayores a esta concentración inicial.

El reparto de fases se realizó en sistemas que consistieron en la mezcla de los polímeros a las diferentes concentraciones (con un peso total de 2.7 g) y una cantidad de proteína (de la fracción de homogenado sin núcleos o H-N) similar para todos los sistemas preparados, y suficiente para que el peso del sistema fuera de 3.6 g.

Después de llevar a cabo el reparto de fases y recuperar las vesículas membranales obtenidas en la fracción superior del sistema (FS), determinamos la cantidad de proteína recuperada en cada una de estas fases. La proteína representa una medida indirecta de la cantidad de vesículas membranales presente en la fase (Tabla 5.1).

Como podemos observar en la tabla, la cantidad de proteína, y por tanto, la cantidad de vesículas membranales recuperadas varía en función de la concentración de polímeros utilizada. El mayor rendimiento en la recuperación

de vesículas membranales lo obtuvimos a una concentración de 6.5% Dextrán/ 6.5% PEG. Los experimentos posteriores, por lo tanto los realizamos con esta concentración de polímeros.

Tabla 5.1. Efecto de la variación de la concentración de los polímeros en la recuperación de proteína en FS.

Concentración Dextran/PEG (%)	Proteína recuperada (µg)	Recuperación (%)
5.5*	—	—
6.2	273.6	1.71
6.5	648.4	4.05
7.0	193.6	1.21

* A esta concentración de polímeros no hubo separación de fases

5.2. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD ÓPTIMA DE PROTEÍNA A CARGAR EN EL SISTEMA DE FASES.

La cantidad de proteína cargada en los sistemas de fases es importante en cuanto a que influye en la eficiencia de separación y recuperación membranal (Sánchez-Nieto, 1994). Por ello, a un peso fijo de sistema de fases se le adicionaron diferentes cantidades de proteína. Después de mezclar y separar las fases, en cada una de estas se cuantificó proteína, la cual refleja la eficiencia en la separación y recuperación de membranas (Figura 5.1).

El porcentaje de proteína recuperada en la fracción superior (FS), que corresponde a la fase enriquecida en membrana plasmática, varió dependiendo de la cantidad de proteína adicionada al sistema. Cantidades de proteína menores a los 2 mg disminuyeron notablemente la recuperación de proteína en FS. Sin embargo, la recuperación no se incrementó al aumentar la cantidad de proteína cargada en el sistema, más aún cantidades mayores de 2.5 mg

disminuyeron la eficiencia de la recuperación. Esto sugiere que la capacidad de reparto del sistema se saturó (Figura 5.1).

La cantidad de tejido utilizada para cada experimento fue de 150 aleuronas. En promedio, la cantidad de proteína obtenida en el sobrenadante de 5000 x g. que corresponde a una fracción de homogenado sin núcleos o H-N, fue de 13 mg.

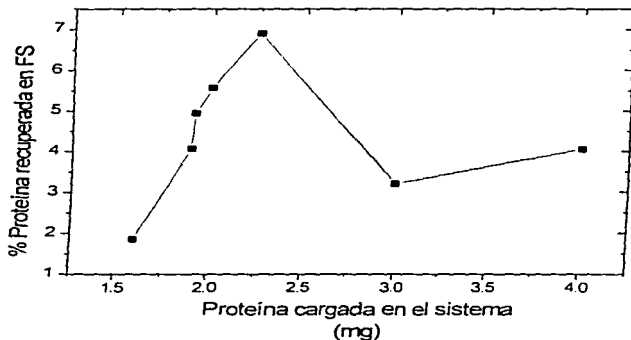


Figura 5.1. Efecto de la proteína cargada en el sistema de fases en la eficiencia de la recuperación membranaral. El sistema de fases fue de 2.7 g y se ajustó a un peso de 3.6 g con proteína de la fracción cruda (H-N)

Sin embargo, la concentración de proteína recuperada ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en cada experimento varió (Tabla 5.2), aún cuando la proporción de tejido a amortiguador utilizada en la homogenización fue constante. Esta variación se

debió al hecho de que el volumen recuperado después de centrifugar a 5000 X g en cada experimento fue diferente. Debido a esta variación, el volumen de homogenado (realizado en Tris/HCl 70 mM) cargado en el sistema de fases fue distinto y por tanto el peso del sistema se tuvo que ajustar a 3.6 g con un amortiguador de fosatos 50 mM pH 7.8 conteniendo KCl 3 mM. Como consecuencia, la concentración de K^+ y Cl^- en el sistema variaron de experimento a experimento (Tabla 5.2). Se ha reportado que la eficiencia de la separación y recuperación del sistema varía con la concentración de estos iones (Gibrat, *et al.* 1990 y Larsson, *et al.*). Por lo anterior fue necesario analizar si la eficiencia de separación y recuperación del sistema era diferente en los diversos experimentos. En la tabla 5.2, se observa que la concentración de K^+ en el sistema no varió de manera importante (2.25 a 2.86 mM), mientras que la de Cl^- sí cambió de manera significativa (15.7 a 22.8 mM). Sin embargo, la cantidad de proteína recuperada en FS, expresada como porcentaje del total cargado, no se modificó de forma significativa.

Tabla 5.2. Efecto de la concentración final de K^+ y Cl^- en la eficiencia de reparto y recuperación de proteína membranal.

Proteína cargada mg	Concentración de Proteína en H-N mg/ml	Buffer de ajuste ml	[K^+] final mM	[Cl^-] final mM	Proteína recuperada %
2.00	1.70	0.048	2.35	22.8	5.57
2.22	1.77	0.014	2.28	24.4	6.90
1.90	2.05	0.276	2.86	17.9	4.06
1.95	2.41	0.057	2.60	15.7	4.01
1.80	1.98	0	2.25	17.8	5.68

El peso de los sistemas fue escalado a 3.6 g, así como también se calculó cantidad de buffer de ajuste añadida al sistema en función de este peso.

5.3. RENDIMIENTO DEL AISLAMIENTO DE LAS VESÍCULAS MEMBRANALES

Una vez seleccionada la concentración de los polímeros y la cantidad de proteína óptima a cargar, los sistemas de fases preparados fueron escalados a sistemas mayores; y se estudió si esta modificación afectaba las características del sistema en cuanto a recuperación y distribución de las vesículas membranales (Tabla 5.3).

La proteína total recuperada después del reparto de fases se conservó alrededor del 12%. En general, la cantidad de proteína membranal en la fracción inferior (FI) fue entre 30 y 50% mayor que en la FS, con excepción de dos experimentos en los que se encontró igual cantidad de proteína membranal en ambas fases (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Recuperación y distribución de la proteína después del reparto de fases.

Peso del sistema	Proteína cargada (H-N)	Proteína recuperada (FS)		Proteína recuperada (FI)		Proteína total recuperada del reparto
		µg	%	µg	%	
g	mg	µg	%	µg	%	%
7.2	4.00	223.0	5.57	294.7	7.36	12.93
7.2	4.45	307.5	6.90	265.7	5.90	12.80
12.0	6.30	256.0	4.06	464.0	7.36	11.42
12.0	6.50	261.0	4.01	520.0	8.00	12.01
36.0	18.00	1,024.0	5.68	788.0	4.30	12.05

5.4. ACTIVIDAD DE ATPASAS COMO MARCADORES DE MEMBRANA

La pureza de las membranas obtenidas en FS se determinó utilizando las ATPasas de diferentes membranas como marcadores. Medimos entonces la

actividad de las ATPasas de tonoplasto, de membrana plasmática y de mitocondria, así como la de la fosfatasa ácida. Esta determinación se realizó midiendo la actividad de hidrólisis de fosfatos cuando se añadía un inhibidor específico para cada una de las ATPasas. Esto, por lo tanto, nos daba una medida indirecta de la actividad de cada tipo de ATPasa. Esta se calculó por la diferencia entre la actividad total (medida en ausencia de inhibidor) y la medida en presencia del mismo (cuya concentración fue similar a la reportada en la literatura, Sánchez-Nieto, et al. 1994). Los resultados de las primeras determinaciones se muestran en la Tabla 5.4. Cabe aclarar que en cada tabla se muestra un experimento diferente, ya que la cantidad de proteína obtenida en FS y FI es limitante.

Tabla 5.4. Determinación de la actividad de ATPasas de las diferentes membranas en FS (Experimento 1).

Tipo de ATPasa	Inhibidor	Concentración (mM)	Actividad (nmoles Pi/h)	% Actividad ¹
Tonoplasto	KNO ₃	100	n.d.	n.d.
Plasmática	Na ₃ VO ₄	0.15	51.8	28.7
Mitocondrial	NaN ₃	1.0	30.2	16.7
Fosfatasa	Na ₃ MoO ₄	1.0	21.0	11.6
Calculada			103.0	57.0
Total			180.0	100.0

¹ Se tomó como 100% la actividad de ATPasa determinada en ausencia de inhibidores

La actividad total de ATPasa presente en FS fue 43% mayor que la calculada cuando se suma la actividad de cada una de las ATPasas determinadas en la fracción (Tabla 5.4). Esto sugiere que la concentración de los inhibidores no fue la adecuada para suprimir totalmente cada tipo de ATPasa o que el K⁺ utilizado como contraión en el inhibidor de la ATPasa de tonoplasto estuviese activando a las otras ATPasas. Este efecto activador del K⁺ ya ha sido

descrito para otros sistemas en los cuales se determina actividad de ATPasas, (Gibrat, *et al.* 1990).

Tabla 5.5. Efecto de la variación en las concentraciones de los inhibidores en la actividad de las diferentes ATPasas en la fracción H-N.

Tipo de ATPasa	Inhibidor	Concentración (mM)	Actividad (nmoles Pi/h)	% Actividad
TONOPLASTO	TRIS/NO ₃	50.0	315.15	8.05
		100.0	530.30	13.5
		200.0 ¹	712.12	18.2
PLASMÁTICA	Na ₂ VO ₄	0.04	375.75	9.60
		0.08	666.66	17.01
		0.10	639.40	16.31
		0.15	748.50	19.09
		0.20	1087.0	27.75
		0.30	981.80	25.04
MITOCONDRIAL	NaN ₃	1.0	nd ²	nd
		2.0	281.5	7.2
		5.0	3.86	3.86
FOSFATASA	Na ₂ MoO ₄	0.50	430.3	10.98
		1.0	397.0	10.13
		2.0	339.4	8.66
TOTAL ³			3921.2	100
Calculado				64.1

¹ Las celdas sombreadas representan las concentraciones de inhibidor seleccionadas como óptimas. La suma de los porcentajes de actividad obtenidos con estas concentraciones representan el total de actividad calculado.

² n.d. no detectable.

³ Determinada en ausencia de inhibidores.

Para seleccionar la concentración óptima de inhibidor para cada una de las ATPasas, se determinó la actividad de estas enzimas en presencia de diversas concentraciones de su inhibidor en la fracción H-N (Tabla 5.5). Además, para evitar el posible efecto activador del K⁺, se utilizó TRIS/NO₃ como inhibidor de ATPasa de tonoplasto.

De nuevo, la actividad total fue mayor que la calculada, sugiriendo que en el homogenado hay actividad de nucleotidasas, las cuales son capaces de

hidrolizar al ATP, pero no son inhibibles por ninguno de los compuestos utilizados como inhibidores.

Con la concentración de cada inhibidor a la cual se obtuvo la mayor actividad se determinó de nuevo la distribución y recuperación de proteína; la actividad de ATPasa durante el proceso de purificación (Tabla 5.6); y la composición membranal de cada una de las fracciones.

En la tabla 5.6, donde se muestran los resultados de dos experimentos independientes, podemos observar que de la proteína extraída de las aleuronas del 5 al 6% se repartió en FS, que teóricamente corresponde a aquella enriquecida en membrana plasmática; y aproximadamente 3% se localizó en FI, donde se localizarían principalmente membrana de tonoplasto y retículo endoplásmico. Alrededor del 3% de la actividad de hidrólisis de fosfato se encontró localizada en la fracción del sistema que correspondía a las membranas plasmáticas. La actividad de ATPasa distribuida hacia la parte inferior del sistema no fue reproducible.

Tabla 5.6. Distribución y recuperación de proteína y actividad de ATPasa durante el proceso de purificación.

Fracción	Exp.	Proteína (mg)	Actividad		Recuperación (%)	
			total ¹	específica	Proteína	ATPasa
H-N	2	13.88	36,827.8	2,653.3	100	100
	3	11.98	20,594.3	1,718.2	100	100
FS	2	0.88	1,101.0	1,251.1	6.3	3.0
	3	0.59	581.0	984.8	4.9	2.8
FI	2	0.67	867.2	1,294.4	4.8	2.4
	3	0.16	172.1	1,075.7	1.36	0.8

¹La actividad total está dada en nmoles P_i / h. La actividad específica está dada en nmoles P_i / h mg proteína. El reparto de fases para ambos experimentos se realizó en las mismas condiciones; así como la determinación de la actividad de ATPasas.

También, podemos observar (Tabla 5.6) que más del 90% de actividad de hidrólisis de fosfato se pierde durante el reparto de fases, ya que la actividad total de estas enzimas detectada en FS y FI suma tan sólo de 3 a 6% de la medida en el H-N. Esto podría deberse a que la mayor parte de actividad en el H-N se debe a fosfatasa solubles y/o vesículas membranales que al pasar por el reparto quedan disueltas en el lavado de los polímeros de las fases.

Para demostrar si cada una de las fracciones del sistema estaba enriquecida en un tipo de membrana, se determinó la actividad de la ATPasa característica de cada tipo membranar. Los resultados (Tabla 5.7) indican que del total de ATPasa determinada en presencia de los diversos inhibidores, la fosfatasa contribuye, dependiendo de la fracción y la repetición analizada, desde el 3% hasta el 76%. Asimismo, la distribución de actividad sensible a NO_3^- y la sensible a VO_4^{3-} es similar en ambas fases, lo que indica que ninguna de ellas está enriquecida en algún tipo de membrana celular. Por otro lado, en general, la actividad de la membrana mitocondrial fue menor del 35%, o bien, no se detectó. En la tabla 5.7, también se puede ver que la suma de la actividad de las diferentes ATPasas fue mayor que la determinada como ATPasa total (Tabla 5.6).

Sólo en el experimento 2 (Tabla 5.7), la actividad de ATPasa calculada en FS como actividad total es menor que la actividad total medida en ausencia de inhibidor. Sin embargo, este comportamiento no se repite en ningún otro caso. Por ejemplo, para el experimento 3 (Tabla 5.7), la suma de las actividades totales calculadas de las diferentes ATPasas para ambas fases sobrepasa el valor de actividad medido.

Dado que de los dos experimentos realizados, uno indica que la actividad de la ATPasa en FS ha sido sobreestimada y el otro que ha sido subestimada lo que se hizo fue repetir el experimento midiendo sólo la composición de ATPasas

en FS (Tabla 5.8).

Tabla 5.7. Determinación del tipo de membranas y su abundancia en cada fracción del sistema de fases.

Tipo de membrana	FS				FI			
	2 ¹		3 ¹		2		3	
	Act. ²	%Act.	Act.	% Act.	Act.	% Act.	Act.	%Act.
Tonoplasto	352.0	32.0	530.9	54.0	474.6	54.0	72.0	41.0
Plasmática	321.7	29.2	292.3	29.7	532.3	60.6	51.8	29.5
Mitocondrial	n.d. ³	n.d.	84.3	8.5	320.1	36.4	---	---
Fosfatasa	37.0	3.3	324.7	32.9	150.6	17.1	134.3	76.6
Sumatoria	710.7	64.5	1232.2	125.1	1477.6	168.1	258.1	147.1
Total ⁴	1101.0	100.0	984.8	100.0	877.6	100.0	175.3	100.0
%Diferencia	-35		+25		+68		+47	

¹ Experimentos independientes

² Actividad total dada en nmoles P_i/h

³ n.d. no detectable

⁴ Determinada en ausencia de inhibidores

De nuevo la actividad de ATPasas fue mucho mayor que la determinada experimentalmente en ausencia de los inhibidores (Tabla 5.8). Tomando en conjunto los resultados de la Tabla 5.8 (FS) y la Tabla 5.9 se puede concluir que la magnitud del incremento no fue constante.

Este tipo de resultados se puede explicar si los inhibidores están realizando un efecto cruzado inespecífico en la actividad de las ATPasas. Por ejemplo, podría ser que cada tipo de inhibidor suprima con diferente grado de especificidad la actividad de las diversas ATPasas de tal forma que en presencia de inhibidor se esté manifestando mayoritariamente un tipo de ATPasa; pero también una fracción de las otras. Esto nos lleva a sobreestimar la actividad de cada tipo de ATPasa. Por otro lado, este tipo de resultado podría también ser producto de la presencia de una nucleotidasa presente en alguno de los tipos de

membrana o asociada de manera inespecífica.

Tabla 5.8. Abundancia de ATPasas en FS.

Tipo membranal	Exp.	Actividad (nmoles Pi/h)		%Actividad	
		4	5	4	5
Tonoplasto		n.d.	123.7	n.d.	79.4
Plasmática		131.1	137.0	89.2	88.0
Mitocondrial		44.1	78.6	30.0	50.5
Fosfatasa		73.0	86.3	49.6	55.4
Sumatoria		248.1	425.6	168.8	273.3
Total determinado		147.0	155.7	100.0	100.0
Diferencia				+68.8	+173.3

Por otra parte, se determinó la actividad de las ATPasas en la fracción FS₂ (Tabla 5.9). Esta fracción se obtuvo al hacer pasar una FS a través de otra mezcla de fases donde la mezcla de polímeros se separó previamente añadiendo agua en vez de homogenado sin núcleos. Una vez realizado esto, se eliminó la fase superior de esta mezcla y se reemplazó con la fracción superior de un sistema de fases corrido con proteína de H-N. Se encontró que en efecto la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática fue aproximadamente un 20% más alta que la de la fracción FS. Esto era de esperarse dado que las membranas están siendo sometidas a otro paso de purificación. La actividad total de la membrana plasmática representa alrededor del 50% (exp. 5 y 6), pero encontramos discrepancia con el experimento 7, donde tenemos un 90% de actividad de esta enzima. Además, hubo diferencias importantes en cuanto la actividad de las otras ATPasas, es decir que no encontramos una tendencia definida en su comportamiento. Por ejemplo, en los experimentos 5 y 6 no detectamos ATPasa mitocondrial, mientras que en el 7 encontramos un 40% de actividad de esta enzima. Por otra parte la actividad de la ATPasa de tonoplasto fluctuaba desde el 4 al 66%, así como también se detectó contaminación por

fosfatasa. Por ello, seguimos pensando que a pesar de haber realizado dos pasos de purificación de la membrana plasmática, no pudimos establecer la pureza de nuestra preparación a través del uso de las ATPasas de membrana como marcadores. En el caso de FS₂, volvemos a observar que las actividades totales medidas no coinciden con la sumatoria de las actividades de las ATPasas medidas por separado con inhibidores. En este caso, solo tenemos un experimento en el que la actividad medida es mucho menor que la sumatoria de las actividades. En los experimentos 5 y 6, la diferencia de las actividades no es muy grande, por lo que quizás lo podríamos explicar como error experimental. Sin embargo, el hecho de que esto mismo haya sucedido para las determinaciones de actividad para FS, sugiere que es factible que exista otra razón para este comportamiento.

Tabla 5.9. Determinación de la actividad de ATPasas de las diferentes membranas en la fracción FS₂.

Fracción FS ₂	Actividad total			% Actividad		
	5	6	7	5	6	7
Tonoplasto	13.4	92.1	66.0	3.6	27.6	66.0
Plasmática	168.0	174.0	91.3	45.0	52.2	91.3
Mitocondrial	n.d. ²	n.d.	41.4	n.d.	n.d.	41.4
Fosfatasa	141.7	n.d.	90.0	38.0	n.d.	90.0
Sumatoria	323.1	266.1	288.7	86.6	79.8	288.7
Total medida	373.3	333.0	100.0	100	100	100
% Diferencia	-13.0	-20.0	+188.0	-13.4	-20.2	+88.7

¹ La actividad total está dada en nmoles Pi / h

² n.d. no detectable

Los resultados de distribución de actividad de los diversos tipos de ATPasas en la fracción FS y FS₂ del gradiente se pueden clasificar en tres grupos, de acuerdo a la diferencia entre la actividad de la ATPasa presente en el sistema de fases y la calculada de la sumatoria de las actividades de cada tipo

de ATPasa. Por ejemplo, en los experimentos 1 (Tabla 5.4), 5 (Tabla 5.7), 3 y 4 (Tabla 5.8), la actividad total calculada es menor que la determinada en ausencia de inhibidores, mientras que para los experimentos 3 y 4 (Tabla 5.4), 6 (Tabla 5.7), y 7 (Tabla 5.8) la sumatoria de las actividades es mucho mayor que la medida sin inhibidores. Sólo en el caso del experimento 2 (Tabla 5.4) la cantidad de actividad medida y la calculada coinciden.

Para explicar el hecho de que la actividad total sea menor que la sumatoria de las actividades medidas por separado, pudiese suceder que los inhibidores además de suprimir la actividad de su respectiva ATPasa estuviesen estimulando la actividad de hidrólisis de fosfatos de otra ATPasa o fosfatasa.

Existe evidencia que muestra que el K^+ (Gibrat, *et al.* 1990) y el NO_3^- desde una concentración de 50 mM (Joaquim, *et al.* 1994) estimulan la actividad de la ATPasa de membrana plasmática. La activación que pudiese haber habido por el K^+ quedó descartada al momento de haber cambiado el inhibidor de la ATPasa de tonoplasto de KNO_3 a $TRIS/NO_3^-$. Sin embargo, la concentración de NO_3^- empleada en el ensayo es cuatro veces mayor que la concentración mínima reportada para que este catión estimule la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática. Por ello, es factible que al inhibir a la ATPasa de tonoplasto no hayamos medido su actividad real por tener hidrólisis de fosfatos adicional por parte de la ATPasa de membrana plasmática.

Además, se ha reportado que el cloruro puede estimular la actividad de las ATPasas de retículo endoplásmico y tonoplasto hasta en un 37% y 19%, respectivamente (Joaquim, *et al.* 1994). La concentración de cloruros presente en el buffer de resuspensión de las vesículas membranales es de tan solo 5 mM de $TRIS/HCl$, así como el medio de hidrólisis de fosfatos del ensayo contiene 10 mM de $MgCl_2$. No obstante, la activación de las ATPasas del retículo endoplásmico y tonoplasto por este catión se da a concentraciones mayores de

20 mM. Por esto último podemos descartar la posible activación de estas enzimas por efecto de los cloruros.

Esta posible activación cruzada de las diferentes ATPasas por la presencia de ciertos iones, podría responder al porqué la actividad total medida es menor a aquella obtenida de la suma de las actividades individuales de cada ATPasa. Ya que al estimular alguna actividad de hidrólisis de fosfato, la actividad de la ATPasa inhibida parece ser menor que la real, puesto que esta última se obtiene de la diferencia entre la actividad total y la actividad de todas las ATPasas y fosfatasa no inhibidas, lo que sería equivalente a detectar una inhibición parcial de la ATPasa.

Por otra parte, existe el caso en el que la actividad total medida es por mucho mayor a la sumatoria de las actividades individuales. Esto sería indicio de que existe cierta hidrólisis de fosfatos que no es suprimible con ningún inhibidor empleado en nuestro ensayo.

Como ya se mencionó, las fosfatasa son enzimas solubles cuya presencia en la muestra es aleatoria. En la capa de aleurona se han caracterizado nueve isoenzimas de la fosfatasa ácida. Tres de ellas se encargan de la movilización del fitato, por lo que se encuentran frecuentemente asociadas a los cuerpos proteicos. Otras dos se encuentran principalmente en la parte interna de la pared celular y al parecer la presencia de ácido giberélico estimula la digestión de pequeñas porciones de pared celular por donde estas fosfatasa salen al espacio periplásmico. Las últimas, por su parte, son citoplásmicas y pueden o no ser secretadas por la inducción con ácido giberélico (Gabard, *et al.* 1986).

Como podemos ver en los resultados, la contaminación por fosfatasa no es constante para todas las preparaciones. Dado que nuestro método de

homogenización no garantiza la eliminación total de la pared celular, como lo haría un método enzimático, pequeñas partículas de ésta podría quedar adosada a las vesículas membranales. Asimismo, pueden existir cuerpos protéicos en nuestra preparación. Probablemente, el acceso del MoO_4^{2-} a las fosfatasa asociadas a la pared celular y a los cuerpos protéicos es difícil, por lo que no llegan a ser inhibidas y detectamos hidrólisis de fosfatos adicional.

La activación cruzada de las ATPasas y la hidrólisis de fosfatos por fosfatasa contaminantes no inhibidas pueden ser simultáneos, por lo que esperaríamos que sus efectos se contrarrestaran y pudiésemos tener actividades totales medidas similares a las calculadas. No obstante, esto no es lo que muestran los resultados. La contaminación con fosfatasa es muy variable; si ésta es muy alta podría sobrepasar el efecto de la activación cruzada por lo que tenemos porcentajes de activación muy por encima del 100%.

Todo esto nos llevó a pensar que el uso de las ATPasas de membrana como marcadores no era muy fiable para determinar exactamente el rendimiento del aislamiento y la pureza de las membranas. Esta metodología, sin embargo, nos puede dar una idea aproximada de qué tanta contaminación por actividad de fosfatasa tenemos en las preparaciones, así como de qué tipos de membranas existen en las muestras. No obstante, esto nos indicó que era necesario implementar la medición de otras enzimas marcadoras de membrana que nos permitieran establecer la eficiencia de la purificación de nuestro método.

5.5 DISTRIBUCIÓN DE LAS ENZIMAS MARCADORAS DE MEMBRANA MITOCONDRIAL, RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Y PLASMÁTICA EN LAS DIFERENTES FRACCIONES DEL REPARTO DE FASES

En la tabla 5.10, se muestra la distribución de la actividad de la citocromo C

oxidasa (marcador de membrana mitocondrial), en las fracciones homogenado total, homogenado sin núcleos, FS y FI.

Podemos observar que perdemos el 86% de la actividad de la citocromo C oxidasa desde la obtención del homogenado sin fracción nuclear. Esto significa que una gran porción de las mitocondrias se sedimenta a 5000 RPM, o bien que es arrastrada por partículas mayores como núcleos y fragmentos de pared celular.

Tabla 5.10. Distribución de las enzimas marcadoras de membrana mitocondrial en las diferentes fracciones del reparto de fases.

Fracción	Actividad total de Cit C oxidasa (nmoles cit C ox/min)	Actividad específica Cit C oxidasa (nmoles cit C ox/min mg proteína)
H-T ¹	3,743.5	355.0
H-N	529.5	58.5
FI	15.85	50.0
FS	14.5	73.5

¹H-T es el homogenado crudo obtenido antes de la centrifugación a 5000 RPM

Después del reparto de fases, perdemos 94% de la actividad total de esta enzima. La actividad restante queda repartida en las fases del reparto FS y FI en un 48% y 52%, respectivamente. Podemos decir que las mitocondrias son eliminadas eficientemente de la fracción enriquecida de membrana plasmática. Ya que su actividad sólo representa un 0.07% de la actividad presente en el homogenado crudo y un 2.7% de la del homogenado sin núcleos.

Con respecto al retículo endoplásmico (Tabla 5.11), después del reparto de fases, perdemos 97.4% de la actividad total medida en el homogenado sin núcleos. La actividad restante de la citocromo C reductasa se distribuye en las dos fases del reparto, quedando 70% de ésta en FI. Aparentemente, no

logramos la eliminación total del retículo endoplásmico en la fracción enriquecida en membrana plasmática, ya que aún se detecta 1.8% de la actividad presente en H-N. No obstante, se ha reportado la evidencia de que existe cierta actividad de reductasa dependiente de NADH y NADPH asociada a la membrana plasmática de plantas (Crane, 1989) que puede ser detectada por la reducción de citocromo C. Por ello, sería conveniente detectar la presencia del retículo endoplásmico por medio de otro marcador, ya que lo que estamos considerando como contaminación por este tipo de membrana pudiera ser esta actividad reductora asociada a la membrana plasmática.

Con respecto a la membrana plasmática (Tabla 5.12), después del reparto de fases, podemos ver que perdemos más del 70% de la actividad de la glucán sintetasa II que había en la fracción de homogenados sin núcleos. La actividad restante la encontramos por completo en FS. Esto nos indica que, a pesar de haber perdido una gran porción de la membrana plasmática en el proceso de purificación, toda ella la tenemos en la fase del sistema en la que la esperábamos. La actividad de esta enzima en FI no fue detectable. Asimismo, podemos observar que según la actividad específica de la enzima, hemos enriquecido 4.5 veces la membrana plasmática en FS.

Tabla 5.11. Distribución de las enzimas marcadoras de membrana de retículo endoplásmico en las diferentes fracciones del reparto de fases.

Fracción	Actividad total Cit c reductasa (nmoles cit C red/ min)	Actividad específica Cit C reductasa (nmoles cit C red/min mg proteína)
H-T	n. m. ¹	n. m.
H-N	204.7	54.0
FI	9.1	27.7
FS	3.8	10.0

¹n.m. no medida

Estos resultados nos indican que en efecto enriquecimos FS del sistema de reparto de fases con membrana plasmática. No obstante, seguimos detectando contaminación de membrana mitocondrial y de retículo endoplásmico.

Tabla 5.12. Distribución de las enzimas marcadoras de membrana plasmática en las diferentes fracciones del reparto de fases.

Fracción	Actividad total glucán sintetasa II	Actividad específica glucán sintetasa II
	(nmoles UDPGincorporado/ min)	(nmoles UDPGincorporado/ min mg proteína)
H-T	n. m. ¹	n. m.
H-N	18.1	0.038
FI	n. d. ²	n. d.
FS	4.88	0.175

¹n. m. no medida

²n. d. no detectada.

Los resultados anteriores se encuentran resumidos en la tabla 5.13.

Tabla 5.13. Distribución de la actividad de los diferentes marcadores de membrana con respecto a la fracción H-N.

Fracción	% Actividad		
	Cit C oxidasa	Cit C reductasa	Glucán sintetasa II
H-N	100	100	100
FI	2.99	4.44	n. d. ¹
FS	2.73	1.85	26.96

¹n. d. no detectable.

Sin embargo, hay que considerar que no hemos medido aún la posible contaminación con membrana de tonoplasto. Aún así, pensamos que podríamos aumentar la eficiencia del enriquecimiento en vesículas de membrana plasmática, modificando una vez más la concentración de los polímeros; ya que

la selección de la concentración de éstos para nuestro sistema fue realizada en base a la recuperación de proteína en FS. Por lo que además de considerar este parámetro, se podría determinar la actividad de la GSII en la fracción superior de diferentes sistemas de fases con distinta concentración de polímeros.

6. CONCLUSIONES

- El método de aislamiento y purificación de membrana plasmática de células de capa de aleurona de cebada por reparto en dos fases de polímeros resultó ser un medio adecuado para obtener preparaciones de vesículas de membrana plasmática relativamente puras.
- En cuanto a la selección de la concentración óptima de polímeros para el sistema de reparto, encontramos que a concentraciones de Dextrán/PEG menores al 5.5% p/p las fases no se llegan a separar.
- Comprobamos que, en efecto, la recuperación de vesículas membranales, medidas como proteína en la fase superior del sistema, varía en función de la concentración de los polímeros en el sistema. La recuperación de proteína

muestra un máximo a concentración de 6.5% p/p de Dextrán/PEG. Mientras que a concentraciones menores y mayores a la anterior la recuperación disminuye.

- Existe una cantidad de proteína de H-N cargada en el sistema de reparto con la cual la recuperación de vesículas membranales es óptima.
- Las concentraciones de los iones K^+ y Cl^- presentes en las condiciones de trabajo no fueron determinantes en la recuperación de las vesículas de membrana plasmática.
- El empleo de sistemas escalados con respecto a una base no influye en la recuperación de las vesículas de membrana plasmática, más bien se mantiene en la misma proporción, siempre y cuando se conserve la concentración de polímeros y la relación de proteína cargada/peso del sistema.
- El uso de la actividad de las ATPasas como marcadores de los diferentes tipos de membranas (de tonoplasto, mitocondrial, plasmática) no resultó ser un método ideal para determinar el enriquecimiento en vesículas de membrana plasmática en las FS y FS₂, así como la purificación de este tipo de membrana. Por otra parte, esta técnica sólo nos permitió tener una idea aproximada de la contaminación de la preparación por mitocondria y fosfatasa soluble. Más, la variabilidad de las actividades de la ATPasa de tonoplasto nos indica que requerimos otra forma de medir la contaminación presente por este tipo de membrana.
- Con el uso de otras enzimas marcadoras de membrana, como la Citocromo C oxidasa (mitocondria), Citocromo C reductasa (retículo endoplásmico) y la glucán sintetasa II (membrana plasmática), logramos determinar con mayor

exactitud la eficiencia en el enriquecimiento de membrana plasmática en FS, así como su pureza.

- La actividad de la citocromo C oxidasa indicó que las mitocondrias quedan repartidas de igual manera en ambas fases del reparto (FS y FI). Sin embargo, la actividad de esta enzima específica de membrana mitocondrial contaminante representa una fracción mínima de la actividad medida en H-N.
- La actividad de la citocromo C reductasa se pierde casi completamente después del reparto de fases. La mayor parte de la actividad restante queda distribuida en FI. La fracción de retículo endoplásmico que queda contaminando FS representa tan solo 0.07% de la actividad medida en el homogenado crudo.
- La medición de la actividad de la glucán sintetasa II resultó un marcador adecuado para determinar de forma indirecta la cantidad de vesículas de membrana plasmática obtenidas en el reparto.
- Una gran porción de membrana plasmática se pierde en proceso de purificación. No obstante, toda la actividad de glucán sintetasa II recuperada se localizó en FS. Esta fracción sólo contiene un 5% de las membranas mitocondriales y de retículo endoplásmico presentes en el homogenado inicial.

7. BIBLIOGRAFÍA

Anderson, B.E., Ward, J.M., Schroeder, J.I. (1994) Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Physiol* 104, 1177-1183.

Bethke, P.C., Jones, R.L. (1994) Ca²⁺-Calmodulin modulates ion channel activity in storage protein vacuoles of barley aleurone cells. *Plant Cell* 6, 277-285.

Bush, D.S., Jones, R.L. (1988) Cytoplasmic calcium and α -amylase secretion from barley aleurone protoplasts. *Eur J Cell Biol* 46, 466-469.

Bush, D.S., Sticher, L., van Huystee, R., Wagner, D., Jones, R.L. (1989) The calcium requirement for stability and enzymatic activity of two isoforms of barley

aleurone α -amylase. *J Biol Chem* 264, 19392-19398.

Bush, D.S., Biswas, A.K., Jones, R.L. (1989) Gibberellic acid-stimulated Ca^{2+} accumulation in endoplasmic reticulum of barley aleurone: Ca^{2+} transport and steady-state levels. *Planta* 178, 411-420.

Bush, D.S., Biswas, A.K., Jones, R.L. (1993) Hormonal regulation of Ca^{2+} transport in the endomembrane system of barley aleurone. *Planta*, 189, 507-515.

Carbonell, J., Jones, R.L. (1984) A comparison of the effects of Ca^{2+} and gibberellic acid on enzyme synthesis and secretion in barley aleurone. *Physiol Plant* 63, 345-350.

Crane, F.L. (1989) Plasma membrane redox reactions involved in signal transduction. En *Second Messengers in Plant Growth and Development*, pp. 115-143.

Devlin, R.M., Witham, F.H. (1983) *Plant Physiology*, 4th Edition, Wadsworth Publishing Co., USA.

Gibrat, R., Grouzis, J.P., Rigaud, J., Grignon, C. (1990) Potassium stimulation of corn root plasmalemma ATPase. II. H^{+} pumping in native and reconstituted vesicles with purified ATPase. *Plant Physiol* 93, 1183-1189.

Gilroy, S., Jones, R.L. (1992) Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3591-3595.

Gilroy, S., Jones R.L. (1994) Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone

protoplasts. *Plant Physiol* 104, 1185-1192.

Gilroy, S., Trewavas, T. (1994) A decade of plant signals. *BioEssays*, 16, No. 8, 677-682.

González-Romo P., Sánchez-Nieto, S., Gavilanes-Ruiz M. (1992) A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Anal Biochem* 200, 235-238.

Green, D.E., Ziegler, D.M. (1963) Respiratory Enzymes: Electron transport particles. En *Methods Enzymol* Vol. VI, 416-419.

Hooley, R. (1984) Gibberellic acid controls the secretion of acid phosphatase in aleurone layers and isolated aleurone protoplasts of *Avena fatua*. *J Exper Bot* 35, 822-828.

Hooley, R., Beale, M.H., Smith, S.J. (1991) Gibberellin perception at the plasma membrane of *Avena fatua* aleurone protoplasts. *Planta*, 183, 274-280.

Hooley, R. (1992) The responsiveness of *Avena fatua* aleurone protoplasts to gibberellic acid. *Plant Growth Reg* 11, 85-89.

Hooley R., Smith S.J., Beale, M.H., Walker, R.P. (1993) *In vivo* Photoaffinity labelling of gibberellin-binding proteins in *Avena fatua* aleurone. *Aust J Plant Physiol* 20.

Hooley, R., Smith, S.J., Beale, M.H., Walker, R.P. (1993) *In vivo* photoaffinity labelling of Gibberellin-binding proteins in *Avena fatua* aleurone. *Aust J Plant Physiol* 20, 573-584.

Hookey, R. (1994) Gibberellins: Perception, transduction and responses. Plant Mol Biol 26,1529-1555.

Huttly, A.K., Baulcome, D.C. (1989) A wheat α -amy2 promoter is regulated by gibberellin in transformed oat aleurone protoplasts. EMBO J S, 1907-1913.

Jacobsen, J.V., Chandler, P.M. (1988) Gibberellin and abscisic acid in germinating cereals. En Plant Hormones and their role in plant growth development. Kluwer Acad. Publishers, Ed. P.J. Davies, 164-193.

Jacobsen, J.V., Close, T.J. (1991) Control of transient expression of chimaeric genes by gibberellic acid and abscisic acid in protoplasts prepared from mature barley aleurone layers. Plant Mol Biol 16, 713-724.

Joaquim, A.F., Vale, M.G.P. (1994) Proton transport by a fraction of endoplasmic reticulum and Golgi membranes of corn roots: comparison with the plasma membrane and tonoplast H⁺ pumps. Plant Science 96, 55-68.

Lanahan, M.B., Ho, T.-H. D., Rogers, S.W., Rogers, R.J. (1991) A gibberellin response complex in cereal α -amylase gene promoters. Plant Cell 4, 203-211.

Larsson, C., Widell, S., Kjellbom, P. (1987) Preparation of high-purity plasma membranes. En Methods Enzymol. 148, 558-568.

Lazarus, C.M., Baulcome, D.C., Martienssen, R.A. (1985) α -amylase genes of wheat are two multigene families which are differentially expressed. Plant Mol Biol 5, 13-24.

Libbenga, K.R., Mennes, A.M. (1984) Hormone binding and its role in hormone action. En Plant Hormones and their role in plant growth development. Kluwer

Acad. Publishers, Ed. P. J. Davies, 194-256.

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

Mahler, H.R. (1955) Respiratory Enzymes: DPNH Cythchrome c Reductase. *En Methods Enzymol.*, Vol. II, 688-692.

Napier, R.M., Venis, M.A. (1990) Monoclonal antibodies detect an auxin-induced conformational change in the maize auxin-binding protein. *Planta* 182, 313-318.

Ray, P.M. (1979) Membrane Associated Molecules and Structures: Maize coleoptile cellular membranes bearing different types of glucan synthetase activity. *En Plant organelles* (E. Reid ed.) 135-146.

Rogers, J.C., Milliman, C. (1995) Coordinate increase in major transcripts from the high pI α -amylase multigene family in barley aleurone cells stimulated with Gibberellic acid. *J Biol Chem*, 259, No. 19, 12234-12241.

Rushton, P.J., Hooley, R., Lazarus, C.M. (1992) Aleurone nuclear proteins bind to similar elements of two gibberellin-regulated α -amylase genes. *Plant Mol Biol* 19, 891-901.

Sánchez Nieto, S. (1994) Caracterización de la aparición de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en la germinación de embriones de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica), Facultad de Química, UNAM, México.

Sembdner, G., Parthier, B. (1993) The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol Mol Biol* 44, 569-589.

Skriver, K., Olsen, F.L., Rogers, J.C., Mundy, J. (1991) Cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7266-7270.

Sutliff, T.D., Lanahan, M.B., Ho, T.-H. D. (1993) Gibberellin treatment stimulates nuclear factor binding to the gibberellin response complex in a barley α -amylase promoter. *Plant Cell* 5, 1681-1692.

Walker, R.P., Waterworth, W.M., Beale, M.H., Hooley, R. (1994) Gibberellin-photoaffinity labeling of wild oat (*Avena fatua* L.) aleurone protoplasts. *Plant Growth Reg* 15, 271-279.

Yeagle, P.L. (1993) Membrane Receptors. En *The Membrane of Cells*, Academic Press Inc., 2nd. ed. p.p. 280-295.